

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia
Tropical e Recursos Naturais - PIPG BTRN



**"ADAPTAÇÕES METABÓLICAS DOS CICLÍDEOS AOS
AMBIENTES HIPÓXICOS DA AMAZÔNIA"**

ADRIANA REGINA CHIPARI GOMES

Tese de Doutorado

Manaus - AM

0086

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

BIBLIOTECA DO INPA

**ADAPTAÇÕES METABÓLICAS DOS CICLÍDEOS AOS
AMBIENTES HIPÓXICOS DA AMAZÔNIA**

ADRIANA REGINA CHIPPARI GOMES

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus – 2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

BIBLIOTECA DO INPA

**ADAPTAÇÕES METABÓLICAS DOS CICLÍDEOS AOS
AMBIENTES HIPÓXICOS DA AMAZÔNIA**

ADRIANA REGINA CHIPPARI GOMES

Orientador: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UFAM, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Suporte financeiro INPA (PPI # 1-3140) e CNPq (PNO PG # 400030/99-3)

T
594 280/15
2633a
28 2

Manaus – 2002

FICHA CATALOGRÁFICA

Chippari-Gomes, Adriana Regina

Adaptações Metabólicas dos Ciclídeos aos Ambientes Hipóxicos da Amazônia

xviii + 152p

Tese de Doutorado

1. Amazônia 2. Hipóxia 3. Adaptações metabólicas 4. Enzimas 5. Ciclídeos

SINOPSE

Foi realizada uma revisão sobre a tolerância dos ciclídeos a hipóxia e sobre os ajustes metabólicos que estes animais possuem para sobreviverem em ambientes hipóxicos. Como há ainda poucos estudos sobre a tolerância dos ciclídeos amazônicos a hipóxia, foram realizadas coletas mensais durante um ano inteiro nas proximidades do Lago Catalão/Manaus, observando a ocorrência dos ciclídeos e a variação de oxigênio. Nessas coletas três espécies de ciclídeos foram capturadas o ano todo, sendo realizada, então, uma verificação da atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) e a sua expressão nos tecidos dessas espécies fazendo uma relação desses dados com a variação de oxigênio anual. Observou-se neste trabalho que a atividade da enzima LDH no coração das três espécies: *S. aff. jurupari*, *Heros apendiculatus* e *C. orbicularis* aumenta a medida que a concentração de oxigênio no meio decresce. Em relação a expressão das isozimas observamos que nas três espécies apenas a isozima A₄ foi expressa no músculo branco e no coração. Os meses de outubro e novembro foram os meses com maior captura de várias espécies de ciclídeos (n=10). As espécies capturadas nesse período (totalizando 9 espécies) foram utilizadas para traçar o perfil metabólico, por meio da análise de cinco enzimas em quatro tecidos, e dos níveis de glicogênio hepático e muscular. Nesta parte do trabalho observamos que há variação na atividade da maioria das enzimas estudadas nas nove espécies de ciclídeos, sendo o metabolismo do músculo branco predominantemente anaeróbico e do coração, fígado e cérebro sendo principalmente aeróbico. Para finalizar a tese, foi realizado em laboratório, um estudo com duas espécies de ciclídeos sobre a tolerância a hipóxia e as respostas metabólicas que cada uma dessas espécies apresentam quando expostas à hipóxia gradual. Observou-se que a tolerância a hipóxia variou de moderada (*S. aequifasciatus*) a alta (*A. crassipinnis*), sendo que ambas as espécies apresentaram supressão do metabolismo como um todo, priorizando o metabolismo anaeróbico.

**Ao meu pai Francesco, à
minha mãe Leonilda, aos
meus irmãos e ao meu
amado esposo Levy. Muito
obrigada por todo apoio,
amor e compreensão que
vocês me deram.**

AGRADECIMENTOS

Esta seção será dividida em duas partes: agradecimentos gerais e por capítulo.

À minha orientadora e amiga Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val por ter me orientado nesta tese, transmitindo seus preciosos ensinamentos os quais foram essenciais para a minha formação, e por toda a amizade, carinho, compreensão e confiança que desenvolvemos ao longo desses anos.

Ao meu amado esposo Levy muitíssimo obrigada pela grande ajuda e paciência durante a tese, por ter sempre me incentivado em todos os momentos e, também, por todo amor compartilhado nestes anos.

Aos meus pais Francesco e Leonilda, aos meus irmãos Luciana, Alessandro, Fabiana, Mariana e Giovanna, às minhas tias Antonieta e Pina, às minhas avós Hermínia e Caterina e a todos os outros membros da família por terem guiado e facilitado minha formação pessoal e profissional.

Ao Dr. Adalberto Luís Val por ter transmitido seus conhecimentos sobre ciência e pela amizade.

À amiga Maria de Nazaré Paula da Silva por tudo que fez para que essa tese tivesse sucesso, e pela amizade e dedicação que teve por mim.

À Carminha, por tudo que sempre fez no que se refere ao curso BADPI e também pela grande amizade e carinho.

À amiga Nívia Pires Lopes por ter ajudado sempre nos diversos trabalhos, pelas longas conversas que tivemos, pelas suas palhacissas e por ter sido sempre companheira.

Aos alunos e amigos do LEEM, Lenise, Christiane, Paulo, Katherine, Aline, Cristhian, Alzira, Nívea e aos demais alunos por tudo que compartilhamos juntos e pela amizade.

À Dra. Alice Reis Oliveira por todos os conhecimentos na área molecular na última fase do doutorado, e pela amizade.

Ao Raimundo Souza por toda a "força" prestada e à Dona Sônia por todos os cafezinhos preparados em homenagem às loiras do laboratório.

Ao Sr. Arnaldo Souza por ter tolerado todos os meus atrasos durante as excursões e por todo o seu carinho.

A todos amigos de curso, pelos bons momentos de convivência.

Aos professores do BADPI pelos ensinamentos passados e paciência.

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

Aos mestres de graduação, Dra Lúcia Panepucci, Dra. Ana Lúcia Kalinin, Dr. Francisco Tadeu Rantin, Dr. Gilberto Moraes, Dr. Roberto Huet que me orientaram nesse caminho que hoje me enveredo.

Ao mestre e amigo Dr. Bernardo Baldisserotto por sempre nos incentivar na carreira de pesquisa.

Agradeço também a Deus e a Nossa Senhora por todas as oportunidades maravilhosas concedidas.

Aproveito também esta oportunidade para fazer uma homenagem póstuma aos meus amados parentes: Primo Romanini, Domenico Chippari, Angelina Chippari, Carmelo Chippari e Maurizio Chippari.

Capítulo I

Agradeço a todos que me ajudaram a preparar o capítulo do livro, e à confiança em mim depositada pelos Drs. Adalberto Luís Val e B.J. Kapoor que me convidaram para escrevê-lo.

Capítulo II e III

Agradeço aos técnicos Luís Cosme, Agenor Negrão, Francisco Fonseca e principalmente ao Jurandir Pina por terem coletado os peixes para a realização dessa tese e por terem sido ótimos companheiros de campo.

Aos guardas do Catalão que sempre nos receberam muito bem.

Aos professores Dr. Efrem J.G. Ferreira e Dr. Jansen A.S. Zuanon por terem identificado as espécies de ciclídeos utilizadas durante esta tese.

Ao Dr. Levy de Carvalho Gomes e Msc. Nívia Pires Lopes por terem auxiliado durante as coletas.

À Msc. Maria de Nazaré Paula-Silva e às estagiárias Luciana e Luana por terem auxiliado na realização de todas as eletroforeses.

Aos alunos Isolda e Kelmer por terem auxiliado na realização das análises de glicogênio.

Capítulo V

Agradeço ao técnico Marcus Makiana por ter cedido os exemplares de acarúçu.

Agradeço novamente ao Dr. Levy de Carvalho Gomes e Msc. Nívia Pires Lopes por terem auxiliado durante os experimentos, e aos estagiários Isolda e Kelmer por terem auxiliado com as análises de glicogênio.

Adaptações Metabólicas dos Ciclídeos aos Ambientes Hipóxicos da Amazônia

Resumo

Os ciclídeos neotropicais são teleósteos avançados e distribuem-se pela África, Madagascar, Américas Central e do Sul, México, sul da Índia e Sri Lanka. Em trabalhos recentes, foi sugerido que esta família está distribuída no ambiente natural de acordo com sua capacidade de tolerância a hipóxia. Diante disso, os principais objetivos dessa tese foram: 1) verificar a atividade e a expressão da enzima Lactato Desidrogenase (LDH; E.C. 1.1.1.27) de três espécies de ciclídeos da Amazônia Central relacionando a atividade e a expressão da LDH com a disponibilidade de oxigênio no ambiente natural; 2) comparar o perfil metabólico de várias espécies de ciclídeos coletadas na natureza; e 3) verificar os ajustes metabólicos em duas espécies de ciclídeos expostas a hipóxia gradual. O primeiro objetivo foi alcançado acompanhando a variação da atividade da enzima LDH, assim como a expressão dessa enzima no músculo branco e cardíaco em três espécies de ciclídeos, *Satanoperca aff. jurupari*, *Heros appendiculatus* e *Chaetobranchopsis orbicularis*, durante um ano de coleta nas proximidades do Lago Catalão/Manaus. Os resultados obtidos mostraram que a atividade da enzima LDH no músculo cardíaco das três espécies tem correlação com a quantidade de oxigênio dissolvido no meio, ou seja, à medida que a concentração de oxigênio diminui no meio a atividade da LDH aumenta no coração. Apenas a isozima A₄ foi expressa tanto no músculo branco quanto no coração. Esses resultados revelam alguns dos ajustes que estas espécies desenvolveram para sobreviver aos ambientes hipóxicos da Amazônia. O segundo objetivo foi alcançado estudando o perfil metabólico de nove espécies de ciclídeos coletadas no período de outubro e novembro de 2000, também na região do Lago Catalão/Manaus. Para caracterizar o perfil metabólico dessas espécies foram avaliadas as atividades das seguintes enzimas: Piruvato Kinase (PK; E.C. 2.7.40), LDH (1 e 10mM), Malato Desidrogenase (MDH; E.C. 1.1.1.37) e 3- Hidroxiacil CoA Desidrogenase (HOAD; E.C. 1.1.1.35) nos músculos branco e cardíaco, fígado e cérebro, e ainda avaliamos o conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Analisando os resultados obtidos podemos dizer que há uma similaridade na atividade das enzimas nas nove espécies de ciclídeos aqui estudadas e no conteúdo de glicogênio. Observamos também que o metabolismo de todos os tecidos estudados, das nove espécies, está baseado na glicólise. As taxas da HOAD (metabolismo dos lipídeos) foram bem menores que das enzimas

glicolíticas. Estes resultados são consistentes com os da literatura, onde os animais tolerantes a hipóxia baseiam seu metabolismo, preferencialmente, no metabolismo glicolítico e apresentam uma redução do metabolismo oxidativo baseado na combustão dos ácidos graxos. Quanto ao terceiro objetivo, duas espécies de ciclídeos, *Astronotus crassipinnis* e *Symphysodon aequifasciatus* (n=10) foram expostas a hipóxia gradual, ou seja, em diferentes tensões de oxigênio (6,0, 3,0, 1,5, 0,75, 0,6, 0,3 e 0,0 mgO₂/L), durante 8 horas. A espécie *A. crassipinnis* sobreviveu a todas essas concentrações, sendo tolerante em ausência total de oxigênio (0,0 mgO₂/L) por mais de 2,5h, demonstrando ser altamente tolerante a hipóxia e a anóxia. Por outro lado, a espécie *S. aequifasciatus* resistiu no máximo 4,5h na tensão de 0,6 mgO₂/L, sendo considerada então moderadamente tolerante a hipóxia severa. Ambas as espécies apresentaram aumento nos batimentos operculares e diminuição do consumo de oxigênio quando expostas a condições hipóxicas. Observou-se, também, aumento nos níveis de glicose e lactato plasmáticos quando as espécies foram expostas a concentrações inferiores a 0,75 mgO₂/L. Em ambas as espécies, a concentração de glicogênio hepático apresentou-se reduzida, enquanto que no músculo branco houve aumento no conteúdo de glicogênio. Quanto à atividade das enzimas, a maioria sofreu alteração durante a exposição das duas espécies nas diferentes tensões de oxigênio. Com base nesses resultados concluímos que ambas as espécies baseiam sua tolerância a hipóxia em combinação com a glicólise anaeróbica. Como conclusão geral podemos dizer que as espécies de ciclídeos possuem diversas estratégias de sobrevivência para lutar com os ambientes hipóxicos da Amazônia, sendo assim pode-se dizer que a maioria delas é tolerante a hipóxia.

Metabolic adaptations of cichlids to hypoxic environments in the Amazon

Abstract

The Neotropical cichlids are advanced teleosts occurring in Africa, Madagascar, South and Central America, Mexico, South of India and Sri Lanka. Recent findings suggest that the geographical distribution of this family (in natural environments) is related to the ability to tolerate hypoxia. Therefore, the objectives of the present work were: 1) to correlate the anaerobic metabolism (Lactate Dehydrogenase levels) profile of three species of cichlids from central Amazon with the oxygen availability in the environment; 2) to compare the metabolic profile of cichlid species collected in the nature; and 3) to study the metabolic adjustments of two species exposed to gradual hypoxia. The first goal was achieved by the analysis of the variation in the activity of Lactate Dehydrogenase (LDH; E.C. 1.1.1.27) and its expression in white and cardiac muscles in three species, *Satanoperca aff. jurupari*, *Heros apendiculatus* and *Chaetobranchopsis orbicularis* during one year in the region of Catalão Lake, Manaus, Amazonas. The results showed that LDH activity in the cardiac muscle of the three species was inversely correlated to the oxygen concentration in the environment, i.e., when oxygen levels in the water decreased, enzyme levels increased. Only the isozyme A₄ was expressed in muscle or in the heart of these animals. These results revealed one of the adjustments developed by these species to survive the hypoxic environments of Amazon basin. The second objective was achieved by studying the metabolic profiles of nine species of cichlids collected in October and November 2000 in the region of Catalão Lake. In order to characterize the metabolic profiles of these species the following enzymes were analyzed: Piruvate Kinase (PK; E.C. 2.7.40), LDH (1 e 10mM), Malate Dehydrogenase (MDH; E.C. 1.1.1.37) e 3-Hydroxiacil CoA Dehydrogenase (HOAD; E.C. 1.1.1.35) in white muscle, heart, liver and brain tissues. In addition, liver and muscle glycogen contents were evaluated. We found a similar enzyme distribution and glycogen contents in the 9 species analyzed. All species presented a glycolytic based metabolism in all tissues, HOAD levels (lipid metabolism) were lower than the levels glycolytic enzymes. These results are consistent with literature where good anaerobes are considered to base their metabolism on the glycolytic metabolism rather than fatty acid oxidation for their energy demands. For the third objective, two species (n=10), *Astronotus crassipinnis* and *Symphysodon aequifasciatus* were exposed to graded hypoxia.

i.e., different oxygen tensions - 6.0, 3.0, 1.5, 0.75, 0.6, 0.3 and 0.0 mgO₂/L - during 8 hrs. The species *A. crassipinnis* survived all these conditions, showing tolerance to complete absence of oxygen (0.0 mgO₂/L) for 2:30 hrs, proving to be highly tolerant to hypoxia and to anoxia. On the other hand, the lower oxygen tension tolerated by *S. aequifasciatus* was 0.6 mgO₂/L for 4:30 hrs, being so considered moderately tolerant to deep hypoxia. Both species showed an increase in the opercular movements and a decrease in oxygen consumption when exposed to hypoxic conditions. When the species were exposed to concentrations lower than 0.75 mgO₂/L it was also observed an increase in plasma levels of glucose and lactate. In both species hepatic glycogen contents were reduced in hypoxic conditions, whereas the white muscle ones were increased. Most of the enzyme activities were altered by the exposition to hypoxia in both species. According to these results we concluded that both species base their hypoxia tolerance by a combination of metabolic suppression and anaerobic glycolysis. Overall, we conclude that cichlids have developed many surviving strategies in order to cope with the natural Amazonian environments which makes most of them specialized to hypoxia tolerance.

ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDA

g	grama
cm	centímetros
L	litro
°C	graus Celsius
mgO ₂ /L	miligrama de oxigênio por litro
%	porcentagem
g	gravidade
h	hora
rpm	rotações por minuto
min	minuto
mg/L	miligrama por litro
mg/dL	miligrama por decilitro
mM	milimolar
mmoles/L	milimoles por litro
μmoles/L	micromoles por litro
μmoles.min ⁻¹ .g ⁻¹	micromoles por minuto por grama de tecido
abs.	Absorbância
nm	nanômetros
mmHg	milímetros de mercúrio
ml O ₂ /g.h	milímetros de oxigênio por grama por hora
IU/ml	unidades internacionais por mililitro
U.gt ⁻¹	unidades por grama de tecido
VO ₂	consumo de oxigênio
SEM	erro padrão da média
PK	piruvato kinase
LDH	lactato desidrogenasee
MDH	malato desidrogenase
CS	citrato sintase

HOAD	3-hidroxiacil CoA desidrogenase
HK	hexoquinase
PFK	fosfofrutoquinase
PGI	glicose fosfato isomerase
PCr	fosfocreatina
CPK	creatina fosfoquinase
GP	glicogênio fosforilase
PIR	piruvato
PEP	fosfoenolpiruvato
OXA	oxalacetato
AACoA	aceto acetil coenzima A
Acetil CoA	acetil coenzima A
HIF	fator de indução a hipóxia
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
Triton X-10	octilfenoxipolietoxietanol
Hepes	ácido etanosulfúrico hidroxietilpiperazina
DTT	dithiothreitol
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo – forma reduzida
KCN	cianeto de potássio
KCl	cloreto de potássio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
DTNB	ácido dithio-bis (2-nitrobenzóico)
TRIS	tris hidroximetil aminometano
RSA	respiração na superfície aquática

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Capítulo 1

- Tabela 1. Níveis enzimáticos no coração de peixes da Amazônia e da região do hemisfério Norte (região temperada). 19
- Figura 1. Representação diagramática da relação entre massa corporal (g) e taxa metabólica específica; taxa metabólica em hipóxia; sobrevivência a hipóxia e potencial anaeróbico específico, obtido por meio dos níveis de LDH em músculo esquelético ($U\text{ g}^{-1}$) do ciclídeo *Astronotus ocellatus* (modificado de Almeida-Val et al., 2000). 13
- Figura 2. Lactato plasmático de quatro espécies de ciclídeos ($n = 6$, média e SEM) expostos a normóxia ($6,0\text{mg O}_2/\text{L}$) e hipóxia ($1,5\text{mgO}_2/\text{L}$) a 28°C . O símbolo (*) indica diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) ($*P < 0,05$) (Chippari-Gomes et al., 2000). 17
- Figura 3. Eletroferograma mostrando a distribuição da LDH em vários tecidos: músculo branco (m), coração (c), fígado (f), olho (o) e cérebro (cer) do ciclídeo *Satanoperca aff. jurupari* coledo em condições de normóxia (N) e hipóxia (H) (A.R. Chippari-Gomes e V.M.F. Almeida-Val, dados não publicados). Setas indicam mudanças no padrão do coração em indivíduos em normóxia e hipóxia. 23

Capítulo II

- Tabela 1. Ocorrência das espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão no período de agosto de 2000 a julho de 2001. 49
- Figura 1 – Imagem de satellite image fornecida pelo INPE/MCT, indicando a área em que se localiza o Lago do Catalão. 43
- Figura 2. Exemplares das três espécies de ciclídeos estudadas. 44
- Figura 3. Ocorrência de todas as 14 espécies de ciclídeos coletadas nas proximidades do Lago Catalão durante o período de agosto de 2000 a julho de 2001. 50
- Figura 4. Variação da quantidade de oxigênio dissolvido nos locais de coleta durante o período de agosto de 2000 a julho de 2001. Os valores estão expressos em média e SEM. 51
- Figura 5. Variação da temperatura nos locais de coleta durante o período de agosto de 2000 a julho de 2001. Os valores estão expressos em média e desvio padrão. 52

Figura 6. Variação da atividade da enzima LDH no coração das três espécies de ciclídeos em relação ao conteúdo de oxigênio dissolvido no meio. Onde: x=oxigênio dissolvido na água e y=atividade da enzima LDH.	53
Figura 7. Variação da atividade da enzima LDH no músculo esquelético das três espécies de ciclídeos em relação ao conteúdo de oxigênio dissolvido no meio.	54
Figura 8. Variação da atividade da enzima LDH no fígado das três espécies de ciclídeos em relação ao conteúdo de oxigênio dissolvido no meio. Onde: x=oxigênio dissolvido na água e y=atividade da enzima LDH.	55
Figura 9. Variação da atividade da enzima LDH no cérebro das três espécies de ciclídeos em relação ao conteúdo de oxigênio dissolvido no meio.....	56
Figura 10. Variação da atividade da enzima LDH no coração das três espécies de ciclídeos em nos meses de novembro de 2000 (4,97mgO ₂ /L) e março de 2001 (0,085 mgO ₂ /L). O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo coletado no mês de novembro (P<0,05). As barras estão expressas em média ± erro padrão.....	57
Figura 11. Foto respresentativa dos eletroferogramas mostrando a distribuição da LDH no músculo branco (m) e no coração (c) obtidos para as três espécies de ciclídeos: <i>S. aff. jurupari</i> (A), <i>H. apendiculatus</i> (B) e <i>C. orbicularis</i> (C).....	59

Capítulo III

Tabela 1. Níveis de atividade das enzimas estudadas no músculo branco das nove espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão.	81
Tabela 2. Níveis de atividade das enzimas estudadas no coração das nove espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão.	82
Tabela 3. Níveis de atividade das enzimas estudadas no fígado das nove espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão.	83
Tabela 4. Níveis de atividade das enzimas estudadas no cérebro das nove espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão.	84
Figura 1. Conteúdo de glicogênio muscular (A) e hepático (B) das nove espécies de ciclídeos estudadas.	85

Capítulo IV

- Tabela 1. Níveis enzimáticos do músculo branco nas espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*. O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) ($P < 0,05$)..... 114
- Tabela 2. Níveis enzimáticos do músculo cardíaco nas espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*. O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) ($P < 0,05$)..... 115
- Tabela 3. Razões enzimáticas nos músculos e branco e cardíaco em *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*..... 116
- Figura 1. Exemplares das duas espécies de ciclídeos estudadas. 102
- Figura 2: Consumo de Oxigênio das espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* em condições de normóxia ($6,0\text{mgO}_2/\text{L}$) e hipóxia severa ($0,3$ e $0,75\text{mgO}_2/\text{L}$, respectivamente). O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) ($P < 0,001$). As barras estão expressas em média \pm erro padrão..... 108
- Figura 3: Batimento opercular das espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* em condições de normóxia ($6,0\text{mgO}_2/\text{L}$) e hipóxia severa ($0,3$ e $0,75\text{mgO}_2/\text{L}$, respectivamente). O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle ($6,0\text{mgO}_2/\text{L}$) ($P < 0,001$). As barras estão expressas em média \pm erro padrão..... 109
- Figura 4: Concentrações de glicose (A) e lactato plasmáticos (B) das espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* expostos a várias concentrações de oxigênio durante 8 horas. O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) ($P < 0,001$)..... 110
- Figura 5: Glicogênio hepático (A) e muscular (B) das espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* expostos a várias concentrações de oxigênio durante 8 horas. O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) ($P < 0,05$)..... 111

ÍNDICE

APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO I - Tolerância a hipóxia e as adaptações dos peixes: O caso dos ciclídeos amazônicos.....	4
Introdução.....	5
Tolerância dos ciclídeos a hipóxia.....	9
Adaptação e regulação isozímicas.....	13
Alterações nos níveis enzimáticos.....	17
Inibição ao substrato pela LDH e metabolismo anaeróbico.....	19
Conclusões.....	23
Bibliografias Citadas.....	25
CAPÍTULO II - Variação da atividade e da expressão da LDH em três ciclídeos da Amazônia em relação à disponibilidade de oxigênio do ambiente.....	37
Introdução.....	38
Objetivos.....	41
Material e Métodos.....	42
Resultados.....	47
Discussão.....	60
Bibliografias Citadas.....	66
CAPÍTULO III - Perfil metabólico de nove espécies de ciclídeos da Amazônia	73
Introdução.....	74
Objetivo.....	78
Material e Métodos.....	79
Resultados.....	82
Discussão.....	86
Bibliografias Citadas.....	94
CAPÍTULO IV - Tolerância a hipóxia em duas espécies de ciclídeos da Amazônia.....	97
Introdução.....	98
Objetivos.....	101
Material e Métodos.....	102

Resultados	107
Discussão	117
Bibliografias Citadas	125
CAPÍTULO V – Considerações Finais	133
APÊNDICES	136
APÊNDICE 1.....	137
APÊNDICE 2.....	139
APÊNDICE 3.....	142
APÊNDICE 4.....	146

APRESENTAÇÃO

Nas últimas décadas, vários pesquisadores têm sugerido que a distribuição dos peixes no ambiente amazônico está relacionada com algumas características físico-químicas do ambiente, particularmente o oxigênio. Alguns autores sugerem que as condições de hipóxia severa, característica marcante da bacia amazônica, formaram uma pressão evolutiva que resultou numa diversidade de estratégias de adaptação ao ambiente nos mais diversos níveis da organização biológica. Assim, além da diversidade de tipos de respiração, peixes de respiração aérea e aérea facultativa, peixes de respiração na superfície aquática (RSA) e peixes de respiração aquática restrita apresentam ajustes em sua anatomia, morfologia, fisiologia e bioquímica para enfrentarem ambientes que variam de anóxicos (durante a noite) a hiperóxicos (durante o dia).

Os ciclídeos constituem uma família de peixes de amplo interesse científico por serem considerados plásticos em sua coloração, forma, alimentação, reprodução e adaptação aos ambientes. Em trabalhos recentes, foi sugerido que esta família está distribuída no ambiente natural de acordo com sua capacidade de tolerância a hipóxia. Além do interesse científico, os ciclídeos representam um grupo de amplo interesse comercial por conterem espécies comercializáveis tanto para alimentação, como para ornamentação.

Considerando o exposto, a presente tese teve como objetivo central verificar o perfil metabólico de várias espécies de ciclídeos da Amazônia Central relacionando tal perfil com a disponibilidade de oxigênio no ambiente; comparar o perfil metabólico de várias espécies de ciclídeos coletados na natureza; bem como os ajustes metabólicos em espécies expostas a hipóxia gradual. Com base nestes objetivos, esta tese foi estruturada em capítulos:

O primeiro capítulo refere-se a uma introdução geral da tese, com o intuito de revisar a tolerância dos ciclídeos a hipóxia e quais os principais ajustes que esse grupo de peixes

apresenta quando expostos a condições hipóxicas. Como esse assunto foi revisto por mim recentemente num capítulo de livro que está em processo de publicação, utilizamos, então, a versão traduzida daquele capítulo para compor a introdução geral dessa tese.

Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Paula-Silva, M.N., Oliveira, A.R. and Almeida-Val, V.

M. F. "Hypoxia tolerance and adaptations in fishes of the Amazon: The case of Amazon Cichlids". In. *Fish Adaptation* (B.J. Kappor and A.L. Val, eds.). Oxford. In press.

O segundo capítulo refere-se à variação da expressão e da atividade da enzima Lactato Desidrogenase em três espécies de ciclídeos ao longo de um ano de coleta na região do Catalão/AM, relacionando os resultados obtidos com a quantidade de oxigênio medida durante o período de coleta.

O terceiro capítulo trata do estudo do perfil metabólico de nove espécies de ciclídeos coletados nas proximidades de Manaus, por meio da atividade de cinco enzimas em quatro tecidos desses animais, constatando também, as reservas energéticas desses animais por meio das concentrações de glicogênio hepático e muscular.

No quarto capítulo, duas espécies de ciclídeos foram submetidas a protocolos experimentais para se determinar o grau máximo de tolerância à ausência de oxigênio bem como as principais mudanças no metabolismo após 8 horas de exposição às diferentes tensões de oxigênio.

O quinto capítulo trata das considerações finais elaboradas como intuito de resumir para os leitores as principais conclusões desta tese.

**CAPÍTULO I - Tolerância a hipóxia e as adaptações dos peixes:
O caso dos ciclídeos amazônicos**

Introdução

Ambientes Amazônicos

A bacia hidrográfica da Amazônia compreende 7 milhões de quilômetros quadrados e é considerada a maior do planeta, abrangendo inúmeros rios, lagos, paranás e igarapés que, juntos, compõem uma paisagem maravilhosa. De acordo com Goulding (1980) e Sioli (1984, 1990), o Rio Amazonas, rio principal, atinge 6.518 km de comprimento e, periodicamente, gera uma vasta área inundada, denominada várzea. Os sistemas de florestas inundadas também ocorrem sazonalmente nos rios de água preta (igapós) que junto com os sistemas de várzea, formam a principal área de alimentação para mais de 1.500 espécies de peixes (atualmente muitos autores estimam mais de 5.000 espécies de peixes habitando a Amazônia - Val & Almeida-Val, 1995; Santos & Ferreira, 1999), a fauna de peixes de água doce mais diversa do planeta (Junk et al., 1983; Val & Almeida-Val, 1995).

Os corpos d'água da Amazônia são comumente reconhecidos como hipóxicos (Gessner, 1961; Schimidt, 1973; Brinkman & Santos, 1973; Kramer et al., 1978; Junk, 1980). Os níveis de oxigênio nas águas podem variar da supersaturação durante o dia até níveis zero de oxigênio (anóxia) ao longo da noite (Almeida-Val et al., 1993). Tais variações no suprimento de oxigênio estão diretamente relacionadas ao chamado “pulso de inundação” (Junk et al., 1989) que ocorre anualmente e é responsável por mudanças nas características físicas, químicas e biológicas dos ambientes aquáticos (Goulding, 1980). De fato, essas mudanças afetam as interações entre os organismos e seus ambientes, impondo um ritmo especial para a comunidade de peixes que ali vive.

Fatores importantes para a compreensão do ambiente aquático da região amazônica são a origem e a formação de suas águas, que são responsáveis por sua composição química. Na Amazônia é possível observar corpos de água com diferentes colorações conhecidas como

águas brancas (ricas em sedimentos), pretas (ácidas e pobres em nutrientes) e claras (pobres em minerais) (Sioli, 1965; Junk, 1983).

Os processos físicos, químicos e biológicos tais como fotossíntese e respiração, difusão de luz, decomposição orgânica e difusão molecular do oxigênio, interagem de maneira complexa determinando a quantidade de oxigênio disponível nos corpos de águas doce. Estes processos apresentam peculiaridades em diferentes ecossistemas da Amazônia devido às características da bacia. De fato, variações na forma, tamanho, profundidade, intensidade de vento, cobertura de macrófitas, vegetação de borda, taxa de decomposição e presença ou ausência de comunicação direta com o rio principal, aparecem como determinantes das concentrações de oxigênio dissolvido em diferentes corpos d'água ou mesmo em diferentes partes de um mesmo corpo d' água (Junk et al., 1983; Val, 1993; Crampton, 1996).

Devido às variações nas tensões de oxigênio e outros fatores indiretamente relacionados, os peixes da Amazônia são expostos a uma variedade de pressões ambientais. Dessa forma, foram conduzidos a desenvolver, durante o processo evolutivo, uma série de ajustes que se apresentam em diferentes níveis da organização biológica, como por exemplo, etológicos, morfológicos, anatômicos, fisiológicos, metabólicos e moleculares. O resultado de tais ajustes está refletido na grande variedade de tipos de respiração, estilos de vida e ocupação de habitats preferenciais, refletindo em uma enorme plasticidade fenotípica destes peixes (Almeida-Val & Farias, 1996; Farias et al., 1997).

Diversos trabalhos têm relacionado à distribuição e abundância de espécies em áreas de várzea e outros ecossistemas amazônicos com a oscilação de oxigênio nas águas (Junk et al., 1983; Junk, 1984; Crampton, 1996). Por outro lado Botero (2000) sugere que tal

distribuição pode ocorrer ao acaso. Um dos grupos de maior interesse para esse tipo de avaliação é o grupo dos ciclídeos por possuírem respiração aquática obrigatória, dependendo unicamente de suas brânquias para troca gasosa, sem auxílio de quaisquer outros órgãos acessórios.

Ciclídeos da Amazônia

Os ciclídeos são teleósteos avançados, pertencentes à Ordem Perciformes e Superordem Acanthopterygii (Nelson, 1994). A família Cichlidae é um grupo ecologicamente diverso com 1.292 espécies validadas (Kullander, 1998) e distribui-se pela África, Madagascar, Américas Central e do Sul, México, sul da Índia e Sri Lanka (Kullander, 1988; Kullander & Nijssen, 1989). A grande maioria dessas espécies é encontrada nos lagos africanos (Lowe-McConnell, 1987; Kullander, 1998). Depois da África, a maior diversidade de ciclídeos encontra-se na América do Sul (Nelson, 1994), com cerca de 300 espécies, que correspondem a 6–10% da fauna de peixes de água doce. Aproximadamente 150 espécies são encontradas na bacia amazônica (Lowe-McConnell, 1991), representando o terceiro grupo mais abundante da ictiofauna amazônica (Géry, 1984).

Os ciclídeos constituem uma família de peixes de amplo interesse científico por serem considerados plásticos em sua coloração, forma, alimentação, reprodução e adaptações aos mais diversos ambientes. Vários são os trabalhos realizados com peixes desta família quanto à sua distribuição geográfica e características genéticas-evolutivas na África e América do Sul (Stiassny, 1991; Kornfield, 1991; Lowe-McConnell, 1969, 1991; Ribbink, 1991; Greenwood, 1991).

Os ciclídeos são também importantes economicamente, sendo comercializados como fonte de alimento e como peixes ornamentais (Chellapa et al., 1999). As espécies mais

consumidas são o tucunaré (*Cichla* spp) e o acará-açu (*Astronotus ocellatus*). As espécies mais capturadas para fins ornamentais são os apistogramas (*Apistogramma* spp), os jacundás (*Crenicichla* spp) e os discos (*Symphysodon* spp). Dentre os peixes ornamentais, os ciclídeos são o terceiro grupo mais comercializado no Rio Negro (Chao, 2001)

Os ciclídeos possuem um amplo espectro alimentar (Goulding, 1980). Por exemplo, a espécie *Cichlasoma* alimenta-se de algas epifíticas e de vegetação aquática, enquanto que a *Satanoperca jurupari* alimenta-se de larvas de insetos, de microcrustáceos e de sementes (Machado, 1983; Reis & Caramachi, 1999) e os maiores ciclídeos da Amazônia, que pertencem ao gênero *Cichla*, são carnívoros (Knoöpel, 1970).

Os ciclídeos são peixes que competem por território e pelas fêmeas durante a fase reprodutiva e exibem um amplo espectro de comportamentos reprodutivos (Keenleyside, 1991; Chellapa et al., 1999). Normalmente, duas formas de cuidado parental podem ser identificadas nesse grupo: os que mantêm sua prole na boca, que são poligâmicos ou monogâmicos e apenas as fêmeas carregam na boca os ovos fertilizados e os recém eclodidos (*Aequidens*, *Geophagus*, *Gymnogeophagus* e *Satanoperca*) (Loiselle, 1985); e os que colocam sua prole no substrato, que usualmente são monogâmicos e ambos os sexos tomam conta dos ovos (*Astronotus*, *Cichla*, *Cichlasoma*, *Pterophyllum* e *Symphysodon*) (Loiselle, 1985). Poucas espécies combinam os dois métodos, em geral, os ovos são colocados e cuidados no substrato, mas a prole recém nascida (ou recém eclodida) é carregada na boca de seus pais (Nelson, 1994). Em todas as espécies de ciclídeos, a prole é protegida por um ou por ambos progenitores, desde a fertilização até a independência dos filhotes, que consiste num período de pelo menos três a quatro semanas, período relativamente longo para muitas espécies (Keenleyside, 1991).

Kullander (1986) e Lowe-McConnell (1991) têm revisto a fauna dos ciclídeos Neotropicais e a ecologia dos ciclídeos Sul Americanos. A fauna brasileira possui vários grupos com especializações marcantes para viverem sob condições ambientais especiais (Chellapa et al., 1999). Muitos desses ciclídeos foram descritos vivendo em diversos habitats, tais como praias, igapós, lagos, regiões pantanosas e algumas espécies também podem ser encontradas em águas abertas dos rios (Lowe-McConnell, 1991). Em muitos desses habitats as águas são hipóxicas, portanto esses animais foram obrigados a ajustar seu metabolismo para poderem sobreviver em tal condição ambiental.

Recentes estudos têm descrito os ciclídeos Neotropicais como um clado monofilético, possuindo uma rápida taxa de evolução, baseada num nível significativamente alto de variação genética comparada com a sua contraparte africana (Farias et al., 1999). Muitos autores consideram sua facilidade de se adaptar a ambientes heterogêneos, bem como a sua rápida radiação adaptativa, como uma causa dos inúmeros eventos de especiação (Fryer & Iles, 1972; Kornfield, 1979, 1984; Stiassny, 1991). Considerados esses aspectos, este grupo tem sido descrito como um grupo extremamente plástico (Stiassny, 1991; Almeida-Val et al., 1999b).

Tolerância dos ciclídeos a hipóxia

A tolerância a hipóxia nos peixes, diferente das outras linhagens de vertebrados, teve, provavelmente, origens evolutivas independentes, considerando a variedade de características adaptativas já descrita nos peixes, particularmente nos peixes tropicais, em resposta à baixa disponibilidade de oxigênio na água (revisto por Val & Almeida-Val, 1995; Almeida-Val & Hochachka, 1995; Almeida-Val et al., 1999a). O conhecimento acumulado sobre as poucas

espécies de peixes tropicais estudadas até o presente momento nos leva a supor que a tolerância a hipóxia é considerada uma característica comum em peixes da Amazônia (Val, 1993; Almeida-Val et al., 1993; Almeida-Val et al., 1999a).

Muitas espécies desenvolveram modelos alternativos de respiração para sobreviverem a tais condições. Como exemplo podemos citar, a respiração aérea obrigatória presente na pirambóia (*Lepidosiren paradoxa*), o único peixe pulmonado do continente americano, no piarucu (*Arapaima gigas*) e no poraquê (*Electrophorus electrorus*), e a respiração aérea facultativa que é encontrada no acari-bodó (*Liposarcus pardalis*), no tamoatá (*Hoplosternum littorale*), no muçum (*Synbranchus marmoratus*) e em outras espécies (revisito por Val & Almeida-Val, 1995).

Algumas espécies não apresentam nenhuma modificação anatômica, em vez disso, apresentam a respiração na superfície aquática (RSA), o que lhes permite explorar a camada superficial dos corpos d'água, rica em oxigênio. O fenômeno RSA apareceu independentemente em vários grupos, incluindo os Osteglossídeos, Caracídeos e Ciclídeos (Val, 1996), o que pode ser considerado como uma convergência evolutiva ou homoplasia. Algumas outras espécies de peixes desenvolveram a habilidade de manter bolhas de ar em suas cavidades bucais durante períodos de escassez de oxigênio, com o intuito de aumentar o conteúdo de oxigênio da água que passa pelas brânquias ou ainda para aumentar a flutuabilidade na superfície da água (Rosenberger & Chapman, 2000). O aparecimento da respiração aérea e de outras características que melhoram a captação do oxigênio na água pode ter ocorrido de maneira independente, como resposta a um único fator: escassez de oxigênio. Portanto, é provável que tenham surgido em diferentes períodos na era geológica,

conforme eventos de queda de oxigênio acoplados à diferenciação e evolução de cada grupo filogenético.

De acordo com Kramer & McClure (1982), a respiração na superfície aquática (RSA) permite aos animais tolerarem, por muito mais tempo, condições de baixo teor de oxigênio. Experimentos realizados por Chapman et al. (1995) com várias espécies de ciclídeos do Lago Victoria, na África, demonstraram que as espécies, quando expostas a condições de hipóxia ($0,2 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) por 30 minutos, não perdem o equilíbrio quando têm o acesso à superfície; entretanto não resistem a essas condições quando não têm acesso à superfície. Almeida-Val et al. (1999b) observaram, também, que a espécie amazônica *Astronotus ocellatus* quando exposta à 30 mmHg ($\cong 1,5 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) pode sobreviver indefinidamente quando há acesso à superfície.

A respiração na superfície aquática é uma adaptação comportamental muito importante para muitas espécies de peixes, principalmente para aquelas espécies de respiração estritamente aquática, como é o caso dos ciclídeos. No entanto, outras respostas em diferentes níveis metabólicos também são encontradas nesses animais, como forma de se ajustarem a hipóxia ambiental. A eficácia de tais respostas é responsável pela capacidade de tolerância a hipóxia das diferentes espécies de ciclídeos e de outras famílias. A espécie *Astronotus ocellatus* é um exemplo de um dos ciclídeos mais tolerantes à escassez de oxigênio no ambiente, uma vez que pode tolerar hipóxia severa por meio da redução quase total de suas atividades metabólicas (Muusze et al., 1998). De acordo com Muusze et al. (1998), esta espécie tolera cerca de 16 horas em concentrações de oxigênio inferiores a $0,4 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ e 6 horas em completa anóxia a 28°C . Com base nesses resultados, os autores sugeriram que a principal resposta do *A. ocellatus* a hipóxia ambiental é a supressão das taxas metabólicas,

enquanto que em hipóxia severa ou em anóxia a compensação parcial é obtida através da glicólise anaeróbica (Muusze et al., 1998).

Embora existam vários ciclídeos que se apresentam tolerantes a hipóxia, como é o caso da espécie *A. ocellatus* e dos ciclídeos do Lago Victoria, muitos são moderadamente ou até mesmo pouco tolerantes à condição hipóxica. Chippari-Gomes et al. (2000) estudando quatro espécies do Rio Negro, Amazonas, expostas a estresse hipóxico ($1,5\text{mgO}_2\cdot\text{L}^{-1}$) observaram que três (*Heros* sp., *Uaru amphiacanthoides* e *Geophagus* aff. *altifrons*) das quatro espécies estudadas apresentaram-se moderadamente tolerantes ao estresse hipóxico por um período médio de 70 minutos sem acesso à superfície, enquanto que a quarta espécie (*Satanoperca* aff. *jurupari*) não resistiu mais que 20 minutos nessa concentração de oxigênio. Contudo, durante nossas coletas (capítulo II) capturamos esta espécie em ambiente natural (floresta inundada, Lago do Catalão – Amazonas) em concentrações de oxigênio inferiores à esta testada em laboratório (resultados apresentados no capítulo II).

Além disso, a tolerância também pode variar de acordo com o tamanho do animal (Almeida-Val et al., 2000). Esses autores compararam espécimes de diferentes tamanhos de *A. ocellatus* (variando de 7,5 a 21,5cm) e analisaram as habilidades de sobrevivência a hipóxia. A tolerância desses animais é diretamente relacionada com o aumento da massa corporal (Figura 1). As diferenças entre os juvenis e os adultos são correlacionadas com o aumento da taxa metabólica de rotina (RMR) e com a diminuição da taxa metabólica específica (SMR). Esses animais também apresentam regulações no nível enzimático, bem como diferenciação na expressão de isozimas no cérebro, que estão relacionadas ao tamanho e à tolerância a hipóxia (Almeida-Val et al., 1999b).

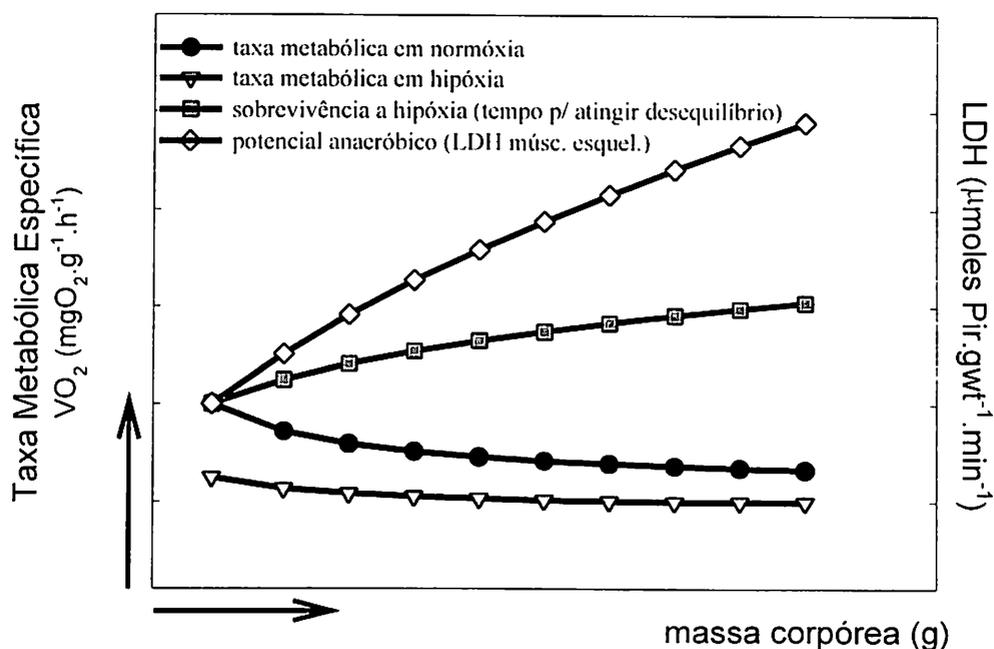


Figura 1. Representação diagramática da relação entre massa corporal (g) e taxa metabólica específica; taxa metabólica em hipóxia; sobrevivência a hipóxia e potencial anaeróbico específico, obtido por meio dos níveis de LDH em músculo esquelético ($U\text{ gt}^{-1}$) do ciclídeo *Astronotus ocellatus* (modificado de Almeida-Val et al., 2000).

Adaptação e regulação isozímicas

Estudos isozímicos em peixes têm sido considerados como excelente ferramenta para retratar a relação mantida entre o animal e o ambiente que habita (Whitt, 1987; Kettler & Whitt, 1986). A distribuição diferencial das isozimas, pertencentes a qualquer sistema enzimático ou a qualquer rota metabólica nos diferentes órgãos e tecidos dos animais, reflete os ajustes metabólicos que ocorrem durante períodos especiais, tais como estresse, crescimento, migração, maturação sexual, etc. A escolha do sistema isozímico a ser estudado se baseia, em geral, no tipo de parâmetro e ajuste metabólico que se deseja analisar.

O sistema isozímico da lactato desidrogenase (LDH: E.C. 1.1.1.27) é um dos sistemas mais bem estudados para a maioria dos vertebrados e tem sido considerado uma das melhores

ferramentas para estudos de ajustes metabólicos a variações nos parâmetros ambientais ou das condições intrínsecas das espécies (Almeida-Val et al., 1985; 1999a).

Plasticidade Fenotípica

Durante a história geológica das bacias hidrográficas brasileiras várias condições ambientais foram modificando-se, conduzindo as espécies de peixes a uma série de ajustes biológicos em seus padrões metabólicos, o que possibilitou a aquisição de grande diversificação genética para a maioria das espécies (Lundberg, 1998). Essa diversificação permitiu aos animais uma plasticidade fenotípica, que propiciou sua sobrevivência em habitats heterogêneos e mutáveis. A plasticidade fenotípica (ou somática) pode ser definida como os limites da variação morfológica e fisiológica na expressão de um dado genótipo quando exposto a mudanças nas condições ambientais (Walker, 1997).

Os peixes, em geral, apresentam grande plasticidade fenotípica, modulando a expressão de muitos genes de acordo com mudanças ambientais (Whitt, 1987). Os peixes coordenam sistemas para detectar alterações ambientais a fim de modularem sua fisiologia e sua bioquímica. Catecolaminas, cortisol, o próprio oxigênio, e o fator de indução a hipóxia (HIF), entre outros, possuem papel fundamental na modulação da tolerância a hipóxia (Randall & Perry, 1992; Hochachka, 1996). Estes aspectos são muito pouco descritos em peixes da Amazônia.

Alguns peixes da Amazônia têm demonstrado ajustes no perfil metabólico da enzima lactato desidrogenase (LDH) por meio da regulação dos seus níveis enzimáticos (ajuste macro), ajustes nos níveis de suas isozimas e na sua distribuição entre os tecidos (ajuste fino) (Almeida-Val, 1999). Por exemplo, as espécies *Cichlasoma amazonarum*, *Astonotus ocellatus* e *Cichla monoculus* apresentaram alterações na distribuição das isozimas da LDH no músculo

cardíaco, que estão relacionadas à disponibilidade de oxigênio do ambiente em que vivem (Almeida-Val et al., 1995).

A plasticidade genética e fisiológica dos peixes amazônicos, associadas com a dinâmica, tamanho, diversidade de habitats e com o caráter aberto da bacia, resultou na enorme diversidade de espécies de peixes, a qual não apresenta paralelo no planeta (Val et al., 1996). Vários peixes que são respiradores estritamente aquáticos, tais como os ciclídeos, apresentam um alto grau de plasticidade fenotípica, que está relacionado às inúmeras e extremas condições ambientais em que vivem (Almeida-Val et al., 1995).

Ajustes metabólicos

Os peixes têm desenvolvido vários ajustes metabólicos para se ajustarem aos episódios de hipóxia ambiental. As principais estratégias de defesa são a ativação do metabolismo anaeróbico e a supressão da demanda de energia por meio de processos oxidativos (Almeida-Val & Hochachka, 1995). Almeida-Val et al. (1992, 1993, 1995) revelaram que ambas as estratégias ocorrem em peixes de respiração aquática e várias espécies de ciclídeos podem ser consideradas ótimos exemplos de cada estratégia. A supressão metabólica, associada com a regulação da glicólise anaeróbica, ajudaria o peixe a sobreviver por longos períodos a hipóxia. Além disso, ajustes para melhorar a tomada de oxigênio podem ocorrer simultaneamente com outros ajustes. Por isso, diferentes arranjos metabólicos podem ser observados em diferentes tecidos. Alterações nas atividades enzimáticas dos diversos tecidos, nos parâmetros hematológicos, níveis de fosfatos intraeritrocitários e frações hemoglobínicas são também estratégias adotadas pelos peixes para se ajustarem ao meio hipóxico (Val, 1993, Val et al., 1985; 1992). Há muito se acredita que tais variações funcionais foram desenvolvidas para enfrentar e satisfazer os requisitos metabólicos (Riggs, 1976).

As concentrações dos metabólitos plasmáticos, tais como glicose, lactato e ácidos graxos, também sofrem alterações quando os peixes estão expostos ao estresse hipóxico. Normalmente, as concentrações de lactato plasmático aumentam nos animais expostos a hipóxia. Esse aumento do lactato deve-se à ativação do metabolismo anaeróbico (Dunn & Hochachka, 1986; Van Raaij et al., 1996) nos diversos tecidos, e este eflui dos tecidos para o sangue (Turner et al., 1983). Essa resposta metabólica tem sido observada em várias espécies da Amazônia. Como exemplo, o ciclídeo *Astronotus ocellatus* apresentou aumento significativo nas concentrações plasmáticas de lactato quando exposto a 8 e 6% de saturação de oxigênio (Muusze et al., 1998). Os níveis de lactato plasmático das espécies *Heros* sp, *Uaru amphiacanthoides*, *Geophagus* aff. *altifrons* e *Satanoperca* aff. *jurupari* aumentaram quando os animais foram expostos a 20% (1,5 mgO₂/L) (Figura 2) (Chippari-Gomes et al., 2000). Resultados similares foram observados na espécie *Salmo gairdneri* exposta a 24,8% (Van Raaij et al., 1996). Para a maioria das espécies, o lactato produzido durante exposição a hipóxia é rapidamente oxidado quando o oxigênio se torna novamente disponível (Mommsen, 1984).

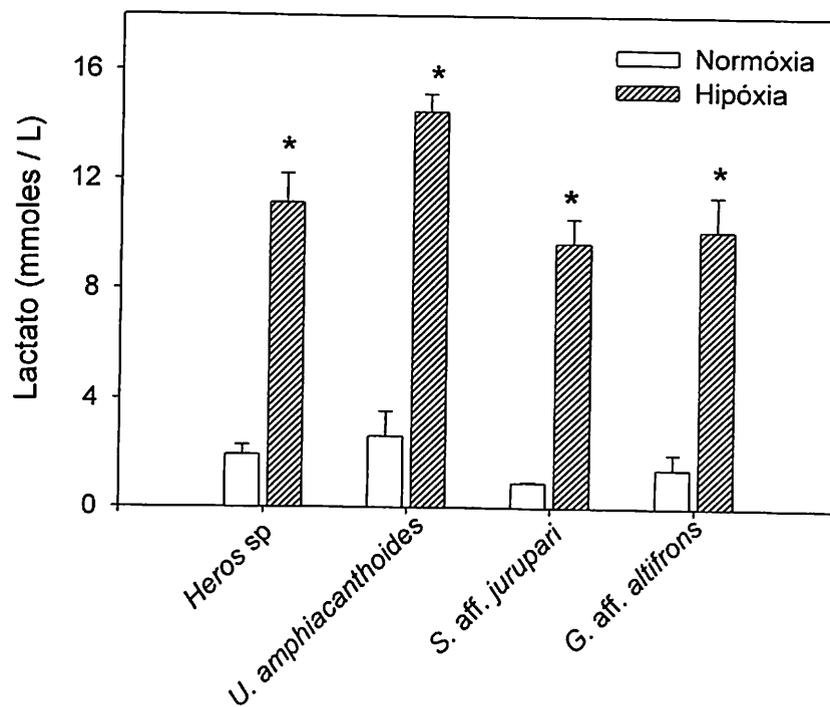


Figura 2. Lactato plasmático de quatro espécies de ciclídeos (n = 6, média e SEM) expostos a normóxia (6,0mg O₂/L) e hipóxia (1,5mgO₂/L) a 28°C. O símbolo (*) indica diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) (*P < 0,05) (Chippari-Gomes et al., 2000).

Alterações nos níveis enzimáticos

As duas estratégias de defesa identificadas nos peixes, ativação do metabolismo anaeróbico e supressão da demanda de energia, dependem de ajustes na atividade de muitas enzimas marcadoras de maneira específica em cada tecido e em cada espécie. A literatura que demonstra tais ajustes enzimáticos nos peixes é extensa. Contudo, são poucos os trabalhos realizados com peixes amazônicos. Almeida-Val et al. (1995) observaram redução significativa na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no fígado, coração e cérebro do ciclídeo *Cichlasoma amazonarum* exposto a hipóxia severa (± 30 mmHg) por um período de 51 dias. Por outro lado, nenhuma modificação da atividade da enzima LDH foi observada

no músculo esquelético. Resultados similares foram encontrados quando espécimes de *Fundulus* sp (killifish) foram expostos a hipóxia durante 4 semanas (Greaney et al., 1980). As atividades da LDH, malato desidrogenase (MDH) e glicose fosfato isomerase (PGI) foram reduzidas no fígado, mas nenhuma alteração foi observada no músculo do *Fundulus* sp (Greaney et al., 1980).

A supressão das atividades da LDH em alguns peixes, como o caso do *Cichlasoma amazonarum*, pode ser devida a uma supressão geral das rotas anaeróbicas como um resultado da redução total do metabolismo desta espécie de peixe (Almeida-Val et al., 1995).

A supressão do metabolismo anaeróbico foi observada no músculo esquelético do ciclídeo *Symphysodon aequifasciatus* exposto a concentrações de oxigênio inferiores a $0,75\text{mgO}_2\text{L}^{-1}$, indicado pela redução da atividade da enzima lactato desidrogenase. A razão LDH/MDH nos peixes expostos ao gradiente de hipóxia demonstra que o coração desses animais está baseado no metabolismo da glicose, aumentando seu potencial anaeróbico conforme a hipóxia aumenta (capítulo IV).

Segundo Driedzic & Almeida-Val (1996) e West et al. (1999), as espécies de peixes amazônicas, geralmente, possuem baixa dependência do metabolismo aeróbico de ácidos graxos na produção de ATP e alta dependência do metabolismo anaeróbico no coração. Esses autores descreveram baixos níveis da enzima oxidativa citrato sintase (CS) no músculo cardíaco das espécies *Colossoma macropomum* (tambaqui), *Brycon cephalus* (matrinchã) e *Astronotus ocellatus* (acará-açu) e altos níveis da enzima hexoquinase (HK), enzima chave do metabolismo glicolítico. Estes dados sugerem que o músculo cardíaco desses animais mantém seu metabolismo sustentado principalmente pela glicólise anaeróbica, envolvendo a mobilização da glicose e a produção de lactato. A razão LDH/CS, obtida por meio desses

dados, sugere uma alta dependência do metabolismo anaeróbico, com exceção de algumas espécies para as quais os valores de LDH e CS têm um balanço semelhante a peixes de região temperada (Tabela 1). Uma baixa regulação de enzimas oxidativas é uma característica comum dos peixes da Amazônia tolerantes a hipóxia e pode ser vista como uma resposta de defesa a hipóxia. Isto tem sido observado em muitos tecidos e em muitas espécies de peixes por mais de duas décadas (Hochachka & Randall, 1978; Almeida-Val & Hochachka, 1995; Driedzic & Almeida-Val, 1996).

Tabela 1. Níveis enzimáticos no músculo cardíaco de peixes da Amazônia e da região do hemisfério Norte.

Espécies	CS	LDH	PK	LDH/CS	PK/CS
<i>U. amphiacanthoides</i> ¹	21,1 ± 1,3	34,4 ± 17,5	40,7 ± 5,9	1,63	1,9
<i>G. aff. altifrons</i> ¹	18,7 ± 18,7	219,1 ± 22,7	69,1 ± 6,8	11,7	3,7
<i>S. aff. jurupari</i> ¹	14,6 ± 2,0	86,9 ± 6,9	16,9 ± 2,4	5,9	1,2
<i>A. ocellatus</i> ²	10,4 ± 0,7	134 ± 37,4	46,2 ± 8,1	12,9	4,4
<i>C. macropomum</i> ²	13,9 ± 3,0	573 ± 113	73,5 ± 6,9	41,2	5,3
Yellow Perch ²	26,4 ± 2,3	255 ± 11	158,7 ± 9,9	9,7	6,0
Rainbow trout ²	47,8 ± 3,1	307 ± 18	71,2 ± 2,6	6,4	1,5

Nota: Os valores são expressos em média ± SEM ($\mu\text{moles}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$); os ensaios foram realizados a 22-25°C. O número 1 indica a referência Chippari-Gomes et al. (2000) e o número 2 a referência West et al. (1999).

Inibição ao substrato pela LDH e metabolismo anaeróbico

Desde a origem do conceito das isozimas e do reconhecimento de sua importância, as isozimas – formas moleculares múltiplas das enzimas (Market & Möller, 1959) – têm sido

usadas como ferramentas poderosas em análises moleculares, bioquímicas, genéticas, morfológicas, comportamentais e em processos evolutivos (Nevo, 1990). Como produto de vários genes, as isozimas podem operar individualmente ou em organizações de multilocus, devido à sua diversidade estrutural e suas inúmeras funções nos níveis molecular e ecológico.

A distribuição tissular de qualquer isozima reflete a expressão gênica, que pode ser regulada de acordo com as necessidades metabólicas e características ambientais (Almeida-Val et al., 1995). Muitos autores descreveram modificações nos padrões isozímicos da LDH nos peixes que rotineiramente são sujeitos a hipóxia ou estresse anóxico (French & Hochachka, 1978; Kettler & Whitt, 1986; Val et al., 1998; Almeida-Val et al., 1995; 1999a).

Em vertebrados, a LDH é composta por duas subunidades, LDH-A e LDH-B, que são codificadas por dois genes. A subunidade A é típica de músculo esquelético, tecido predominantemente anaeróbico e é muito eficiente na conversão de piruvato a lactato durante períodos de escassez de oxigênio. Já a subunidade B é típica de músculo cardíaco, tecido tipicamente aeróbico e é inibida por altas concentrações de piruvato, evitando que o coração acumule altas concentrações de lactato. A combinação dessas duas subunidades resulta em cinco isozimas, as quais exibem propriedades diferentes. Essas isozimas são expressas diferencialmente nos diferentes tecidos de acordo com as necessidades energéticas, disponibilidade de oxigênio, e funções fisiológicas (Markert & Holmes, 1969). O aumento na expressão da isozima da LDH-A nos tecidos considerados tipicamente aeróbicos, tais como coração e cérebro, pode ser detectado em animais expostos a hipóxia ou anóxia (Hochachka & Storey, 1975). E ainda, alguns experimentos têm mostrado redução da expressão LDH-B em tais tecidos aeróbicos depois da exposição a hipóxia, que combinado com aumento da LDH-A, resulta numa melhor capacidade anaeróbica (Almeida-Val et al., 1995).

Os sistemas isozímicos, especialmente o da LDH, têm sido alvo de muitos estudos em peixes da região amazônica (Almeida-Val & Val, 1993; Almeida-val et al., 1992). Dois modelos diferentes são sugeridos para a distribuição da LDH em peixes: (i) a predominância da isozima B₄ no coração, indicando manutenção do metabolismo aeróbico a baixas taxas durante episódios de hipóxia; e (ii) baixa expressão do gene LDH-B* combinado com uma forte expressão do gene LDH-A* em todos os tecidos, sugerindo ativação do metabolismo anaeróbico durante os episódios de hipóxia (Almeida-Val et al., 1993). A redução da expressão do gene LDH-B* no coração foi descrita primeiramente em teleósteos avançados da região temperada como o linguado - “flatfish” (*Pleuronectes platessa*) (Market & Holmes, 1969) e mais tarde observado em “stickleback” (*Gasterosteus aculeatus*) por Rooney & Ferguson (1985). Estudos prévios com LDH de truta arco-íris (Moon & Hochachka, 1971) e outros sistemas isozímicos de peixes (Hochachka, 1965; Baldwin & Hochachka, 1970; Schwantes & Schwantes, 1982a,b; DeLuca et al., 1983; Almeida-Val et al., 1995; Farias et al., 1997) indicam que a expressão em diferentes enzimas depende de parâmetros ambientais. Almeida-Val et al. (1995) mostraram que a distribuição tissular da LDH em ciclídeos está relacionada com a habilidade desses animais em tolerar hipóxia ambiental, expressando plasticidade fenotípica no coração e, portanto, revelando os seus habitats preferenciais. Um bom exemplo é a presença de dois modelos de distribuição da LDH no coração do ciclídeo *Cichlasoma amazonarum*. Dependendo da disponibilidade de oxigênio em seu habitat, os animais irão apresentar predominância da isozima B₄ ou da isozima A₄ no coração (Almeida-Val et al., 1995). Este ciclídeo quando é exposto a hipóxia severa (± 30 mmHg) por um longo período (51 dias), apresenta mudanças significativas na distribuição da LDH: a isozima A₄ aumenta sua expressão no coração e no cérebro, enquanto que a isozima B₄ aumenta no

fígado e desaparece em músculo esquelético. No entanto, as mudanças mais significativas podem ser observadas no cérebro, o qual adota a cinética do tipo muscular, detectada por meio de ensaios enzimáticos, resultado dessa nova distribuição das isozimas da LDH (Almeida-Val et al., 1995; Val et al., 1998).

Outras espécies, tais como *Astronotus ocellatus*, *Cichla monoculus* e *Satanoperca aff. jurupari* apresentam o mesmo modelo de distribuição descrito para *Cichlassoma amazonarum* exposto a hipóxia (Figura 3). Por outro lado, as espécies *Geophagus* sp., *Pterophyllum* sp., *Acarichthys heckelli*, *Crenicichla* sp., *Hypselecara* sp., e *Symphysodon* sp. apresentam apenas o modelo conhecido como bidirecionalmente divergente, ou seja, ocorre a predominância da isozima A₄ no músculo esquelético e da isozima B₄ no coração. Outras espécies apresentaram redução da expressão da LDH-B* no tecido cardíaco, refletindo um moderado ajuste metabólico. Essa preferência anaeróbica foi encontrada nas espécies *Astronotus crassipinis*, *Heros* sp., *Heros severum*, *Acaronia nassa* e *Geophagus cf. harreri* (Almeida-Val et al., 1995).

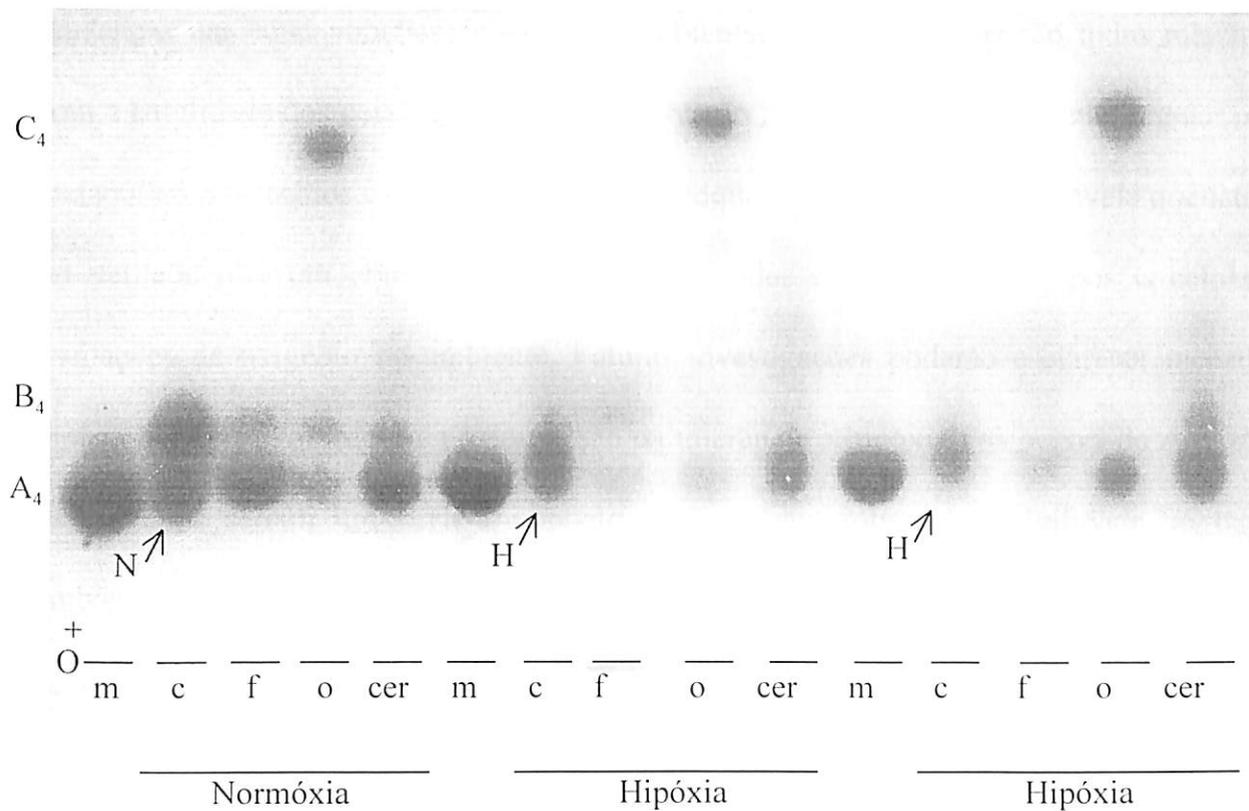


Figura 3. Eletroferograma mostrando a distribuição da LDH em vários tecidos: músculo branco (m), coração (c), fígado (f), olho (o) e cérebro (cer) do ciclídeo *Satanoperca aff. jurupari* coletado em condições de normóxia (N) e hipóxia (H) (A.R. Chippari-Gomes e V.M.F. Almeida-Val, dados não publicados). Setas indicam mudanças no padrão do coração em indivíduos em normóxia e hipóxia.

Essa plasticidade na regulação da expressão dos genes LDH-A* e LDH-B* encontrada nos ciclídeos da Amazônia indica a capacidade desses animais em basear seu metabolismo na glicólise anaeróbica e na expressão do locus LDH-A* quando há escassez de oxigênio. Dessa forma, tal plasticidade oferece a esses animais a habilidade de visitar ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio enquanto procuram por alimento, sítios de reprodução, etc.

Conclusões

Mostramos neste capítulo que os sistemas isozímicos podem ser valiosos como indicadores das preferências metabólicas e de ajustes presentes em peixes expostos a

mudanças nas concentrações de oxigênio ambiental. Essas respostas são todas relacionadas com a habilidade dos peixes em regular a expressão gênica e, por conseguinte, regular o perfil metabólico nos tecidos específicos. Recente enfoque nesse tipo de estudo revela que isto pode ser verdade para um grande número de genes, todos relacionados a respostas celulares às oscilações de oxigênio no ambiente. Futuras investigações poderão esclarecer mecanismos moleculares da evolução e da manutenção da tolerância a hipóxia nos peixes da Amazônia, e os ciclídeos seriam um perfeito modelo para estudos sobre a sensibilidade ao oxigênio ambiental.

Bibliografias Citadas

- Almeida Val, V.M.F. 1999. Phenotypic plasticity in amazon fishes: water versus air breathing. In: Mittal, A.K.; Eddy, F.B.; Datta Munshi, J.S. (Eds.). *Water / Air Transition in Biology*. Oxford & IBH Publishing CO. PVT. LTD. New Delhi, Calcutta, 102-115.
- Almeida Val, V.M.F. & Val, A.L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 105B: 21-28.
- Almeida Val, V.M.F. & Hochachka, P.W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. In: Hochachka, P.W.; Mommsen, T. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Environ. and Ecol. Biochem.* Elsevier Science, Amsterdam, 45-55.
- Almeida Val, V.M.F. & Farias, I.P. 1996. 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*. INPA. Manaus. Brazil, 257-271.
- Almeida Val, V.M.F, Paula-Silva, M.N., Caraciolo, M.C.M., Mesquita, L.S. B., Farias, I.P., Val, A.L. 1992. LDH isozymes in Amazon fish. III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalminidae (Teleostei: Ostariophysi). *Comp. Biochem. Physiol.*, 103B: 119-125.
- Almeida Val, V.M.F., Val, A.L., Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes status of an under-explored biological "goldmine". In: Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Van den Thillart, G. (Eds.), *Surviving Hypoxia Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press, Boca Raton, 435-445.

- Almeida Val, V.M.F., Farias, I.P., Silva, M.N.P., Duncan, W.P. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia in Amazon Cichlids. *Braz. J. Med. Biochem. Res.*, 28: 1257-1263.
- Almeida Val, V.M.F., Val, A.L., Walker, I. 1999a. Long and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O₂-levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In: Val A. L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), *Biology of tropical fishes*. INPA, Manaus, pp.185-203.
- Almeida Val, V.M.F., Paula-Silva, M.N., Duncan, W.P., Lopes, N.P., Val, A.L., Land, S. 1999b. Increase of anaerobic potential during growth of an Amazonian cichlid. *Astronotus ocellatus*. Survivorship and LDH regulation after hypoxia exposure. In: Val A. L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), *Biology of tropical fishes*. INPA, Manaus, pp.437-448.
- Almeida Val, V.M.F., Val, A.L., Duncan, W.P., Souza, F.C.A., Paula-Silva, M.N., Land, S. 2000. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 125B: 219-126.
- Baldwin, J. & Hochachka, P.W. 1970. Functional significance of isozymes in the thermal acclimatization: acetylcholinesterase from trout brain. *Biochem. J.*, 116: 883-887.
- Botero, J.I.S. 2000. Distribuição espacial da ictiofauna associada às raízes de macrófitas em relação ao oxigênio dissolvido, temperatura e tipo de planta na Amazônia Central. MSc. Dissertação. Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Brasil, 47p.
- Brinkman, W.L.F. & Santos, U.M. 1973. Heavy fish-kill in unpolluted floodplain-lakes of Central Amazon, Brazil. *Conservation Biology*, 5(2): 146-147.

- Chao, N.L. 2001. The fishery, diversity, and conservation of ornamental fishes in the Rio Negro basin, Brazil – A review of Project Piaba (1989-99). In: Chao, N.L.; Petry, P.; Prang, G.; Sonneschien L.; Tlusty, M. (Eds.), Conservation and management of ornamental fish resources of the Rio Negro basin, Amazonia, Brazil – Project Piaba. EDUA, Manaus, 161-204.
- Chapman, L.J., Kaufman, L.S., Chapman, C., MacKenzie, E. 1995. Hypoxia tolerance in twelve species of East African cichlids: potential for low oxygen refuge in Lake Victoria. *Conservation Biology*, 9: 1274-1288.
- Chellapa, S., Yamamoto, M.E., Cacho, M.S.R.F. 1999. Reproductive behavior and ecology of two species of Cichlid fishes. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), *Biology of tropical fishes*. INPA, Manaus, 113-126.
- Chippari-Gomes, A.R., Paula-Silva, M.N., Val, A.L., Bicudo, J.E.P.W., Almeida-Val, V.M.F. 2000. Hypoxia tolerance in amazon cichlids. In: Almeida-Val, V.M.F.; Gonzales, R.; MacKinlay, D. (Eds.), *Evolution of Physiological and Biochemistry Traits in Fish* Proceedings in Int. Symp. Congress on the Biology of Fish, Aberdeen, Scotland. 43-54.
- Crampton, W.G.R. 1996. The electric fish of the upper Amazon: ecology and signal diversity. Ph Thesis. University of Oxford, England, 223p.
- De Luca, P.H., Schwantes, M.L.B., Schwantes, A.R. 1983. Adaptive features of ectothermic enzymes. IV. Studies on malate dehydrogenase of *Astyanax fasciatus* (Characidae) from Lobo Reservoir (São Carlos, São Paulo, Brazil). *Comp. Biochem. Physiol.* 47B: 315-324.

- Driedzic, W.R. & Almeida Val, V.M.F. 1996. Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *J. Exp. Zool.*, 274: 327-333.
- Dunn, J.F. & Hochachka, P.W. 1986. Turnover rates and lactate in rainbow trout during acute hypoxia. *Can. J. Zool.*, 65:1144-1148.
- Farias, I.P., Paula-Silva, M.N., Almeida Val, V.M.F. 1997. No co-expression of LDH-C in Amazon Cichlids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117B: 315-319.
- Farias, I. F., Ortí, G., Sampaio, I., Schneider, H., Meyer, A. 1999. Mitochondrial DNA phylogeny of the family cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage. *J. Mol. Evol.*, 48:701-711.
- French, C.J. & Hochacha, P.W. 1978. Lactate dehydrogenase isoenzymes from heart and white muscle of water-breathing and air-breathing fish from the Amazon. *Can. J. Zool.*, 56: 769-773.
- Fryer, G. & Illes, T.D. 1972. The cichlid fishes of the Great Lakes of Africa: their biology and evolution. Oliver and Boyd, London.
- Géry, J. 1984. The fishes of Amazonia. In: Sioli, H (Ed.), *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Junk, Dordrecht, 15-46.
- Gessner, F. 1961. Der Sauerstoffvhaushalt des Amazonas. *Int. Ver. Ges. Hydrobiol.*, 46: 542-561.
- Goulding, M. (1980). *The fishes and the forest. Explorations in Amazon natural history*. University of California press. 280p.

- Greaney, G.S., Place, A.R., Cashoon, R.E., Smith, G., Powers, D.A. 1980. Time course of changes in enzymes activities and blood respiratory properties of Killifish during long term acclimation to hypoxia. *Physiol. Zool.*, 53: 136-144.
- Greenwood, P.H. 1991. Speciation. In: Keenleyside, M.H.A. (Ed.), *Cichlid Fishes – Behaviour, ecology and evolution*. Chapman & Hall, London. 86-102.
- Hochachka, P.W. 1965. Isozymes in metabolic adaptation of a poikilotherm: Subunit relationships in lactate dehydrogenases of goldfish. *Arch. Biochem. Biophys.*, pp 111: 96-103.
- Hochachka, P.W. & Storey, K.B. 1975. Metabolic consequences of diving in animals and man. *Science*, 187:613-621.
- Hochachka, P.W. & Randall, D.J. 1978. Alpha-Helix Amazon expedition, September-October 1976. *Can. J. Zool.*, 56: 713-716.
- Hochachka, P.W. 1996. Oxygen sensing and metabolic regulation: short, intermediate, and long term roles. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*, INPA, Manaus. 233-256.
- Junk, W.J. 1980. Áreas inundáveis - um desafio para a limnologia. *Acta Amazônica*, 10(4): 775-796.
- Junk, W.J. 1983. Aquatic habitats in Amazonia. *The Environmentalist*. 3(5): 24-35.
- Junk, W.J. 1984. Ecology, fisheries and fish culture in Amazonia. In: Sioli, H. (Ed.), *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, 443-476.

- Junk, W.J., Soares, G.M., Carvalho, F.M. 1983. Distribution of fish species in a lake of the Amazon river floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana*, 7(4): 39-431.
- Junk, W.J., Bailey, P.B., Sparks, R.E. 1989. The flood-pulse concept in river-floodplain systems. In: Dodge, D. (Ed.), *Proc. Int. Larger River Symp. Can. Spec. Publ. Fish Aquat. Sci.*, 106-127.
- Keenleyside, M.H.A. 1991. Parental care. In: Keenleyside, M.H.A. (Ed.), *Cichlid Fishes – Behaviour, ecology and evolution*. Chapman & Hall, London, 191-209.
- Kettler, M.K. & Whitt, G.S. 1986. An apparent progressive and current evolutionary restriction in tissue expression of a gene, the lactate dehydrogenase-C gene, within a family of bony fish (Salmoniformes: Umbridae). *J. Mol. Evol.*, 23:95-107.
- Knoöppel, H.A. 1970. Food of Central Amazonian fishes. *Amazoniana*, 2: 257-352.
- Kornfield, I.L. 1979. Evidence for rapid speciation in African cichlid fishes. *Experientia*. 34: 335-336.
- Kornfield, I.L. 1984. Descriptive genetics of cichlid fishes. In: Turner, B.J. (Ed.), *Evolutionary Genetics of Fishes*. Plenum Press, New York, 591-615.
- Kornfield, I.L. 1991. Genetics. In: Keenleyside, M.H.A. (Ed.), *Cichlid Fishes – Behaviour, ecology and evolution*. Chapman & Hall, London, 123-128.
- Kornfield, I.L., Ritte, U., Richler, C., Wahrman, J. 1979. Biochemical and Cytological differentiation among Cichlid fishes of the sea of Galilee. *Evolution*, 33(1): 1-14.
- Kramer, D.L. & McClure, M. 1982. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. *Environ. Biol. Fishes*, 7: 47-55.

- Kramer, D.L., Lindsey, C.C., Moodie, G.E.E., Stevens E.D. 1978. The fishes and aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. *Can. J. Zool.*, 56: 717-729.
- Kullander, S.O. 1986. Cichlid Fishes of the Amazon River Drainage of Peru. Swedish Museum of Natural History, Stockholm.
- Kullander, S.O. 1988. *Teleocichla*, a new genus and of South American rheophilic cichlid fishes with six new species (Teleostei:Cichlidae). *Copeia*. 1: 196-230.
- Kullander, S.O. 1998. "A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes)". In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena; Z.M.; Lucena, C.A. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, 461-498.
- Kullander, S.O. & Nijssen, H. 1989. The cichlid of Surinam (Teleostei: Labrodei). E.J. Brill Publication, Leiden, 225 p.
- Loiselle, P.V. 1985. *The Cichlid Aquarium*. Tetra Press. Melle, Federal Republic of Germany.
- Lowe-McConnell, R. H. 1969. The cichlid fishes of Guyana, South America, with notes on their ecology and breeding behavior. *Zool. J. Soc.*, 48: 255-302.
- Lowe-McConnell, R. H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press, Cambridge, 382 p.
- Lowe-McConnell, R. H. 1991. Ecology of cichlids in South American and African waters excluding the African Great Lakes. In: Keenleyside. M.H.A. (Ed.), *Cichlid fishes: behavior, ecology and evolution*, Croom Helm, London. *Capt.*, 3: 61-85.

- Lundberg, J.G. 1998. The temporal context for the diversification of neotropical fishes. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, 49-68.
- Machado, F.A. 1983. Comportamentos e hábitos alimentares de quatro espécies de Cichlidae (Teleostei) no Pantanal Matogrossense. MSc. Dissertação. Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil.
- Markert, C.L & Holmes, R.S. 1969. Lactate dehydrogenase isozymes of flatfish, Pleuronectiformes: kinetic, molecular and immunochemical analysis. *J. Exp. Zool.*, 17: 105-118.
- Markert, C.L & Möller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 45: 753-763.
- Moon, T.W. & Hochachka, P.W. 1971. Effect of thermal acclimation on multiple forms of the liver-soluble NADP⁺ linked isocitrate dehydrogenase in the family Salmonidae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 40B: 209-213.
- Mommsen, T.P. 1984. Metabolism of the fish gill. In: Hoar, W.; Randall, D.J. (Eds.), *Fish physiology*. Academic Press, New York, 10B: 203-238.
- Muusze, B., Marcon, J.L., Van den Thillart, G., Almeida Val, V.M.F. 1998. Review: Hypoxia tolerance of Amazon fish – Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120A: 151-156.
- Nelson, J.S. (1994) *Fishes of the world*. John Willey & Sons Inc. USA. 600p.
- Nevo, E. 1990. Molecular Evolutionary Genetics of Isozymes: Pattern, Theory, and Application. *Biol. Med.*, 701-742.

- Randall, D.J. & Perry, S.F. 1992. Catecholamines. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J.; Farrel, A.P. (Eds.), Fish physiology. Academic Press, New York, 12(B): 255-300.
- Reis, R.A. & Caramachi, E.P. 1999. Feeding habitats of nine cichlid found in Batata Lake (Porto Trombetas, PA, Brazil). In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), Biology of tropical fishes. INPA, Manaus, 127-136.
- Ribbink, A.J. 1991. Distribution and ecology of the cichlids of the African Great Lakes. In: Keenleyside, M.H.A. (Ed.), Cichlid Fishes – Behavior, ecology and evolution. Chapman & Hall, London, 36-59.
- Riggs, A. 1976. Factors in the evolution of hemoglobin function. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.. 35: 2115-2118.
- Rooney, C.H.T. & Ferguson, A. 1985. Lactate dehydrogenase isozymes and allozymes of nine-spined stickleback *Pungitius pungitius* (L.) (Osteichthyes: Gasteroteidae). Comp. Biochem. Physiol., 81B: 711-715.
- Rosenberger, A.E. & Chapman, L.J. 2000. Respiratory of three species of haplocromine cichlids: Implications for use of wetland refugia. J. Fish Biol.. 57: 483-501.
- Santos, G.M. & Ferreira, E.J.G. 1999. Peixes da bacia amazônica. In: Lowe-McConnell, R. H. (Ed.), Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. EDUSP. São Paulo. Brazil, 345-373.
- Schmidt, G.W. 1973. Primary production of phytoplankton in the three types of Amazonian waters. II. The limnology of a tropical floodplain lake in central Amazonia (Lago do Castanho). Amazoniana, 4(2): 139-203.

- Schwantes, M.L.B. & Schwantes, A.R. 1982a. Adaptive features of ectothermic enzymes. I. Temperature effects on the malate dehydrogenase from a temperate fish *Leistomus xanthurus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B: 49-58.
- Schwantes, M.L.B. & Schwantes, A.R. 1982b. Adaptive features of ectothermic enzymes. II. The effects of acclimation temperature on the malate dehydrogenase of the spot, *Leistomus xanthurus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72B: 59-64.
- Sioli, H. 1990. Amazônia. Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais. Editora Vozes, Petrópolis.
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its affluent: hydrographic, morphology of the river courses and river types. In: Sioli, H. (Ed.). The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin. Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, 127-165.
- Stiassny, M.L.J. 1991. Phylogenetic interrelationships of the family Cichlidae: an overview. In: Keenleyside, M.H.A. (Ed.), Cichlid Fishes – Behaviour, ecology and evolution. Chapman & Hall, London. 1-31.
- Turner, J.D., Wood, C.M., Clark, D. 1983. Lactate and proton dynamics in the rainbow trout *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Biol.*, 104: 247-268.
- Val, A.L. 1993. Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh waters. In: Bicudo, J.E.P.W. (Ed.), The vertebrate gas transport cascade. Adaptations to environment and mode of life. CRC Press, Boca Raton, 43-53.
- Val, A.L. 1996. Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds.), Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon. INPA, Manaus, Brazil, 59-73.

- Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F. 1995. Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and biochemical features. Springer Verlag, Heidelberg, 224 p.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. and Randall, D.J. 1996. Volume overview: Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds.), Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon. INPA, Manaus, Brazil, 1-3.
- Val, A.L., Schwantes, A.R., Almeida-Val, V.M.F., Schwantes, M. L. B. 1985. Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect from lotic and lentic *Hypostamus regani* populations (São Paulo-Brazil). Comp. Biochem. Physiol., 80B: 737-741.
- Val, A.L.; Affonso, G.E., Almeida-Val, V.M.F. 1992. Adaptive features of Amazon fishes: blood characteristics of curimatã (*Prochilodus cf. nigricans*, Osteichthyes). Physiol. Zool., 65(4): 823-843.
- Val, A. L; Silva, M.N.P., Almeida-Val, V.M.F. 1998. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. S. Afr.J. Zool., 33: 107-114.
- Van Raaij, M.T.M., Pit, D.S.S., Balm, P.H.M., Steffens, A.B., Van den Thillart, J.M. 1996. Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. Hormones and Behavior, 30: 85-92.
- Walker, I. 1997. Prediction of evolution? Somatic plasticity as a basic, physiological condition for the viability of genetic mutations. Acta Biotheoretica, 44: 165-168.
- West, J.L., Bailey, J.R., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Sidel, B.D., Driedzic, W.R. 1999. Activity levels of enzymes of energy metabolism in heart and red muscle are higher in north-temperate-zone than in Amazonian teleosts. Can. J. Zool., 77: 690-696.

Whitt, G.S. 1987. Species differences in isozyme tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analyses. In: Ratazzi, M.C.; Scandalios J.G.; Whitt, G.S. (Eds.), *Isozymes: Current topics in biological and medical research*. Alan R Liss, New York, 2-23.

**CAPÍTULO II - Variação da atividade e da expressão da LDH em três
ciclídeos da Amazônia em relação à disponibilidade de oxigênio no
ambiente**

Introdução

A quantidade de oxigênio dissolvido nos corpos de águas da bacia amazônica é determinada por um complexo de interações físicas, químicas e biológicas, as quais são afetadas pela oscilação regular do nível da água, ou pulso de inundação (Junk et al., 1989). Durante os períodos de enchente a taxa de decomposição aumenta nos ambientes de várzea e igapó fazendo com que a quantidade de oxigênio dissolvido nesses ambientes caia para valores próximos a zero. Além das oscilações sazonais, a quantidade de oxigênio dissolvido varia também em curtos períodos de tempo. Segundo Junk et al. (1983), os níveis de oxigênio dos lagos da Ilha da Marchantaria variam de zero durante a noite a níveis de supersaturação durante o dia.

Os corpos de águas da Amazônia também possuem outra característica quanto à disponibilidade de oxigênio que é a microestratificação. Tem sido sugerido que os primeiros milímetros da coluna d' água possui cerca de 90% de todo o oxigênio dissolvido na mesma. Dessa forma, os primeiros 10cm da coluna d'água são, praticamente, a única fonte de oxigênio para muitos organismos aquáticos durante episódios de hipóxia/anóxia (revisto por Val, 1996).

Essas freqüentes oscilações nos níveis de oxigênio dos corpos d'água da Amazônia conduziram as espécies de peixes a uma série de ajustes em seus padrões metabólicos, tais ajustes só foram possíveis devido à grande diversificação genética que os peixes apresentam, propiciando sua sobrevivência em habitats heterogêneos e mutáveis (Almeida-Val, 1997).

Os peixes apresentam grande plasticidade genotípica, isto é, seu material genético está apto a sofrer alterações e pode variar em sua expressão, de acordo com mudanças ambientais (Whitt, 1987), como as freqüentes oscilações nos níveis de oxigênio dos corpos d'água da

Amazônia. A diversidade de habitats associada com o tamanho da bacia amazônica proporcionou aos peixes amazônicos grande plasticidade genética e fisiológica (Val et al., 1996). Tal plasticidade garante a esses animais uma melhor adaptação a pressões ambientais específicas. Essas interações com o meio em que vivem estão relacionadas à presença de características genéticas específicas (Kramer et al., 1978; Val & Almeida-Val, 1995; Almeida-Val & Farias, 1996). Peixes de respiração aquática da bacia amazônica, como por exemplo, os ciclídeos, apresentam uma grande plasticidade fenotípica face às inúmeras e extremas condições ambientais em que vivem (Almeida-Val, 1998).

A supressão metabólica acoplada à glicólise anaeróbica, são respostas adaptativas que esses peixes apresentam para sobreviver por longos períodos de hipóxia (Nilsson, 1995). Tais respostas ocorrem simultaneamente a outros ajustes para melhorar a transferência de oxigênio aos tecidos. Assim, diferentes arranjos metabólicos podem ocorrer em diferentes tecidos e são observados por meio da distribuição diferencial de isozimas (Kettler & Whitt, 1986; Almeida-Val et al., 1992; 1995; Almeida-Val & Hochachka, 1995). O padrão de distribuição das isozimas da Lactato Desidrogenase pode ser relacionado com as exigências metabólicas e a disponibilidade de oxigênio nos tecidos e no meio ambiente. Ajustes na distribuição das isozimas da LDH de muitas espécies de peixes amazônicos foram observados durante certos períodos do ano ou após prolongada exposição a hipóxia (revisito por Almeida-Val et al., 1999b).

Os conhecimentos sobre as isozimas e como elas se distribuem nos diversos tecidos são ferramentas de estudo de grande valor, porque servem como provas poderosas dos ajustes nos diferentes níveis: molecular, bioquímico, genético, morfológico, fisiológico, comportamental e evolutivo (Nevo, 1990). Segundo Almeida-Val et al. (1995) e Farias et al.

(1997), a distribuição das isozimas da Lactato Desidrogenase (LDH) nos tecidos dos ciclídeos da Amazônia está relacionada com a habilidade desses animais em tolerar ambientes hipóxicos, os quais expressam plasticidade fenotípica no coração e, portanto, revelam os seus habitats preferenciais. Um exemplo é a espécie *Cichlasoma amazonarum* que apresenta dois modelos de distribuição da LDH no coração, um deles com predominância da isozima B₄ e o outro com predominância da isozima A₄; esta distribuição está relacionada com o conteúdo de oxigênio da água no local de captura. Sendo assim, a distribuição tissular isozímica é a expressão gênica do produto e pode ser regulada de acordo com as necessidades metabólicas e características ambientais (Almeida-Val et al, 1995). Tal plasticidade permite, então, que esses animais visitem ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio enquanto procuram por alimentos, locais para reprodução e proteção, etc.

Estudos no nível molecular estão sendo intensificados com o intuito de determinar os ajustes que ocorrem no DNA das células quando estas são expostas a condições hipóxicas e, dessa forma, poder explicar as modificações que ocorrem no nível bioquímico e fisiológico. Vários desses estudos sugerem que alguns sítios do DNA são suprimidos e outros são ativados quando as células são expostas a hipóxia (Keitzmann et al., 1992; 1993; Webster et al., 1994; Land & Hochachka, 1995). Estudos realizados por Murphy et al. (1984) e Robin et al. (1984) revelaram que células em cultura quando expostas à hipóxia aumentaram a expressão de enzimas glicolíticas, como a LDH, enquanto que, simultaneamente, diminuíram a expressão de enzimas do metabolismo oxidativo.

Estudos realizados *in vitro* com sistemas de mamíferos revelaram que muitos genes induzidos pela hipóxia são regulados por uma proteína de ligação do DNA, conhecida como fator 1 de indução à hipóxia (HIF-1) (Wang & Semenza, 1993; Bunn & Poyton, 1996;

Guillemin & Krasnow, 1997). Essa proteína, quando recebe o sinal de um sensor de oxigênio por meio de uma reação de oxi-redução ou fosforilação, ativa a transcrição de genes induzíveis pela hipóxia, tais como uma variedade de enzimas glicolíticas, como a hexoquinase, lactato desidrogenase, piruvato quinase e fosfrutoquinase (Semenza et al., 1994; 1996, Arany et al., 1996; Okino et al., 1998). Recentemente, o HIF-1 foi caracterizado em células de truta arco-íris, tendo 61% de similaridade com o HIF-1 humano (Soitano et al., 2001).

Diante desses estudos, o entendimento sobre plasticidade genotípica fica cada vez mais fácil, principalmente, em relação a mudanças na expressão da isozima A₄ no coração e ao aumento da atividade da enzima LDH na maioria dos tecidos de animais expostos a hipóxia.

Objetivos

Os objetivos deste capítulo foram:

- 1) Identificar variações na expressão e na atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) em três espécies de ciclídeos coletadas nas proximidades do Lago Catalão/Manaus ao longo de um ano; e
- 2) Verificar se possíveis variações na expressão e na atividade da LDH das espécies coletadas estão correlacionadas com a variação na disponibilidade de oxigênio ocorrida ao longo do ano.

Material e Métodos

Coletas

Doze coletas mensais foram realizadas no período de agosto de 2000 a julho de 2001, nas proximidades do Lago Catalão (59°54'29"N, 3°9'47"S), em frente à confluência do Rio Negro com o Rio Solimões, a 15 km da cidade de Manaus (Figura 1).

As coletas mensais foram realizadas com o intuito de capturar o maior número possível de espécies de ciclídeos, atingindo um número ideal de 10 indivíduos por espécie, para que fosse possível fazer uma comparação da expressão da enzima Lactato Desidrogenase entre as diferentes espécies relacionando-a com a variação de oxigênio anual. Ao final das doze coletas observou-se que, das quatorze espécies capturadas em maior quantidade, apenas três delas foram capturadas mensalmente com um número mínimo de 6 exemplares. Portanto, as espécies alvo dessa comparação foram *Satanoperca* aff. *jurupari* ($110,5 \pm 70,1\text{g}$), *Heros* *apendiculatus* ($88,2 \pm 25,6\text{g}$) e *Chaetobranchopsis orbicularis* ($99,7 \pm 26,5\text{g}$) (Figura 2).

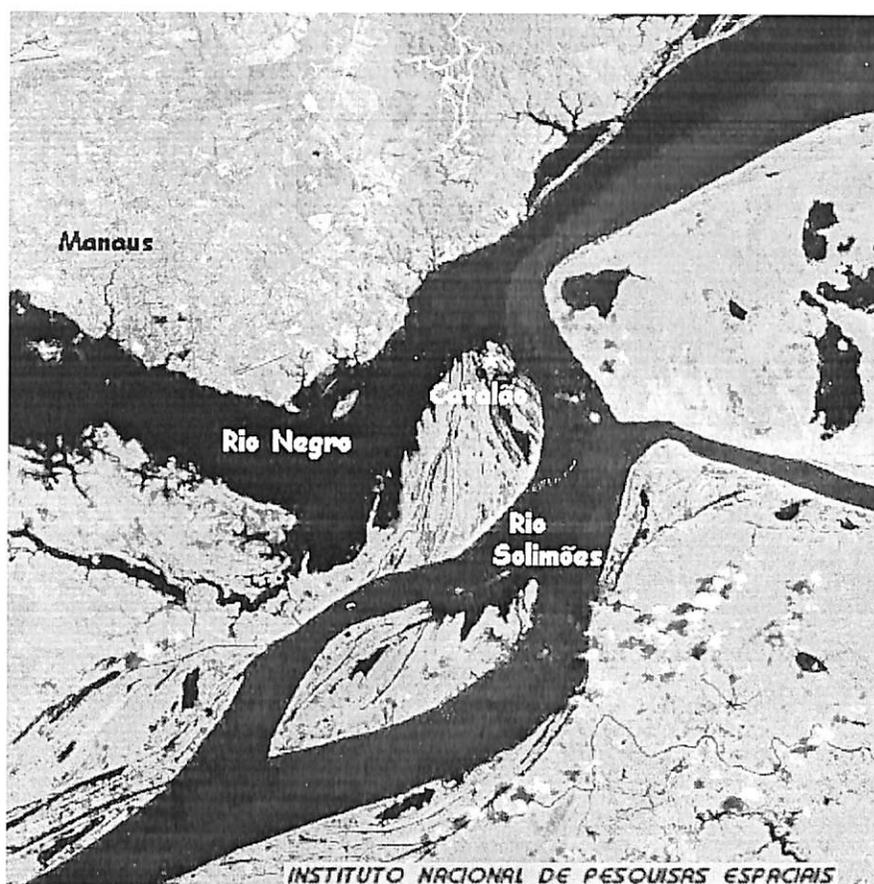


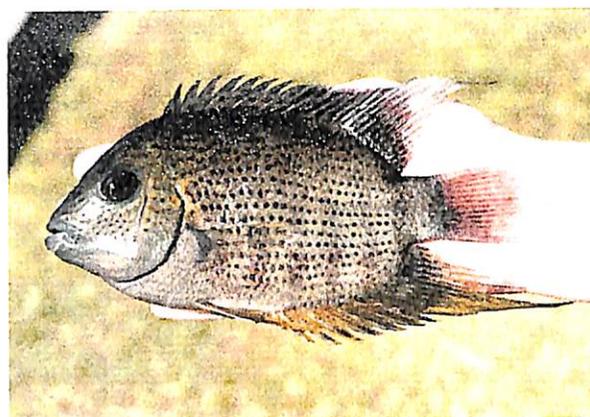
Figura 1 – Imagem de satélite fornecida pelo INPE/MCT, indicando a área em que se localiza o Lago do Catalão.

Em todas as coletas utilizou-se quatro malhadeiras com tamanho de 35mm entre nós, as quais permaneceram na água por, aproximadamente, 24 horas (6 horas no primeiro dia, 12 horas no segundo dia e 6 horas no terceiro dia). As malhadeiras eram vistoriadas a cada duas horas. Apenas os animais capturados com vida e que se apresentavam saudáveis foram utilizados neste estudo.

Assim que os peixes foram capturados, eles foram mantidos em um tanque rede até serem sacrificados e seus tecidos retirados. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e posteriormente transferidos para freezer -73°C , onde foram estocados até o momento das análises.



Satanoperca aff. jurupari



Heros apendiculatus



Chaetobranchopsis orbicularis

Figura 2. Exemplos das três espécies de ciclídeos estudadas.

Locais de coleta

A maioria das coletas foi feita dentro do igapó, durante os períodos da enchente, cheia e vazante e, no período em que este habitat não era inundado, as coletas foram feitas próximo às margens, onde havia “galhada”. Esses locais foram escolhidos por serem os habitats preferidos pela maioria dos ciclídeos dessa região (conhecimento tradicional, informação obtida com os pescadores).

Medidas de Oxigênio e Temperatura

Durante todas as coletas foram realizadas medidas de oxigênio e temperatura, com duração de 24 horas, em intervalos de 4 horas, nas seguintes profundidades: 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 e 200 cm. As medidas nas profundidades maiores só foram feitas quando o nível da água assim permitiu. As medições foram realizadas utilizando um oxímetro YSI 85.

Os locais de medida de oxigênio e temperatura foram os mesmos onde as malhadeiras foram colocadas, porém a medição foi feita em apenas um ponto de uma das quatro malhadeiras. Esse ponto era sempre na malhadeira em que a captura de ciclídeos era maior.

Análises laboratoriais

Preparação dos tecidos e obtenção dos extratos para as análises eletroforéticas e enzimáticas

Os tecidos retirados para análises foram: fígado, coração, cérebro, olho e músculo esquelético. Estes tecidos foram pesados e homogeneizados com tampão Imidazol 150mM, contendo 1mM de EDTA, 5mM de dithiothreitol (DTT) e 1% de triton X-100, pH 7,4. A diluição utilizada variou de acordo com cada tecido: 1:4 para o músculo branco, fígado e cérebro e 1:4 para o coração. A homogeneização foi feita em triturador automático (Tissue Tearos mod. 985370) em gelo fundente. Os homogeneizados foram centrifugados durante 15 minutos a 13.000g em centrífuga Sorvall RC5B a 4°C para retirar qualquer material particulado. O sobrenadante (extrato cru de tecido) foi utilizado para aplicação no suporte eletroforético em gel de amido e nos ensaios enzimáticos a 25°C. O mesmo tampão foi utilizado para as duas análises, pois o coração desses animais era muito pequeno e não era

possível dividi-lo para a realização das duas análises (eletroforética e enzimática), sendo assim, padronizou-se o uso do mesmo tampão em todos os tecidos.

Eletroforese em gel de amido

A determinação dos padrões eletroforéticos da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) foi feita por meio de eletroforese horizontal (Smithies, 1955) em gel de amido de milho (Val et al., 1981). O sistema de tampões usado foi o descrito por Boyer et al. (1963). Um gradiente de voltagem de 6V/cm foi aplicado durante 15 a 18 horas a uma temperatura constante de 4°C. Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado a 37°C, contendo uma solução de coloração histoquímica específica para a enzima LDH. O método de coloração foi o descrito por Shaklee et al. (1973).

A nomenclatura adotada para as subunidades da enzima e para os genes estruturais foi aquela descrita por Shaklee et al. (1989).

Análise enzimática

Os níveis de atividade enzimática da LDH foram determinados a 25°C em um espectrofotômetro Spectronic Genesys 2, utilizando as técnicas revistas por Driedzic & Almeida-Val (1996). As reações enzimáticas procederam com o seguinte protocolo:

LDH – 0,15mM de NADH -, 1mM de KCN em 50mM de Imidazol, pH 7,4 a 25°C.

As reações foram iniciadas com adição de Piruvato - 1 e 10mM;

O cálculo para determinar a atividade da enzima nos tecidos foi realizado de acordo com a equação abaixo:

$$\mu\text{moles substrato.g}^{-1} \text{ tecido fresco. min}^{-1} = \frac{\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{fd (cubeta)}}{6,22} \times \frac{\text{vol. tampão (ml)}}{\text{peso tecido (g)}}$$

onde:

fd = fator de diluição

ΔOD/min = variação na densidade óptica por minuto

6,22 = coeficiente de extinção molar da coenzima NADH

Análise Estatística

Para verificar se existe um efeito da concentração de oxigênio dissolvido na água sobre a atividade da enzima LDH nos quatro tecidos analisados, foi realizada uma análise de regressão linear sendo o oxigênio dissolvido a variável independente e a atividade da enzima LDH a variável dependente. Para comparar a atividade da LDH no coração entre os meses de novembro e março foi usado um teste t ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no pacote estatístico SYSTAT 9.

Resultados

Espécies capturadas ao longo do ano

No total das 12 coletas no período de agosto de 2000 a julho de 2001 foram coletadas 14 espécies de ciclídeos (Tabela 1 e Figura 3). Apenas a espécie *Satanoperca* aff. *jurupari* foi capturada o ano inteiro, outras espécies como *Heros apendiculatus*, *Chaetobranchopsis orbicularis*, *Geophagus* aff. *altifrons* e *Pyterophyllum scalare* também foram capturadas em quase todas as coletas, embora apenas as duas primeiras espécies tivessem uma frequência no número amostral maior do que as duas outras espécies.

Diante desses resultados, os exemplares das espécies *Satanoperca* aff. *jurupari*, *H. apendiculatus* e *Chaetobranchopsis orbicularis* foram utilizados para a realização do

acompanhamento da atividade e da expressão da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) ao longo de um ano de coleta.

Tabela 1. Ocorrência das espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão/Manaus no período de agosto de 2000 a julho de 2001.

	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Total
<i>Satanoperca aff. jurupari</i>	28	7	10	22	36	41	18	77	45	10	12	47	353
<i>Chaetobrancopsis orbicularis</i>	5	4	1	10	51	28	13	11	22	7	10	0	162
<i>Pterophyllum scalare</i>	0	3	10	2	18	20	6	22	6	1	2	1	91
<i>Geophagus aff. altifrons</i>	19	0	5	11	0	5	3	3	21	2	3	19	91
<i>Cichla monoculus</i>	10	6	0	2	0	5	10	20	3	5	7	2	70
<i>Heros apendiculatus</i>	6	5	8	5	2	4	3	10	5	8	5	3	64
<i>Acaronia nassa</i>	3	5	11	0	0	0	0	5	3	9	3	0	39
<i>Astronotus crassipinnis</i>	3	5	9	6	4	4	6	1	0	1	0	0	39
<i>Hypsicalare temporallis</i>	4	1	1	0	0	1	0	4	2	4	0	3	20
<i>Chaetobranchus flavencis</i>	5	5	0	2	4	0	0	0	1	0	0	0	17
<i>Aequedins tetramerus</i>	1	4	3	0	0	0	0	0	0	2	4	0	14
<i>Symphysodon discus</i>	0	1	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7
<i>Uaru amphiacanthoides</i>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<i>Satanoperca acuticeps</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	86	46	63	60	115	110	59	153	108	49	46	75	970

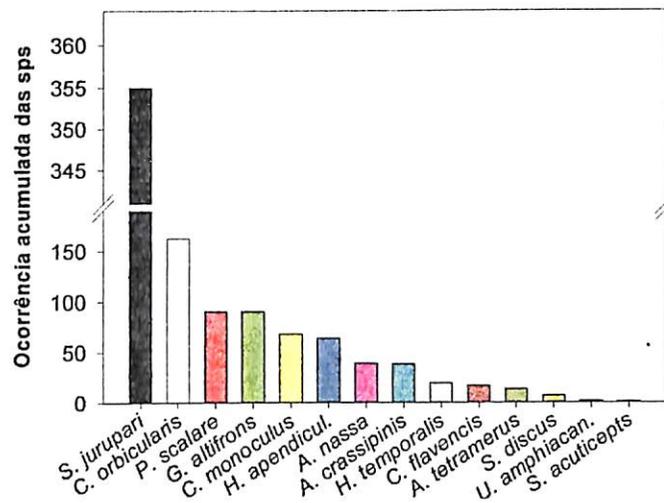


Figura 3. Ocorrência das 14 espécies de ciclídeos coletadas nas proximidades do Lago Catalão/Manaus durante o período de agosto de 2000 a julho de 2001.

Variação do oxigênio e temperatura ao longo do ano

A variação do oxigênio nos locais de coleta está representada na figura 4 e no apêndice

1. Os resultados apresentados nesta figura são uma média da concentração de oxigênio nas diferentes profundidades e das diferentes horas de medição.

Verifica-se na figura 4 que durante os meses de vazante a concentração de oxigênio foi mais elevada, em torno de $4\text{mgO}_2/\text{L}$, ocorrendo uma redução significativa das concentrações de oxigênio durante o período referente à enchente (fevereiro – maio), voltando a aumentar nos meses seguintes.

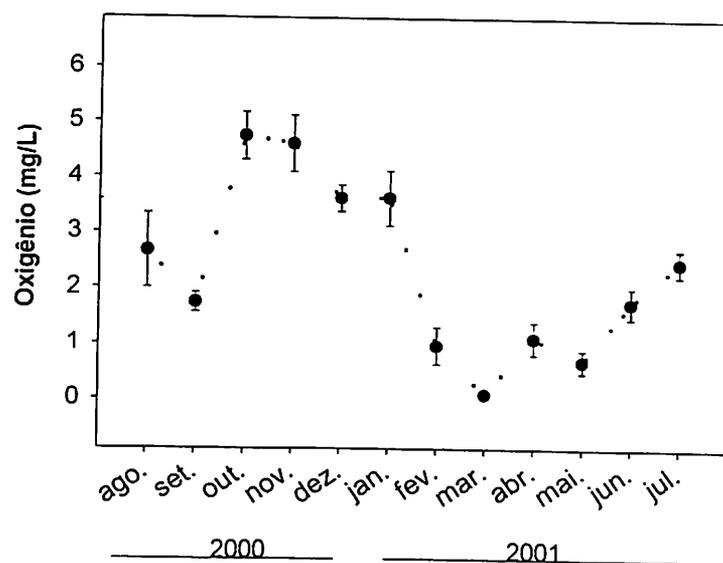


Figura 4. Variação da quantidade de oxigênio dissolvido nos locais de coleta durante o período de agosto de 2000 a julho de 2001. Os valores estão expressos em média e SEM.

A variação da temperatura ao longo do ano está representada na figura 5. Assim como para o oxigênio os resultados apresentados são uma média da variação da concentração de temperatura nas diferentes profundidades e nas diferentes horas de medição.

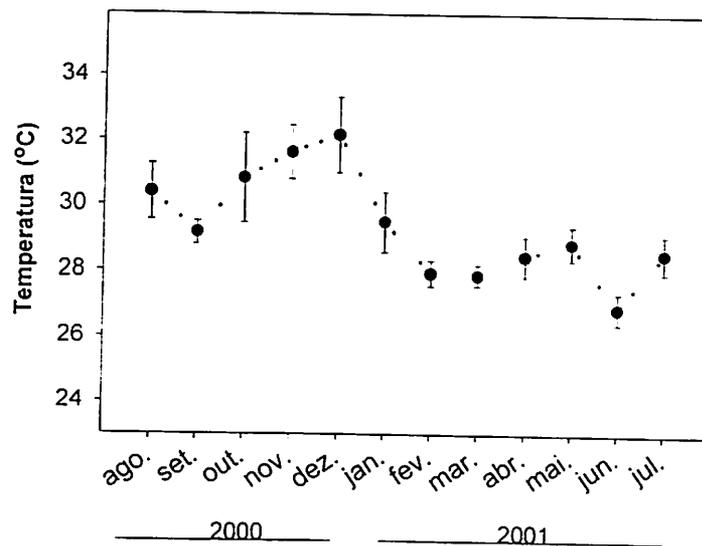


Figura 5. Variação da temperatura nos locais de coleta durante o período de agosto de 2000 a julho de 2001. Os valores estão expressos em média e desvio padrão.

Variação da atividade da enzima LDH nas três espécies de ciclídeos ao longo do ano em relação à variação de oxigênio

Os níveis de atividade da enzima LDH (1mM) nos quatro tecidos das três espécies de ciclídeos estão representados no Apêndice 2. Observamos neste trabalho que a atividade da LDH no coração das espécies estudadas teve relação significativa com a variação das concentrações de oxigênio ao longo do ano (figura 6). A atividade da enzima aumentou com o decréscimo das tensões de oxigênio no meio. Essa relação não foi observada nos demais tecidos (músculo branco, fígado e cérebro) das três espécies (figuras 7, 8 e 9), com exceção da atividade da LDH no fígado da espécie *H. apendiculatus* que também aumentou significativamente com a redução das concentrações de oxigênio (Figura 8).

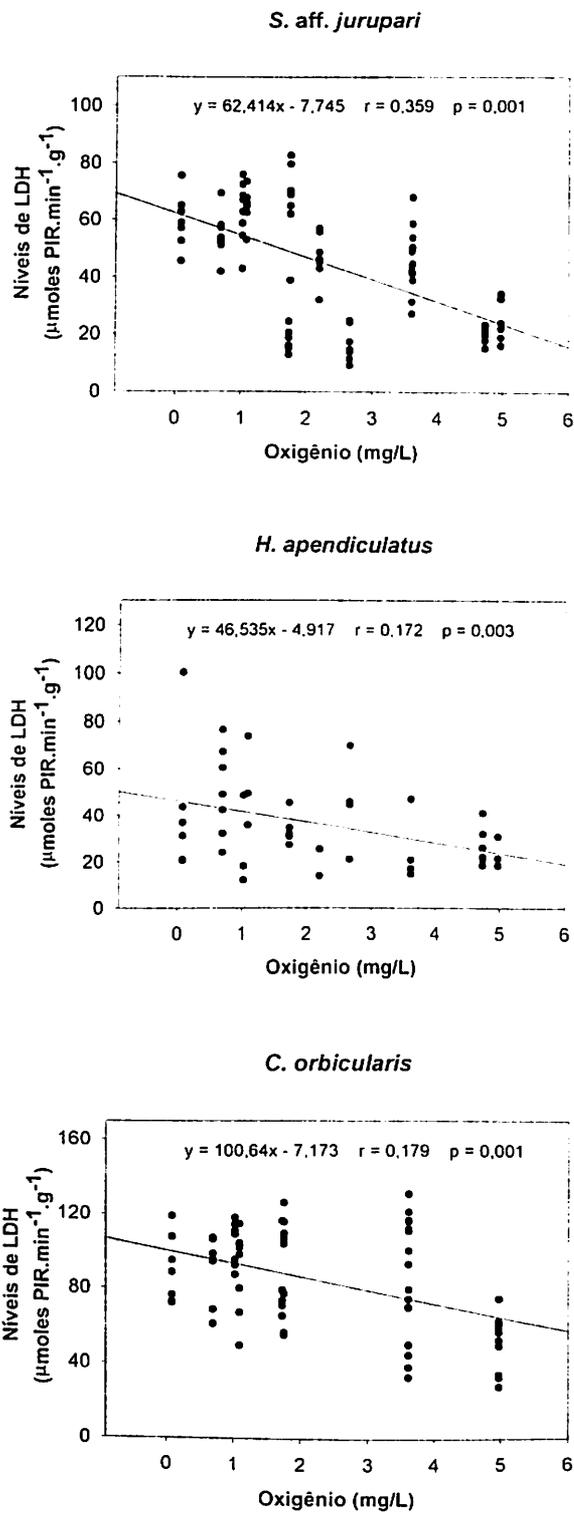


Figura 6. Variação da atividade da enzima LDH no músculo cardíaco das três espécies de ciclídeos em relação ao conteúdo de oxigênio dissolvido no meio. Onde: x=oxigênio dissolvido na água e y=atividade da enzima LDH.

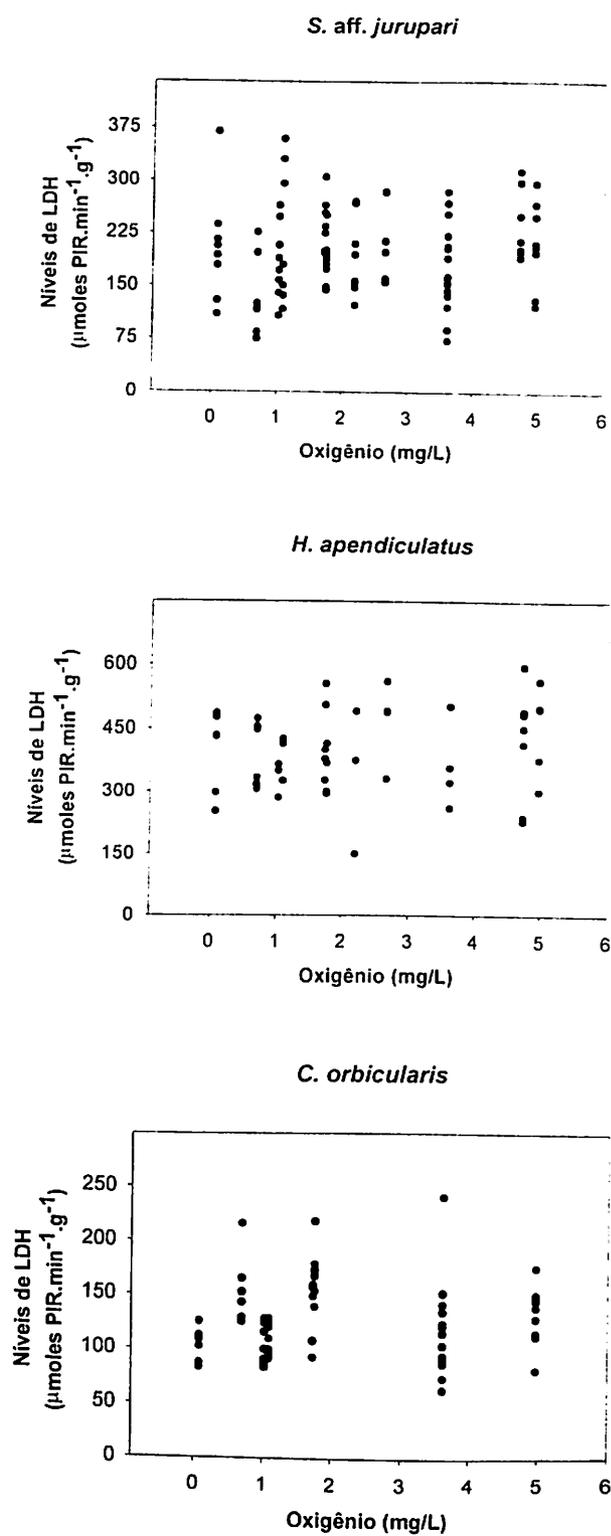


Figura 7. Variação da atividade da enzima LDH no músculo esquelético das três espécies de ciclídeos em relação ao conteúdo de oxigênio dissolvido no meio.

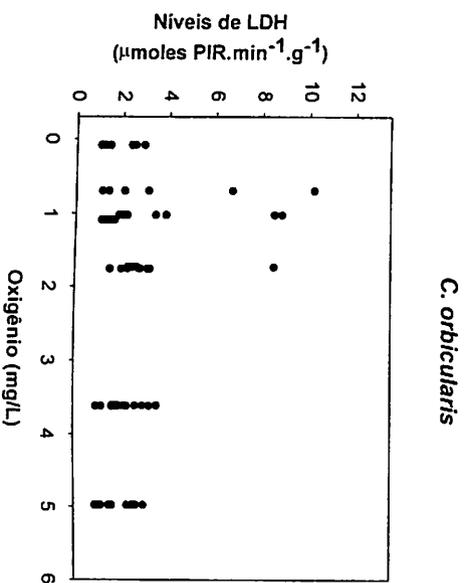
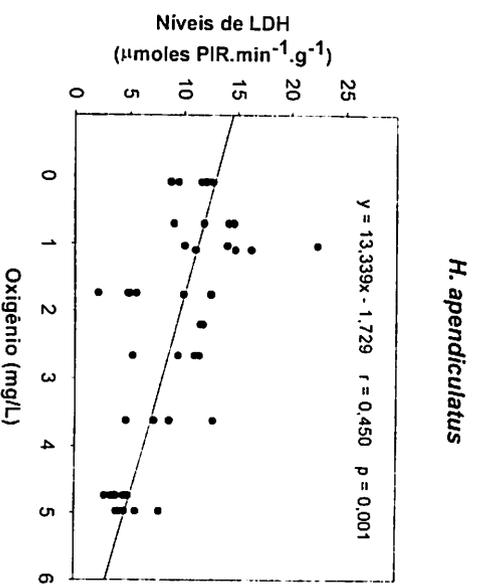
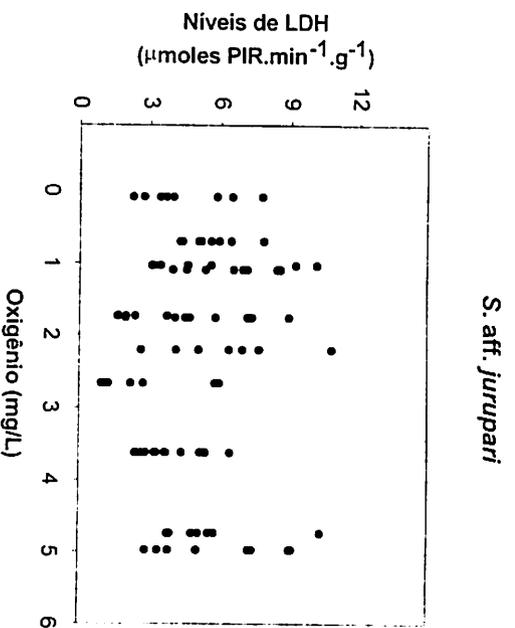


Figura 8. Variação da atividade da enzima LDH no fígado das três espécies de ciclídeos em relação ao conteúdo de oxigênio dissolvido no meio. Onde: x=oxigênio dissolvido na água e y=atividade da enzima LDH.

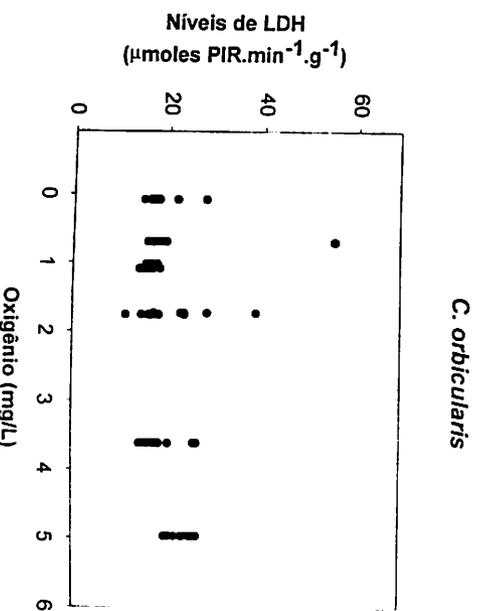
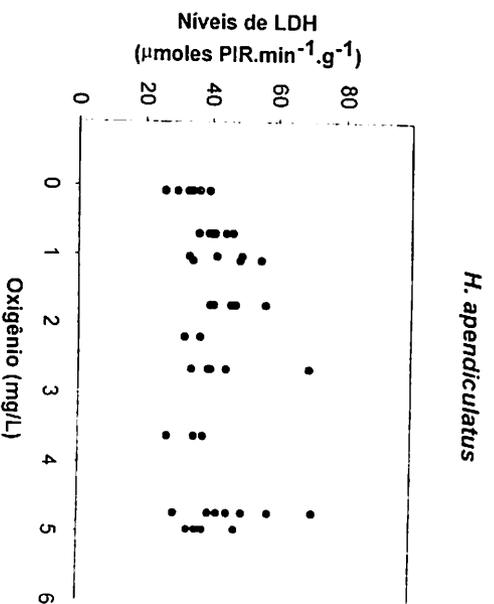
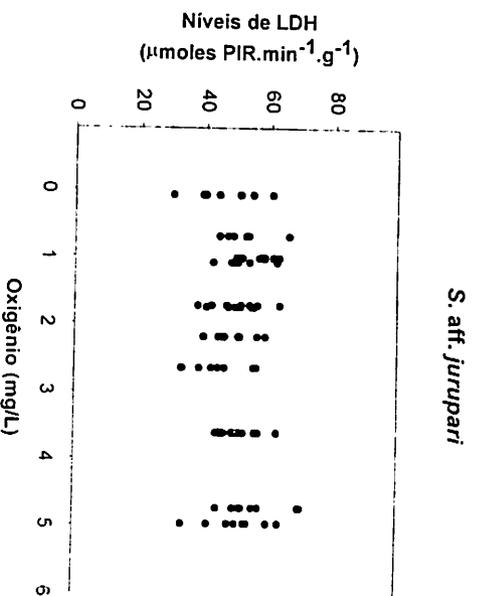


Figura 9. Variação da atividade da enzima LDH no cérebro das três espécies de ciclídeos em relação ao conteúdo de oxigênio dissolvido no meio.

Quando se compara a atividade da LDH (1mM) no músculo cardíaco no mês de novembro (alta concentração de oxigênio) com a atividade dessa enzima no mês de março (baixa concentração de oxigênio) (Figura 10) observa-se que a atividade da LDH foi 2,3 vezes maior nas espécies *S. aff. jurupari* e *H. apendiculatus* e 1,6 maior na espécie *C. orbicularis*. A enzima LDH também teve sua atividade duplicada no fígado da espécie *H. apendiculatus*.

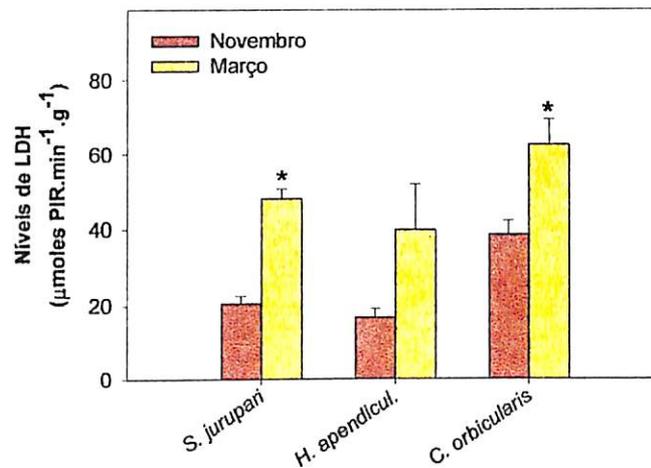


Figura 10. Variação da atividade da enzima LDH no músculo cardíaco das três espécies de ciclídeos nos meses de novembro de 2000 (4,97mgO₂/L) e março de 2001 (0,085 mgO₂/L). O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo coletado no mês de novembro (P<0,05). As barras estão expressas em média ± erro padrão.

A atividade da enzima LDH foi inibida em altas concentrações de piruvato (10mM) nos quatro tecidos analisados das três espécies (Apêndice 3). Durante o decorrer do ano, esta situação se manteve, indicando que há uma inibição da enzima por altas concentrações de piruvato, impedindo o acúmulo de lactato nos tecidos.

Variação da expressão da enzima LDH nas três espécies de ciclídeos em relação à variação de oxigênio

Uma foto representativa dos eletroferogramas obtidos para cada espécie pode ser observada nas figuras 11A, 11B e 11C.

O loco LDH-A foi expresso em todas as amostras de músculo branco das três espécies de ciclídeos. No coração das espécies foi observada redução total da expressão do loco B, compensada por uma predominância total da expressão do loco A em todos os meses amostrados (Apêndice 4), variando apenas quanto à intensidade de expressão da isozima A₄. Infelizmente não foi possível realizar análises densiométricas dos eletroferogramas.

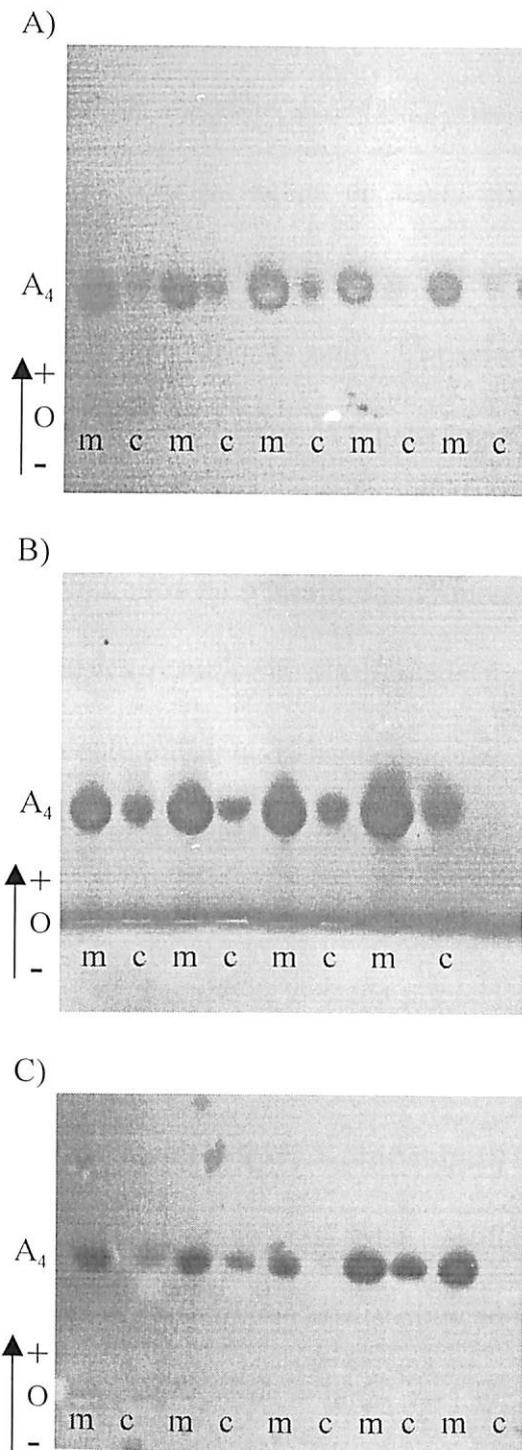


Figura 11. Foto representativa dos eletroferogramas mostrando a distribuição da LDH no músculo branco (m) e no músculo cardíaco (c) obtidos para as três espécies de ciclídeos: *S. aff. jurupari* (A), *H. apendiculatus* (B) e *C. orbicularis* (C).

Discussão

As variações na quantidade de oxigênio dissolvido observadas durante o período de coleta deixa claro, mais uma vez, que as águas da bacia amazônica sofrem oscilações espaciais, diárias e sazonais, tendo, na maioria das vezes, concentrações críticas de oxigênio, podendo atingir condições anóxicas em parte da noite. Considerando tais concentrações de oxigênio dissolvido, não há outra saída aos peixes da região amazônica, a não ser a adaptação a estas oscilações ambientais. Sendo assim, inúmeros ajustes no metabolismo, morfologia, anatomia, etc são facilmente encontrados na maioria dos grupos de peixes que vivem nessa região. A combinação de tais ajustes resulta em plasticidade fenotípica, a qual viabiliza a adaptação desses animais ao ambiente pulsante da bacia amazônica (Junk et al., 1983; Val & Almeida-Val, 1995; Almeida-Val et al, 1999a).

Considerando a grande plasticidade fenotípica encontrada nos ciclídeos (Stiassny, 1981), vários autores sugerem que este grupo se destaca por seu sucesso evolutivo, ou seja, sua taxa de especiação extremamente rápida, sendo por eles considerado um grupo de peixes altamente especializados (Lowe-McConnell, 1969; Kornfield, 1979; Kornfield et al. 1979; Thompson, 1979). A combinação desses fatores com resultados obtidos em estudos ecofisiológicos leva vários autores a sugerir que a distribuição desse grupo no ambiente natural está relacionada com sua capacidade de tolerância à hipóxia (Almeida-Val et al., 1995; Almeida-Val & Farias, 1996).

Os ajustes encontrados nos ciclídeos estudados neste trabalho, como a predominância da isozima A_4 no coração das três espécies, isozima esta que é típica de tecidos anaeróbicos, e o aumento na atividade da enzima LDH no coração das três espécies de ciclídeos conforme o

decréscimo na quantidade de oxigênio dissolvido mostram nitidamente a adaptação ao ambiente pulsante da bacia amazônica.

Os ajustes na atividade de muitas enzimas chaves ocorrem de maneira específica em cada tecido (Hochachka & Somero, 1984; Almeida-Val & Hochachka, 1995). No presente trabalho observou-se que praticamente apenas o coração das três espécies estudadas teve a atividade da Lactato Desidrogenase ajustada em relação às concentrações de oxigênio na água. É provável que o coração, por ser um órgão tipicamente aeróbico, sofra mais quando em situações de hipóxia. Uma vez que esse órgão apresentou aumento na atividade da enzima LDH quando em baixas concentrações de oxigênio, a saída encontrada para o coração não ter problemas com o acúmulo de lactato foi aumentar a inibição da isozima A₄ pelo piruvato, fator incomum neste tipo de isozima. Observa-se, então, que este órgão protege-se de concentrações muito elevadas de lactato por meio da inibição da enzima a altas concentrações de piruvato (Apêndice 2). Este fato pode ser observado quando se faz a comparação da inibição da enzima pelo piruvato no mês de março (baixa concentração de oxigênio) em relação ao mês de novembro (alta concentração de oxigênio). O aumento da inibição no mês de março, este aumento é significativo na espécie *C. orbicularis*.

A hipóxia causa alteração na taxa metabólica da maioria dos tecidos. Dependendo do tecido/órgão, a regulação de diversos sítios de DNA pode resultar na diminuição das atividades de enzimas pertencentes ao metabolismo aeróbico, como aquelas do ciclo de Krebs e cadeia respiratória, enquanto que enzimas como a LDH e as glicolíticas passam a ser ativadas (Hochachka, 1996). O fato dos ciclídeos aqui estudados estarem diariamente e sazonalmente expostos a situações de hipóxia fez com que esses animais se ajustassem a tal

condição aumentando suas taxas glicolíticas, observadas pelo aumento na atividade da enzima LDH e da expressão da isozima A₄ no coração.

Variações na expressão das isozimas da LDH foram descritas por estarem relacionadas com as preferências metabólicas e características adaptativas dos peixes aos ambientes hipóxicos da Amazônia (Almeida-Val et al., 1993). Um exemplo é a espécie *Cichlasoma amazonarum* que, por ser encontrada em todos os tipos de ambientes, varia a distribuição das isozimas da LDH no coração de acordo com a disponibilidade de oxigênio no meio (Almeida-Val et al., 1995). A espécie *Colossoma macropomum*, também, apresentou variações na distribuição das isozimas da LDH no coração estando, possivelmente, relacionadas com a disponibilidade de oxigênio no meio (Almeida-Val et al., 1990). No presente trabalho, a expressão preferencial da isozima A₄ no coração das três espécies ao longo do ano é um indicativo dos ajustes sofridos por elas para se adaptarem aos seus habitats. Em trabalhos anteriores, Almeida-Val et al. (1995 e 1999b) sugeriram que algumas espécies de ciclídeos apresentam redução do gene LDH-B* no coração como uma estratégia evolutiva de adaptação a ambientes cronicamente hipóxicos como as águas da bacia amazônica.

A redução da expressão do gene LDH-B* no coração foi descrita pela primeira vez em *Pleuronectes platessa* (“flatfish”), por Market & Holmes (1969) e mais tarde observado em *Gasterosteus aculeatus* (“stickleback”) por Rooney & Ferguson (1985). Alguns autores sugerem que esta redução está relacionada com as condições anaeróbicas dos habitats onde essas espécies vivem (Kettler & Whitt, 1986). De acordo com Almeida-Val et al. (1993), o modelo de distribuição das isozimas da LDH nos ciclídeos está relacionado com duas estratégias de sobrevivência à hipóxia: a que se baseia no metabolismo anaeróbico e a outra

que se baseia na supressão da demanda da energia, mantendo baixas as taxas do metabolismo oxidativo. No presente estudo, a inversão da expressão da isozima B₄ pela isozima A₄ no coração das três espécies estudadas provavelmente favorece esse órgão a atuar mais anaerobicamente, com o aumento da atividade da LDH em situações de escassez de oxigênio, uma vez que, de acordo com suas propriedades catalíticas, a isozima A₄ funciona melhor num ambiente anaeróbico. Segundo Almeida-Val et al. (1995), a redução da expressão do loco LDH-B* no coração é considerada uma característica comum entre a maioria das espécies de ciclídeos da Amazônia já estudadas.

É importante ressaltar que, em estudos realizados pela equipe do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), verificou-se que os ciclídeos possuem um dos menores índices cardiossomáticos dentre as 14 espécies estudadas (V.M.F. Almeida-Val, A.R. Chippari-Gomes & H.M. Maciel, em preparação). Deduz-se, então, que a função cardíaca nesses animais seja muito reduzida e esteja restrita à manutenção da circulação por meio de reduzida atividade aeróbica e alto potencial glicolítico (vide capítulo III). Uma vez que esses animais são territorialistas e apresentam comportamento especializado de proteção à prole, são adaptados a nados de arranque (“burst swimming”), comportamento de defesa e agressão, o que requer maior massa muscular como observado e pouca capacidade aeróbica.

A alta taxa de especiação (i.e., radiação adaptativa) observada no grupo dos ciclídeos e sua plasticidade têm sido requerida para explicar mudanças fenotípicas na distribuição tissular das isozimas inter e intraespecificamente quando encontradas em condições ambientais diferentes (Almeida-Val et al., 1995). Um exemplo dessa plasticidade é a própria espécie *S. aff. jurupari* que apresentou numa mesma população, a expressão e a redução do gene LDH-B* no coração em alguns indivíduos, como pôde ser observado no Capítulo 1,

figura 3(Chippari-Gomes et al., 2002). Já, no presente trabalho, pudemos observar apenas a expressão da isozima A₄ no coração durante todo o ano de coleta para as três espécies de peixes estudadas. Em trabalhos anteriores (Almeida-Val et al., 1995; Almeida-Val & Farias, 1997) a distribuição das isozimas da LDH no coração foi considerada um bom indicador da condição de hipóxia ambiental. Para a espécie *Cichlasoma amazonarum* foi, inclusive, sugerido que animais aclimatizados em hipóxia apresentavam ausência da isozima B₄ em coração. Apesar dos nossos resultados não terem se mostrado indicativos de um tipo de ambiente, pôde-se observar que a variação na distribuição das isozimas ocorre naturalmente na população amostrada e pode não estar refletindo a quantidade de oxigênio disponível no meio como indicou anteriormente Almeida-Val et al. (1995), mas, certamente, indica o metabolismo predominante no coração daquele indivíduo no momento da captura, o que pode variar de acordo com a condição fisiológica individual que, por sua vez, está relacionada com as condições ambientais nas quais aqueles indivíduos estavam aclimatizados.

Aqui, não podemos descartar a possibilidade de que a LDH dessas espécies possuam homopolímeros com mobilidades eletroforéticas semelhantes que não se separam por meio da técnica eletroforética utilizada no presente trabalho. Se as isozimas A₄ e B₄ apresentam migrações iguais não poderemos afirmar que ocorreu redução da expressão do gene LDH B* nessas espécies. Assim, outros testes tais como termoestabilidade, diluição seriada e determinação de Km, deverão ser aplicados para reduzir as dúvidas.

A redução dos heteropolímeros formados entre os diferentes produtos gênicos (i.e., subunidades A e B) tem sido considerada como sendo o resultado do alto grau de divergência entre os locos. Tal propriedade é freqüentemente observada em teleósteos avançados (Whitt et al., 1975) – os Acanthopterygii, superordem da qual os ciclídeos fazem parte. A ausência

dos heteropolímeros formados entre os produtos dos locos LDH-A e LDH-B nas três espécies de ciclídeos aqui estudadas confirma sua posição filogenética como teleósteos avançados.

Segundo Hochachka (1996), o aumento ou diminuição da regulação de certos genes ou grupo de genes é dependente da intensidade e do limiar de hipóxia, bem como da habilidade do modelo em tolerar este limite ou não. Sendo assim, a predominância da expressão da isozima A₁ no coração dos ciclídeos estudados neste trabalho sinaliza que essas espécies são, no mínimo, moderadamente tolerantes a hipóxia.

Diante do que foi exposto pode-se dizer, então, que a distribuição tissular da LDH nas três espécies de ciclídeos está relacionada com a habilidade desses animais em tolerar hipóxia ambiental, expressando plasticidade fenotípica no coração. Esses resultados são confirmados pelo aumento da atividade da Lactato Desidrogenase neste mesmo órgão à medida que a quantidade de oxigênio disponível diminui em função do pulso de inundação da região. As respostas metabólicas observadas nas espécies *S. aff. jurupari*, *H. apendiculatus* e *C. orbicularis* revelam, portanto, alguns dos ajustes que estas espécies desenvolveram para sobreviver aos ambientes hipóxicos da Amazônia.

De fato, nossos estudos vêm avançando no que tange à regulação gênica em animais expostos a hipóxia e já podemos afirmar que a expressão do gene LDH-A* é modulada pela hipóxia em *Astronotus crassipinnis* e pode variar de acordo com o tamanho do peixe (Oliveira et al., 2002). Resta saber se a condição de aclimatização (adaptação ao ambiente) pode ser um fator que influencia nos ajustes metabólicos do animal quando os mesmos são submetidos a hipóxia. A partir dos dados aqui obtidos podemos sugerir que sim. A confirmação disso só será obtida após as análises da expressão do gene LDH-A* nos animais coletados nos diferentes meses com diferentes condições de oxigênio.

Bibliografias Citadas

- Almeida Val. V.M.F. (1997) Phenotype plasticity on fish of the Amazon. In: International Symposium Biology of Tropical Fishes. Manaus, AM, Brasil, 58.
- Almeida Val. V.M.F. & Hochachka, P.W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. In: Hochachka, P.W.; Mommsen, T. (Eds.). Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Environ. and Ecol. Biochem. Elsevier Science, Amsterdam, 45-55.
- Almeida Val. V.M.F. & Farias, I.P. 1996. Respiration in fish of the Amazon metabolic adjustments to chronic hypoxia. In: A.L. Val. V.M.F. Almeida-Val and D.J. Randall. (Eds.). Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon. INPA. Manaus. Brazil. 257-271.
- Almeida Val. V.M.F., Schwantes, M.L.B., Val. A.L.. 1990. LDH isozymes in Amazon fish – I. Electrophoretic studies on two species from serrasalmidae family: *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum*. Comp. Biochem. Physiol., 95B(1): 77-84.
- Almeida Val. V.M.F, Paula-Silva, M.N., Caraciolo, M.C.M., Mesquita, L.S. B., Farias, I.P., Val. A.L. 1992. LDH isozymes in Amazon fish. III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalmidae (Teleostei: Ostariophysi). Comp. Biochem. Physiol., 103B: 119-125.
- Almeida Val, V.M.F., Val, A.L., Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes status of an under-explored biological “goldmine”. In: P.W. Hochachka, P.L. Lutz, T. Sick, M. Rosenthal and G. Van den Thillart, (Eds.), Surviving Hypoxia Mechanisms of Control and Adaptation. CRC Press, Boca Raton, 435-445.

- Almeida Val, V.M.F., Farias, I.P., Silva, M.N.P., Duncan, W.P. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia in Amazon Cichlids. *Braz. J. Med. Biochem. Res.*, 28: 1257-1263.
- Almeida Val, V.M.F., Val, A.L., Walker, I. 1999a. Long and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O₂-levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. In: A. L. Val and V.M.F. Almeida-Val (Eds.), *Biology of tropical fishes*. INPA, Manaus, pp.185-203.
- Almeida Val, V.M.F., Paula-Silva, M.N., Duncan, W.P., Lopes, N.P., Val, A.L.. Land. S. 1999b. Increase of anaerobic potential during growth of an Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. Survivorship and LDH regulation after hypoxia exposure. In: A. L. Val and V.M.F. Almeida-Val (Eds.), *Biology of tropical fishes*. INPA. Manaus, pp.437-448.
- Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R. 1996. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the America*, 93: 12969-12973.
- Boyer, S.H.; Fainer, D.C., Watson-Williams, E.J. 1963. Lactate dehydrogenase variant from human blood evidence for molecular subunits. *Sciences*, 141: 349-356.
- Bunn, H.F. & Poyton, R.O. 1996. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological Reviews*, 76: 839-885.
- Chippari-Gomes, A.R., Leitão, M.A.B., Paula-Silva, M.N., Mesquita-Saad, L.S.B. Almeida-Val, V.M.F. 2002. Metabolic adjustments of *Satanoperca aff. jurupari* (Perciformes; Cichlidae). *Genetics and Molecular Biology*. In press.

- Driedzic, W.R. & Almeida Val, V.M.F. 1996. Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *J. Exp. Zool.*, 274: 327-333.
- Farias, I.P., Paula-Silva, M.N., Almeida Val, V.M.F. 1997. No co-expression of LDH-C in Amazon Cichlids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117B: 315-319.
- Guillemin, K. Krasnow, M.A. 1997. The hypoxia response: Huffing and HIFing. *Cell.*, 89: 9-12.
- Hochachka, P.W. 1996. Oxygen sensing and metabolic regulation: short, intermediate, and long term roles. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randal, D.J. (Eds.), *Physiology and biochemistry of fishes of the Amazon*. INPA, Manaus, 233-256.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princenton University Press, New Jersey. 537p.
- Junk, W.J., Soares, G.M., Carvalho, F.M. 1983. Distribution of fish species in a lake of the Amazon River floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana*, 7(4): 39-431.
- Junk, W.J., Bailey, P.B., Sparks, R.E. 1989. The flood-pulse concept in river-floodplain systems. In: D. Dodge (Ed.), *Proc. Int. Larger River Symp. Can. Spec. Publ. Fish Aquat. Sci.*, 106-127.
- Keitzmann, T., Schmidt, H., Probst, I., Jungermann, K. 1992. Modulation of the glucagons-dependent activation of the PEPCK gene by oxygen in rat hepatocyte cultures. *FEBS Lett.*, 311: 251-255.
- Keitzmann, T., Schmidt, H., Unthan-Feschner, K., Probst, I., Jungermann, K. 1993. A ferro-heme protein senses oxygen levels which modulate the glucagons dependent

- activation of the PEPCK gene in rat hepatocyte cultures. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 195: 792-798.
- Kettler, M.K. & Whitt, G.S. 1986. An apparent progressive and current evolutionary restriction in tissue expression of a gene, the lactate dehydrogenase-C gene, within a family of bony fish (Salmoniformes: Umbridae). *J. Mol. Evol.*, 23:95-107.
- Kornfield, I.L. 1979. Evidence for rapid speciation in African cichlid fishes. *Experientia*. 34: 335-336.
- Kornfield, I.L., Ritte, U., Richler, C., Wahrman, J. 1979. Biochemical and Cytological differentiation among Cichlid fishes of the sea of Galilee. *Evolution*, 33(1): 1-14.
- Kramer, D.L., Lindsey, C.C., Moodie, G.E.E., Stevens E.D. 1978. The fishes and aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. *Can. J. Zool.*, 56: 717-729.
- Land, S.L. & Hochachka, P.W. 1995. A heme-based oxygen sensing mechanism controls the hepatocytes: role and energy dependence of proteolysis. *Am. J. Physiol.* 266: C1028-C1036.
- Lowe-McConnell, R. H. 1969. The cichlid fishes of Guyana, South America, with notes on their ecology and breeding behavior. *Zool. J. Soc.*, 48: 255-302.
- Markert, C.L & Holmes, R.S. 1969. Lactate dehydrogenase isozymes of flatfish. Pleuronectiformes: kinetic, molecular and immunochemical analysis. *J. Exp. Zool.* 17: 105-118.
- Murphy, B.J., Robin, E.D., Tapper, D.P., Wong, R.J. 1984. Hypoxic coordinate regulation of mitochondrial enzymes in mammalian cells. *Science*, 223: 707-709.

- Nevo, E. 1990. Molecular Evolutionary Genetics of Isozymes: Pattern, Theory, and Application. *Biol. Med.*, 701-742.
- Nilsson, G.E. 1995. Oxygen availability: Brain defense mechanisms. In: Hochachka, P.W.&T.P. Mommsen (Eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. Environ. and Ecol. Biochem. Vol.5. Elsevier Science, Amsterdam, 19-44.
- Okino, S.T., Chichester, C.H., Whitlock, Jr., J.P. 1998. Hypoxia-inducible mammalian gene expression analyzed in vivo at TATA-driven promotor and at in initiator-driver promotor. *The Journal of Biological Chemistry*, 273- 23837-23843.
- Oliveira, A.R., Val, A.L., Paula-Silva, M.N., Lopes, N.P., Chippari-Gomes, A.R., Menk, C., Almeida-Val, V.M.F. 2002. LDH responses to hypoxia and anoxia in *Astronotus crassipinnis*. In: Randall, D.; MacKinlay, D. (Eds.). *Responses of fish to aquatic hypoxia* Proc. Int. Congress on the Biology of Fish. Vancouver, Canada. 65-69.
- Robin, E.D., Murphy, B.J., Theodore, J., 1984. Coordinate regulation of glycolysin by hypoxia in mammalian cells. *J. Cell. Physiol.*, 118: 287-290.
- Rooney, C.H.T. & Ferguson, A. 1985. Lactate dehydrogenase isozymes and allozymes of nine-spined stickleback *Pungitius pungitius* (L.) (Osteichthyes: Gasteroteidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 81B: 711-715.
- Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W. 1996. Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters containing essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 271: 32529-32537.

- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor 1. *The Journal of Biological Chemistry*, 269: 23757-23763.
- Shaklee, J.B.; Kepes, K.L., Whitt, G.S. 1973. Specialized lactate dehydrogenase isozymes: The molecular and genetic basis for the unique eye and liver LDH of teleost fishes. *J. Exp. Zool.*, 185: 217-240.
- Shaklee, J.B.; Allendorf, F.W.; Morizot, D.C., Whitt, G.S. 1989. Genetic nomenclature for protein-coding loci in fish: Proposed Guidelines. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 118: 218-227.
- Smithies, O. 1955. Zone electrophoresis in starch gel: Group variation in the serum proteins normal Human adults. *Biochem. J.*, 61: 629-641.
- Soitano, A.J., Rabergh, C.M.I., Gassmann, M., Sistonen, L., Nikimaa, M. 2001. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF) from rainbow trout. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 19699-19705.
- Stiassny, M.L.J. 1981. The phyletic status of the family Cichlidae (Pisces: Perciformes): a comparative anatomical investigation. *Netherl. J. Zool.*, 31: 275-314.
- Thompson, K.W. 1979. Cytotaxonomy of 41 species of neotropical Cichlidae. *Copeia*, 4: 679-691.
- Val, A.L. 1996. Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon. In: A.L., Val, V.M.F, Almeida-Val and D.J, Randall (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. INPA, Manaus, Brazil, 59-73.
- Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and Biochemical Features*. Springer Verlag, Heidelberg, 224 p.

- Val, A. L., Schwantes, A. R., Schwantes, M. L. B., De Luca, P. H. 1981. Amido de milho como suporte eletroforético. *Ciência e Cultura*, 33: 992-996.
- Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. 1996. Volume overview: Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon. In: A.L. Val, V.M.F. Almeida-Val and D.J. Randall (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. INPA, Manaus, Brazil, 1-3.
- Wang, G.L. & Semenza, G.L. 1993. General involvement of hypoxia inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academic of Sciences of the America*, 90: 4304-4308.
- Webster, K.A.; Discher, D.J., Bishopric, N.H. 1994. Regulation of *fos* and *jun* immediate-early genes by redox or metabolic stress in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 74: 679-686.
- Whitt, G.S.; Shaklee, J.B., Market, C.L. 1975. Evolution of the lactate dehydrogenase isozymes of fishes. In: Market, C.L. (Ed.), *Genetics and Evolution*. Academic Press, New York, 4: 381-400.
- Whitt, G.S. 1987. Species differences in isozyme tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analyses. In: M.C. Ratazzi, J.G. Scandalios and G.S Whitt (Eds.), *Isozymes: Current topics in biological and medical research*. Alan R Liss, New York, 2-23.

**CAPÍTULO III - Perfil metabólico de nove espécies de ciclídeos da
Amazônia**

Introdução

Com a finalidade de identificar os principais mecanismos que controlam a vida e, dessa forma, entender como os organismos interagem entre si e com o ambiente, muitos cientistas têm aprofundado seus conhecimentos a respeito do metabolismo dos animais (principalmente o do ser humano), dos microorganismos e das plantas. Esses estudos tornam-se mais interessantes quando a diversidade de espécies animais, no caso os peixes, interage intimamente com uma diversidade de ambientes, como é o caso da Amazônia.

O metabolismo de uma célula ou de um organismo pode ser definido como um conjunto de processos químicos pelos quais a vida se mantém. É evidente que todos os aspectos do metabolismo de um organismo não foram “desenhados” ao acaso. Os diferentes passos do metabolismo de um organismo são interconectados por uma delicada e intrincada rede de metabólitos e enzimas, que são expressos e controlados por componentes intrínsecos (genéticos) e extrínsecos (fisiológicos ou ambientais) (Hochachka, 1969). Dessa forma, pode-se esperar que o caráter pulsante da bacia amazônica afete diretamente as características metabólicas dos organismos que ali vivem, principalmente no que diz respeito aos ajustes desenvolvidos em relação à disponibilidade de oxigênio no meio.

Classicamente, o metabolismo como um todo, tem sido dividido em duas etapas: a catabólica e a anabólica. A fase de catabolismo (degradação) consiste da quebra de macromoléculas, com a finalidade de obter energia para o organismo, para que ocorra crescimento, reprodução, síntese de material genético, etc. Já a fase do anabolismo (biossíntese) consiste da construção de componentes estruturais, funcionais e de estoque das células a partir de substâncias simples como ácidos graxos, carboidratos e aminoácidos, utilizando a energia produzida pelo catabolismo. Neste capítulo, nos deteremos

principalmente ao estudo das enzimas que fazem parte do catabolismo: enzimas glicolíticas, enzimas da via oxidativa e da oxidação lipídica em diversas espécies de ciclídeos, que serão aqui sucintamente descritas.

Os animais possuem dois processos metabólicos com finalidade de produzir ATP: o aeróbio e o anaeróbio. Em presença de oxigênio, o mecanismo geral para obtenção de ATP em tecidos musculares de vertebrados é a mobilização do fósforo, por meio da fosfocreatina (PCr) que é requerida e catalisada pela Creatina Fosfoquinase (CPK). A outra forma pela qual o músculo obtém ATP é a fermentação ou catabolismo parcial que gera produtos finais aeróbicos (Hochachka, 1994).

Sob condições aeróbicas, a glicose ou o glicogênio armazenado no fígado ou no músculo é catalisado a piruvato e, subsequentemente, oxidado a CO_2 e H_2O por meio do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs) que fornece poder redutor à cadeia fosforilativa. Já em condições anaeróbicas, o piruvato é convertido a lactato pela enzima Lactato Desidrogenase (LDH).

A enzima LDH, além de ser responsável pela produção de lactato, é também responsável pela reoxidação do piruvato e pela re-conversão a glicogênio via gliconeogênese no fígado e no músculo (Hochachka, 1969). A LDH por ser uma enzima típica do metabolismo anaeróbico, é uma excelente ferramenta de estudo para se averiguar a tolerância dos animais expostos a condições hipóxicas, sejam elas ambientais ou experimentais.

Assim como a LDH, a enzima Piruvato Kinase (PK) também pertence ao grupo das enzimas glicolíticas, sendo uma das enzimas glicolíticas terminais. Em peixes a enzima PK, assim como as outras enzimas glicolíticas, como a hexoquinase (HK) e fosfofrutoquinase (PFK), possuem várias características comuns às várias enzimas regulatórias: catalizam etapas

de alta energia que são (essencialmente) irreversíveis, catalizam reações que envolvem uma energia intermediária alta e são enzimas com várias subunidades. São, também, alostericamente reguladas por diferentes compostos que servem para associar a atividade da enzima ao estado de energia da célula (Hochachka, 1969).

A enzima Malato Desidrogenase (MDH) faz parte do grupo das enzimas oxidativas, atuando no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs). A MDH é uma proteína composta por duas formas distintamente compartimentalizadas; uma forma mitocondrial (mMDH) e uma citoplasmática (sMDH). A mMDH catalisa a reação reversível do malato à oxaloacetato gerando poder redutor para a cadeia respiratória, e a sMDH está associada nos processos de gliconeogênese, lipogênese e ainda na lançadeira malato-aspartato que proporciona o transporte de poder redutor para a mitocôndria durante a glicólise aeróbica. Vários autores têm observado, em muitas espécies de peixes da Amazônia tolerantes a hipóxia, uma baixa regulação de enzimas oxidativas em muitos tecidos, sendo esta uma característica que pode ser considerada como uma resposta de defesa a hipóxia (Hochachka & Randall, 1978; Almeida-Val & Hochachka, 1995; Driedzic & Almeida-Val, 1996).

A enzima 3- Hidroxiacil CoA Desidrogenase (HOAD) é uma enzima do metabolismo lipídico, que é utilizada para indicar a taxa de oxidação dos lipídeos. A β oxidação dos lipídios, em combinação com o ciclo dos ácidos tricarboxílicos e a cadeia respiratória, fornece mais energia por átomo de carbono do que qualquer outra fonte, tal como a glicose e a quebra dos aminoácidos. No entanto, quando em situações de escassez de oxigênio, essa rota metabólica torna-se prejudicada, sendo então a glicólise anaeróbica a principal fonte de energia do organismo. Segundo Driedzic & Almeida-Val (1996) e West et al. (1999), as espécies de peixes amazônicas, geralmente, possuem baixa dependência do metabolismo

aeróbico de ácidos graxos na produção de ATP e alta dependência do metabolismo anaeróbico no coração.

A família Cichlidae

A família Cichlidae como dito no capítulo 1 é encontrada principalmente na África e Américas Central e do Sul (incluindo algumas ilhas do Caribe), sendo a região amazônica um dos principais centros de diversidade dos ciclídeos (Goulding, 1980). Esta família apresenta uma plasticidade de forma e cores inigualável a nenhum outro grupo de peixes (revisto por Val & Almeida-Val, 1995), sendo esta uma das razões por estes animais serem tão procurados para fins ornamentais.

Segundo Nelson (1994), os ciclídeos apresentam uma fossa nasal de cada lado; linha lateral interrompida; geralmente possui na nadadeira dorsal 7-25 espinhos e 5-30 raios flexíveis, a nadadeira anal apresenta 3-15 espinhos (3 na maioria das espécies) e 4-15 raios flexíveis. Atingem um comprimento máximo de 80cm, sendo os ciclídeos do gênero *Cichla* os maiores da Amazônia (Goulding, 1980). Existe, entre as espécies de ciclídeos, uma variabilidade no formato do corpo, a maioria deles possui um corpo fino e comprimido, similar ao do *Cichlasoma*. Entretanto, o corpo pode ser em forma de disco e ter a nadadeira extremamente alta, como ocorre nos *Pterophyllum* (acará-bandeira), ou ser baixa, como nos *Symphysodon* (acará-disco); ou também ter corpo alongado como nos *Crenicichlas* e *Cichlas* (jacundás e tucunarés) (Nelson, 1994).

Esta família apresenta um amplo espectro alimentar, como por exemplo, os ciclídeos do gênero *Cichlasoma* que se alimentam de matéria vegetal (incluindo frutas), invertebrados e peixes e os do gênero *Cichla* que são carnívoros (Goulding, 1980).

Estes animais formam um importante grupo de peixes ornamentais. Muitos dos modelos de coloração têm sido desenvolvidos através de reprodução seletiva de algumas espécies para o comércio de aquário (Nelson, 1994).

Essa plasticidade alcança o nível metabólico sendo que se supõe que a distribuição dos organismos deste grupo na natureza esteja relacionada com sua resistência à ausência de oxigênio na água e que, por sua vez, reflita seus perfis metabólicos e sua capacidade de regulá-los de acordo com as mudanças ambientais (Almeida-Val et al., 1995).

Devido a essa plasticidade de cores, formas, hábitos alimentares e adaptações aos mais diversos ambientes, escolhemos este grupo para ser o centro do nosso estudo, no caso deste capítulo abordaremos a variação da atividade de várias enzimas em diferentes espécies de ciclídeos coletados na natureza.

Objetivo

O objetivo deste capítulo foi:

1) Caracterizar e comparar o metabolismo de nove espécies de ciclídeos tentando estabelecer um padrão específico para a família, que corresponda aos seus hábitos de vida. Para tanto, investigamos as atividades enzimáticas de quatro tecidos: músculo branco, coração, fígado e cérebro, bem como verificamos o conteúdo de glicogênio hepático e muscular.

Material e Métodos

Coleta

Os animais utilizados neste capítulo foram oriundos das coletas realizadas no capítulo II, nas proximidades do Lago Catalão (59°54'29"N, 3°9'47"S), em frente à confluência do Rio Negro com o Rio Solimões, a 15 km da cidade de Manaus.

Os exemplares das nove espécies de ciclídeos trabalhados neste capítulo foram capturados nos meses de outubro e novembro de 2000. Foram usados animais referentes a esse período de coleta devido a uma maior quantidade de indivíduos de uma mesma espécie capturada naqueles meses, e pela quantidade de oxigênio disponível no meio ter sido muito próximas: outubro: 4,74mgO₂/L e novembro: 4,97mgO₂/L.

A temperatura média durante as coletas no mês de outubro foi 30,83 ± 1,4°C e no mês de novembro foi de 31,63 ± 0,83 °C.

Como no mês de novembro o nível do rio estava baixo, a coleta foi então realizada às margens do lago, próximo às galhadas. A coleta do mês de outubro ainda foi realizada dentro do igapó (vide capítulo II).

Espécies

As nove espécies utilizadas neste trabalho foram: *Satanoperca* aff. *jurupari* (n=7, 105,0 ± 17,7g), *Heros* *apendiculatus* (n=7, 87,9 ± 23,7g), *Chaetobranchopsis* *orbicularis* (n=10, 90,30 ± 29,97g), *Geophagus* aff. *altifrons* (n=10, 109,3 ± 21,7g), *Astronotus* *crassipinnis* (n=10, 230,0 ± 71,0g), *Symphysodon* *discus* (n=5, 52,3 ± 33,8g), *Cichla* *monoculus* (n=8, 277,3 ± 130,9g), *Pterophyllum* *scalare* (n=8, 30,3 ± 7,0g), *Acaronia* *nassa* (n=10, 114,15 ± 25,12),

Análises laboratoriais

Preparação dos tecidos e obtenção dos extratos para a análise do perfil enzimático

Na análise das enzimas Piruvato Kinase, Lactato Desidrogenase, Malato Desidrogenase e 3- Hidroxiacil CoA Desidrogenase, foi utilizado o tampão Imidazol 150mM, contendo 1mM de EDTA, 5mM de dithiothreitol (DTT) e 1% de triton X-100, pH 7,4.

Foram analisadas as amostras de músculo esquelético (branco), cardíaco, fígado e cérebro. Estes tecidos foram homogeneizados em triturador automático (Tissue Tearos mod. 985370) em gelo fundente e centrifugados durante 15 minutos a 13.000g em centrífuga Sorvall RC5B a 4°C para retirar o material particulado. Os ensaios enzimáticos foram feitos com o extrato (porção sobrenadante) a 25°C. A diluição utilizada para o homogenado variou de acordo com cada tecido: 1:4 para o músculo branco, fígado e cérebro e 1:10 para o coração.

Análise Enzimática

Os níveis de atividade enzimática foram determinados a 25°C em um espectrofotômetro Spectronic Genesys 2, utilizando as técnicas revistas por Driedzic & Almeida-Val (1996). As reações enzimáticas procederam com os seguintes protocolos:

- 1) **PK** - 150mM de KCl, 10mM de MgSO₄ (sulfato de magnésio), 0,15mM de NADH, 5mM de ADP, 10 IU/ml de lactato desidrogenase, 1mM de KCN em 50mM de imidazol, pH 6,9 a 25°C. As reações foram iniciadas com a adição de 2,5mM de fosfoenolpiruvato;
- 2) **LDH** - 0,15mM de NADH, 1mM de KCN em 50mM de imidazol, pH 7,4 a 25°C. As reações foram iniciadas com adição de 1 e 10mM de piruvato;

- 3) **MDH** - 0,15mM de NADH em 50mM de imidazol, pH 7,4 a 25°C. As reações foram iniciadas com adição de 0,5mM de ácido oxalacético;
- 4) **HOAD** – 0,15mM de NADH, 1mM de KCN, 1mM de EDTA em 50mM de imidazol, pH 7,5 a 25°C. As reações foram iniciadas com a adição de 0,1mM de acetoacetyl CoenzimaA.

O cálculo para determinar a atividade da enzima nos tecidos seguiu de acordo com a equação abaixo:

$$\mu\text{moles substrato.g}^{-1} \text{ tecido fresco. min}^{-1} = \frac{\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{fd (cubeta)}}{6,22} \times \frac{\text{vol. tampão (ml)}}{\text{peso tecido (g)}}$$

onde:

fd = fator de diluição

$\Delta\text{OD}/\text{min}$ = variação na densidade óptica por minuto

6,22 = coeficiente de extinção molar da coenzima NADH

Glicogênio

A determinação da concentração de glicogênio hepático e do músculo branco foi realizada segundo Keppler & Decker (1974), com modificações. Neste método, 100mg de tecido foram homogeneizados em 400 ml de PCA (8%) sendo a centrifugação realizada em baixa rotação (2.000 rpm) por 5 min, para não sedimentar o glicogênio. Após isso, o extrato ácido foi neutralizado com KHCO_3 (1,0M) e o glicogênio presente no extrato foi digerido pela ação da enzima amiloglicosidase, que foi adicionada à amostra, a mistura foi incubada a 45°C durante 4 horas, com agitação. Após este período a inativação da enzima foi obtida com a adição de PCA (35%), sendo o extrato neutralizado (v:v) com KHCO_3 (1,0M). A hidrólise do

glicogênio produziu unidades de glicosil. A leitura foi realizada em um, espectrofotômetro Spectronic Genesis 2 usando-se os mesmos procedimentos para determinação dos níveis de glicose (sistema enzimático colorimétrico produzido pela Doles S.A. - "kit" Glucox 500). Os valores foram expressos em unidades de glicosil/g de tecido fresco.

Resultados

Atividades enzimáticas

PK

O nível da enzima PK nos quatro tecidos estudados das nove espécies de ciclídeos estão representados nas tabelas 1, 2, 3 e 4. Observa-se nestas tabelas a variação dos níveis desta enzima entre as espécies nos diferentes tecidos. Nas espécies *C. orbicularis*, *A. crassipinis* e *C. monocolus* a atividade da PK no fígado esteve abaixo dos níveis detectáveis pelo método (Tabela 3).

LDH

Observando as tabelas 1, 2, 3 e 4 notamos também que a atividade da LDH varia entre as diferentes espécies de ciclídeos, sendo o músculo branco o tecido com maior atividade (Tabela 1) e o fígado com menor atividade da LDH (Tabela 3). Ainda, quanto à atividade da enzima LDH no músculo branco, notamos que as espécies de ciclídeos dividem-se em dois grupos, um formado pela espécie *H. apendiculatus* e *C. monocolus* possuindo níveis de LDH maiores que o outro grupo, formado pelas demais espécies.

A razão entre a atividade da LDH em baixa concentração de piruvato e alta concentração de piruvato em todos os casos foi acima que 1 (Tabelas 1, 2, 3 e 4) indicando inibição da enzima pelo substrato. Muitos desses valores estão bem próximos de 1 o que

indica que não tem inibição do metabolismo anaeróbico, caracterizando a existência de potencial glicolítico anaeróbico para muitas das espécies analisadas.

É interessante notar que as espécies *H. apendiculatus* e *C. monoculus*, destacadas por apresentarem maiores níveis de LDH em músculo branco, apresentam menor inibição pelo piruvato.

Assim como PK, o fígado foi o tecido que apresentou menores níveis absolutos da enzima, refletindo o baixo potencial glicolítico anaeróbico deste órgão.

MDH

Nas tabelas 2 e 3 observa-se que a atividade da enzima MDH é maior no coração e no fígado do que nos demais tecidos (Tabela 1 e 4), sendo os valores semelhantes entre as espécies de ciclídeos, com exceção das espécies *H. apendiculatus* (no coração e fígado) e *crassipinnis* (no fígado) que apresentam atividade maior dessa enzima em relação às demais espécies. Quanto ao músculo branco (Tabela 1) observa-se também uma padronização quanto à atividade dessa enzima, com exceção das espécies *S. aff. jurupari* e *H. apendiculatus* nas quais a atividade da MDH é maior em relação às demais espécies. O cérebro (Tabela 4) também apresentam padronização do nível de atividade dessa enzima com algumas exceções.

Essas quatro tabelas mostram a razão entre a atividade da enzima MDH em relação à enzima LDH (MDH/LDH) nos quatro tecidos analisados para as nove espécies de ciclídeos. Observa-se nestas tabelas que a razão MDH/LDH é menor que 1 apenas no músculo branco dos exemplares estudados e que essa razão é maior, em duas ordens de magnitude, para o fígado das nove espécies, refletindo as características gliconeogênicas deste órgão.

HOAD

A enzima HOAD também varia em sua atividade entre as diferentes espécies como mostram as tabelas 1, 2, 3 e 4. Observa-se nas tabelas 2 e 3 que os níveis de HOAD também são maiores no coração e no fígado das espécies estudadas. Por problemas nas amostras não foi possível medir a atividade da HOAD no coração e cérebro das espécies *S. aff. jurupari*, *H. apendiculatus* e *C. orbicularis*.

Tabela 1. Níveis de atividade das enzimas estudadas no músculo branco das nove espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão.

	Atividades enzimáticas							
	Glicolítica			Oxidativa	Lipídica	Razões		
	PK	LDH 1mM	LDH 10mM	MDH	HOAD	LDH (1/10mM)	PK/LDH	MDH/LDH
<i>S. aff. jurupari</i> (n=7)	116,1 ± 9,5	196,4 ± 15,0	93,0 ± 8,7	41,8 ± 2,8	0,20 ± 0,008	2,11	0,59	0,21
<i>H. apendiculatus</i> (n=7)	131,5 ± 22,1	415,8 ± 51,5	348,4 ± 38,0	42,8 ± 2,6	0,20 ± 0,03	1,19	0,32	0,10
<i>C. orbicularis</i> (n=10)	94,8 ± 6,6	131,4 ± 8,3	48,2 ± 2,8	7,4 ± 0,2	0,71 ± 0,04	2,73	0,72	0,06
<i>G. aff. altifrons</i> (n=10)	116,0 ± 8,8	138,3 ± 10,7	124,1 ± 8,6	5,0 ± 0,2	0,15 ± 0,03	1,11	0,84	0,04
<i>A. crassipinnis</i> (n=10)	54,8 ± 8,1	212,6 ± 15,2	198,8 ± 17,1	6,3 ± 0,3	0,36 ± 0,01	1,07	0,26	0,03
<i>S. discus</i> (n=5)	90,1 ± 27,2	181,8 ± 18,5	158,8 ± 18,9	7,6 ± 0,5	0,17 ± 0,02	1,15	0,50	0,04
<i>C. monoculus</i> (n=8)	22,0 ± 3,0	389,5 ± 52,1	352,5 ± 38,9	9,5 ± 0,9	0,13 ± 0,01	1,10	0,06	0,02
<i>P. scalare</i> (n=8)	162,2 ± 17,8	185,9 ± 7,7	181,9 ± 9,1	8,7 ± 1,0	0,27 ± 0,02	1,02	0,87	0,05
<i>A. nassa</i> (n=10)	100,9 ± 14,5	122,1 ± 13,8	98,0 ± 12,1	8,7 ± 1,0	0,74 ± 0,13	1,25	0,83	0,07

Nota: Os valores são expressos em média ± SEM ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$); os ensaios foram realizados a 22-25°C.

Tabela 2. Níveis de atividade das enzimas estudadas no músculo cardíaco das nove espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão.

	Atividades enzimáticas							
	Glicolítica			Oxidativa	Lipídica	Razões		
	PK	LDH 1mM	LDH 10mM	MDH	HOAD	LDH (1/10mM)	PK/LDH	MDH/LDH
<i>S. aff. jurupari</i> (n=7)	96,6 ± 5,3	52,3 ± 6,6	16,8 ± 2,0	120,9 ± 13,8	-	3,11	1,85	2,31
<i>H. apendiculatus</i> (n=7)	60,9 ± 4,0	26,9 ± 3,4	15,9 ± 1,6	249,4 ± 15,1	-	1,69	2,26	9,27
<i>C. orbicularis</i> (n=10)	84,2 ± 8,1	48,1 ± 6,0	20,1 ± 2,3	143,8 ± 14,0	-	2,39	1,75	3,00
<i>G. aff. altifrons</i> (n=10)	113,5 ± 5,9	89,2 ± 13,9	27,5 ± 4,8	167,0 ± 5,2	7,6 ± 0,5	3,24	1,27	1,87
<i>A. crassipinnis</i> (n=10)	87,5 ± 3,9	19,6 ± 1,9	15,7 ± 1,4	141,4 ± 3,9	3,5 ± 1,2	1,25	4,46	7,21
<i>S. discus</i> (n=5)	3,8 ± 0,7	7,0 ± 0,6	5,3 ± 0,9	164,8 ± 9,3	3,1 ± 0,3	1,32	0,54	23,54
<i>C. monoculus</i> (n=8)	12,1 ± 1,4	12,8 ± 1,1	10,6 ± 1,1	158,3 ± 10,4	1,6 ± 0,1	1,21	0,94	12,37
<i>P. scalare</i> (n=8)	56,3 ± 2,7	20,9 ± 2,2	17,1 ± 2,3	152,9 ± 12,8	4,2 ± 0,9	1,22	2,69	7,32
<i>A. nassa</i> (n=10)	55,3 ± 1,9	5,4 ± 0,9	3,5 ± 0,6	148,0 ± 3,7	2,5 ± 0,3	1,54	10,24	27,41

Nota: Os valores são expressos em média ± SEM ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$); os ensaios foram realizados a 22-25°C. (-) atividade enzimática não medida no tecido.

Tabela 3. Níveis de atividade das enzimas estudadas no figado das nove espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão.

	Atividades enzimáticas							
	Glicolítica			Oxidativa	Lipídica	Razões		
	PK	LDH 1mM	LDH 10mM	MDH	HOAD	LDH (1/10mM)	PK/LDH	MDH/LDH
<i>S. aff. jurupari</i> (n=7)	9,1 ± 1,6	1,8 ± 0,4	1,9 ± 1,1	78,6 ± 7,6	0,9 ± 0,12	0,9	5,05	43,67
<i>H. apendiculatus</i> (n=7)	5,4 ± 0,9	3,6 ± 0,4	3,4 ± 0,2	265,7 ± 17,5	0,5 ± 0,08	1,1	1,50	73,81
<i>C. orbicularis</i> (n=10)	Não detectável	1,8 ± 0,2	0,9 ± 0,1	111,7 ± 5,7	1,4 ± 0,12	2,0	-	62,06
<i>G. aff. altifrons</i> (n=10)	4,1 ± 1,0	4,6 ± 1,3	4,4 ± 1,0	115,0 ± 8,8	1,6 ± 0,30	1,0	0,89	25,00
<i>A. crassipinnis</i> (n=10)	Não detectável	3,3 ± 1,0	2,7 ± 0,8	268,9 ± 23,3	1,0 ± 0,06	1,2	-	81,48
<i>S. discus</i> (n=5)	0,30 ± 0,1	3,8 ± 0,7	2,9 ± 0,9	112,2 ± 3,1	0,3 ± 0,03	1,3	0,08	29,53
<i>C. monoculus</i> (n=8)	Não detectável	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,2	183,3 ± 3,9	2,1 ± 0,3	0,9	-	122,20
<i>P. scalare</i> (n=8)	4,4 ± 1,0	7,3 ± 1,0	5,8 ± 0,9	139,6 ± 6,2	0,6 ± 0,07	1,3	0,61	19,13
<i>A. nassa</i> (n=10)	2,1 ± 0,5	3,6 ± 0,8	3,0 ± 0,2	130,8 ± 6,2	2,2 ± 0,3	1,2	0,58	36,33

Nota: Os valores são expressos em média ± SEM ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$); os ensaios foram realizados a 22-25°C. (-) razão não calculada pois atividade da enzima PK no tecido não foi detectada.

Tabela 4. Níveis de atividade das enzimas estudadas no cérebro das nove espécies de ciclídeos capturadas nas proximidades do Lago Catalão.

	Atividades enzimáticas							
	Glicolítica			Oxidativa	Lipídica	Razões		
	PK	LDH 1mM	LDH 10mM	MDH	HOAD	LDH (1/10mM)	PK/LDH	MDH/LDH
<i>S. aff. jurupari</i> (n=7)	88,8 ± 2,2	24,8 ± 2,2	10,8 ± 0,6	60,8 ± 3,1	-	2,30	3,58	2,45
<i>H. apendiculatus</i> (n=7)	99,7 ± 6,9	47,5 ± 5,1	41,1 ± 4,2	150,2 ± 14,9	-	1,16	2,10	3,16
<i>C. orbicularis</i> (n=10)	86,2 ± 2,6	23,0 ± 0,7	9,1 ± 0,4	63,9 ± 2,5	-	2,53	3,75	2,78
<i>G. aff. altifrons</i> (n=10)	94,7 ± 6,0	50,2 ± 4,3	17,6 ± 1,7	83,1 ± 4,3	1,1 ± 0,06	2,85	1,89	1,65
<i>A. crassipinnis</i> (n=10)	112,8 ± 1,8	29,2 ± 0,9	26,9 ± 0,7	88,0 ± 2,7	0,9 ± 0,06	1,09	3,86	3,01
<i>S. discus</i> (n=5)	15,3 ± 1,6	17,5 ± 1,0	12,9 ± 0,4	67,3 ± 3,0	0,3 ± 0,03	1,36	0,87	3,85
<i>C. monoculus</i> (n=8)	6,7 ± 0,4	9,7 ± 1,9	8,5 ± 0,3	55,7 ± 1,7	0,4 ± 0,04	1,14	0,69	5,74
<i>P. scalare</i> (n=8)	34,1 ± 0,8	30,8 ± 1,7	27,2 ± 1,3	83,1 ± 1,9	0,8 ± 0,03	1,13	1,11	2,70
<i>A. nassa</i> (n=10)	75,9 ± 4,2	22,2 ± 2,5	16,2 ± 2,1	66,8 ± 3,7	0,5 ± 0,08	1,37	3,42	3,01

Nota: Os valores são expressos em média ± SEM ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$): os ensaios foram realizados a 22-25°C.(-) atividade enzimática não medida no tecido.

Glicogênio

O conteúdo de glicogênio no músculo branco foi bastante semelhante entre as nove espécies ciclídeos (Figura 1A), variando de 233,14 a 321,14 $\mu\text{mol.g}^{-1}$. Já o conteúdo de glicogênio no fígado teve uma variação maior quando se compara as nove espécies estudadas (Figura 1B), variando de 531,34 a 1.266,68 $\mu\text{mol.g}^{-1}$. Devido a problemas nas amostras, também, não foi possível fazer a análise no fígado das espécies *S. aff. jurupari*, *H. apendiculatus* e *C. orbicularis*.

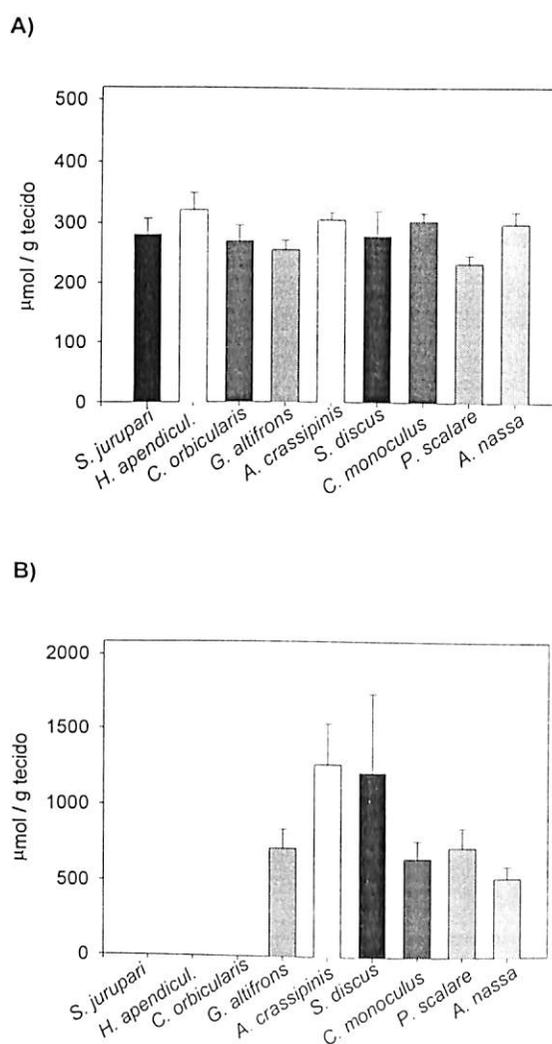


Figura 1. Conteúdo de glicogênio muscular (A) e hepático (B) das nove espécies de ciclídeos estudadas.

Discussão

Neste capítulo vimos que há uma variação da atividade das diversas enzimas nas nove espécies de ciclídeos aqui estudadas. De acordo com Hochachka & Somero (1984), as necessidades para as diferentes funções metabólicas podem variar grandemente entre o estágio de desenvolvimento, entre as diferentes condições ambientais, e entre os diferentes órgãos e tecidos nos diferentes organismos.

A enzima PK, que catalisa a reação de conversão de PEP + ADP a piruvato + ATP, apresentou variações em seus níveis de atividade quando comparamos os quatro tecidos das nove espécies estudadas, no entanto observamos pouca variação num mesmo tipo de tecido, como é o caso dos músculos esquelético, cardíaco e cérebro, com algumas exceções. Quanto ao tecido hepático, observamos que há uma variação nos níveis de atividade dessa enzima muito mais marcante, enquanto a espécie *S. aff. jurupari* apresenta níveis de PK próximos a $7\mu\text{moles PEP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, outras espécies como *C. orbicularis*, *A. crassipinnis* e *C. monoculus* apresentam valores da atividade dessa enzima abaixo do nível de detecção do método. Segundo Knox et al. (1980) a atividade da PK é bem menor no fígado, brânquias e rins do que no músculo branco e coração das espécies de peixes de região temperada como bacalhau, linguado e truta. Resultado este similar ao observado para as espécies de ciclídeos aqui estudadas.

West et al (1999), estudando o coração e o músculo vermelho de teleósteos da Amazônia e de região norte-temperada, encontraram que os valores da enzima PK no coração são menores nos animais da Amazônia, uma média aproximada de $49\mu\text{moles de PEP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$, contra uma média de $94,5\mu\text{moles PEP}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ para os animais da zona temperada. Segundo West et al. (1999) a diferença na atividade dessa enzima nesses dois grupos de animais, assim

como a diferença observada em outras enzimas estudadas (HK, PFK, LDH, HOAD, CPT, Cyt Ox e CS) deve-se, provavelmente, à temperatura (25°C) em que os ensaios enzimáticos foram realizados, cerca de 10°C acima da temperatura em que os peixes da região temperada foram aclimatados. Esses autores sugerem, então, que se estes resultados (*in vitro*) forem decrescidos cerca de duas vezes para dentro da variação fisiológica, pode-se dizer então que a mesma capacidade metabólica pode existir nos tecidos de espécies de peixes tropicais a da zona temperada em suas respectivas temperaturas corporais. No presente trabalho, entretanto, os valores encontrados para a PK de coração das espécies de ciclídeos analisadas variaram de $4,4 \pm 1,5 \mu\text{moles PEP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ a $88,3 \pm 4,6 \mu\text{moles PEP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, com exceção das espécies *S. discus* e *C. monoculus*, cujos valores estiveram abaixo de $10 \mu\text{moles PEP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Portanto, com exceção destas duas espécies, podemos afirmar que a capacidade glicolítica do coração dos ciclídeos é alta.

Além disso, a relação PK/LDH também mostra alta capacidade glicolítica no coração da maioria das espécies. *S. discus* e *C. monoculus* apresentam potencial anaeróbio no coração, refletido pela taxa PK/LDH < 1,0. É importante que se ressalte que esses valores foram obtidos em peixes coletados num mês onde a disponibilidade de oxigênio era alta em relação aos demais meses de coleta. A predominância da LDH sobre a PK no coração dessas duas espécies pode refletir estresse provocado com a captura dos animais.

Em relação à atividade da enzima LDH, notamos que as espécies de ciclídeos também diferem entre si nos níveis de atividade dessa enzima, diferenças estas encontradas nos quatro tecidos. Observa-se ainda que os níveis de LDH no músculo branco são maiores do que nos demais tecidos, como era de se esperar por este ser um tecido eminentemente anaeróbico.

Segundo Hochachka & Somero (1984) os níveis de enzimas glicolíticas são maiores no músculo branco do que em qualquer outro tecido ou órgão do corpo de um vertebrado.

Embora a atividade no músculo branco tenha sido maior do que nos demais tecidos, nota-se que os níveis de atividade da LDH dos ciclídeos aqui estudados são menores que os encontrados para outras espécies de peixes da Amazônia tanto de respiração aquática quanto aérea (Hochachka & Hulbert, 1978; Hochachka et al., 1978; Hochachka, 1980; Driedzic & Almeida-Val, 1996; Almeida-Val & Farias, 1996), refletindo uma supressão do metabolismo geral do animal. Por exemplo, a espécie *Prochilodus scrofa* apresenta níveis de LDH próximos a $950 \mu\text{moles Pir. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ no músculo branco e a espécie *Prochilodus nigricans* os níveis são próximos a $561 \mu\text{moles Pir. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ para (Lopes, 1999). No coração, as espécies *Colossoma macropomum* e *Brycon cephalus* apresentam níveis de LDH próximos a 573 e $202 \mu\text{moles Pir. min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, respectivamente (Driedzic & Almeida-Val, 1996). Acreditamos que os baixos valores da atividade da LDH encontrados nos tecidos das espécies de ciclídeos aqui estudadas devem-se ao estilo de vida territorial e moderado que esses animais possuem. Em trabalhos realizados anteriormente (Chippari-Gomes et al., 2002) sugerimos que a baixa atividade da enzima LDH encontrada no músculo e no coração da espécie *S. aff. jurupari*, bem como as demais enzimas analisadas (MDH e CS), indicam que esta espécie de peixe tenha hábitos territoriais e que depende pouco do metabolismo oxidativo.

De qualquer maneira, os estudos realizados no presente trabalho mostram que a atividade da LDH varia de acordo com o mês de captura de três espécies o que provavelmente está relacionado com a disponibilidade de oxigênio no ambiente (capítulo II). Assim, não podemos tomar os valores das enzimas aqui medidos como valores absolutos e imutáveis, pois os animais estão sob pressões ambientais e sofrem ajustes metabólicos, por meio da regulação

alostérica e da síntese das enzimas das diferentes rotas metabólicas, para se ajustar às mesmas. É importante ressaltar que apenas a análise comparativa é pertinente ao presente capítulo

Quanto aos valores de inibição pelo piruvato (LDH 1mM/10mM) encontrados neste estudo evidencia-se que, com a exceção das espécies *S. aff. jurupari*, *H. apendiculatus*, *C. orbicularis* e *G. aff. altifrons*, o metabolismo desses animais está baseado na glicólise podendo ativar seu metabolismo anaeróbico na maioria dos tecidos. A presença de inibição pode refletir as condições da concentração de oxigênio dissolvido no local onde foram capturados, já que no período de outubro e novembro as concentrações de oxigênio encontravam-se relativamente altas (próximas a 5,0mgO₂/L). A inibição da LDH pelo substrato reflete a inabilidade da enzima em transformar piruvato em lactato quando este se acumula nas células, direcionando tal metabólito para o metabolismo aeróbico ou para a gliconeogênese. A manutenção de tal inibição em condições hipóxicas pode ser um mecanismo de defesa do animal para não acumular ácido láctico em seus tecidos. No capítulo II verificamos que isso ocorreu com a enzima LDH em tecidos das espécies *S. aff. jurupari*, *H. apendiculatus* e *C. orbicularis*, capturadas nos diferentes meses do ano, quando o oxigênio oscilou e atingiu níveis próximos a zero (março = 0,08mgO₂/L). Resta saber como canalizam o piruvato quando o oxigênio era indisponível aos animais em hipóxia. No próximo capítulo (Capítulo IV) poderemos verificar que a estratégia de duas espécies de ciclídeos, *Astronotus crassipinnis* e *Symphysodon aequifasciatus*, quando expostas à hipóxia gradual, é a combinação da supressão do metabolismo aeróbico com a ativação do metabolismo glicolítico, gerando ATP na medida necessária para a manutenção das atividades basais. Dado interessante é que, aparentemente, essas espécies canalizam a pouca energia produzida

anaerobicamente na síntese de glicogênio muscular, o que explica a inibição da LDH nos diferentes tecidos.

A ausência de inibição da enzima LDH por altas concentrações de piruvato já foi observada inúmeras vezes, inclusive em teleósteos tropicais. Segundo Val & Almeida-Val (1995) a espécie *C. macropomum* apresentou variação quanto à inibição a altas concentrações de piruvato em função do período do ano em que foi capturada, sendo durante o período de seca (setembro a novembro) que os valores da taxa de inibição foram menores que 1. Embora todas as espécies tenham apresentado inibição ao piruvato, observa-se ainda que as espécies *S. aff. jurupari* e *C. orbicularis* destacam-se das demais espécies de ciclídeos por apresentarem valores bem mais altos em todos os tecidos.

A enzima MDH, por atuar no metabolismo oxidativo e na gliconeogênese, apresentou elevados níveis de atividade no coração, fígado e cérebro, e baixos níveis no músculo branco nas espécies estudadas, com exceção das espécies *S. aff. jurupari* e *H. apendiculatus*. Esses resultados mostraram claramente que esses três órgãos possuem metabolismo tipicamente aeróbico. As razões MDH/LDH (vide tabelas 1, 2, 3 e 4) são indicadoras da predominância de metabolismo anaeróbico em alguns tecidos. Como esperado, órgãos com menor capacidade de tolerar anaerobiose apresentaram tais valores mais elevados, como o fígado por exemplo. Resultados similares foram observados por Almeida-Val & Farias (1996) para a espécie *Lipossarcus pardalis* na qual a razão MDH/LDH no fígado foi igual a 29,68. Além do mais, há diferenças entre as espécies estudadas que podem estar a refletir suas capacidades em tolerar períodos prolongados de hipóxia. Entretanto, não existe na literatura nenhum dado que proponha a relação desses valores com a tolerância a hipóxia. Outra explicação para os elevados níveis de MDH no fígado é que esta enzima está associada à síntese de glicose e de

lipídios e, ainda, ao transporte de poder redutor para a mitocôndria, durante a glicólise aeróbica, estando também associada à catálise da reação do malato a oxalacetato. A razão MDH/LDH nos indica também que o músculo branco desses animais é um tecido anaeróbico por excelência, uma vez que a razão MDH/LDH é sempre inferior a 1, o que pode indicar capacidade natatória de arranque, uma vez que estas espécies são territorialistas e agressivas, fazendo uso constante de tal comportamento (nado de arranque).

Assim como para as demais enzimas aqui estudadas, observamos variação na atividade da enzima HOAD nas nove espécies de ciclídeos, sendo o coração e o fígado os órgãos com maiores níveis de atividade dessa enzima. Estes resultados sugerem que a fonte energética desses dois tecidos pode estar baseada no catabolismo dos ácidos graxos, embora estes valores sejam inferiores aos encontrados para teleósteos de regiões temperadas. Segundo Driedzic & Almeida-Val (1996), essa diferença deve-se ao fato de que espécies amazônicas possuem, em comum, uma baixa dependência do metabolismo aeróbico dos ácidos graxos como fonte de produção de ATP e uma dependência relativamente alta do metabolismo glicolítico. Os autores sugerem que esta organização do metabolismo possa estar relacionada às adaptações aos ambientes hipóxicos da Amazônia. West et al (1999) também observaram que as espécies de regiões temperadas e árticas possuem uma maior atividade da enzima HOAD no coração ($\approx 10,3 \mu\text{moles AACoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) em contraposição às espécies amazônicas ($\approx 6,8 \mu\text{moles AACoA} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$), como uma compensação à temperatura, uma vez que, a baixas temperaturas, a atividade catalítica é menor.

Segundo Hochachka & Somero (1984), as atividades metabólicas dos tecidos e órgãos dos animais não acontecem num vácuo; de certo modo elas são integradas em relação às necessidades do organismo com um todo. Pode-se dizer então que os músculos apresentam

uma plasticidade e ajustam suas atividades metabólicas a condições ambientais particulares. Tais adaptações podem refletir em mudanças nos tipos e nas atividades das enzimas (Hochacka & Somero, 1984). Novamente aqui, reportamo-nos ao capítulo II do presente trabalho para a corroboração desta hipótese.

Segundo Hochachka (1980), os carboidratos são estocados na forma de glicogênio hepático e muscular, sendo considerados as maiores reservas de energia dos peixes. Dessa forma, observa-se no presente trabalho que as maiores concentrações de glicogênio encontram-se no fígado, e secundariamente no músculo branco. Normalmente, o glicogênio representa cerca de 1 a 6% do peso do fígado, embora algumas espécies, como *Cyprinus carpio* possam acumular valores que excedem a 10% (Navarro & Gutiérrez, 1995). Observa-se, ainda, que o conteúdo de glicogênio muscular foi mais homogêneo entre as diferentes espécies de ciclídeos aqui analisadas do que no fígado. De acordo com Navarro & Gutiérrez (1995), há uma variação grande na quantidade de glicogênio no fígado entre os diferentes indivíduos. A quantidade de glicogênio por ser a principal fonte de energia do organismo (Hochachka, 1980), varia em função de inúmeros fatores, tais como privação alimentar (Navarro et al, 1992; Navarro & Gutiérrez, 1995), variação de temperatura (Gordon & Mcleay, 1978), variação nas concentrações de oxigênio (Van den Thillart & Van Waarde, 1985), variação de exercícios, etc. Diante disso, podemos dizer que a variação na quantidade de glicogênio no fígado observada neste trabalho pode também estar relacionada a alguns desses fatores, principalmente quanto à privação alimentar, uma vez que não foi feita uma avaliação do conteúdo estomacal desses animais. Segundo De la Higuera & Cardenas (1986) os valores de glicogênio em truta alimentada pode variar de 35 a 2.000 $\mu\text{mol.g}^{-1}$, essa variabilidade pode refletir os procedimentos de amostragem, esforço e/ou diferenças na

história de vida de cada indivíduo. Pode-se dizer, então, que os valores de glicogênio encontrados neste trabalho estão dentro da variação encontrada para a maioria das espécies de teleósteos, que não são superiores a $1500\mu\text{mol.g}^{-1}$ (Moon & Foster, 1995).

Diante de tudo o que foi explanado neste capítulo podemos dizer que as nove espécies de ciclídeos aqui estudadas apresentam variações quanto à atividade das enzimas estudadas e quanto à quantidade de glicogênio em seus tecidos. No entanto, fica claro a maior dependência de todos os tecidos na atividade glicolítica em detrimento da oxidação de ácidos graxos, predominante em tecidos altamente aeróbicos. O estilo de vida deste grupo de peixes, somado a todos os resultados observados no presente trabalho e na literatura de que esses animais toleram hipóxia nos ambientes em que vivem, podem refletir no perfil metabólico das espécies aqui observadas.

Bibliografias Citadas

- Almeida Val, V.M.F. & Hochachka, P.W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. In: Hochachka P.W.; Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Environ. and Ecol. Biochem.*, vol 5, Elsevier Science, Amsterdam, 45-55.
- Almeida Val, V.M.F. & Farias, I.P. 1996. 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*. INPA, Manaus, Brazil, 257-271.
- Almeida Val, V.M.F., Farias, I.P., Silva, M.N.P., Duncan, W.P. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia in Amazon Cichlids. *Braz. J. Med. Biochem. Res.*, 28: 1257-1263.
- Chippari-Gomes, A.R., Leitão, M.A.B., Paula-Silva, M.N., Mesquita-Saad, L.S.B. Almeida-Val, V.M.F. 2002. Metabolic adjustments of *Satanoperca aff. jurupari* (Perciformes: Cichlidae). *Genetics and Molecular Biology*. In press.
- De la Higuera, M. & Cardenas, P. 1986. Hormonal effects on gluconeogenesis from (U-¹⁴C) glutamate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 85B: 517-521.
- Driedzic, W.R. & Almeida Val, V.M.F. 1996. Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *J. Exp. Zool.*, 274: 327-333.

- Gordon, M.R. & McLeay, D.J. 1978. Effect of photoperiod on seasonal variations in glycogen reserves of juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 60A: 326-349.
- Goulding, M. (1980). *The fishes and the forest. Explorations in Amazon natural history.* University of California press. 280p.
- Hochachka, P.W. 1969. Intermediary metabolism in fishes. In: Hoar W.G.; Randal, D.J (Eds.), *Fish Physiology.* Academic Press, New York, 1: 351-390.
- Hochachka, P.W. 1980. *Living without oxygen.* Harvard University Press, 181p.
- Hochachka, P.W. 1994. *Muscles as molecular and metabolic machines.* CRC press, Boca Raton, 158p.
- Hochachka, P.W. & Hulbert, W.C. (1978) Glycogen "seas", glycogen bodies and glycogen granules in heart and skeletal muscle of two air-breathing, burrowing fishes. *Can. J. Zool.*, 56: 774-786.
- Hochachka, P.W. & Randall, D.J. 1978. Alpha-Helix Amazon expedition, September-October 1976. *Can. J. Zool.*, 56: 713-716.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N. 1984. *Biochemical Adaptation.* Princeton University Press, New Jersey. 537p.
- Hochachka, P.W., Guppy, M., Goderley, H.E., Storey, M.B. 1978. Metabolic biochemistry of waters vs. air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. *Can. J. Zool.*, 56: 736-750.
- Keppler, D. & Decker, K. 1974. Glycogen determination with amyloglucosidase. In: H.U. Bergmeyer and K. Gawehn (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press, New York, 4: 1127-1131.

- Knox, D. Walton, M.J. & Cowey, C.B. 1980. Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues. *Mar. Biol.*, 56: 7-10.
- Lopes, N.P. 1999. Perfil metabólico de duas espécies de peixes migradores do gênero *Prochilodus*. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 66p.
- Moon, W. & Foster, G. 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: Hochachka P.W.; Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Metabolic Biochemistry*, vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam, 65-100.
- Navarro, I. & Guitiérrez, J. 1995. Fasting and starvation. In: Hochachka P.W.; Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Metabolic Biochemistry*, vol. 4. Elsevier Science, Amsterdam, 393-434.
- Navarro, I., Guitiérrez, J. & Planas, J. 1992. Changes in plasma glucagon, insulin and tissue metabolites associated with prolonged fasting in brown trout (*Salmo trutta fario*) during two different seasons of the year. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102A: 401-407.
- Nelson, J.S. 1994. *Fishes of the world*. John Willey & Sons Inc. USA, 600p.
- Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and Biochemical features*. Springer Verlag, Heidelberg, 224 p.
- Van den Thillart, G. & Van Waarde, A. 1985. Teleost in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.*, 8: 393-409.
- West, J.L., Bailey, J.R., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Sidel, B.D., Driedzic, W.R. 1999. Activity levels of enzymes of energy metabolism in heart and red muscle are higher in north-temperate-zone than in Amazonian teleosts. *Can. J. Zool.*, 77: 690-696.

**CAPÍTULO IV - Tolerância a hipóxia em duas espécies de ciclídeos
da Amazônia**

Introdução

Alterações cíclicas no nível da água e flutuações associadas à disponibilidade de oxigênio são dois fatores que exercem considerável influência sobre a biologia dos peixes da Amazônia Central (Fink & Fink, 1979). Processos físicos, químicos e biológicos interagem de maneira complexa determinando a quantidade de oxigênio disponível nos corpos de água doce. Estes processos apresentam peculiaridades em diferentes ecossistemas da Amazônia devido às características da bacia. Vários são os determinantes das concentrações de oxigênio dissolvido em diferentes corpos d'água ou mesmo em diferentes partes de um mesmo corpo de água, tais como profundidade, cobertura de macrófitas, taxa de decomposição, presença ou ausência de comunicação direta com o rio principal e outros (Junk, 1980; Junk et al., 1983; Val, 1993).

Para sobreviver a estas variações nas tensões de oxigênio, os peixes da Amazônia desenvolveram, durante o processo evolutivo, uma série de ajustes que podem ocorrer em diferentes níveis da organização biológica e em diferentes graus (Almeida-Val & Hochachka, 1995; Almeida-Val & Farias, 1996). Alguns grupos de peixes desenvolveram órgãos respiratórios obrigatórios e acessórios, outros, ainda, utilizam a camada superficial da água, rica em oxigênio (Kramer et al., 1978; Junk et al., 1983; Sioli, 1984; Almeida-Val & Farias, 1996). O grupo dos ciclídeos não possui nenhuma modificação anatômica, mas alguns deles utilizam-se da respiração na superfície aquática (RSA) (Kramer & McClure, 1982).

Mesmo não possuindo nenhuma estrutura especializada, a maioria dos ciclídeos tolera muito bem as situações de hipóxia que enfrenta no ambiente, isso devido aos ajustes no metabolismo desses animais (Almeida-Val et al., 1995). Alguns desses ajustes referem-se à ativação do metabolismo anaeróbico, acoplada à supressão do metabolismo oxidativo

(Almeida-Val et al., 1992; 1993 e 1995; Driedzic & Almeida-Val, 1996; Muusze et al., 1998; West et al., 1999). Além disso, esses ajustes podem ocorrer simultaneamente com outros ajustes para melhorar a transferência de oxigênio. Por isso, diferentes arranjos metabólicos são observados em diferentes tecidos (Val, 1993; Val et al., 1985; 1992; Almeida-Val & Hochachka, 1995).

A espécie *Astronotus ocellatus* é um dos ciclídeos mais tolerantes a hipóxia. Segundo Muusze et al. (1998), esta espécie sobrevive durante 6 horas em completa ausência de oxigênio, por meio da redução quase total de suas atividades metabólicas, e se a camada superficial for acessível, sobrevive indeterminadamente em situações de hipóxia (1,5mgO₂/L) (Almeida-Val et al., 1999b).

Assim como o *A. ocellatus*, outras espécies de ciclídeos também respondem muito bem a essa condição, como por exemplo, o *Cichlasoma amazonarum* que foi exposto a hipóxia severa (1,5mgO₂/L) por um longo período (51 dias) e apresentou mudanças significativas na atividade de várias enzimas, em vários tecidos (Almeida-Val et al., 1995). A tolerância a hipóxia varia entre os vários grupos de peixes, não sendo diferente entre as espécies de ciclídeos. Acredita-se, entretanto que, pelo menos para os peixes de respiração estritamente aquática e que habitam os corpos de água da Amazônia, a tolerância a hipóxia, na sua grande maioria, varia de moderada para alta.

Inúmeros trabalhos já foram realizados abordando o estudo da tolerância a hipóxia em peixes, principalmente, nos de região temperada, como truta (Marvin & Heath, 1968), salmão (Van Raaj et al., 1996), “goldfish” (Van den Thillart, 1982), e outros. Vários estudos, também, foram realizados com peixes tropicais, como os realizados com traíra (Rantin & Johansen, 1984; Rantin et al., 1992) e tilápia (Fernandes & Rantin, 1987, 1989; 1994)

abordando os aspectos respiratórios, além dos trabalhos já mencionados anteriormente. No entanto há, ainda, muitas lacunas a serem preenchidas, tornando necessário intensificar os estudos com peixes tropicais, os quais enfrentam periodicamente situações de hipóxia, a fim de entender quais os mecanismos utilizados e como eles diferem entre as diferentes espécies. Diante disso, o alvo deste trabalho foi estudar a tolerância de duas espécies de ciclídeos da região amazônica, avaliando modificações fisiológicas e bioquímicas quando expostas a diferentes concentrações de oxigênio.

Espécies

As duas espécies de ciclídeos estudadas neste capítulo foram: *Astronotus crassipinnis* e *Symphysodon aequifasciatus*. A primeira espécie é normalmente conhecida por acará-açu, apaiari ou oscar, já a segunda espécie é popularmente conhecida por acará-disco. Segundo Kullander (1998), a espécie *A. crassipinnis* pertence à subfamília Astronotinae e a tribo Astronotini, e a espécie *S. aequifasciatus* pertence à subfamília Cichlasomatinae e a tribo Heroini.

Ambas as espécies possuem interesse econômico para a região. A espécie *A. crassipinnis* é comercializada tanto para alimentação quanto para fins ornamentais, no entanto é a espécie *S. aequifasciatus* que atinge altos valores no mercado nacional e internacional de aquariofilia.

A espécie *A. crassipinnis* distribui-se nos sistemas lênticos das bacias dos rios Orinoco, Amazonas e Paraguai (Gil & Martinez, 2001). É considerada uma espécie de médio porte, atingindo cerca de 25cm de comprimento. O corpo dessa espécie apresenta manchas escuras verticais não alinhadas, com a presença de um ocelo no ramo superior da base da nadadeira caudal, já a espécie *Astronotus ocellatus* apresenta manchas oceladas sobre a base

dos raios moles da nadadeira dorsal. O acará-açu possui hábito alimentar onívoro, com forte tendência carnívora. Vive em cardumes e forma casais na época de reprodução, a desova ocorre mais de uma vez por ano (Ferreira et al., 1998).

A espécie *S. aequifasciatus* é freqüentemente encontrada em águas calmas e límpidas, permanecendo junto às rochas e árvores submersas, sendo encontrada sempre em grupos (Axelrod, 1972). O formato redondo de seu corpo e lateralmente achatado permite viver entre a vegetação, e pode alcançar cerca de 15 cm de comprimento. Esta espécie apresenta 9 bandas escuras verticais sobre o corpo, a primeira passando sobre o olho e a última sobre o pendúnculo caudal. É um peixe onívoro, alimentando-se de vegetais e pequenos insetos e crustáceos (Ferreira et al., 1998). Segundo Chao (1995a,b) essa espécie é a segunda mais exportada da região amazônica para fins ornamentais, atingindo altos preços no mercado internacional devido à sua linda coloração.

Objetivos

O presente capítulo teve como objetivos:

- 1) Expor duas espécies de ciclídeos (*Astronotus crassipinnis* e *Symphysodon aequifasciatus*) a diferentes concentrações de oxigênio até obter a perda de equilíbrio em 8 horas de experimento.
- 2) Medir o consumo de oxigênio e os batimentos operculares na maior e na menor concentração de oxigênio em que os animais forem expostos durante 8 horas de experimento.

- 3) Analisar as possíveis alterações nos parâmetros hematológicos e mudanças na atividade de várias enzimas ligadas ao metabolismo glicolítico e oxidativo após 8 horas de experimento em cada tensão de oxigênio estipulada.

Material e Métodos

Animais

As duas espécies de ciclídeos *Astronotus crassipinnis* ($54,3 \pm 17,4\text{g}$) e *Symphysodon aequifasciatus* ($28,8 \pm 7,9\text{g}$) (Figura 1) foram adquiridas em aquaristas da região de Manaus e transferidas para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do INPA, onde foram mantidas em caixas de polietileno, com capacidade para 500L, sistema de aeração constante e temperatura controlada por termostato a 29°C , por um período mínimo de 20 dias, para aclimação. Os animais foram alimentados diariamente com ração comercial.



Astronotus crassipinnis



Symphysodon aequifasciatus

Figura 1. Exemplos das espécies *Astronotus crassipinnis* (acará-açu) e *Symphysodon aequifasciatus* (acará-disco) estudado.

Unidades experimentais

As unidades experimentais eram compostas por duas câmaras metabólicas com capacidade de 14,7L e dotadas de entrada e saída d'água. Cada câmara era imersa em uma caixa de isopor de 100L, que por meio de bombas submersas mantinha um sistema fechado de

circulação de água com as unidades experimentais. As caixas de isopor continham um sistema de mangueiras perfuradas pelo qual o nitrogênio gasoso era injetado na água dessas caixas, e dessa forma a tensão do oxigênio pode ser diminuída homogênea e indiretamente para dentro das câmaras metabólicas.

A água do sistema manteve pH próximo a 6,0 e temperatura controlada por termostato a $29^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. A esta temperatura, a água saturada de oxigênio (100%) contém $7,5\text{mgO}_2/\text{L}$ (19,95 Paskal).

Experimento I

Ao fim do período de aclimação, 10 exemplares de cada espécie foram transferidos individualmente para as câmaras metabólicas, onde foram mantidos durante 12 horas em uma concentração de oxigênio equivalente a $6,0\text{mgO}_2/\text{L}$, antes do início do experimento. Essa concentração de oxigênio foi escolhida como condição controle, uma vez que era essa a concentração de oxigênio mantida nas caixas de aclimação.

Após 12 horas, a tensão de oxigênio foi diminuída gradativamente (20% da saturação por hora) para as tensões estipuladas, que foram de 6,0 (controle), 3,0, 1,5, 0,75, 0,6, 0,3 e $0\text{mgO}_2/\text{L}$. O declínio da tensão do oxigênio ocorreu por meio da adição de nitrogênio gasoso na água das caixas de isopor. Após atingir a concentração de oxigênio estipulada, os animais permaneceram na condição experimental por 8 horas, ou até perderem o equilíbrio, no caso das tensões mais baixas. As tensões de oxigênio e temperatura foram monitoradas durante todo o experimento utilizando-se um oxímetro YSI 85.

Ao fim de cada experimento, os animais tiveram o sangue coletado e foram imediatamente sacrificados e seus tecidos (músculos branco e cardíaco) retirados, congelados e estocados a -73°C , até o momento das análises.

Experimento II

As medidas do consumo de oxigênio e contagem dos batimentos operculares se deram em um segundo experimento, no qual seis exemplares de cada espécie foram transferidos individualmente para aquários de acrílico de 7L, dotados de sistema de aeração e de temperatura controlada a $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Esses aquários continham tampas que os isolava do ambiente externo, impedindo a troca de gases. Após 12 horas da transferência dos peixes para esses aquários, a tensão de oxigênio foi diminuída gradativamente (20% da saturação por hora) até atingir os valores de 0,3 e 0,75mgO₂/L. Estas tensões de oxigênio foram escolhidas, pois foram, respectivamente, as últimas tensões de oxigênio em que os exemplares das espécies *Astronotus crassipinnis* e *Symphysodon aequifasciatus* não perderam o equilíbrio durante as 8 horas de experimento. Depois de alcançada a tensão de oxigênio desejada, os animais permaneceram nessas condições por 8 horas. Durante esse período foram realizadas cinco medidas de consumo de oxigênio e contagem dos batimentos operculares, que ocorreram nos seguintes tempos de experimento: 0, 2, 4, 6 e 8 horas. Em cada um desses tempos, foram feitas quatro medidas de consumo de oxigênio com intervalos de 10 minutos. Durante esses intervalos fez-se a contagem direta dos batimentos operculares no período de 1 minuto. O mesmo procedimento foi realizado para a tensão de 6,0mgO₂/L, condição considerada controle.

Os batimentos operculares foram expressos em n° de batimentos operculares/minuto e, o consumo de oxigênio (VO₂) expresso em mlO₂/g.h

Análises laboratoriais

Coleta e análise de sangue

O sangue foi coletado da veia caudal, com a utilização de seringas heparinizadas e transferido para tubos “ependorf”, mantendo-o sempre em gelo fundente. O plasma foi então separado por centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos, em uma centrífuga NT-801. Foram analisados os seguintes parâmetros hematológicos: glicose e lactato plasmáticos.

Glicose plasmática

Os níveis de glicose plasmática foram determinados através do sistema enzimático colorimétrico produzido pela Doles S.A. (“kit” Glucox 500) e expressos em mg/dL. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Spectronic Genesis 2.

Lactato plasmático

Os níveis de lactato (ácido láctico) plasmático foram determinados segundo procedimento técnico da Sigma Chemical Co. (“kit” nº. 826 UV) e os valores foram expressos em mmoles de lactato/L. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Spectronic Genesis 2.

Glicogênio

A determinação da concentração de glicogênio hepático e do músculo foi realizada segundo Keppler & Decker (1974), com modificações. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectronic Genesis 2 usando-se os mesmos procedimentos para determinação dos níveis de glicose descrito anteriormente.

Preparação dos tecidos e obtenção dos extratos para a análise do perfil enzimático

Na análise das enzimas Citrato Sintase (CS; E.C. 4.1.3.7) foi utilizado o tampão EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 1mM, contendo 1% de Triton X-100 (Octilfenoxipolietoxietanol) e 20 mM de Hepes (ácido etanosulfúrico hidroxietilpiperazina), pH 7.4.

Na análise das enzimas Lactato Desidrogenase (LDH; E.C. 1.1.1.27), Piruvato Kinase (PK; E.C. 2.7.40) e Malato Desidrogenase (MDH; E.C. 1.1.1.37), foi utilizado o tampão Imidazol 150mM, contendo 1mM de EDTA, 5mM de dithiothreitol (DTT) e 1% de triton X-100, pH 7,4.

Foram analisados tecidos do músculo branco e do coração. Estes tecidos foram homogeneizados em triturador automático (Tissue Tearos mod. 985370) em gelo fundente e centrifugados durante 15 minutos a 13.000g em centrífuga Sorvall RC5B a 4°C para retirar qualquer material particulado. Os ensaios enzimáticos foram feitos com o extrato (porção sobrenadante) a 25°C.

Análise enzimática

Os níveis de atividade enzimática foram determinados a 25°C em um espectrofotômetro Spectronic Genesys 2, utilizando as técnicas revistas por Driedzic & Almeida-Val (1996). As reações enzimáticas procederam com os seguintes protocolos:

- 1) PK - 150mM de KCl, 10mM de MgSO₄ (sulfato de magnésio), 0,15mM de NADH, 5mM de ADP, 10 IU/ml de lactato desidrogenase, 1mM de KCN em 50mM de imidazol, pH 6,9 a 25°C. As reações foram iniciadas com a adição de 2,5mM de fosfoenolpiruvato;

- 2) **LDH** - 0,15mM de NADH, 1mM de KCN em 50mM de imidazol, pH 7,4 a 25°C. As reações foram iniciadas com adição de 1 e 10mM de piruvato;
- 3) **MDH** - 0,15mM de NADH em 50mM de imidazol, pH 7,4 a 25°C. As reações foram iniciadas com adição de 0,5mM de ácido oxalacético;
- 4) **CS** - 0,4mM de Acetil CoA, 0,25mM de DTNB (ácido dithio-bis(2-nitrobenzóico)) em 75mM de TRIS (tris hidroximetil aminometano), pH 8,0 a 25°C. As reações foram iniciadas com adição de 0,5mM de ácido oxalacético;

O cálculo para determinar a atividade da enzima nos tecidos segue de acordo com a equação abaixo:

$$\mu\text{moles substrato.g}^{-1} \text{ tecido fresco. min}^{-1} = \frac{\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{fd (cubeta)}}{6,22} \times \frac{\text{vol. tampão (ml)}}{\text{peso tecido (g)}}$$

onde:

fd = fator de diluição

$\Delta\text{OD}/\text{min}$ = variação na densidade óptica por minuto

6,22 = coeficiente de extinção molar da coenzima NADH

*Exceto para CS cuja reação é medida a 412nm e o coeficiente de extinção molar do DTNB é de 13,6.

Análise Estatística

Para comparar se houve alteração significativa no consumo de oxigênio e nos batimentos operculares nas condições de hipóxia e normóxia para cada uma das espécies foi usado o teste t de student ($P < 0,05$). O teste de Dunnett's ($P < 0,05$) foi utilizado para verificar possíveis mudanças nas concentrações de glicose e lactato plasmáticos e nas atividades enzimáticas do músculo branco e cardíaco para ambas as espécies nas diferentes

concentrações de oxigênio. A concentração de 6,0mgO₂/L foi considerada como concentração controle.

Resultados

Os exemplares da espécie *A. crassipinnis* resistiram cerca de 2,5 horas em 0mgO₂/L, e os exemplares de *S. aequifasciatus* resistiram 4,5 horas em 0,6mgO₂/L.

As duas espécies, *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*, reduziram significativamente o consumo do oxigênio, quando expostas na menor concentração de oxigênio na qual conseguiram tolerar durante 8 horas (0,3 e 0,75 mgO₂/L, respectivamente) (Figura 2). O consumo de oxigênio, de ambas as espécies não variou significativamente durante as 8 horas de experimento.

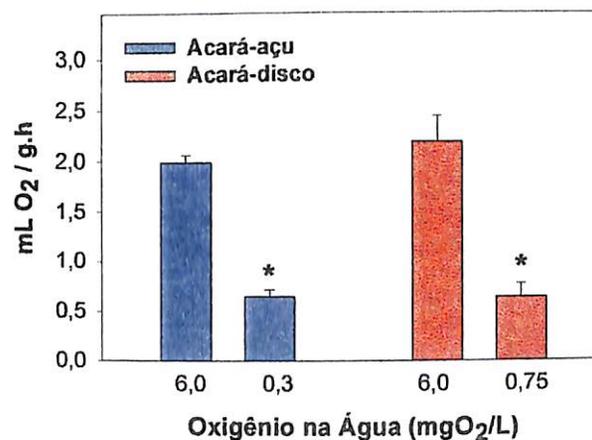


Figura 2: Consumo de oxigênio das espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* em condições de normóxia (6,0mgO₂/L) e hipóxia severa (0,3 e 0,75mgO₂/L, respectivamente). O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) (P<0,001). As barras estão expressas em média ± erro padrão.

Os batimentos operculares das duas espécies aumentaram significativamente quando os animais foram expostos a hipóxia (0,3 e 0,75 mgO₂/L) (Figura 3). Nesse caso também não houve variação significativa dos batimentos operculares ao longo das 8 horas de experimento. A frequência dos batimentos operculares difere significativamente entre as duas espécies nas duas condições em que foram expostas (normóxia e hipóxia).

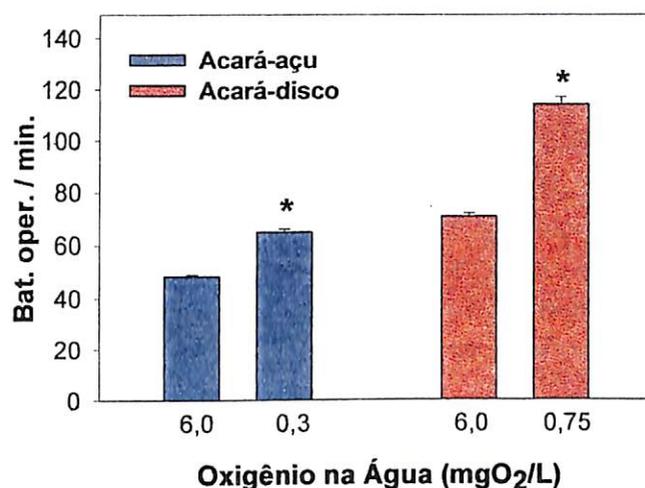
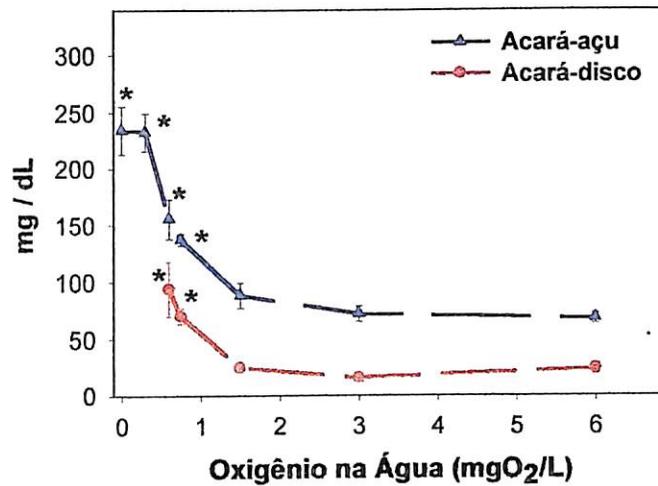


Figura 3: Batimento opercular das espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* em condições de normóxia (6,0mgO₂/L) e hipóxia severa (0,3 e 0,75mgO₂/L, respectivamente). O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (6,0 mgO₂/L) (P<0,001). As barras estão expressas em média ± erro padrão.

Os exemplares das duas espécies apresentaram aumento significativo nas concentrações de glicose plasmática, quando expostas às tensões de oxigênio inferiores e iguais a 0,75mgO₂/L, em comparação com a tensão controle (6,0mgO₂/L) (Figura 4A). Resultado similar foi observado para os níveis de lactato plasmático de ambas as espécies (Figura 4B).

A)



B)

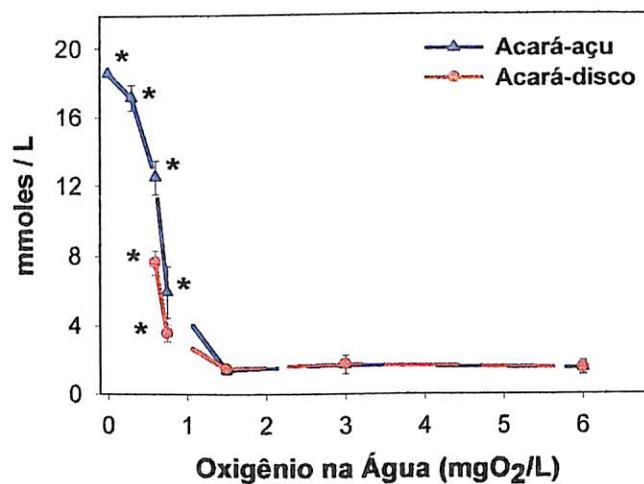


Figura 4: Concentrações de glicose (A) e lactato plasmático (B) das espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* expostos a várias concentrações de oxigênio durante 8 horas. O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) ($P < 0,001$).

O nível de glicogênio hepático diminuiu significativamente nas espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* expostas nas menores concentrações de oxigênio (0 e 0,6mgO₂/L, respectivamente), quando comparadas com o controle (Figura 5A). Entretanto, o

essa enzima não sofreu alteração significativa da sua atividade no músculo em concentrações intermediária (Tabela 1) e no coração dos exemplares da espécie *S. aequifasciatus* (Tabela 2). No coração dos espécimes de *A. crassipinnis* a atividade da enzima PK diminuiu significativamente nas tensões de 0,6, 0,3 e 0mgO₂/L (Tabela 2).

A atividade enzimática da Lactato Desidrogenase (LDH) no músculo branco da espécie *A. crassipinnis*, diminuiu significativamente quando os animais foram expostos a 3,0 e 1,5mgO₂/L, quando comparada com o controle (6,0mgO₂/L), e retornando aos níveis próximos dos normais nas demais concentrações de oxigênio. Já os exemplares da espécie *S. aequifasciatus* reduziram significativamente a atividade dessa enzima no músculo em concentrações de oxigênio inferiores a 3,0mgO₂/L (Tabela 1). A atividade da enzima LDH no coração das duas espécies aumentou significativamente nas tensões de oxigênio inferiores a 0,75mgO₂/L (Tabela 2).

A exposição dos exemplares da espécie *A. crassipinnis* em todas as condições hipóxicas (3,0, 1,5, 0,75, 0,6, 0,3 e 0mgO₂/L) provocou a redução significativa da atividade da enzima Malato Desidrogenase (MDH) no músculo dessa espécie. Entretanto, nenhuma alteração significativa foi observada na atividade dessa enzima no músculo da espécie *S. aequifasciatus* em hipóxia (Tabela 1). Ainda no coração das duas espécies, a atividade da MDH também não sofreu modificação em nenhuma das tensões de oxigênio em que os dois grupos de animais foram expostos (Tabela 2). A enzima Citrato Sintase (CS) do coração das duas espécies teve sua atividade reduzida significativamente quando os animais foram expostos às condições de hipóxia. Nos exemplares da espécie *A. crassipinnis* a redução da atividade da CS se deu em 0,6, 0,3 e 0mgO₂/L. Já nos exemplares de *S. aequifasciatus* a redução se deu em todas as condições hipóxicas (3,0, 1,5, 0,75 e 0,6mgO₂/L) (Tabela 2).

Tabela 1. Níveis enzimáticos do músculo branco nas espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*. O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) (P<0,05).

<i>Astronotus crassipinnis</i>				<i>Symphysodon aequifasciatus</i>		
Níveis de O ₂ mgO ₂ /L	PK	LDH	MDH	PK	LDH	MDH
6,0 (n=10)	188,7 ± 11,5	304,4 ± 20,3	25,5 ± 1,2	113,1 ± 16,3	294,8 ± 34,9	2,8 ± 0,2
3,0 (n=10)	132,1 ± 7,2 *	174,4 ± 9,0 *	8,5 ± 0,5 *	156,3 ± 29,3	355,5 ± 22,0	5,2 ± 0,4
1,5(n=10)	153,0 ± 10,3	187,1 ± 16,2 *	7,7 ± 0,5 *	178,0 ± 17,0	191,6 ± 23,1 *	5,2 ± 0,5
0,75 (n=10)	211,2 ± 15,5	402,0 ± 37,7	7,5 ± 0,3 *	112,2 ± 15,4	88,5 ± 7,0 *	4,6 ± 0,7
0,60 (n=10)	192,2 ± 8,4	405,6 ± 34,7	8,8 ± 0,5 *	139,3 ± 23,0	71,2 ± 12,5 *	3,9 ± 0,4
0,30 (n=10)	202,6 ± 10,1	386,4 ± 43,3	7,5 ± 0,3 *	-	-	-
0,0 (n=10)	122,9 ± 14,1 *	358,3 ± 20,9	7,5 ± 0,4 *	-	-	-

Nota: As atividades enzimáticas estão expressas em média ± SEM (µmol.min⁻¹.g⁻¹); os ensaios foram realizados a 25°C.

Tabela 2. Níveis enzimáticos do músculo cardíaco nas espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*. O símbolo (*) significa diferença significativa contra o grupo controle (normóxia) (P<0,05).

<i>Astronotus crassipinnis</i>					<i>Symphysodon aequifasciatus</i>			
Níveis de O ₂ mgO ₂ /L	PK	LDH	MDH	CS	PK	LDH	MDH	CS
6,0 (n=10)	55,0 ± 3,2	8,6 ± 0,5	105,7 ± 11,7	19,8 ± 4,8	41,9 ± 5,0	33,4 ± 2,5	123,5 ± 10,4	20,3 ± 1,8
3,0 (n=10)	53,7 ± 2,5	12,5 ± 1,7	99,2 ± 2,9	16,4 ± 1,9	39,8 ± 4,1	36,9 ± 2,2	139,4 ± 12,8	13,5 ± 2,1 *
1,5 (n=10)	52,0 ± 3,4	11,9 ± 0,9	94,9 ± 8,5	16,8 ± 1,5	37,0 ± 5,6	38,6 ± 1,0	157,4 ± 16,7	14,6 ± 1,2
0,75 (n=10)	49,4 ± 2,1	16,3 ± 2,6 *	83,2 ± 8,5	16,3 ± 1,1	32,6 ± 5,3	44,5 ± 2,4 *	147,5 ± 22,5	10,9 ± 1,4 *
0,60 (n=10)	42,2 ± 4,4 *	16,2 ± 2,3 *	84,2 ± 9,8	13,5 ± 1,5 *	32,9 ± 4,2	42,6 ± 2,4 *	138,2 ± 16,5	11,6 ± 1,6 *
0,30 (n=10)	33,6 ± 3,8 *	20,0 ± 1,2 *	87,9 ± 8,4	13,1 ± 0,7 *	-	-	-	-
0,0 (n=10)	36,6 ± 3,0 *	15,6 ± 2,9 *	76,8 ± 11,2	11,7 ± 1,0 *	-	-	-	-

Nota: As atividades enzimáticas estão expressas em média ± SEM (μmol.min⁻¹.g⁻¹); os ensaios foram realizados a 25°C.

A tabela 3 mostra as razões PK/ LDH e MDH/LDH para o músculo branco das duas espécies estudadas. Para a espécie *A. crassipinnis* a razão PK/LDH reduziu-se pela metade na condição anóxica e a razão MDH/LDH diminuiu a medida em que a espécie foi exposta a concentrações menores de oxigênio, permanecendo estável a partir de 0,75mgO₂/L, enquanto que a espécie *S. aequifasciatus* apresentou aumento nas duas taxas. A mesma tabela mostra também as razões PK/LDH, MDH/LDH e CS/LDH para o coração de ambas as espécies. Todas as três razões diminuíram no coração das duas espécies a medida em que a concentração de oxigênio foi sendo reduzida.

Tabela 3. Razões enzimáticas nos músculos branco e cardíaco em *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*.

Níveis de O ₂	MÚSCULO		CORÇÃO		
	PK/LDH	MDH/LDH	PK/LDH	MDH/LDH	CS/LDH
<i>A. crassipinnis</i>					
6,0	0,6	0,08	6,4	12,3	2,3
3,0	0,8	0,05	4,3	7,9	1,3
1,5	0,8	0,04	4,4	8,0	1,4
0,75	0,5	0,02	3,0	5,1	1,0
0,60	0,5	0,02	2,6	5,2	0,8
0,30	0,5	0,02	1,7	4,4	0,7
0,0	0,3	0,02	2,4	4,9	0,7
<i>S. aequifasciatus</i>					
6,0	0,4	0,009	1,3	3,7	0,7
3,0	0,4	0,01	1,1	3,8	0,4
1,5	0,9	0,03	1,0	4,1	0,4
0,75	1,3	0,05	0,7	3,3	0,2
0,60	2,0	0,05	0,8	3,2	0,3

Discussão

Os teleósteos apresentam considerável diferença quanto à tolerância a hipóxia. Alguns peixes são pouco tolerantes, como é caso de *Lepomis macrochirus* (≈ 116 mmHg) e de *Oncorhynchus mykiss* (≈ 93 mmHg) (Marvin & Heath, 1968). Outros já são considerados moderadamente tolerantes (entre 40 e 20 mmHg) como os ciclídeos *Heros* sp, *Uaru amphiacanthoides* e *Geophagus* aff. *altifrons* (30mmHg) (Chippari-Gomes et al, 2000) e a maioria dos peixes da bacia amazônica. Outros, entretanto, são altamente tolerantes a hipóxia, podendo até passar algumas horas em completa ausência de oxigênio, como é caso do *Astronotus ocellatus* (Muusze et al., 1998) e do *Carassius auratus* (Van den Thillart, 1977 apud Van den Thillart, 1982). No presente trabalho observamos que assim como o *A. ocellatus*, a espécie *A. crassipinnis* também é altamente tolerante a hipóxia. Embora tenha resistido cerca de 4,5 horas em anóxia, em comparação com a espécie *A. ocellatus* que resistiu aproximadamente 6,0 horas, elas podem ser igualadas, pois tal diferença talvez se deva, à diferença no tamanho dos animais. Segundo Almeida-Val et al. (2000), a tolerância a hipóxia na espécies *A. ocellatus* é diretamente proporcional ao tamanho dos animais. Já a espécie *S. aequifasciatus* mostrou ser moderadamente tolerante a hipóxia, assim como a maioria dos ciclídeos, a exemplo do *Cichlasoma amazonarum* (Almeida-Val et al, 1995)

A relação entre consumo de oxigênio e tensão de oxigênio na água tem sido estudada em várias espécies de peixes. Segundo Schimidt-Nielsen (1996), a regulação da respiração ocorre de acordo com a demanda de oxigênio no meio. Em situações de escassez de oxigênio, os animais fazem a compensação por meio do aumento da ventilação, ou pelo aumento da quantidade de oxigênio removido do meio, ou por ambos. No presente trabalho, pudemos observar que as duas espécies estudadas utilizaram o recurso de aumentar os batimentos

operculares com a finalidade de tentar remover mais oxigênio do meio quando expostas à situação de hipóxia. Enquanto que, nessa condição, o consumo foi reduzido significativamente devido à escassez de oxigênio. Vários autores já demonstraram que em tensões críticas de oxigênio a captação de oxigênio (VO_2) torna-se dependente da disponibilidade de oxigênio do meio (Beamish, 1964; Holeyton & Randal, 1967; Rantin & Johansen, 1984; Almeida-Val & Farias, 1996), independente do animal ser conformista ou regulador, no caso desse último grupo, eles regulam o seu consumo até uma determinada tensão crítica de oxigênio, que varia para os diferentes grupos de animais, abaixo da qual o consumo de oxigênio dos animais reguladores passa a depender da disponibilidade desse gás no ambiente (Beamish, 1964; Holeyton & Randal, 1967; Rantin & Johansen, 1984). Vale dizer ainda que a redução no metabolismo é uma estratégia importante dos peixes expostos a hipóxia, diminuindo dessa forma o requerimento pelo oxigênio.

Em situações de hipóxia, uma série de ajustes ocorre no metabolismo dos peixes concomitantemente com a regulação da respiração. Esses ajustes associam-se à supressão metabólica e/ou a ativação do metabolismo anaeróbico (usando os carboidratos como fonte de energia) e a resposta pode ser específica ao tecido (Storey, 1987; Dunn & Hochachka, 1986; Van Raaij et al., 1996). Vários trabalhos mostraram o aumento da glicose e do lactato em vários tecidos de peixes temperados e tropicais expostos a hipóxia (Van den Thillart et al., 1980; Van den Thillart & Waarde, 1985; Van Raaij et al., 1996; Muusze et al., 1998; Zhou et al., 2000). Ambas as espécies estudadas neste trabalho apresentaram aumento nas concentrações de glicose e lactato quando expostas a 0,75, 0,6, 0,3 e 0,0mgO₂/L. Podemos pressupor, então, que esses animais estejam utilizando a estratégia de ativar o metabolismo anaeróbico para tolerar as situações de hipóxia a que foram expostos.

Segundo um “quadro” que emerge a respeito do metabolismo anaeróbico, fundamentado em vários trabalhos, o lactato é acumulado em todos os tecidos e as reservas de glicogênio são reduzidas nos teleósteos expostos a hipóxia (Van den Thillart & Van Waarde, 1985). O glicogênio hepático e muscular são considerados as maiores reservas de energia dos peixes, e o metabolismo anaeróbico é sustentado pela glicogenólise (Hochachka, 1980). No presente trabalho observamos redução significativa do glicogênio hepático nas espécies *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus* expostas a 0,0 e 0,6 mgO₂/L, respectivamente. Essa resposta indica que o glicogênio está sendo utilizado como uma importante fonte de energia durante a hipóxia ou anóxia. A sobrevivência dos peixes a longos períodos de anaerobiose pode ser atribuída as grandes reservas de glicogênio no músculo vermelho (Hochachka et al., 1978), no coração e no fígado (Driedzic et al., 1978). Sendo assim, o tamanho da reserva de glicogênio pode ser uma das causas de *A. crassipinnis* ser mais tolerante que o *S. aequifasciatus*, visto que a concentração de glicogênio no fígado daquela espécie é maior. Segundo Moon & Foster (1995), o glicogênio hepático é mantido como último recurso de energia e a depleção de seu conteúdo a valores próximos a zero resulta na morte do indivíduo. Esse evento foi observado na espécie *Carassius carassius* após 18 dias de exposição à anóxia (Nilsson, 1990).

A depleção do glicogênio no fígado também foi observada na espécie *Cyprinus carpio* (Zhou et al., 2000). Muitas vezes essa redução pode ocorrer apenas depois de prolongada exposição a hipóxia ou anóxia, como é o caso da espécie *Chana punctata* (Yu & Woo, 1987) e *Carassius carassius* (Van den Thillart & Van Raaij, 1995). Entretanto, essa resposta nem sempre ocorre como observado para a espécie *Oncorhynchus mykiss* (Dunn & Hochachka, 1986). Essa resposta também não foi observada no músculo das duas espécies estudadas neste

trabalho. Muito pelo contrário, houve aumento significativo da concentração de glicogênio na última tensão de oxigênio em que o *S. aequifasciatus* foi exposto, e aumento significativo nas tensões de 0,6, 0,3 e 0,0mgO₂/L para a espécie *A. crassipinnis*. Como explicar esse ocorrido? De acordo com Hochachka & Somero (1984), se as reservas de glicogênio do fígado são mobilizadas durante o estresse anóxico, o problema da redução massiva e rápida da glicose que pode ser esperado é, na verdade, evitado. Segundo esses autores existem pelo menos três mecanismos que podem evitar esse problema: i) estocando mais glicogênio endógeno em outros tecidos, ii) utilizando mais eficientemente a fermentação, e iii) reduzindo as taxas metabólicas. No entanto, cada uma dessas estratégias deve ser considerada separadamente, uma vez que elas variam na sua importância nas diferentes espécies. Segundo Wright et al. (1989), quando há depleção de glicogênio durante longa exposição a hipóxia, a gliconeogênese deve ser ativada para suprir a glicose requerida no metabolismo anaeróbico. Diante disso, podemos supor, então, que o aumento do glicogênio no músculo das duas espécies em condições de hipóxia severa/anóxia se deu como uma forma de proteção das reservas energéticas desses animais, utilizando o lactato acumulado como substrato para a gliconeogênese. Entretanto, há um paradoxo nessa explicação quando consideramos o alto custo energético da gliconeogênese (6 ATPs por unidade de glicosil) bem como a depressão metabólica em que o organismo se encontra; a explicação poderia residir, talvez, no fato de que a glicólise anaeróbica apresentou redução no músculo esquelético (vide valores da PK e LDH) bem como houve tempo suficiente para que a glicose acumulada no plasma fosse recrutada para a construção de reserva no tecido. Futuros estudos serão necessários, utilizando glicose marcada e medindo a enzima PEPCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinase), a

qual representa uma ferramenta importante em vertebrados tolerantes a hipóxia (Hochachka, 1997).

Segundo Almeida-Val & Farias (1996), a sobrevivência a longos períodos de hipóxia de peixes de respiração estritamente aquática deve-se à utilização de duas estratégias: i) ativação da glicólise anaeróbica, e ii) supressão do metabolismo como um todo. A ocorrência concomitante dessas duas estratégias foi observada por esses autores no ciclídeo *Cichlasoma* sp exposto por 48 horas em 30mmHg (1,5mgO₂/L). Analisando os resultados apresentados na tabela 3 deste trabalho, podemos sugerir que essas duas estratégias também foram usadas pelas duas espécies estudadas, mesmo elas apresentando diferenças na intensidade de suas respostas. Dessa forma, os animais conseguem, então, manter as funções vitais com baixo custo de energia, por meio da anaerbiose e tentam, ainda, diminuir o acúmulo de produtos finais produzidos por meio da supressão metabólica, reduzindo ainda mais o gasto de energia.

Essas duas estratégias adotadas pelos peixes, inclusive pelo *A. crassipinnis* e pelo *S. aequifasciatus*, quando expostos a hipóxia, dependem de alterações nas atividades de enzimas chaves nos diferentes tecidos (Val, 1993; Almeida-Val & Farias, 1996). Greaney et al (1980) observaram redução significativa das atividades das enzimas LDH, MDH e PGI (glicose fosfato isomerase) no fígado da espécie *Fundulus heteroclitus* exposta durante 35 dias a hipóxia. No entanto, nenhuma modificação foi observada no músculo branco dessa espécie. A enzima LDH também não teve sua atividade alterada no músculo branco da espécie *Cyprinus carpio* exposta por 7 dias a 0,5mgO₂/L (Zhou et al., 2000). No presente trabalho, a espécie *A. crassipinnis* apresentou algumas alterações na atividade da enzima LDH no músculo branco e praticamente não teve alteração na atividade da enzima PK nesse tecido, apresentando, porém, redução significativa da atividade da MDH quando exposta a hipóxia. Dessa forma,

ao observarmos a taxa MDH/LDH (Tabela 3) para as diferentes tensões de oxigênio em que esse grupo animal foi exposto, notamos a ocorrência de sua redução de acordo com a diminuição na disponibilidade de oxigênio, indicando que o metabolismo do músculo assumiu uma condição mais anaeróbica, principalmente a partir da concentração de $0,75\text{mgO}_2/\text{L}$, na qual ocorre um aumento de 25% do metabolismo glicolítico comparado com o grupo controle. Já a espécie *S. aequifasciatus* apresentou redução significativa da atividade da enzima LDH no músculo branco quando exposta a 1,5, 0,75 e $0,6\text{mgO}_2/\text{L}$, enquanto que as enzimas PK e MDH não tiveram alterações significativas em suas atividades. Com essa alteração na atividade da LDH, notamos que houve um aumento na taxa MDH/LDH, mas mesmo assim o metabolismo desse tecido continuou predominantemente anaeróbico, já que os valores dessa razão foram sempre menores que 1, o que caracteriza metabolismo anaeróbico. Pode-se observar, também, que houve aumento da taxa PK/LDH. Segundo Almeida-Val & Farias (1996), muitos peixes apresentam aumento nas taxas MDH/LDH e PK/LDH como forma de evitar o acúmulo excessivo dos produtos finais do metabolismo anaeróbico.

De acordo com Driedzic & Almeida-Val (1996) e West et al. (1999), os peixes da Amazônia, geralmente, possuem uma alta dependência do metabolismo anaeróbico no coração, como uma resposta de defesa a hipóxia. A baixa regulação de enzimas oxidativas tem sido observada há muito tempo em várias espécies de peixes e em vários tecidos (Hochachka & Randall, 1978; Almeida-Val & Hochachka, 1995). Dessa forma, níveis baixos da enzima oxidativa CS foram observados em três espécies da bacia amazônica, *Colossoma macropomum*, *Brycon cephalus* e *Astronotus ocellatus* (Driedzic & Almeida-Val, 1996; West et al., 1999). A redução da atividade da enzima CS, acompanhada do aumento da atividade da

enzima LDH no coração das duas espécies aqui estudadas durante a exposição a hipóxia, demonstram que o coração dessas espécies aumenta seu potencial anaeróbico conforme a hipóxia se assevera. Essa resposta é confirmada ao observarmos as razões MDH/LDH e PK/LDH que são diminuídas e a razão LDH/CS que é aumentada com a redução da tensão de oxigênio. Esses resultados mostram, então, uma supressão do metabolismo oxidativo acoplada à ativação da glicólise anaeróbica; esse tipo de resposta já foi observado em várias espécies de peixes como uma forma de sobreviver às situações de hipóxia ou anóxia que ocorrem no ambiente (Nilsson, 1995).

Além de todas essas respostas apresentadas por estas espécies de peixes e por outros animais quando expostos a condições hipóxicas/anóxicas, o organismo dos animais precisa também se defender contra os radicais livres (espécies reativas de oxigênio - ERO) formados quando ocorre a reoxigenação do meio. Dessa forma, muitos desses animais ativam sistemas antioxidantes de natureza enzimática e não enzimática, evitando o aumento de ERO, as quais provocam danos em biomoléculas, incluindo proteínas como RNA, DNA e membranas formadas por lipídios polinsaturados (Beckman & Ames, 1997; Stadtman & Levine, 2000). Vig & Nemsek (1989) observaram aumento significativo da atividade da enzima Superoxidismutase (SOD – enzima antioxidante) no fígado, cérebro e brânquias da carpa, *Cyprinus carpio*, durante hipóxia severa. Segundo Hermes-Lima (2002) essa resposta indica um relevante mecanismo adaptativo contra danos pós-hipóxia de espécies reativas do oxigênio. Estudos realizados por Marcon (1997) expondo a espécie *A. ocellatus* a hipóxia (30 mmHg) demonstraram que a espécie não apresentou variação na atividade da enzima SOD no fígado e no sangue, reforçando a idéias de que esta espécie recorre ao metabolismo anaeróbico. Com os resultados do presente trabalho e de outros realizados em nosso

laboratório (Muusze et al., 1998; Oliveira et al., 2002), fica claro que os experimentos de Marcon (1997) não alcançaram os níveis de hipóxia severa que as espécies desse gênero podem tolerar e que, se há uma resposta antioxidante, esta poderia ser ativada em concentrações mais baixas de oxigênio. De qualquer maneira, futuros estudos serão importantes para elucidar os mecanismos de ativação do metabolismo antioxidante das espécies de ciclídeos aqui estudadas quando expostas a condições hipóxicas e anóxicas. Além do mais, far-se-á necessário o acompanhamento da recuperação do metabolismo do animal após o retorno à condição de normóxia. Somente após esse tipo de estudo, poderemos ter uma noção do nível de danos celulares que um prolongado período de exposição a hipóxia poderia causar nas espécies de ciclídeos amazônicos.

Concluindo: estratégias adaptativas foram sendo selecionadas nas espécies de peixes que habitam corpos d'água na Amazônia, onde situações de hipóxia ocorrem freqüentemente. Essas estratégias variam nas diferentes espécies e nos diversos níveis, como as alterações fisiológicas e bioquímicas observadas no presente trabalho. Os ajustes desenvolvidos pelas duas espécies estudadas, *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*, quando expostas a hipóxia, demonstram que ambas apoiam-se na redução do metabolismo e na utilização da glicólise anaeróbica como estratégia de sobrevivência, tendo como conseqüências, modificações nas suas taxas metabólicas, nas suas reservas energéticas, na atividade de diversas enzimas dos seus diversos órgãos, e muitas outras respostas. Portanto, concluímos que ambas espécies toleram hipóxia severa, embora a espécie *A. crassipinnis* seja mais tolerante que a espécie *S. aequifasciatus*.

Bibliografias Citadas

- Almeida Val, V.M.F. & Hochachka, P.W. 1995. Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. In: Hochachka P.W.; Mommsen, T. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Environ. and Ecol. Biochem.* Elsevier Science, Amsterdam, 45-55.
- Almeida Val, V.M.F. & Farias, I.P. 1996. 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*. INPA, Manaus, Brazil, 257-271.
- Almeida Val, V.M.F., Paula-Silva, M.N., Caraciolo, M.C.M., Mesquita, L.S. B., Farias, I.P., Val, A.L. 1992. LDH isozymes in Amazon fish. III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalminidae (Teleostei: Ostariophysi). *Comp. Biochem. Physiol.*, 103B: 119-125.
- Almeida Val, V.M.F., Val, A.L., Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes status of an under-explored biological goldmine. In: Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal M.; Van den Thillart, G. (Eds.), *Surviving Hypoxia Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press, Boca Raton, 435-445.
- Almeida Val, V.M.F., Farias, I.P., Paula-Silva, M.N., Duncan, W.P. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia in Amazon Cichlids. *Braz. J. Med. Biochem. Res.*, 28: 1257-1263.
- Almeida Val, V.M.F., Paula-Silva, M.N., Duncan, W.P., Lopes, N.P., Val, A.L., Land, S. 1999b. Increase of anaerobic potential during growth of an Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. Survivorship and LDH regulation after hypoxia exposure. In:

- Val, A. L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), Biology of tropical fishes. INPA, Manaus. 437-448.
- Almeida Val, V.M.F., Val, A.L., Duncan, W.P., Souza, F.C.A., Paula-Silva, M.N., Land, S. 2000. Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 125B: 219-226.
- Axelrod, H.R. 1972. All about discus. T.F.H., 2 ed., New Jersey, 135 p.
- Beamish, F.W.H. 1964. Respiration of fishes with special emphasis on standart oxygen consumption. III. Influence of oxygen. *Can. J. Zool.*, 42: 355-366.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N., 1997. Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.*, 272: 19633-19636.
- Chao, N.L. 1995a. Saving the rain forest's endangered ornamentals. *Today's Aqua.*, v. 6, n. 6. p. 4-8.
- Chao, N.L. 1995b. Ornamental fish resource of Amazonia and aquatic conservation. Part 2: Protection and socio-economic factors. *OFI Journal Issue*. 13: 4-5.
- Chippari-Gomes, A.R., Paula-Silva, M.N., Val, A.L., Bicudo, J.E.P.W., Almeida-Val, V.M.F. 2000. Hypoxia tolerance in amazon cichlids. In: Almeida-Val, V.M.F.; Gonzales, R.; MacKinlay, D. (Eds.). *Evolution of Physiological and Biochemistry Traits in Fish*. Proc. Int. Symp. Congress on the Biology of Fish. Aberdeen, Scotthland, 43-54.
- Driedzic, W.R. & V.M.F. Almeida Val. 1996. Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *J. Exp. Zool.* 274: 327-333.

- Driedzic, W.R., Phleger, C.F., Fields, J.H., French, C. 1978. Alterations in energy metabolism associated with the transition from water to air breathing in fish. *Can. J. Zool.*, 56: 730-735.
- Dunn, J.F. & Hochachka, P.W. 1986. Turnover rates and lactate in rainbow trout during acute hypoxia. *Can. J. Zool.*, 65:1144-1148.
- Fernandes, M.N. & Rantin, F.T. 1987. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental reductions of dissolved oxygen. *B. Fisiol. Anim. Univ. São Paulo*, 11: 51-60
- Fernandes, M.N. & Rantin, F.T. 1989. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. *J. Fish Biol.*, 35: 509-519.
- Fernandes, M.N. & Rantin, F.T. 1994. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing em Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): aquacultural consequences. *Aquaculture*, 127: 339-346.
- Ferreira, E.J.G.; Zuanon, A.S.; Santos, G.M. 1998. Peixes Comerciais do Médio Amazonas – Região de Santarém, Pará. Edições IBAMA, Brasília, 383p.
- Fink, W.I & Fink, S.V. 1979. Central Amazonia and its fishes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62(A): 13-29.
- Gil, H.R. & Martinez, R.E.A. 2001. La pesca em la baja Orinoquia colombiana uma visão integral. In: Gil, H.R. & Martinez, R.E.A. (Eds.), INPA, Bogotá, Colombia, 255p.
- Greaney, G.S., Place, A.R., Cashoon, R.E., Smith, G., Powers, D.A. 1980. Time course of changes in enzymes activities and blood respiratory properties of Killifish during long term acclimation to hypoxia. *Physiol. Zool.*, 53: 136-144.

- Hermes-Lima, M. & Zenteno-Zavín, T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, In press.
- Hochachka, P.W. 1980. *Living without oxygen*. Harvard University Press, 181p.
- Hochachka, P.W. & Randall, D.J. 1978. Alpha-Helix Amazon expedition, September-October 1976. *Can. J. Zool.*, 56: 713-716.
- Hochachka, P.W. & Somero, G.N. 1984. *Biochemical Adaptation*. Princenton University Press, New Jersey. 537p.
- Hochachka, P.W., Guppy, M., Goderley, H.E., Storey, M.B. 1978. Metabolic biochemistry of waters vs. air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. *Can. J. Zool.*, 56: 736-750.
- Holeton, G.G & Randal, D.J. 1967. The effect of hypoxia upon the partial pressure of gases in the blood and water efferent to gills of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 46: 317-327.
- Junk, W.J. 1980. Áreas inundáveis - um desafio para a limnologia. *Acta Amazônica*, 10(4): 775-796.
- Junk, W.J., Soares, G.M., Carvalho, F.M. 1983. Distribution of fish species in a lake of the Amazon River floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana*, 7(4): 39-431.
- Keppler, D. & Decker, K. (1974) Glycogen determination with amyloglucosidase. In: Bergmeyer, H.U.; Gawehn, K. (Eds.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York, 4: 1127-1131.
- Kramer, D.L. & McClure, M. 1982. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. *Environ. Biol. Fishes*, 7: 47-55.

- Kramer, D.L., Lindsey, C.C., Moodie, G.E.E., Stevens E.D. 1978. The fishes and aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. *Can. J. Zool.*, 56: 717-729.
- Marcon, J.L. 1997. Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa. Tese de Mestrado. INPA, Manaus. 139p.
- Marvin, D.E. & Heath, A.G. 1968. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of freshwater fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 27A: 349-355.
- Moon, T.W. & Foster, G. 1995. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: Hochachka P.W.; Mommsen, T. (Eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Environ. and Ecol. Biochem.*, vol. 5. Elsevier Science, Amsterdam, 65-100.
- Muusze, B., Marcon, J.L., Van den Thillart, G., Almeida Val, V.M.F. 1998. Review: Hypoxia tolerance of Amazon fish – Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 120A: 151-156.
- Nilsson, G.E. 1990. Long-term anoxia in crucian carp: changes in the levels of amino acid and monoamine neurotransmitters in the brain, catecholamines in cromaffin tissue and liver glycogen. *J. Exp. Biol.*, 150: 295-320.
- Nilsson, G.E. 1995. Oxygen availability: Brain defense mechanisms. In: Hochachka, P.W.&T.P. Mommsen (Eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Environ. and Ecol. Biochem. Vol.5.* Elsevier Science, Amsterdam, 19-44.

- Oliveira, A.R., A.L. Val, M.N. Paula Silva, N.P. Lopes, A.R. Chippari-Gomes and V.M.F. Almeida-Val. 2002. LDH gene responses to hypoxia in *Astronotus crassipinnis*. In Proceedings of Fish Biology Congress, Vancouver, Canada, 65-69.
- Rantin, F.T. & Johansen, K. 1984. Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to hypoxia. *Env. Biol. Fish.*, 11: 221-228.
- Rantin, F.T., Kallinin, A.L., Fernandes, M.N. 1992. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). *J. Fish Biol.*, 141: 805-812.
- Schmidt-Nielsen, K. 1996. *Fisiologia Animal: Adaptação e Meio Ambiente*. Cambridge University Press. 600p.
- Sioli, H. 1984. The Amazon and its affluent: hydrographic, morphology of the river courses and river types. In: Sioli, H. (Ed.), *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr W. Junk Publishers, Dordrecht, 127-165.
- Stadtman, E.R. & Levine, R.L., 2000. Protein oxidation. *Ann. NY Acad. Sci.*, 899: 191 –208.
- Storey, K.B. 1987. Tissue-specific controls on carbohydrate catabolism during anoxia in goldfish. *Physiol. Zool.*, 60: 601-607.
- Val, A.L. 1993. Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh waters. In: Bicudo, J.E.P.W (Ed.), *The vertebrate gas transport cascade. Adaptations to environment and mode of life*. CRC Press, Boca Raton, 43-53.
- Val, A.L., Schwantes, A.R., Almeida-Val, V.M.F., Schwantes, M. L. B. 1985. Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood B_{hor} effect from lotic and lentic *Hypostamus regani* populations (São Paulo-Brazil). *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 737-741.

- Val, A.L., Affonso, G.E., Almeida-Val, V.M.F. 1992. Adaptive features of Amazon fishes: blood characteristics of curimatã (*Prochilodus cf. nigricans*, Osteichthyes). *Physiol. Zool.*, 65(4): 823-843.
- Van den Thillart, G. 1982. Adaptations of fish energy metabolism to hypoxia and anoxia. *Mol. Physiol.* 2: 49-61.
- Van den Thillart, G. & Van Raaij, M. 1995. Endogenous fuels; non invasive versus invasive approaches. In: Hochachka P.W.; Mommsen, T.P. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Environ. and Ecol. Biochem.* Vol.5. Elsevier Science, Amsterdam, 33-63.
- Van den Thillart, G. & Van Waarde, A. 1985. Teleost in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.*, 8: 393-409.
- Van den Thillart, G., Kesbeke, F., Van Waarde, A. 1980. Anaerobic energy metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L). *Comp. Biochem. Physiol.*, 59A: 329-336.
- Van Raaij, M., Pit, D.S.S., Balm, P.H.M., Steffens, A.B., Van den Thillart, J.M. 1996. Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. *Hormones and Behavior*, 30: 85-92.
- Vig, E. & Nemcsok, J. 1989. The effect of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.*, 35: 23-25.
- Zhou, B.S., Wu, R.S.S., Randal, D.J., Lam, P.K.S., Ip, Y.K., Chew, S.F. 2000. Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *J. Fish Biol.*, 57: 1160-1171.

- West, J.L., Bailey, J.R., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Sidel, B.D., Driedzic, W.R. 1999. Activity levels of enzymes of energy metabolism in heart and red muscle are higher in north-temperate-zone than in Amazonian teleosts. *Can. J. Zool.*, 77: 690-696.
- Wright, P.A., Perry, S.F., Moon, T.W. 1989. Regulation of hepatic gluconeogenesis and glycogenolysis by catecholamines in rainbow trout during environmental hypoxia. *J. Exp. Biol.*, 147: 169-188.
- Yu, K.L. & Woo, N.Y.S. 1987. Metabolic adjustments of an air-breathing teleost, *Channa punctata*, to acute and prolonged exposure to hypoxic water. *J. Fish Biol.*, 31: 165-175.

CAPÍTULO V – Considerações Finais

A hipóxia é, sem dúvida alguma, uma das principais características dos corpos d'água da Amazônia, exercendo influência direta sobre a distribuição e diversidade dos organismos que habitam esse ambiente. A disponibilidade de oxigênio no ambiente conduziu também esses organismos a ajustarem seu metabolismo, morfologia e anatomia para adequarem suas vidas a essa condição. Dentre os peixes encontrados na bacia amazônica, os ciclídeos constituem um dos grupos de peixes que não possui nenhuma modificação anatômica e tão pouco morfológica, eles simplesmente contam com seus ajustes metabólicos. Esses ajustes são tão eficazes, que, a grande maioria dos ciclídeos da Amazônia tolera as condições hipóxicas. Essa tolerância permite a esse grupo freqüentar os igapós, ricos em alimento e ao mesmo tempo protegidos dos principais predadores.

De acordo com os dados obtidos nesta tese, podemos afirmar, então, que as estratégias metabólicas que os ciclídeos possuem para sobreviver aos ambientes hipóxicos da Amazônia estão diretamente relacionadas ao seu metabolismo glicolítico, sendo esta, então, sua principal estratégia. Como visto nos vários capítulos da tese, a glicólise é a principal fonte de energia desses animais, independente das condições em que se encontram.

No capítulo II, as três espécies de ciclídeos estudadas, *S. aff. jurupari*, *H. apendiculatus* e *C. orbicularis*, apresentaram expressão da isozima A₄ no coração durante todo o ano, independente da concentração de oxigênio, sendo a atividade da enzima LDH desse órgão influenciada diretamente pela quantidade de oxigênio dissolvido. Os resultados obtidos confirmam que esses animais toleram os ambientes hipóxicos baseando seu metabolismo na glicólise e que desenvolveram capacidade anaeróbica em seu coração. Esses dados são reforçados quando comparamos o perfil metabólico das nove espécies de ciclídeos estudadas no capítulo III, as quais foram capturadas num período em que a concentração de oxigênio

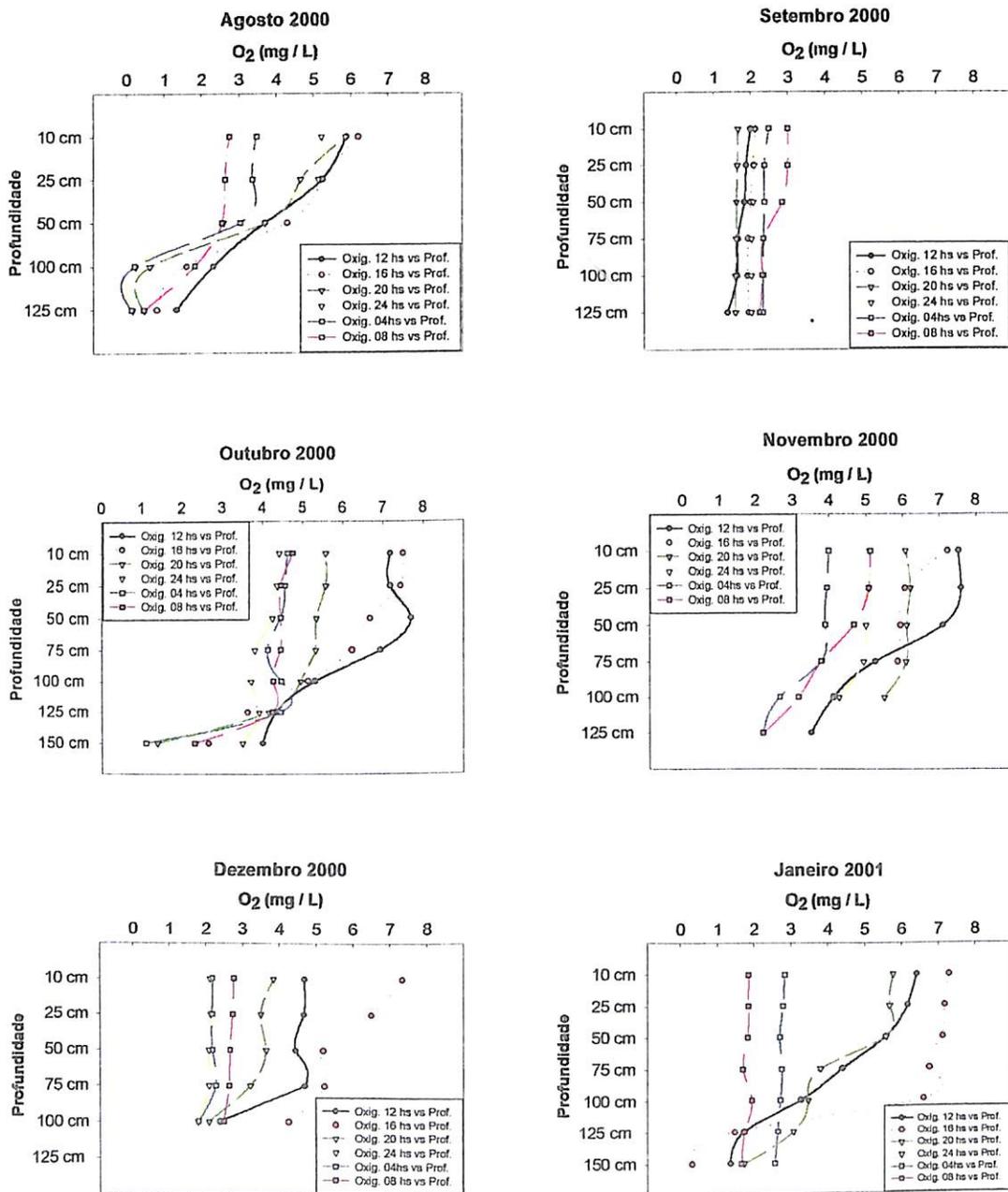
era elevada e, mesmo numa condição confortável de suprimento de oxigênio, todas apresentaram seu metabolismo baseado preferencialmente na glicólise, apresentando concomitante redução do metabolismo oxidativo.

Como uma confirmação desses resultados, o capítulo IV provou que, quando em situações de hipóxia severa a fonte de energia das duas espécies estudadas, *A. crassipinnis* e *S. aequifasciatus*, passa ser a glicólise anaeróbica, com ativação da glicogenólise no fígado, acompanhada de uma supressão total do metabolismo de ambas as espécies. Embora as condições fossem críticas, o pouco de energia gerada foi direcionada a gliconeogênese (síntese de glicogênio) no músculo branco, como uma última saída para assegurar a produção de energia a ser gasta durante movimentos rápidos, como os de arranque.

Diante de tudo o que foi observado nesta tese chegamos à conclusão de que a grande maioria dos ciclídeos da Amazônia é tolerante a hipóxia. E que sua principal estratégia para obter energia é a supressão metabólica acoplada a um ajuste no qual o perfil metabólico baseia-se no metabolismo dos carboidratos (glicólise) muito mais que na oxidação dos ácidos graxos. Atualmente, para que esses resultados sejam ainda mais reforçados, estudos na área molecular serão intensificados, visto que já começamos os estudos com o gene *LDH-A** da espécie *A. crassipinnis* expostas a hipóxia severa. Os estudos nessa área poderão nos fornecer dados sobre como a expressão dos genes, principalmente os que sintetizam as enzimas glicolíticas, são moduladas pelas condições ambientais, no caso o oxigênio, e dessa forma esclarecer os mecanismos moleculares da evolução e da manutenção da tolerância a hipóxia não apenas dos ciclídeos como nos demais peixes da Amazônia.

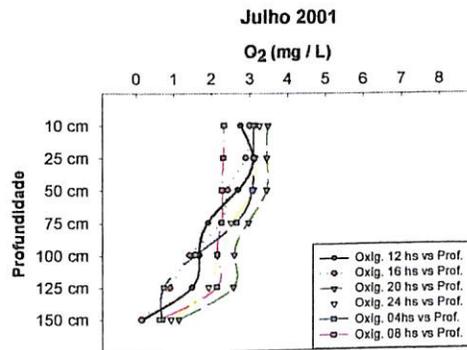
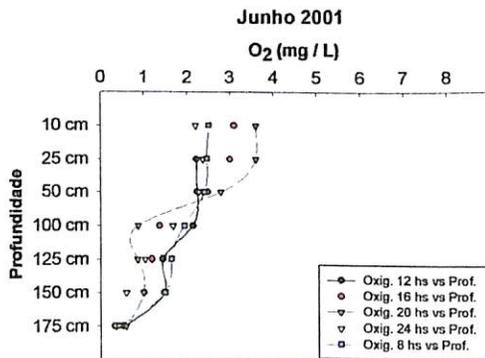
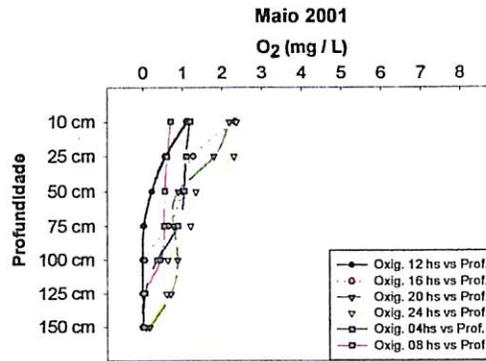
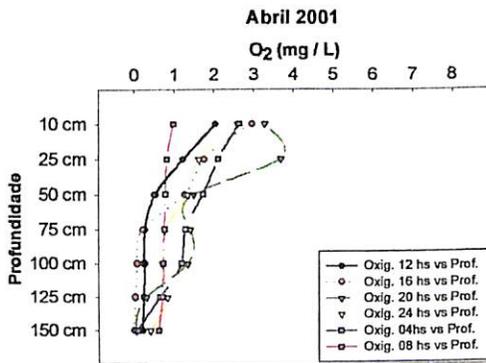
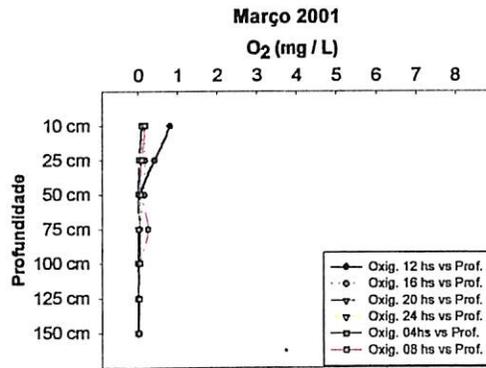
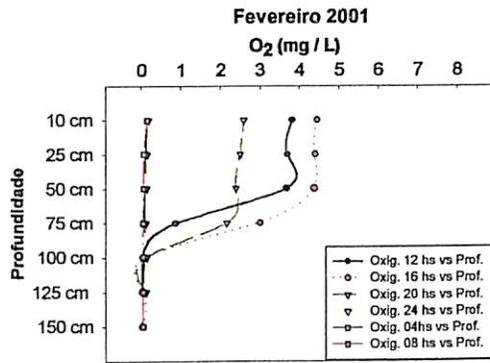
APÊNDICES

APÊNDICE 1



Variação diária das concentrações de oxigênio dissolvido na região do Lago Catalão no período de agosto de 2000 a janeiro de 2001.

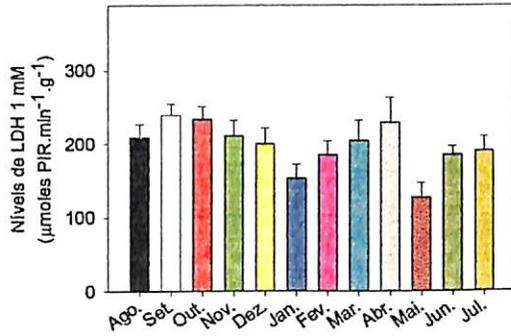
APÊNDICE 1



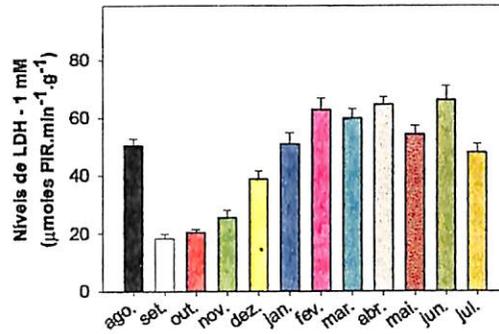
Variação diária das concentrações de oxigênio dissolvido na região do Lago Catalão no período de fevereiro de 2001 a julho de 2001.

APÊNDICE 2

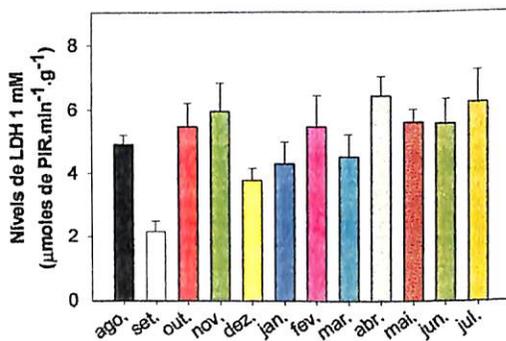
***S. aff. jurupari*
Músculo**



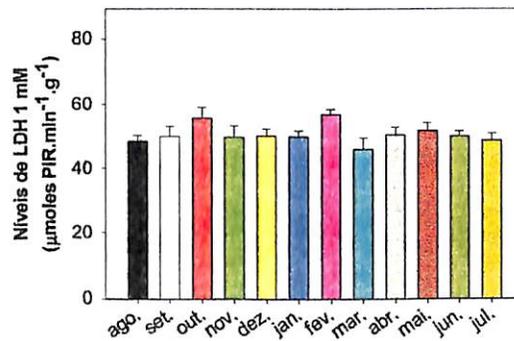
***S. jurupari*
Coração**



***S. aff. jurupari*
Fígado**

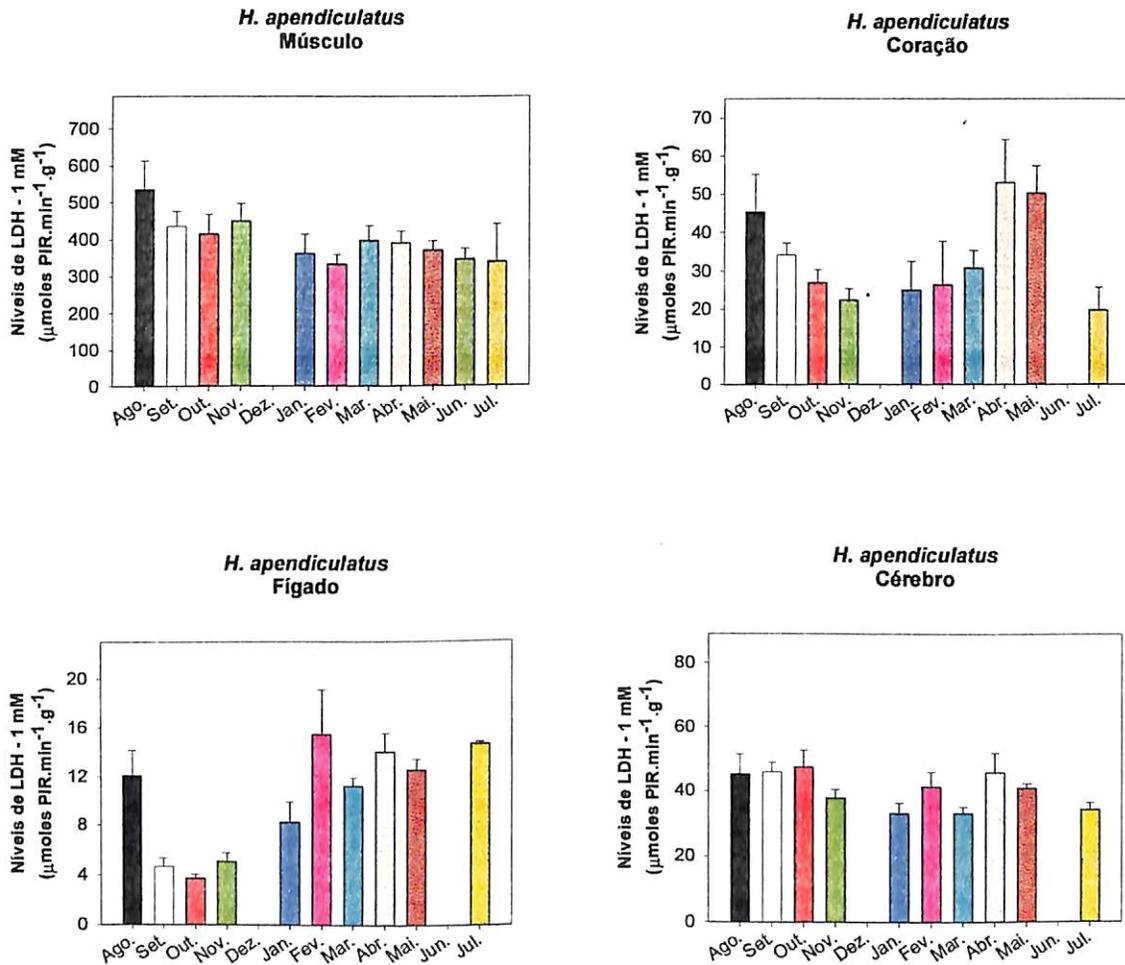


***S. aff. jurupari*
Cérebro**



Níveis de atividade da enzima LDH 1mM nos músculos branco e cardíaco, no fígado e no cérebro da espécie *S. aff. jurupari* no período de agosto de 2000 a julho de 2001.

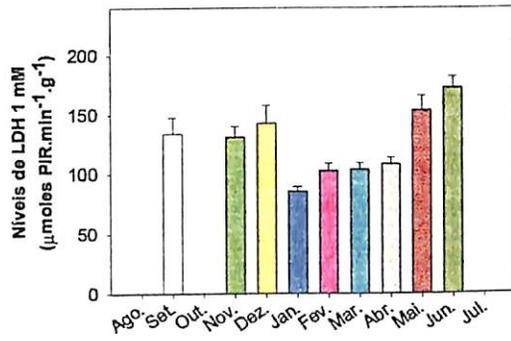
APÊNDICE 2



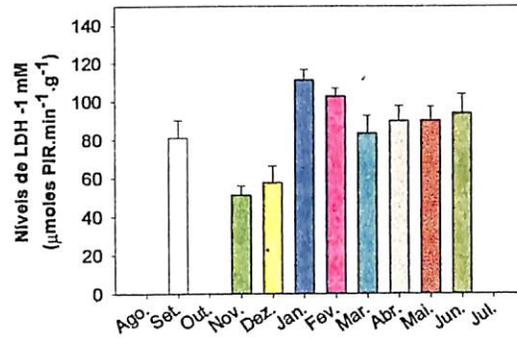
Níveis de atividade da enzima LDH 1mM nos músculos branco e cardíaco, no fígado e no cérebro da espécie *H. apendiculatus* no período de agosto de 2000 a julho de 2001. Os meses que não estão representados com barras indicam que não houve coleta de exemplares da espécie nesse período.

APÊNDICE 2

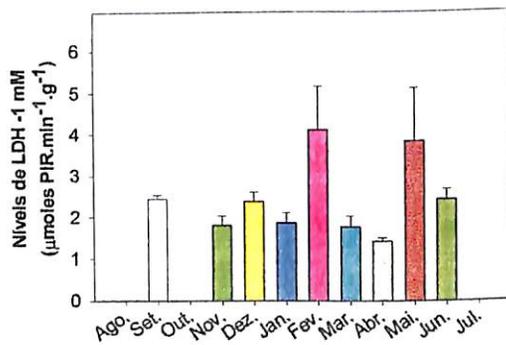
***C. orbicularis*
Músculo**



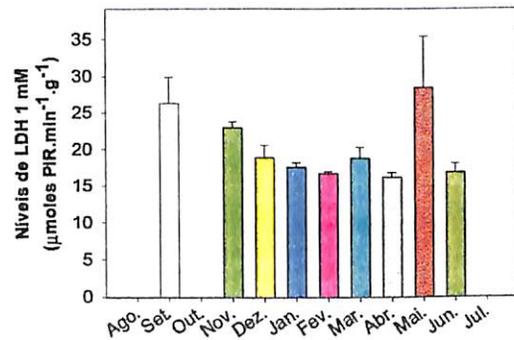
***C. orbicularis*
Coração**



***C. orbicularis*
Fígado**



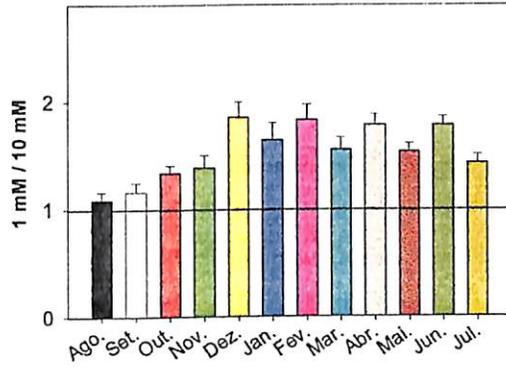
***C. orbicularis*
Cérebro**



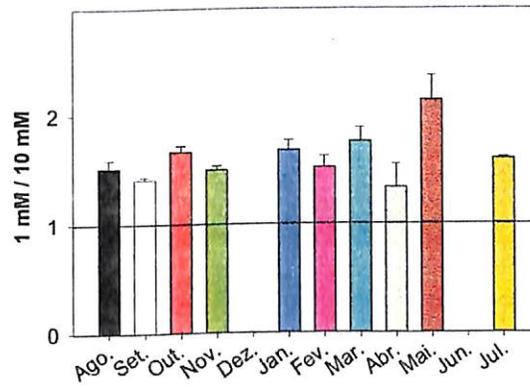
Níveis de atividade da enzima LDH 1mM nos músculos branco e cardíaco, no fígado e no cérebro da espécie *C. orbicularis* no período de agosto de 2000 a julho de 2001. Os meses que não estão representados com barras indicam que não houve coleta de exemplares da espécie nesse período.

APÊNDICE 3

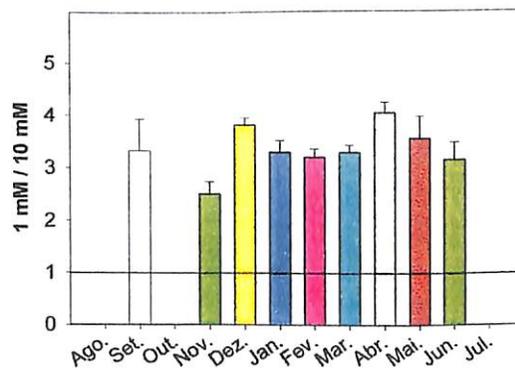
S. aff. jurupari



H. apendiculatus



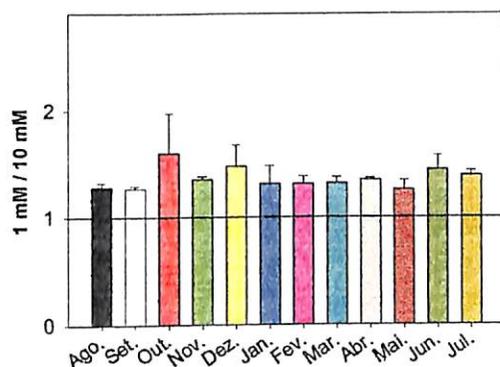
C. orbicularis



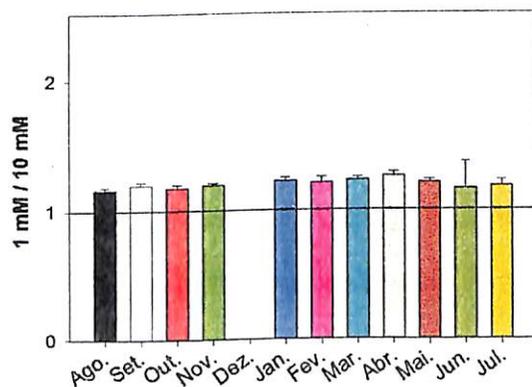
Inibição da enzima LDH pelo piruvato, representada pela relação entre baixa e alta concentração de piruvato no coração das três espécies de ciclídeos durante o decorrer do ano.

APÊNDICE 3

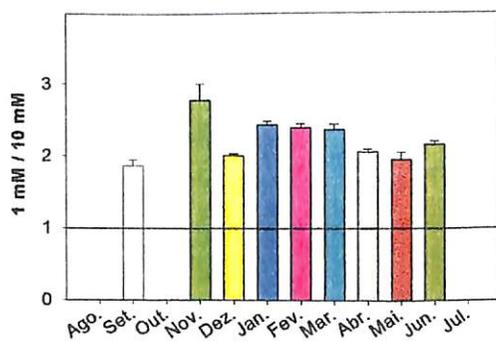
S. aff. jurupari



H. apendiculatus



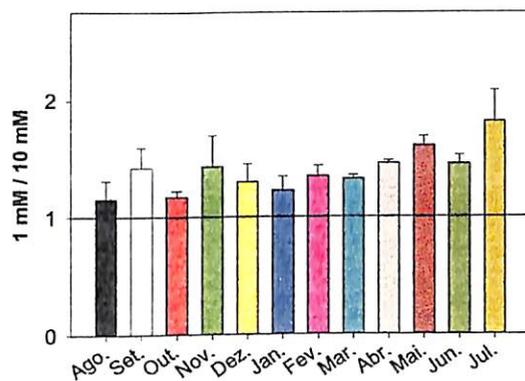
C. orbicularis



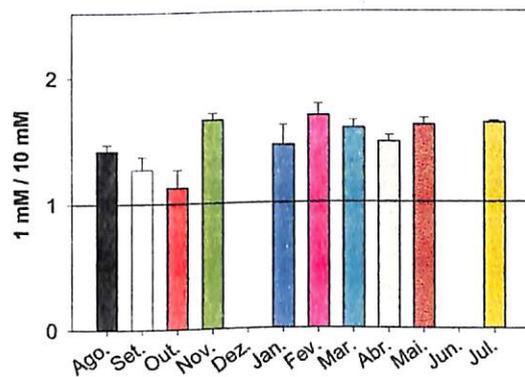
Inibição da enzima LDH pelo piruvato, representada pela relação entre baixa e alta concentração de piruvato no músculo branco das três espécies de ciclídeos durante o decorrer do ano.

APÊNDICE 3

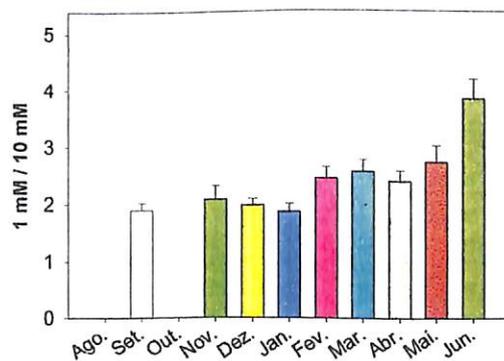
S. aff. jurupari



H. apendiculatus



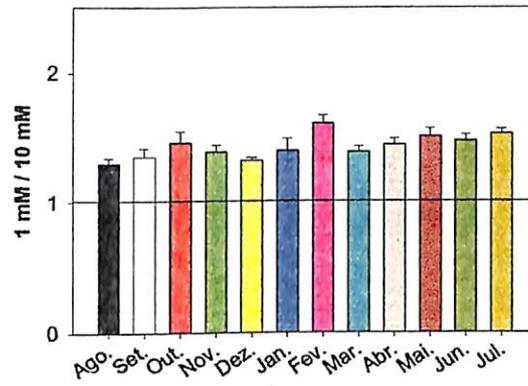
C. orbicularis



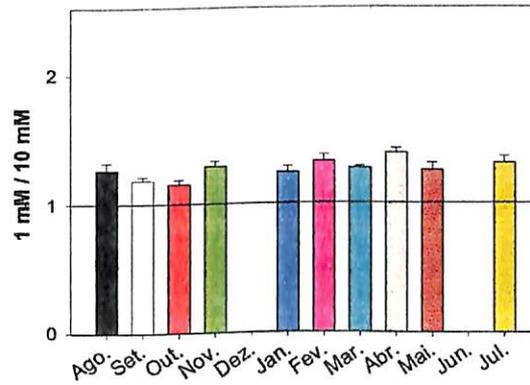
Inibição da enzima LDH pelo piruvato, representada pela relação entre baixa e alta concentração de piruvato no fígado das três espécies de ciclídeos durante o decorrer do ano.

APÊNDICE 3

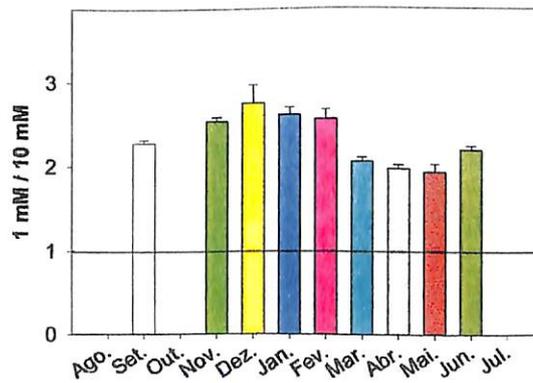
S. aff. jurupari



H. apendiculatus



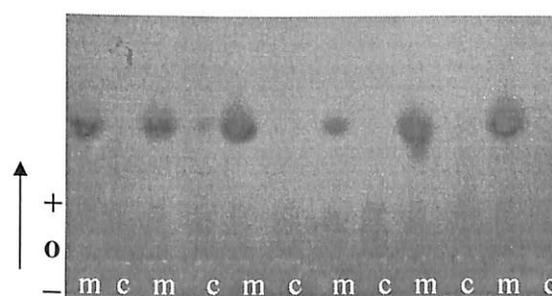
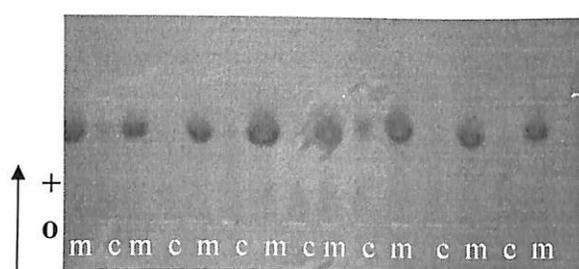
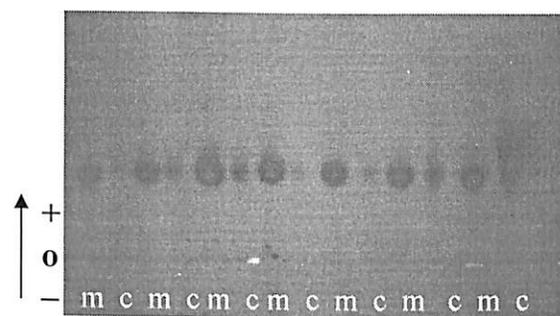
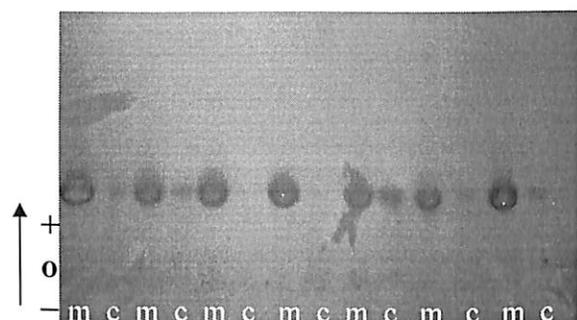
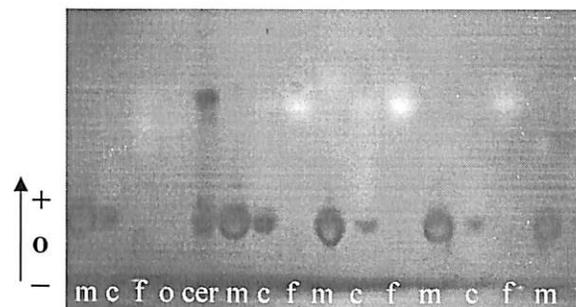
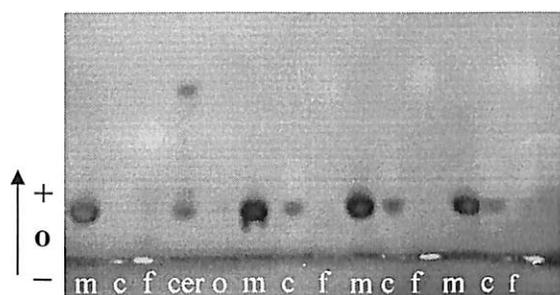
C. orbicularis



Inibição da enzima LDH pelo piruvato, representada pela relação entre baixa e alta concentração de piruvato no cérebro das três espécies de ciclídeos durante o decorrer do ano.

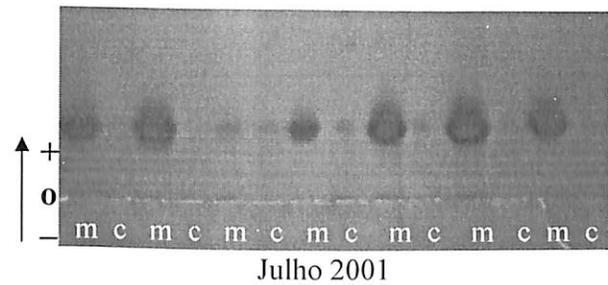
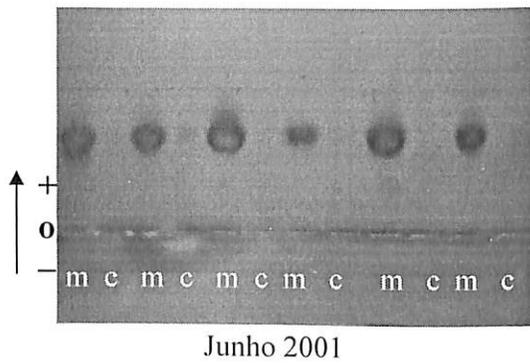
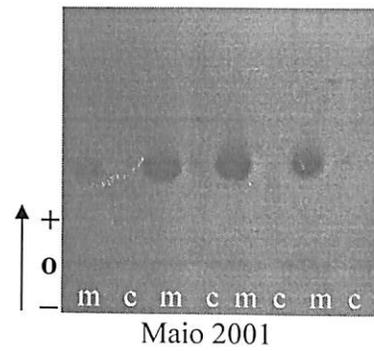
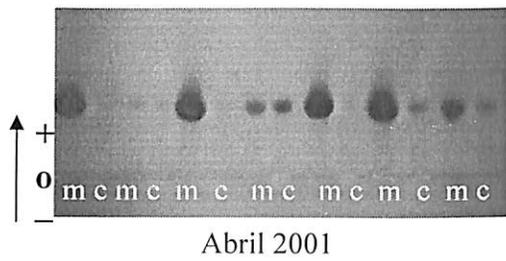
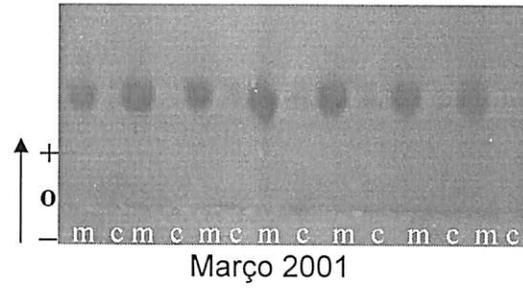
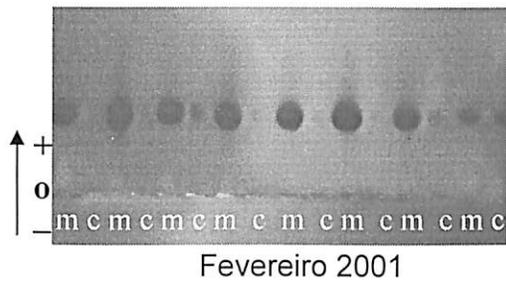
APÊNDICE 4

Satanoperca aff. jurupari



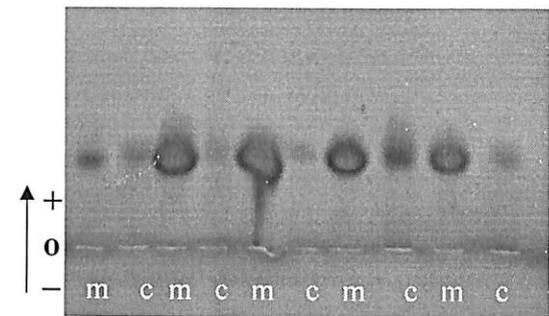
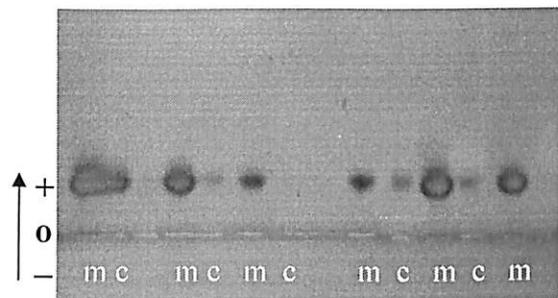
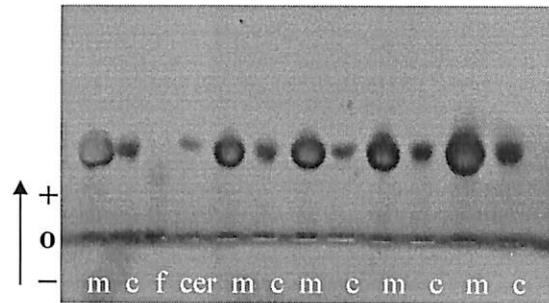
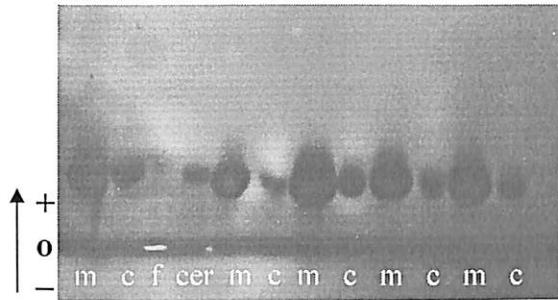
Fotos dos eletroferogramas da espécie *S. aff. jurupari* no período de agosto de 2000 a janeiro de 2001. m = músculo branco, c = coração, f = fígado, cer = cérebro e o = olho; o = origem.

Satanoperca aff. jurupari



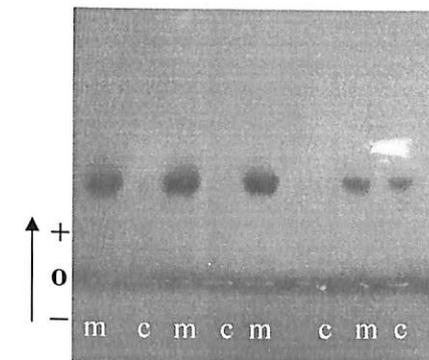
Fotos dos eletroferogramas da espécie *S. aff. jurupari* no período de fevereiro de 2001 a julho de 2001. m = músculo branco e c = coração; 0 = origem.

Heros apendiculatus



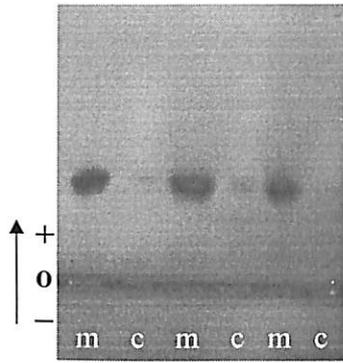
Exemplares da espécie
não coletados

Dezembro 2000

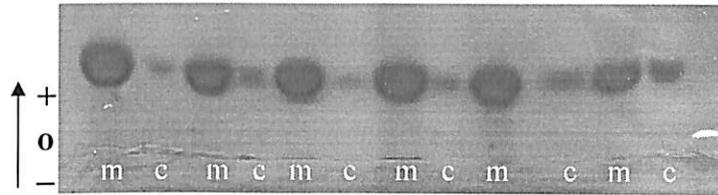


Fotos dos eletroferogramas da espécie *H. apendiculatus* no período de agosto de 2000 a janeiro de 2001. m = músculo branco, c = coração, f = fígado e cer = cérebro; o = origem.

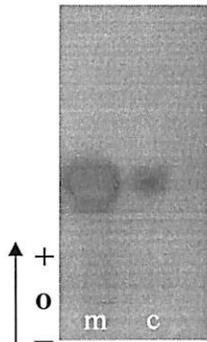
Heros apendiculatus



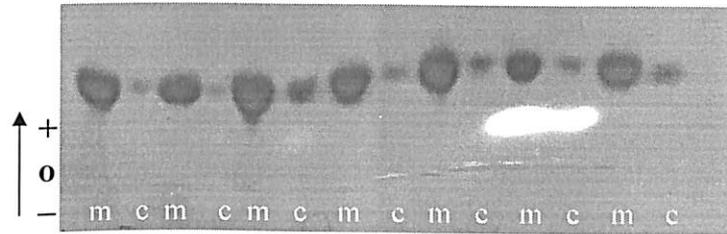
Fevereiro 2001



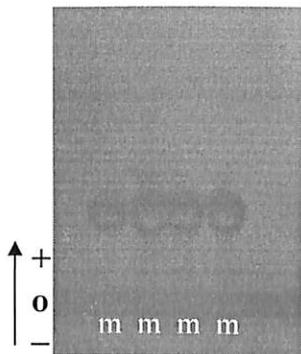
Março 2001



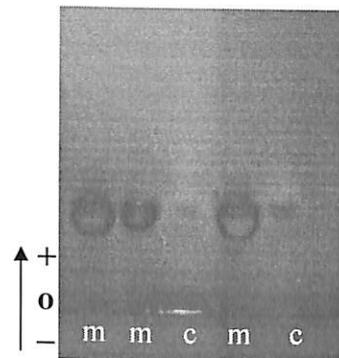
Abril 2001



Mai 2001



Junho 2001



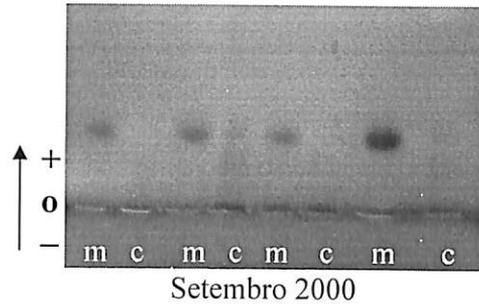
Julho 2001

Fotos dos eletroferogramas da espécie *H. apendiculatus* no período de fevereiro de 2001 a julho de 2001. m = músculo branco e c = coração; o = origem.

Chaetobranchopsis orbicularis

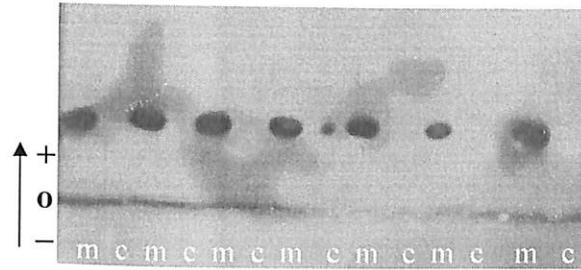
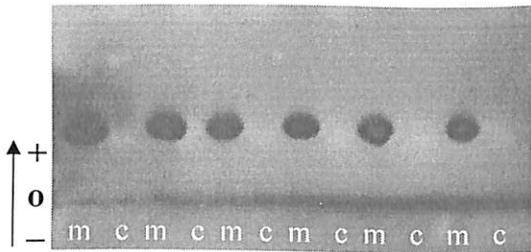
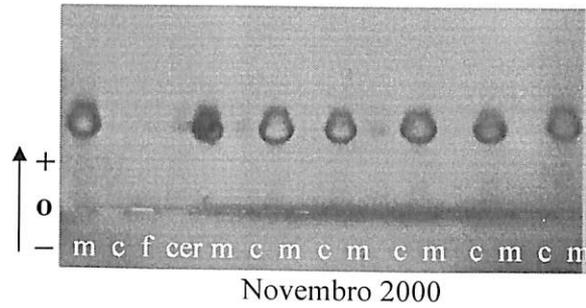
Exemplares da espécie
não coletados

Agosto 2000



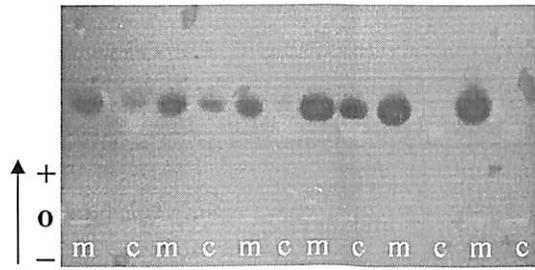
Exemplares da espécie
não coletados

Outubro 2000

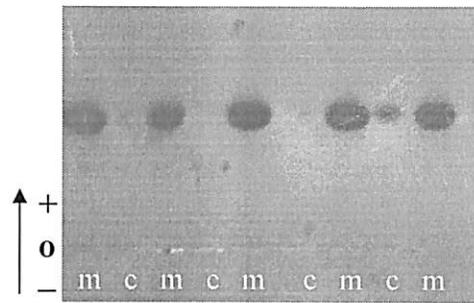


Fotos dos eletroferogramas da espécie *H. apendiculatus* no período de agosto de 2000 a janeiro de 2001. m = músculo branco, c = coração, f = fígado e cer = cérebro; o = origem.

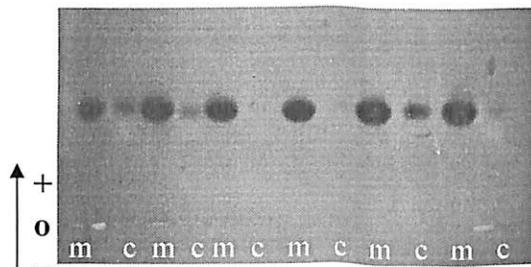
Chaetobranchopsis orbicularis



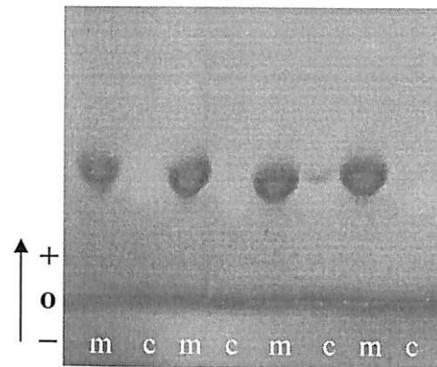
Fevereiro 2001



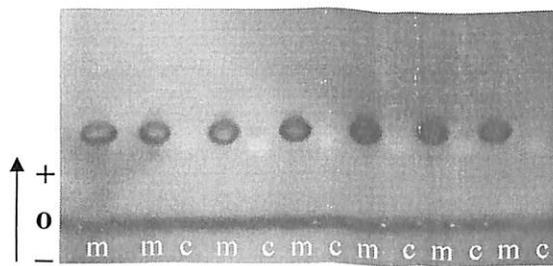
Março 2001



Abril 2001



Maio 2001



Junho 2001

Exemplares da espécie
não coletados

Julho 2001

Fotos dos eletroferogramas da espécie *H. apendiculatus* no período de fevereiro de 2001 a julho de 2001. m = músculo branco e c = coração; o = origem.