

DANIEL CARNEIRO MOREIRA

Metabolismo de Radicais Livres Durante a Diapausa da Lagarta do Girassol (*Chlosyne lacinia*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Orientador: Prof. Marcelo Hermes Lima

BRASÍLIA

2014

DANIEL CARNEIRO MOREIRA

Metabolismo de Radicais Livres Durante a Diapausa da Lagarta do Girassol (*Chlosyne lacinia*)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Biologia Molecular).

Aprovada em 21 de fevereiro de 2014

Prof. Dr. Marcelo Hermes Lima
Orientador

Prof. Dr. Alexis Fonseca Welker
Membro Titular

Dr. Lorena da Silveira Derengowski
Membro Titular

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo apoio, incentivo e reconhecimento;

À Bruna Pla, minha noiva, por sua compreensão e carinho;

Ao professor Marcelo Hermes Lima por: ter me recebido em seu laboratório, ter me introduzido na ciência, ter confiado em mim na realização de projetos ainda como IC, ter me oferecido a oportunidade de trabalhar em diversas facetas da ciência: coleta de campo, ensaios bioquímicos, manutenção de animais, escrita de projetos de pesquisa, escrita de resumos, artigos e capítulo de livro, atuar como revisor de periódicos, realizar apresentações orais nacionais e internacionais, além de muitos outros ensinamentos.

Ao professor Alexis F. Welker, pelos ensinamentos de bancada e de ciência em geral, pela ótima convivência e discussões sobre ciência e outros assuntos;

À professora Elida G. Campos, pela ajuda no desenho de oligonucleotídeos e em outras tarefas, pela ótima convivência e discussões sobre ciência e outros assuntos;

À Debora P. Paula, por abrir as portas de seu laboratório, acreditar na realização deste projeto e pela importante colaboração neste trabalho;

Ao pessoal do LBM/Cenargen, Renata Timbó, Luciana Farias e Gabrielle, pela fundamental ajuda na manutenção da colônia, nos experimentos de biologia molecular e pela convivência;

Ao pessoal do Laboratório de Radicais Livres, especialmente ao Marcus Sabino e à Luana Dalvi pela ótima convivência e discussões sobre ciência e outros assuntos;

Aos ex-alunos do Laboratório de Radicais Livres, Juliana Bicalho e Roberto G. Andrade Junior, por terem me ensinado muito do que eu sei hoje;

Ao Chiquinho pelo apoio técnico e pela ótima convivência;

Ao Laboratório de Biologia Molecular, especialmente ao Bruno, pela execução dos sequenciamentos;

Ao CNPq-Universal e ao INCT Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma) pelo apoio financeiro ao projeto;

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa e ao DPP/UnB pelo auxílio à participação no 14th International Hibernation Symposium.

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

RESUMO

Em diferentes processos de depressão metabólica animal (e.g. hibernação, estivação e diapausa), o sistema antioxidante endógeno exerce relevante papel, sendo um importante componente da maquinaria de adaptação fisiológica. Dentre as situações de depressão metabólica nas quais o metabolismo redox foi estudado, a diapausa destaca-se por ter sido pouco estudada, e menos ainda se conhece sobre o papel de antioxidantes na diapausa de insetos tropicais. O objetivo deste estudo foi identificar adaptações do metabolismo redox associadas à diapausa tropical, utilizando como modelo lagartas do girassol *Chlosyne lacinia*. Neste estudo, foram determinadas as atividades de enzimas do metabolismo intermediário e do sistema antioxidante, além das concentrações de glutatona e de indicadores de estresse oxidativo em homogeneizados de corpo inteiro. Foram analisados animais coletados em três períodos, janeiro e março de 2010 e junho de 2011. Os grupos experimentais foram animais ativos (controle), animais em diapausa por menos de 24 horas, 20, 40, 60 e 120 dias, e animais ativos por 48-72h após 120 dias de diapausa. A atividade de citrato sintase (CS) diminuiu 70% no início da diapausa, sendo restabelecida no final da diapausa. As atividades das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase, glutatona peroxidase e catalase seguiram o mesmo padrão, diminuindo 64%, 51% e 43% respectivamente no início da diapausa e retornando aos valores de animais ativos no final da diapausa. As atividades de glicose 6-fosfato desidrogenase e piruvato quinase permaneceram inalteradas. No início da diapausa, houve um aumento abrupto (360%) da atividade de isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (ICDH), cuja atividade permaneceu elevada até o quadragésimo dia de diapausa. A atividade de glutatona transferase (GST) aumentou em resposta à diapausa, nas primeiras 24 horas de diapausa de animais amostrados em 2011 (370%). Em janeiro e março de 2010, o aumento da atividade de GST foi influenciado por variações na atividade dos grupos controles. As concentrações de equivalentes de glutatona (GSH-eq), glutatona reduzida (GSH) e de glutatona dissulfeto (GSSG) diminuiriam significativamente durante a diapausa e retornaram aos níveis do controle após a diapausa. A razão GSSG/GSH-eq permaneceu inalterada. As concentrações de TBARS e proteínas carboniladas foram reduzidas ou permaneceram inalteradas durante a diapausa. A diminuição da atividade de CS sugere redução do metabolismo aeróbico, também observada em diferentes casos de diapausa. Uma menor potencial de produção de espécies reativas de oxigênio em conjunto com os mecanismos de economia energética durante a diapausa podem explicar a diminuição dos níveis de antioxidantes endógenos. O início da diapausa é marcado por um elevado potencial de produção de NADPH, que pode ser empregado no sistema antioxidante, na síntese de ácidos graxos e na síntese de polióis – servindo como um mecanismo de proteção à desidratação. A elevada atividade de GST, observada também em outros insetos em diapausa, pode exercer funções além da destoxificação de xenobióticos, incluindo a ligação e transporte de biomoléculas. A ausência de evidências de aumento de estresse oxidativo e de desequilíbrio redox indica que *C. lacinia* apresenta adaptações bioquímicas eficientes para sobreviver às transições metabólicas de entrada e saída da diapausa.

Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, antioxidantes, glutatona, glutatona transferase, depressão metabólica, hibernação.

ABSTRACT

Animals challenged with adverse environmental conditions rely on metabolic depression as an important adaptive response. Endogenous antioxidant defenses play important roles in different metabolic depression processes (e.g. hypoxia tolerance, freezing, hibernation, estivation and diapause). Among the situations of metabolic depression in which the redox metabolism has been addressed, diapause is one of the least studied, especially in tropical insects. The aim of this work was to identify adaptations of the redox metabolism associated to tropical diapause employing as an animal model the bordered patch *Chlosyne lacinia* caterpillars. The determination of antioxidant and intermediary metabolism enzymes activity and of glutathione and oxidative stress markers concentrations were conducted in whole body homogenates. Animals were collected in three different months, January and March (2010), and June (2011). Experimental groups were active animals (control), diapausing animals for 0-24 hours, 20, 40, 60 and 120 days, and post-diapause active animals. Citrate synthase (CS) activity decreased (70%) at the diapause beginning and returned to control levels at the end of diapause. The activities of the antioxidant enzymes ascorbate peroxidase, catalase and glutathione peroxidase (selenium independent) also decreased by 64%, 51% and 43% respectively at the diapause beginning and returned to control levels at the end of diapause. The activities of glutathione reductase and selenium dependent glutathione peroxidase were not detected in *C. lacinia*. There were significant correlations between antioxidant activities and CS activity. Glucose 6-phosphate dehydrogenase and pyruvate kinase activity remained unchanged in response to diapause. Isocitrate dehydrogenase (NADP⁺) activity increased at diapause beginning and remained higher than control until the 40th day of diapause. Glutathione transferase (GST) activity increased in response to diapause. In the first 24 hours of diapause GST activity increased by 370%. The concentrations of glutathione equivalents (GSH-eq), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) decreased significantly during diapause and returned to control levels after diapause. Thus, the GSSG/GSH-eq ratio was unaltered. The levels of oxidative stress markers (TBARS and protein carbonyls) either decreased or remained constant during diapause. The results indicate decreased mitochondrial density and reduced aerobic metabolism those were already related during diapause in other species. Potentially diminished production of reactive oxygen species together with mechanisms of reduced energetic demand justify the reduction of endogenous antioxidants. Diapause beginning is accompanied by an increased potential production of NADPH, which could be used by the antioxidant system, by fatty acid synthesis and by polyol synthesis – as dehydration resistance mechanism. Increased GST activity, also observed in other diapausing insects, could play roles other than xenobiotics detoxication, including the binding and transport of biomolecules. The biological function of GST during diapause must be further investigated. The lack of evidences showing oxidative stress or redox imbalance indicates that *C. lacinia* presents efficient biochemical adaptation to survive the metabolic transitions occurring in the tropical diapause under low humidity.

Keywords: Reactive oxygen species, oxidative stress, antioxidants, glutathione, glutathione transferase, metabolic depression, hibernation.

SUMÁRIO

1	Introdução	9
1.1	Depressão Metabólica	9
1.2	Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes.....	10
1.2.1	Espécies reativas de oxigênio.....	10
1.2.2	Sistema antioxidante	11
1.3	Diapausa.....	14
1.3.1	Controle hormonal da diapausa.....	16
1.3.2	Diapausa e metabolismo redox.....	18
1.3.3	Diapausa tropical e Cerrado	19
1.4	A lagarta do girassol <i>Chlosyne lacinia</i>	20
2	Objetivos	22
3	Material e Métodos	23
3.1	Animais	23
3.2	Extração de RNA total e síntese de DNAC.....	25
3.3	Desenho de oligonucleotídeos iniciadores, amplificação e isolamento de fragmentos de DNAC.....	26
3.4	Transformação bacteriana, isolamento de plasmídeos e sequenciamento.....	28
3.5	Determinação da atividade de enzimas metabólicas e antioxidantes	29
3.5.1	Preparo dos homogeneizados	29
3.5.2	Citrato sintase (EC 2.3.3.1)	30
3.5.3	Glicose 6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49).....	30
3.5.4	Isocitrato desidrogenase dependente de NADP ⁺ (EC 1.1.1.42)	31
3.5.5	Piruvato quinase (EC 2.7.1.40)	31
3.5.6	Glutaciona redutase (EC 1.8.1.7).....	32
3.5.7	Glutaciona transferase (EC 2.5.1.18).....	32
3.5.8	Glutaciona peroxidase (EC 1.11.1.9).....	33
3.5.9	Catalase (EC 1.11.1.6).....	33
3.5.10	Ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11)	34
3.5.11	Proteínas solúveis totais	34
3.6	Determinações das concentrações de glutaciona, TBARS e proteínas carboniladas	35
3.6.1	Preparo dos homogeneizados	35
3.6.2	Glutaciona.....	35
3.6.3	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	37

3.6.4 Proteínas carboniladas.....	37
3.7 Análise estatística.....	38
4 Resultados.....	39
4.1 Atividades de enzimas do metabolismo intermediário.....	39
4.2 Atividades de enzimas antioxidantes e glutathione transferase.....	42
4.3 Glutathione.....	45
4.4 Indicadores de dano oxidativo.....	47
4.5 Correlações.....	48
4.6 Sequências parciais de genes de interesse.....	49
5 Discussão.....	52
5.1 Enzimas do metabolismo intermediário.....	52
5.1.1 Citrato sintase.....	52
5.1.2 Glicose 6-fosfato desidrogenase e isocitrato desidrogenase dependente de NADP ⁺	54
5.1.3 Piruvato quinase.....	56
5.2 Sistema antioxidante e danos oxidativos.....	57
5.2.1 Glutathione redutase e glutathione peroxidase (H ₂ O ₂).....	57
5.2.2 Ascorbato peroxidase, catalase e glutathione peroxidase.....	58
5.2.3 Glutathione e danos oxidativos.....	61
5.3 Glutathione transferase.....	62
5.4 Sequências parciais de genes antioxidantes e GST.....	66
5.5 Limitações do estudo.....	66
6 Conclusão e Perspectivas.....	69
Referências Bibliográficas.....	73
APÊNDICE A – Sequências parciais dos genes para proteínas de interesse.....	96
APÊNDICE B – Redox Metabolism During Tropical Diapause in a Lepidoptera Larva.....	98

1 Introdução

1.1 Depressão Metabólica

Em grande parte do planeta, condições bióticas e abióticas adequadas para o crescimento, desenvolvimento e reprodução geralmente estão restritas a determinados períodos. Para sobreviver a condições ambientais desfavoráveis, inúmeros animais apresentam um conjunto de adaptações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas. Muitas espécies deprimem seu metabolismo para lidar com ambientes hostis que podem apresentar temperaturas extremas, baixa umidade, indisponibilidade de água ou baixa oferta de alimento, e retornam às suas atividades metabólicas quando condições mais brandas são reestabelecidas. O grau de depressão metabólica é medido pela comparação entre a taxa metabólica deprimida pela taxa metabólica normal em repouso.

A mudança para um estado de depressão metabólica é uma estratégia amplamente distribuída entre animais, desde invertebrados (esponjas, nematoides, moluscos, crustáceos, insetos e pepinos do mar), até peixes, anfíbios, répteis e mamíferos (Guppy & Withers 1999). Neste estado há uma redução global da demanda e produção de energia, o que possibilita a sobrevivência baseada em reservas endógenas por longos períodos (Storey & Storey 2007). O metabolismo intermediário, o transporte de íons, a expressão gênica e a síntese de proteínas são seletivamente suprimidos, o que resulta em uma redução de 20-95% da taxa metabólica (Guppy & Withers 1999; Storey & Storey 2012), podendo atingir até 99-100% (Clegg 1997; Guppy & Withers 1999). Nesta situação, em que a síntese e a degradação de biomoléculas estão reduzidas, o sistema antioxidante tem papel fundamental, na preservação dos componentes celulares durante a depressão metabólica e no momento em que a atividade metabólica é retomada (Kültz 2005; Storey & Storey 2012). A depressão metabólica é uma resposta comum em condições nas quais o sistema antioxidante têm sido estudado, como a anóxia (Brooks & Storey 1988; Storey & Storey 2004), a hipóxia (Hochachka et al. 1996; van Ginneken et al. 1999), o congelamento (Storey 2006; Calderon et al. 2009), a estivação (Guppy et al. 2000; Cowan et al. 2000), a hibernação (Storey & Storey 1990) e a diapausa (Joplin & Denlinger 1989; Denlinger 2002). A diapausa é um fenômeno de depressão metabólica no qual o metabolismo de espécies reativas vêm recebendo pouca atenção.

1.2 Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes

1.2.1 Espécies reativas de oxigênio

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são constantemente e naturalmente produzidas durante a respiração mitocondrial em células aeróbicas. As EROs compreendem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e os radicais livres superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroxil (HO^{\cdot}), entre outras moléculas. Grande parte do oxigênio é utilizada como aceptor final de elétrons na respiração mitocondrial (**Figura 1.2.1.1**), resultando na formação de água, entretanto, estima-se que 0,1-2,0% do oxigênio é convertido no radical superóxido (Boveris & Chance 1973; Turrens 2003; Tahara et al. 2009). Desta forma, o radical superóxido é a espécie reativa primariamente formada, dando origem a outras EROs. A dismutação, espontânea ou catalisada enzimaticamente, do $\text{O}_2^{\cdot-}$ produz H_2O_2 . O H_2O_2 , apesar de ser pouco reativo e um agente oxidante ou redutor fraco, dá origem ao radical altamente reativo HO^{\cdot} na presença de íons cobre ou ferro (Halliwell & Gutteridge 2007). Além da produção endógena pela respiração mitocondrial, as EROs podem ser produzidas por fontes exógenas. No caso de insetos herbívoros (tema dessa dissertação), a alimentação é uma importante fonte exógena geradora de EROs (Ahmad & Pardini 1990; Barbehenn et al. 2008).

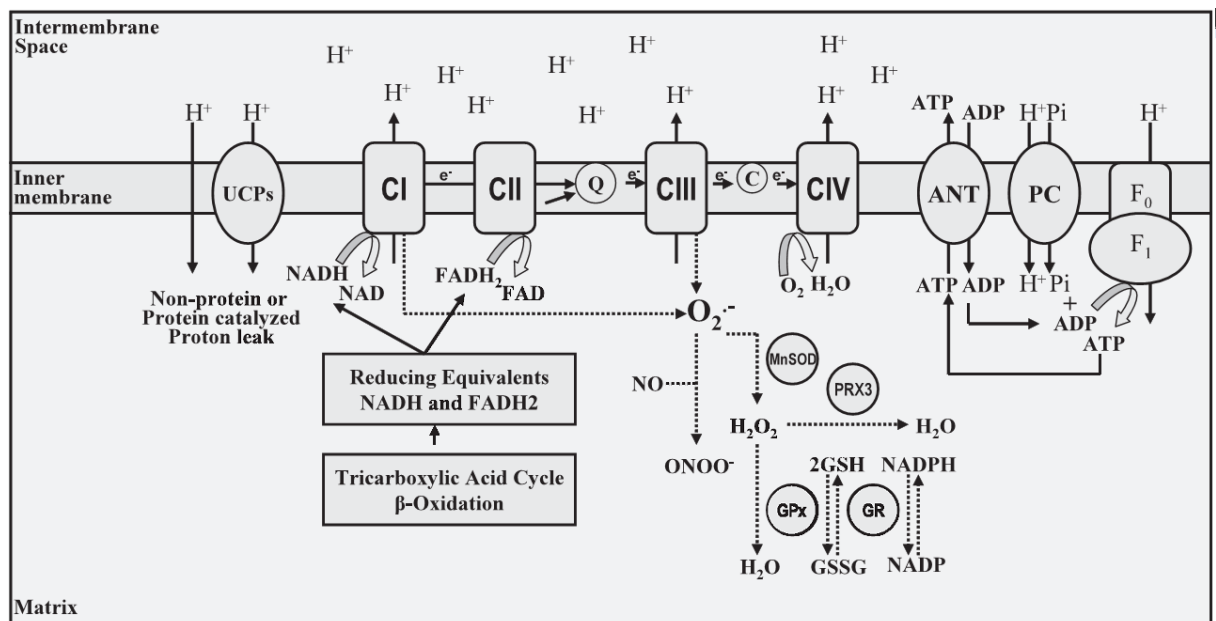


Figura 1.2.1.1. Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, produção de EROs ($\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2) e ação do sistema antioxidante (superóxido dismutase, MnSOD; peroxidase, PRX; glutaciona peroxidase, GPX; e glutaciona redutase, GR) Retirado de Pamplona & Costantini (2011).

Os processos nos quais as EROs participam envolvem reações de redução-oxidação (ou redox), isto é, envolvem a transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio de um reagente a outro (Pamplona & Costantini 2011). As EROs podem reagir com virtualmente todos os componentes celulares. Para lidar com o alto potencial reativo das EROs, surgiram diferentes componentes antioxidantes. Estas moléculas altamente reativas juntamente com o sistema antioxidante exercem importantes papéis em vias de sinalização celular e estão envolvidas em um amplo espectro de processos fisiológicos (Droge 2002; Dickinson & Chang 2011). A função do sistema antioxidante é manter os níveis basais e regular a localização de EROs nas células. Entretanto, quando a produção de EROs supera a capacidade de controle do sistema antioxidante, a sinalização é perturbada e ocorre o estresse oxidativo (Jones 2006). Como resultado, ocorrem danos oxidativos a biomoléculas, incluindo lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Sies 1997; Pamplona & Costantini 2011).

1.2.2 Sistema antioxidante

O sistema antioxidante de organismos aeróbicos é constituído por uma intrincada rede de componentes enzimáticos e não-enzimáticos (Hermes-Lima 2004). As superóxido dismutases encontram-se na linha de frente do sistema antioxidante, uma vez que catalisam a dismutação do radical $O_2^{\cdot-}$. Existem três principais tipos de SOD, um contendo cobre e zinco (CuZnSOD), um contendo manganês (MnSOD) e outro contendo ferro (FeSOD) em suas estruturas (Halliwell & Gutteridge 2007). Há ainda em determinadas bactérias uma forma contendo níquel (NiSOD, Wuerges et al. 2004). Em eucariotos, as CuZnSODs são encontradas no citosol, lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembrana mitocondrial, enquanto a MnSOD, também denominada de SOD-2, encontra-se no interior da mitocôndria (Hermes-Lima 2004). Superóxido dismutases contendo ferro, são encontradas em bactérias, algas, tripanosomas e plantas, porém estão ausentes em animais (Hermes-Lima 2004; Halliwell & Gutteridge 2007). Em insetos, a importância das SODs foi investigada em resposta à alimentação (Krishnan & Kodrík 2006), a exposição a poluentes (Emre et al. 2013), a exposição à radiação ionizante (Datkhile et al. 2009), a infecção (Wang et al. 2001). Na diapausa de adultos *Culex pipiens* há o aumento dos níveis de transcritos para a SOD-2, de maneira que sua supressão por RNAi reduz a longevidade (Sim & Denlinger 2011).

O peróxido de hidrogênio, produto da reação das SODs e de outras reações, pode ser removido pela ação de enzimas catalases ou peroxidases (**Figura 1.2.2.1**). As catalases catalisam a decomposição direta do H_2O_2 a O_2 , enquanto as peroxidases removem o H_2O_2 ao

oxidar outro substrato, em ambos os casos há a formação de H_2O (Halliwell & Gutteridge 2007). As catalases de mamíferos são formadas por quatro subunidades iguais, cada uma contendo um grupo heme e uma molécula de NADPH (Hermes-Lima 2004). Na lagarta da seda *Bombyx mori*, a catalase apresenta alta identidade em relação a catalases de mamíferos e é encontrada no corpo gorduroso, no trato digestório, em hemócitos e no ovário (Yamamoto et al. 2005). Dentre as enzimas peroxidases destacam-se as glutatona peroxidases, as ascorbato peroxidases e as peroxiredoxinas.

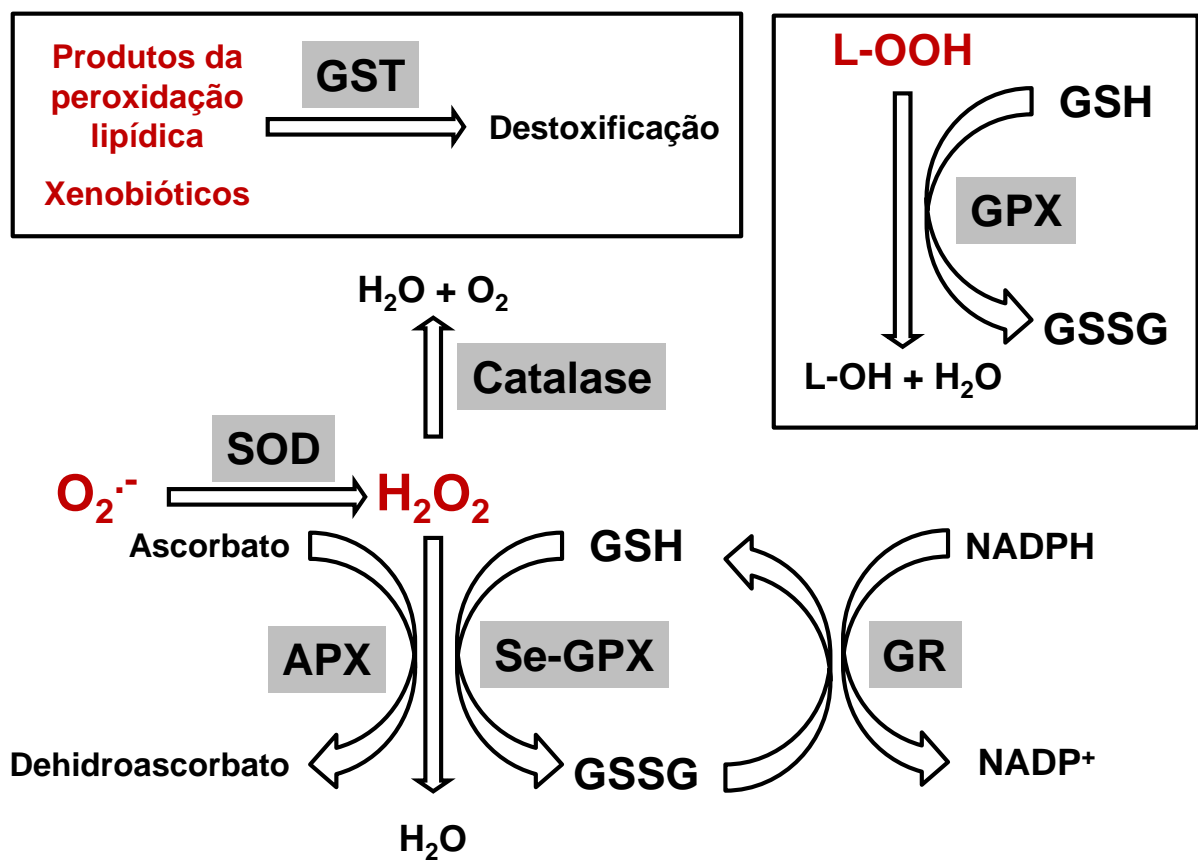


Figura 1.2.2.1. Resumo esquemático mostrando parte do sistema antioxidante. As espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas naturalmente na cadeia transportadora de elétrons, por exemplo, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), são controladas por componentes enzimáticos e não enzimáticos. Os componentes enzimáticos incluem as superóxido dismutases (SODs), a catalase, a ascorbato peroxidase (APX) e a glutatona peroxidase dependente de selênio (Se-GPX). A glutatona e o ascorbato são importantes antioxidantes não-enzimáticos. A glutatona é convertida de sua forma dissulfeto (GSSG) à forma reduzida (GSH) pela glutatona redutase (GR). Xenobióticos e produtos da peroxidação de lipídeos são detoxificados por glutatona transferases (GSTs). Peróxidos lipídicos (L-OOH) gerados pela reação entre EROs e lipídeos são decompostos por glutatona peroxidases (GPX). Baseado em Hermes-Lima (2004).

As glutathiona peroxidases (GPXs) formam uma família de enzimas que acoplam a redução de H_2O_2 a H_2O à oxidação da glutathiona reduzida. As GPXs são amplamente distribuídas em tecidos animais e podem agir também sobre outros peróxidos além do H_2O_2 , incluindo hidroperóxidos orgânicos e sintéticos (e.g. cumeno hidroperóxido; Halliwell & Gutteridge 2007). Na literatura, a atividade de GPX exclusiva sobre H_2O_2 é comumente designada como GPX dependente de selênio (SeGPX), enquanto a atividade sobre outro hidroperóxidos é designada apenas como GPX ou GPX-total (Joanisse & Storey 1996; Lushchak et al. 2001; Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima 2003; Welker et al. 2012). Em alguns casos, a atividade de GPX sobre hidroperóxidos orgânicos é designada GSTPx (Ahmad & Pardini 1990; Joanisse & Storey 1996), devido à atividade de peroxidase que algumas glutathiona transferases apresentam (Mannervik & Danielson 1988; Josephy 1997; Tu & Akgül 2005). Em insetos, a atividade de GPX sobre o H_2O_2 é ausente ou muito baixa (Ahmad & Pardini 1988; Weinhold et al. 1990; Mathews et al. 1997; Joanisse & Storey 1998; Ying Wang et al. 2001; Stanic et al. 2004; Halliwell & Gutteridge 2007). Em insetos, a atividade de ascorbato peroxidase (APX), que remove H_2O_2 com a concorrente oxidação ascorbato (Asada 1992), compensa a baixa atividade de SeGPX (Mathews et al. 1997).

As peroxiredoxinas (PRXs) formam uma família de proteínas identificadas em procariotos e eucariotos que apresentam atividade de peroxidase (Radyuk et al. 2001). Existem duas principais classes de PRXs, a 2-cys, a mais comum, e a 1-cys. Em ambas as classes, o peróxido oxida um grupo $-\text{SH}$ da PRX formando um ácido sulfênico, cys-SOH. Nas 2-cysPRX, o ácido sulfênico formado reage com um outro grupo $-\text{SH}$, gerando um dissulfeto, que é reduzido por tioredoxinas (Halliwell & Gutteridge 2007). Nas 1-cysPRX, a redução é feita por outros mecanismos independentes de tioredoxina e glutathiona (Kang et al. 1998). Membros da família PRX foram identificados em várias espécies de insetos, incluindo *Drosophila melanogaster* (Radyuk et al. 2001), *Bombyx mori* (Lee et al. 2005), *Gryllotalpa orientalis* (Kim et al. 2005), *Anopheles stephensi* (Peterson & Luckhart 2006) e *Bombus ignitus* (Hu et al. 2010).

A glutathiona é um tripeptídeo, γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina, presente em praticamente todo o reino animal em concentrações de 0,3 a 5 mM (Hermes-Lima 2004). Em eucariotos, a glutathiona é o tiol de baixa massa molecular mais abundante (Bachhawat et al. 2013). As funções da glutathiona incluem a ação direta sobre EROs, ser substrato de enzimas do sistema antioxidante e agir como tampão redox (Sies 1999; Dalle-Donne et al. 2007; Lushchak 2012). A glutathiona é encontrada nas formas reduzida (GSH), dissulfeto (GSSG) e

dissulfeto misto ligado a outros tióis celulares (GS-SR). Quando oxidadas, moléculas de GSSG são reduzidas a GSH pela enzima glutathiona redutase (GR), com o consumo de NADPH proveniente de vias metabólicas específicas, como a via das pentoses fosfato onde a reação catalisada pela glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) leva à formação deste composto (Hermes-Lima 2004; Krüger et al. 2011). Em *Drosophila*, aparentemente não há GR, de maneira que, neste caso, a tioredoxina substitui a GR na redução de GSSG a GSH (Kanzok et al. 2001). Outra importante fonte de potencial redutor na forma de NADPH, podendo ser utilizado na redução de GSSG (para GSH), é proveniente da reação catalisada pela isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (ICDH; Lawler & Demaree 2001; Kim et al. 2009). A ICDH tem sido pouco estudada em insetos, tendo sido purificada e caracterizada em *Drosophila melanogaster* (Williamson et al. 1980), *Bombyx mori* (Fumio Miake et al. 1977) e *Gryllus firmus* (Zera et al. 2011). Acredita-se que a ICDH também seja importante no provimento de NADPH para síntese de ácidos graxos (Zera et al. 2011). A síntese *de novo* de glutathiona ocorre no citoplasma em duas reações catalisadas pelas enzimas glutamato-cisteína ligase (GCL) e glutathiona sintase (Lu 2013).

As glutathiona transferases (GSTs) formam um superfamília de enzimas díméricas responsáveis pela destoxificação de xenobióticos e de produtos da peroxidação lipídica (e.g. 4-hidroxi-2-trans-nonenal) através da conjugação destes com moléculas de glutathiona (Sharma et al. 2004; Mannervik et al. 2005). Cada subunidade de uma GST apresenta dois domínios, cada um com dois sítios de ligação, (i) um sítio G, local de ligação à GSH, e (ii) um sítio H, local de ligação ao substrato (Ding et al. 2003). Como falado acima, algumas GSTs apresentam atividade de peroxidase. Outras funções destas enzimas são a resistência ao choque térmico (Choi et al. 1998) e a ligação e o transporte de biomoléculas (Listowsky et al. 1988; Ishigaki et al. 1989; Tansey & Cammer 1991; Singh & Pandey 1996). As GSTs são classificadas de acordo com homologia da sequência N-terminal de aminoácidos, especificidade ao substrato, imunoreatividade e sensibilidade a inibidores (Ranson et al. 2002; Ding et al. 2003; Shi et al. 2012). Em insetos, são encontradas pelo menos seis classes de GSTs: Delta, Épsilon, Ômega, Sigma, Teta e Zeta, sendo as classes Delta e Épsilon exclusivas de insetos (Ketterman et al. 2011; Shi et al. 2012).

1.3 Diapausa

A diapausa é uma característica marcante do ciclo de vida de muitos insetos, durante a qual ocorrem adaptações fisiológicas e comportamentais em resposta às alterações sazonais de

muitos ambientes (Tauber & Tauber 1976). A habilidade de entrar em diapausa, um programa alternativo de desenvolvimento, é considerada o evento mais importante envolvido no sucesso evolutivo dos insetos (Denlinger et al. 2005). A diapausa é caracterizada pela parada do desenvolvimento e pela supressão do metabolismo em antecipação à chegada de condições ambientais adversas (Denlinger 2002). A diapausa ocorre em um estágio de desenvolvimento específico determinado geneticamente em uma espécie, podendo ocorrer em ovos, larvas, pupa e adultos (Denlinger 2002; MacRae 2010). A entrada em diapausa resulta na sobrevivência a extremos ambientais e na sincronização das atividades (e.g. desenvolvimento e reprodução) com períodos favoráveis (MacRae 2010).

A diapausa é classificada como obrigatória se uma espécie entra em diapausa inevitavelmente e independente das condições ambientais, por exemplo, as mariposas *Hyalophora cecropia* (Shappirio 1974a) e *Lymantria dispar* (Atay-Kadiri & Benhsain 2005). Entretanto, a diapausa facultativa é muito mais comum entre os insetos, na qual a entrada em diapausa ocorre em resposta a fatores ambientais (Denlinger et al. 2005). Na zona temperada, o encurtamento da duração dos dias, um indicador da chegada do inverno, é o principal fator ambiental utilizado pelos insetos para se antecipar à chegada de condições hostis. Entretanto, o fotoperíodo não é o único fator utilizado. Outros fatores envolvidos na indução da diapausa em insetos são a temperatura, o regime de chuvas, a humidade, a disponibilidade de alimento e substâncias voláteis (Denlinger 1986). Desta forma, há a sensação de alterações das condições ambientais, que dispara os eventos endócrinos envolvidos na diapausa.

Ao contrário de um estado estático de total parada, a diapausa é um processo dinâmico constituído de fases sucessivas, que são indução, preparação, iniciação, manutenção, terminação e, em alguns casos, quiescência pós-diapausa (Kostál 2006). Ao longo da diapausa ocorrem alterações na utilização de reservas energéticas, no consumo de oxigênio, no sistema endócrino e na resistência a diferentes estresses (Denlinger et al. 2005; Hahn & Denlinger 2007; MacRae 2010). A fase de preparação evidencia a ocorrência de uma programação anterior ao começo da diapausa propriamente dita, preparando o animal às condições peculiares à diapausa. Algumas alterações ocorridas na fase preparatória são o acúmulo de reservas energéticas (ver abaixo), o desenvolvimento de tolerância à desidratação e/ou ao frio e a mudança de coloração (Denlinger et al. 2005). A entrada e a manutenção da diapausa são acompanhadas por diferentes mecanismos moleculares, incluindo expressão diferencial de genes, eventos pós-transcricionais, modificações pós-traducionais e distribuição de proteínas

em regiões específicas (MacRae 2010). Apesar de haver uma redução global da transcrição, alguns genes são especificamente expressos durante a diapausa (Denlinger 2002).

Uma característica da diapausa e de outras situações de depressão metabólica é a cessação da alimentação. Desta forma, insetos devem gerenciar adequadamente suas reservas energéticas para sobreviver. Por exemplo, um período de 9 a 10 meses de diapausa é comum, podendo se estender por até alguns anos (Hahn & Denlinger 2007). Neste contexto, a depressão metabólica, o acúmulo de reservas energéticas e de outras moléculas são importantes adaptações. Alterações quantitativas e qualitativas do estoque e utilização de nutrientes são observadas em insetos destinados a entrar em diapausa, incluindo lipídeos, carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais (Hahn & Denlinger 2011). Outras substâncias acumuladas em insetos em resposta à diapausa são polióis e açúcares que conferem resistência ao congelamento e à desidratação (Danks 2000; Kostál et al. 2004). Outros fatores que reduzem perda de água durante a diapausa são a redução da taxa de trocas gasosas e alterações da cutícula do exoesqueleto (Benoit 2010).

1.3.1 Controle hormonal da diapausa

A diapausa em insetos é um fenômeno de depressão metabólica com um forte componente hormonal. O controle hormonal da diapausa difere entre os estágios de desenvolvimento nos quais ela ocorre. A diapausa embrionária, que ocorre em ovos, foi amplamente estudada em ovos da lagarta da seda *Bombyx mori*. Na lagarta da seda, a diapausa é induzida pelo hormônio da diapausa (DH), um neuropeptídeo liberado pela fêmea adulta durante a maturação dos ovos (Denlinger et al. 2005). Genes para peptídeos semelhantes ao DH foram identificados em todas as espécies de Lepidoptera estudadas, entretanto seu efeito indutor da diapausa não foi confirmado em nenhuma espécie (Denlinger et al. 2005). Na verdade, peptídeos semelhantes ao DH resultam na terminação da diapausa em pupas de *Helicoverpa armigera* (Zhang et al. 2004) e *Heliothis virescens* (Xu & Denlinger 2004; Zhang et al. 2011). Não há observações que confirmem o papel indutor do DH em outras espécies além de *B. mori*. Em outras espécies, a diapausa embrionária é regulada por ecdisteróides, mas com padrões opostos. Na diapausa do lepidóptero *L. dispar*, os ecdisteróides têm efeito indutor (Denlinger & Lee 1997). Por outro lado, níveis muito maiores de ecdisteróides são encontrados em ovos ativos em relação a ovos em diapausa nos gafanhotos *Chortoicetes terminifera* (Gregg et al. 1987) e *Locusta migratoria* (Tawfik et al. 2002).

Em diferentes ordens de insetos observam-se diapausas na fase larval ou na fase pupal. A diapausa larval é comum em lepidópteros, enquanto a diapausa pupal é bastante observada em Lepidoptera e Diptera. As diapausas nas formas de larva e pupa têm um aspecto em comum, a incapacidade de seguir para o próximo estágio de metamorfose. A metamorfose em insetos é regulada pelo eixo endócrino formado por (i) cérebro, que produz o hormônio protoracicotrópico (PTTH), (ii) glândulas protorácicas, que produzem ecdisteróides, e (iii) *corpus allatum*, que produz o hormônio juvenil (JH, **Figura 1.3.1.1**, Gilbert et al. 1996).

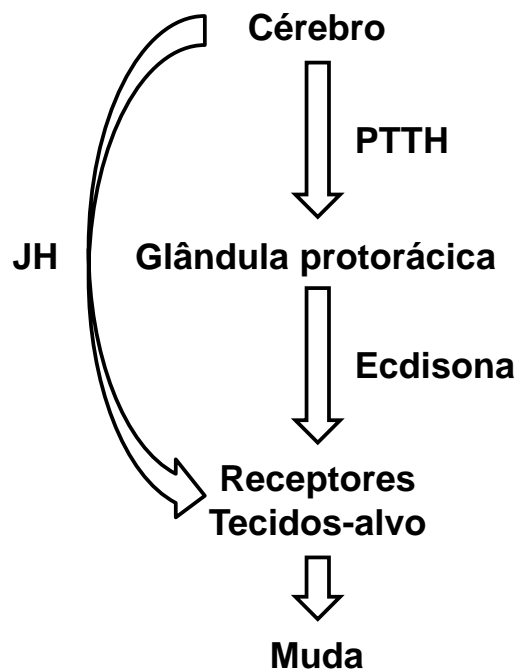


Figura 1.3.1.1. Resumo esquemático do eixo endócrino que controla a metamorfose em insetos. Os hormônios que participam das vias são: o hormônio juvenil (JH), o hormônio protoracicotrópico (PTTH) e a ecdisona. Baseado em de Gilbert et al. (1996).

Na maioria dos casos de diapausa larval ou pupal, ocorre uma redução da produção de PTTH, resultando na menor produção de ecdisteróides pela glândula protorácica. Durante a diapausa de pupas de *Manduca sexta*, as células produtoras e secretoras de PTTH apresentam menor atividade elétrica (Tomioka et al. 1995). Atividades reduzidas de PTTH durante a diapausa foram registradas em lagartas de *Diatraea grandiosella* (Yin et al. 1985), em lagartas de *Ostrinia nubilalis* (Gelman et al. 1992) e em pupas de *Mamestra brassicae* (Endo et al. 1997). Porém, as espécies *M. sexta* (Bowen et al. 1984), *Sarcophaga argyrostoma* (Richard & Saunders 1987) e *Sarcophaga peregrina* (Moribayashi et al. 1992) apresentam níveis inalterados ou maiores de PTTH em resposta à diapausa, sugerindo que apesar dos

níveis elevados ou normais de PTH, ele não é secretado (Denlinger et al. 2005). Em alguns outros casos, há o envolvimento do JH nas diapausas larval e pupal (Denlinger et al. 2005).

Ao contrário da diapausa ocorrida em estágios imaturos, a diapausa adulta é caracterizada pela cessação da reprodução. Em machos e fêmeas, há a atrofia de glândulas sexuais acessórias e, em fêmeas, ocorre a parada do desenvolvimento de oócitos (Denlinger et al. 2005). Em machos, pode ocorrer ou não a atrofia dos *testes* (Pener 1992; Denlinger et al. 2005). Observações de diversas espécies indicam o JH como fundamental regulador da diapausa em adultos, incluindo *Plautia stali* (Kotaki & Yagi 1989), *Cacopsylla pyricola* (Krysan 1990), *Leptinotarsa decemlineata* (Koopmanschap et al. 1989), *Aulacophora nigripennis* (Watanabe & Tanaka 1998), *Speyeria idalia* (Kopper et al. 2001), *Bombus terrestris* (Larrere et al. 1993).

1.3.2 Diapausa e metabolismo redox

Os poucos estudos que tiveram como objetivo a investigação do metabolismo de EROs durante a diapausa são em sua maioria restritos a espécies habitando regiões temperadas. As atividades das enzimas catalase, GPX e GST, assim como as concentrações de ácido ascórbico e glutatona, diminuem em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Ostrinia nubilalis* em diapausa em relação a lagartas ativas (Jovanovic-Galovic et al. 2004). Ainda em *O. nubilalis*, a atividade em mitocôndrias isoladas de corpo inteiro das enzimas catalase e GST diminuem, enquanto a atividade de GPX é mantida em lagartas em diapausa (Jovanovic-Galovic et al. 2007). Na diapausa de adultos *Culex pipiens* há um aumento dos níveis de transcritos para a catalase e a SOD-2 (Sim & Denlinger 2011).

Eventualmente, estudos de análise de perfil proteico e de transcritos, identificam alterações de proteínas envolvidas no metabolismo redox. A análise do perfil de transcritos de corpos inteiros de *Sarcophaga crassipalpis* mostrou que não há alteração de transcritos para catalase, GPX e SOD, enquanto há um aumento de transcritos para GSTD1 no início da diapausa (Ragland et al. 2010). No início da diapausa de pupas *Helicoverpa armigera*, há aumento das quantidades de proteína de duas isoformas de GSTs no cérebro (Lu & Xu 2010), mas na hemolinfa há o aumento da concentração de apenas uma isoforma de GST (Zhang et al. 2013). Pode-se perceber que o metabolismo redox é alvo de regulação em diferentes situações de diapausa, sugerindo a importância de suas alterações.

Apesar de fatores ecológicos e fisiológicos da diapausa tropical serem conhecidos (Denlinger 1986), as alterações do metabolismo redox são desconhecidas. Ao nosso conhecimento, o único estudo que analisou o sistema antioxidante durante a diapausa tropical foi o de Jena et al. (2013). Lagartas *Antheraea mylitta* de 5º instar destinadas a entrar em diapausa pupal apresentam maior atividade de GST, menor atividade de catalase e menores conteúdos de hidroperóxidos e ácido ascórbico em comparação a lagartas de 5º instar em desenvolvimento normal (Jena et al. 2013).

1.3.3 Diapausa tropical e Cerrado

Do ponto de vista neuroendócrino, a regulação da diapausa é semelhante entre animais habitando áreas tropicais e temperadas. Por outro lado, a diapausa em ecossistemas tropicais apresenta importantes diferenças em relação à diapausa dos climas temperados. O clima tropical é caracterizado por alterações sazonais mínimas de temperatura (Wolda 1988). As variações sazonais da duração dos dias são muito menores em regiões tropicais em comparação às temperadas (Denlinger 1986). Um padrão de precipitação é peculiar ao clima tropical, onde períodos de chuva são alternados por uma ou duas estações chuvosas (Wolda 1988). Portanto, fatores ambientais como a umidade e a disponibilidade de alimento podem estar associados à regulação da diapausa (Denlinger 1986).

Tais características do clima tropical apresentam desafios únicos aos insetos que entram em diapausa. Uma vez que a taxa metabólica de insetos é proporcional à temperatura, assim como em outros animais ectotérmicos, as espécies tropicais que entram em diapausa devem reduzir suas taxas metabólicas sem o auxílio de baixas temperaturas (Hahn & Denlinger 2011). Ao contrário do que ocorre durante o inverno em regiões temperadas, as temperaturas relativamente maiores do clima tropical permitem a manutenção da atividade de predadores e parasitas, a proliferação de fungos e outros patógenos, enquanto os animais em diapausa permanecem em atividade reduzida (Denlinger 1986). Além disso, a inatividade durante a diapausa durante estações secas deve ser acompanhada por mecanismos de redução da perda de água (Benoit 2010).

O Cerrado é um importante bioma brasileiro e ocupa o segundo lugar dentre os biomas brasileiros em extensão (Lima & Silva 2005), sendo considerada a maior savana do mundo (Henriques 2005). O Cerrado apresenta características típicas de climas tropicais e é caracterizado por duas estações bem definidas, uma seca, de maio a setembro e outra chuvosa,

entre outubro e abril (Scariot et al. 2005; **Figura 1.3.3.1** mostra o que acontece em Brasília). Mesmo com períodos de intensa seca, a fauna de borboletas do Distrito Federal é rica e estima-se que número de espécies, superior a 750 (Brown & Freitas 2000), supere a fauna de borboletas da América do Norte e da Europa (Pinheiro 2005).

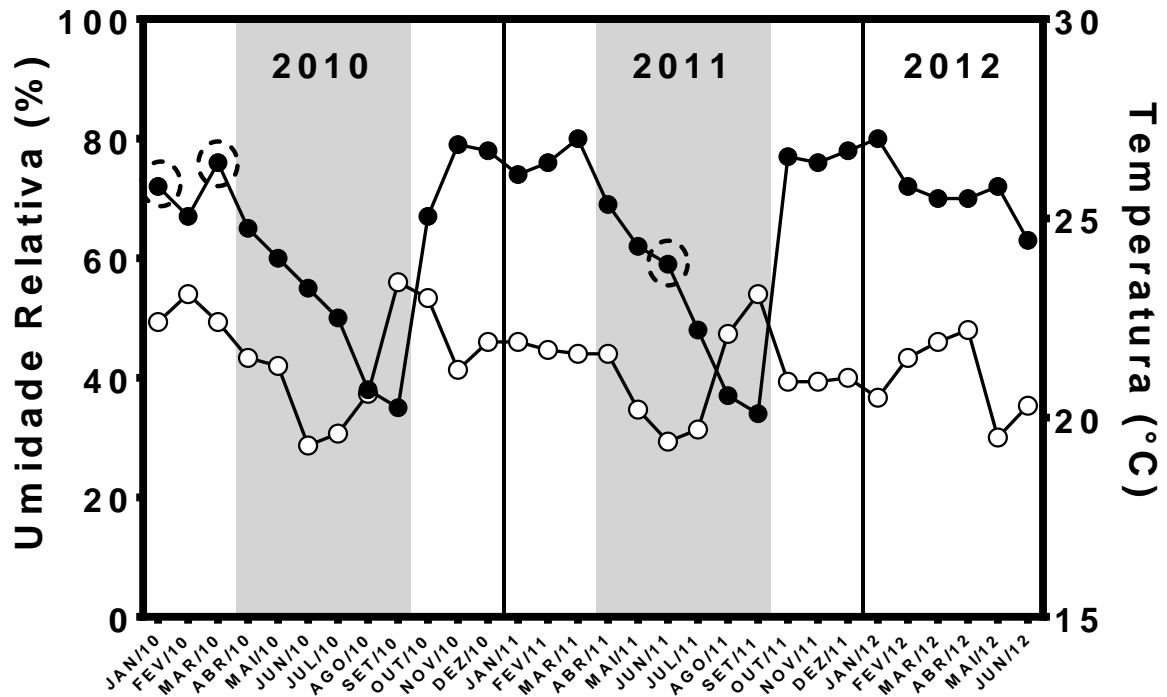


Figura 1.3.3.1. Variáveis climáticas registradas em Brasília entre janeiro de 2010 e junho de 2012. Círculos cheios: umidade relativa do ar mensal média. Círculos vazios: temperatura do ar mensal média. Dados do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) consultados em <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmp>. Estação 83377 Brasília – DF, latitude $-15,78^\circ$, longitude $-47,93^\circ$, altitude 1159,54 m. Os círculos com linha intermitente sinalizam os três períodos de coleta.

1.4 A lagarta do girassol *Chlosyne lacinia*

A lagarta do girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae; **Figura 1.4.1**) apresenta ampla distribuição geográfica, estendendo-se do Norte da Argentina até o Sul dos Estados Unidos (Drummond et al. 1970; Scott 1992). No Brasil, esta espécie é encontrada no Distrito Federal e nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Bahia e Rondônia (Cunha et al. 2010). Apesar de alimentarem-se de diversas espécies da família Asteraceae (Justus et al. 2003), as lagartas de *C. lacinia* são a principal praga da cultura do girassol no Brasil (Boiça Jr. & Vendramin 1993; Gallo et al. 2002).

Dependendo do nível de infestação, o dano causado por lagartas de *C. lacinia* pode atingir até 100% de desfolhamento de exemplares de girassol (Nakano et al. 1981).



Figura 1.4.1. Desenvolvimento de *Chlosyne lacinia*. **A.** Ovos na face abaxial de folha de *T. diversifolia*, barra = 5 mm. **B.** Lagartas ativa de 3° e 4° instares alimentando em folha de *T. diversifolia*. **C.** Adulto no interior da gaiola externa, barra = 5 mm.

O desenvolvimento de *C. lacinia* é caracterizado por cinco instares larvais e o ciclo de vida completo da espécie é estimado entre 35 e 45 dias (Drummond et al. 1970), 42 e 45 dias (Nakano et al. 1981) e 30 e 40 dias (Paula et al. 2009). A diapausa é observada nesta espécie especificamente no terceiro instar tanto no inverno quanto no verão (Drummond et al. 1970). Mesmo em condições padrões constantes, a frequência de animais que entram em diapausa no laboratório é de 30% (Paula et al. 2009). Não se sabe a frequência da diapausa na natureza. Lagartas em diapausa tornam-se mais claras (**Figura 3.2.3**), agregam-se, permanecem imóveis e não se alimentam por até seis meses (Paula et al. 2009). A modificação para uma coloração mais clara, por perda de pigmentação, é comum em larvas de lepidópteros de áreas tropicais e representa um mecanismo de redução de estresse térmico e de coloração críptica (Denlinger 1986). O comportamento de agregação de animais em diapausa reduz a perda de água por transpiração durante estações secas (Benoit 2010). Há relatos de lagartas de *C. lacinia* que sobreviveram por mais de um ano neste estado sem se alimentar (Drummond et al. 1970). Os fatores responsáveis pela indução de entrada e saída da diapausa e o controle endócrino de *C. lacinia* são desconhecidos. Entretanto, potenciais fatores ambientais de indução da diapausa em áreas tropicais são o fotoperíodo, a temperatura, a umidade, o regime de chuvas e a disponibilidade de alimento (Denlinger 1986). No caso de *C. lacinia*, acredita-se que a disponibilidade de alimento está associada à indução da diapausa (Paula et al. 2009).

2 Objetivos

O objetivo geral deste estudo foi identificar adaptações bioquímicas associadas à diapausa do lepidóptero *Chlosyne lacinia* com especial ênfase ao metabolismo de radicais livres, quantificando a atividade de enzimas, a concentração de glutatona e os níveis de indicadores de danos oxidativos. Além da obtenção de sequências parciais de genes que codificam as proteínas catalase, 1CysPrx, CuZn-SOD, GST δ e RpS7 de *C. lacinia*, os objetivos específicos foram as comparações dos seguintes parâmetros entre animais ativos, animais em diapausa por <24h, 20, 40, 60 e 120 dias e animais ativos após 120 dias de diapausa:

- As atividades das enzimas do metabolismo intermediário citrato sintase (CS), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (ICDH) e piruvato quinase (PK).
- As atividades das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APX), catalase e glutatona peroxidase (GPX).
- As atividades de glutatona redutase (GR) e glutatona transferase (GST).
- As concentrações do total de glutatona (GSH-eq), glutatona reduzida (GSH), glutatona dissulfeto (GSSG) e razão GSSG/GSH-eq
- Os níveis de danos oxidativos a lipídeos (TBARS) e a proteínas (proteínas carboniladas).

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Ovos da lagarta do girassol *C. lacinia* foram coletados em 2010 e 2011 em uma pequena área de cerrado (15°43'S, 47°53'W) no interior da propriedade da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Asa norte, Brasília, Brasil. Os ovos foram colocados em recipientes plásticos até a eclosão, quando foram transferidos para gaiolas plásticas maiores (Figura 3.1.1) e as lagartas alimentadas diariamente com folhas de margaridão (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) recém-coletadas. Durante o ano de 2010, ovos e lagartas foram mantidos no laboratório sem controle de luz e temperatura. Já em 2011 os animais foram mantidos em câmaras (**Figura 3.1.1**) com controle de temperatura $25\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo 12:12h.

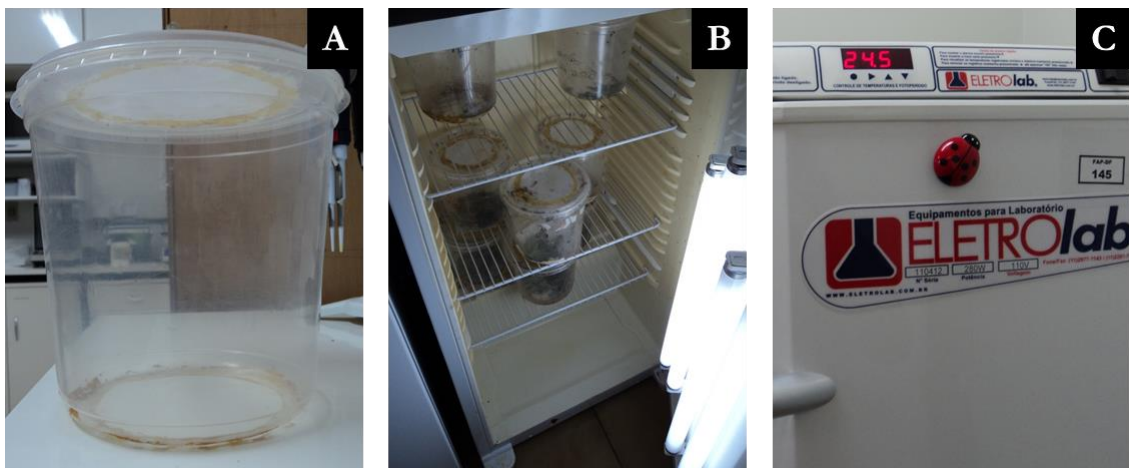


Figura 3.1.1. Manutenção dos estágios imaturos de *C. lacinia* em 2011. **A.** Gaiola plástica na qual eram mantidas lagartas e pupas até eclosão dos adultos. **B.** Gaiolas dentro da câmara de controle de temperatura e luz. **C.** Painel da câmara mostrando a temperatura.

Uma vez atingido o estágio adulto, as borboletas eram transferidas para uma gaiola de 1 m^3 instalada em uma área externa, sujeitas as variações de temperatura e humidade do ambiente (**Figura 3.1.2**). Dentro da gaiola externa, havia um arbusto de *T. diversifolia* e algumas flores de picão (*Bidens pilosa*, Asteraceae). A gaiola externa era verificada periodicamente e os ovos encontrados levados para o laboratório. Desta forma, os estágios imaturos eram mantidos em laboratório e os adultos na gaiola externa. Ovos eventualmente encontrados em folhas de arbustos de *T. diversifolia* nas proximidades eram inseridos na colônia.



Figura 3.1.2. Manutenção de adultos de *C. lacinia*. **A**, Exterior da gaiola externa na qual eram mantidas as borboletas. **B**, Interior da gaiola mostrando o alimento dos adultos (*B. pilosa*). **C**, Interior da gaiola mostrando borboletas e o arbusto de *T. diversifolia*, onde as borboletas depositam seus ovos.

As gaiolas contendo lagartas eram verificadas diariamente. Nestas verificações, os animais eram transferidos para gaiolas limpas e animais em diapausa separados dos demais em pequenas gaiolas plásticas sem alimento. Gaiolas de animais em diapausa eram mantidas em câmara separada das demais. Lagartas em diapausa foram identificadas pela diferente coloração de seus exoesqueletos (**Figura 3.1.3**) e cessação da alimentação. Desta forma, formaram-se os grupos experimentais: grupo controle, lagartas de 3º instar ativas e alimentando-se; grupo <24 horas, lagartas que entraram em diapausa nas últimas 24 horas; grupos 20, 40, 60 e 120 dias, animais em diapausa por 20, 40, 60 ou 120 dias; grupo pós-diapausa, animais que estiveram em diapausa por 120 dias e retornaram ao desenvolvimento normal.

Foram feitas coletas em três períodos diferentes (**Figura 1.3.2.1**). Em janeiro de 2010, foram coletados animais controle e animais em diapausa por 20 dias. Em março de 2010, foram coletados animais controle e animais em diapausa por 20, 40 e 60 dias. Em junho de 2011, foram coletados animais controle, animais em diapausa por menos de 24h, 20, 40, 60, e 120 dias, além de animais pós-diapausa. Para obter o grupo pós-diapausa, lagartas em diapausa por 120 dias foram transferidas em sacos plásticos perfurados para folhas de arbustos de *T. diversifolia* em uma área externa (**Figura 3.1.3**). Animais ativos pós-diapausa, que retomaram a atividade e o desenvolvimento entre 48 e 72h da transferência ao ambiente externo, foram identificados pela muda e a coloração escura de animais ativos. Lagartas em seus estágios específicos de cada grupo foram transferidas para tubos, imediatamente mergulhadas em N₂ líquido e armazenadas a -80° C.

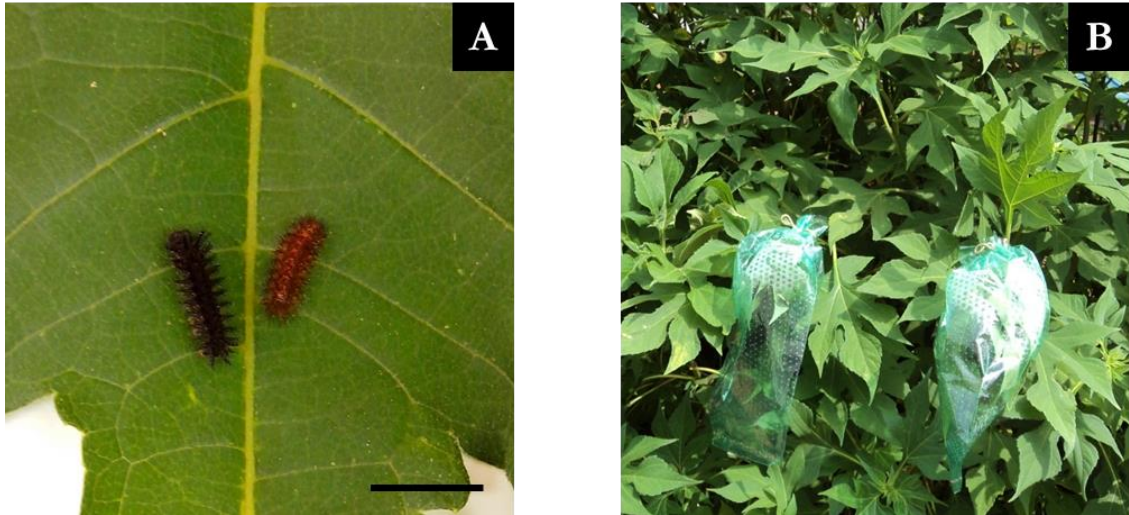


Figura 3.1.3. Lagartas de *C. lacinia*. **A**, Lagartas de *C. lacinia*, a esquerda lagarta ativa de coloração escura, a direita, lagarta em diapausa de coloração mais clara, barra = 1 cm. **B**. sacos plásticos perfurados contendo lagartas em diapausa por 120 dias fixados em arbusto de *T. diversifolia*.

A transferência para o ambiente externo durante o mês de outubro de 2011 mostrou-se eficiente para induzir a saída da diapausa. Outras tentativas não apresentaram sucesso, incluindo, a oferta de alimento, a pulverização de água sobre os animais, a colocação de algodão encharcado nas gaiolas e a aplicação tópica de solventes orgânicos (hexano e butanol) sobre a cabeça das lagartas. A administração de solventes orgânicos é um protocolo de indução de saída da diapausa em pupas de *Sarcophaga crassipalpis* e lagartas de *Manduca sexta* (Denlinger et al. 1980; Ragland et al. 2010). Os solventes orgânicos estimulam a produção de ecdisteróides por mecanismo desconhecido (Ragland et al. 2010).

3.2 Extração de RNA total e síntese de DNAc

O RNA total de um conjunto de três animais pesando entre 60 e 90 mg dos grupos controle (3^o instar e alimentados) e de animais em diapausa por 20 dias foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Life Technologies). Os corpos inteiros dos animais foram homogeneizados em 1 mL de TRIzol® em homogeneizador vidro-vidro. O homogeneizado foi transferido para um tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio. O homogeneizado foi agitado vigorosamente e deixado à temperatura ambiente por 3 minutos. Após centrifugação a $12.000 \times g$ por 15 minutos a 4° C, o sobrenadante (fase aquosa) foi coletado e transferido para um novo tubo. O sobrenadante foi acrescido de 0,5 mL de isopropanol puro, deixado em temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugado a $12.000 \times g$ por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante formado após a adição de isopropanol e

centrifugação foi descartado e o pellet (contendo o RNA) foi lavado com etanol. A lavagem consistiu na adição de 1 mL de etanol 75% (v/v), agitação e centrifugação $7.500 \times g$ por 5 minutos a 4°C . O pellet resultante da lavagem foi deixado em capela para secagem, solubilizado em água deionizada RNase-free e armazenado a -80°C . A quantidade e a pureza do RNA obtido foram determinadas por espectrofotometria a 260 nm e pela taxa 260/280 nm em espectrofotômetro Spectronic Genesys 2 (Milton Roy). A integridade do RNA extraído foi analisada após eletroforese (60 V por uma hora) em gel de agarose 1% em tampão TBE (tris 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2mM; pH 8,3) e visualização com uso de brometo de etídeo (0,5 $\mu\text{g/mL}$) e transiluminação a 302 nm.

O RNA total extraído do corpo inteiro de lagartas de *C. lacinia* foi tratado com DNase e posteriormente aplicado na síntese de DNA complementar (DNAc) com o uso do kit First-Strand cDNA Synthesis Kit for Real-Time PCR (Affymetrix). Seguindo orientações do fabricante, em um tubo foram adicionados 0,8 μg de RNA total, tampão de reação, mistura de primers, dNTPs, inibidor de RNase e a enzima transcriptase reversa. O tubo então foi mantido a 45°C por uma hora, em seguida a 92°C por 10 minutos e, por último, a 4°C por 24 horas. O DNAc resultante foi armazenado a -20°C até utilização.

3.3 Desenho de oligonucleotídeos iniciadores, amplificação e isolamento de fragmentos de DNAc

Para a amplificação de sequências relacionadas ao sistema antioxidante, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (**Tabela 3.3.2**) com base em sequências de RNAm disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). As sequências de RNAm de organismos de referência (**Tabela 3.3.1**) foram analisadas utilizando a ferramenta de alinhamento de múltiplas sequências ClustalW2 nas configurações padrão (Larkin et al. 2007). Regiões de homologia entre as sequências alinhadas foram escolhidas para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores considerando as seguintes características: tamanho dos oligonucleotídeos, temperatura de anelamento, diferença de temperatura de anelamento entre o par, conteúdo de G e C, dimerização entre o par, repetições de nucleotídeos e de dinucleotídeos. Com a exceção da enzima 1-Cys peroxidase (1CysPrx), as sequências de referência foram de espécies da ordem Lepidoptera e especialmente no caso da proteína ribossomal S7 (RpS7) sequências de espécies da família Nymphalidae estão disponíveis.

Tabela 3.3.1. Sequências de RNAm disponíveis no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) de organismos utilizados como referência para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores.

Identificação	Proteína alvo	Sequências referência
<i>ChlCAT</i>	Catalase	<i>Bombyx mori</i> RNAm Catalase (AB164195.1) <i>Spodoptera exigua</i> RNAm Catalase (JN051294.1)
<i>ChlCuZnSOD</i>	Cu,Zn-Superóxido dismutase	<i>Bombyx mori</i> RNAm Cu,Zn-SOD (NM_001043619.1) <i>Helicoverpa armigera</i> RNAm Cu,Zn-SOD (JQ009331.1)
<i>Chl1CysPrx</i>	1-Cys peroxiredoxina	<i>Bombyx mori</i> RNAm 1-Cys PRX (EU128675.1) <i>Drosophila melanogaster</i> RNAm 1-Cys PRX (AF311880.1)
<i>ChlGSTδ</i>	Glutathione S-transferase δ	<i>Bombyx mori</i> RNAm GST 3 (DQ355374.2) <i>Choristoneura fumiferana</i> RNAm GST 3 (EF370473.1)
<i>ChlRpS7</i>	Proteína ribossomal S7	<i>Euphydryas aurinia</i> RNAm RpS7 (HQ424729.1) <i>Heliconius erato</i> RNAm RpS7 (EF207966.1) <i>Heliconius melpomene</i> RNAm RpS7 (JF265022.1) <i>Papilio polytes</i> RNAm RpS7 (AK402419.1)

A Cu,Zn-superóxido dismutase (CuZnSOD), a catalase (CAT) e uma forma de 1-Cys peroxiredoxina (1CysPrx) foram enzimas antioxidantes escolhidas para terem seus genes parcialmente sequenciados. Além das enzimas antioxidantes, foi escolhida uma isoforma da classe delta (δ) da família das glutathione transferases (GSTs). A classe delta é a maior classe de GSTs em insetos e foi escolhida pelo fato dela ser altamente expressa, especialmente durante o estágio larval (Ranson & Hemingway 2005). O desenho de oligonucleotídeos iniciadores para o gene referente à proteína ribossomal S7 (RpS7) foi feito com o objetivo de utilizar a expressão desta proteína como controle/referência em experimentos posteriores de PCR em tempo real quantitativos. A escolha de RpS7 como gene de referência foi fundamentada na observação de que este é o mais estável entre outros 6 candidatos a gene de referência analisados para análises de PCR em tempo real quantitativo durante a diapausa do lepidóptero *Helicoverpa zea* (Zhang & Denlinger 2012).

Uma vez obtidos os pares de oligonucleotídeos iniciadores, estes foram empregados em reações de PCR comuns utilizando como molde o DNAc obtido de *C. lacinia* anteriormente. As reações de PCR foram realizadas com o uso do reagente GoTaq® Green Master Mix (Promega) seguindo orientações do fabricante e a concentração de 1 μ M para cada oligonucleotídeo iniciador. Reações controle na ausência de DNAc para cada par de

oligonucleotídeos iniciadores também foram feitas. A programação da temperatura para as reações de PCR foi feita seguindo a estratégia de *PCR Touchdown* (Don et al. 1991). O *PCR Touchdown* consiste na redução sucessiva das temperaturas de anelamento durante o programa, iniciando em uma temperatura 10° C acima da temperatura calculada para cada oligonucleotídeo iniciador (Korbie & Mattick 2008).

Tabela 3.3.2. Pares de oligonucleotídeos iniciadores desenhados com base em alinhamentos de sequências de RNAm de organismos filogeneticamente próximos a *C. lacinia* para proteínas de interesse (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). *ChlCAT*, catalase; *ChlCuZnSOD*, Cu,Zn-superóxido dismutase; *Chl1CysPrx*, 1-cys peroxiredoxina; *ChlGSTδ*, glutathione S-transferase δ; *ChlRpS7*, proteína ribossomal S7. O tamanho esperado da sequência amplificada pelo par de oligonucleotídeos também é mostrado.

Identificação	Proteína alvo	Oligonucleotídeos iniciadores (5'→3')	Amplicon (pb)
<i>ChlCAT</i>	Catalase	ATG GCT CAA GCA GAA AGC TG GTT GTC CTC AGT CTG GCC ACT	462
<i>ChlCuZnSOD</i>	Cu,Zn-Superóxido dismutase	AAT GCC SGC YAA AGC AGT GTC ATC AGG GTC AGC RTG	376
<i>Chl1CysPrx</i>	1-Cys peroxiredoxina	TTC TCT CAC CCM KCM GAC TT ATC AGT CAR CTG GAG RGA GTC	492
<i>ChlGSTδ</i>	Glutathione S-transferase δ	ACC TWM ASC TSA ACC TYA AAC CMT YCT GRT AMY CTG GAG CTG	524
<i>ChlRpS7</i>	Proteína ribossomal S7	GGC AAG CAT GTT GTG TTC GTG TCC ACC TTG TGT TCA AT	251

S, C ou G; Y, C ou T; R, A ou G; M, A ou C; K, G ou T; W, A ou T.

Os produtos de PCR de cada par de oligonucleotídeo iniciador foram avaliados em gel de agarose conforme descrito acima. A visualização das bandas foi feita com o uso de GelRed™ (Biotium) e exposição pelo menor tempo possível à luz ultravioleta. Após visualização, fragmentos dos géis contendo os produtos de PCR foram excisados com o uso de uma lâmina e transferidos para tubos de 2 mL para posterior purificação com o kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) conforme instruções do fabricante.

3.4 Transformação bacteriana, isolamento de plasmídeos e sequenciamento

Cada um dos produtos de PCR foi ligado ao vetor pGEM®-T Easy (Promega) seguindo orientações do fabricante. Os produtos de PCR ligados ao vetor foram utilizados

para a transformação de células competentes (pelo tratamento com CaCl_2) de *Escherichia coli* linhagem XL1 Blue. A transformação foi feita por choque térmico. Foram acrescentados a um tubo contendo células competentes 2 μL do meio resultante da ligação do produto de PCR com o vetor. O tubo foi deixado em gelo por 30 minutos, transferido para 42°C por exatamente 90 segundos e mantido em gelo por mais 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 900 μL de meio Luria-Bertani (LB) líquido aos tubos contendo os sistemas de transformação e os tubos foram mantidos a 37°C por uma hora a 140 rpm. Um volume de 100 μL de células transformadas foi semeado em placas contendo meio LB sólido adicionado de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ampicilina, 0,5 mM IPTG e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ X-Gal. As placas semeadas foram então mantidas a 37°C por 16 horas. As placas então foram analisadas, observando a formação de colônias brancas e azuis.

A confirmação da inserção dos fragmentos de DNAC foi feita por reações de PCR, com o respectivo par de oligonucleotídeos iniciadores para cada placa, adicionando colônias brancas diretamente ao meio reacional. Confirmada a presença dos fragmentos de DNAC, colônias brancas foram pré-inoculadas em 5 mL de meio LB líquido contendo ampicilina e mantidas a 37°C por 8 horas a 240 rpm. Um volume de 40 μL do pré-inóculo foi adicionado a 15 mL de meio LB líquido contendo ampicilina e o tubo mantido a 37°C por 16 horas a 240 rpm. As células então foram coletadas por centrifugação a $6.000\times g$ por 15 minutos a 4°C e utilizadas para o isolamento dos plasmídeos pelo kit QIAGEN Plasmid Midi Kit seguindo instruções do fabricante. Os plasmídeos isolados tiveram suas concentrações determinadas pelo kit Qubit™ dsDNA BR Assay e, após diluição adequada, foram encaminhados para sequenciamento pelo kit BigDye® Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) e posterior análise em 3130xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) no Laboratório de Biologia Molecular (IB/UnB). Uma vez obtidas, as sequências foram comparadas às sequências depositadas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) utilizando a ferramenta BLAST (Altschul et al. 1990; Zhang et al. 2000).

3.5 Determinação da atividade de enzimas metabólicas e antioxidantes

3.5.1 Preparo dos homogeneizados

Animais inteiros congelados foram diluídos 1:19 (p/v) e homogeneizados por um minuto em tubos de 2 mL contendo tampão de homogeneização (pH 7,2) com o uso do homogeneizador elétrico Omni Tissue Master-125. Animais coletados em janeiro e março de

2010 foram homogeneizados em conjuntos (*pools*) de 3 animais, ou seja, cada *pool* de 3 animais representa uma observação (n=1). Já animais coletados em 2011 foram homogeneizados individualmente, ou seja, cada indivíduo representa n=1. Durante todo o procedimento os tubos contendo os homogeneizados foram mantidos em gelo. As concentrações dos reagentes no tampão de homogeneização eram: 50 mM fosfato e 1 mM ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Imediatamente antes da homogeneização de cada amostra foi adicionado o inibidor de proteases fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) de maneira a resultar em uma concentração final de 1 mM. Somente nas amostras coletadas em 2011, além do PMSF, foi utilizado o coquetel inibidor de protease (Sigma, P8340) em um diluição 1:100 (v/v). Após homogeneização, os homogeneizados foram centrifugados nos próprios tubos a 15.000×g por 15 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram coletados e transferidos para novos tubos, mantidos em gelo e utilizados na determinação das atividades enzimáticas e de proteínas totais.

3.5.2 Citrato sintase (EC 2.3.3.1)

A atividade de citrato sintase (CS) foi determinada pelo monitoramento da velocidade de formação do grupo CoASH pela reação deste grupo com o 5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico (DTNB; Srere 1969; Joannis & Storey 1994; Salway et al. 2010). A CS catalisa a reação de condensação do acetilCoA com o oxaloacetato produzindo citrato e o grupo livre CoASH. Neste método, o grupo CoASH reage com o DTNB formando o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB), que absorve luz em 412 nm. Desta forma, a formação de CoASH é monitorada pela absorbância em 412 nm. As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 0,5 mM EDTA, 0,1 mM acetil-CoA, 0,5 mM oxaloacetato, 0,1 mM DTNB e homogeneizado 1:400. As taxas resultantes de ensaios controles: (i) na ausência de homogeneizado e (ii) na presença de homogeneizado, mas sem oxaloacetato, foram descontadas das taxas registradas do meio reacional completo. Uma unidade (U) de CS foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol de TNB por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{412}) 13,6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5.3 Glicose 6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49)

A atividade de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da redução de NADP^+ a NADPH em 340 nm (Glock &

McLean 1953; Kostal et al. 2004; Welker 2009). Ao final da reação catalisada pela G6PDH o NADP^+ é reduzido a NADPH usando glicose 6-fosfato como substrato e íons Mg^{2+} como cofator. As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 0,5 mM EDTA, 5 mM MgSO_4 , 0,25 mM NADP^+ , 1 mM glicose 6-fosfato e homogeneizado 1:100. As taxas resultantes de ensaios controles: (i) na ausência de homogeneizado e (ii) na presença de homogeneizado, mas sem glicose 6-fosfato, foram descontadas das taxas registradas do meio reacional completo. Uma unidade (U) de G6PDH foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5.4 Isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ (EC 1.1.1.42)

A atividade de isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ (ICDH) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da redução de NADP^+ a NADPH em 340 nm (Fox 1971; F Miake et al. 1977; Zera et al. 2011). Ao final da reação catalisada pela ICDH, o NADP^+ é reduzido a NADPH usando isocitrato como substrato e íons Mg^{2+} como cofator. As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 0,5 mM EDTA, 5 mM MgSO_4 , 0,25 mM NADP^+ , 1 mM D,L-isocitrato e homogeneizado 1:100. As taxas resultantes de ensaios controles: (i) na ausência de homogeneizado e (ii) na presença de homogeneizado, mas sem isocitrato, foram descontadas das taxas registradas do meio reacional completo. Uma unidade (U) de ICDH foi definida como a quantidade de enzima que forma 1 μmol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5.5 Piruvato quinase (EC 2.7.1.40)

A atividade de piruvato quinase (PK) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da queda da absorbância em 340 nm resultante da oxidação do NADH a NAD^+ em um sistema de reações acopladas (Whitwam & Storey 1990; Cowan & Storey 1999; Cornish-Bowden 2012). A PK catalisa a transferência de um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato ao ADP, formando piruvato e ATP. A reação anterior é acoplada a uma reação subsequente catalisada pela lactato desidrogenase, que converte o piruvato a lactato consumindo NADH. Desta forma, o consumo de NADH, monitorado em 340 nm, representa a velocidade da primeira reação, ou seja, a atividade de PK. As concentrações finais dos reagentes foram 20 mM tampão imidazol (pH 7,2), 5 mM MgSO_4 , 1,5 mM ADP, 0,2 mM

NADH, 1,5 mM fosfoenolpiruvato, 2 UI/mL L-lactato desidrogenase e homogeneizado 1:400. As taxas resultantes de ensaios controles: (i) na ausência de homogeneizado e (ii) na presença de homogeneizado, mas sem fosfoenolpiruvato, foram descontadas das taxas registradas do meio reacional completo. Uma unidade (U) de PK foi definida como a quantidade de enzima que resulta no consumo de 1 μmol de NADH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) $6,22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5.6 Glutaciona redutase (EC 1.8.1.7)

A glutaciona redutase (GR) reduz uma molécula de glutaciona dissulfeto (GSSG) a duas moléculas de glutaciona reduzida (GSH), consumindo potencial redutor na forma de NADPH. A atividade de GR foi aferida por dois diferentes métodos. O primeiro método consiste no monitoramento da velocidade do consumo de NADPH a 340 nm de um meio reacional contendo 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 0,5 mM EDTA, 5 mM GSSG e 0,2 mM NADPH (Racker 1955; Joannis & Storey 1996; Welker 2009). No segundo método, moléculas de GSH, geradas pela redução de GSSG pela GR, reagem com o DTNB para formar TNB (Smith et al. 1988). A velocidade de formação de TNB é acompanhada pela variação da absorbância em 412 nm de um meio reacional contendo 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 0,5 mM EDTA, 5 mM GSSG, 0,2 mM NADPH e 1 mM DTNB. Em ambos os métodos, a presença ou ausência de GSSG (substrato da GR) não alterou as taxas de absorbância (A_{340} ou A_{412}/min) em ensaios contendo diferentes quantidades de homogeneizados de *C. lacinia*. Por outro lado, ensaios simultâneos com homogeneizados de fígado de rato apresentaram atividade detectável em ambos os métodos.

3.5.7 Glutaciona transferase (EC 2.5.1.18)

Múltiplas proteínas com diferentes afinidades para diferentes substratos formam a superfamília das glutaciona transferases (GSTs; Habig et al. 1974; Mannervik et al. 2005; Board & Menon 2013). A atividade de GST foi determinada pelo monitoramento em 340 nm da velocidade de formação de S-(2,4-dinitrofenil)-glutaciona, um conjugado entre a GSH e o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB; Habig et al. 1974; Joannis & Storey 1996). Apesar de não fisiológico o CDBN é um substrato conveniente e universal para a determinação da atividade de GST (Clark et al. 1973; Josephy 1997; Coles & Kadlubar 2005). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM EDTA, 5 mM GSH, 1 mM CDBN e homogeneizado 1:16.000. As taxas resultantes de ensaios controles

na ausência de homogeneizado foram descontadas das taxas registradas do meio reacional completo. Uma unidade (U) de GST foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol do conjugado por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) $9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.8 Glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9)

A atividade de glutathione peroxidase (GPX) foi determinada pelo monitoramento da velocidade da queda da absorbância em 340 nm resultante do consumo de NADPH em um sistema de reações acopladas (Paglia & Valentine 1967; Ahmad & Pardini 1988; Joannis & Storey 1996). Em uma primeira reação a GPX decompõe hidroperóxidos, oxidando GSH a GSSG. Na segunda reação, a GR reduz GSSG com o consumo de NADPH. Portanto, o consumo de NADPH representa a velocidade da primeira reação, ou seja, a atividade de GPX. Inicialmente foi acompanhada a variação da absorbância em 340 nm do meio reacional na ausência de hidroperóxidos contendo 50 mM tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM EDTA, 4 mM NaN_3 , 5 mM GSH, 1 U/mL GR, 0,2 mM NADPH e homogeneizado 1:100. Após dois minutos, quando a taxa de oxidação do NADPH estava estável, era adicionado o substrato e a taxa A_{340}/min registrada. Dois substratos foram utilizados, o H_2O_2 em diferentes concentrações para a detecção da atividade de GPX sobre H_2O_2 comumente denominada de GPX dependente de selênio (ou Se-GPX) e o cumeno hidroperóxido (1 mM) para a detecção da atividade de GPX sobre peróxidos orgânicos (também chamada na literatura de GPX-total). A utilização de peróxidos orgânicos detecta a atividade de peroxidase de algumas GSTs (Ahmad & Pardini 1988; Josephy 1997). Uma unidade (U) de GPX foi definida como a quantidade de enzima que resulta no consumo de 1 μmol de NADPH por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{340}) $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.9 Catalase (EC 1.11.1.6)

A atividade de catalase foi determinada pelo monitoramento da velocidade da queda da absorbância em 240 nm resultante da decomposição do H_2O_2 (Aebi 1984; Joannis & Storey 1996). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM EDTA, 10 mM H_2O_2 e homogeneizado 1:8.000. As taxas resultantes de ensaios controles na ausência de homogeneizado foram descontadas das taxas registradas do meio reacional completo. Uma unidade (U) de catalase foi definida como a quantidade de enzima

que decompõe 1 μmol de H_2O_2 por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{240}) $0,0394 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A utilização de homogeneizados de *C. lacinia* anteriormente incubados com 3-amino-1,2,4-triazol, um inibidor específico da catalase (Margoliash & Novogrodsky 1958), não causa consumo significativo de H_2O_2 neste ensaio.

3.5.10 Ascorbato peroxidase (EC 1.11.1.11)

A atividade de ascorbato peroxidase (APX) foi determinada pelo monitoramento da velocidade de consumo do ácido L-ascórbico em 290 nm (Asada 1984; Krishnan & Kodrík 2006). As concentrações finais dos reagentes foram 50 mM tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM EDTA, 4 mM NaN_3 , 10 mM H_2O_2 , 0,35 mM ácido L-ascórbico e homogeneizado 1:400. A interferência da atividade da catalase foi anulada pela utilização de NaN_3 . As taxas resultantes de ensaios controles: (i) na ausência de homogeneizado e (ii) na presença de homogeneizado, mas sem H_2O_2 , foram descontadas das taxas registradas do meio reacional completo. Uma unidade (U) de APX foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido ascórbico por minuto, utilizando o coeficiente de absorvidade molar (ϵ_{290}) $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.5.11 Proteínas solúveis totais

Para os cálculos de atividade enzimática específica a concentração de proteínas solúveis totais nos sobrenadantes foi determinada pela reação das proteínas com o reagente coomassie brilliant blue G-250 (Bradford 1976). Um volume de 10 μL de sobrenadante diluído 1:500 (p/v) foi adicionado a 200 μL do reagente de Bradford em uma microplaca de 96 poços em triplicata. A placa então foi agitada, mantida em temperatura ambiente e protegida da luz por 5 minutos e a leitura realizada em 595 nm no espectrofluorímetro SpectraMax M3. O cálculo da concentração de proteínas no homogeneizado foi feito comparando a absorbância em 595 nm das amostras a uma curva-padrão feita em triplicata com albumina do soro bovino (BSA) em concentrações de 0,05 a 0,25 mg/mL.

3.6 Determinações das concentrações de glutathiona, TBARS e proteínas carboniladas

3.6.1 Preparo dos homogeneizados

Animais inteiros congelados foram diluídos 1:20 (p/v) e homogeneizados por um minuto em tubos de 2 mL contendo 10% (p/v) ácido tricloroacético (TCA) com o uso do homogeneizador elétrico Omni Tissue Master-125. Animais coletados em janeiro e março de 2010 foram homogeneizados em conjuntos (*pools*) de 3 animais, ou seja, cada *pool* de 3 animais representa uma observação (n). Já animais coletados em 2011 foram homogeneizados individualmente, ou seja, cada indivíduo representa uma observação. Durante todo o procedimento os tubos contendo os homogeneizados foram mantidos em gelo. A partir de um mesmo homogeneizado foram separadas alíquotas para diferentes medições: glutathiona, TBARS e proteínas carboniladas.

3.6.2 Glutathiona

As determinações dos níveis de equivalentes de glutathiona ($GSH\text{-eq} = [GSH] + 2 \times [GSSG]$) e de glutathiona dissulfeto (GSSG) foram feitas pelo método enzimático (Tietze 1969; Griffith 1980) com modificações (Welker 2009) e adaptações para microplacas (Rahman et al. 2006). O método fundamenta-se na reação entre GSH e DTNB, em um meio reacional contendo GSH, DTNB, glutathiona redutase (GR) e NADPH (Figura 3.6.2.1). Neste ensaio, a velocidade da alteração da absorvância em 412 nm ($\Delta A_{412}/\text{min}$) é linearmente proporcional à concentração total de glutathiona. Devido à presença de GR todo o conteúdo de glutathiona, incluindo GSSG, está no estado reduzido – GSH. Para medir apenas o conteúdo de GSSG dos homogeneizados foi utilizado o reagente 2-vinilpiridina (2-VP), que liga-se apenas à GSH e impede reações posteriores (Griffith 1980).

Primeiramente foram feitas duas curvas-padrão com diferentes concentrações de GSH. Uma curva variando a concentração de GSH entre 0,375 e 1,5 μM , contendo 100 mM tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM EDTA, 0,238% (p/v) TCA, 0,1 mM NADPH, 2 mM DTNB e 0,05 U/mL GR. A outra curva-padrão continha concentrações de GSH entre 0,0125 e 0,2 μM e o meio reacional era 100 mM tampão fosfato (pH 7,0), 1 mM EDTA, 0,238% (p/v) TCA, 0,1 mM NADPH, 2 mM DTNB e 0,4 U/mL GR. Cada ponto da curva foi feito em triplicata em

uma microplaca de 96 poços. A reação era disparada pela adição de GR e a absorbância em 412 nm monitorada por dois minutos.

Os homogeneizados destinados à medição de glutathiona foram centrifugados $10.000\times g$ por 10 minutos a $4^\circ C$ e seus sobrenadantes ácidos usados nas etapas seguintes. Alíquotas de $25 \mu L$ de sobrenadantes foram transferidas para dois tubos diferentes, um para a determinação do conteúdo total de glutathiona (GSH-eq) e outro para a medição de GSSG. No tubo destinado a medição de GSSG foram adicionados $75 \mu L$ de tampão fosfato $0,5 M$ (pH 7,0) e $5 \mu L$ de $0,5 M$ 2-VP em etanol. No tubo destinado a medição de GSH-eq foram adicionados $75 \mu L$ de tampão fosfato $0,5 M$ (pH 7,0) e $5 \mu L$ de etanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e mantidos por uma hora em temperatura ambiente protegidos da luz. Após esta primeira hora, o conteúdo dos tubos foi adicionado a microplacas de 96 poços em triplicata contendo o meio reacional utilizado para as curvas-padrão. A $\Delta A_{412}/min$ das amostras foi comparada às curvas-padrão e a concentração de GSH-eq e GSSG calculadas em nmol/g peso úmido. A concentração de GSH propriamente dita foi obtida pela subtração GSH-eq - GSSG e a razão GSSG/GSH-eq pela divisão entre os valores.

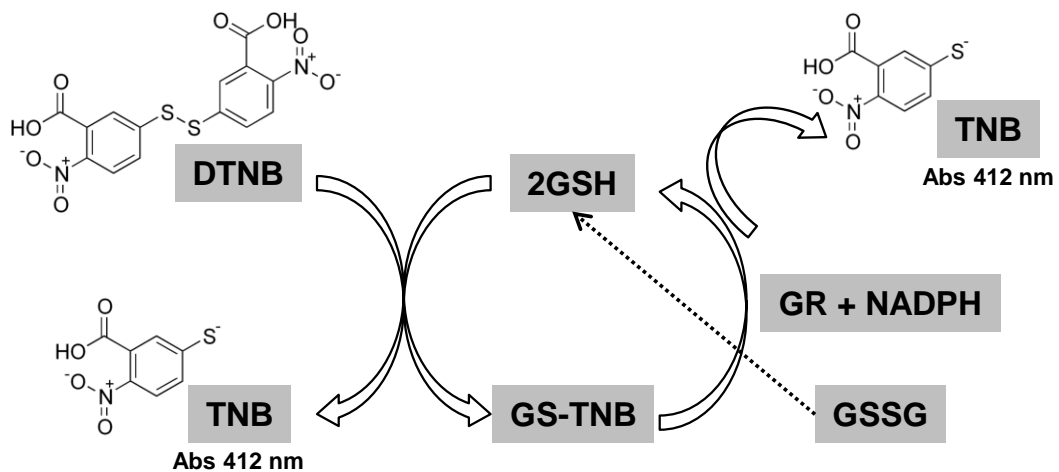


Figura 3.6.2.1. Resumo esquemático do princípio do método para a determinação da concentração de glutathiona. Para cada molécula de glutathiona (GSH) que reage com o 5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico (DTNB) são formadas uma molécula de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e outra do composto GS-TNB. A glutatona redutase (GR) reduz o GS-TNB a GSH e TNB. A GR ainda reduz uma molécula de glutathiona dissulfeto (GSSG) presente no meio reacional a duas moléculas de GSH, consumindo NADPH. A formação de TNB é monitorada em 412 nm. Baseado em Rahman et al. 2006.

3.6.3 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi determinada como um indicador de peroxidação lipídica. A peroxidação lipídica resulta na formação de diferentes produtos, dentre eles o malondialdeído (MDA). O método de TBARS estima o conteúdo de MDA pela reação entre o ácido tiobarbitúrico (TBA) e o MDA. Os homogeneizados destinados à medição de TBARS foram usados diretamente no ensaio seguindo procedimentos descritos originalmente em Buege e Aust (1978) e também em Welker (2009). Foram separados dois tubos por amostra, aos quais foram adicionados 400 μL de homogeneizado, 400 μL de 20% (p/v) TCA e 400 μL de 0,5 M HCl (no tubo branco) ou 400 μL 0,75% (p/v) TBA em 0,5 M HCl (no tubo teste). Os tubos foram agitados, mantidos a 90° C por 15 minutos e centrifugado a 10.000 \times g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para cubetas plásticas e as absorvâncias em 532 e 600 nm registradas. A A_{600} foi subtraída da A_{532} e a concentração de TBARS em nmol/g peso úmido calculada utilizando o coeficiente de absorvidade molar de 156 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

3.6.4 Proteínas carboniladas

A concentração de proteínas carboniladas foi determinada como um indicador de danos oxidativos a proteínas. O método utilizado, descrito por Fields e Dixon (1971), é fundamentado na reação entre grupos carbonil e o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH). O produto desta reação, 2,4-dinitrofenilhidrazona, absorve luz em 370 nm. Adaptações da metodologia original e o protocolo mais detalhado podem ser consultados em Welker (2009). Os homogeneizados destinados à medição de proteínas carboniladas foram separados em dois tubos por amostra e centrifugados 10.000 \times g por 10 minutos a 4° C e seus *pellets*, contendo as proteínas precipitadas, usados nas etapas seguintes. Aos tubos contendo os *pellets* foram adicionados 500 μL de 10 mM DNPH em 2 M HCL (tubo teste) ou 500 μL de 2 M HCl (tubo branco). Os *pellets* foram homogeneizados com o auxílio de uma haste plástica e mantido a temperatura ambiente protegidos da luz por uma hora, período no qual eram agitados a cada 15 minutos. Após esta uma hora, foram adicionados 500 μL de 20% (p/v) TCA em ambos os tubos e estes mantidos em gelo por 10 minutos. Então, os tubos foram centrifugados a 10.000 \times g por 10 minutos a 4° C e os sobrenadantes descartados.

Os *pellets* resultantes da etapa anterior foram submetidos a um processo de lavagem três vezes. A lavagem consistiu na adição de 1 mL de uma solução 1:1 (v/v) etanol:acetato de

etila, agitação vigorosa, centrifugação a $10.000\times g$ por 10 minutos a $4^{\circ} C$ e descarte do sobrenadante. Ao final da última lavagem os *pellets* foram deixados em capela de exaustão para secagem e acrescidos de 1 mL de 6 M cloreto de guanidina em 20 mM tampão fosfato (pH 2,3). Os tubos foram agitados até total dissolução dos *pellets* e centrifugados a $10.000\times g$ por 10 minutos a $4^{\circ} C$. Os sobrenadantes foram transferidos para cubetas plásticas e a absorbância em 370 nm registrada. Para os cálculos, a absorbância do tubo branco foi subtraída da absorbância do tubo teste e o coeficiente de absorvidade molar $\epsilon_{370} = 22.000 M^{-1}cm^{-1}$ foi utilizado.

Para normalizar a concentração de proteínas carboniladas em relação ao conteúdo de proteínas totais de cada amostra a concentração de proteínas totais foi estimada pela leitura do tubo branco em 280 nm (Aitken & Learmonth 2002). Como padrão foi utilizado o coeficiente de absorvidade da BSA de acordo com a seguinte equação: $[BSA] (mg/mL) = (A_{280}\times 10)/6,6$. Desta forma, foi possível calcular a concentração de proteínas carboniladas em nmol/mg proteína.

3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente usando o programa GraphPad Prism 5, considerando um nível de significância de $p < 0,05$. As comparações foram feitas entre os grupos coletados em um mesmo período. A comparação entre os grupos de animais coletados em janeiro de 2010 (que tinha apenas dois grupos experimentais) foi feita pelo teste t. As comparações entre os grupos de animais coletados em março de 2010 e entre os animais coletados em 2011 foram feitas pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. Somente para os animais coletados em 2011, foram feitas análises de correlação apenas entre os parâmetros medidos em um mesmo indivíduo, isto é, as atividades enzimáticas. As correlações foram obtidas pelo teste de Spearman.

4 Resultados

4.1 Atividades de enzimas do metabolismo intermediário

A atividade de citrato sintase (CS) diminuiu durante a diapausa nos animais nos três períodos amostrados (**Figura 4.1.1**). Tal redução durante a diapausa em relação ao controle foi em média 78%, 51% e 80% nos períodos junho de 2011, março e janeiro de 2010, respectivamente. No grupo de animais coletados em 2011, a atividade de CS variou ao longo da diapausa, diminuindo 64% em relação ao controle nas primeiras 24 horas de diapausa. Após 20 dias de diapausa, a atividade de CS diminuiu novamente 40% em relação ao grupo <24h. Animais ativos após 120 dias de diapausa tiveram a atividade de CS aumentada em relação aos grupos em diapausa, mas esta atividade manteve-se menor que os níveis do controle atingindo 62% da atividade controle (**Figura 4.1.1**).

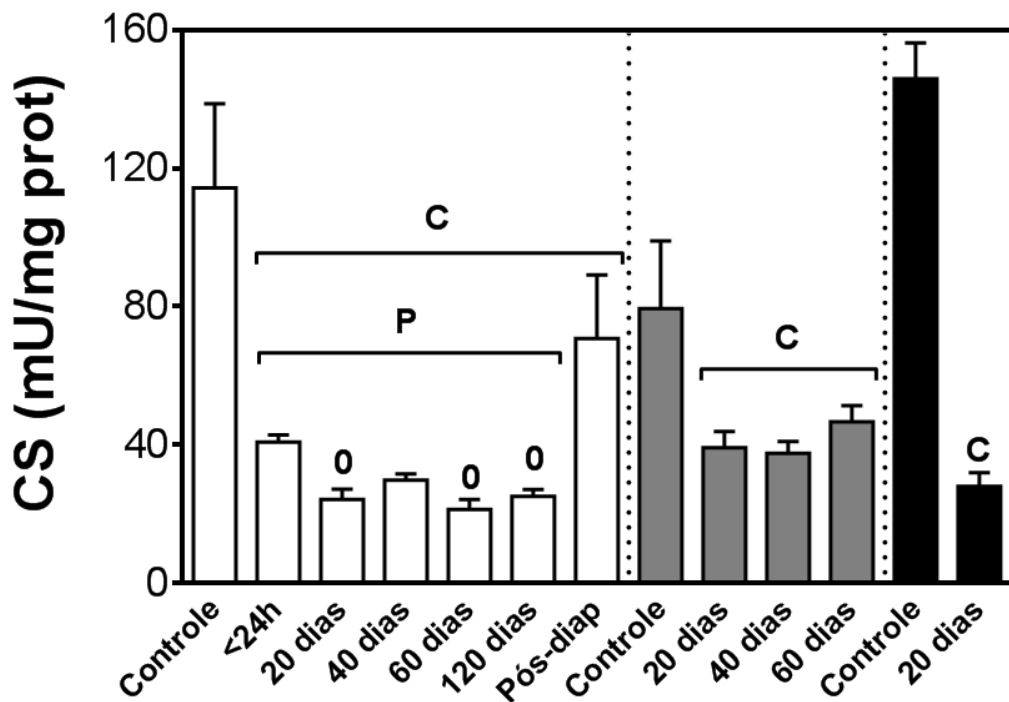


Figura 4.1.1. Atividade de citrato sintase (CS) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Controle – animais ativos no 3º instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Colunas: brancas – animais amostrados em junho de 2011 (n = 7); cinzas – animais amostrados em março de 2010 (n = 3); pretas – animais amostrados em janeiro de 2010 (n = 4). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle; 0 – em comparação ao grupo <24h; P – em relação ao grupo Pós-diap.

As atividades das enzimas piruvato quinase (PK) e glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) permaneceram inalteradas quando comparados animais controle, animais em diapausa e animais ativos após 120 dias em diapausa (**Figura 4.1.2** e **Figura 4.1.3**).

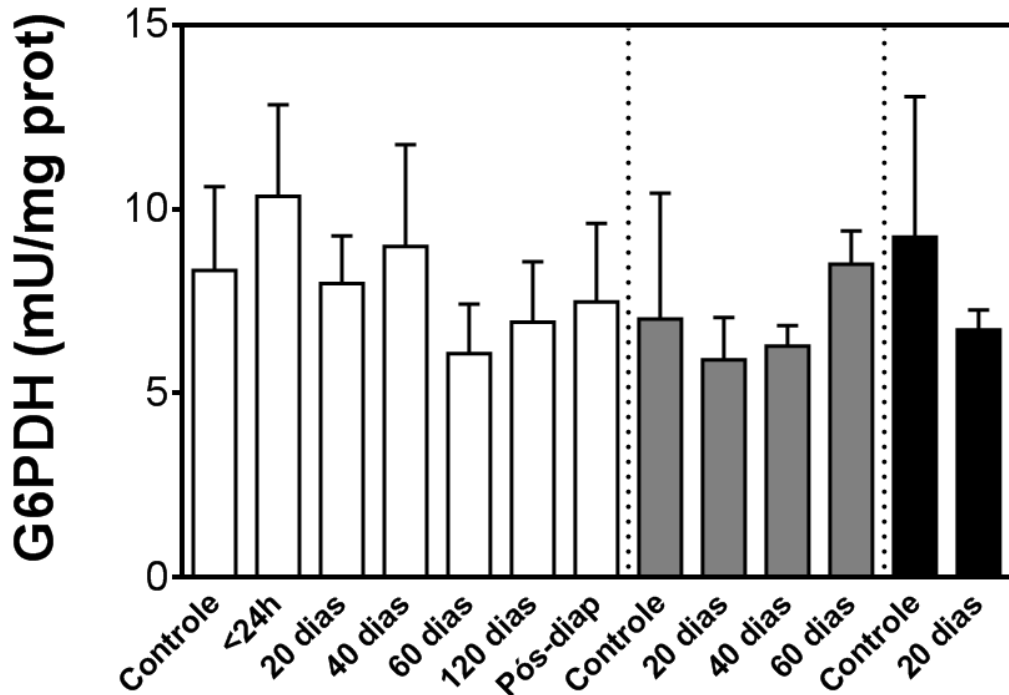


Figura 4.1.2. Atividade de glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Controle – animais ativos no 3º instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Colunas: brancas – animais amostrados em junho de 2011 (n = 7); cinzas – animais amostrados em março de 2010 (n = 3); pretas – animais amostrados em janeiro de 2010 (n = 4). Não há diferença significativa entre os grupos.

Nas primeiras 24 horas de diapausa houve um aumento de 360% da atividade de isocitrato desidrogenase dependente de NADP^+ (ICDH) em relação ao grupo controle (**Figura 4.1.4**). Após 20 dias de diapausa, a atividade de ICDH diminuiu 33% em relação ao grupo <24h, mas manteve-se maior que os níveis do grupo controle até os 40 dias de diapausa. A partir do 60º dia de diapausa, a atividade de ICDH apresentou valores semelhantes aos do grupo controle e assim manteve-se nos animais em diapausa por 120 dias e ativos após 120 dias em diapausa (**Figura 4.1.4**).

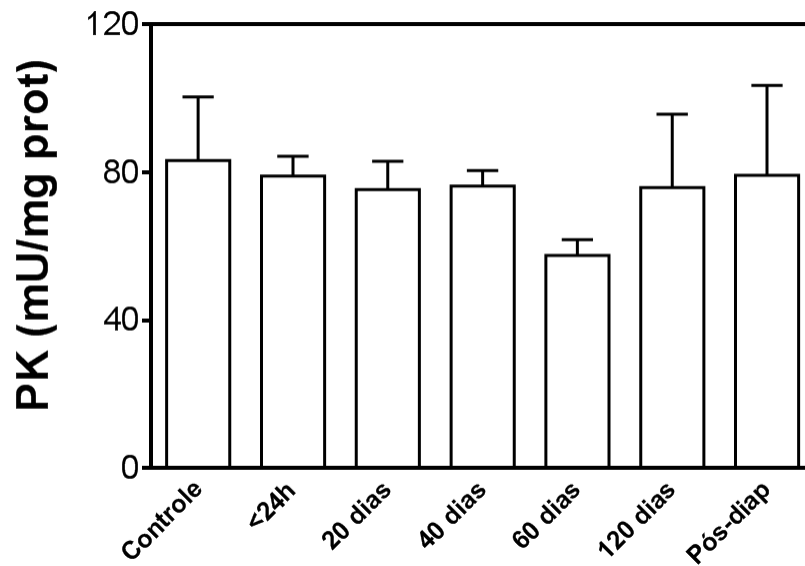


Figura 4.1.3. Atividade de piruvato quinase (PK) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Controle – animais ativos no 3º instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Animais amostrados em junho de 2011 (n = 5-7).

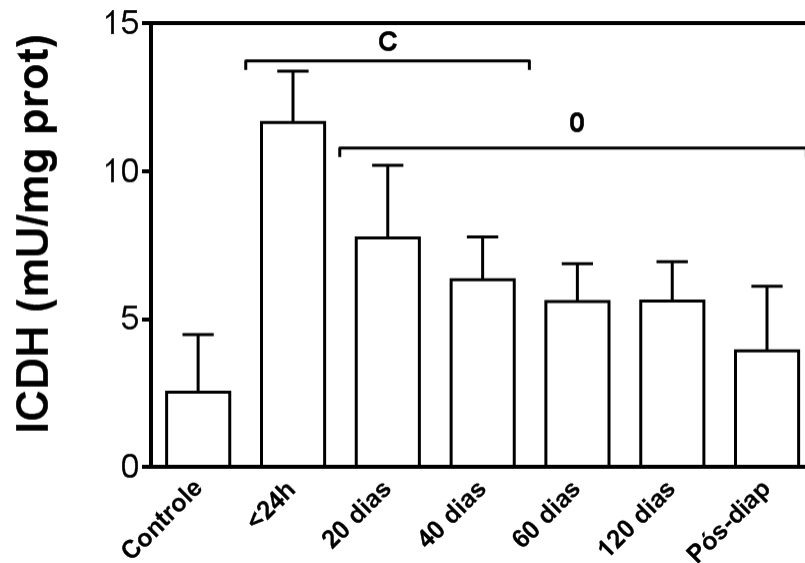


Figura 4.1.4. Atividade de isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (ICDH) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Controle – animais ativos no 3º instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Animais amostrados em junho de 2011 (n = 7). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle; 0 – em comparação ao grupo <24h.

4.2 Atividades de enzimas antioxidantes e glutatona transferase

A atividade de glutatona redutase foi aferida por dois diferentes métodos e, em ambos os casos, não foi detectada atividade em homogeneizados de corpo inteiro de *C. lacinia*. Também esteve abaixo do limite de detecção do método a atividade de glutatona peroxidase dependente de selênio (Se-GPX).

Nos animais coletados em junho de 2011, a atividade de catalase diminuiu 44% nas primeiras 24 horas de diapausa em relação ao controle (**Figura 4.2.1**). Houve uma queda de 57% na atividade de catalase quando comparados o grupo 20 dias e o <24h. Entre o 20º e o 120º dia de diapausa, a atividade de catalase manteve-se em média 72% menor que os níveis do grupo controle. Após a diapausa, animais ativos apresentaram atividade de catalase 142% maior que animais em diapausa por 120 dias, mas ainda 29% menor que animais controle (**Figura 4.2.1**).

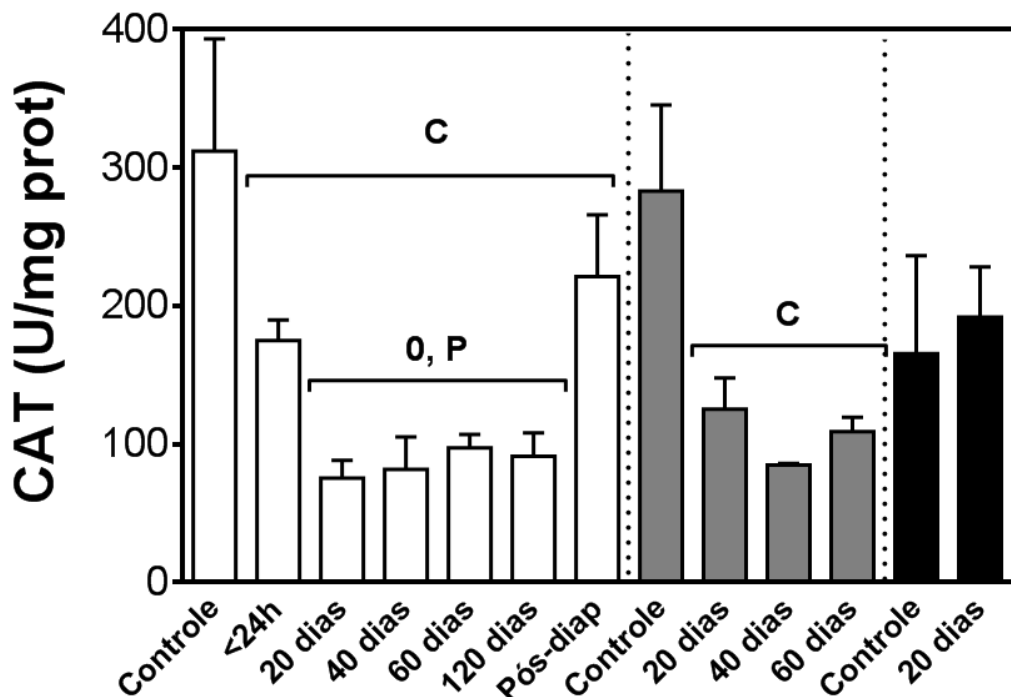


Figura 4.2.1. Atividade de Catalase (CAT) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Controle – animais ativos no 3º instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Colunas: brancas – animais amostrados em junho de 2011 (n = 7); cinzas – animais amostrados em março de 2010 (n = 3); pretas – animais amostrados em janeiro de 2010 (n = 3). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle; 0 – em comparação ao grupo <24h; P – em relação ao grupo Pós-diap.

De forma semelhante, nos animais coletados em março de 2010, a atividade de catalase diminuiu 58% no grupo 20 dias em relação ao controle e manteve-se em média 62% menor que o controle entre 20 e 60 dias de diapausa (**Figura 4.2.1**). Por outro lado, não houve diferença significativa entre as médias dos grupos controle e 20 dias nos animais coletados em janeiro de 2010 (**Figura 4.2.1**). A grande variabilidade nas determinações de catalase nesse grupo de animais pode explicar a não observação de alterações na diapausa.

Nos animais amostrados em junho de 2011, a atividade de glutatona transferase (GST) aumentou drasticamente (370%) nas primeiras 24 horas de diapausa em comparação ao grupo controle (**Figura 4.2.2**). Após 20 dias de diapausa, a atividade de GST caiu 18% em relação ao grupo <24h. Ao longo de toda a diapausa, a atividade de GST manteve-se em média 240% mais alta que de animais controle, retornando a níveis semelhantes ao controle no final da diapausa em animais ativos após 120 dias em diapausa (**Figura 4.2.2**).

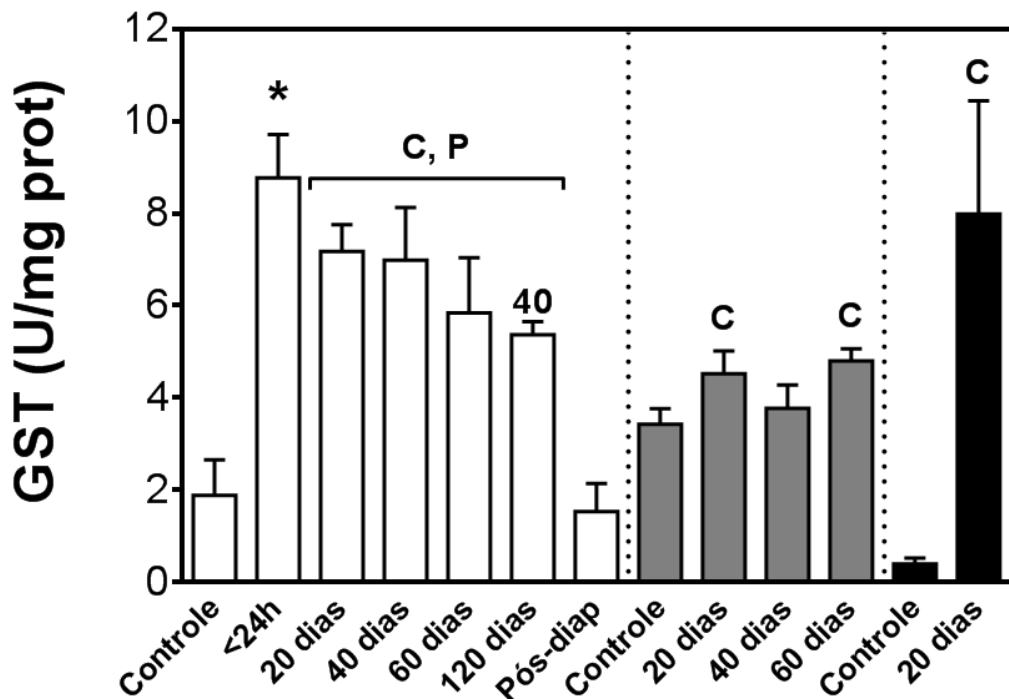


Figura 4.2.2. Atividade de Glutaciona Transferase (GST) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Controle – animais ativos no 3° instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Colunas: brancas – animais amostrados em junho de 2011 (n = 7); cinzas – animais amostrados em março de 2010 (n = 3); pretas – animais amostrados em janeiro de 2010 (n = 3). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle; 40 – em comparação ao grupo 40 dias; P – em relação ao grupo Pós-diap. *significativamente diferente dos demais grupos dentro do mesmo período.

Atividades de GST elevadas também foram observadas nos outros períodos de coleta, entretanto, a intensidade do aumento variou. Nos animais coletados em março de 2010, a atividade de GST aumentou 30% em relação ao controle, enquanto nos animais coletados em janeiro de 2010, este aumento foi de aproximadamente 20 vezes quando comparados os grupos 20 dias e controle (**Figura 4.2.2**). Os valores dos controles variaram consideravelmente entre os 3 grupos: nos animais de junho de 2011, a atividade foi cerca da metade que os de março de 2010 (1,87 *versus* 3,42 U/mg proteína) e aproximadamente nove vezes maior que os de janeiro de 2010 (0,39 U/mg proteína).

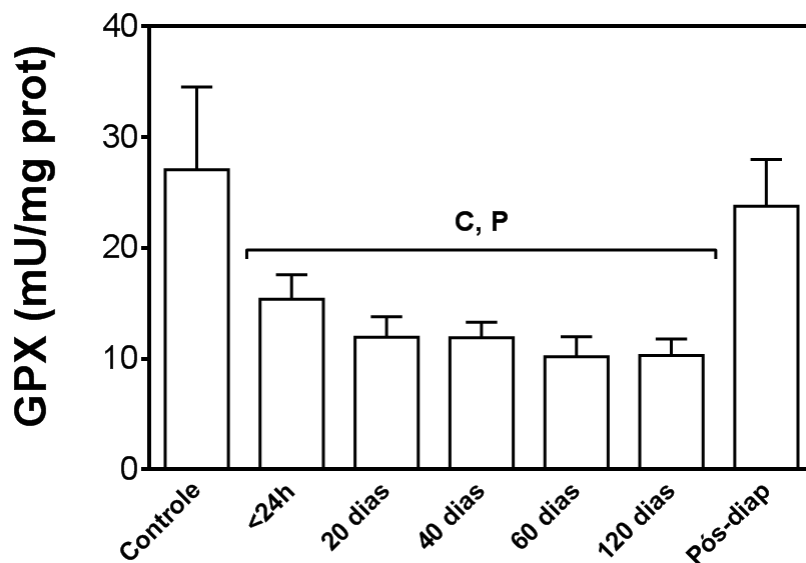


Figura 4.2.3. Atividade de Glutathione Peroxidase (GPX) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Controle – animais ativos no 3° instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Animais amostrados em junho de 2011 (n = 7). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle; P – em relação ao grupo Pós-diap.

Ambas as atividades de glutathione peroxidase (GPX) e ascorbato peroxidase (APX) diminuíram durante a diapausa (**Figura 4.2.3** e **Figura 4.2.4**). A atividade de GPX diminuiu 43% em relação ao controle, mantendo-se em média 56% menor em comparação ao controle ao longo da diapausa e retornou a níveis semelhantes ao controle em animais ativos após 120 dias de diapausa (**Figura 4.2.3**). De maneira similar, a atividade de APX diminuiu 64% em relação ao controle, manteve-se em média 60% menor em comparação ao controle ao longo da diapausa e retornou a níveis semelhantes ao controle em animais ativos após 120 dias de diapausa (**Figura 4.2.4**).

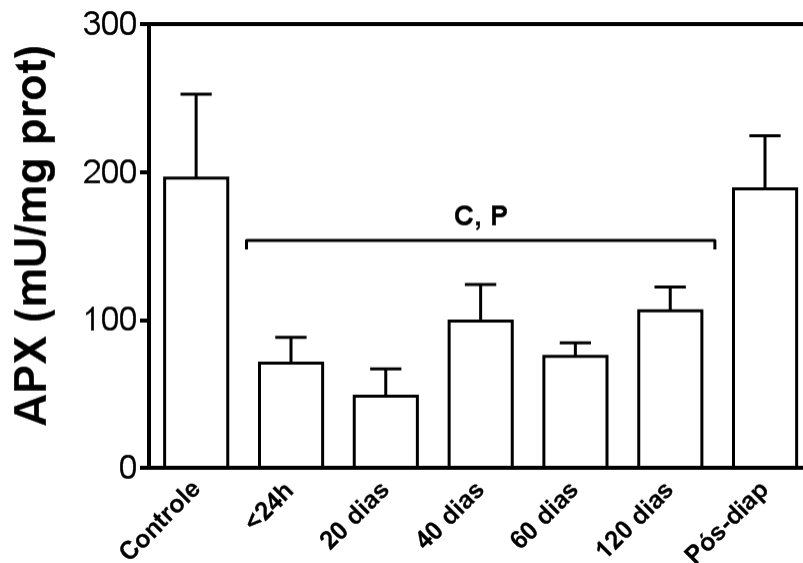


Figura 4.2.4. Atividade de Ascorbato Peroxidase (APX) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Controle – animais ativos no 3° instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Animais amostrados em junho de 2011 (n = 5). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle; P – em relação ao grupo Pós-diap.

4.3 Glutathiona

Em animais coletados em 2011, a concentração de total de glutathiona (GSH-eq) manteve-se inalterada nas primeiras 24 horas de diapausa. No 20° dia de diapausa houve redução de 30% em relação ao controle e no 40° dia diminuição de 51% em relação ao grupo 20 dias (**Figura 4.3.1 A**). A concentração de GSH-eq entre 40 e 120 dias de diapausa manteve-se em média 68% menor em relação ao controle. Após diapausa de 120 dias, animais ativos apresentaram a maior concentração de GSH-eq entre todos os grupos, sendo 84% maior que o controle (**Figura 4.3.1 A**). A redução das concentrações de GSH-eq durante a diapausa foi consistente nos outros períodos de coleta. Após 20 dias de diapausa a concentração de GSH-eq foi 70% e 82% menor em relação aos controles nos períodos de março e janeiro de 2010 respectivamente (**Figura 4.3.1 A**).

A concentração de glutathiona dissulfeto (GSSG) manteve-se em níveis semelhantes ao controle até o 40° dia de diapausa, quando houve queda de 76% em relação ao controle nos animais coletados em 2011 (**Figura 4.3.1 B**). Entre 60 e 120 dias de diapausa, a concentração de GSSG esteve em média 72% menor em comparação ao controle e retornou ao nível do

controle em animais ativos após 120 dias em diapausa (**Figura 4.3.1 B**). A redução da concentração de GSSG ocorreu após 20 dias de diapausa em animais coletados em 2010, atingindo valores 81% e 74% menores que os controles nos meses de março e janeiro respectivamente (**Figura 4.3.1 B**).

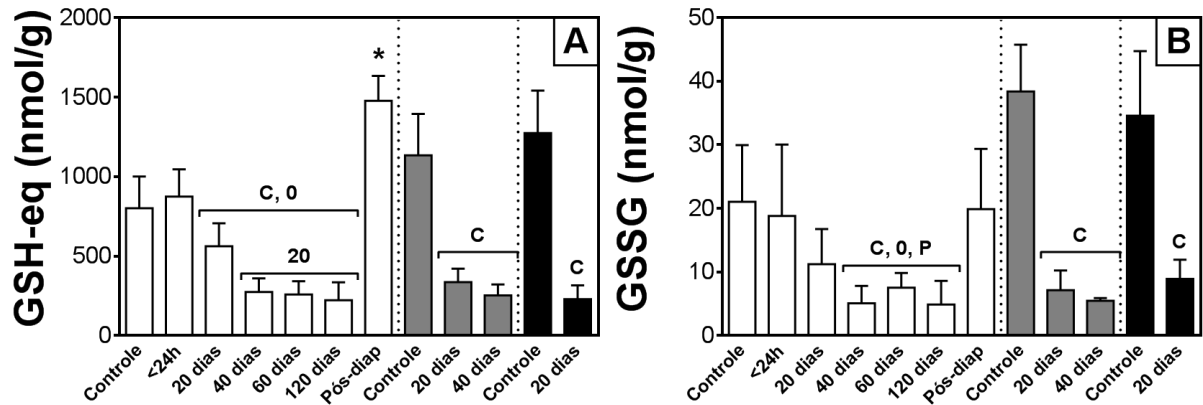


Figura 4.3.1. Concentrações do total de glutatona (A, GSH-eq) e de glutatona dissulfeto (B, GSSG) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Valores expressos em nmol por grama de peso úmido. Controle – animais ativos no 3º instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Colunas: brancas – animais amostrados em junho de 2011 (n = 7); cinzas – animais amostrados em março de 2010 (n = 3-4); pretas – animais amostrados em janeiro de 2010 (n = 7). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle; 0 – em comparação ao grupo <24h; 20 – em relação ao grupo 20 dias; P – em relação ao grupo Pós-diap. *significativamente diferente dos demais grupos dentro do mesmo período.

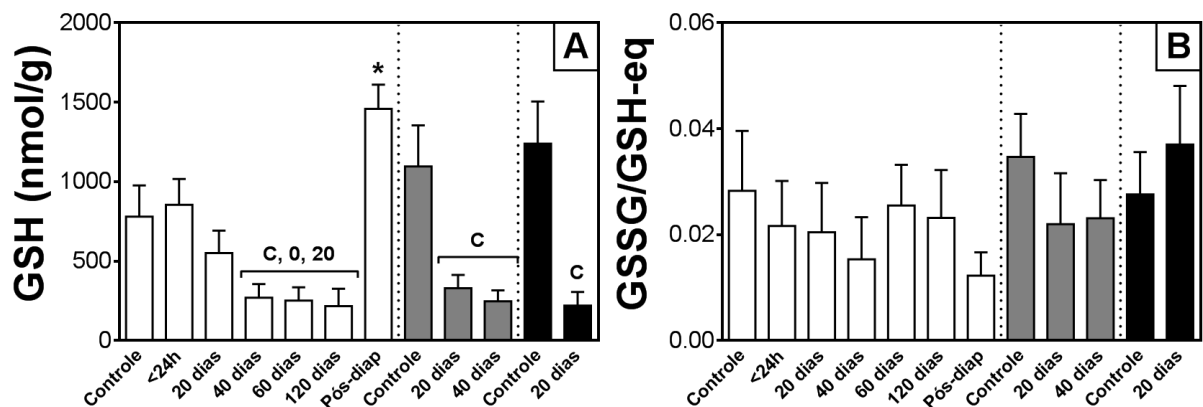


Figura 4.3.2. Concentração de glutatona reduzida (A, GSH) e razão entre os conteúdos de glutatona dissulfeto e glutatona total (B, GSSG/GSH-eq) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Valores de GSH expressos em nmol por grama de peso úmido. Controle – animais ativos no 3º instar; <24h, 20, 40, 60 e 120 dias – animais em diapausa por estes períodos; Pós-diap – animais que retomaram o desenvolvimento após 120 dias em diapausa. Colunas: brancas – animais amostrados em junho de 2011 (n = 7); cinzas – animais amostrados em março de 2010 (n = 3-4); pretas – animais amostrados em janeiro de 2010 (n = 7). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle; 0 – em comparação ao grupo <24h; 20 – em relação ao grupo 20 dias. *significativamente diferente dos demais grupos dentro do mesmo período.

Os níveis de glutatona reduzida (GSH) diminuíram 65% em relação ao controle no 40º dia de diapausa em animais coletados em 2011 (**Figura 4.3.2 A**). A concentração de GSH manteve-se em média 68% menor que a média do grupo controle até o final da diapausa. A diminuição da concentração de GSH foi de 70% no 20º dia de diapausa nos animais coletados em março de 2010. Em janeiro de 2010, esta redução foi de 82% (**Figura 4.3.2 A**). A relação entre glutatona dissulfeto e o total de glutatona (GSSG/GSH-eq), um importante indicador de desequilíbrio redox, não apresentou diferença significativa entre as médias dos grupos experimentais (**Figura 4.3.2 B**).

4.4 Indicadores de dano oxidativo

Após 20 dias de diapausa, a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) diminuiu 60% e 24% em animais coletados em março e janeiro de 2010 respectivamente (**Figura 4.4.1 A**). Nos animais coletados em março, a concentração de TBARS no grupo 40 dias foi similar à do grupo controle (**Figura 4.4.1 A**). Os níveis de proteínas carboniladas (CP) não apresentaram diferença significativa entre si ao longo de 40 dias de diapausa nos animais coletados em março de 2010 (**Figura 4.4.1 B**). Entretanto, nos animais coletados em janeiro, a concentração de CP diminuiu 70% nos animais em diapausa por 20 dias em relação ao controle (**Figura 4.4.1 B**). Não determinamos TBARS e proteínas carboniladas em animais coletados em 2011.

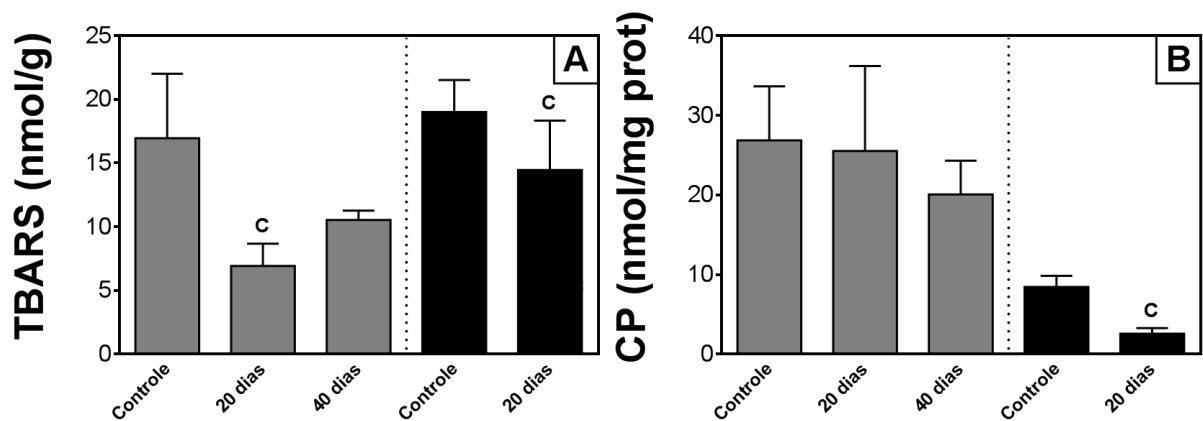


Figura 4.4.1. Concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (A, TBARS) e de proteínas carboniladas (B, CP) em homogeneizados de corpo inteiro de lagartas *Chlosyne lacinia* ativas ou em diapausa. Valores de TBARS expressos em nmol por grama de peso úmido. Controle – animais ativos no 3º instar; 20 e 40 dias – animais em diapausa por estes períodos. Colunas: cinzas – animais amostrados em março de 2010 (n = 3-4); pretas – animais amostrados em janeiro de 2010 (n = 7). Diferenças significativas entre os grupos amostrados em um mesmo período: C – em comparação ao controle.

4.5 Correlações

A análise de correlações foi feita somente nos animais coletados no ano de 2011. Pelo fato de terem sido determinadas em um mesmo indivíduo, as atividades de diferentes enzimas foram os parâmetros correlacionados entre si. Não foram feitas correlações entre outros parâmetros, por exemplo, GSH-eq, GSSG/GSH-eq e TBARS. Observamos correlação significativa entre a atividade de CS e as atividades de APX, catalase, GPX e GST (**Figura 4.5.1**). A correlação entre CS e APX apresentou $p < 0,0001$ e *Spearman* $r = 0,6790$ (**Figura 4.5.1 A**). A correlação entre CS e catalase apresentou $p < 0,0001$ e *Spearman* $r = 0,7810$ (**Figura 4.5.1 B**). A correlação entre CS e GPX apresentou $p < 0,0001$ e *Spearman* $r = 0,9096$ (**Figura 4.5.1 C**). A correlação entre CS e GST apresentou $p = 0,0061$ e *Spearman* $r = -0,3623$ (**Figura 4.5.1 D**).

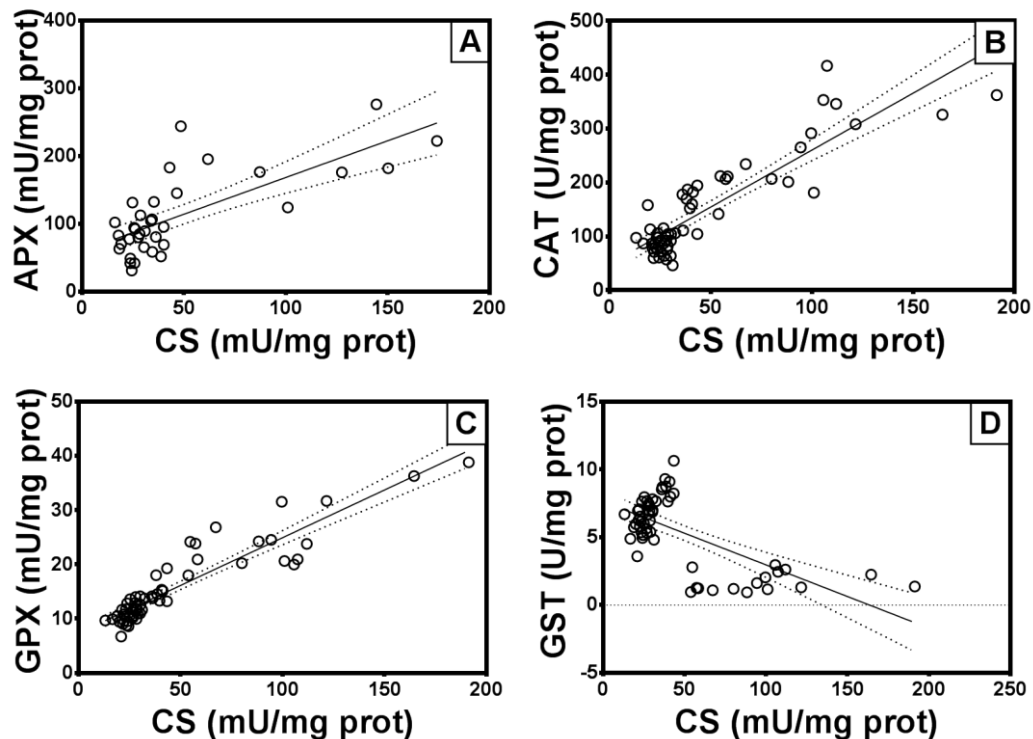


Figura 4.5.1. Correlações entre a atividade de citrato sintase (CS) e as atividades de ascorbato peroxidase (A, APX), catalase (B, CAT), glutathiona peroxidase (C, GPX) e glutathiona transferase (D, GST). Cada ponto representa um indivíduo. As medidas das atividades das duas enzimas comparadas em cada gráfico foram feitas de um mesmo homogeneizado. Apenas os dados de animais coletados em 2011 foram utilizados nestas análises.

Também houve correlação significativa entre as atividades de GST e ICDH (**Figura 4.5.2 A**) com $p < 0,0001$ e *Spearman* $r = 0,8590$ e entre as atividades de PK e G6PDH (**Figura 4.5.2 B**) com $p = 0,0002$ e *Spearman* $r = 0,4939$.

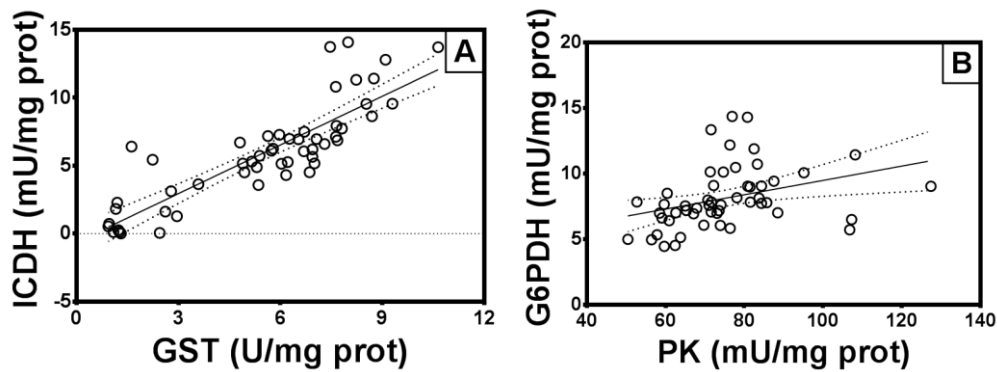


Figura 4.5.2. Correlações entre as atividades de glutiona transferase (GST) e NADP⁺-isocitrato desidrogenase (A, ICDH) e entre as atividades de piruvato quinase (PK) e glicose 6-fosfato desidrogenase (B, G6PDH). Cada ponto representa um indivíduo. As medidas das atividades das duas enzimas comparadas em cada gráfico foram feitas de um mesmo homogeneizado. Apenas os dados de animais coletados em 2011 foram utilizados nestas análises.

4.6 Sequências parciais de genes de interesse

Sequências parciais de genes para as proteínas catalase, Cu,Zn-superóxido dismutase, 1-cys peroxiredoxina, glutiona S-transferase δ e proteína ribossomal S7 foram obtidas (Apêndice A) e comparadas no banco de dados do NCBI (**Tabela 4.5.1**). A sequência parcial de DNAC referente à catalase apresentou similaridade às sequências de catalase de outros lepidópteros, dentre eles *Bombyx mori* (Bombycidae), *Helicoverpa armigera* (Noctuidae), duas espécies do gênero *Spodoptera* (Noctuidae) e cinco espécies do gênero *Heliconius* (Nymphalidae). A sequência referente à Cu,Zn-SOD apresentou similaridade às sequências de Cu,Zn-SOD dos lepidópteros *Papilio xuthus* (Papilionidae), *Hyphantria cunea* (Arctiidae), duas espécies do gênero *Bombyx*, *Biston betularia* (Geometridae), *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa armigera*. A sequência referente à GST δ apresentou similaridade às sequências de diferentes famílias de GSTs dos lepidópteros *Heliconius melpomene* (Nymphalidae), *Cydia pomonella* (Tortricidae), *Choristoneura fumiferana* (Tortricidae), *Bombyx mori*, *Galleria mellonella* (Pylalidae), *Corcyra cephalonica* (Pylalidae), *Plutella xylostella* (Plutellidae) e *Antheraea pernyi* (Saturniidae). Já a sequência referente à proteína ribossomal S7 de *C. lacinia* apresentou grande similaridade às sequências de outros membros da família Nymphalidae, *Ephydryas aurinia*, *Heliconius erato* e *Heliconius melpomene*, além de outras oito espécies da

ordem Lepidoptera. Por outro lado, a sequência parcial obtida de *C. lacinia* referente a 1-cys peroxiredoxina apresentou maior similaridade às sequências de peroxidases de espécies de outros grupos filogenéticos, incluindo o artrópode *Eriocheir sinensis* (Malacostraca), os moluscos *Cristaria plicata* (Bivalvia) e *Aplysia californica* (Gastropoda), e o equinodermo *Strongylocentrotus intermedius* (Echinoidea).

Mesmo tratando-se de sequências parciais, a análise na ferramenta BLASTx detectou domínios conservados, classificando as sequências de aminoácidos em grupos específicos. A ferramenta BLASTx deduz os aminoácidos a partir da sequência de nucleotídeos e procura sequências de aminoácidos similares no banco de dados. A sequência de aminoácidos deduzida de ChlGST δ foi classificada dentro da subfamília de GSTs delta e épsilon (domínio: cd03177), apresentando interface de dimerização, domínio de interação N- terminal e bolso hidrofóbico de ligação ao substrato (sítio-H). A sequência de aminoácidos deduzida de ChlCuZnSOD foi classificada na família das Cu,Zn-superóxido dismutases (domínio: cd00305), apresentando o sítio ativo, o sítio de ligação a Cu²⁺, o sítio de ligação a Zn²⁺ e regiões de dimerização. A sequência de aminoácidos deduzida de ChlCAT apresentou bolso de ligação ao grupo heme e foi classificada no clado 3 da família das catalases. Por último, as sequências de aminoácidos deduzidas de Chl1CysPrx e ChlRpS7 foram classificadas como membro da subfamília 1-cys peroxiredoxinas (domínio: cd03016) e membro da superfamília de proteínas ribossomais S7 (domínio: pfam01251), respectivamente.

Tabela 4.6.1. Sequências de RNAm mais similares aos fragmentos de DNAC clonados e sequenciados de *C. lacinia* segundo a ferramenta BLAST/NCBI. *ChlCAT*, catalase; *ChlCuZnSOD*, Cu,Zn-superóxido dismutase; *ChlCysPrx*, 1-cys peroxiredoxina; *ChlGSTδ*, glutationa S-transferase δ; *ChlRpS7*, proteína ribossomal S7.

Identificação	Descrição	Score total	E value	Identidade	Acesso
<i>ChlCAT</i>					
	<i>Bombyx mori</i> catalase RNAm	473	6e-130	82%	NM_001043447.1
	<i>Helicoverpa armigera</i> catalase RNAm	455	2e-124	82%	JQ009332.1
	<i>Spodoptera litura</i> catalase RNAm	437	4e-119	81%	JQ663444.1
	<i>Spodoptera exigua</i> catalase RNAm	416	1e-112	80%	JN051294.1
	<i>Heliconius cydno</i> catalase RNAm	385	2e-103	80%	GQ987727.1
	<i>Heliconius heurippa</i> catalase RNAm	379	1e-101	80%	GQ987748.1
	<i>Heliconius melpomene</i> catalase RNAm	370	5e-99	80%	GQ987782.1
	<i>Heliconius ismenius</i> catalase RNAm	360	9e-96	80%	JN898099.1
	<i>Heliconius numata</i> catalase RNAm	358	3e-95	79%	JN898105.1
<i>ChlCuZnSOD</i>					
	<i>Papilio xuthus</i> SOD RNAm	284	4e-73	77%	AK401283.1
	<i>Hyphantria cunea</i> Cu,Zn-SOD RNAm	284	4e-73	77%	AB290453.1
	<i>Bombyx mori</i> Cu,Zn-SOD RNAm	284	4e-73	77%	NM_001043619.1
	<i>Bombyx mandarina</i> Cu,Zn-SOD RNAm	275	2e-70	76%	AM410997.1
	<i>Biston betularia</i> Cu,Zn-SOD RNAm	266	1e-67	76%	JF811436.1
	<i>Spodoptera exigua</i> SOD RNAm	241	5e-60	74%	EU263634.1
	<i>Helicoverpa armigera</i> Cu,Zn-SOD RNAm	212	2e-51	73%	JQ009331.1
<i>ChlCysPrx</i>					
	<i>Aplysia californica</i> GPX RNAm	212	2e-51	72%	NM_001204579.1
	<i>Strongylocentrotus intermedius</i> GPX RNAm	203	1e-48	71%	HM208171.1
	<i>Cristaria plicata</i> peroxiredoxina 6 RNAm	185	4e-43	71%	HQ199304.1
	<i>Eriocheir sinensis</i> peroxiredoxina 6 RNAm	174	2e-39	71%	FJ617305.1
	<i>Eriocheir sinensis</i> GPX RNAm	172	2e-39	71%	EU626070.1
<i>ChlGSTδ</i>					
	<i>Heliconius melpomene</i> GST RNAm	497	5e-137	84%	EF207961.1
	<i>Cydia pomonella</i> GST1 RNAm	407	7e-110	80%	EU887533.1
	<i>Choristoneura fumiferana</i> GST3 RNAm	399	1e-107	79%	EF370473.1
	<i>Bombyx mori</i> GST delta 2 RNAm	387	7e-104	79%	NM_001043509.2
	<i>Galleria mellonella</i> GST-like RNAm	378	3e-101	78%	AF336288.1
	<i>Corcyra cephalonica</i> GST RNAm	361	3e-96	77%	DQ234273.1
	<i>Plutella xylostella</i> GST delta RNAm	338	3e-89	76%	AB541016.1
	<i>Antheraea pernyi</i> GST theta RNAm	338	3e-89	77%	EU541490.1
<i>ChlRpS7</i>					
	<i>Euphydryas aurinia</i> RpS7 RNAm	365	1e-97	92%	HQ424729.1
	<i>Papilio polytes</i> RpS7 RNAm	259	1e-65	83%	AK402419.1
	<i>Papilio xuthus</i> RpS7 RNAm	259	1e-65	83%	AK401100.1
	<i>Papilio dardanus</i> RpS7 RNAm	257	4e-65	83%	AJ783760.1
	<i>Manduca sexta</i> RpS7 RNAm	253	5e-64	83%	L20096.1
	<i>Heliconius erato</i> RpS7 RNAm	248	2e-62	82%	EF207966.1
	<i>Heliconius melpomene</i> RpS7 RNAm	246	8e-62	82%	JF265022.1
	<i>Mythimna separata</i> RpS7 RNAm	241	3e-60	81%	JN582331.1
	<i>Spodoptera frugiperda</i> RpS7 RNAm	235	1e-58	81%	AF400206.1
	<i>Plutella xylostella</i> RpS7 RNAm	232	2e-57	81%	AB180420.1
	<i>Galleria mellonella</i> RpS7 RNAm	228	2e-56	80%	DQ137845.1
	<i>Bombyx mori</i> RpS7 RNAm	212	2e-51	79%	NM_001043796.1

5 Discussão

5.1 Enzimas do metabolismo intermediário

5.1.1 Citrato sintase

Os animais coletados nos três períodos: junho de 2011, março e janeiro de 2010, apresentaram reduzidas atividades de CS durante a diapausa. A CS é a primeira enzima do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), que catalisa a reação de condensação entre acetil-CoA e oxaloacetato para formar citrato e CoA-SH no interior das mitocôndrias. Portanto, a atividade desta enzima é utilizada como um marcador de densidade mitocondrial e capacidade oxidativa/aeróbica em tecidos animais (Leek et al. 2001; Hindle et al. 2010; Chamberlin et al. 1997). A queda da atividade de CS durante a diapausa indica a ocorrência de ajustes de redução dos metabolismos intermediário e respiratório peculiares a diversas situações de depressão metabólica, incluindo a diapausa (Guppy et al. 1994; Guppy & Withers 1999; Storey & Storey 2012; Storey & Storey 2004; Hahn & Denlinger 2007). Durante a depressão metabólica em resposta a baixas temperaturas (até -20°C), larvas da mosca *Eurosta solidaginis* e da mariposa *Epiblema scudderiana* apresentam reduzida atividade de CS e de outras duas enzimas mitocondriais (Joanisse & Storey 1994). A redução da atividade de CS também foi observada durante a estivação em diferentes tecidos de anfíbios (Pereira 2009) e peixes pulmonados (Frick et al. 2008b). Entretanto, a queda da atividade de CS não é uma alteração universal entre animais em depressão metabólica. Por exemplo, a atividade de CS permanece inalterada durante a estivação do gastrópode *Achatina fulica* (Salway et al. 2010) e está aumentada em diferentes tecidos musculares de esquilos *Spermophilus lateralis* em hibernação (Wickler et al. 1991; Steffen et al. 1991).

A possível redução da capacidade oxidativa em *C. lacinia* durante a diapausa está de acordo com a redução do consumo de oxigênio que caracteriza a depressão metabólica, por exemplo, em insetos durante a diapausa (exemplos abaixo), em caramujos (Guppy et al. 2000), peixes pulmonados (Guppy et al. 1994) e anfíbios (Young et al. 2011) durante a estivação e em mamíferos durante a hibernação (Toien et al. 2001). Em pupas de moscas do gênero *Sarcophaga* que habitam uma região temperada, o consumo de oxigênio é 90% menor quando comparados animais em diapausa com animais ativos (Denlinger et al. 1972). Em pupas de moscas de diferentes espécies de áreas tropicais, o consumo de oxigênio é pelo menos 85% menor durante a diapausa em comparação aos animais ativos (Denlinger 1979). No caso de larvas de lepidópteros, há redução do consumo de oxigênio durante a diapausa em

diversas espécies de diferentes famílias (Adkisson et al. 1963; Beck & Hanec 1960; Hansen & Harwood 1968; Usua 1974; Wipking et al. 1995; Kostal et al. 1998; Han et al. 2008). Tal redução varia entre 90% (Usua 1974) e 44% (Beck & Hanec 1960). Consistente com as observações de reduzido consumo oxigênio e reduzida atividade de CS está à diminuição da atividade de enzimas envolvidas na respiração mitocondrial durante a diapausa de pupas dos lepidópteros *Samia cynthia* (Shappirio 1974a) e *Antheraea pernyi* (Shappirio 1974b). Além disso, durante a diapausa, ocorre degradação de citocromos mitocondriais, que são re-sintetizados no término da diapausa de pupas de *Helicoverpa zea* (Lepidoptera) (Gruetzmacher & Keeley 1982), padrão semelhante ao da atividade de CS em *C. lacinia*.

Além do consumo de oxigênio, outras observações corroboram a possível redução da atividade de vias aeróbicas, em especial o ciclo de Krebs, durante a diapausa. A análise de metabólitos em extratos de corpo inteiro de pupas de *Sarcophaga crassipalpis* após 30 dias em diapausa demonstrou um acúmulo de piruvato e uma redução dos níveis de fumarato e isocitrato (moléculas intermediárias do ciclo de Krebs) em comparação a animais ativos, indicando reduzido fluxo na via (Michaud & Denlinger 2007). Uma diferente análise mostrou que a abundância de transcritos associados ao ciclo de Krebs aumenta no início da diapausa em relação a animais ativos em extratos de corpo inteiro de pupas de *S. crassipalpis* (Ragland et al. 2010). Entretanto, no mesmo estudo, evidenciou-se uma inibição na conversão de piruvato a acetil-CoA, sugerindo o desvio de piruvato para a gliconeogênese na diapausa (Ragland et al. 2010).

Uma potencial causa da redução da atividade de CS em homogeneizados de corpo inteiro de *C. lacinia* durante a diapausa é a atrofia de tecidos com custo energético elevado, como o músculo e o trato digestório, observada durante a diapausa (Hahn & Denlinger 2007). No caso de lagartas de lepidópteros, o trato digestório é particularmente um tecido altamente aeróbico e representa um importante componente na demanda energética (Chamberlin & King 1998). Desta forma, pode-se supor que ocorre a atrofia do trato digestório durante a diapausa em *C. lacinia*, uma vez que a alimentação é interrompida completamente.

Ao contrário de espécies que entram em diapausa durante o inverno em regiões temperadas, animais que entram em diapausa em áreas tropicais, como *C. lacinia*, reduzem suas taxas metabólicas sem o auxílio de baixas temperaturas (Denlinger 1986; Hahn & Denlinger 2011). Portanto, a redução da atividade de CS em *C. lacinia* representa uma

importante adaptação na conservação de reservas energéticas e redução da taxa metabólica durante a diapausa em uma zona tropical.

5.1.2 Glicose 6-fosfato desidrogenase e isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺

A G6PDH é a enzima responsável pela catálise da primeira reação da via das pentoses fosfato. Além de ser uma das duas etapas que resultam na formação de NADPH, esta primeira reação é responsável pelo controle do fluxo da via (Levy 1979). A manutenção da atividade de G6PDH durante a diapausa indica que lagartas de *C. lacinia* mantêm o potencial de produção de equivalentes redutores, na forma de NADPH, pela via das pentoses fosfato, mesmo em depressão metabólica. A via das pentoses fosfato está relacionada ao sistema antioxidante uma vez que o NADPH proveniente desta via é empregado em diferentes reações de redução de antioxidantes e tem importante papel na manutenção do estado redox celular (Tian et al. 1998; Ho et al. 2007). Por exemplo, a enzima glutationa redutase (GR, cuja atividade não foi detectada em *C. lacinia*) catalisa a redução de uma molécula de GSSG em duas de GSH com o concomitante consumo de NADPH (Hermes-Lima 2004). Outros sistemas, como os que envolvem tioredoxina (Arnér & Holmgren 2000) e ácido ascórbico (Del Bello et al. 1994), também consomem NADPH na regeneração de seus componentes.

A atividade de G6PDH tem sido aferida em diferentes estudos envolvendo alterações do sistema antioxidante e estresse oxidativo (Ursini et al. 1997; Lushchak et al. 2001; Lushchak & Bagnyukova 2007; Lama et al. 2013; outros exemplos abaixo). Semelhante às lagartas de *C. lacinia* em diapausa, a atividade de G6PDH não se altera em resposta à estivação em caramujos aquáticos *Biomphalaria tenagophila* (Ferreira et al. 2003) e em caramujos terrestres *Helix aspersa* (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima 2003; Ramos-Vasconcelos et al. 2005). A manutenção da atividade de G6PDH também ocorre durante a hibernação no intestino de esquilos *Spermophilus tridecemlineatus* (Carey et al. 2003) e de lagartos *Tupinambis merianae* (Welker 2009). Em contrapartida, a atividade de G6PDH hepática aumenta durante a estivação do caramujo *Otala lactea* por um mecanismo de fosforilação (Ramnanan & Storey 2006).

Além de prover potencial redutor para o sistema antioxidante, a via das pentoses fosfato também é uma importante fonte de NADPH para diversas reações de biossíntese. Especificamente no caso da diapausa de insetos, a síntese de polióis é uma importante via

consumidora de NADPH (Kageyama & Ohnishi 1973; Storey et al. 1991). Em adultos de percevejos *Pyrrhocoris apterus*, há um aumento da atividade de G6PDH e de outras enzimas envolvidas na síntese de polióis durante a diapausa (Kostál et al. 2004). Os polióis são açúcares e álcoois de baixas massas moleculares (e.g. glicerol e sorbitol) amplamente estudados em insetos habitando regiões que atingem baixíssimas temperaturas. O acúmulo destas moléculas ocorre em grande parte dos insetos que resistem às baixas temperaturas em depressão metabólica (Storey 1997; Storey & Storey 1991; Somme 1982). A elevada concentração de polióis e açúcares de baixa massa molecular (e.g. glicose e trealose) exerce função crioprotetora, conferindo resistência ao frio e congelamento (Storey & Storey 1991). Os efeitos dessas moléculas incluem a redução dos pontos de fusão e *supercooling*, a estabilização de proteínas, e a proteção contra desidratação (Zachariassen 1985; Carpenter & Crowe 1988; Crowe et al. 1990).

Este último efeito apresenta particular importância para animais vivendo em ambientes áridos, evidenciando a sobreposição de mecanismos de proteção à desidratação e ao frio/congelamento (Ring & Danks 1994; Danks 2000). De fato, em espécies tropicais que entram em diapausa, ocorre o acúmulo de polióis durante a diapausa (Pullin & Wolda 1993). A síntese desses compostos de baixo peso molecular, e consequente resistência à desidratação, seria de extrema importância na manutenção do equilíbrio osmótico dos fluidos corporais durante as estações secas no cerrado, onde a umidade relativa média mensal pode chegar a até 34% no pico da seca em setembro (Figura 1.3.2.1). Desta forma, a investigação da concentração de açúcares e polióis, bem como as enzimas envolvidas em suas sínteses, por exemplo, aldose redutase, poliol desidrogenases e cetose redutase (Kostál et al. 2004), pode ajudar a elucidar o papel destas moléculas na adaptação a condições ambientais áridas durante a depressão metabólica.

A enzima isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (ICDH) está distribuída no citoplasma e mitocôndria de eucariotos, onde catalisa a descarboxilação reversível de isocitrato a α -cetoglutarato, reduzindo NADP⁺ a NADPH (Smolková & Ježek 2012). A forma citoplasmática desta enzima foi caracterizada em diferentes insetos, incluindo *Drosophila melanogaster* (Williamson et al. 1980), *Bombyx mori* (F Miake et al. 1977) e *Gyllus firmus* (Zera et al. 2011). Da mesma forma que a G6PDH, o NADPH formado pela ICDH pode ser empregado no sistema antioxidante (Lawler & Demaree 2001; Smolková & Ježek 2012) e na biossíntese de determinados compostos, incluindo solutos de baixo peso molecular (polióis e açúcares) e ácidos graxos (Zera et al. 2011).

Em lagartas de *C. lacinia*, ocorreu um aumento abrupto da atividade de ICDH logo no início da diapausa e uma queda gradativa até atingir níveis do grupo controle em animais pós-diapausa. Considerando a redução da densidade mitocondrial, indicada pela redução a atividade de CS, é possível que a forma citoplasmática da enzima tenha sido responsável pelo aumento da atividade ICDH. O aumento da ICDH também está de acordo com a diminuição dos níveis do metabólito isocitrato em moscas *S. crassipalpis* após 30 dias de diapausa (Michaud & Denlinger 2007). Tal aumento sugere um tipo de preparo para a entrada no estado hipometabólico, no qual ocorreria a síntese de moléculas importantes para a sobrevivência ao período de inatividade. De fato, para muitas espécies ocorre uma fase preparatória pré-diapausa, na qual grandes quantidades de reservas energéticas são acumuladas (Denlinger et al. 2005; Kostál 2006; Hahn & Denlinger 2007).

Os macronutrientes estocados em antecipação à entrada em diapausa incluem carboidratos, na forma de glicogênio; aminoácidos, na forma de proteínas especializadas; e lipídeos, na forma de triacilglicerídeos. Os triacilglicerídeos, cuja síntese requer NADPH, são o tipo de reserva energética mais importante para animais em diapausa (Hahn & Denlinger 2011) e seus níveis estão aumentados na larva do lepidóptero *Pectinophora gossypiella* em resposta à diapausa (Adkisson et al. 1963). Além de alterações quantitativas, aspectos qualitativos, como o nível de saturação de ácidos graxos, sofrem mudanças durante a diapausa (Foster & Crowder 1980; Cakmak et al. 2008). Por exemplo, a proporção de ácidos graxos insaturados aumenta em larvas de *Cydia pomonella* (Lepidoptera), de maneira que a taxa entre insaturados e saturados sobe de 1,72 em animais ativos para 2,63 em animais em diapausa (Khani et al. 2007).

5.1.3 Piruvato quinase

Não houve mudanças na atividade de piruvato quinase (PK) em resposta à diapausa ou em animais pós-diapáusicos. A última reação da glicólise, a transferência de um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato ao ADP, resultando em piruvato e ATP, catalisada pela PK é um dos três pontos de controle da via. Ao contrário da manutenção da atividade de PK observada durante a diapausa de *C. lacinia*, a atividade desta enzima diminui em várias situações de depressão metabólica. Em lagartas do lepidóptero *Chilo suppressalis*, a atividade de PK diminui durante o *overwintering*, período no qual as temperaturas atingem até -4°C (Li et al. 2002). A diminuição da atividade de PK também ocorre durante a diapausa, caracterizada por redução de mais de 99% da taxa metabólica, de embriões de *Artemia franciscana* (Patil et al.

2012). Outros casos em que a atividade de PK é reduzida incluem a estivação de anfíbios (Cowan & Storey 1999), a estivação de gastrópodes (Whitwam & Storey 1990) e a hibernação de mamíferos (Storey 1987). No caso de *C. elegans* no estado Dauer (análogo à diapausa), ocorre um aumento dos níveis de RNAm das três proteínas envolvidas nas reações irreversíveis da glicólise, hexoquinase, fosfofrutoquinase e PK (Wang & Kim 2003). Entretanto, *C. elegans* apresenta vias fermentativas alternativas (láctica e alcoólica) elevadas durante o estado Dauer e ainda são capazes de sintetizar carboidratos a partir de lipídeos pela via do glioxilato (Wang & Kim 2003; Hand et al. 2011). Ao contrário dos exemplos acima, a capacidade da via glicolítica parece estar mantida durante a diapausa em *C. lacinia* (tendo em vista a manutenção da atividade de PK), indicando o suporte da demanda energética pela via a partir de carboidratos (e.g. glicogênio e trealose). Semelhante à *C. lacinia*, a atividade de PK é mantida durante a estivação do peixe pulmonado africano *Protopterus dolloi* em diversos tecidos analisados (Frick et al. 2008a).

5.2 Sistema antioxidante e danos oxidativos

5.2.1 Glutathiona redutase e glutathiona peroxidase (H₂O₂)

Os ensaios enzimáticos empregados para aferir as atividades de Se-GPX (atividade de GPX sobre H₂O₂) e de GR em lagartas de *C. lacinia* não detectaram atividade significativa. Observações similares foram feitas em outras espécies de insetos, nos quais há atividade negligenciável ou ausente de GPX contra H₂O₂, apesar de apresentar elevada atividade contra peróxidos orgânicos (Ahmad & Pardini 1988; Weinhold et al. 1990; Ahmad 1992; Mathews et al. 1997; Joannis & Storey 1998; Ying Wang et al. 2001; Stanic et al. 2004). A ausência de Se-GPX em insetos é compensada pela presença da enzima ascorbato peroxidase (Mathews et al. 1997). Porém, há exceções, por exemplo, o barbeiro *Rhodnius prolixus* (Paes & Oliveira 1999), a mariposa *Galleria mellonella* (Hyrsl et al. 2007), os mosquitos *Chironomus riparius* (Forcella et al. 2007) e *C. ramosus* (Datkhile et al. 2009), e o besouro *Rhynchophorus phoenicis* (Bamidele et al. 2013) que apresentam relevante atividade de GPX sobre H₂O₂.

A atividade de GR é detectada em diferentes ordens de insetos, por exemplo, Orthoptera (Augustyniak et al. 2009), Hymenoptera (Dussaubat et al. 2012), Lepidoptera (Tarhan et al. 2013), Hemiptera (Laskowska et al. 1999), Coleoptera (Torres 2003) e Diptera (Datkhile et al. 2009). Entretanto, não há GR em *Drosophila melanogaster*, na qual esta enzima é substituída pelo sistema tioredoxina/tioredoxina redutase (Kanzok et al. 2001).

Portanto, é possível que outros mecanismos substituam a função da GR em *C. lacinia*. Mesmo com atividades de GR e Se-GPX abaixo dos limites de detecção dos métodos, lagartas de *C. lacinia* não apresentaram qualquer sinal de desequilíbrio redox (medido pela razão GSSG/GSH-eq) nas transições metabólicas de entrada e saída da diapausa.

5.2.2 Ascorbato peroxidase, catalase e glutathiona peroxidase

As atividades das três enzimas antioxidantes medidas, APX, catalase e GPX apresentaram o mesmo perfil em lagartas de *C. lacinia* durante a diapausa. Logo no início há uma redução, a atividade é mantida relativamente baixa ao longo da diapausa e, então, retorna às atividades do grupo controle. Poucos estudos investigaram enzimas do sistema antioxidante durante a diapausa e compararam animais ativos com animais diapáusicos. Semelhante aos resultados aqui relatados, a redução das atividades de diferentes antioxidantes também ocorre durante a diapausa em estado larval do lepidóptero *Ostrinia nubilalis*. Nesta espécie, as atividades de catalase e GPX em homogeneizados de corpo inteiro são menores em animais em diapausa em relação a animais ativos (Jovanovic-Galovic et al. 2004). Em mitocôndrias isoladas do corpo inteiro de *O. nubilalis* a atividade de catalase é menor e a de GPX é mantida em animais diapáusicos em comparação aos ativos (Jovanovic-Galovic et al. 2007). A diapausa causa redução da atividade de catalase e SOD no trato digestório de indivíduos adultos *Leptinotarsa decemlineata*, situação na qual as concentrações de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ estão reduzidas (Krishnan et al. 2007).

Além das observações de Krishnan et al. (2007), outros aspectos indicam uma produção de EROs potencialmente reduzida durante a diapausa de *C. lacinia* e, portanto, uma menor demanda por defesas antioxidantes. Primeiramente, lagartas de *C. lacinia* não se alimentam durante a diapausa, e o alimento é uma importante fonte exógena produtora de EROs, especialmente para insetos fitófagos (Ahmad & Pardini 1990; Felton & Summers 1995; Mittapalli et al. 2007). A mitocôndria, é o principal sítio de produção de EROs em células aeróbicas (Droge 2002; Turrens 2003; Brand et al. 2004) e sua quantidade esteve reduzida durante a diapausa de *C. lacinia* (considerando a atividade de CS). Além disso, há correlação entre taxa metabólica (aferida pelo consumo de O_2) e danos oxidativos ao DNA, pelo menos entre mamíferos (Adelman et al. 1988; Foksinski et al. 2004). Apesar de não ter sido medido no presente estudo, o consumo de oxigênio é diminuído durante a diapausa (seção 5.1.1). Níveis elevados de transcritos da proteína desacopladora mitocondrial UCP3 em embriões de *Artemia franciscana* durante a diapausa (Qiu et al. 2007) indicam outro

mecanismo pelo qual a produção de EROs pode estar reduzida. As UCP2 e UCP3 alteram a força próton-motiva da membrana interna mitocondrial reduzindo a produção de EROs (Brand & Esteves 2005). A investigação do papel da UCPs na diapausa tropical seria de grande valor para entender a regulação do metabolismo redox.

Outro fator concordante com a redução das atividades de enzimas antioxidantes é a reduzida taxa de síntese proteica característica de situações de depressão metabólica (Frerichs et al. 1998; Guppy & Withers 1999; Pakay et al. 2002; Storey & Storey 2012), incluindo a diapausa (Joplin & Denlinger 1989; Podrabsky & Hand 2000). Desta forma, a potencial menor produção de EROs em conjunto com os mecanismos de economia energética durante a diapausa justificam a redução das atividades de antioxidantes endógenos e a correlação entre capacidade oxidativa (CS) e as atividades antioxidantes (APX, catalase e GPX) durante a diapausa de *C. lacinia*.

Em outros tipos de hipometabolismo, também se observa a redução da atividade de enzimas antioxidantes. As atividades de catalase e GPX no rim e catalase no hepatopâncreas estão reduzidas durante a estivação do caramujo *Helix pomatia* (Nowakowska et al. 2009). Apesar de a resposta variar de acordo com o tecido aferido, as atividades de catalase no fígado e rim, de GPX no fígado e coração estão reduzidas em sapos *Scaphiopus couchii* após dois meses em estivação em comparação a animais ativos (Grundy & Storey 1998). Em lagartos *Tupinambis merianae*, a atividade de GPX intestinal é menor em animais hibernantes em comparação aos ativos (Welker 2009).

A depressão do sistema antioxidante não é um fenômeno universal entre os casos de depressão metabólica. Na verdade, em muitos casos, há a manutenção ou até mesmo um aumento de níveis/atividades de antioxidantes (Hermes-Lima & Zenteno-Savín 2002). Exemplos nos quais há aumento de expressão (níveis de RNAm ou de proteína) e de atividade de antioxidantes incluem a estivação de gastrópodes (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima 2003; Ramos-Vasconcelos et al. 2005; Ferreira et al. 2003) a estivação de peixes pulmonados (Page et al. 2010) e a hibernação em mamíferos (Buzadzić et al. 1990; Eddy et al. 2005; Okamoto et al. 2006; Morin & Storey 2007; Morin et al. 2008). O aumento de antioxidantes em estados de depressão metabólica foi interpretado como um importante mecanismo preparatório para o despertar ao final do estado de dormência, no qual há um abrupto aumento no consumo de O₂ e potencial produção proporcional de EROs (Hermes-Lima et al. 1998; Hermes-Lima & Zenteno-Savín 2002). Este mecanismo foi denominado nos anos 90 “preparo

para o estresse oxidativo” e foi recentemente revisado e atualizado para os atuais conhecimentos de controle da expressão gênica (Welker et al. 2013). Os resultados aqui relatados parecem não enquadrar *C. lacinia* no grupo de animais que se utilizam do preparo para o estresse oxidativo como mecanismo adaptativo.

Mesmo entre insetos em diapausa, são encontrados resultados divergentes. Há casos em que ocorre redução, outros em que não há alteração e outros onde ocorre aumento da concentração/atividade de antioxidantes endógenos. Por exemplo, os níveis de transcritos extraídos de corpo inteiro para as enzimas catalase, GPX e SODs permanecem inalterados comparando pupas de *S. crassipalpis* ativos e em diapausa (Ragland et al. 2010). No cérebro de *S. crassipalpis*, há um aumento na quantidade de catalase em pupas logo no início da diapausa em comparação às ativas (Pavlidis et al. 2011). Maiores níveis de transcritos para MnSOD foram registrados no cérebro de pupas *Helicoverpa armigera* na iniciação da diapausa (Bao & Xu 2011). Em mosquitos *Culex pipiens* adultos em diapausa, os níveis de transcritos para GPX e duas formas de SOD mantêm-se estáveis enquanto há um aumento drástico dos níveis de RNAm para catalase e SOD-2 em comparação com animais ativos (Sim & Denlinger 2011).

A divergência entre as observações citadas acima pode ser explicada por alguns fatores. Diferentes abordagens metodológicas foram utilizadas, aferição de atividade enzimática, análise do perfil proteico total e determinação de níveis de RNAm. Antioxidantes estão sujeitos à regulação em diferentes momentos, na transcrição, pela ação de fatores de transcrição (Jaiswal 2004; Lam et al. 2006; Calnan & Brunet 2008; Kaspar et al. 2009; Ma 2013), na tradução, pela ação de microRNAs (Haque et al. 2012; Cheng et al. 2013), e após a tradução, por mudanças covalentes, como fosforilação (Veal et al. 2007), acetilação (Qiu et al. 2010) e SUMOilação (Manza et al. 2004). Estas alterações podem levar a resultados conflitantes entre diferentes metodologias. Outro fator engloba as características ecológicas e fisiológicas da diapausa nas diferentes espécies, incluindo o estágio de desenvolvimento em que ocorre a diapausa e variáveis ambientais. Por último, apesar de permitir a verificação de alterações globais no organismo, análises de corpo inteiro (a exemplo do presente estudo) impedem a identificação de mudanças em determinados tecidos.

5.2.3 Glutathiona e danos oxidativos

A concentração total de glutathiona (GSH-eq) apresentou resposta semelhante à resposta das enzimas antioxidantes. A redução dos níveis GSH-eq durante a diapausa pode ter sido causada por reduzida síntese e/ou maior consumo GSH. Uma explicação para este comportamento é a possível redução da produção de EROs e menor demanda por antioxidantes discutidas anteriormente (seção 5.2.1). Moléculas de GSH são sintetizadas no citosol em duas reações consumidoras de ATP catalisadas pelas enzimas glutamato-cisteína ligase e glutathiona sintase (Lu 2013). Portanto, uma reduzida taxa de produção de GSH significaria uma economia energética durante a diapausa. Além disso, a cessação da alimentação deve alterar o fornecimento de aminoácidos para a síntese de GSH.

A depleção de GSH-eq sem alteração na taxa GSSG/GSH-eq indica que a concentração de GSH-eq foi reduzida de forma não oxidativa. Desta forma, a glutatiolação de proteínas e a utilização de GSH por GSTs podem ter contribuído para a diminuição dos níveis de GSH-eq. A glutatiolação é a formação de uma ligação dissulfeto entre os grupos SH de moléculas de GSH e de resíduos de cisteína de proteínas por diferentes mecanismos (Ghezzi 2013). A glutatiolação causa alterações funcionais de proteínas, protege resíduos de cisteína de oxidação irreversível e representa uma forma de armazenamento de GSH em condições de estresse oxidativo (Dalle-Donne et al. 2009; Cooper et al. 2011). Além disso, a conjugação de moléculas de GSH com diferentes moléculas pela ação de GSTs pode reduzir a concentração de GSH-eq. O aumento da atividade de GST (seção 5.3) foi possivelmente responsável pela queda da concentração total de glutathiona durante a diapausa.

A concentração total de glutathiona também está reduzida na diapausa em comparação a animais ativos em corpo inteiro de larvas de *O. nubilalis* (Jovanovic-Galovic et al. 2004) e em ovos de *Bombyx mori* (Meng et al. 2011). A concentração de GSH-eq diminui no fígado de sapos *S. couchii* em estivação (Grundy & Storey 1998), no intestino de répteis *T. merianae* em hibernação (Welker 2009), e no hepatopâncreas de caramujos *Pomacea canaliculata* em estivação (Giraud-Billoud et al. 2013). Por outro lado, a concentração de GSH-eq aumenta em caramujos *H. aspersa* (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima 2003) e se mantém constante em caramujos *O. lactea* (Hermes-Lima & Storey 1995) quando comparados animais em estivação com aqueles ativos.

A redução de GSH-eq em *C. lacinia* durante a diapausa foi acompanhada pela diminuição equivalente das concentrações de GSH e GSSG, resultando na manutenção da razão GSSG/GSH-eq em homogeneizados de corpo inteiro. Ao contrário de *C. lacinia*, diferentes situações de depressão metabólica resultam em aumento do parâmetro GSSG/GSH-eq, indicando um desequilíbrio redox, durante a hibernação de vertebrados (Carey et al. 2003; Orr et al. 2009) e a estivação de caramujos e sapos (Hermes-Lima & Storey 1995; Grundy & Storey 1998; Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima 2003).

A diminuição e/ou manutenção dos níveis de marcadores de estresse oxidativo durante a diapausa em *C. lacinia* - relação GSSG/GSH-eq, TBARS e proteínas carboniladas - indica que, apesar da redução das atividades antioxidantes, não há estresse oxidativo. Tal observação concorda com a manutenção do equilíbrio redox e menor taxa metabólica durante a diapausa. Ao contrário de *C. lacinia*, há aumento dos níveis de dano oxidativo a lipídeos (TBARS) e proteínas durante a estivação de caramujos *H. aspersa* (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima 2003). Níveis maiores de peroxidação lipídica também são observados em vários tecidos do sapo pé-de-espada durante a estivação (Grundy & Storey 1998).

No caso da concentração de proteínas carboniladas, respostas distintas foram observadas em lagartas amostradas em diferentes períodos. Em março de 2010, a concentração se manteve, enquanto em janeiro de 2010, houve uma redução. Um dos motivos é a grande variabilidade dos valores na determinação das réplicas experimentais em diferentes amostras biológicas (observação pessoal). De fato, pode-se observar pela amplitude das barras de erro dos animais coletados em março, nos quais a concentração de proteínas carboniladas variou de 19,2 a 32,2 nmol/mg proteína nos grupos controle e de 13,5 a 33,7 nmol/mg proteína nos grupos em diapausa por 20 dias. De qualquer forma, os resultados indicaram que não há aumento da concentração de proteínas carboniladas (ou seja, da oxidação de proteínas pela ação de EROs) durante a diapausa.

5.3 Glutathione transferase

As glutathione transferases (GSTs) formam uma grande família de enzimas altamente conservadas filogeneticamente e classificadas em diferentes grupos de acordo com suas características (Sheehan et al. 2001; Mannervik et al. 2005; Ketterman et al. 2011). Apesar de serem principalmente conhecidas pelas suas funções de detoxificação de compostos endógenos e xenobióticos, as GSTs ainda têm papel no transporte intracelular, síntese de

hormônios e proteção contra o estresse oxidativo (Listowsky et al. 1988; Vontas et al. 2001; Enayati et al. 2005). A atividade de GST apresentou comportamento semelhante à atividade de ICDH, aumentando abruptamente no grupo <24h em diapausa. A atividade de GST manteve-se maior que o controle durante todo o período de diapausa analisado e retornou a níveis semelhantes ao do grupo controle no grupo pós-diapausa.

De maneira semelhante à *C. lacinia*, em outras espécies, os níveis de proteína e/ou de RNAm referentes a GSTs estão elevados em resposta à diapausa. Lagartas de *Choristoneura fumiferana* em 2º instar em diapausa apresentam um nível muito maior de uma forma específica de GST (*CfGST*) em comparação a lagartas de 2º e 6º instares ativas (Feng et al. 1999). Ainda em *C. fumiferana*, há um pico dos níveis de RNAm para *CfGST* no início da diapausa (Feng et al. 2001). Pupas de mosca *S. crassipalpis* em diapausa apresentam maior quantidade de transcritos para *GSTD1* em relação a animais ativos (Ragland et al. 2010). Em *H. armigera*, a quantidade de proteína de duas formas de GST estão aumentadas em cérebro de pupas mantidas em condições de indução de diapausa em relação a pupas ativas (Lu & Xu 2010). O aumento da expressão de GST em pupas de *H. armigera* programadas para entrar em diapausa foi confirmado pela análise dos níveis de RNAm para GST, os quais estão elevados no início da diapausa (Bao & Xu 2011). A quantidade de uma forma específica de GST também está elevada na hemolinfa de lagartas de *H. armigera* mantidas em condições indutoras de diapausa em relação a lagartas mantidas em condições controle (Zhang et al. 2013). Ao contrário do observado em *C. lacinia* e nos exemplos acima, a atividade de GST diminui em lagartas de *O. nubilalis* em diapausa tanto em extratos de corpo inteiro (Jovanovic-Galovic et al. 2004) quanto em mitocôndrias isoladas de corpo inteiro (Jovanovic-Galovic et al. 2007) em comparação com animais ativos. Porém, nestes estudos, as coletas de *O. nubilalis* ativas ocorreram em períodos do ano distantes em relação aos animais em diapausa.

As GSTs também foram alvo de investigação em outros modelos de depressão metabólica. A atividade de GST diminui no intestino do lagarto *T. merrianae* durante a hibernação (Welker 2009) e em diversos tecidos do sapo *S. couchii* durante a estivação (Grundy & Storey 1998) em comparação aos animais ativos. Durante a estivação, há a manutenção da atividade de GST em duas espécies de gastrópodes, no hepatopaneas de *B. tenagophila* (Ferreira et al. 2003) e no hepatopaneas e músculo de *H. aspersa* (Ramos-Vasconcelos & Hermes-Lima 2003; Ramos-Vasconcelos et al. 2005). No peixe pulmonado *Protopterus annectens*, ocorre um aumento dos níveis hepáticos de RNAm para uma forma de

GST (GST M), enquanto os níveis de RNAm para outras duas formas de GST (GST π e GST microsomal 1) estão reduzidos durante a estivação (Loong et al. 2012). Os dados de *P. annectens* indicam que diferentes formas de GST têm suas expressões alteradas de maneira distinta durante a depressão metabólica.

O presente estudo não permite determinar a forma (ou formas) de GST que está elevada, nem tampouco sua localização. A forma não pode ser determinada uma vez que foi utilizado o substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), considerado um substrato genérico para maioria das GSTs (Clark et al. 1973; Mannervik et al. 2005). E o uso de homogêneos de corpo inteiro impede a localização. Entretanto, o corpo gorduroso é o principal tecido no qual as GSTs estão distribuídas em insetos (Chien & Dauterman 1991; Lee 1991; Feng et al. 1999). Desta forma, a hipertrofia do corpo gorduroso peculiar aos eventos de preparo para a diapausa em insetos pode favorecer o aumento da atividade de GST no organismo de *C. lacinia* em um todo.

Apesar do aumento dos níveis de GST (tanto proteína quanto RNAm) ter sido observado em diferentes modelos de diapausa e por diferentes metodologias, pouco se sabe sobre a função do acúmulo de GST durante a diapausa. De certo modo, o aumento dos níveis de GST é inesperado, considerando a reduzida taxa metabólica e a cessação da alimentação durante a diapausa. Alguns dos estudos que observaram elevados níveis de GST durante a diapausa apenas declaram, sem especificar mecanismos ou vias envolvidas, que maiores níveis de GST estariam associados a “maior tolerância a estresses” (Ragland et al. 2010; Lu & Xu 2010; Bao & Xu 2011; Zhang et al. 2013), peculiar à diapausa (MacRae 2010). Determinadas formas de GST apresentam função antioxidante pela atividade de peroxidase (Weinhold et al. 1990), decompondo hidroperóxidos lipídicos gerados pela peroxidação lipídica (Havrilla et al. 2000). Uma função antioxidante do acúmulo de GST se enquadraria na hipótese do “preparo para o estresse oxidativo” (seção 5.2.2). Entretanto, este não parece ser o caso de *C. lacinia*, já que a atividade total de peroxidase dependente de glutatona sobre hidroperóxidos orgânicos (a GPX é determinada utilizando cumeno hidroperóxido como substrato) se reduz na diapausa. Além disso, o processo de diapausa que estamos estudando parece estar associado a uma menor produção de EROs (seção 5.2.2). Desta forma, é possível que a elevada atividade de GST exerça outras funções além da detoxificação e ação antioxidante (Feng et al. 1999; Feng et al. 2001). O estudo das diferentes isoformas de GST em *C. lacinia* poderia elucidar esta questão.

As possíveis funções da GST observadas em outros organismos incluem a resistência ao choque térmico (Choi et al. 1998) e a ligação e o transporte de hormônios e metabólitos (Listowsky et al. 1988; Ishigaki et al. 1989; Tansey & Cammer 1991; Singh & Pandey 1996). Em lagartas *G. mellonella* (Lepidoptera), a administração dos hormônios 20-hidroxiecdisona (20E) e hormônio juvenil tem efeitos distintos, resultando em redução e aumento da atividade de GST, respectivamente (Tarhan et al. 2013). Apesar de não haver dados sobre o controle hormonal da diapausa em *C. lacinia*, o controle da diapausa em insetos em fase larval comumente envolve a redução dos níveis de 20E e, em algumas espécies, há o envolvimento do hormônio juvenil (Denlinger et al. 2005). Portanto, devido ao importante componente hormonal envolvido na diapausa, é possível que a GST esteja relacionada às alterações hormonais.

Independentemente da função natural do acúmulo de GST, uma implicação importante da elevada atividade de GST durante a diapausa em *C. lacinia* (praga da cultura do girassol) é o potencial de maior resistência a inseticidas neste período. A resistência às principais classes de inseticidas, incluindo organofosforados, organoclorados e piretroides está associada à elevada atividade de GSTs (Enayati et al. 2005; Ranson & Hemingway 2005; Tu & Akgül 2005; Ketterman et al. 2011). Os mecanismos pelos quais as GSTs conferem resistência incluem a degradação do inseticida, a ligação e sequestro do inseticida, e a proteção contra o estresse oxidativo provocado pelo inseticida (Ketterman et al. 2011). Por exemplo, GSTs catalisam a reação de desidrocloração do DDT (Sternburg et al. 1954; Clark & Shamaan 1984; Tang & Tu 1994), de maneira que o aumento desta atividade é observado em populações de insetos resistentes ao DDT (Lipke & Kearns 1959a; Lipke & Kearns 1959b; Grant et al. 1991; Prapanthadara et al. 1993). No caso dos organofosforados, as GSTs podem catalisar duas reações distintas, a O-desalquilação (Oppenoorth et al. 1979) e a O-desarilação (Chiang & Sun 1993). O envolvimento de GSTs na resistência a organofosforados foi verificado em *Plutella xylostella* (Huang et al. 1998) e em *Musca domestica* (Wei et al. 2001). Por último, apesar de não agir diretamente no metabolismo de piretroides, as GSTs tem envolvimento na resistência a esta classe de inseticidas por minimizar o estresse oxidativo provocado (Vontas et al. 2001; Vontas et al. 2002) e por ligar e sequestrar moléculas de inseticidas (Kostaropoulos et al. 2001). As alterações que observamos entre as atividades de GST dos grupos controle em três coletas podem estar associadas à exposição a xenobióticos, tendo em vista que o local de coleta e manutenção dos animais adultos é cercado por edificações e atividade humana. Outra possível causa da oscilação dos níveis basais de GST

são alterações sazonais na composição de aleloquímicos nas folhas de margaridão (*T. diversifolia*) utilizadas na alimentação dos animais.

5.4 Sequências parciais de genes antioxidantes e GST

Com a exceção da *Chl1CysPrx*, as sequências parciais dos genes de *C. lacinia* obtidas apresentaram grande similaridade às sequências de outros lepidópteros. As espécies com sequências homólogas incluem lepidópteros das famílias Arctiidae, Bombycidae, Geometridae, Noctuidae, Nymphalidae, Papilionidae, Plutellidae, Pyralidae, Saturniidae e Tortricidae. No caso da *Chl1CysPrx*, a maior similaridade ocorreu em comparação ao RNAm de uma GPX do gastrópode *Aplysia californica*, seguido de outros invertebrados. As sequências parciais serão utilizadas para o desenho de oligonucleotídeos iniciadores com o objetivo de determinar níveis de transcritos pela técnica de PCR quantitativo em tempo real. A partir das sequências, ainda será possível a obtenção dos DNAc completos para cada proteína de interesse pela técnica de amplificação rápida das extremidades de DNAc (RACE).

5.5 Limitações do estudo

Uma limitação do estudo foram as diferenças dos métodos das análises bioquímicas, do método de manutenção dos animais e das condições ambientais entre os diferentes períodos de coleta. Em 2010, as duas coletas foram feitas na estação chuvosa, enquanto, em 2011, a coleta foi feita no meio da estação seca. Outra diferença foi a utilização de um conjunto de três animais para formar uma observação (n=1) em 2010; em 2011, a análise bioquímica foi feita individualmente (uma lagarta sendo n=1). Além disso, em 2010, início do projeto, as gaiolas dos estágios imaturos foram mantidas em laboratório sem controle de temperatura e luz. Já em 2011, as lagartas foram mantidas em condições controladas de temperatura e luz. Apesar destas diferenças experimentais e ambientais, foi possível observar uma tendência convergente das alterações bioquímicas da diapausa de maneira geral. As maiores variações dos resultados de bioquímica foram observadas entre os dois grupos de 2010, os quais foram coletados em épocas com valores muito próximos de médias mensais de temperatura do ar e de umidade relativa do ar. Por exemplo, a atividade de catalase não se alterou durante a diapausa em animais de janeiro de 2010, enquanto, em março de 2010, houve uma diminuição de atividade (não sabemos exatamente o que ocasionou isso). Outro exemplo é a atividade de GST de animais controle, que oscilou significativamente quando

comparadas as três coletas. Neste contexto, uma opção interessante seria, em estudos futuros, analisar lagartas no auge da estação seca, por exemplo, no mês de setembro.

Outra importante limitação do presente estudo foi a incapacidade de identificar e coletar lagartas em um estado de pré-diapausa, ou seja, animais ainda ativos que posteriormente entrariam em diapausa. Desta forma, não se sabe se os animais do grupo controle entrariam ou não em diapausa. Esta observação é extremamente relevante uma vez que as alterações bioquímicas e fisiológicas têm início antes da entrada em diapausa propriamente dita. Entretanto, pode-se supor que as alterações observadas no grupo de animais em diapausa por menos de 24 horas representam mudanças ocorridas na fase pré-diapausa. Assim, as atividades de enzimas possivelmente aumentadas na fase pré-diapausa, por exemplo, a ICDH com o provimento de NADPH para reações de biossíntese (induzindo por exemplo a formação de reservas de gordura a partir de carboidrato ingerido - processo esse dependente de NADPH), ainda estariam aumentadas no grupo <24h. Neste sentido, é possível que o aumento da ICDH no grupo <24h seja um “resquício” (causado por baixo *turnover* da enzima) do que aconteceu em um período anterior (pré-diapausa). Grande parte desta limitação deve-se ao fato de que os estímulos ambientais que controlam a diapausa em *C. lacinia* são desconhecidos. Em espécies nas quais estes estímulos são conhecidos é possível coletar animais na fase de pré-diapausa.

Uma explicação alternativa aos resultados aqui apresentados, proposta pelo Prof. Alexis F. Welker (comunicação pessoal, em 21/02/2014), opõe-se à hipótese de menor capacidade oxidativa e potencial menor produção de EROs durante a diapausa (pelo menos nos primeiros dias da mesma). Esta explicação propõe que a maior atividade de citrato sintase em animais ativos estaria associada à biossíntese de ácidos graxos (esta via é iniciada com a formação de citrato), de maneira que o animal estaria suprindo sua demanda energética pela glicólise (considerando a grande disponibilidade de alimento) e armazenando o excesso na forma de triglicérides. Nesta situação, a menor atividade de ICDH (nos animais controle) limitaria a entrada de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. O aumento de ICDH no início da diapausa possivelmente aumentaria o gradiente eletroquímico mitocondrial, pelo maior fluxo de elétrons provenientes indiretamente do NADPH, levando a um aumento da produção de EROs (a elevada formação de NADPH levaria a um aumento de NADH pela ação da enzima nicotinamida nucleotídeo transhidrogenase, resultando em maior fluxo de elétrons provenientes de NADH). Por sua vez, o aumento de EROs resultaria em uma resposta fisiológica, e que seria o aumento da expressão de GST (e esse processo seria mediado por

Nrf2, como descrito por Welker et al. 2013). Uma evidência indireta para essa proposta é a correlação positiva entre as atividades de GST e de ICDH (**Figura 4.5.2 A**). O elevado nível de GST poderia atuar como antioxidante (via atividade peroxidásica de determinadas GSTs; Hermes-Lima 2004) e como agente destoxicante de compostos xenobióticos de origem vegetal (fitoquímicos “anti-herbivoria”, incluindo terpenos, alcaloides e polifenóis; Barbehenn et al. 2008, War et al. 2012). Por outro lado, a atividade de outras enzimas antioxidantes estaria reduzida na diapausa em resposta à menor síntese proteica, típica dos processos de depressão metabólica. Neste sentido, o aumento dos níveis de GST (que pode ter ocorrido já na fase de pré-diapausa) seria suficiente para o controle dos níveis de fitoquímicos alimentares (por meio de conjugação com GSH) e da “homeostase redox”.

6 Conclusão e Perspectivas

A depressão metabólica é uma importante adaptação animal para lidar com condições ambientais desfavoráveis. Diferentes alterações bioquímicas suportam o estado hipometabólico. Lagartas do girassol *Chlosyne lacinia* entram em diapausa, estado no qual podem sobreviver por até 220¹ dias sem se alimentar. Em *C. lacinia* as alterações bioquímicas ocorrem cedo, de maneira que animais em diapausa nas primeiras 24 horas já apresentam diferenças de parâmetros bioquímicos em relação aos animais ativos. A entrada em diapausa causou uma redução da densidade mitocondrial e da capacidade oxidativa, alteração vista como uma estratégia de economia energética. Por outro lado, a capacidade da via glicolítica e da via das pentoses fosfato são mantidas durante a diapausa. As defesas antioxidantes (APX, catalase, GPX e GSH-eq) diminuíram na diapausa, uma vez que as produções endógena (pelas mitocôndrias) e exógena (pela alimentação) estão potencialmente reduzidas.

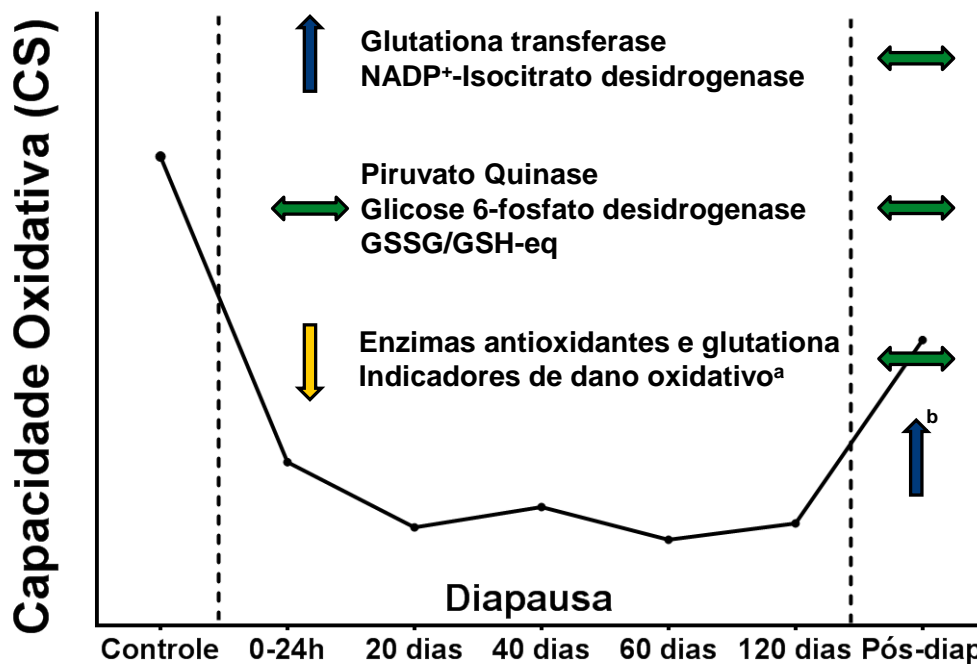


Figura 6.1 Resumo esquemático das alterações bioquímicas relacionadas à diapausa da lagarta do girassol *C. lacinia*. **a**, a concentração de proteínas carboniladas foi mantida durante a diapausa nos animais coletados em março de 2010. **b**, as concentrações de equivalentes de glutaciona (GSH-eq) e de glutaciona reduzida (GSH) foram maiores em animais ativos após 120 dias de diapausa em relação ao controle.

¹ Este foi o período máximo de diapausa observado em laboratório neste trabalho no qual as lagartas foram capazes de sair da diapausa e retomar o desenvolvimento normalmente. Períodos mais longos não foram avaliados.

Mesmo com a redução das atividades de enzimas antioxidantes e a aparente ausência de importantes componentes do sistema antioxidante (GR e Se-GPX), lagartas de *C. lacinia* passam pela diapausa e pelas transições metabólicas de entrada e saída da diapausa sem apresentam indícios de desequilíbrio redox ou estresse oxidativo. Os danos oxidativos a lipídeos e proteínas apresentaram redução (e/ou manutenção) durante a diapausa. A ausência de desequilíbrio redox (razão GSSG/GSH-eq) e danos oxidativos sugere uma eficiente regulação do sistema antioxidante em uma situação de limitada produção energética.

Duas atividades enzimáticas aumentaram no início da diapausa, as atividades de ICDH e de GST. O aumento da atividade de ICDH sugere maior provimento de potencial redutor na forma de NADPH nas primeiras 24 horas de diapausa. Este NADPH pode ser utilizado por diferentes vias incluindo o sistema antioxidante e processos biossintéticos. Por outro lado, o papel da elevada atividade de GST, também observada em outros insetos em diapausa, é desconhecido, mas funções como tolerância a estresses bióticos/abióticos, proteção antioxidante, detoxificação, resistência a choque térmico e transporte de moléculas são considerados. Portanto, o papel das GSTs em insetos, além da função “clássica” de detoxificação, precisa ser melhor examinado.

As determinações das atividades de superóxidos dismutases e peroxiredoxinas, assim como a concentração de ácidos ascórbico e úrico podem ampliar o entendimento das alterações do sistema antioxidante durante a diapausa. Estes antioxidantes apresentam importantes funções em diferentes situações de depressão metabólica. Por exemplo, MnSOD durante a estivação (Page et al. 2010), peroxiredoxinas durante a hibernação (Morin & Storey 2007), o ácido ascórbico durante a hibernação (Toien et al. 2001) e o ácido úrico durante a estivação (Giraud-Billoud et al. 2013). Outras análises iminentes são a análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a análise do perfil proteico total (proteômica) comparando lagartas ativas com lagartas em diapausa. A análise em MET possibilitará a visualização de alterações morfológicas bem como verificar alterações mitocondriais. A análise proteômica permite uma avaliação global de alterações da expressão de proteínas ocorridas durante a diapausa.

As sequências parciais obtidas no presente estudo serão empregadas para análise de expressão gênica com o objetivo de elucidar os mecanismos de regulação do sistema antioxidante de *C. lacinia* durante a diapausa. Contudo, deve-se ressaltar que alterações dos níveis de transcritos (RNAm) não resultam, necessariamente, em alterações dos níveis de

proteínas, nem tampouco de proteínas em suas formas ativas. Isto se deve à ação de outros mecanismos de controle. Um dos mecanismos de controle da resposta celular, incluindo o sistema antioxidante, é a ação de microRNAs. A regulação por microRNAs apresenta características que atendem às condições de depressão metabólica, sendo amplamente aplicável (em várias vias alvo), facilmente induzida e prontamente revertida (Biggar & Storey 2011). O envolvimento de microRNAs na depressão metabólica foi mostrado na hibernação de mamíferos (Kornfeld et al. 2012; Maistrovski et al. 2012), na estivação do invertebrado *Apostichopus japonicus* (Chen et al. 2013) e na diapausa da mosca *Sarcophaga bullata* (Reynolds et al. 2013).

Outro importante mecanismo de controle da atividade do sistema antioxidante são mudanças pós-traducionais. Tal mecanismo representa uma forma rápida e de reduzido custo energético de regulação. A fosforilação é uma importante modificação pós-traducional de proteínas e seu papel na regulação da atividade de enzimas do metabolismo intermediário foi demonstrado há algum tempo em diferentes modelos animais de depressão metabólica (Storey 1987; Whitwam & Storey 1990; Cowan & Storey 1999). Apesar de não haver estudo mostrando o papel específico da fosforilação de enzimas antioxidantes em situações de depressão metabólica, há evidência de que isto ocorre em outros sistemas. A fosforilação altera a atividade de enzimas antioxidantes como catalase (Cao et al. 2003a), GPX (Cao et al. 2003b), peroxiredoxina I (Chang et al. 2002) e GST-P1 (Singh et al. 2010). Desta forma, a avaliação do papel regulatório por microRNAs e de modificações pós-traducionais durante a diapausa é um próximo passo para o melhor compreensão da resposta molecular à depressão metabólica.

De uma forma geral, o lepidóptero *C. lacinia* apresenta-se como um excelente modelo para o estudo de adaptações bioquímicas e fisiológicas relacionadas à depressão metabólica, especialmente no caso da diapausa tropical (fenômeno muito pouco estudado, tanto do ponto de vista “redox” como da fisiologia e bioquímica geral). Os mecanismos moleculares envolvidos na diapausa podem ainda revelar novos aspectos envolvidos em questões como o envelhecimento e a obesidade (Denlinger 2008). Afinal o ciclo de vida de *C. lacinia* de aproximadamente 35 dias é estendido por mais de 220 dias quando estes animais entram em diapausa. Além disso, animais programados para entrar em diapausa reorganizam suas reservas energéticas acumulando grandes quantidades de gordura (Hahn & Denlinger 2011). Quais os mecanismos moleculares que permitem estes animais “ligar” e “desligar” o desenvolvimento? Frear e retomar a atividade metabólica? Resistir à indisponibilidade de

recursos naturais? Sobreviver a condições ambientais desfavoráveis e inóspitas para muitas outras espécies? Retardar o envelhecimento e estender a longevidade? Estas são algumas das grandes perguntas envolvidas no estudo da depressão metabólica dentro da biologia animal comparada.

Referências Bibliográficas

- Adelman, R., Saul, R.L., Ames, B.N., 1988. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 2706–2708.
- Adkisson, P.L., Bell, R.A., Wellso, S.G., 1963. Environmental factors controlling the induction of diapause in the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders). *J. Insect Physiol.* 9, 299–310.
- Aebi, H., 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–6.
- Ahmad, S., 1992. Biochemical defence of pro-oxidant plant allelochemicals by herbivorous insects. *Biochem. Syst. Ecol.* 20, 269–296.
- Ahmad, S., Pardini, R.S., 1988. Evidence for the presence of glutathione peroxidase activity toward an organic hydroperoxide in larvae of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem.* 18, 861–866.
- Ahmad, S., Pardini, R.S., 1990. Mechanisms for regulating oxygen toxicity in phytophagous insects. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 401–413.
- Aitken, A., Learmonth, M., 2002. Protein Determination by UV Absorption, In: Walker, J. (Ed.), *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press, pp. 3–6.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Arnér, E.S., Holmgren, A., 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur. J. Biochem.* 267, 6102–6109.
- Asada, K., 1984. Chloroplasts: Formation of active oxygen and its scavenging. *Methods Enzymol.* 105, 422–429.
- Asada, K., 1992. Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* 85, 235–241.
- Atay-Kadiri, Z., Benhsain, N., 2005. The diapause of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1040, 219–223.
- Augustyniak, M., Babczynska, A., Augustyniak, M., 2009. Does the grasshopper *Chorthippus brunneus* adapt to metal polluted habitats? A study of glutathione-dependent enzymes in grasshopper nymphs. *Insect Sci.* 16, 33–42.
- Bachhawat, A.K., Thakur, A., Kaur, J., Zulkifli, M., 2013. Glutathione transporters. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3154–3164.

- Bamidele, O., Ajele, J., Kolawole, A., Oluwafemi, A., 2013. Changes in the tissue antioxidant enzyme activities of palm weevil (*Rynchophorus phoenicis*) larva by the action of 2, 2-dichlorovinyl dimethyl phosphate. *African J. Biochem. Res.* 7, 128–137.
- Bao, B., Xu, W.-H., 2011. Identification of gene expression changes associated with the initiation of diapause in the brain of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics* 12, 224.
- Barbehenn, R. V., Maben, R.E., Knoester, J.J., 2008. Linking phenolic oxidation in the midgut lumen with oxidative stress in the midgut tissues of a tree-feeding caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Environ. Entomol.* 37, 1113–1118.
- Beck, S.D., Hanec, W., 1960. Diapause in the European corn borer, *Pyrausta nubilalis* (Hübner). *J. Insect Physiol.* 4, 304–318.
- Benoit, J.B., 2010. Water management by dormant insects: comparisons between dehydration resistance during summer aestivation and winter diapause. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 49, 209–229.
- Biggar, K.K., Storey, K.B., 2011. The emerging roles of microRNAs in the molecular responses of metabolic rate depression. *J. Mol. Cell Biol.* 3, 167–175.
- Board, P.G., Menon, D., 2013. Glutathione transferases, regulators of cellular metabolism and physiology. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3267–3288.
- Boiça Jr., A.L., Vendramin, J.D., 1993. Infestação de girassol pela lagarta *Chlosyne lacinia saundersii* em duas épocas de cultivo. *Sci. Agric.* 50, 244–253.
- Boveris, A., Chance, B., 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716.
- Bowen, M.F., Bollenbacher, W.E., Gilbert, L.I., 1984. In vitro studies on the role of the brain and prothoracic glands in the pupal diapause of *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 108, 9–24.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L., Parker, N., 2004. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 755–767.
- Brand, M.D., Esteves, T.C., 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.* 2, 85–93.
- Brooks, S.P., Storey, K.B., 1988. Anoxic brain function: molecular mechanisms of metabolic depression. *FEBS Lett.* 232, 214–216.

- Brown, K.S., Freitas, A.V.L., 2000. Atlantic forest butterflies: Indicators for landscape conservation. *Biotropica* 32, 934–956.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302–310.
- Buzadzić, B., Spasić, M., Saicić, Z.S., Radojčić, R., Petrović, V.M., Halliwell, B., 1990. Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Radic. Biol. Med.* 9, 407–413.
- Cakmak, O., Bashan, M., Kocak, E., 2008. The influence of life-cycle on phospholipid and triacylglycerol fatty acid profiles of *Aelia rostrata* Boheman (Heteroptera: Pentatomidae). *J. Kansas Entomol. Soc.* 81, 261–275.
- Calderon, S., Holmstrup, M., Westh, P., Overgaard, J., 2009. Dual roles of glucose in the freeze-tolerant earthworm *Dendrobaena octaedra*: cryoprotection and fuel for metabolism. *J. Exp. Biol.* 212, 859–866.
- Calnan, D.R., Brunet, A., 2008. The FoxO code. *Oncogene* 27, 2276–2288.
- Cao, C., Leng, Y., Huang, W., Liu, X., Kufe, D., 2003a. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-Abl and Arg tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 278, 39609–39614.
- Cao, C., Leng, Y., Kufe, D., 2003b. Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response. *J. Biol. Chem.* 278, 29667–29675.
- Carey, H. V, Rhoads, C. a, Aw, T.Y., 2003. Hibernation induces glutathione redox imbalance in ground squirrel intestine. *J. Comp. Physiol. B* 173, 269–276.
- Carpenter, J.F., Crowe, J.H., 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25, 244–255.
- Chamberlin, M., Gibellato, C., Noecker, R., Dankoski, E., 1997. Changes in midgut active ion transport and metabolism during larval-larval molting in the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *J. Exp. Biol.* 200, 643–648.
- Chamberlin, M.E., King, M.E., 1998. Changes in midgut active ion transport and metabolism during the fifth instar of the tobacco hornworm (*Manduca sexta*). *J. Exp. Zool.* 280, 135–141.
- Chang, T.-S., Jeong, W., Choi, S.Y., Yu, S., Kang, S.W., Rhee, S.G., 2002. Regulation of peroxiredoxin I activity by Cdc2-mediated phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277, 25370–25376.
- Chen, M., Zhang, X., Liu, J., Storey, K.B., 2013. High-throughput sequencing reveals differential expression of miRNAs in intestine from sea cucumber during aestivation. *PLoS One* 8, e76120.

- Cheng, X., Ku, C.-H., Siow, R.C.M., 2013. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radic. Biol. Med.* 64, 4–11.
- Chiang, F.M., Sun, C.N., 1993. Glutathione transferase isozymes of diamondback moth larvae and their role in the degradation of some organophosphorus insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* 45, 7–14.
- Chien, C., Dauterman, W.C., 1991. Studies on glutathione S-transferase in *Helicoverpa* (= *Heliothis*) *zea*. *Insect Biochem.* 21, 857–864.
- Choi, J.H., Lou, W.L., Vancura, A., 1998. A novel membrane-bound glutathione s-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 29915–29922.
- Clark, A.G., Shamaan, N.A., 1984. Evidence that DDT-dehydrochlorinase from the house fly is a glutathione S-transferase. *Pestic. Biochem. Physiol.* 22, 249–261.
- Clark, A.G., Smith, J.N., Speir, T.W., 1973. Cross specificity in some vertebrate and insect glutathione-transferases with methyl parathion (dimethyl p-nitrophenyl phosphorothionate), 1-chloro-2,4-dinitro-benzene and s-crotonyl-N-acetylcysteamine as substrates. *Biochem. J.* 135, 385–392.
- Clegg, J., 1997. Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous anoxia: the case for complete metabolic rate depression. *J. Exp. Biol.* 200, 467–475.
- Coles, B.F., Kadlubar, F.F., 2005. Human alpha class glutathione S-transferases: genetic polymorphism, expression, and susceptibility to disease. *Methods Enzymol.* 401, 9–42.
- Cooper, A.J., Pinto, J.T., Callery, P.S., 2011. Reversible and irreversible protein glutathionylation: biological and clinical aspects. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 7, 891–910.
- Cornish-Bowden, A., 2012. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed. Wiley-Blackwell.
- Cowan, K.J., MacDonald, J.A., Storey, J.M., Storey, K.B., 2000. Metabolic reorganization and signal transduction during estivation in the spadefoot toad. *Exp. Biol. Online* 5, 1–25.
- Cowan, K.J., Storey, K.B., 1999. Reversible phosphorylation control of skeletal muscle pyruvate kinase and phosphofructokinase during estivation in the spadefoot toad, *Scaphiopus couchii*. *Mol. Cell. Biochem.* 195, 173–181.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M., Anchordoguy, T.J., 1990. Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology* 27, 219–231.

- Cunha, F., Gomez, D.R.S., Silva, J.J., Alexandre, T.M., Moscardi, F., 2010. Genetic diversity of the sunflower caterpillar (*Chlosyne lacinia saundersii* Doubleday and Hewitson) (Lepidoptera: Nymphalidae) populations determined by molecular RAPD markers. *An. Acad. Bras. Cienc.* 82, 1127–1136.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, G., Giustarini, D., Milzani, A., 2009. Protein S-glutathionylation: a regulatory device from bacteria to humans. *Trends Biochem. Sci.* 34, 85–96.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Colombo, R., Milzani, A., 2007. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 43, 883–898.
- Danks, H., 2000. Dehydration in dormant insects. *J. Insect Physiol.* 46, 837–852.
- Datkhile, K.D., Mukhopadhyaya, R., Dongre, T.K., Nath, B.B., 2009. Increased level of superoxide dismutase (SOD) activity in larvae of *Chironomus ramosus* (Diptera: Chironomidae) subjected to ionizing radiation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 149, 500–506.
- Del Bello, B., Maellaro, E., Sugherini, L., Santucci, A., Comporti, M., Casini, A.F., 1994. Purification of NADPH-dependent dehydroascorbate reductase from rat liver and its identification with 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochem. J.* 304, 385–390.
- Denlinger, D.L., 1979. Pupal diapause in tropical flesh flies: environmental and endocrine regulation, metabolic rate and genetic selection. *Biol. Bull.* 156, 31–46.
- Denlinger, D.L., 1986. Dormancy in tropical insects. *Annu. Rev. Entomol.* 31, 239–264.
- Denlinger, D.L., 2002. Regulation of diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 47, 93–122.
- Denlinger, D.L., 2008. Why study diapause? *Entomol. Res.* 38, 1–9.
- Denlinger, D.L., Campbell, J.J., Bradfield, J.Y., 1980. Stimulatory effect of organic solvents on initiating development in diapausing pupae of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, and the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Physiol. Entomol.* 5, 7–15.
- Denlinger, D.L., Lee, K., 1997. A role for ecdysteroids in the induction and maintenance of the pharate first instar diapause of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *J. Insect Physiol.* 43, 289–296.
- Denlinger, D.L., Willis, J.H., Fraenkel, G., 1972. Rates and cycles of oxygen consumption during pupal diapause in *Sarcophaga* flesh flies. *J. Insect Physiol.* 18, 871–882.
- Denlinger, D.L., Yocum, G.D., Rinehart, J.P., 2005. Hormonal control of diapause, In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*. Elsevier, Amsterdam, pp. 615–50.
- Dickinson, B.C., Chang, C.J., 2011. Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses. *Nat. Chem. Biol.* 7, 504–511.

- Ding, Y., Ortelli, F., Rossiter, L.C., Hemingway, J., Ranson, H., 2003. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: annotation, phylogeny and expression profiles. *BMC Genomics* 4, 35.
- Don, R.H., Cox, P.T., Wainwright, B.J., Baker, K., Mattick, J.S., 1991. "Touchdown" PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res.* 19, 4008.
- Droge, W., 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95.
- Drummond, B.A., Bush, G.L., Emmel, T.C., 1970. The biology and laboratory culture of *Chlosyne lacinia* Geyer (Nymphalidae). *J. Lepid. Soc.* 24, 286–291.
- Dussaubat, C., Brunet, J.-L., Higes, M., Colbourne, J.K., Lopez, J., Choi, J.-H., Martín-Hernández, R., Botías, C., Cousin, M., McDonnell, C., Bonnet, M., Belzunces, L.P., Moritz, R.F.A., Le Conte, Y., Alaux, C., 2012. Gut pathology and responses to the microsporidium *Nosema ceranae* in the honey bee *Apis mellifera*. *PLoS One* 7, e37017.
- Eddy, S.F., McNally, J.D., Storey, K.B., 2005. Up-regulation of a thioredoxin peroxidase-like protein, proliferation-associated gene, in hibernating bats. *Arch. Biochem. Biophys.* 435, 103–111.
- Emre, I., Kayis, T., Coskun, M., Dursun, O., Cogun, H.Y., 2013. Changes in antioxidative enzyme activity, glycogen, lipid, protein, and malondialdehyde content in cadmium-treated *Galleria mellonella* larvae. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 106, 371–377.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* 14, 3–8.
- Endo, K., Fujimoto, Y., Kondo, M., Yamanaka, A., Watanabe, M., Weihua, K., Kumagai, K., 1997. Stage-dependent changes of the prothoracicotropic hormone (PTTH) activity of brain extracts and of the ptth sensitivity of the prothoracic glands in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, before and during winter and aestival pupal diapause. *Zoolog. Sci.* 14, 127–133.
- Felton, G.W., Summers, C.B., 1995. Antioxidant systems in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 29, 187–197.
- Feng, Q.-L., Davey, K., Pang, A.S., Primavera, M., Ladd, T., Zheng, S.-C., Sohi, S., Retnakaran, A., Palli, S., 1999. Glutathione S-transferase from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*: identification, characterization, localization, cDNA cloning, and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 779–793.
- Feng, Q.-L., Davey, K.G., S.D. Pang, A., Ladd, T.R., Retnakaran, A., Tomkins, B.L., Zheng, S., Palli, S.R., 2001. Developmental expression and stress induction of glutathione S-transferase in the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *J. Insect Physiol.* 47, 1–10.

- Ferreira, M.V., Alencastro, A.C., Hermes-Lima, M., 2003. Role of antioxidant defenses during estivation and anoxia exposure in the freshwater snail *Biomphalaria tenagophila* (Orbigny, 1835). *Can. J. Zool.* 81, 1239–1248.
- Fields, R., Dixon, H.B., 1971. Micro method for determination of reactive carbonyl groups in proteins and peptides, using 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Biochem. J.* 121, 587–589.
- Foksinski, M., Rozalski, R., Guz, J., Ruszkowska, B., Sztukowska, P., Piwowarski, M., Klungland, A., Olinski, R., 2004. Urinary excretion of DNA repair products correlates with metabolic rates as well as with maximum life spans of different mammalian species. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1449–1454.
- Forcella, M., Berra, E., Giacchini, R., Parenti, P., 2007. Antioxidant defenses preserve membrane transport activity in *Chironomus riparius* larvae exposed to anoxia. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65, 181–94.
- Foster, D.R., Crowder, L.A., 1980. Diapause of the pink bollworm, *Pectinophora gossypiella* (Saunders), related to dietary lipids. *Comp. Biochem. Physiol. Part B* 65, 723–726.
- Fox, D., 1971. The soluble citric acid cycle enzymes of *Drosophila melanogaster*. I. Genetics and ontogeny of NADP-linked isocitrate dehydrogenase. *Biochem. Genet.* 5, 69–80.
- Frerichs, K.U., Smith, C.B., Brenner, M., DeGracia, D.J., Krause, G.S., Marrone, L., Dever, T.E., Hallenbeck, J.M., 1998. Suppression of protein synthesis in brain during hibernation involves inhibition of protein initiation and elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14511–14516.
- Frick, N.T., Bystriansky, J.S., Ip, Y.K., Chew, S.F., Ballantyne, J.S., 2008a. Lipid, ketone body and oxidative metabolism in the African lungfish, *Protopterus dolloi* following 60 days of fasting and aestivation. *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 93–101.
- Frick, N.T., Bystriansky, J.S., Ip, Y.K., Chew, S.F., Ballantyne, J.S., 2008b. Carbohydrate and amino acid metabolism in fasting and aestivating African lungfish (*Protopterus dolloi*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 151, 85–92.
- Gallo, D., Nokama, O., Neto, S.S., Carvalho, R.P.L., Baptista, G.C., Filho, E.B., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramin, J.D., MArchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, C., 2002. *Entomologia Agrícola. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, Piracicaba.*
- Gelman, D.B., Thyagaraja, B.S., Kelly, T.J., Masler, E.P., Bell, R.A., Borkovec, A.B., 1992. Prothoracicotropic hormone levels in brains of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*: Diapause vs the non-diapause state. *J. Insect Physiol.* 38, 383–395.
- Ghezzi, P., 2013. Protein glutathionylation in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3165–3172.
- Gilbert, L.I., Rybczynski, R., Tobe, S.S., 1996. Endocrine Cascade in Insect Metamorphosis, In: Gilbert, L.I., Tata, J.R., Atkinson, B.G.B.T.-M. (Eds.), *Metamorphosis:*

Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells. Academic Press, San Diego, pp. 59–107.

- Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Tosi, M.E.R., Abud, M.A., Calderón, M.L., Castro-Vazquez, A., 2013. Antioxidant and molecular chaperone defences during estivation and arousal in the South American apple snail *Pomacea canaliculata*. *J. Exp. Biol.* 216, 614–622.
- Glock, G.E., McLean, P., 1953. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. *Biochem. J.* 55, 400–408.
- Grant, D.F., Dietze, E.C., Hammock, B.D., 1991. Glutathione S-transferase isozymes in *Aedes aegypti*: Purification, characterization, and isozyme-specific regulation. *Insect Biochem.* 21, 421–433.
- Gregg, P.C., Roberts, B., Wentworth, S.L., 1987. Levels of ecdysteroids in diapause and non-diapause eggs of the Australian plague locust, *Chortoicetes terminifera* (Walker). *J. Insect Physiol.* 33, 237–242.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207–212.
- Gruetzmacher, M.C., Keeley, L.L., 1982. Cytochrome degradation and synthesis in fat body mitochondria during diapause, diapause termination and metamorphosis of *Heliothis zea*. *Insect Biochem.* 12, 49–54.
- Grundy, J.E., Storey, K.B., 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation damage in estivating toads, *Scaphiopus couchii*. *J. Comp. Physiol. B* 168, 132–142.
- Guppy, M., Fuery, C.J., Flanigan, J.E., 1994. Biochemical principles of metabolic depression. *Comp. Biochem. Physiol. B* 109, 175–189.
- Guppy, M., Reeves, D.C., Bishop, T., Withers, P., Buckingham, J.A., Brand, M.D., 2000. Intrinsic metabolic depression in cells isolated from the hepatopancreas of estivating snails. *FASEB J.* 14, 999–1004.
- Guppy, M., Withers, P., 1999. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 74, 1–40.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Hahn, D., Denlinger, D.L., 2007. Meeting the energetic demands of insect diapause: nutrient storage and utilization. *J. Insect Physiol.* 53, 760–773.
- Hahn, D., Denlinger, D.L., 2011. Energetics of insect diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 56, 103–121.

- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed. Oxford, New York.
- Han, R., Gan, Y., Kong, X., Ge, F., 2008. Physiological and endocrine differences between diapausing and non-diapausing larvae of the pine caterpillar *Dendrolimus tabulaeformis* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Zool. Stud.* 47, 96–102.
- Hand, S.C., Menze, M.A., Borcar, A., Patil, Y., Covi, J.A., Reynolds, J.A., Toner, M., 2011. Metabolic restructuring during energy-limited states: insights from *Artemia franciscana* embryos and other animals. *J. Insect Physiol.* 57, 584–594.
- Hansen, L.D., Harwood, R.F., 1968. Comparisons of diapause and nondiapause larvae of the codling moth, *Carpocapsa pomonella*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 61, 1611–1617.
- Haque, R., Chun, E., Howell, J.C., Sengupta, T., Chen, D., Kim, H., 2012. MicroRNA-30b-mediated regulation of catalase expression in human ARPE-19 cells. *PLoS One* 7, e42542.
- Havrilla, C.M., Hachey, D.L., Porter, N.A., 2000. Coordination (Ag^+) ion spray–mass spectrometry of peroxidation products of cholesterol linoleate and cholesterol arachidonate: high-performance liquid chromatography–mass spectrometry analysis of peroxide products from polyunsaturated lipid autoxidation. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 8042–8055.
- Henriques, R.P.B., 2005. Influência da história, solo e fogo na distribuição e dinâmica das fitofisionomias no bioma do Cerrado, In: Scariot, A., Sousa-Silva, J.C., Felfili, J.M. (Eds.), *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 73–92.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals, In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. Wiley, New York, pp. 319–368.
- 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, K.B., 1995. Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am. J. Physiol.* 268, R1386–1393.
- 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.
- Hindle, A.G., Lawler, J.M., Campbell, K.L., Horning, M., 2010. Muscle aging and oxidative stress in wild-caught shrews. *Comp. Biochem. Physiol. B* 155, 427–434.
- Ho, H., Cheng, M., Chiu, D.T., 2007. Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. *Redox Rep.* 12, 109–118.

- Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., Land, S.C., 1996. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 9493–9498.
- Hu, Z., Lee, K.S., Choo, Y.M., Yoon, H.J., Lee, S.M., Lee, J.H., Kim, D.H., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2010. Molecular cloning and characterization of 1-Cys and 2-Cys peroxiredoxins from the bumblebee *Bombus ignitus*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 155, 272–280.
- Huang, H.-S., Hu, N.-T., Yao, Y.-E., Wu, C.-Y., Chiang, S.-W., Sun, C.-N., 1998. Molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 651–658.
- Hyrsl, P., Büyükgüzel, E., Büyükgüzel, K., 2007. The effects of boric acid-induced oxidative stress on antioxidant enzymes and survivorship in *Galleria mellonella*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 66, 23–31.
- Ishigaki, S., Abramovitz, M., Listowsky, I., 1989. Glutathione-S-transferases are major cytosolic thyroid hormone binding proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 265–272.
- Jaiswal, A.K., 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* 36, 1199–1207.
- Jena, K., Kar, P.K., Babu, C.S., Giri, S., Singh, S.S., Prasad, B.C., 2013. Comparative study of total hydroperoxides and antioxidant defense system in the Indian tropical tasar silkworm, *Antheraea mylitta*, in diapausing and non-diapausing generations. *J. Insect Sci.* 13, 123.
- Joanisse, D., Storey, K., 1996. Oxidative stress and antioxidants in overwintering larvae of cold-hardy goldenrod gall insects. *J. Exp. Biol.* 199, 1483–1491.
- Joanisse, D.R., Storey, K.B., 1994. Mitochondrial enzymes during overwintering in two species of cold-hardy gall insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 145–150.
- Joanisse, D.R., Storey, K.B., 1998. Oxidative stress and antioxidants in stress and recovery of cold-hardy insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 23–30.
- Jones, D.P., 2006. Redefining oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 1865–1879.
- Joplin, K.H., Denlinger, D.L., 1989. Cycles of protein synthesis during pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 12, 111–122.
- Josephy, P.D., 1997. *Molecular Toxicology*. Oxford, New York.
- Jovanovic-Galovic, A., Blagojevic, D.P., Grubor-Lajsic, G., Worland, M.R., Spasic, M.B., 2007. Antioxidant defense in mitochondria during diapause and postdiapause development of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 64, 111–119.

- Jovanovic-Galovic, A., Blagojevic, D.P., Grubor-Lajsic, G., Worland, R., Spasić, M.B., 2004. Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): Diapause and metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55, 79–89.
- Justus, C.M., Pasini, A.P., Oliveira, E.D.M., 2003. Biologia e preferência da lagarta do girassol, *Chlosyne lacinia saundersii* (Lepidoptera: Nymphalidae) na planta daninha losna branca, *Parthenium hysterophorus* (Asteraceae). *Neotrop. Entomol.* 32, 163–166.
- Kageyama, T., Ohnishi, E., 1973. Carbohydrate metabolism in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. II. Anaerobiosis and polyol formation. *Dev. Growth Differ.* 15, 47–55.
- Kang, S.W., Baines, I.C., Rhee, S.G., 1998. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. *J. Biol. Chem.* 273, 6303–6311.
- Kanzok, S.M., Fechner, A., Bauer, H., Ulschmid, J.K., Müller, H.M., Botella-Munoz, J., Schneuwly, S., Schirmer, R., Becker, K., 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science* 291, 643–646.
- Kaspar, J.W., Niture, S.K., Jaiswal, A.K., 2009. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1304–1309.
- Ketterman, A.J., Saisawang, C., Wongsantichon, J., 2011. Insect glutathione transferases. *Drug Metab. Rev.* 43, 253–265.
- Khani, A., Moharramipour, S., Barzegar, M., Naderi-Manesh, H., 2007. Comparison of fatty acid composition in total lipid of diapause and non-diapause larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Sci.* 14, 125–131.
- Kim, I., Lee, K.S., Hwang, J.S., Ahn, M.Y., Li, J., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2005. Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin gene from the mole cricket, *Gryllotalpa orientalis*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 140, 579–587.
- Kim, J., Kim, K.Y., Jang, H.-S., Yoshida, T., Tsuchiya, K., Nitta, K., Park, J.-W., Bonventre, J. V., Park, K.M., 2009. Role of cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase in ischemia-reperfusion injury in mouse kidney. *Am. J. Physiol.* 296, F622–633.
- Koopmanschap, A.B., Oouchi, H., Kort, C.A.D., 1989. Effects of a juvenile hormone analogue on the eggs, post-embryonic development, metamorphosis and diapause induction of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomol. Exp. Appl.* 50, 255–263.
- Kopper, B.J., Shu, S., Charlton, R.E., Ramaswamy, S.B., 2001. Evidence for Reproductive Diapause in the Fritillary *Speyeria idalia* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 94, 427–432.
- Korbie, D.J., Mattick, J.S., 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* 3, 1452–1456.

- Kornfeld, S.F., Biggar, K.K., Storey, K.B., 2012. Differential expression of mature microRNAs involved in muscle maintenance of hibernating little brown bats, *Myotis lucifugus*: a model of muscle atrophy resistance. *Genomics. Proteomics Bioinformatics* 10, 295–301.
- Kostál, V., 2006. Eco-physiological phases of insect diapause. *J. Insect Physiol.* 52, 113–127.
- Kostal, V., Sula, J., Simek, P., 1998. Physiology of drought tolerance and cold hardiness of the Mediterranean tiger moth *Cymbalophora pudica* during summer diapause. *J. Insect Physiol.* 44, 165–173.
- Kostal, V., Tamura, M., Tollarova, M., Zahradnickova, H., 2004. Enzymatic capacity for accumulation of polyol cryoprotectants changes during diapause development in the adult red firebug, *Pyrrhocoris apterus*. *Physiol. Entomol.* 29, 344–355.
- Kostál, V., Tollarová, M., Sula, J., 2004. Adjustments of the enzymatic complement for polyol biosynthesis and accumulation in diapausing cold-acclimated adults of *Pyrrhocoris apterus*. *J. Insect Physiol.* 50, 303–313.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 313–319.
- Kotaki, T., Yagi, S., 1989. Hormonal control of adult diapause in the brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl. Entomol. Zool.* 24, 42–51.
- Krishnan, N., Kodrík, D., 2006. Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress? *J. Insect Physiol.* 52, 11–20.
- Krishnan, N., Kodrík, D., Turanli, F., Sehnal, F., 2007. Stage-specific distribution of oxidative radicals and antioxidant enzymes in the midgut of *Leptinotarsa decemlineata*. *J. Insect Physiol.* 53, 67–74.
- Krüger, A., Grüning, N.-M., Wamelink, M.M.C., Kerick, M., Kirpy, A., Parkhomchuk, D., Bluemlein, K., Schweiger, M.-R., Soldatov, A., Lehrach, H., Jakobs, C., Ralser, M., 2011. The pentose phosphate pathway is a metabolic redox sensor and regulates transcription during the antioxidant response. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 311–324.
- Krysan, J.L., 1990. Fenoxycarb and diapause: a possible method of control for pear psylla (Homoptera: Psyllidae). *J. Econ. Entomol.* 83, 293–299.
- Kültz, D., 2005. Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 225–257.
- Lam, E.W.-F., Francis, R.E., Petkovic, M., 2006. FOXO transcription factors: key regulators of cell fate. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 722–726.

- Lama, J.L., Bell, R.A. V, Storey, K.B., 2013. Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation in the hepatopancreas of the anoxia-tolerant marine mollusc, *Littorina littorea*. *PeerJ* 1, e21.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Larrere, M., Lavenseau, L., Tasei, J.N., Couillaud, F., 1993. Juvenile hormone biosynthesis and diapause termination in *Bombus terrestris*. *Invertebr. Reprod. Dev.* 23, 7–14.
- Laskowska, I., Leszczynski, B., Markowski, J., 1999. Activity of glutathione transferase and reductase in tissues of bird cherry-oat aphid during its host-plant alternation. *Exp. Toxicol. Pathol.* 51, 357–359.
- Lawler, J.M., Demaree, S.R., 2001. Relationship between NADP-specific isocitrate dehydrogenase and glutathione peroxidase in aging rat skeletal muscle. *Mech. Ageing Dev.* 122, 291–304.
- Lee, K., 1991. Glutathione S-transferase activities in phytophagous insects: Induction and inhibition by plant phototoxins and phenols. *Insect Biochem.* 21, 353–361.
- Lee, K.S., Kim, S.R., Park, N.S., Kim, I., Kang, P.D., Sohn, B.H., Choi, K.H., Kang, S.W., Je, Y.H., Lee, S.M., Sohn, H.D., Jin, B.R., 2005. Characterization of a silkworm thioredoxin peroxidase that is induced by external temperature stimulus and viral infection. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 73–84.
- Leek, B.T., Mudaliar, S.R., Henry, R., Mathieu-Costello, O., Richardson, R.S., 2001. Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 280, R441–447.
- Levy, H.R., 1979. Glucose-6-phosphate dehydrogenases, In: Meister, A. (Ed.), *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 97–192.
- Li, Y.-P., Ding, L., Goto, M., 2002. Seasonal changes in glycerol content and enzyme activities in overwintering larvae of the Shonai ecotype of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 50, 53–61.
- Lima, J.E.W., Silva, E.M., 2005. Estimativa da produção hídrica superficial do Cerrado brasileiro, In: Scariot, A., Sousa-Silva, J.C., Felfili, J.M. (Eds.), *Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação*. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 61–72.
- Lipke, H., Kearns, C.W., 1959a. DDT dehydrochlorinase: I. Isolation, chemical properties, and spectrophotometric assay. *J. Biol. Chem.* 234, 2123–2128.
- Lipke, H., Kearns, C.W., 1959b. DDT dehydrochlorinase: II. Substrate and cofactor specificity. *J. Biol. Chem.* 234, 2129–2132.

- Listowsky, I., Abramovitz, M., Homma, H., Niitsu, Y., 1988. Intracellular binding and transport of hormones and xenobiotics by glutathione-S-transferases. *Drug Metab. Rev.* 19, 305–318.
- Loong, A.M., Hiong, K.C., Wong, W.P., Chew, S.F., Ip, Y.K., 2012. Differential gene expression in the liver of the African lungfish, *Protopterus annectens*, after 6 days of estivation in air. *J. Comp. Physiol. B* 182, 231–245.
- Lu, S.C., 2013. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 3143–3153.
- Lu, Y.-X., Xu, W.-H., 2010. Proteomic and phosphoproteomic analysis at diapause initiation in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Proteome Res.* 9, 5053–5064.
- Lushchak, V.I., 2012. Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J. Amino Acids* 2012, 736837.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T. V, 2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. *Comp. Biochem. Physiol. B* 148, 390–397.
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 280, R100–107.
- Ma, Q., 2013. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 53, 401–426.
- MacRae, T.H., 2010. Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 2405–2424.
- Maistrovski, Y., Biggar, K.K., Storey, K.B., 2012. HIF-1 α regulation in mammalian hibernators: role of non-coding RNA in HIF-1 α control during torpor in ground squirrels and bats. *J. Comp. Physiol. B* 182, 849–859.
- Mannervik, B., Board, P.G., Hayes, J.D., Listowsky, I., Pearson, W.R., 2005. Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401, 1–8.
- Mannervik, B., Danielson, U.H., 1988. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23, 283–337.
- Manza, L.L., Codreanu, S.G., Stamer, S.L., Smith, D.L., Wells, K.S., Roberts, R.L., Liebler, D.C., 2004. Global shifts in protein sumoylation in response to electrophile and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1706–1715.
- Margoliash, E., Novogrodsky, A., 1958. A study of the inhibition of catalase by 3-amino-1:2:4:-triazole. *Biochem. J.* 68, 468–475.
- Mathews, M.C., Summers, C.B., Felton, G.W., 1997. Ascorbate peroxidase: A novel antioxidant enzyme in insects. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34, 57–68.

- Meng, G., Yao, J., Wang, L., Zhao, L., 2011. Variation in glutathione status associated with induction and initiation of diapause in eggs of the bivoltine strain of the silkworm *Bombyx mori*. *Physiol. Entomol.* 36, 173–179.
- Miake, F., Torikata, T., Koga, K., Hayashi, K., 1977. Isolation and characterization of NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase from the pupa of *Bombyx mori*. *J. Biochem.* 82, 449–454.
- Michaud, M.R., Denlinger, D.L., 2007. Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. *J. Comp. Physiol. B* 177, 753–763.
- Mittapalli, O., Neal, J.J., Shukle, R.H., 2007. Antioxidant defense response in a galling insect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 1889–1894.
- Moribayashi, A., Kurahashi, H., Ohtaki, T., 1992. Physiological differentiation of the ring glands in mature larvae of the flesh fly, *Boettcherisca peregrina*, programmed for diapause or non-diapause. *J. Insect Physiol.* 38, 177–183.
- Morin, P., Ni, Z., McMullen, D.C., Storey, K.B., 2008. Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Mol. Cell. Biochem.* 312, 121–129.
- Morin, P., Storey, K.B., 2007. Antioxidant defense in hibernation: cloning and expression of peroxiredoxins from hibernating ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 461, 59–65.
- Nakano, O., Neto, S.S., Zucchi, R.A., 1981. *Entomologia Econômica. Agronômica Ceres*, São Paulo.
- Nowakowska, A., Swiderska-Kołacz, G., Rogalska, J., Caputa, M., 2009. Antioxidants and oxidative stress in *Helix pomatia* snails during estivation. *Comp. Biochem. Physiol. C* 150, 481–486.
- Okamoto, I., Kayano, T., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2006. Up-regulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating hamsters subjected to oxidative stress in mid- to late arousal from torpor. *Comp. Biochem. Physiol. C* 144, 47–56.
- Oppenoorth, F.J., van der Pas, L.J.T., Houx, N.W.H., 1979. Glutathione S-transferase and hydrolytic activity in a tetrachlorvinphos-resistant strain of housefly and their influence on resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 11, 176–188.
- Orr, A.L., Lohse, L.A., Drew, K.L., Hermes-Lima, M., 2009. Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. *Comp. Biochem. Physiol. A* 153, 213–221.

- Paes, M., Oliveira, P., 1999. Extracellular glutathione peroxidase from the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 41, 171–177.
- Page, M.M., Salway, K.D., Ip, Y.K., Chew, S.F., Warren, S.A., Ballantyne, J.S., Stuart, J.A., 2010. Upregulation of intracellular antioxidant enzymes in brain and heart during estivation in the African lungfish *Protopterus dolloi*. J. Comp. Physiol. B. 180, 361–369.
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70, 158–169.
- Pakay, J.L., Withers, P.C., Hobbs, A.A., Guppy, M., 2002. In vivo downregulation of protein synthesis in the snail *Helix apersa* during estivation. Am. J. Physiol. 283, R197–204.
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. Am. J. Physiol. 301, R843–863.
- Patil, Y.N., Marden, B., Brand, M.D., Hand, S.C., 2012. Metabolic downregulation and inhibition of carbohydrate catabolism during diapause in embryos of *Artemia franciscana*. Physiol. Biochem. Zool. 86, 106–118.
- Paula, D.P., Teixeira, M.M., Timbo, R. V., Ferreira, L.A., Andrade, I., Sujii, E.R., Pires, C.S.S., Fontes, E.M.G., 2009. Metodologia de criação em laboratório do ciclo completo da lagarta-do-girassol *Chlosyne lacinia* (Lepidoptera: Nymphalidae). Bol. Pesqui. e Desenvolv. 267, 1–23.
- Pavlidis, S.C., Pavlidis, S.A., Tammariello, S.P., 2011. Proteomic and phosphoproteomic profiling during diapause entrance in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. J. Insect Physiol. 57, 635–644.
- Pener, M.P., 1992. Environmental cues, endocrine factors, and reproductive diapause in male insects. Chronobiol. Int. 9, 102–113.
- Pereira, I.C., 2009. Aspectos fisiológicos e ecológicos da estivação em *Pleurodema diploslistris* (Leiuperidae/Anura). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Peterson, T.M.L., Luckhart, S., 2006. A mosquito 2-Cys peroxiredoxin protects against nitrosative and oxidative stresses associated with malaria parasite infection. Free Radic. Biol. Med. 40, 1067–1082.
- Pinheiro, C.E.G., 2005. Estudos comparativos sobre a fauna de borboletas do Distrito Federal: implicações para a conservação, In: Scariot, A., Sousa-Silva, J.C., Felfili, J.M. (Eds.), Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, pp. 295–304.
- Podrabsky, J.E., Hand, S.C., 2000. Depression of protein synthesis during diapause in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. Physiol. Biochem. Zool. 73, 799–808.

- Prapanthadara, L.A., Hemingway, J., Ketterman, A.J., 1993. Partial purification and characterization of glutathione S-transferases involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 47, 119–133.
- Pullin, A.S., Wolda, H., 1993. Glycerol and glucose accumulation during diapause in a tropical beetle. *Physiol. Entomol.* 18, 75–78.
- Qiu, X., Brown, K., Hirsche, M.D., Verdin, E., Chen, D., 2010. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab.* 12, 662–667.
- Qiu, Z., Tsoi, S.C.M., MacRae, T.H., 2007. Gene expression in diapause-destined embryos of the crustacean, *Artemia franciscana*. *Mech. Dev.* 124, 856–867.
- Racker, E., 1955. Glutathione reductase from bakers' yeast and beef liver. *J. Biol. Chem.* 217, 855–866.
- Radyuk, S.N., Klichko, V.I., Spinola, B., Sohal, R.S., Orr, W.C., 2001. The peroxiredoxin gene family in *Drosophila melanogaster*. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1090–1100.
- Ragland, G.J., Denlinger, D.L., Hahn, D. a, 2010. Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14909–14914.
- Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K., 2006. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 1, 3159–3165.
- Ramnanan, C.J., Storey, K.B., 2006. Glucose-6-phosphate dehydrogenase regulation during hypometabolism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 339, 7–16.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., Cardoso, L., Hermes-Lima, M., 2005. Seasonal modulation of free radical metabolism in estivating land snails *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 140, 165–174.
- Ramos-Vasconcelos, G.R., Hermes-Lima, M., 2003. Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. *J. Exp. Biol.* 206, 675–685.
- Ranson, H., Claudianos, C., Ortell, F., Abgrall, C., Hemingway, J., Sharakhova, M. V, Unger, M.F., Collins, F.H., Feyereisen, R., 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* 298, 179–81.
- Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol.* 401, 226–241.
- Reynolds, J.A., Clark, J., Diakoff, S.J., Denlinger, D.L., 2013. Transcriptional evidence for small RNA regulation of pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga bullata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43, 982–989.

- Richard, D., Saunders, D., 1987. Prothoracic gland function in diapause and non-diapause *Sarcophaga argyrostoma* and *Calliphora vicina*. *J. Insect Physiol.* 33, 385–392.
- Ring, R.A., Danks, H. V., 1994. Desiccation and cryoprotection: overlapping adaptations. *Cryo-Letters* 15, 181–190.
- Salway, K.D., Tattersall, G.J., Stuart, J., 2010. Rapid upregulation of heart antioxidant enzymes during arousal from estivation in the Giant African snail (*Achatina fulica*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 157, 229–236.
- Scariot, A., Sousa-Silva, J.C., Felfili, J.M., 2005. Cerrado: Ecologia, Biodiversidade e Conservação. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Scott, J.A., 1992. *The Butterflies of North America: A Natural History and Field Guide*. Stanford University Press.
- Shappirio, D.G., 1974a. Comparative studies of oxidative enzyme systems in epidermis and fat body of diapausing and non-diapausing silkmoths. *J. Insect Physiol.* 20, 291–300.
- Shappirio, D.G., 1974b. Respiratory enzymes of the silkmoth *Antheraea pernyi* in relation to metamorphosis and pupal diapause. *Comp. Biochem. Physiol. B* 49, 705–713.
- Sharma, R., Brown, D., Awasthi, S., Yang, Y., Sharma, A., Patrick, B., Saini, M.K., Singh, S.P., Zimniak, P., Singh, S. V, Awasthi, Y.C., 2004. Transfection with 4-hydroxynonenal-metabolizing glutathione S-transferase isozymes leads to phenotypic transformation and immortalization of adherent cells. *Eur. J. Biochem.* 271, 1690–1701.
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A., 2001. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360, 1–16.
- Shi, H., Pei, L., Gu, S., Zhu, S., Wang, Y., Zhang, Y., Li, B., 2012. Glutathione S-transferase (GST) genes in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and comparative analysis with five additional insects. *Genomics* 100, 327–335.
- Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291–295.
- Sies, H., 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 916–921.
- Sim, C., Denlinger, D.L., 2011. Catalase and superoxide dismutase-2 enhance survival and protect ovaries during overwintering diapause in the mosquito *Culex pipiens*. *J. Insect Physiol.* 57, 628–634.
- Singh, D., Pandey, R.S., 1996. Glutathione-S-transferase in rat ovary: its changes during estrous cycle and increase in its activity by estradiol-17 beta. *Indian J. Exp. Biol.* 34, 1158–1160.

- Singh, S., Okamura, T., Ali-Osman, F., 2010. Serine phosphorylation of glutathione S-transferase P1 (GSTP1) by PKC α enhances GSTP1-dependent cisplatin metabolism and resistance in human glioma cells. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1343–1355.
- Smith, I.K., Vierheller, T.L., Thorne, C.A., 1988. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* 175, 408–413.
- Smolková, K., Ježek, P., 2012. The role of mitochondrial NADPH-dependent isocitrate dehydrogenase in cancer cells. *Int. J. Cell Biol.* 273947.
- Somme, L., 1982. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comp. Biochem. Physiol. A* 73, 519–543.
- Srere, P.A., 1969. Citrate synthase: [EC 4.1.3.7. Citrate oxaloacetate-lyase (CoA-acetylating)]. *Methods Enzymol.* 13, 3–11.
- Stanic, B., Jovanovic-Galovic, A., Blagojevic, D.P., Grubor-Lajsic, G., Worland, R., Spasic, M.B., 2004. Cold hardiness in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): glycerol content, hexose monophosphate shunt activity, and antioxidative defense system. *Eur. J. Entomol.* 101, 459–466.
- Steffen, J.M., Koebel, D.A., Musacchia, X.J., Milsom, W.K., 1991. Morphometric and metabolic indices of disuse in muscles of hibernating ground squirrels. *Comp. Biochem. Physiol. B* 99, 815–819.
- Sternburg, J., Kearns, C.W., Moorefield, H., 1954. Resistance to DDT, DDT-dehydrochlorinase, an enzyme found in ddt-resistant flies. *J. Agric. Food Chem.* 2, 1125–1130.
- Storey, K.B., 1987. Regulation of liver metabolism by enzyme phosphorylation during mammalian hibernation. *J. Biol. Chem.* 262, 1670–1673.
- Storey, K.B., 1997. Organic solutes in freezing tolerance. *Comp. Biochem. Physiol. A* 117, 319–326.
- Storey, K.B., 2006. Reptile freeze tolerance: metabolism and gene expression. *Cryobiology* 52, 1–16.
- Storey, K.B., Keefe, D., Kourtz, L., Storey, J.M., 1991. Glucose-6-phosphate dehydrogenase in cold hardy insects: Kinetic properties, freezing stabilization, and control of hexose monophosphate shunt activity. *Insect Biochem.* 21, 157–164.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1990. Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Q. Rev. Biol.* 65, 145–174.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1991. Biochemistry of cryoprotectants. In: Lee, R.E., Denlinger, D.L. (Eds.), *Insects at Low Temperature*. Chapman and Hall, New York, pp. 64–93.

- Storey, K.B., Storey, J.M., 2004. Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 79, 207–233.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 2007. Tribute to P. L. Lutz: putting life on 'pause' – molecular regulation of hypometabolism. *J. Exp. Biol.* 210, 1700–1714.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 2012. Aestivation: signaling and hypometabolism. *J. Exp. Biol.* 215, 1425–1433.
- Tahara, E.B., Navarete, F.D.T., Kowaltowski, A.J., 2009. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1283–1297.
- Tang, A.H., Tu, C.P., 1994. Biochemical characterization of *Drosophila* glutathione S-transferases D1 and D21. *J. Biol. Chem.* 269, 27876–27884.
- Tansey, F.A., Cammer, W., 1991. Depletion of glutathione interferes with induction of glycerolphosphate dehydrogenase in the brains of young rats. *Brain Res.* 564, 31–36.
- Tarhan, L., Kayali, H.A., Karacali, S., 2013. The glutathione-related detoxication responses to juvenile and ecdysone hormones in *Galleria mellonella*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 158, 117–121.
- Tauber, M.J., Tauber, C.A., 1976. Insect seasonality: diapause maintenance, termination, and postdiapause development. *Annu. Rev. Entomol.* 21, 81–107.
- Tawfik, A.I., Tanaka, Y., Tanaka, S., 2002. Possible involvement of ecdysteroids in embryonic diapause of *Locusta migratoria*. *J. Insect Physiol.* 48, 743–749.
- Tian, W.N., Braunstein, L.D., Pang, J., Stuhlmeier, K.M., Xi, Q.C., Tian, X., Stanton, R.C., 1998. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *J. Biol. Chem.* 273, 10609–10617.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502–522.
- Toien, O., Drew, K.L., Chao, M.L., Rice, M.E., 2001. Ascorbate dynamics and oxygen consumption during arousal from hibernation in Arctic ground squirrels. *Am. J. Physiol.* 281, R572–583.
- Tomioka, K., Agui, N., Bollenbacher, W.E., 1995. Electrical properties of the cerebral prothoracicotropic hormone cells in diapausing and non-diapausing pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Zoolog. Sci.* 12, 165–173.
- Torres, M.A., 2003. Papel da trealose no metabolismo de larvas de *Pyrearinus termitilluminans* (Coleoptera: Elateridae) sob estresse hídrico. Universidade de São Paulo, São Paulo.

- Tu, C.-P.D., Akgül, B., 2005. *Drosophila* glutathione S-transferases. *Methods Enzymol.* 401, 204–226.
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* 552, 335–344.
- Ursini, M. V, Parrella, A., Rosa, G., Salzano, S., Martini, G., 1997. Enhanced expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in human cells sustaining oxidative stress. *Biochem. J.* 323, 801–806.
- Usua, E.J., 1974. Observations on the physiology of diapause and non-diapause larvae of *Busseola fusca*. *Bull. Entomol. Res.* 63, 513–518.
- Van Ginneken, V.J., van Den Thillart, G.E., Muller, H.J., van Deursen, S., Onderwater, M., Visée, J., Hopmans, V., van Vliet, G., Nicolay, K., 1999. Phosphorylation state of red and white muscle in tilapia during graded hypoxia: an in vivo (31)P-NMR study. *Am. J. Physiol.* 277, R1501–1512.
- Veal, E.A., Day, A.M., Morgan, B.A., 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* 26, 1–14.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Hemingway, J., 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 357, 65–72.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Nikou, D.C., Ranson, H., Hemingway, J., 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.* 362, 329–337.
- Wang, J., Kim, S.K., 2003. Global analysis of dauer gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 130, 1621–1634.
- Wang, Y., Oberley, L.W., Murhammer, D.W., 2001. Evidence of oxidative stress following the viral infection of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1448–1455.
- Wang, Y., Oberley, L.W., Murhammer, D.W., 2001. Antioxidant defense systems of two lepidopteran insect cell lines. *Free Radic. Biol. Med.* 30, 1254–1262.
- War, A.R., Paulraj, M.G., Ahmad, T., Buhroo, A.A., Hussain, B., Ignacimuthu, S., Sharma, H.C., 2012. Mechanism of plant defense against insect herbivores. *Plant Signal Behav.* 7, 1306–1320
- Watanabe, M., Tanaka, K., 1998. Effect of juvenile hormone analogs on diapause termination and myo-inositol content in *Aulacophora nigripennis* adults (Coleoptera: Chrysomelidae). *Appl. Entomol. Zool.* 33, 259–262.

- Wei, S.H., Clark, A.G., Syvanen, M., 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1145–1153.
- Weinhold, L.C., Ahmad, S., Pardini, R.S., 1990. Insect glutathione-S-transferase: A predictor of allelochemical and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. B* 95, 355–363.
- Welker, A.F., 2009. Efeito da flutuação da disponibilidade de oxigênio e da privação alimentar sobre o metabolismo de radicais livres. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Welker, A.F., Campos, E.G., Cardoso, L.A., Hermes-Lima, M., 2012. Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant Nile tilapia. *Am. J. Physiol.* 302, R1111–1118.
- Welker, A.F., Moreira, D.C., Campos, E.G., Hermes-Lima, M., 2013. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability. *Comp. Biochem. Physiol. A* 165, 384–404.
- Whitwam, R.E., Storey, K.B., 1990. Pyruvate kinase from the land snail *Otala lactea*: regulation by reversible phosphorylation during estivation and anoxia. *J. Exp. Biol.* 154, 321–337.
- Wickler, S.J., Hoyt, D.F., van Breukelen, F., 1991. Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *Am. J. Physiol.* 261, R1214–1217.
- Williamson, J.H., Krochko, D., Bentley, M.M., 1980. Properties of *Drosophila* NADP⁺-isocitrate dehydrogenase purified on Procion Brilliant Blue-Sepharose-4B. *Comp. Biochem. Physiol. B* 65, 339–343.
- Wipking, W., Vtebahn, M., Neumann, D., During, C., 1995. Oxygen consumption, water, lipid and glycogen content of early and late diapause and non-diapause larvae of the burnet moth *Zygaena trzyolii*. *J. Insect Physiol.* 41, 47–56.
- Wolda, H., 1988. Insect Seasonality: Why? *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 19, 1–18.
- Wuerges, J., Lee, J.-W., Yim, Y.-I., Yim, H.-S., Kang, S.-O., Djinovic Carugo, K., 2004. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8569–8574.
- Xu, W.-H., Denlinger, D.L., 2004. Identification of a cDNA encoding DH, PBAN and other FXPRL neuropeptides from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and expression associated with pupal diapause. *Peptides* 25, 1099–1106.
- Yamamoto, K., Banno, Y., Fujii, H., Miake, F., Kashige, N., Aso, Y., 2005. Catalase from the silkworm, *Bombyx mori*: gene sequence, distribution, and overexpression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 277–283.

- Yin, C.-M., Wang, Z.-S., Chaw, W.-D., 1985. Brain neurosecretory cell and ecdysiotropin activity of the non-diapausing, pre-diapausing and diapausing southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella* Dyar. *J. Insect Physiol.* 31, 659–667.
- Young, K.M., Cramp, R.L., White, C.R., Franklin, C.E., 2011. Influence of elevated temperature on metabolism during aestivation: implications for muscle disuse atrophy. *J. Exp. Biol.* 214, 3782–3789.
- Zachariassen, K.E., 1985. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.* 65, 799–832.
- Zera, A.J., Newman, S., Berkheim, D., Black, C., Klug, L., Crone, E., 2011. Purification and characterization of cytoplasmic NADP⁺-isocitrate dehydrogenase, and amplification of the NADP⁺-IDH gene from the wing-dimorphic sand field cricket, *Gryllus firmus*. *J. Insect Sci.* 11, 53.
- Zhang, Q., Denlinger, D.L., 2012. Dynamics of diapause hormone and prothoracicotropic hormone transcript expression at diapause termination in pupae of the corn earworm, *Helicoverpa zea*. *Peptides* 34, 120–126.
- Zhang, Q., Lu, Y.-X., Xu, W.-H., 2013. Proteomic and metabolomic profiles of larval hemolymph associated with diapause in the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *BMC Genomics* 14, 751.
- Zhang, Q., Nachman, R.J., Kaczmarek, K., Zabrocki, J., Denlinger, D.L., 2011. Disruption of insect diapause using agonists and an antagonist of diapause hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 16922–16926.
- Zhang, T.-Y., Sun, J.-S., Zhang, Q.-R., Xu, J., Jiang, R.-J., Xu, W.-H., 2004. The diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide gene of *Helicoverpa armigera* encodes multiple peptides that break, rather than induce, diapause. *J. Insect Physiol.* 50, 547–554.
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., Miller, W., 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203–214.

APÊNDICE A – Sequências parciais dos genes para proteínas de interesse

ChlCAT – Catalase

GGCCGCGGGAATTCGATTATGGCTCAAGCAGAAAGCTGTAAATTTAATCCATTTGATCTTAC
TAAAATCTGGCCTCATTTCAGAATATCCTCTAATTCCTGTTGGTAAATTGGTTTTGGATAGAA
ATCCGAAAAATTACTTTGCAGAGGTTGAACAAATTGCCTTCAGTCCATCTAACTTGGTACCT
GGCATTGAGCCATCACCTGATAAAATGTTACAGGGACGCTTTTTTGCATACAGTGACACTCA
TCGTCACCGCCTTGGTGCAAATTACCTTCAAATTCAGTTAACTGCCCATACCGTGTGACTG
TAGCCAATTACCAACGGGATGGACCTCAAGCAATGTGCAATCAAGATGGTGCCCCAATTAC
TTCCCCAACTCATTCTCTGGTCCCCAAGAGTGCCCAAGAGCGCAACGCTTTCAACCAAGATA
CAATGTGAGCGGTGATGTTGACAGATACGAAAGTGGCCAGACTGAGGACAACAATCACTAGT
GAATTC

ChlCuZnSOD – Cu,Zn-Superóxido dismutase

GGCCGCGGGAATTCGATTAATGCCCGCCAAAGCAGTGTGTGTATTAAAAGGTGATGTTAGCG
GCACAGTGTTCCTCGACCAGAAGGATGATAAGTCCCCAGTGGTTGTGTCCGGAGAAGTTTCT
GGCCTTTCAAAGGGTCTGCACGGTTTCCACATCCACGAGTTCGGTGATAACACAAACGGATG
CACATCGGCCCGGAGCTCACTTCAATCCCCTGAAACAAGAGCATGGAGCCCCCGATGCAGCGG
TCAGACATGTGGGTGATCTCGGTAACATTGAGGCTACATCAGACGGTGGTGTACAAAGGTA
AATATCCAAGACTCCCAAATCTCCCTCAACGGACCCAACAGCATCATCGGACGTACACTGGT
TGTCACGCTGACCCTGATGACCATCACTAGTGAATTC

ChlCysPrx – 1-Cys peroxiredoxina

GGCCGCGGGAATTCGATTTTCTCTCACCCAGCCGACTTCACGCCAGTATGTACCACGAAGCT
CGCAAGGGTTGTCACTCTGGTGCCTGAATTCATAAGCGAAATGTGAAGCTCATTGCCTTGT
CATGTGACAGTGTGGAAAGTCACCAAGGCTGGGGCAAGGATGTATTACATTATGCCGACTCC
AAGCAAGAAAACTGCCGTACCCATTATTGCTGATGAAAACGTGAACTTGCTGTACAGCT
GGGCATGATTGACCCCGACCAGATATCCAAAGAAGGATTGCCACTCACTGCTAGAGCTGTCT
TCATTATTGGACCTGACAAGAACTGAAGTTGTCCATTTTATATCCAGCAACCACCGGACGT
AATTTTCATGAAATCCTGCGGGTCATGGACTCTCTCCAGCTGACTGATAATCACTAGTGAAT
TC

ChlGST δ – Glutathiona S-transferase δ

GGCCGCGGGAATTCGATTACCTTCATCTGAACCTCAAACCTGAATACCTTAAGATTAACCCC
 CAACACACAGTCCCGACTCTAGTAGACGACGGCTACCCGATCTACGAGTCACGTGCTATCAT
 CACCTACCTCGTGAACAAGTACGGCAAGGGTAGCGCTCTCTACCCCGAGGAGCCTAAGGCGA
 GAGCACTCGTCGACCAGCGCCTGTACTTCGACATCGGAACTTTGTACCAGAGATTCAGTGAT
 TATTTCTACCCACAAGTCTTCGGCAATGCGCCCGCCGACAAGGACAAGCTAACCAAGGTAGA
 GGACGCTCTACAACCTTTTGGACACATTCCTCGAGGGCCAGAAATACGTCGCCGGCCCTAACC
 TCACCGTGGCCGACCTGAGCATCATAGCTGGTGTGTCCAGCTTCGAGGCGTCTGACGTTGAC
 TTCAAGAAATACGCTAATGTTAAAAGGTGGTACGAAACCGTGAAGTCGACAGCTCCAGAGTA
 CCAGAATGAATCACTAGTGAATTC

ChlRpS7 – Proteína ribosomal S7

GGCCGCGGGAATTCGATTGGCAAGCATGTTGTGTTTCATCGGTGACCGTAAAATTCTACCTAA
 ACCCAGCCACAAGACGCGCGTCGCTAACAAACAGAAGAGGCCAAGATCGAGGACTTTGACGT
 CTGTCTATGATGCTATTCTTGAGGATCTCCTGGTTCCTGCTGAGATTGTTGGCAAGAGGAT
 CAGGGTGAAGCTTGATGGATCACAATTGATTAAAGTGCACCTTGACAAGAATCAGCAGACCA
 CCATTGAACACAAGGTGGACACAATCACTAGTGAATTC

**APÊNDICE B – Redox Metabolism During Tropical Diapause in a Lepidoptera
Larva**

Thomas Ruf · Claudia Bieber
Walter Arnold · Eva Millesi
Editors

Living in a Seasonal World

Thermoregulatory and Metabolic
Adaptations

 Springer

Chapter 35

Redox Metabolism During Tropical Diapause in a Lepidoptera Larva

Daniel Carneiro Moreira, Débora Pires Paula
and Marcelo Hermes-Lima

Abstract Many studies on metabolic rate depression and redox metabolism exist in the literature; however, virtually none focuses on tropical insect diapause. Thus, our aim was to evaluate peculiarities of the metabolism of reactive oxygen species (ROS) between diapausing and non-diapausing insects in a tropical region. The lepidopteran *Chlosyne lacinia* undergoes diapause as larva at the third instar prior to the dry season in middle-west Brazil. We measured the activity of metabolic and anti-oxidant enzymes at day 20 of diapause. The activity of citrate synthase decreased by 81% in whole-body extracts as compared with larvae sampled before diapause entry. Moreover, total-glutathione content and lipid peroxidation dropped significantly (by 82 and 24%, respectively) in diapausing insects. On the other hand, the activities of catalase and glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were unchanged. These results indicate a diminished oxidative metabolism and suggest important roles for catalase and G6PDH in ROS control in diapause and, possibly, during arousal. The diminished glutathione levels could be related to its depletion by glutathione-dependent systems or by its diminished biosynthesis.

D. C. Moreira · M. Hermes-Lima (✉)
Laboratório de Radicais Livres, Departamento de Biologia Celular,
Universidade de Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil
e-mail: m_hermes_lima@yahoo.com.br

D. P. Paula
Laboratório de Ecologia Molecular, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília,
DF 70770-917, Brazil

35.1 Introduction

Our research group has been engaged over the years in the investigation of free radical metabolism in animals that are naturally exposed to environmental stresses. Surviving natural insults often involves a reduction of metabolic rate leading to high stress tolerance and reduced metabolic demand. Several works observed common biochemical mechanisms (Guppy and Withers 1999; Storey 2002) and marked modulation of free radical metabolism during conditions such as freezing, dehydration, hypoxia, anoxia, aestivation, hibernation, and diapause (Hermes-Lima and Zenteno-Savin 2002; Bickler and Buck 2007; Jovanovic-Galovic et al. 2007; Gorr et al. 2010).

Insects and other arthropods use diapause as an anticipatory response to the advent of unfavorable conditions including low temperature and dry periods (Denlinger 2002). Diapause is an endogenously programmed arrest in development characterized by suppressed metabolic rate and high stress tolerance. It is triggered by environmental cues, such as changes in photoperiod and temperature (Denlinger 2002). The developmental stage in which diapause occurs is species specific and it can occur in eggs, different larval instars, pupae, or adults. More than a simple halt in development, diapause is an alternative physiological state consisting of several successive stages (Kostal 2006). During diapause, differential gene expression and metabolic regulation occur (Denlinger 2002; MacRae 2010). As a result of the selective reduction of cellular processes, overall metabolic demand is decreased. Thus, animals are able to survive long periods without feeding during diapause. In temperate regions, diapausing insects take advantage of low temperatures during winter to decrease their energetic requirements, since metabolic rate is closely related to environmental temperature in ectotherms (Hahn and Denlinger 2011). On the other hand, tropical diapausing insects depress their metabolic rate without the assistance of low temperatures (Denlinger 1986).

Many studies in comparative biology have been dedicated to the investigation of the metabolism of reactive oxygen species (ROS) and other radical/reactive species. Although hazardous at high concentrations, the highly reactive nature of these compounds is employed by aerobic organisms in many cellular processes (Droge 2001; Hermes-Lima 2004). ROS are formed continuously as by-products of mitochondrial respiration and other biochemical “routes” in the animal kingdom. In the case of phytophagous insects, the metabolism of allelochemicals is an important source of ROS (Felton and Summers 1995; Barbehenn 2002). These highly reactive compounds participate in several vital cellular pathways. However, when ROS production rises to levels that jeopardize redox control and signaling, oxidative stress occurs (Jones 2006). Excess ROS may induce oxidation of virtually all groups of biomolecules, including proteins, lipids, and nucleic acids (Sies 1993; Halliwell and Gutteridge 2007). Hence, aerobic organisms rely on a suite of anti-oxidants that include enzymatic and non-enzymatic components able to manage both pro-oxidant activity and signaling networks mediated by ROS (Hermes-Lima 2004; Pamplona and Costantini 2011).

In insects, as well as in other taxa, several anti-oxidant enzymes have been characterized, for example, superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione S-transferases (GSTs), and peroxiredoxins (Felton and Summers 1995; Hermes-Lima 2004; Halliwell and Gutteridge 2007). Auxiliary enzymes, such the NADPH generating glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), provide reducing power for the regeneration of reduced glutathione (GSH) from glutathione disulfide (GSSG) by glutathione reductase (GR). GSH a tripeptide known as “the most abundant non-protein thiol in eukaryotic cells” plays important roles in ROS metabolism that include redox buffering, cell signaling, as substrate for several enzymes, and direct scavenging of reactive species (Dalle-Donne et al. 2007; Halliwell and Gutteridge 2007). Most studies concerning anti-oxidant defense responses in insects are limited to exposure to plant pro-oxidants, insecticides or pollutants (Ku et al. 1994; Zaman et al. 1995; Krishnan and Kodrik 2006; Barbehenn et al. 2008; Augustyniak et al. 2009, 2011). Anti-oxidant defenses may also be important during shifts from anaerobic toward aerobic metabolism, when oxygen uptake rapidly increases, resulting in a potential ROS overproduction ultimately reflected as oxidative damage (Hermes-Lima and Zenteno-Savin 2002).

The sunflower caterpillar, *Chlosyne lacinia* (Geyer) (Lepidoptera: Nymphalidae), is widely distributed, ranging from northern Argentina to the southern USA (Drummond et al. 1970). It is the main defoliator of sunflower (*Helianthus annuus*) crops in Brazil, representing an important economical issue (Boiça and Vendramin 1993). *C. lacinia* features five larval instars and the generation time ranges between 35 and 40 days under field conditions in Texas, USA (Drummond et al. 1970) or 30–40 days in laboratory cages in middle-west Brazil (Paula DP, personal communication). Both winter and summer diapauses have been observed specifically at the third larval instar in *C. lacinia* at Texas, USA (Drummond et al. 1970; Scott 1986). Unfed animals can be maintained in laboratory in a quiescent state for over a year (Drummond et al. 1970). Diapausing *C. lacinia* larvae aggregate, do not feed, remain inactive, and form a thin silk layer surrounding animals. Changes in color patterns may occur. Environmental regulators of *C. lacinia* diapause are still unknown; however, potential regulators of diapause in tropical insects include photoperiod, temperature, rainfall, and nutrition (Denlinger 1986).

Several observations suggest a relationship between the modulation of free radical metabolism and biochemical adaptations of cold-hardy and diapausing insects of temperate regions (Grubor-Lajsic et al. 1997; Joannis and Storey 1998; Stanic et al. 2004; Kojic et al. 2009). Few studies have compared diapausing animals to their active counterparts (Jovanovic-Galovic et al. 2004, 2007; Sim and Denlinger 2011) and data on free radical metabolism and redox balance during diapause in insects inhabiting tropical regions is scarce. Thus our aim was to identify particularities of the anti-oxidant apparatus between non-diapausing and diapausing *C. lacinia* larvae prior to the dry season in middle-west Brazil. We determined the activities of citrate synthase (CS), G6PDH, and catalase and total glutathione concentration in whole-body extracts of active and 20-day diapausing third instar *C. lacinia* larvae.

35.2 Methods

Eggs of *C. lacinia* were collected near the University of Brasilia (in preserved areas of cerrado vegetation, 15°43'S, 47°53'W, approximately at 1,000 m altitude) in January-2010, prior to the dry season, from the leaves of Mexican sunflower (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae). The eggs were maintained at $25 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ R.H., and 16:8 h photophase in 3.5 L plastic cages. After hatching, the caterpillars were kept at the same conditions and fed daily with fresh leaves of *T. diversifolia*. Once transformed to the third instar, a group of larvae were frozen in liquid nitrogen to be used as the control group and kept at -80°C until analysis. The remaining animals, kept without food, entered diapause (at third instar) and stayed in this state for 20 days, when they were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis. Whole-body extracts were prepared from a pool of three larvae and represented one experimental unit per assay.

Frozen samples were homogenized using an OMNI Tissue Master homogenizer (Omni International, Marietta, GA) in ice cold 50 mM potassium phosphate, pH 7.2, containing 0.5 mM EDTA and 10 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). Extracts were centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min at 5°C and supernatants were collected for enzyme assays. Citrate synthase (CS) activity was measured as described by Srere (1969). Catalase and G6PDH activities were measured as described by Ramos-Vasconcelos and Hermes-Lima (2003). One unit of CS, catalase, or G6PDH activity is defined as the amount that converts 1 μmol substrate into product per min. Protein concentration was measured with Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradford 1976) using bovine serum albumin as a standard. Enzyme activities were expressed as units per milligram of soluble protein.

To measure total glutathione, frozen samples were homogenized in ice cold 10% (w/v) trichloroacetic acid, centrifuged at $10,000 \times g$ for 6 min at 5°C , and supernatants were collected for analysis. Total glutathione, reduced + oxidized forms, was determined as total-glutathione equivalents (GSH-eq) based on Griffith (1980). GSH-eq was quantified by following the reduction rate of DTNB by GSH catalyzed by GR and comparing this rate to a standard curve (see details in Ramos-Vasconcelos and Hermes-Lima 2003). Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were measured as an index of lipid peroxidation as described by Buege and Aust (1978). Statistical analyses used the software GraphPad Prism 5 (San Diego, USA). The comparisons between groups were performed by a two-tailed Student's t-test and a significance level at $P < 0.05$ was considered. Results are presented as means \pm standard error (SEM).

35.3 Results and Discussion

The activity of CS in 20-day diapausing larvae decreased by 81% (Fig. 35.1a), indicating that the TCA cycle works at a lower rate, causing diminished oxidative capacity of diapausing animals. Citrate and fumarate—aerobic intermediates—are

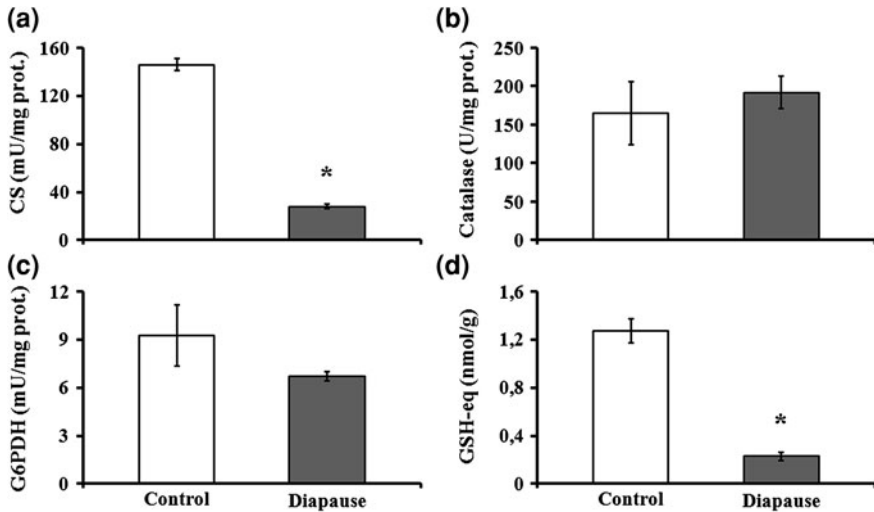


Fig. 35.1 Whole-body CS, catalase and G6PDH activities per milligram of protein and GSH-eq levels per gram wet weight of active, and 20-day diapausing third instar *C. lacinia* larvae. (*) Significantly different from corresponding control values. Data are means \pm SEM, $n = 3$ for enzyme activities, and $n = 7$ for total-glutathione (GSH-eq) levels

markedly decreased in whole-body extracts of 30-day diapausing flesh fly (*Sarcophaga crassipalpis*) pupae at 20°C also indicating a reduction in TCA cycle activity (Michaud and Denlinger 2007). In addition, whole-body transcript profiling of *S. crassipalpis* diapausing pupae revealed that even though the transcript abundance of important TCA cycle enzymes increased, the initial reactions of the cycle are suppressed (Ragland et al. 2010). Moreover, increased gene expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) and sorbitol dehydrogenase was observed in diapausing larvae of the mosquito, *Wyeomyia smithii* (Emerson et al. 2010). It has been proposed that an anticipatory physiological response for low oxygen consumption is associated with diapause (Emerson et al. 2010). During diapause there is a trend toward anaerobic metabolism, even when animals are not under hypoxia or anoxia, suggesting that the shift away from aerobic metabolism is a preprogrammed component of the diapause phenomenon (Hahn and Denlinger 2011). The shift from aerobic toward anaerobic metabolism is among the shared physiological features of animals in hypometabolic states (Guppy and Withers 1999; Storey 2002; Storey and Storey 2007).

Catalase activity remained unchanged in 20-day diapausing larvae (Fig. 35.1b). This result differs from previous observations by Jovanovic-Galovic et al. (2004) in which catalase activity was lower in whole-body homogenates of diapausing compared to non-diapausing larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. Catalase activity was also reduced in isolated mitochondria of diapausing *O. nubilalis* larvae (Jovanovic-Galovic et al. 2007). The maintenance of catalase activity under low metabolic rate indicates that the control of hydrogen peroxide

(H_2O_2) is somehow important during diapause. In diapausing mosquitoes (*Culex pipiens*) catalase plays important roles in both lifespan extension and stress tolerance, as evidenced by an upregulation of catalase expression in young diapausing females (Sim and Denlinger 2011). Moreover, high levels of apoptosis in ovaries and increased mortality were observed in diapausing animals in which catalase expression was suppressed by RNA interference (Sim and Denlinger 2011). It has been shown that in *Caenorhabditis elegans* larvae under metabolic depression there is an upregulation of catalase and SOD expression (Houthoofd et al. 2002). Sima et al. (2011) suggest that changes in H_2O_2 levels are involved in initiation and termination of diapause in eggs of the silkworm *Bombyx mori*. H_2O_2 may also be associated with the release of a neuropeptide hormone related to diapause in *B. mori* as evidenced by peculiarities of H_2O_2 metabolism between univoltine and polyvoltine strains (Zhao and Shi 2009). Thus, the maintenance of catalase activity in *C. lacinia* could be related to the control of H_2O_2 levels possibly preventing a premature break of diapause.

G6PDH activity remained unchanged after 20 days of diapause (Fig. 35.1c). This result indicates the ability to maintain NADPH production via the pentose phosphate pathway. This pathway would be essential to provide reducing power for biosynthetic pathways and for the enzyme-catalyzed reduction of GSSG to GSH at the cost of NADPH by the glutathione cycle (Hermes-Lima 2004). A supply of NADPH and reduced glutathione is also important for the functioning of glutathione-dependent enzymes, such as glutathione S-transferases (GSTs). Other NADPH consuming antioxidants, such as peroxiredoxins (see Conclusion section), could also take advantage of this supply. This, together with unaltered catalase activity, may be especially important during the recovery from hypometabolism, because awakening is considered a condition of potential ROS overproduction (Ferreira-Cravo et al. 2010). In the garden snail, *Helix aspersa*, the awakening from winter aestivation is accompanied by increased levels of lipid peroxidation and GSSG/GSH-eq ratio (a key index of cellular redox status and oxidative stress), suggesting augmented ROS production (Ramos-Vasconcelos and Hermes-Lima 2003). Increased SOD activity and lipid peroxidation in arousing snails *Otala lactea* also indicate oxidative stress in the recovery from metabolic depression (Hermes-Lima and Storey 1995).

In many hypometabolic states metabolism is not constant. For example, aestivating snails, *Otala lactea*, show intermittent increases in metabolic rate associated with opening the pneumostome for gas exchange (Barnhart and McMahon 1987). Moreover, periodic arousal events are characteristic of all mammalian hibernators (Carey et al. 2003). During insect diapause there are also cycles of enhanced metabolic rate, as observed by monitoring oxygen uptake in pupal diapause of the tropical flesh flies, *Sarcophaga inzi* and *Poecilometopa spilogaster* (Denlinger 1979). Periodic cycles of oxygen uptake were also observed in diapausing pupae of the lepidopterans *Pieris brassicae* and *Papilio machaon* (Crozier 1979). It is unclear if diapausing *C. lacinia* larvae exhibit these cycles; however, the maintenance of anti-oxidant activities (catalase and G6PDH) may be very important for the maintenance of redox homeostasis preventing oxidative stress from any bursts in oxygen consumption.

Another critical role of the pentose phosphate pathway is the supply of reducing equivalents for the synthesis of polyols (Storey and Storey 1991). The accumulation of low molecular weight sugars and polyols such as glycerol and sorbitol are known to confer not only cold hardiness but also enhanced dehydration tolerance in dormant insects (Kostal et al. 1998; Benoit 2010). A comparison between diapausing and non-diapausing *Pyrrohocoris apterus* revealed increased G6PDH activity related to polyol biosynthesis in diapausing animals (Kostal et al. 2004). Although increased levels of polyols were reported in diapausing tropical insects (Pullin and Wolda 1993) the levels of low molecular weight sugars and polyols, as well as activities of enzymes involved in polyol production, are unknown in *C. lacinia*. Nevertheless, it would be critical to maintain the water balance during diapause through the dry season in the Brazilian savanna-like cerrado.

The GSH-eq levels in diapausing animals fell to 18% of control levels (Fig. 35.1d). This reduction is consistent with the lowered metabolic rate and agrees with another study (Meng et al. 2011) in which diapausing silkworm eggs showed decreased total-glutathione concentration as compared to non-diapausing eggs. The lowered GSH-eq levels in *C. lacinia* could be a result of decreased GSH biosynthesis, increased protein glutathionylation, or increased GSH-eq depletion caused, for example, by GST-catalyzed conjugation. Molecular analysis identified a GST from *Choristoneura fumiferana* as a diapause-associated protein, with levels markedly increased in diapausing second instar larvae as compared to control second instar larvae (Feng et al. 1999). It is possible that GST activity is increased in diapausing *C. lacinia* and that this could account for the observed depletion in total glutathione. Moreover, TBARS levels decreased by 24% in diapausing animals (control animals: 19.0 ± 0.94 nmol/g; $n = 7$). The diminished lipid peroxidation is in accordance with the suppressed metabolic rate and the maintenance of the enzymatic anti-oxidant potential.

35.4 Conclusion and Perspectives

To our knowledge, this is the first study that investigates redox metabolism during diapause in an insect inhabiting a tropical region. Our results showed an expected diminished oxidative metabolism, the maintenance of catalase and G6PDH activities, the depletion of total glutathione, and reduced lipid peroxidation in diapausing animals. The potential to maintain both the NADPH supply and the control of H₂O₂ metabolism may be crucial at the moment of arousal from diapause toward larval development. Moreover, gene expression analyses of peroxiredoxins (Prxs), a family of enzymes that could take advantage of the potential NADPH supply and plays important roles in ROS signaling (Cox et al. 2010), should be a further step in our investigation. The Prxs family is being studied in several insect systems and their roles in oxidative stress tolerance and life span extension have been reported (Kim et al. 2005; Lee et al. 2009; Hu et al. 2010). Furthermore, the investigation of polyol biosynthesis may compose a clearer picture of the relationship between carbohydrate and free radical metabolism in diapausing *C. lacinia*. The reasons

for the depletion of glutathione may be further elucidated by the determination of glutathionylated proteins in addition to the assessment of the activities and expression of GST isozymes; those experiments are currently in progress. The assessment of enzymes involved in GSH biosynthesis could also aid the understanding the depletion of GSH-eq. The study of diapause in the tropical zone, where seasonal variations of temperature are not as wide as in temperate regions, is important not only to unveil the characteristics of tropical insect diapause, but also to assist the investigation of the biochemical mechanisms related to metabolic depression in all of its forms.

Acknowledgments This work was supported by grants from FINATEC (Brasília, Brazil), Projeto Universal (CNPq, Brazil), and INCT-Processos Redox em Biomedicina (Redoxoma, CNPq). Daniel C. Moreira is a recipient of an undergraduate fellowship from CNPq. We thank graduate student Renata Timbó (UnB) for taking good care of our “sleeping” bugs and Prof. Élide G. Campos (UnB) for revising this manuscript. We also thank an anonymous reviewer for insightful comments. This study is in honor of Cláudio Mário Guimarães da Silva (Rio de Janeiro, Brazil), retired biology teacher and an inspiring mind.

References

- Augustyniak M, Babczynska A, Augustyniak M (2009) Does the grasshopper *Chorthippus brunneus* adapt to metal polluted habitats? A study of glutathione-dependent enzymes in grasshopper nymphs. *Insect Sci* 16:33–42
- Augustyniak M, Babczynska A, Augustyniak M (2011) Oxidative stress in newly-hatched *Chorthippus brunneus*—the effects of zinc treatment during diapause, depending on the female’s age and its origins. *Comp Biochem Physiol C* 154:172–179
- Barbehenn RV (2002) Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper. *J Chem Ecol* 28:1329–1347
- Barbehenn RV, Maben RE, Knoester JJ (2008) Linking phenolic oxidation in the midgut lumen with oxidative stress in the midgut tissues of a tree-feeding caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Environ Entomol* 37:1113–1118
- Barnhart MC, McMahon BR (1987) Discontinuous carbon dioxide release and metabolic depression in dormant land snails. *J Exp Biol* 128:123–138
- Benoit JB (2010) Water management by dormant insects: comparisons between dehydration resistance during summer aestivation and winter diapause. In: Navas CA, Carvalho JE (eds) *Aestivation: molecular and physiological aspects*. Progress in molecular and subcellular biology, vol 49. Springer, Heidelberg, pp 209–229
- Bickler PE, Buck LT (2007) Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu Rev Physiol* 69:145–170
- Boiça AL Jr, Vendramin JD (1993) Infestação de girassol pela lagarta *Chlosyne lacinia saundersii* em duas épocas de cultivo. *Sci Agric* 50:244–253
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 52:302–310
- Carey HV, Andrews MT, Martin SL (2003) Mammalian hibernation: cellular and molecular responses to depressed metabolism and low temperature. *Physiol Rev* 83:1153–1181
- Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB (2010) Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J* 425:313–325
- Crozier AJG (1979) Diel oxygen uptake rhythms in diapausing pupae of *Pieris brassicae* and *Papilio machaon*. *J Insect Physiol* 25:647–652

- Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med* 43:883–898
- Denlinger DL (1979) Pupal diapause in tropical flesh flies: environmental and endocrine regulation, metabolic rate and genetic selection. *Biol Bull* 156:31–46
- Denlinger DL (1986) Dormancy in tropical insects. *Annu Rev Entomol* 31:239–264
- Denlinger DL (2002) Regulation of diapause. *Annu Rev Entomol* 47:93–122
- Droge W (2001) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82:47–95
- Drummond III BA, Bush GL, Emmel TC (1970) The biology and laboratory culture of *Chlosyne lacinia* Geyer (Nymphalidae). *J Lep Soc* 24:135–142
- Emerson KJ, Bradshaw WE, Holzapfel CM (2010) Microarrays reveal early transcriptional events during the termination of larval diapause in natural populations of the mosquito, *Wyeomyia smithii*. *PLoS One* 5:e9574
- Felton GW, Summers CB (1995) Antioxidant systems in insects. *Arch Insect Biochem Physiol* 29:187–197
- Feng QL, Davey KG, Pang ASD, Primavera M, Ladd TR, Zheng SC, Sohi SS, Retnakaran A, Palli SR (1999) Glutathione S-transferase from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*: identification, characterization, localization, cDNA cloning, and expression. *Insect Biochem Mol Biol* 29:779–793
- Ferreira-Cravo M, Welker AF, Hermes-Lima M (2010) The connection between oxidative stress and estivation in gastropods and anurans. In: Navas CA, Carvalho JE (eds) *Aestivation: molecular and physiological aspects*. Progress in molecular and subcellular biology, vol 49. Springer, Heidelberg, pp 47–61
- Gorr TA, Wichmann D, Hu J, Hermes-Lima M, Welker AF, Terwilliger N, Wren JF, Viney M, Morris S, Nilsson GE, Deten A, Soliz J, Gassmann M (2010) Hypoxia tolerance in animals: biology and application. *Physiol Biochem Zool* 83:733–752
- Griffith OW (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106:207–212
- Grubor-Lajsic G, Block W, Telesmanic M, Jovanovic A, Stevanovic D, Baca F (1997) Effect of cold acclimation on the antioxidant defense system of two larval Lepidoptera (Noctuidae). *Arch Insect Biochem Physiol* 36:1–10
- Guppy M, Withers P (1999) Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol Rev Camb Philos Soc* 74:1–40
- Hahn DA, Denlinger DL (2011) Energetics of insect diapause. *Annu Rev Entomol* 56:103–121
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free radicals in biology and medicine*. University Press, Oxford
- Hermes-Lima M (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey KB (ed) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. Wiley, New York, pp 319–368
- Hermes-Lima M, Storey KB (1995) Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am J Physiol* 268:R1386–R1393
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T (2002) Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Physiol C* 133:537–556
- Houthoofd K, Braeckman BP, Lenaerts I, Brys K, Vreese A, Eygen SV, Vanfleteren JR (2002) Ageing is reversed, and metabolism is reset to young levels in recovering dauer larvae of *C. elegans*. *Exp Gerontol* 37:1015–1021
- Hu Z, Lee KS, Choo YM, Yoon HJ, Lee SM, Lee JH, Kim DH, Sohn HD, Jin BR (2010) Molecular cloning and characterization of 1-Cys and 2-Cys peroxiredoxins from the bumblebee *Bombus ignites*. *Comp Biochem Physiol B* 155:272–280
- Joanisse DR, Storey KB (1998) Oxidative stress and antioxidants in stress and recovery of cold-hardy insects. *Insect Biochem Mol Biol* 28:23–30
- Jones DP (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8:1865–1879
- Jovanovic-Galovic A, Blagojevic DP, Grubor-Lajsic G, Worland R, Spasic MB (2004) Role of antioxidant defense during different stages of preadult life cycle in European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.): diapause and metamorphosis. *Arch Insect Biochem Physiol* 55:79–89

- Jovanovic-Galovic A, Blagojevic DP, Grubor-Lajsic G, Worland MR, Spasic MB (2007) Antioxidant defense in mitochondria during diapause and postdiapause development of European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hubn.). Arch Insect Biochem Physiol 64:111–119
- Kim I, Lee KS, Hwang JS, Ahn MY, Li J, Sohn HD, Jin BR (2005) Molecular cloning and characterization of a peroxiredoxin gene from the mole cricket, *Gryllotalpa orientalis*. Comp Biochem Physiol B 140:579–587
- Kojic D, Spasojevic I, Mojovic M, Blagojevic D, Worland MR, Grubor-Lajsic G, Spasic MB (2009) Potential role of hydrogen peroxide and melanin in the cold hardiness of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Eur J Entomol 106:451–454
- Kostal V (2006) Eco-physiological phases of insect diapause. J Insect Physiol 52:113–127
- Kostal V, Sula J, Simek P (1998) Physiology of drought tolerance and cold hardiness of the Mediterranean tiger moth *Cymbalophora pudica* during summer diapause. J Insect Physiol 44:165–173
- Kostal V, Tollarova M, Sula J (2004) Adjustments of the enzymatic complement for polyol biosynthesis and accumulation in diapausing cold-acclimated adults of *Pyrrhocoris apterus*. J Insect Physiol 50:303–313
- Krishnan N, Kodrik D (2006) Antioxidant enzymes in *Spodoptera littoralis* (Boisduval): are they enhanced to protect gut tissues during oxidative stress. J Insect Physiol 52:11–20
- Ku C, Chiang F, Hsin C, Yao Y, Sun C (1994) Glutathione transferase isozymes involved in insecticide resistance of diamondback moth larvae. Pestic Biochem Physiol 50:191–197
- Lee K, Iijima-Ando K, Iijima K, Lee W, Lee JH, Yu K, Lee D (2009) JNK/FOXO-mediated neuronal expression of fly homologue of peroxiredoxin II reduces oxidative stress and extends life span. J Biol Chem 284:29454–29461
- MacRae TH (2010) Gene expression, metabolic regulation and stress tolerance during diapause. Cell Mol Life Sci 67:2405–2424
- Meng G, Yao JM, Wang L, Zhao L (2011) Variation in glutathione status associated with induction and initiation of diapause in eggs of the bivoltine strain of the silkworm *Bombyx mori*. Physiol Entomol 36:173–179
- Michaud MR, Denlinger DL (2007) Shifts in the carbohydrate, polyol, and amino acid pools during rapid cold-hardening and diapause-associated cold-hardening in flesh flies (*Sarcophaga crassipalpis*): a metabolomic comparison. J Comp Physiol B 177:753–763
- Pamplona R, Costantini D (2011) Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 301:R843–R863
- Pullin AS, Wolda H (1993) Glycerol and glucose accumulation during diapause in a tropical beetle. Physiol Entomol 18:75–78
- Ragland GJ, Denlinger DL, Hahn DA (2010) Mechanisms of suspended animation are revealed by transcript profiling of diapause in the flesh fly. Proc Natl Acad Sci U S A 107:14909–14914
- Ramos-Vasconcelos GR, Hermes-Lima M (2003) Hypometabolism, antioxidant defenses and free radical metabolism in the pulmonate land snail *Helix aspersa*. J Exp Biol 206:675–685
- Scott JA (1986) The butterflies of North America: a natural history and field guide. University Press, Stanford
- Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. Eur J Biochem 215:213–219
- Sim C, Denlinger DL (2011) Catalase and superoxide dismutase-2 enhance survival and protect ovaries during overwintering diapause in the mosquito *Culex pipiens*. J Insect Physiol 57:628–634
- Sima Y, Yao J, Hou Y, Wang L, Zhao L (2011) Variations of hydrogen peroxide and catalase expression in *Bombyx* eggs during diapause initiation and termination. Arch Insect Biochem Physiol 77:72–80
- Srere PA (1969) Citrate synthase. Methods Enzymol 13:3–11
- Stanic B, Jovanovic-Galovic A, Blagojevic DP, Grubor-Lajsic G, Worland R, Spasic MB (2004) Cold hardiness in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): glycerol content, hexose monophosphate shunt activity, and antioxidative defense system. Eur J Entomol 101:459–466
- Storey KB (2002) Life in the slow lane: molecular mechanisms of estivation. Comp Biochem Physiol A 133:733–754

- Storey KB, Storey JM (1991) Glucose-6-phosphate dehydrogenase in cold hardy insects: kinetic properties, freezing stabilization, and control of hexose monophosphate shunt activity. *Insect Biochem* 21:157–164
- Storey KB, Storey JM (2007) Tribute to P. L. Lutz: putting life on ‘pause’—molecular regulation of hypometabolism. *J Exp Biol* 210:1700–1714
- Zaman K, MacGill RS, Johnson JE, Ahmad S, Pardini RS (1995) An insect model for assessing oxidative stress related to arsenic toxicity. *Arch Insect Biochem Physiol* 29:199–209
- Zhao L, Shi L (2009) Metabolism of hydrogen peroxide in univoltine and polyvoltine strains of silkworm (*Bombyx mori*). *Comp Biochem Physiol B* 152:339–345