

Universidade do Estado do Amazonas

Carlos Eduardo da Silva Sanches

Efeito sinérgico da aclimação térmica e hipóxia sobre as defesas antioxidantes no tambaqui (*Colossoma macropomum*)

Manaus/Amazonas
2019

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS - UEA
ESCOLA NORMAL SUPERIOR- ENS
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

CARLOS EDUARDO DA SILVA SANCHES

Efeito sinérgico da aclimação térmica e hipóxia sobre as defesas antioxidantes no tabaqui (*Colossoma macropomum*)

Trabalho de conclusão de curso, apresentado a Universidade do estado do Amazonas - UEA, como parte das exigências para a obtenção do título de licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Raimundo Souza Lima Júnior
Co-orientadora: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Manaus/AM
2019

Carlos Eduardo da Silva Sanches

Efeito sinérgico da aclimação térmica e hipóxia sobre as defesas antioxidantes no tabaqui (*Colossoma macropomum*)

Manaus, ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. (Nome do orientador)
Afiliações

Prof. (Nome do professor avaliador)
Afiliações

Prof. (Nome do professor avaliador) Afiliações

S211e Sanches, Carlos Eduardo da Silva

Efeito sinérgico da aclimação térmica e hipóxia sobre as defesas antioxidantes no tabaqui (*Colossoma macropomum*) / Carlos Eduardo da Silva Sanches.

Manaus : [s.n], 2019.

25 f.: il.; 30 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura

- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

Inclui bibliografia

Orientador: Raimundo Souza Lima Júnior

Coorientador: Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

1. Tabaqui. 2. Hipóxia. 3. Estresse oxidativo. 4. Genotoxicidade. I. Raimundo Souza Lima Júnior (Orient.). II. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Efeito sinérgico da aclimação térmica e hipóxia sobre as defesas antioxidantes no tabaqui (*Colossoma macropomum*)

Resumo

Considerando o iminente aumento da temperatura ambiental, é de suma importância verificar como espécies de peixes amazônicos de grande valor econômico, como o tambaqui, responderão as mudanças climáticas. Para tal, a avaliação da atividade enzimática antioxidante bem como dos danos oxidativos, permite uma maior compreensão das adaptações que os peixes desenvolvem para sobreviver às variações de parâmetros físico-químicos em seus ambientes. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade das enzimas Glutathione S-transferase (GST) e Catalase (CAT), os níveis de lipoperoxidação (LPO) e o efeito genotóxico da exposição a variações na temperatura e na concentração de oxigênio no tambaqui. Um total de 64 juvenis de tambaqui foram distribuído em 16 tanques experimentais, onde 8 tanques foram mantidos a 26 °C e os 8 tanques restantes a 32 °C, por 28 dias. Após o período de aclimatação térmica, os peixes foram submetidos a hipóxia. Para tanto, cada animal foi colocado numa câmara de respirometria e o oxigênio foi mantido a 1,5 mgO₂ /L por 8 horas. Após esse tempo, foram coletadas amostras de sangue para os ensaios de ANE (anormalidade nucleares eritrocíticas) e cometa. Em seguida, os peixes foram eutanasiados e foram coletadas amostras de fígado, músculo branco e brânquia para análises enzimáticas e de lipoperoxidação (LPO). Nas brânquias, não houve mudança na atividade enzimática em nenhum dos tratamentos. Para o fígado, a hipóxia induziu alterações na atividade da CAT. No músculo, foi possível observar resultados significativos tanto na atividade da GST quanto na LPO. Em relação ao ensaio ANE, foi possível verificar a influência da concentração de oxigênio, com aumento na frequência de anormalidades. Resultados semelhantes foram observados no ensaio cometa, onde o Índice de Danos Genéticos (IDG) também foi maior em animais expostos a hipóxia. Apesar dos resultados mostrarem que o tambaqui pode ativar as defesas antioxidantes, como observado na atividade da CAT a exposição a hipóxia induz danos oxidativo, apresentando efeito genotóxico.

Palavras-chave: Tambaqui, Hipóxia, Estresse oxidativo, Genotoxicidade

Abstract

Considering the imminent increase in environmental temperature, it is extremely important to see how Amazonian fish species of great economic value, such as tambaqui, will respond to climate change. To this end, the evaluation of antioxidant enzymatic activity allows a better understanding of the adaptations that fish develop to survive the variations of physicochemical parameters in their environments. To this end, the objective of the present study was to evaluate the activity of the enzymes Glutathione S-transferase (GST), Catalase (CAT), as well as the lipoperoxidation levels (LPO) and the genotoxic effect of exposure to temperature variations and the concentration of oxygen in the tambaqui. A total of 72 tambaqui juveniles were distributed in 18 experimental tanks, where 9 tanks were kept at 26 ° C and the remaining 9 tanks at 32 ° C for 28 days. After the thermal acclimatization period, the fish underwent hypoxia. Thereafter, each animal was placed in a respirometry chamber and oxygen was kept at 1.5 mgO₂ / L for 8 hours. After this time, the fish were euthanized and liver, muscle and gill samples were collected for enzymatic analyzes and blood samples for the ANE (erythrocyte nuclear anomalies) and comet assays. In the gills, none of the enzymes showed statistically significant differences. In the liver, there was significant difference only in relation to CAT. In muscle, it was possible to observe significant results in both GST and LPO.

Regarding the ANE test, it was possible to verify the influence of oxygen concentration, where animals exposed to hypoxia at 26 ° C and 32 ° C had a higher frequency of abnormalities. Similar results were observed in the comet assay, where the Genetic Damage Index (GDI) was also higher in animals exposed to hypoxia, both at 26 ° C and 32 ° C. Although the results show that tambaqui has some resistance to oxidative stress related damage, the genotoxic effect of the analyzed factors is apparent.

Palavras-chave: Tambaqui, Hypoxia, Oxidative stress, Genotoxicity

SUMÁRIO

1.	Introdução	7
2.	Objetivos	9
3.	Material e Metodos.....	11
4.	Resultados e Discussão.....	14
5.	Conclusão.....	20
6.	Referencias.....	21

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o 5º Relatório do IPCC (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas), publicado em 2014, está previsto um aumento na temperatura do planeta entre 1,8 e 6 °C (IPCC 2014), e de acordo com Esteves (2011), a temperatura é um fator que pode favorecer uma diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido no ambiente aquático. Diversas espécies de peixes amazônicos apresentam certa plasticidade a mudanças na temperatura e concentração de oxigênio na água graças a um conjunto de adaptações biológicas que ocorrem desde o nível molecular até populacional e de comunidade (Val e Almeida-Val, 1995).

Tanto a hipóxia quanto a variação de temperatura são fatores físico-químicos que podem induzir a geração das Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e consequente ocorrência do estresse oxidativo. As EROS são moléculas instáveis, pois possuem elétrons despareados, podendo reagir com as macromoléculas biológicas (Van der Oost et al., 2003). Mudanças bruscas na temperatura ambiental além de ocasionar o aparecimento de EROS, pode prejudicar a habilidade do organismo de ativar suas defesas antioxidantes (Ahmed, 2005). A eliminação de EROS é garantido pela ativação das defesas antioxidantes, que atuam na sua eliminação (Van der Oost et al., 2003).

Silva e colaboradores (2019) utilizando tabaquis para testar a genotoxicidade do pesticida Roundup® em situação de hipóxia, verificaram que as enzimas antioxidantes (GST e CAT) foram eficazes na redução de estresse oxidativo e altos níveis de peroxidação lipídica (LPO). A glutathione S-transferase (GST), como observado por Rinaldi e colaboradores (2002), atua como catalizador da ligação da glutathione (GSH) com agentes xenobióticos gerados devido ao estresse oxidativo, e sua presença pode servir de biomarcador para indicar a eliminação desses agentes do organismo.

O desequilíbrio entre a geração de EROS e uma defesa antioxidante ineficiente pode resultar na ocorrência de danos oxidativos às macromoléculas biológicas, como DNA, proteínas e lipídeos (Silva et al. 2003). Os danos no DNA podem ser detectados por meio de técnicas como o Ensaio Cometa e Anormalidades Nucleares Eritrocíticas (ANE), como demonstrado por Araújo e colaboradores (2011). A exposição de juvenis de tambaqui a variação de temperatura entre 28 e 36 °C resultou em danos nos eritrócitos, sendo observado após 24 horas de exposição a 36 °C, uma frequência de 32% de danos no DNA dos eritrócitos (Araújo, 2011). Além dos danos no DNA, as ERRO podem reagir com lipídios, resultando na lipoperoxidação (Silva et al, 2019). Danos oxidativos em peixes expostos a baixas concentrações de oxigênio também tem sido demonstrado para as espécies amazônicas (Silva et al., 2019; Souza et al., 2019).

Para a Amazônia, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie conhecidamente tolerante a mudanças em seu ambiente, com a habilidade de se adaptar por meio de ajustes comportamentais, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos (Rantin e Kalinin, 1996). Quando ocorre uma redução de oxigênio no ambiente, a espécie apresenta uma mudança comportamental que consiste no deslocamento para a camada mais superficial da água para uma melhor captação de água rica em oxigênio utilizando a Respiração de Superfície Aquática (RSA) (Verheyen et al. 1994; Val e Almeida-Val, 1995). Além disso, em situação de hipóxia, o tambaqui forma um edema labial que funciona como um órgão facilitador para captação da água durante a RSA, melhorando o fluxo hidrodinâmico da água em direção as brânquias (Revisto em Almeida-Val e Farias, 1996). Todas essas características tornam o tambaqui uma espécie modelo para estudos sobre as mudanças nas características físico-químicas dos ambientes aquáticos amazônicos.

OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito sinérgico da aclimação térmica e hipóxia sobre as defesas antioxidantes e danos genotóxicos no tambaqui (*Colossoma macropomum*).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito genotóxico da temperatura associada à hipóxia no tambaqui.
- Verificar a ocorrência de estresse oxidativo no tambaqui após exposição a temperatura e hipóxia.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando o iminente aumento de temperatura ambiental, é de suma importância verificar como espécies de peixes amazônicos de grande valor econômico, como o tambaqui, responderão as mudanças climáticas. Para tal, a utilização de ferramentas que avaliam a genotoxicidade e a ação enzimática antioxidante permite uma maior compreensão das adaptações que os organismos desenvolvem para sobreviver as variações de parâmetros físico-químicos nos seus ambientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aquisição dos animais

Juvenis de tambaqui foram adquiridos na Estação Experimental de Balbina (Presidente Figueiredo, AM), e transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/COBio/INPA). No laboratório, os animais foram aclimatados em tanques de polietileno com capacidade de 310 L e alimentados diariamente com ração composta de 35% de proteína bruta até a realização dos experimentos.

3.2 Delineamento experimental

Um total de 64 juvenis de tambaqui foram distribuídos em 16 tanques experimentais, 4 animais em cada tanque. 8 tanques foram mantidos a 26 °C e os outros 8 a 32 °C. Após 28 dias de aclimação, um animal foi coletado de cada tanque e acondicionado em câmeras de respirometria, onde foram mantidos às respectivas temperaturas de aclimação. Após esse período, os animais foram submetidos sinergicamente às mesmas temperaturas de aclimação (26 e 32 °C) e hipóxia (1,5 mg O₂/L) no mesmo sistema de respirometria por 8 horas. Ao final do experimento, os animais retirados de cada tratamento foram pesados e medidos e, em seguida foi realizada a coleta de sangue para as análises de Ensaio Cometa e ANE. Posteriormente os animais foram eutanasiados por corte na cervical. Amostras de fígado, brânquia e músculo branco foram destinadas as análises enzimáticas e de LPO.

3.3. Análises genotóxicas

Para o Ensaio Cometa, seguindo o protocolo de Silva (2007), lâminas foram previamente preparadas com agarose ultrapura (Invitrogen) a 1,5% e secas a temperatura ambiente. Após a coleta, 5 μ L de sangue foi misturado com 300 μ L de RPMI (solução utilizada em cultivo celular). Logo em seguida, 10 μ L do sangue diluído foi misturado com 95 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,75% agarose low melting, Invitrogen). Essa solução foi imediatamente estendida nas lâminas pré-gelificadas e coberta com lamínula, para espalhamento. Após solidificadas, as lamínulas foram retiradas e dispostas em cubeta vertical contendo solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM TRIS) gelada e protegida da luz, a fim de remover o conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. As lâminas ficaram imersas em solução de lise até uma semana e, em seguida, foram movidas para a cuba de eletroforese com solução tampão (300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH>13) e deixadas imersas por 20 minutos. Após esse período, a fonte de eletroforese foi ligada a 25V e 300mA por 15 minutos. As lâminas foram retiradas e aplicadas sobre elas o tampão neutralizador (pH 7,5) por 5 minutos, sendo repetida a aplicação três vezes. As lâminas foram lavadas duas vezes com água destilada e secas à temperatura ambiente e, após um período de 2 horas, reidratadas com água destilada por 5 minutos. Na etapa de coloração, as lâminas foram submetidas por 15 minutos à solução de impregnação à base de prata a 37 °C em cubetas verticais. Após esse processo, as lâminas foram observadas em microscópio óptico (Leica DM500), em aumento de 100x. Os danos no DNA foram classificados de acordo com o tamanho do rastro de DNA nos núcleos, nas categorias 0 (núcleo intacto), 1 (sem cauda e danos mínimos), 2 (com uma pequena cauda menor que o diâmetro do núcleo), 3 (com o comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça), 4 (cauda longa e mais espalhada e em forma de leque menor do que a classe 3). As células foram selecionadas aleatoriamente e durante a visualização dos danos foram contadas 100 células por lâmina, sendo duas lâminas para cada peixe.

Para o ensaio ANE, o sangue foi estendido em lâminas por meio de esfregaço e coradas com Giemsa diluída em tampão fosfato (pH 5,4). Em seguida, as lâminas

foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente para que as anormalidades fossem observadas em microscópio óptico (Leica DM500) no aumento de 100x. As lesões nos eritrócitos foram classificadas de acordo com Carrasco e Noaa (1990) em quatro tipos: núcleo em forma de rim, lobado, micronúcleo e segmentado. Foram visualizadas 2.000 células de cada indivíduo submetido às condições experimentais.

3.4 Análises enzimáticas

Para a análise das enzimas antioxidantes, amostras de fígado, brânquia e músculo branco foram homogeneizadas em solução tampão (200 mM Tris base; 1 mM EDTA; pH 8) e centrifugadas a 9.000 g durante 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi usado para análise da atividade das enzimas glutathione S-transferase (GST) e catalase (CAT). Para a análise da lipoperoxidação (LPO), amostras de fígado, brânquias e músculo branco foram pesadas, homogeneizadas com o mesmo tampão usado para GST e CAT e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. A atividade da GST foi determinada de acordo com o método descrito por Keen e colaboradores (1976) utilizando CDNB (1cloro-2,4-dinitrobenzeno) como substrato. Mudanças na absorvância foram obtidas espectrofotometricamente a 340 nm. Atividade da catalase foi determinada segundo a metodologia descrita por Beutler (1975) que mede a velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio a 240 nm. A concentração de LPO no fígado foi quantificada pelo método FOX (*Ferrous Oxidation/Xylenol Orange*) como descrito por Jiang e colaboradores (1992). O método é baseado na rápida oxidação do Fe^{2+} por hidroperóxidos em condições ácidas e, posterior, formação do complexo Fe^{3+} laranja de xilenol, na presença do estabilizador butilato hidroxitolueno (BHT). As leituras foram realizadas espectrofotometricamente a 560 nm.

3.5- Análises estatísticas

Todos os dados são expressos como média e erro padrão da média. A significância das diferenças foi analisada estatisticamente por meio de análise de variância (ANOVA, two-way), seguido de teste Tukey. Foi mantido o nível de significância de $p < 0,05$ para todas as análises

4. Resultados e Discussão.

4.1. Danos genotóxicos

Não houve alteração na frequência de anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) em nenhuma das temperaturas analisadas, tanto em normóxia quanto em hipóxia ($p = 0,220$ e $F = 0,643$). Porém, a exposição à hipóxia resultou no aumento na frequência de ANE em relação aos peixes mantidos em normóxia ($p = 0,001$ e $F = 19,187$). Não houve interação entre temperatura e concentração de oxigênio ($p = 0,422$ e $F = 0,670$) (Figura 1).

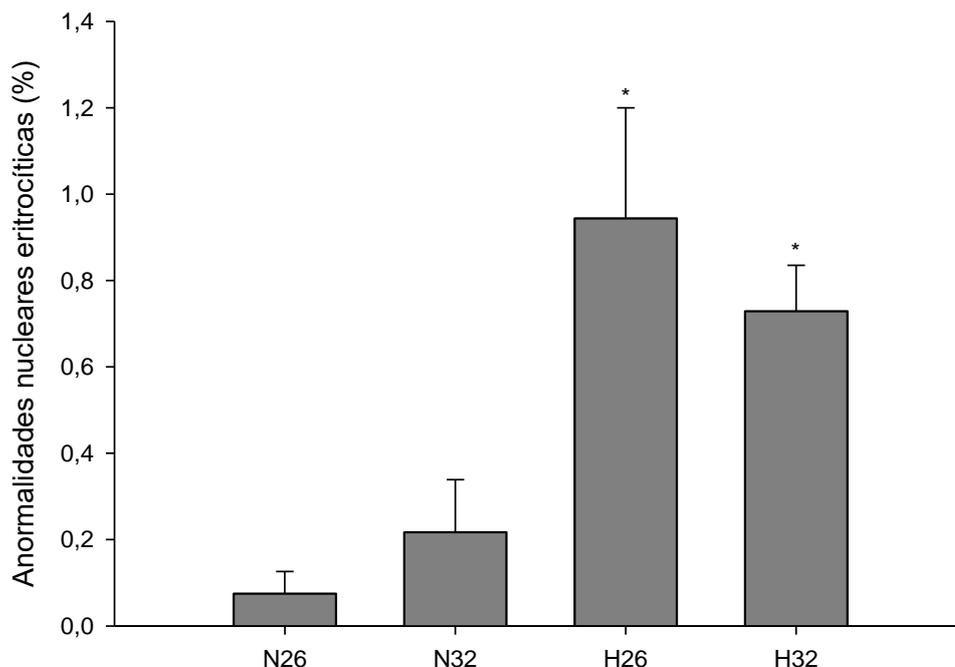


Figura 1. Frequência de Anormalidades nucleares eritrocíticas (ANE) de *C. macropomum* nos grupos normóxia 26 °C (N26), normóxia 32 °C (N32), hipóxia 26°C (H26) e hipóxia 32 °C (N32). * indica diferença entre normóxia e hipóxia de um mesmo tratamento. Tukey com significância $p < 0,05$.

Resultados semelhantes foram observados para índices de danos genéticos (IDG), obtidos por meio do ensaio cometa. A exposição a hipóxia resultou no aumento no IDG em eritrócitos de *C. macropomum*, sendo o índice de danos, cerca de 2 vezes maior nos peixes mantidos em hipóxia quando comparado a normóxia ($p=?$ e $F=?$). Não foi encontrada diferença entre as temperaturas ($p= 0,941$ e $F= 0,00555$), e não houve interação entre temperatura e níveis de oxigênio ($p= 0,773$ e $F= 12,766$) (Figura 2). Em relação aos níveis de danos no DNA, os indivíduos mantidos em normóxia, em ambas as temperaturas, apresentaram maior número de células com DNA íntegro (classe 0), e uma prevalência de danos classe 1, 2 e 3. Já os indivíduos mantidos em hipóxia, nas duas temperaturas, tiveram prevalência de danos classe 3 e 4, indicando maior nível de fragmentação do DNA, causado pela baixa disponibilidade de O_2 na água (Figura 2).

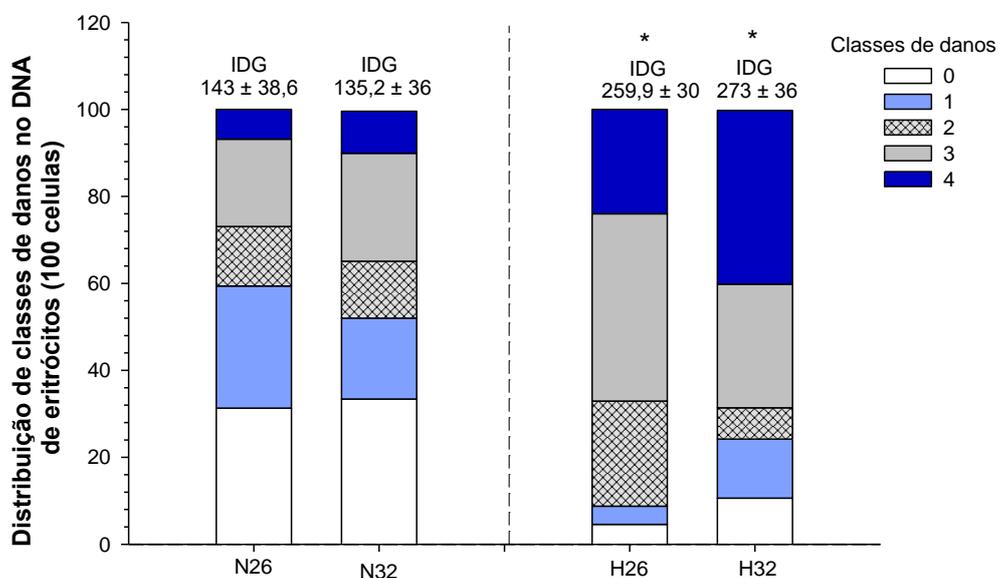


Figura 2: Distribuição das classes de danos no DNA em eritrócitos de *C. macropomum* nos grupos normóxia 26 °C (N26), normóxia 32 °C (N32), hipóxia 26°C (H26) e hipóxia 32 °C (N32). O Índice de Danos Genéticos (IDG) está identificado em cada tratamento (sobre as barras). Asteriscos indicam diferença entre normóxia e hipóxia de um mesmo tratamento. Valor de significância $p < 0.05$.

Estudo conduzido por Silva et al. (2017) com espécimes de tambaqui expostas aos cenários climáticos propostos pelo IPCC para 2100, cenário atual (temperatura atual) e o cenário extremo (aumento médio de 4,5 °C acima da temperatura atual) combinado com a exposição ao Benzo[a]pireno, um hidrocarboneto policíclico

aromático, resultou na ocorrência de danos oxidativos. Os autores concluíram que aumentos sinérgicos na temperatura e CO₂ no ambiente não só causam danos teciduais e genéticos, como também enfraquecem as respostas antioxidantes do organismo, o que propicia o aparecimento de danos histológicos e no DNA.

Assim como a temperatura, a hipóxia também contribui para a ocorrência de estresse oxidativo e danos no DNA, bem como ativação das defesas antioxidantes. Saana et al. (2011) verificaram em um experimento envolvendo a carpa comum (*Cyprinus carpio*) que danos no material genético são em média 25 a 30% mais elevados quando os indivíduos estão expostos à hipóxia, o que está de acordo com os resultados encontrados no presente estudo. O trabalho realizado por Mustafa e colaboradores (2011) demonstrou que a hipóxia foi um agravante, em experimentos envolvendo poluentes, na ocorrência de danos genéticos quando comparados com tratamentos similares em normóxia. A exposição do tambaqui a hipóxia resultou no aumento de danos eritrocitários e na frequência de danos genéticos quando comparados aos peixes mantidos em normoxia (Groff et al., 2010), similar ao que foi observado no presente estudo.

4.2. Análises Bioquímicas

A atividade da enzima GST nas brânquias não foi influenciada pela variação de temperatura ($p= 0,124$ e $F= 2,531$), pela hipóxia ($p= 0,409$ e $F= 0,705$) ou pela combinação de ambos os fatores ($p= 0,936$ e $F= 0,000662$) (Figura 3). No músculo foi possível observar a sinergia dos fatores, onde tanto a temperatura quanto a hipóxia causaram diferença estatística ($p=0,017$ e $F= 0,0227$). No fígado houve diferença apenas em relação a concentração de oxigênio ($p= 0,027$ e $F= 0,987$).

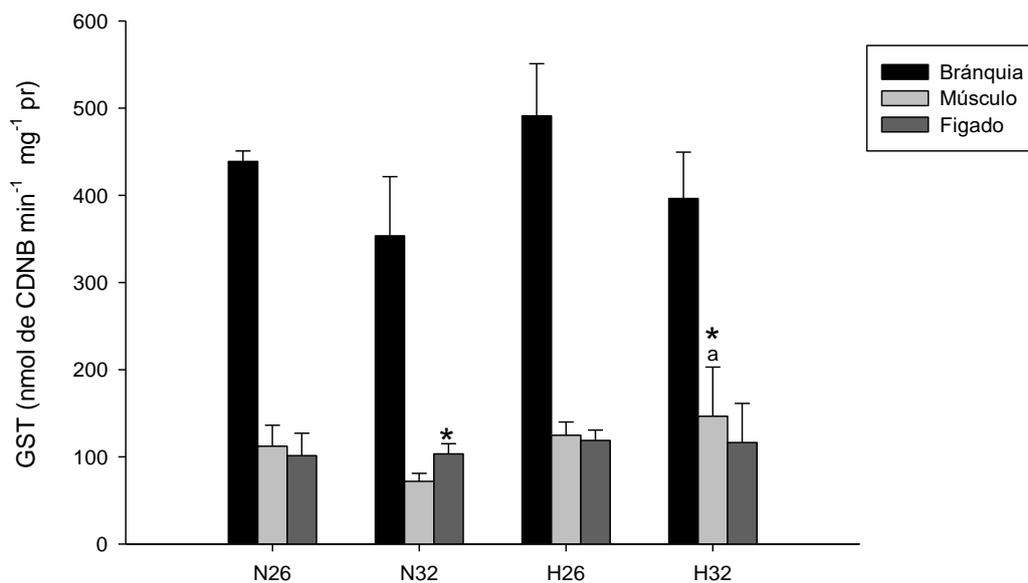


Figura 3: Atividade da GST em tecidos de *C. macropomum* nos grupos normóxia 26 °C (N26), normóxia 32 °C (N32), hipóxia 26°C (H26) e hipóxia 32 °C (N32). Asteriscos representam diferença estatística entre normóxia e hipóxia em um mesmo tratamento. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre as temperaturas. A presença de ambos indica efeito sinérgico. Valor de significância do teste de Tuckey $p < 0.05$

A exposição à hipóxia não afetou a atividade da CAT nas brânquias ($p = 0,409$ e $F = 0,705$), porém a temperatura induziu alteração na atividade da enzima ($p = 0,124$ e $F = 2,531$). No fígado, apenas a hipóxia promoveu mudanças na atividade da CAT ($p = 0,007$ e $F = 3,204$). Enquanto no musculo, a hipóxia promoveu aumento na atividade da enzima ($p = 0,001$ e $F = 0,943$) (figura 4).

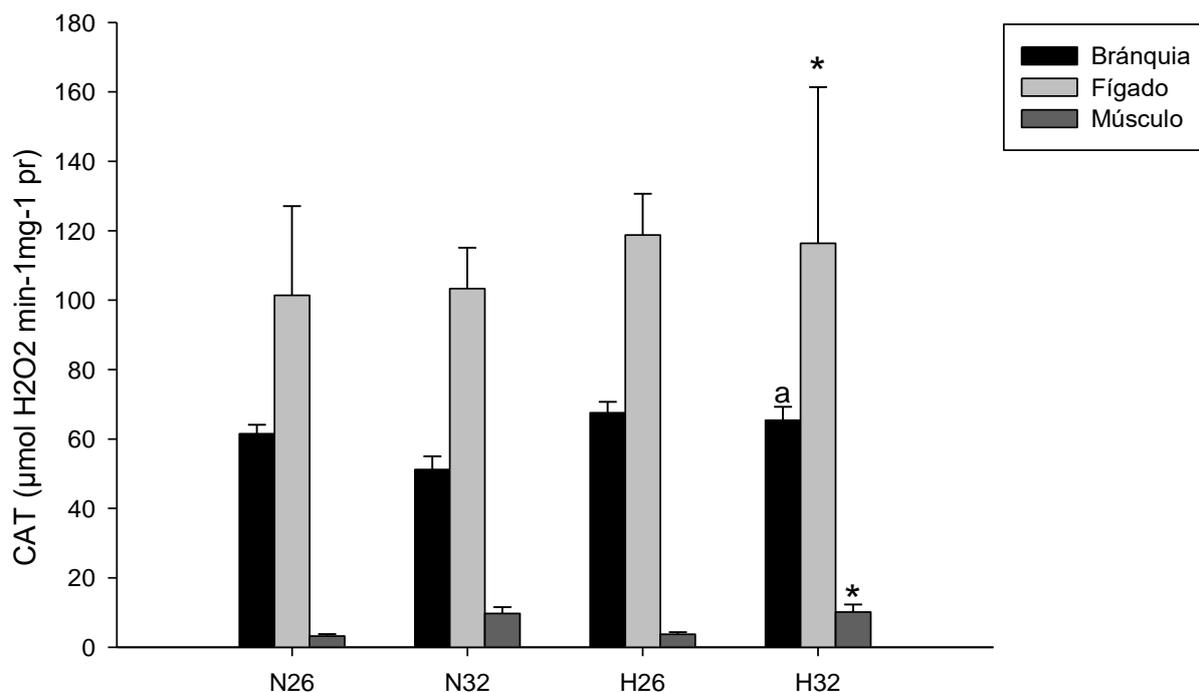


Figura 4: Atividade da Catalase no fígado de *C. macropomum* nos grupos normóxia 26 °C (N26), normóxia 32 °C (N32), hipóxia 26 °C (H26) e hipóxia 32 °C (N32). Asteriscos representam diferença estatística entre normóxia e hipóxia em um mesmo tratamento. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre as temperaturas. Valor de significância do teste de Tuckey $p < 0.05$.

Em relação a LPO branquial, não houve diferença entre as temperaturas ($p = 0,401$ e $F = 0,726$), concentração de oxigênio ($p = 0,401$ e $F = 0,726$), bem como, interação entre os fatores ($p = 0,313$ e $F = 1,051$). No fígado foram encontrados resultados similares, não havendo diferenças estatísticas significativas. No músculo, ocorreu interação sinérgica dos fatores ($p = 0,004$ e $F = 10,186$) (Figura 5).

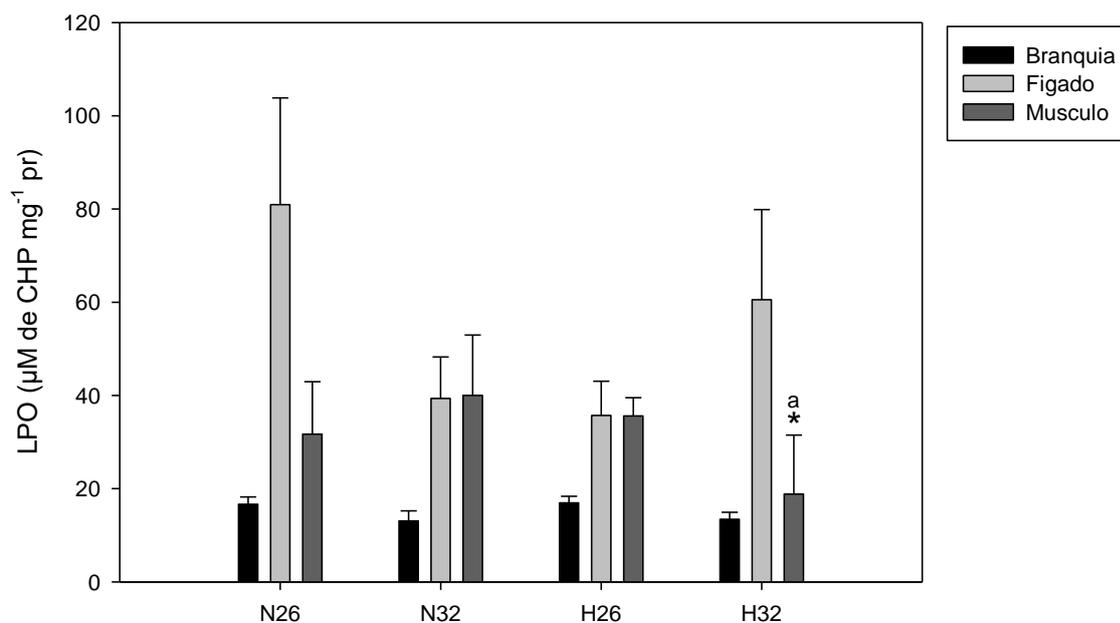


Figura 5: Lipoperoxidação (LPO) nos tecidos de *C. macropomum* nos grupos normóxia 26°C (N26), normóxia 32 °C (N32), hipóxia 26 °C (H26) e hipóxia 32 °C (N32). Asteriscos representam diferença estatística entre normóxia e hipóxia em um mesmo tratamento. Letras minúsculas representam diferenças estatísticas entre as temperaturas. A presença de ambos indica efeito sinérgico. Valor de significância do teste de Tuckey $p < 0.05$.

Souza e colaboradores (2019) expuseram juvenis de tambaqui a hipóxia e injeções de naftaleno, afim de determinar a genotoxicidade da combinação de ambos os fatores; os resultados obtidos no presente estudo, foram similares aos descritos pelos autores onde a hipóxia foi um fator determinante na variação de GST e CAT quando levada em consideração o resultado encontrado no fígado, onde houve a interação entre ambos os fatores.

No trabalho de Dourado e colaboradores (2019), os autores realizam a exposição de Tilápias do Nilo a hipóxia e ao pesticida Fipronil, foi observado resultados similares ao do presente estudo, com a hipóxia sendo responsável pela alteração tanto na GST quanto na CAT, quando comparados ao grupo controle do estudo.

Estudo realizado por Silva e colaboradores (2019) com juvenis de tambaqui demonstra que a hipóxia foi o fator determinante na atividade da GST e CAT. Em

relação a LPO foi observado uma redução na atividade em hipóxia, o que foi similar ao resultado encontrado da LPO muscular.

O aumento da atividade da CAT hepática, sugere que os tambaquis ativaram as defesas antioxidantes em resposta a hipóxia, porém não foram suficientes para minimizar os danos oxidativos resultantes da exposição a níveis reduzidos de oxigênio, uma vez que, a hipóxia induziu danos no DNA dos peixes. Similar ao trabalho de Dasgupta e colaboradores (2016), onde foi observado que a exposição de larvas de *Cyprinodon variegatus* a hipóxia (2 mg/L) e contaminação por petróleo, apresentou um agravamento dos danos genéticos devido a supressão da ação enzimática induzida pela hipóxia.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstram, que de maneira geral, o tabaqui consegue manter as defesas antioxidantes funcionando normalmente, quando submetidos a variações na concentração de oxigênio e temperatura, para as condições testadas no presente estudo, porém fica susceptível aos danos genotóxicos, principalmente quando exposto a hipóxia

6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA-VAL, V.M.F.; FARIAS, I.P. Respiration in fish of the Amazon metabolic adjustments to chronic hypoxia. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds.). *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*. Manaus: INPA, p. 257-271. 1996.

Ahmed, R.G. Is there a balance between oxidative stress and antioxidant defense system during development? *MJIAS*, 2005

ARAÚJO, V.D.; NETTO, J.G.S.; SAKURAGUI, M.M.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Análise de parâmetros hematológicos de exemplares de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) submetidos a diferentes temperaturas e concentrações de CO₂. Manaus-Amazonas, XX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA – CNPq/FAPEAM. 2011.

CARRASCO, K. R.; NOAA, N.A.T.L. Assessment of the piscine micronucleus test as an insitu biological indicator of chemical contaminant effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47 (11): 2123-2136. 1990.

DASGUPTA, S.; DIGIULIO, R. T.; DROLLETTE, Brian D.; *et al.* Hypoxia depresses CYP1A induction and enhances DNA damage, but has minimal effects on antioxidant responses in sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larvae exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology*, v. 177, p. 250–260, 2016.

ESTEVES, F.A. Fundamentos de Limnologia. 3ª Edição. Interciência, Rio de Janeiro, 2011.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva. 2014.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, 202: 384-389. 1992.

WANG, J.; LU, D. Q.; JIANG, B.; LUO, H. L.; LU, G. L.; LI, A. X. 2018. The effect of intermittent hypoxia under different temperature on the immunomodulation in *Streptococcus agalactiae* vaccinated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 10.1016/j.fsi.2018.04.040. 2018.

KEEN, J.H., HABIG, W.H., JAKOBY, W.B. Mechanism for the several activities of the Glutathione S-Transferases. *J. Biol. Chem.* 251, 6188-1976. 1976.

KOBAYASHI, S.C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M., SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Community*, 2p. 103–115. 1995.

MUSTAFA, S.A., AL-SUBIAI, S.N., DAVIES, S. J., JHA, A.N. Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology*. 20, 1455-1466. 2011.

RANTIN, F.T.; KALININ, A. L. Cardiorespiratory function and aquatic surface respiration in *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. In. Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds.). *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*, 400p. 1996.

SILVA, G. S., MATOS, L. V., FREITAS, J. O. S., CAMPOS, D. F., & ALMEIDA E VAL, V. M. F. Gene expression, genotoxicity, and physiological responses in an Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (CUVIER 1818), exposed to Roundup® and subsequent acute hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*. 2019.

SILVA, G. S.; Fé, L. M. L.; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL, V. A. F. Ras oncogene and Hypoxia-inducible factor-1 alpha (hif-1 a) expression in the Amazon fish *Colossoma macropomum* (Cuvier , 1818) exposed to benzo [a] pyrene . v. 501, p. 491–501, 2017.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. P. Genética Toxicológica. Editora Alcance, Porto Alegre, 424p. 2003.

SILVA, J. O uso do ensaio cometa para o ensino de genética toxicológica. Genética na escola. Toxicológica. Universidade Luterana do Brasil. 1980-3540. 2007.

SOUZA, S. S., SILVA, G. S., & ALMEIDA-VAL, V. M. F. Ecophysiology, genotoxicity, histopathology, and gene responses of naphthalene injected *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) exposed to hypoxia. *Genetics and Molecular Biology*, 42(2), 411–424. 2019.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191. 1988.

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Fishes of the Amazon and their Environment Physicological and Biochemical Aspects. 1ed. Springer, Michigan, 224p. 1995.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13: 57-149. 2003

VERHEYEN, E.; BLUST, R.; DECLEIR, W. Metabolic-rate, hypoxia tolerance and aquatic surface respiration of some lacustrine and riverine African cichlid fishes (Pisces, Cichlidae). *Comp Biochem Physiol A*, p. 403-411. 1994.