

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**O Tamanho de *Crenuchus spilurus* influencia na tolerância e ajustes metabólicos
após exposição à hipóxia?**

Marcos Cunha da Silva

Manaus – AM

2021

Marcos Cunha da Silva

O tamanho de *Crenuchus spilurus* influencia na tolerância e ajustes metabólicos após exposição à hipóxia?

Orientadora: Cristina Motta Bührnheim, Dra.

Coorientadora: Susana Braz-Mota, MSc.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Amazonas, para obtenção do título de Graduação em Licenciatura em Biologia.

Manaus – AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

M321t Silva, Marcos Cunha da
O tamanho de *Crenuchus spilurus* influencia na tolerância e ajustes metabólicos após exposição à hipóxia? / Marcos Cunha da Silva. Manaus : [s.n], 2021.
29 f.: il.; 8 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.

Inclui bibliografia

Orientador: Cristina Motta Bührnheim

Coorientador: Susana Braz-Mota

□1. Hipóxia. 2. peixes de igarapé. 3. ajustes metabólicos. 4. tolerância a hipóxia. I. Cristina Motta Bührnheim (Orient.). II. Susana Braz-Mota (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. O tamanho de *Crenuchus spilurus* influencia na tolerância e ajustes metabólicos após exposição à hipóxia?

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

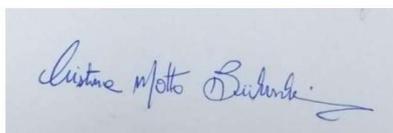
AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador:	10,0
b) 1º avaliador(a):	8,5
c) 2º avaliador(a):	9,0
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	9,2

MÉDIA DA NOTA: 9,2

Manaus, 5 de janeiro de 2021

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA



Orientadora – Dra. Cristina Motta Bührnheim



1º Avaliador – Dr. Edinbergh Caldas de Oliveira



2º Avaliador – Dr. Rafael Lopes e Oliveira

Dedico este trabalho aos meus pais, por não terem medido esforços para que eu pudesse estudar e realizar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sem ele nada seria possível.

À minha família, que me apoiou durante toda a minha vida, me dando forças para prosseguir.

Às minhas orientadoras, Dra. Vera Val pela orientação e incentivo; e em especial a MSc. Susana Braz por ser um exemplo de pesquisadora e de pessoa, esse exemplo de dedicação foi essencial para a conclusão deste trabalho.

À minha orientadora “peixóloga” Dra. Cristina Motta Bührnheim pelos ensinamentos e conselhos durante todo o curso, pelas coletas e por me fazer gostar de peixes.

Ao meu amor, Paula Beatriz, a menina dos meus olhos, coração e alma. Por todo amor, carinho e companheirismo.

Aos meus amigos Antônio Luiz, Gabriel Caldas, Ricardo Cabral e em especial aos meus amigos Leonardo Alho e Hélio Dias, pela presença desde o primeiro dia da faculdade. Pelas conversas, coletas e risadas. Pelo companheirismo porque “quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado, com certeza vai mais longe”.

A toda equipe do LEEM, por me acolher durante a realização deste trabalho.

Ao projeto INCT- ADAPTA, pelo recurso para a elaboração deste trabalho.

À Universidade do Estado do Amazonas e a todos os professores do meu curso pela elevada qualidade do ensino oferecido.

À Coleção Zoológica da UFAM / ICB / Coleção Zoológica Paulo Bührnheim.

“Demore o tempo que for para decidir o que você quer da vida, e depois que decidir não recue ante nenhum pretexto.”

Friedrich Nietzsche

O tamanho de *Crenuchus spilurus* influencia na tolerância e ajustes metabólicos após exposição à hipóxia?

RESUMO

Um dos principais parâmetros que afeta a distribuição dos organismos aquáticos é o oxigênio dissolvido. Nos sistemas aquáticos da Amazônia os peixes encontram regularmente ambientes hipóxicos, tendo, assim, desenvolvido uma série de adaptações para sobreviver nesses ambientes. *Crenuchus spilurus* é uma espécie que ocorre em ambientes com uma ampla faixa de variação de oxigênio, sendo encontrado com maior frequência em locais hipóxicos quando juvenil. Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar a tolerância e os ajustes metabólicos à hipóxia em *C. spilurus* de diferentes tamanhos; adultos e juvenis. Para isso, nós avaliamos a tolerância fisiológica do animal, a qual foi determinada pela medida da concentração de oxigênio em que ocorre perda de equilíbrio (LOE, do inglês Loss of Equilibrium), e também investigamos os ajustes metabólicos, tais como a taxa metabólica (MO_2) e a atividade das enzimas do metabolismo energético e antioxidante dos animais. Nossos resultados de LOE mostram que *C. spilurus* é uma espécie tolerante à hipóxia e que a exposição prévia à hipóxia em ambos os tamanhos aumenta sua tolerância a baixas concentrações de oxigênio. Os resultados aqui apresentados mostram uma regulação metabólica dos animais após a exposição à hipóxia, tal como observado pela diminuição da taxa metabólica. Porém, essa regulação não parece estar relacionada nem às enzimas do metabolismo energético e tampouco ao sistema antioxidante, uma vez que estes parâmetros foram pouco afetados pela hipóxia, provavelmente em resposta a um ajuste adaptativo após os sete dias de exposição. Sugerimos, a partir dos dados de tolerância, que a regulação metabólica após exposição à hipóxia em *C. spilurus* deve estar associada a uma maior eficiência na tomada de oxigênio e entrega para as células, refletindo em uma capacidade mais efetiva na captação de oxigênio pelas brânquias, bem como no transporte desse gás via sistema circulatório.

PALAVRAS CHAVE: Hipóxia, peixes de igarapé, ajustes metabólicos, tolerância a hipóxia.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
EPIÍGRAFE.....	vii
RESUMO.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. MATERIAL E MÉTODOS.	11
2.1 Coleta e aclimatação dos animais.....	11
2.2 Reprodução.....	12
2.3 Delineamento experimental.....	13
2.4 Tolerância fisiológica.....	14
2.4.1 Taxa metabólica.....	14
2.4.2 Perda de equilíbrio (LOE)	15
2.5 Ajustes metabólicos enzimáticos.....	15
2.6 Análise estatística.....	16
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4. CONCLUSÃO.....	24
5. REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

O ambiente aquático está sujeito a diversas variáveis ambientais, tais como pH, temperatura, condutividade e velocidade da água. Um dos principais parâmetros que afeta a distribuição dos peixes é o oxigênio dissolvido na água (JUNK *et al.*, 1983). Em geral, os animais aquáticos que se encontram em ambientes hipóxicos, particularmente na Amazônia, apresentam uma série de adaptações fisiológicas e bioquímicas desenvolvidas durante o processo evolutivo para conseguir sobreviver nestes ambientes. Entre estas adaptações estão, a depressão da taxa metabólica e compensação anaeróbica, sendo estes ajustes importantes na manutenção da demanda energética em baixas concentrações de oxigênio (JUNK *et al.*, 1983; ALMEIDA-VAL *et al.*, 1995; SLOMAN *et al.*, 2006).

Crenuchus spilurus é uma espécie da família Crenuchidae, a qual é representada por exemplares de pequeno porte encontrados normalmente em riachos de água corrente (BUCKUP, 2003). Essa espécie pode ser encontrada tanto no canal dos igarapés, onde a concentração de oxigênio pode chegar a $9,42 \text{ mgO}_2\text{L}^{-1}$ (MENDONÇA, 2002), quanto em poças temporárias, onde o oxigênio dissolvido pode atingir níveis menores a $1 \text{ mg O}_2\text{L}^{-1}$ (COUTO *et al.*, 2015). As poças temporárias servem de abrigo para uma diversidade de espécies, que as usam para alimentação, reprodução, berçário, abrigo em relação ao aumento da descarga dos igarapés e para a fuga de predadores presentes no canal do igarapé (COUTO *et al.*, 2015). Robb e Abrahams (2003), baseando-se na hipótese de que peixes pequenos utilizam ambientes com baixa concentração de oxigênio como uma estratégia de fuga para predadores, verificaram, analisando o tempo de perda de equilíbrio em *Pimephales promelas* (Cyprinidae) e seu principal predador, *Perca flavescens* (Percidae), de diferentes tamanhos, que os *P. promelas* têm maior tolerância à hipóxia que seu predador. Do mesmo modo, analisando os predadores de diferentes tamanhos, os autores relataram que os menores levam mais tempo até a perda do equilíbrio, mostrando que peixes menores são mais tolerantes à hipóxia que peixes grandes e que, portanto, podem habitar esses ambientes com uma concentração de oxigênio muito baixa. Esta espécie teria, portanto, comportamento oposto ao ciclídeo *Astronotus ocellatus*, conhecido como oscar, apaiari ou carauaçu, na qual seus indivíduos aumentam sua resistência à hipóxia na medida que crescem, apresentando-se mais aptos a recrutarem estratégias bioquímicas, fisiológicas e metabólicas para suportar a baixa concentração de oxigênio (ALMEIDA-VAL *et al.*, 2000; SLOMAN *et al.*, 2006).

Até o presente momento, muito se tem questionado como os peixes sobrevivem às oscilações de oxigênio na água e podem sobreviver a baixas e altas concentrações de oxigênio ao longo de suas vidas. *Crenuchus spilurus* está distribuído em um ambiente com uma ampla variação de concentração de oxigênio, flutuando de 0,2 a 8,08 mgO₂.L⁻¹ (PIRES *et al.*, 2016), e os mecanismos bioquímicos e fisiológicos resultantes dos ajustes dessas condições ainda são desconhecidos. Esse aspecto é interessante, pois a variação na concentração de oxigênio pode gerar Espécies Reativas de Oxigênio (ROS, da sigla em inglês *Reactive Oxygen Species*) (COOPER *et al.*, 2002; LEVEELAHTI *et al.*, 2014; JOHANNSSON *et al.*, 2018), as quais podem causar estresse oxidativo em diferentes tecidos, o que resulta na oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e danos no DNA (PELSTER *et al.*, 2018). As ROS são moléculas altamente reativas que incluem o radical superóxido (O₂⁻), formado a partir da dismutação do oxigênio molecular (O₂), e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é um composto intermediário altamente deletério, participando da reação que produz o radical hidroxila (OH), considerado a molécula de ROS mais reativa e danosa em sistemas biológicos (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). As proteções contra as ROS incluem enzimas antioxidantes tais como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), ou mecanismos não enzimáticos como algumas vitaminas. A hipóxia pode induzir o estresse oxidativo, alterando o equilíbrio entre a produção das ROS e a sua eliminação por antioxidantes, produzindo ROS em excesso, o que danifica os componentes celulares e/ou interrompe a sinalização redox (COSTANTINI, 2019).

Considerando que *Crenuchus spilurus* está distribuído em ambientes com ampla faixa de variação de oxigênio e que, geralmente, esta espécie é encontrada na fase juvenil nas poças (Tiago H. Pires, comunicação pessoal), onde a concentração de oxigênio é muito menor que no canal do igarapé, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a tolerância fisiológica e os ajustes metabólicos à hipóxia de *C. spilurus* de diferentes tamanhos. Nós hipotetizamos que: (i) peixes de tamanhos diferentes apresentarão respostas distintas de tolerância fisiológica à hipóxia; e (ii) peixes de tamanhos diferentes manifestarão ajustes metabólicos diferentes a exposição à hipóxia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Coleta e aclimação dos animais

Exemplares de *Crenuchus spilurus* foram capturados nos igarapés da Universidade Federal do Amazonas e transferidos para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, onde passaram por um período de um mês de aclimação na água do INPA, com aeração constante e alimentação diária.



Figura 1. Macho de *Crenuchus spilurus* (Foto: Erik N. Costa Suzuki).

2.2 Reprodução

Os juvenis foram obtidos a partir da reprodução dos indivíduos adultos coletados. Para isso, foram separados oito casais em um esquema de circulação, para a manutenção da qualidade da água. Dentro de cada um dos aquários foi posto um tubo PVC de 20 mm utilizado como abrigo e postura dos ovos durante os eventos de acasalamento (Figura 2). A temperatura da água foi controlada e mantida em 25 °C. Na caixa de circulação (Figura 2) foram adicionadas folhas, como fonte de carbono orgânico dissolvido, para simular o ambiente natural do animal.

Os animais permaneceram nesse ambiente por cerca de três meses, até ocorrer os eventos de reprodução. Após a postura e eclosão dos ovos, e a absorção do vitelo pelos alevinos, os juvenis foram separados dos pais e alimentados diariamente com artêmia salina eclodida. Para a manutenção da qualidade da água e níveis de NaCl, a troca de água ocorreu diariamente logo após a alimentação dos juvenis. Os animais permaneceram nessas condições até alcançarem tamanho adequado para realização do experimento.



Figura 2. Sistema de aquários para a reprodução dos casais adultos de *Crenuchus spilurus*. Oito casais foram mantidos com circulação de água constante e temperatura controlada a 25 °C.

2.3 Delineamento experimental

Grupos de 16 indivíduos adultos ($2,02 \pm 0,11$ g; CP: $4,41 \pm 0,10$ cm; $n= 8$) e 16 juvenis ($0,14 \pm 0,01$ g; CP: $1,76 \pm 0,04$ cm; $n= 8$) de *Crenuchus spilurus* foram individualmente distribuídos em potes de 750 ml perfurados em suas laterais. Estes potes foram mantidos em banho-maria (de forma que todos os indivíduos experimentassem as mesmas condições de oxigênio) em duas caixas maiores com água, sendo oito animais de cada tamanho por caixa ($n= 8$). Nestas condições, os animais de ambas as caixas foram aclimatados com oxigênio constante ($\cong 7$ mgO₂.L⁻¹) durante as 24 h prévias ao início dos experimentos de exposição. Após esse período de aclimação, os animais foram submetidos a um dos dois tratamentos: hipóxia ($0,57 \pm 0,072$ mgO₂.L⁻¹) e normóxia ($7,38 \pm 0,08$ mgO₂.L⁻¹) por sete dias. A concentração de oxigênio foi mensurada através do sistema automatizado DAQ M da Loligo System.

No tratamento de hipóxia, a concentração de oxigênio foi reduzida por meio da injeção de nitrogênio gasoso e controlada de forma automatizada por uma válvula solenoide acoplada ao oxímetro OXI 4 (Figura 3). No tratamento da normóxia foi mantida a concentração de oxigênio da água em que os peixes foram aclimatados inicialmente. Durante sete dias, diariamente, foram mensurados os parâmetros: temperatura da água, oxigênio dissolvido e pH (Tabela 1). Para evitar o acúmulo de

resíduos nitrogenados no sistema, um tanque adicional com água aerada foi mantido para troca diária de 50% da água dos tanques experimentais.

O mesmo procedimento experimental idêntico foi repetido duas vezes para avaliar o efeito da hipóxia sobre os animais. Na primeira série experimental, avaliamos a tolerância fisiológica, por meio da perda de equilíbrio (LOE), e a taxa metabólica dos animais. Na segunda série experimental, procuramos entender os ajustes metabólicos enzimáticos dos animais. Para isso, ao final do período experimental, os animais foram removidos dos aquários, pesados, medidos e eutanasiados. O corpo todo do peixe foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80 °C para posterior análises enzimáticas. O corpo todo dos indivíduos foi macerado e utilizado para medir as enzimas antioxidantes e do metabolismo energético. Em todos os experimentos, os animais não foram alimentados para evitar o gasto energético da digestão.



Figura 3. Demonstração do sistema experimental. Os animais foram submetidos durante 24 h a dois tratamentos: hipóxia ($0,57 \pm 0,072 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) e normóxia ($7,38 \pm 0,08 \text{ mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$). Detalhes para os dois tanques experimentais (normóxia e hipóxia) e para o tanque de troca de água diária. Assim como para o sistema automatizado DAQ M acoplado a válvula solenoide para a conexão automática com o nitrogênio gasoso.

2.4 Tolerância fisiológica

2.4.1 Taxa metabólica

Para cada grupo experimental (normóxia e hipóxia), indivíduos adultos e juvenis ($n = 8$; $N = 32$) foram transferidos individualmente para câmaras de vidro de 70 ml imersas em um tanque em banho-maria com água na concentração de oxigênio

destinada de cada grupo experimental. As taxas de consumo de oxigênio dos indivíduos foram determinadas usando respirometria de fluxo intermitente em câmaras respiratórias acopladas a um sistema automatizado de medição de oxigênio (Oxy-4; Loligo Systems, Viborg, DEN). Uma bomba em interface com um sistema de aquisição de dados DAQ-M (Loligo Systems) controlava o ciclo de medição, com um loop composto por 3 fases: condição de descarga ambiente (180 s), espera (120 s) e medição (300 s). As medições foram coletadas ao longo de 4 h. A taxa metabólica foi calculada como: $\dot{M}O_2 = \Delta O_2 * V_{resp} * B^{-1}$, onde: ΔO_2 é a taxa de variação na concentração de oxigênio ($mg O_2 h^{-1}$), V_{resp} é o volume da câmara de respirometria, e B é a massa do indivíduo (kg).

2.4.2 Perda de equilíbrio (LOE)

Posteriormente às análises de consumo de oxigênio, o oxigênio foi reduzido dentro das câmaras respirométricas até uma concentração de $0,5 mg O_2.L^{-1}$ para as análises de tempo de perda de equilíbrio (LOE) e o tempo em que os animais permaneceram nessa condição foi monitorado até quando observado qualquer sinal de perda de equilíbrio. Nestas condições foram anotados o tempo e a concentração de oxigênio. Sequencialmente, o peixe foi rapidamente removido do tanque experimental e colocado em um tanque bem oxigenado para recuperação.

2.5 Ajustes metabólicos enzimáticos

O corpo todo dos animais armazenados no freezer $-80 ^\circ C$ foi macerado e homogeneizado em tampão fosfato. Com estes homogenados foram realizados ensaios de enzimas antioxidantes, catalase, determinados pela taxa de inibição de H_2O_2 monitorado a 240 nm (BEUTLER, 1975) e glutathione S-transferase (GST) determinada utilizando 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, de acordo com Keen *et al.* (1976), além da mensuração dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) quantificada com base na oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} por hidroperóxidos em meio ácido na presença de xilenol laranja de acordo com Jiang *et al.* (1991). Também foram realizados ensaios de enzimas do metabolismo energético, Lactado Desidrogenase (LDH) e Citrato Sintase (CS) (DRIEDZIC e ALMEIDA-VAL, 1996). A quantificação de proteína foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

2.6 Análise estatística

Os dados estão apresentados como média±SEM (n= 8). Antes dos testes estatísticos comparativos, a distribuição e homogeneidade dos dados foram verificadas. Uma ANOVA de dois fatores foi usada para determinar as diferenças, considerando como fatores: (i) as diferentes concentrações de oxigênio e (ii) estágio de desenvolvimento do peixe (adulto ou juvenil). Quando os dados violaram as premissas da ANOVA, um teste não-paramétrico de Friedman foi aplicado. Para todos os dados foi adotado um nível de significância de 95% ($p>005$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve mortalidade durante o período experimental e as condições da qualidade da água foram as mesmas para os dois tratamentos, exceto quanto à concentração de oxigênio dissolvido na água (Tabela 1).

Tabela 1. Variáveis físicas e químicas da água durante o período experimental.

	Oxigênio dissolvido (mg. l ⁻¹)	Temperatura(°C)	pH
Normóxia	7,38±0,08 ^a	25,88±0,18	4,37±0,18
Hipóxia	0,57±0,07 ^b	25,88±0,18	4,42±0,18

Tolerância fisiológica e taxa metabólica

Crenuchus spilurus adultos e juvenis expressaram respostas diferentes na taxa de consumo de oxigênio, no tempo de perda de equilíbrio (LOE) e na concentração de oxigênio no momento da perda do equilíbrio (LOEcrit). Nossos resultados demonstram que adultos apresentaram menor taxa metabólica em comparação com os juvenis, e que ambos os tamanhos diminuem a taxa de consumo de oxigênio quando exposto a hipóxia (Figura 4). Além disso, peixes adultos e juvenis aclimatados à hipóxia apresentaram maior tempo para o LOE quando comparado com a normóxia de ambos os tamanhos (Figura 5A), também indivíduos adultos suportaram concentrações mais baixas de oxigênio comparado com os juvenis em ambas as concentrações de oxigênio (LOEcrit). Ainda, nossos resultados demonstram que os juvenis suportaram concentrações mais baixas após a exposição à hipóxia (Figura 5B), sugerindo capacidade de aclimação e plasticidade fenotípica para lidar com a diminuição da concentração de oxigênio nesta espécie em ambos os tamanhos.

No presente trabalho, a depressão da taxa metabólica ocorreu em ambos os tamanhos após a exposição à hipóxia. A diminuição da taxa de consumo de oxigênio para sustentar o metabolismo em repouso é uma resposta comum para animais aclimatados à hipóxia (BOROWIEC *et al.*, 2015, 2018). Essa resposta geralmente reflete o impacto combinado de diversas alterações fisiológicas, tais como o aumento na captação de oxigênio branquial, ajustes no metabolismo anaeróbico e redução da demanda de ATP celular. Nossos resultados mostram que o mecanismo de redução da taxa metabólica em hipóxia ocorreu em ambos os tamanhos de *Crenuchus spilurus* aqui estudados, mostrando que o mecanismo de depressão metabólica em hipóxia é o mesmo para ambos os tamanhos. Entretanto, o consumo de oxigênio desses animais é diferente entre os tamanhos, o que já era esperado, uma vez que animais maiores tendem a ter taxas metabólicas específicas menores.

O LOE é uma medida utilizada para inferir a tolerância fisiológica de peixes a estressores, como temperatura ou oxigênio, por exemplo (BOROWIEC *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2019). Como esperado, no presente trabalho, houve um aumento no tempo de perda de equilíbrio nos animais, tanto adultos quanto juvenis, previamente aclimatados à hipóxia (Figura 5A), indicando que a aclimação a baixas concentrações de oxigênio aumenta a tolerância deste animal à hipóxia. Borowiec *et al.* (2015) mostraram resultados semelhantes analisando estratégias fisiológicas de *Fundulus heteroclitus* (Fundulidae), onde a concentração de oxigênio no momento da perda do equilíbrio de animais expostos à hipóxia severa foi reduzida em animais aclimatados à hipóxia por sete dias, indicando uma maior tolerância à falta de oxigênio nos animais deste tratamento. Muitos autores associam essa maior tolerância com reduções no comprimento do filamento branquial, melhora na capacidade oxidativa e maior eficiência na captação do oxigênio por esses animais (BOROWIEC *et al.*, 2015; BOROWIEC *et al.*, 2018).

Além disso, animais adultos foram mais resistentes quando comparados aos juvenis, uma vez que toleraram mais tempo em concentrações menores até o momento da perda do equilíbrio (LOEcrit) para ambos os tratamentos (Figura 5B). Este resultado pode estar relacionado a uma maior eficiência de *Crenuchus spilurus* adultos, os quais apresentaram maiores níveis enzimáticos de LDH em comparação aos juvenis (Figura 6). Resultados semelhantes foram encontrados no fundulídeo *Fundulus heteroclitus* expostos à hipóxia, em que houve um aumento da LDH no fígado nos animais aclimatados a sete dias de hipóxia e redução na concentração de oxigênio no momento

da perda do equilíbrio (BOROWIEC *et al*, 2015). Além disso, Almeida-Val *et.al.* (2000) também avaliaram as mudanças na taxa metabólica e atividade da LDH em peixes de diferentes tamanhos da espécie amazônica de ciclídeo *Astronotus ocellatus*, e concluíram que a sobrevivência à hipóxia aumenta devido à combinação dos efeitos da supressão das taxas metabólicas com o aumento do poder anaeróbico à medida que os peixes crescem.

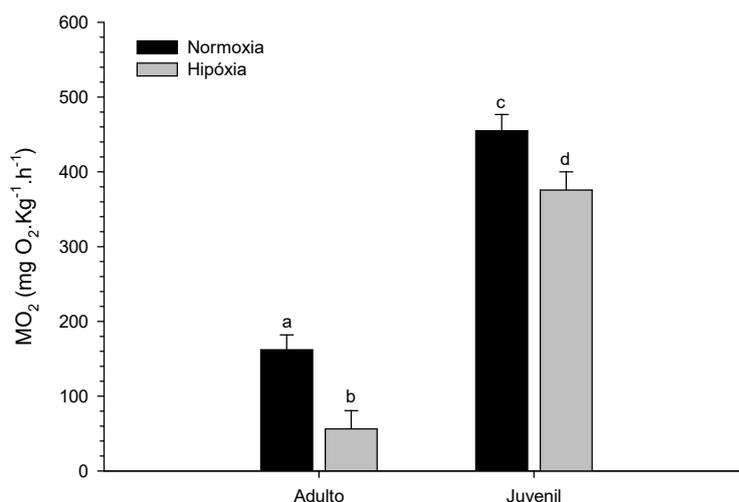


Figura 4. Taxa de consumo de oxigênio de *Crenuchus spilurus* adultos e juvenis após sete dias de exposição aos tratamentos de hipóxia e normóxia. Dados como média±SEM. Letras diferentes indicam significância estatística entre os tratamentos.

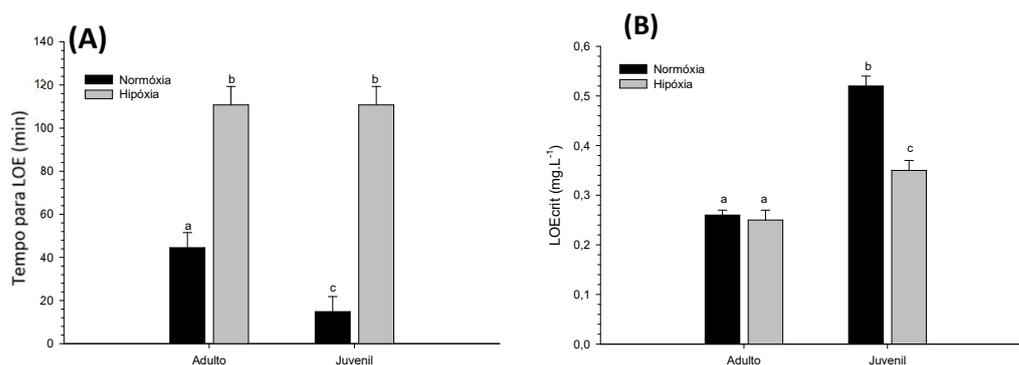


Figura 5. Tempo até a perda do equilíbrio (A) e concentração de oxigênio no momento da perda do equilíbrio (B) de *Crenuchus spilurus* adultos e juvenis após sete dias de exposição aos tratamentos de hipóxia e normóxia. Dados como média±SEM. Letras diferentes indicam significância estatística entre os tratamentos.

Ao observar os resultados de taxa metabólica e do LOEcrit, é notável uma tendência de resposta entre os tratamentos testados, indicando um ajuste metabólico desses animais ao desafio hipóxico. Geralmente, um animal com LOEcrit mais baixo é capaz de sustentar uma taxa metabólica de rotina para uma menor tensão de oxigênio (CHAPMAN *et al.*, 2002; BARNES *et al.*, 2011), o que foi possível observar na taxa de consumo de oxigênio de *Crenuchus spilurus*, onde animais adultos apresentaram uma menor LOEcrit e uma redução na taxa de consumo de oxigênio quando comparado com os juvenis. As melhorias observadas na tolerância à hipóxia associadas à aclimatação à hipóxia provavelmente ajudarão essa espécie, *C. Spilurus*, a colonizar ambientes hipóxicos na natureza.

Ajustes metabólicos enzimáticos

O metabolismo energético constitui no catabolismo de substratos energéticos (carboidratos, lipídeos e proteínas) por meio de diversas reações enzimáticas para geração de energia para os organismos vivos. Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos de hipóxia em relação à normóxia para a atividade da LDH, porém houve diferença entre os tamanhos (Figura 6). A LDH é uma enzima indicadora do metabolismo anaeróbico. Dessa forma, era esperado que sua atividade fosse aumentada à medida que o oxigênio diminuísse. De modo geral, os organismos empregam duas estratégias metabólicas quando expostos a condições hipóxicas: redução na taxa metabólica e mudança nas contribuições aeróbicas e anaeróbicas para o metabolismo total (HOCHACHKA *et al.*, 1996), o que não foi observado no presente estudo. Esse resultado indica que essa enzima não altera seu padrão de atividade para esta espécie quando exposta aos tratamentos aqui estudados, o que pode ocorrer em resposta à grande plasticidade dessa espécie por viver em ambientes com uma ampla variação de oxigênio. Porém, foi observado que houve diferença entre adultos e juvenis na atividade da LDH, indicando um aumento do potencial anaeróbico conforme o animal cresce. Almeida-Val *et al* (2000) analisando as atividades de enzimas do metabolismo energético em *Astronotus ocellatus*, verificou que existe uma correlação positiva entre a atividade das enzimas do metabolismo energético com a massa corporal do animal, indicando uma maior capacidade anaeróbica por grama de tecido à medida que o indivíduo se torna adulto, o que reflete na biologia do animal que enquanto adultos são encontrados em águas hipóxicas e, enquanto juvenis, podem ser encontrados em camadas superficiais do

corpo d'água, onde a disponibilidade de oxigênio é maior, sugerindo uma capacidade reduzida de tolerar hipóxia entre os jovens (ALMEIDA-VAL, *et al*, 2000). Contudo, os juvenis de *Crenuchus spilurus* são encontrados com maior frequência em ambientes de poças, onde a concentração do oxigênio é inferior ao canal principal. A busca por um ambiente com menor concentração de oxigênio pode estar relacionada à procura de um ambiente mais seguro, com maior disponibilidade de abrigo contra o aumento da descarga em relação ao canal principal ou abrigo contra predadores (COUTO *et al*, 2015). Sloman (2006), ao estabelecer um gradiente de oxigênio em um aquário grande e colocar plantas flutuantes disponíveis no lado mais hipóxico, verificou que *Astronotus ocellatus* jovens optaram por permanecer sob o abrigo por praticamente todo o período experimental, aceitando o custo fisiológico associado à exposição à hipóxia, em troca de um ambiente mais seguro.

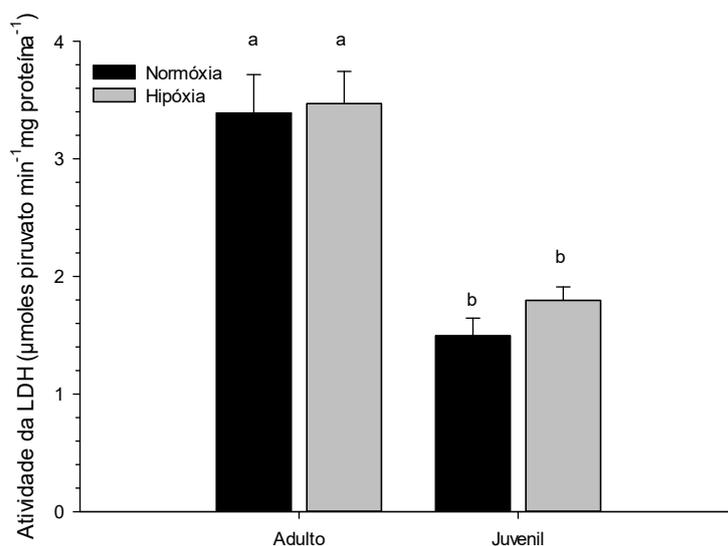


Figura 6. Atividade da LDH no corpo inteiro de *Crenuchus spilurus* adultos e juvenis após sete dias de exposição aos tratamentos de hipóxia e normóxia. Os dados são apresentados como média±SEM. Letras diferentes indicam significância estatística entre os tratamentos.

Por outro lado, uma importante enzima indicadora do metabolismo aeróbico é a citrato sintase, a qual participa da primeira etapa do ciclo de Krebs, tendo maior atividade quando o organismo necessita de mais energia. Como um indicador do metabolismo aeróbico, era esperado que a atividade da CS diminuísse à medida que a concentração de oxigênio diminuísse. Em *Leiostomus xanthurus* (Sciaenidae) expostos

à hipóxia, houve uma redução na atividade da CS no tecido muscular em relação ao controle indicando que, conforme o oxigênio é limitado, há uma redução no uso das vias aeróbicas e um aumento das vias glicolíticas (COOPER *et al.*, 2002). No presente estudo não houve diferença na atividade da CS na espécie estudada (Figura 7), o que corrobora os dados da LDH (Figura 6), indicando que o metabolismo aeróbico continua com seu funcionamento normal e não há ativação das vias anaeróbicas para os tratamentos aqui analisados. Esses resultados sugerem uma medida adaptativa do animal para manter as atividades dessas enzimas, porém alterando as respostas fisiológicas de outros componentes celulares.

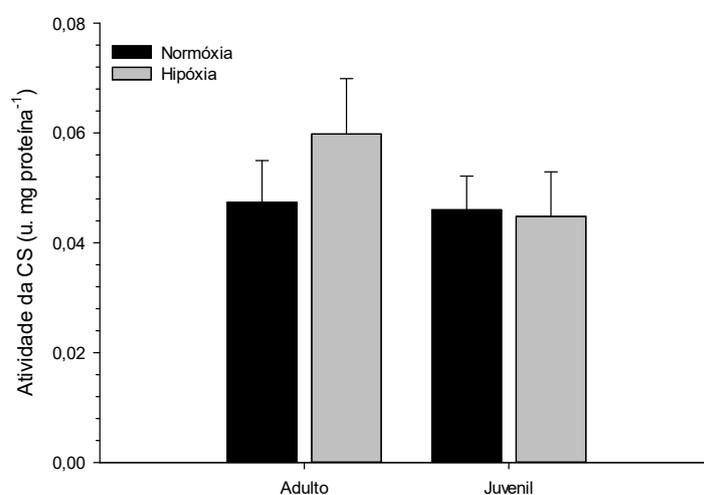


Figura 7. Atividade da CS no corpo inteiro de *Crenuchus spilurus* adultos e juvenis após sete dias de exposição aos tratamentos de hipóxia e normóxia. Dados como média±SEM. Letras diferentes indicam significância estatística entre os tratamentos.

Assim como no funcionamento do metabolismo energético, os resultados demonstraram alterações na enzima do estresse oxidativo, quando comparados os adultos com os juvenis. A catalase mostrou diferença significativa, entre os indivíduos adultos e juvenis, porém não houve diferença entre os tratamentos de hipóxia e normóxia (Figura 8). A GST apresentou diferença estatística entre os indivíduos adultos e juvenis, no entanto não houve diferença significativa entre os tratamentos de hipóxia em relação à normóxia (Figura 9). Os níveis de peroxidação lipídica não apresentaram diferença estatística (Figura 10).

A catalase é uma enzima que catalisa a redução da ROS H_2O_2 em H_2O e O_2 e é considerada uma enzima importante no sistema de defesa antioxidante (WINSTON e DI GIULIO, 1991), atuando quando há altas concentrações de H_2O_2 . No presente trabalho, houve diferença significativa entre peixes adultos e juvenis, porém não houve diferença entre hipóxia em relação à normóxia (Figura 8). Dado seu papel no sistema antioxidante, tal resultado mostra que a baixa concentração de oxigênio não induz a geração de ROS nessa espécie após a exposição à hipóxia durante sete dias. Além disso, é possível observar que os juvenis têm um sistema antioxidante muito mais ativo que os adultos (Figura 8), o que pode ser importante para essa espécie lidar com as condições mais hipóxicas encontradas nas poças laterais dos igarapés onde habita. De fato, uma maior atividade dessa enzima pode refletir uma resposta adaptativa para os juvenis que vivem nas poças onde a concentração de oxigênio é baixa, precisando recrutar mecanismos antioxidantes potencializados para lidar com os efeitos deletérios da hipóxia.

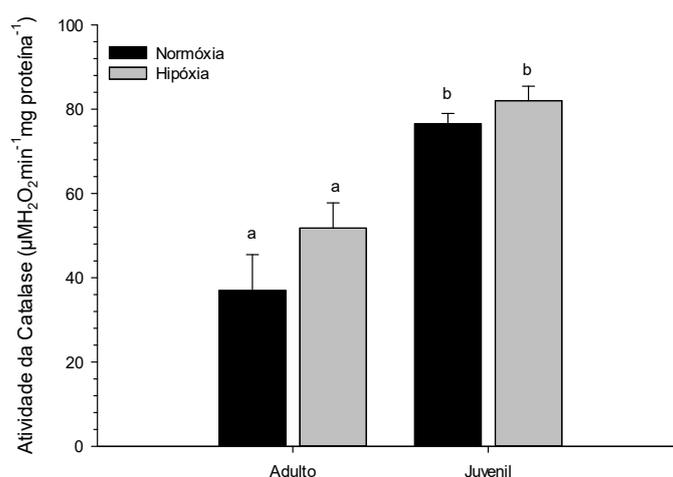


Figura 8. Atividade da catalase no corpo inteiro de *Crenuchus spilurus* adultos e juvenis após sete dias de exposição aos tratamentos de hipóxia e normóxia. Dados como média \pm SEM. Letras diferentes indicam significância estatística entre os tratamentos.

A GST é uma enzima envolvida na desintoxicação de muitos xenobióticos e que desempenha um papel importante na proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo (FOURNIER *et al.*, 1992). Apesar da GST não atuar diretamente sobre os radicais livres, ela metaboliza uma variedade de substratos formando compostos solúveis em água, amenizando sua toxicidade. Lushchak *et al.* (2005), ao expor o

ciprinídeo *Carassius auratus*, o peixe-dourado, a altas concentrações de oxigênio, verificou uma forte correlação entre os produtos da peroxidação lipídica e a atividade de algumas enzimas, tendo uma correlação inversa dos níveis de TBARS (um subproduto da peroxidação lipídica) com as atividades da GST no fígado dessa espécie, indicando que um aumento na atividade da GST pode ser necessário para reduzir o conteúdo dos produtos finais da peroxidação lipídica. No presente trabalho, a GST aumentou sua atividade nos adultos em comparação aos juvenis. No entanto, não apresentou diferença estatística entre o tratamento de hipóxia em relação à normóxia (Figura 9). Esse resultado indica que essa enzima não altera seu padrão de atividade para esta espécie quando exposta aos tratamentos aqui estudados, o que pode ser devido ao não requerimento de um sistema de biotransformação, tendo em vista o não aumento nos níveis de peroxidação lipídica entre os tratamentos (Figura 10). Além disso, um maior conteúdo de GST nos animais maiores, assim como também observado para a LDH, em comparação aos animais menores, nos fornece um bom indicativo de plasticidade fenotípica, tendo em vista a capacidade do animal em aumentar seus níveis enzimáticos ao longo de sua vida.

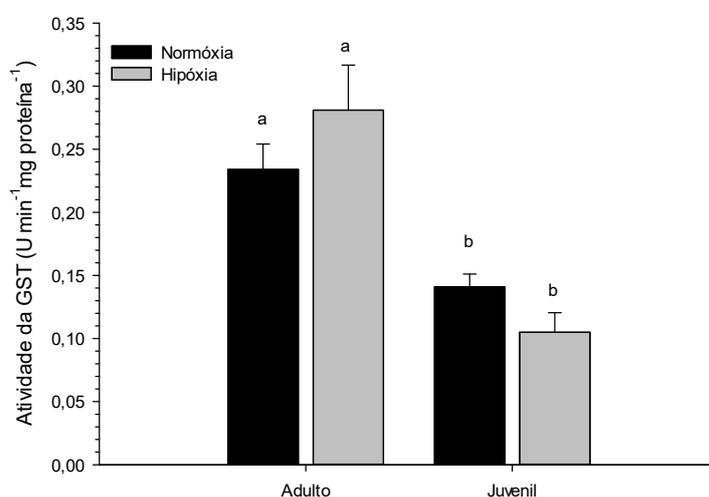


Figura 9. Atividade da GST no corpo inteiro de *Crenuchus spilurus* adultos e juvenis após sete dias de exposição aos tratamentos de hipóxia e normóxia. Dados como média±SEM. Letras diferentes indicam significância estatística entre os tratamentos.

Uma medida indireta para avaliarmos a ocorrência de estresse oxidativo é o conteúdo da peroxidação lipídica (LPO). A LPO é um processo que resulta em danos oxidativos nos lipídeos, incluindo as membranas celulares, os quais são causados pelos radicais livres de oxigênio. Dessa forma, o aumento nos níveis de LPO são indicadores de estresse oxidativo, o qual pode ocorrer em resposta ao aumento de ROS. No presente trabalho não houve diferença estatística entre adultos e juvenis, nem entre os tratamentos de hipóxia em relação a normóxia (Figura 10), o que confirma a não ativação de um sistema antioxidante nos animais expostos à hipóxia (Figuras 8 e 9). Esses resultados sugerem que esses animais são altamente adaptáveis quanto ao seu sistema antioxidante, podendo ter remodelado suas atividades enzimáticas após sete dias de exposição à hipóxia, resultado este condizente com os resultados obtidos com as medidas de ajustes metabólicos e na alteração das taxas metabólicas e LOE.

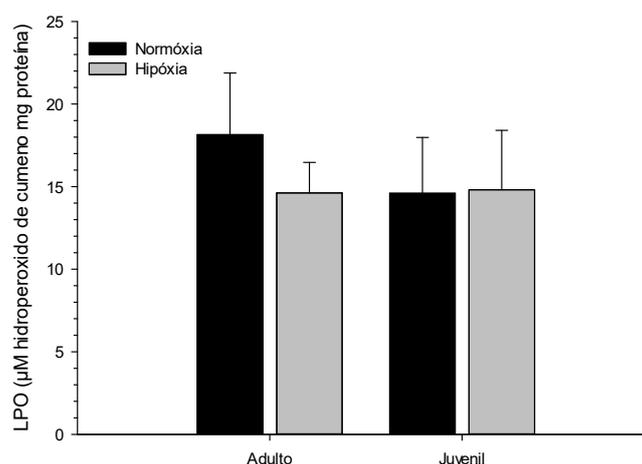


Figura 10. Níveis de LPO no corpo inteiro de *Crenuchus spilurus* adultos e juvenis após sete dias de exposição aos tratamentos de hipóxia e normóxia. Dados como média±SEM. Letras diferentes indicam significância estatística entre os tratamentos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,005$).

4. CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que *Crenuchus spilurus* é uma espécie altamente tolerante à hipóxia e que a exposição prévia a hipóxia em ambos os tamanhos aumenta sua tolerância a baixos teores de oxigênio dissolvido na água. Isso indica que esta espécie possui uma maior adaptação a ambientes com baixa concentração de oxigênio quando previamente aclimatado a eles. Além disso, indivíduos adultos foram mais tolerantes a baixas concentrações de oxigênio do que os

juvenis, o que pode estar relacionado a maior concentração de LDH e capacidade antioxidante para lidar com as ROS, devido ao maior nível da atividade da GST observado no adulto.

Portanto, nossos resultados demonstram importantes diferenças intraespecíficas ao longo do desenvolvimento de *Crenuchus sipulurus*, uma vez que os adultos apresentam maior tolerância à hipóxia, menor LOEcrit e tempo de LOE. Essa plasticidade fenotípica ao longo do desenvolvimento pode estar diretamente relacionada com a capacidade de modulação do metabolismo como uma maior taxa de depressão metabólica, assim como níveis aumentados de LDH e GST em relação ao juvenil.

Os resultados aqui apresentados mostram uma regulação metabólica dos animais após a exposição à hipóxia, observada pela depressão da taxa metabólica. Porém, essa regulação não parece estar relacionada nem às enzimas do metabolismo energético e nem ao sistema antioxidante, uma vez que estes parâmetros foram pouco afetados, provavelmente em resposta a um ajuste adaptativo após os sete dias de exposição. Após esses estudos, nos quais nossos resultados sugerem que a regulação à hipóxia em *Crenuchus spilurus* pode estar associada a diferentes fatores fisiológicos, os quais podem estar relacionados a uma maior eficiência na tomada de oxigênio pelas brânquias e uma maior capacidade de transporte desse gás pelo sangue. Mais estudos são necessários para a compreensão das estratégias adaptativas desta espécie para tolerar hipóxia e apresentar tal plasticidade fenotípica. Esses resultados nos motivam a continuar investigando o efeito da hipóxia sobre as adaptações fisiológicas nesta espécie a fim de entender os mecanismos que levam a um aumento da tolerância ao hipóxia ao longo do desenvolvimento ontogenético.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA-VAL, V.M.F. VAL, A.L. WALKER, I. **Respiratory Metabolism**. Pp. 137-181. In: VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Fishes of the Amazon and their Environment: Physiological and Biochemical Aspects**. Manaus: Springer, 1995.

ALMEIDA-VAL, V.M.F., VAL, A.L., DUNCAN, W.P., SOUZA, F.C.A., PAULA-SILVA, M.N., LAND, S. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, vol. 125, p. 219–226, 2000.

BARNES, R.; KING H.; CARTER, C.G. Hypoxia tolerance and oxygen regulation in Atlantic salmon, *Salmo salar* from a Tasmanian population. **Aquaculture**, vol. 318, p.397-401, 2011.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 2a. ed. New York: Grune & Stratton, 1975.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976..

BOROWIEC, B.G.; DARCY, K.L.; GILLETTE, D.M.; SCOTT, G.R. Distinct physiological strategies are used to cope with constant hypoxia and intermittent hypoxia in killifish (*Fundulus heteroclitus*). **The Journal of Experimental Biology**, vol. 218: p.1198-1211, 2015.

BOROWIEC, B. G., MCCLELLAND, G. B., REES, B. B.; SCOTT, G. R. Distinct metabolic adjustments arise from acclimation to constant hypoxia and intermittent hypoxia in estuarine killifish (*Fundulus heteroclitus*). **The Journal of Experimental Biology**, vol. 221, jeb190900, 2019.

BUCKUP, P.A. Family Crenuchidae (South American darters). Pp. 87-95. In: Reis, R. E., S. O. Kullander; C. J. Ferraris Jr. (Eds.). **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, p. 729, 2003.

CAMPOS, D.F.; BRAZ-MOTA, S.; VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. **Ecological Indicators**. vol. 101, p. 533-540, 2019.

CHAPMAN, L.J.; CHAPMAN, C.A.; NORDLIE, F.G.; ROSENBERGER, A.E. Physiological refugia: swamps, hypoxia tolerance and maintenance of fish diversity in the Lake Victoria region. **Comparative Biochemistry and Physiology**. Part A vol. 133, p. 421–437, 2002.

COOPER, R.U.; CLOUGH, L.M.; FARWELL M.A.; WEST, T.L. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 2002, 279:1-20.

COSTANTINI, D. Understanding diversity in oxidative status and oxidative stress: the opportunities and challenges ahead. **The Journal of Experimental Biology**. vol. 222, jeb194688, 2019.

COUTO, T. B. d'A., ESPÍRITO-SANTO, H.M.V., LEITÃO, R.P., BASTOS, D.A., DIAS, M.S., ZUANON, J. Os peixes e as poças: o uso de áreas marginais alagáveis por peixes de igarapés amazônicos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia**. n. 116, p.31-40, 2015.

DRIEDZIC, W. R.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and the fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). **Journal of Experimental Zoology**. vol. 274, p. 327–333,1996.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. 43(1):61-8, 1997.

FOURNIER, D., BRIDE, J.M., POIRIE, M., BERGE, J.B., PLAPP, F.W., Insect glutathione s-transferases: biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides. **Journal of Biological Chemistry**. vol. 267, p. 1840-1845,1992.

HOCHACHKA, P.W., BUCK, L.T., DOLL, C.J., LAND, S.C. Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/ metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. **Proceedings of National Academy of Sciences**. vol. 93 p. 9493 – 9498, 1996.

JIANG, Z.Y., WOOLLARD, A.C.S., WOLFF, S.P., Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, vol. 26, n. 10, p. 853–856, 1991.

JOHANNSSON, O.E., GIACOMIN, M., SADAUSKAS-HENRIQUE, H., CAMPOS, D., BRAZ-MOTA, S., HEINRICHS-CALDAS, W., BAPTISTA, R., WOOD, C.M., ALMEIDA-VAL, V.M.F., VAL, A.L. Does the rate of re-oxygenation after hypoxia modify the oxidative stress response in *Cyphocharax abramoides* (Kner 1858), a characid fish of the Rio Negro? **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 22, p. 53-67, 2018.

JUNK, W.J., SOARES, G.M., CARVALHO, F.M. Distribution of fish species in a lake of the Amazon River floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. **Amazoniana**. vol. 4, p.39-431, 1983.

KEEN, J. H., HABIG, H., JAKOBY, W.B., 1976. Mechanism for the several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal of Biological Chemistry** 251(20):6183-8, 1976

LEVEELAHTI, L.; RYTKONEN, K.T.; RENSHAW, G.M.; NIKINMAA, M. Revisiting redox-active antioxidant defenses in response to hypoxic challenge in both hypoxia-tolerant and hypoxiasensitive fish species. **Fish Physiology and Biochemistry**, vol. 40, p183–191, 2014.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V.; HUSAK, V.V.; LUZHNA, L.I.; LUSHCHAK, O.V.; STOREY, K.B. 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. vol. 37, p.1670–1680, 2005.

MENDONÇA, F.P., **Ictiofauna de igarapés de terra firme: estrutura das comunidades de duas bacias hidrográficas, Reserva Florestal Adolfo Ducke, Amazônia Central**. Dissertação de mestrado (Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais). Manaus: INPA/UFAM, 2002.

PELSTER, B.; WOOD, C. M.; JUNG, E.; VAL, A. L. Air-breathing behavior, oxygen concentrations, and ROS defense in the swimbladders of two erythrinid fish, the facultative air-breathing jeju, and the non-air-breathing traira during normoxia, hypoxia and hyperoxia. **Journal of Comparative Physiology**. 188(3):437-449, 2018

PIRES, T. H. S., FARAGO T. B., CAMPOS, D.F., CARDOSO, G. M. ZUANON, J. Traits of a lineage with extraordinary geographical range: ecology, behavior and life-history of the sailfin tetra *Crenuchus spilurus*. **Environmental Biology of Fishes**. 2016. 99:925-937

ROBB, T., ABRAHAMS, M.V. Variation in tolerance to hypoxia in a predator and prey species: an ecological advantage of being small? **Journal of Fish Biology**. 62:1067–1081, 2003

SLOMAN, K.A., WOOD, C.M., SCOTT, G.R., WOOD, S., KAJIMURA, M., JOHANNSSON, O.E., ALMEIDA-VAL, V.M.F., VAL, A.L. Tribute to R. G.

Boutilier: the effect of size on the physiological and behavioural responses of oscar, *Astronotus ocellatus*, to hypoxia. **The Journal of Experimental Biology**, vol. 209, p. 1197-1205, 2006.

WINSTON, G.W., DI GIULIO, R.T., 1991. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism. **Aquatic Toxicology**., vol. 24, p. 143–152,1991.