

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ECOFISIOLOGIA DE *GEOPHAGUS BRASILIENSIS* EM FUNÇÃO DA
TEMPERATURA E OXIGÊNIO DISSOLVIDO**

JÉSSICA ALVES PEREIRA

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2015

UNIVERSIDADE VILA VELHA - ES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE ECOSISTEMAS

**ECOFISIOLOGIA DE *GEOPHAGUS BRASILIENSIS* EM FUNÇÃO DA
TEMPERATURA E OXIGÊNIO DISSOLVIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha, como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ecologia de Ecossistemas, para a obtenção do grau de Mestre em Ecologia.

JÉSSICA ALVES PEREIRA

VILA VELHA
FEVEREIRO / 2015

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

P436e Pereira, Jéssica Alves.

Ecofisiologia de *Geophagus brasiliensis* em função da temperatura e oxigênio dissolvido / Jéssica Alves Pereira. – 2015.
62 f : il.

Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Dissertação (mestrado em Ecologia de Ecossistemas) –
Universidade Vila Velha, 2015.
Inclui bibliografias.

1. Ecologia aquática. 2. Metabolismo energético. 3. Oxigênio. I.
Gomes, Levy de Carvalho. II. Universidade Vila Velha. III. Título.

CDD 577.6

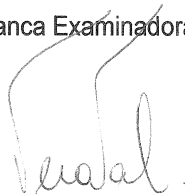
JÉSSICA ALVES PEREIRA

**ECOFISIOLOGIA DE *GEOPHAGUS BRASILIENSIS* EM FUNÇÃO
DA TEMPERATURA E OXIGÊNIO DISSOLVIDO**

Dissertação apresentada à
Universidade Vila Velha, como pré-
requisito do Programa de Pós-
graduação em Ecologia de
Ecossistemas, para a obtenção do
grau de Mestre em Ecologia.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2015,

Banca Examinadora:



Vera Maria Fonseca de Almeida Val - INPA



Charles Gladstone Duca Soares - UVV



Levy de Carvalho Gomes - UVV
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Levy de Carvalho Gomes por ter me apresentado com um trabalho tão bonito, que despertou em mim uma grande vontade em aprender e dar o meu melhor. À minha co-orientadora Dra. Adriana Regina Chippari-Gomes por toda ajuda e tranquilidade transmitida graças ao seu jeito maternal. Vocês serão para sempre lembrados.

Aos professores Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val e Dr. Charles Gladstone que foram exemplos de profissionais, os quais procurei me espelhar durante essa etapa acadêmica.

Aos meus amigos de laboratório Vinícius Baroni, Alexandra Veronez, Priscylla Pavione e Vinícius Davel por toda ajuda e disposição oferecida a mim durante a execução do trabalho. À Daniela Pitol e Cinthia Cassotti pela amizade e momentos de descontração. Vocês tornaram essa caminhada mais alegre!

Agradeço aos meus pais Jesse e Sandra por terem sempre priorizado os meus estudos. Vocês são minha maior inspiração. Espero estar retribuindo de alguma forma todo o esforço dedicado a mim.

Ao meu marido Otávio pelo amor incondicional e pela segurança que sempre me transmitiu quando o medo e ansiedade tentavam aparecer. Você nem imagina o quanto sua força me ajudou a chegar até aqui!

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) por ter financiado os meus estudos e tornado possível o meu ingresso na vida acadêmica.

À Universidade Vila Velha pela estrutura e pelos ótimos profissionais que me ofereceram tanto conhecimento.

E principalmente, agradeço a Deus por ter colocado todas essas pessoas e oportunidades no meu caminho, e por ter providenciado essa felicidade imensa que estou sentindo hoje.

Deixo a todos os meus mais sinceros agradecimentos!

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	2
Espécie Estudada	2
Oxigênio Dissolvido	3
Adaptação e tolerância da Ictiofauna à hipóxia	5
Temperatura	6
Metabolismo Aeróbico e Anaeróbico	8
2.1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
2.2 OBJETIVOS	19
Objetivo Geral	19
Objetivos Específicos	19
Ecofisiologia de <i>Geophagus brasiliensis</i> em função da temperatura e oxigênio dissolvido	20
RESUMO	20
ABSTRACT	21
2. INTRODUÇÃO	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Aquisição e Aclimação dos Peixes	23
3.2 Desenhos Experimentais	23
Experimento I	23
Análises Laboratoriais (maiores detalhes dos procedimentos em Anexo I)	24
Experimento II	25
3.3 Análises Estatísticas	25
6. RESULTADOS	27
6.1 Experimento I	27
Parâmetros Hematológicos	27
Glicogênio	27
Análises Enzimáticas	28
6.2 Experimento II	32
7. DISCUSSÃO	36
7.1 Experimento I	36
Parâmetros Hematológicos	36
Glicogênio	38
Análises Enzimáticas	39
7.2 Experimento II	40
8. Conclusões	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXO I	48

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Parâmetros hematológicos de *Geophagus brasiliensis* expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores estão apresentados em suas respectivas médias $\pm$ desvio padrão.....27
- Tabela 2.** Valores do tempo de duração dos experimentos e da concentração de O₂ em que houve a perda de equilíbrio (PDE) de exemplares *G. brasiliensis* expostos às temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa do mesmo tratamento entre as temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores estão apresentados em suas respectivas médias $\pm$ desvio padrão.....32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Geophagus brasiliensis</i>	2
Figura 2. Concentração de glicogênio hepático em <i>G. brasiliensis</i> expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$	28
Figura 3. Atividade da enzima Malato Desidrogenase (MDH) nos tecidos do fígado (A), músculo branco (B) e coração (C) de exemplares de <i>G. brasiliensis</i> expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$	29
Figura 4. Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) nos tecidos fígado (A), coração (B) e músculo branco (C) de exemplares de <i>G. brasiliensis</i> expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$	30
Figura 5. Atividade da enzima Citrato Sintase (CS) nos tecidos do músculo branco (A), coração (B) e fígado (C) de exemplares de <i>G. brasiliensis</i> expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$	31
Figura 6. Consumo de oxigênio de <i>G. brasiliensis</i> nas condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) expostos às temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$	33
Figura 7. Batimentos operculares/min de <i>G. brasiliensis</i> em função da pressão de O ₂ nas temperaturas de 20°C (A), 24°C (B) e 28°C (C).	34
Figura 8. Valores da pressão de O ₂ ao longo do tempo de duração dos experimentos com <i>G. brasiliensis</i> nas temperaturas de 20°C (A), 24°C (B) e 28°C (C).	35

RESUMO

PEREIRA, Jéssica Alves, Universidade Vila Velha – ES, Fevereiro 2015.
Ecofisiologia de *Geophagus brasiliensis* em função da temperatura e oxigênio dissolvido. Orientador: Levy de Carvalho Gomes.

Oxigênio e temperatura são os fatores mais limitantes dos ambientes aquáticos. Diversas espécies são expostas a variações desses fatores na água como consequência dos processos físico-químicos e biológicos, e também pela eutrofização do ambiente que, juntos, interferem diretamente na distribuição da ictiofauna. Como resultado, esses organismos desenvolveram adaptações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais como estratégia alternativa para se ajustarem a essas variações. Os ciclídeos amazônicos e africanos são conhecidos por sua tolerância em ambientes hipóxicos, que foi atribuída pela plasticidade adaptativa apresentada pelo grupo. Entre os mecanismos adaptativos desenvolvidos estão, a utilização do metabolismo anaeróbico, aumento na eficiência de captação do oxigênio e a realização de supressão metabólica. O presente estudo buscou avaliar o perfil metabólico e comportamental da espécie *Geophagus brasiliensis* através de análises dos parâmetros hematológicos lactato, hemoglobina e glicose, do glicogênio hepático e muscular, das atividades das enzimas Lactato Desidrogenase (LDH; E.C. 1.1.1.27), Malato Desidrogenase (MDH; E.C. 1.1.1.37) e Citrato Sintase (CS; E.C. 4.1.3.7), após expor os indivíduos a concentrações de oxigênio de 1,5 mg/L (~30mmHg) e 6,0 mg/L (~100mmHg) combinadas com temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Foram quantificados também o consumo de oxigênio, a contagem de batimentos operculares e a concentração de perda de equilíbrio (PDE) dos indivíduos expostos às temperaturas citadas. Em condição de hipóxia a concentração de glicose plasmática apresentou um aumento significativo nas temperaturas de 20°C e 24°C. Os valores de hemoglobina aumentaram significativamente em hipóxia à 24°C. O glicogênio hepático foi significativamente reduzido em hipóxia à 24°C e 28°C. À 24°C e 28°C, em condições normais de oxigênio, os indivíduos apresentaram um maior consumo em uma menor escala de tempo e, em todas as temperaturas, houve uma redução significativa de consumo quando expostos à hipóxia. A perda de equilíbrio dos animais ocorreu à uma maior concentração de oxigênio em 24°C e 28°C. Um importante estratégia apresentada pela espécie foi a supressão metabólica que pode ser observada pela redução na

atividade da enzima MDH no fígado e da CS no coração em condição de hipóxia. A utilização do metabolismo anaeróbico também foi uma estratégia adotada por essa espécie vista através do aumento na atividade da enzima LDH no músculo. Os resultados apontam a grande contribuição do efeito sinérgico de temperatura e hipóxia no mecanismo de respostas de *Geophagus brasiliensis*.

Palavras-chave: Hipóxia, metabolismo energético, comportamento, vias aeróbicas e anaeróbicas.

ABSTRACT

PEREIRA, Jéssica Alves, Universidade Vila Velha – ES, Fevereiro 2015.
Ecophysiology of *Geophagus brasiliensis* as function of temperature and dissolved oxygen. Advisor: Levy de Carvalho Gomes.

Oxygen and temperature are the most limiting factors in aquatic environments. Several species are exposed to variations of these factors in the water as a result of physical, chemical, biological processes, and also by eutrophication, and together, they can directly interfere in the distribution of fish. As a result, these organisms develop physiological, biochemical and behavioural adjustments as an alternative strategy to adapting in the environment. Amazonian and African cichlids are known for their tolerance in hypoxic environments, which was awarded by the great adaptive plasticity presented by the group. Among the adaptive mechanisms developed by the group are, the use of anaerobic metabolism, increase in oxygen uptake efficiency and the performance of metabolic suppression. The aim of this study was to evaluate the metabolic and behavioural responses of *Geophagus brasiliensis* through analysis of haematological lactate, haemoglobin and glucose, liver and muscle glycogen, and the activities of the enzymes MDH, LDH and CS after exposing individuals to hypoxia (1,5 mg/L) and normoxic (6,0 mg/L) with combined temperatures 20°C, 24°C and 28°C. We also measured oxygen consumption and ventilation rates of individuals exposed to the temperatures described above, until they reached a loss of equilibrium. In hypoxic condition plasma glucose concentration showed a very sharp increase in temperatures of 20°C and 24°C, but in other hand, substantially less at 28°C. The haemoglobin values were few greater at 28°C at normal oxygen condition, but there was no difference between the temperatures in hypoxia. Liver glycogen was significantly reduced by hypoxia at 28°C. At 24°C and 28°C, individuals showed higher oxygen consumption in a smaller time scale when in normoxic, therefore, in all the temperatures, the individuals consumption was significantly reduced in hypoxia. The loss of equilibrium of the animals occurred at a higher concentration of oxygen at 24°C and 28°C. One important strategy showed by *G. brasiliensis* was the metabolic suppression that could be observed by the reduction of MDH enzyme activity in the liver and the CS enzyme activity in the heart when in hypoxic condition. The use of anaerobic metabolism was also a strategy adopted by these specie with was seen through the increase in LDH enzyme activity in muscle. The results show the great

contribution of the synergistic effect of temperature and hypoxia in the mechanism showed by *Geophagus brasiliensis*.

Key-words: hypoxia, energy metabolism, behaviour, aerobic and anaerobic pathways.

1. APRESENTAÇÃO

A mudança climática afeta diretamente a biota através de alterações em seus processos fisiológicos e comportamentais, influenciando em sua sobrevivência, crescimento e reprodução (Kordas et al., 2011). O aumento de zonas hipóxicas através da estratificação do corpo d'água adicionado ao aumento da demanda de oxigênio dos organismos em decorrência da elevação da taxa metabólica, são algumas das consequências da elevação térmica (Stramma et al., 2008).

Organismos que persistem em ambientes com baixa tensão de oxigênio, apresentam mecanismos que oferecem tolerância à hipóxia como, ajustes morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, e comportamentais (Martinez et al., 2006; Timmerman & Chapman, 2004). Quando as mudanças ambientais excedem a capacidade de resposta dos organismos através desses mecanismos, a seleção atua permitindo adaptações evolutivas (Anttila, 2013).

Os ciclídeos são peixes de alto interesse científico por apresentarem uma alta plasticidade em sua forma e adaptação aos ambientes. Além disso, é sugerido que a distribuição dessa família é condicionada pela tolerância à hipóxia (Chippari-Gomes et al., 2005).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo conhecer os ajustes metabólicos desenvolvidos pela espécie *Geophagus brasiliensis* sobre influência da hipóxia e alta temperatura. Para tal, foram realizadas análises dos parâmetros hematológicos, glicogênio hepático e do músculo branco, atividade das enzimas MDH, LDH e CS em três tecidos após 8 horas de exposição a duas condições de oxigênio e três temperaturas. A espécie foi também submetida a um segundo experimento para a determinação de sua tolerância à hipóxia através da avaliação de seu consumo de oxigênio e batimentos operculares.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Espécie Estudada

Dentro da ordem Perciforme, a família Cichlidae é uma das mais ricas famílias de vertebrados, com cerca de 105 gêneros e 1900 espécies (Kullander 2003), e são representados por espécies versáteis, territorialistas e bastante resistentes. Os ciclídeos possuem ampla distribuição geográfica nas Américas, África, Madagascar, litoral sul da Índia, Sri Lanka e Oriente Médio, e se distribuem pelos mais diferentes habitats, como margens de rios, florestas alagadas, lagos e corredeiras, porém a grande maioria apresenta preferência por ambientes lênticos (Kullander 2003).

Geophagus brasiliensis (acará) é uma espécie bastante popular em rios e riachos do sul e sudeste brasileiro (Perazzo et al., 2013). Apresentam grande variedade em sua morfologia e, por sua ocorrência abranger diferentes condições ambientais, são sugeridos eventos de especiação em função das variações do ambiente (Perazzo et al., 2013). Quanto à alimentação, apresentam hábito onívoro podendo se alimentar de sedimentos, pequenos peixes, crustáceos e larvas de insetos (Abilhoa e Da Silva 2003).

Os ciclídeos constituem uma família de peixes de grande interesse científico por apresentarem plasticidade em sua coloração, forma, reprodução, alimentação e adaptação aos ambientes (Chippari-Gomes 2002), o que os tornam excelentes instrumentos de estudos de impactos causados por mudanças de condições ambientais, e até mesmo indicadores de poluição ambiental (Hauser-Davis et al., 2010).



Figura 1. Exemplar de *Geophagus brasiliensis*.

Oxigênio Dissolvido

O oxigênio é um dos fatores mais limitantes do meio aquático, e sua depleção vem sendo associada com a grande participação das ações antrópicas na eutrofização dos ambientes (Diaz & Rosenberg, 2008). A disposição desse gás no ambiente é primordial para organismos aquáticos podendo influenciar sua ecologia, comportamento e fisiologia (Martinez, 2011).

A concentração de oxigênio na água é derivada de fatores como vento, a movimentação entre os substratos gerada pelo atrito da água com rochas, da produção primária, além da incidência solar, temperatura e decomposição de material orgânico (Chippari-Gomes et al. 2003).

Essas variáveis não são constantes ao longo do dia e, conseqüentemente, a concentração de oxigênio é alterada. Essa flutuação é ainda mais expressiva em ambientes lênticos que possuem pouco fluxo e renovação da água, e por isso normalmente enfrentam períodos extremos de hipóxia.

Alguns fatores naturais podem causar a redução periódica ou sazonal de oxigênio na água como, por exemplo, a estratificação de nutrientes em ecossistemas de água doce, que pode causar uma redução dos níveis de oxigênio dissolvido nas águas mais profundas, resultando em um ambiente hipóxico, principalmente no verão (Diaz e Rosenberg 2008).

No entanto, a prática de ações antrópicas vem contribuindo substancialmente para a redução de oxigênio no meio aquático, e sua frequência e intensidade estão diretamente associadas com o aumento da eutrofização e poluição dos corpos d'água (Rabalais et al., 2010).

Dentre os efeitos da eutrofização no meio aquático estão, o acúmulo de nutrientes que estimula o aumento de fitoplânctons e, conseqüentemente, sua atividade respiratória, especialmente no período noturno onde não há fotossíntese, além do aumento da decomposição e respiração bacteriana.

É considerado hipóxia, um nível de oxigênio dissolvido na água que causa efeitos deletérios no comportamento e/ou fisiologia de um organismo (Pollock et al., 2007). A concentração de oxigênio considerada ideal para a maioria dos peixes varia entre 5 – 6 mg/L, a partir de 3 mg/L, cria-se um cenário estressante para os organismos, e níveis iguais ou abaixo de 0,5 mg/L, geralmente considerados anóxia, são letais para a grande maioria desses animais (Diaz e Rosenberg 2008).

Na grande maioria das espécies, a hipóxia pode causar a morte do organismo, entretanto, é mais comum a ocorrência de efeitos sub-letais como, alterações nos processos fisiológicos (Fitzgibbon et al., 2007), na distribuição espacial (Zhang et al., 2009), nas interações tróficas (Pollock et al., 2007) e, em maior escala, na dinâmica populacional (Stierhoff et al., 2006), no fluxo de energia e na riqueza de espécies de uma comunidade.

Um importante determinante da tolerância a hipóxia em peixes é a habilidade em manter a captação de oxigênio em baixas concentrações no ambiente (PO_2), o que reflete a concentração ambiental em que a taxa de consumo do animal passa de independente para dependente da quantidade de oxigênio disponível no meio, o que é denominado como concentração crítica (Mandic et al. 2009; Speers-Roesch et al. 2012).

Além da concentração crítica (P_{CRIT}), a pressão parcial de oxigênio (PO_2) na qual o organismo não mais consegue manter o equilíbrio, pode ser uma grande indicadora da tolerância de um indivíduo (Mandic et al., 2013).

Entre os efeitos sub-letais originados pela falta de oxigênio, as mais frequentes são, alterações nos processos fisiológicos (Chapman e Mackenzie 2009), mudanças quantitativas e qualitativas de habitat (Zhang et al. 2009), influência nas interações de predação (Altieri, 2008), decaimento das taxas de sobrevivência, crescimento, e redução do potencial reprodutivo (Thomas et al. 2007), comportamento e conversão alimentar (Vaquer-Sunyer e Duarte 2008).

Juntos, esses efeitos podem influenciar potencialmente o desempenho dos indivíduos, interferindo na dinâmica populacional, nas interações tróficas e fluxo de energia, e na riqueza de espécies a nível de comunidade (Stierhoff et al., 2006).

Contudo, as espécies se distinguem na forma como respondem aos efeitos causados pela escassez de oxigênio, o que torna importante obter informações de maneira específica para avaliar os impactos em populações e comunidades como um todo (Arend et al. 2011). Dessa forma, é necessário conhecer os mecanismos que permitem os peixes sobreviverem e tolerarem essas condições adversas, e utilizar os indicadores de tolerância para realizar comparações entre as espécies e ambientes.

Adaptação e tolerância da Ictiofauna à hipóxia

Eventos como radiações adaptativas e origem de genes adicionais, contribuíram aos peixes a característica de mais diversos entre os vertebrados, e são também responsáveis pelas adaptações evolutivas por eles apresentadas, entre elas, a habilidade de tolerar as alterações na condição de oxigênio no ambiente (Leggatt e Iwama, 2003).

A radiação adaptativa confere a rápida diversificação de um grupo devido a adaptação em diferentes nichos ecológicos (Mahler et al., 2010), e seu padrão de diversificação pode ser dado em escala geográfica e taxonômica.

Os ciclídeos são constantes objetos de estudo devido à sua riqueza de espécies e diversidade de adaptações fenotípicas, além de sua grande variedade de formas e colorações (Chippari-Gomes et al., 2005).

As respostas de ajustes à hipóxia variam entre as espécies e também dentro de uma mesma espécie. Essa diferença sugere que as mudanças na disponibilidade de oxigênio atuam como um importante agente seletivo que contribui com a grande plasticidade fenotípica dos ciclídeos (Almeida-Val et al., 1995).

A resistência à hipóxia e plasticidade fisiológica entre as espécies de peixes, podem estar relacionadas com os seus habitats. Normalmente, ambientes de corredeira contam com uma constante e elevada concentração de oxigênio e, em contrapartida, ambientes de menor fluxo e renovação de água, enfrentam uma ampla variação de oxigênio ao longo do dia (Fu et al., 2011). Assim, a capacidade de resposta dos organismos são relacionadas com a frequência e intensidade de situações hipóxicas na qual são expostos (Farrel e Richards, 2009).

Certos hábitos foram adotados por algumas espécies que enfrentam situações de hipóxia com mais frequência. Entre eles estão a realização da respiração na superfície da água (Soares et al., 2006) e manter bolhas de ar em suas cavidades bucais para elevar a quantidade de oxigênio que passa pelas brânquias (Rosenberger e Chapman, 2000).

Alterações bioquímicas e fisiológicas como, aumento dos níveis de glicose, lactato, enzima lactato desidrogenase, aumento da produção de eritrócitos afim de aprimorar a afinidade entre oxigênio e hemoglobina (Mandic et al., 2009; Brauner e Val 2006), produção anaeróbica de ATP, aumento da ventilação branquial, redução da frequência do batimento cardíaco e aumento da força de

contração do coração (McNeil e Closs, 2007), podem ser realizadas após uma situação de hipóxia intensa.

Mudanças nos parâmetros bioquímicos e hematológicos são potencialmente úteis por permitirem detectar danos agudos e crônicos causados por algum tipo de estresse (Adham et al., 2002). Estudos hematológicos de diferentes espécies de peixes são de grande interesse ecológico e fisiológico por auxiliarem na compreensão das particularidades sanguíneas, filogenia, habitat e capacidade adaptativa dos indivíduos no ambiente.

A supressão metabólica, realizada através da redução da demanda de O_2 e da utilização do metabolismo anaeróbico, é uma das mais eficazes estratégias de tolerância à hipóxia realizada por algumas espécies (Bickler e Buck, 2007). Seu benefício é atribuído pela redução da produção e consumo de ATP, maiores no metabolismo aeróbico, que contribui com um maior aproveitamento energético (Chippari-Gomes et al., 2005).

Com a redução da demanda metabólica (O_2) há também uma mudança nas atividades das enzimas metabólicas. Esse ajuste enzimático varia de acordo com a duração e intensidade da hipóxia e também com o tecido e espécie (Martinez et al., 2009).

Quando a variação ambiental excede a capacidade do animal em responder através desses mecanismos de ajuste, a seleção pode atuar permitindo as populações a responderem através de uma adaptação evolutiva (Anttila et al. 2013).

Temperatura

É sabido o quanto as variáveis físico-químicas ambientais, em especial a temperatura, influenciam os ecossistemas aquáticos. Elas podem influenciar diretamente as respostas ecofisiológicas dos organismos em diferentes níveis do ecossistema (Portner e Peck, 2010), principalmente os ectotérmicos, que se caracterizam por depender do calor do seu ambiente para a regulação de sua temperatura corporal.

Para os próximos 100 anos, é esperado um aumento da temperatura da superfície terrestre de até $7^{\circ}C$ (Ficke et al., 2007), o que irá acarretar em alterações nos padrões de precipitação, aumento na ocorrência de temperaturas extremas

(Doney et al., 2012), elevação do nível dos oceanos, e alterações nos padrões de distribuição e abundância das espécies (Sunday et al., 2012).

Com o aumento da temperatura em decorrência das mudanças climáticas, diversos organismos aquáticos enfrentarão temperaturas próximas ou acima de seu limite tolerável (Huey et al., 2012).

Entre os impactos causados pelo aumento da temperatura no ambiente, destaca-se a alteração nas interações tróficas (Portner e Peck 2010), diminuição do sucesso reprodutivo devido à redução de energia destinada ao crescimento (Farrell, 2009), influência nas atividades padrões sazonais e escolha de habitats (Whitaker e Shine 2002), desempenho natatório e, em maior escala, podem afetar a dinâmica das populações (Brander, 2007).

Alterações nas taxas metabólicas também podem ocorrer quando a temperatura da água se encontra fora do intervalo ótimo de um organismo ectotérmico. O mesmo pode ser alterado para mais ou menos acelerado com o objetivo de manter as funções vitais do animal (Martin, 2003).

Entretanto, os efeitos da mudança climática alcançam outros fatores além da temperatura. O aumento de zonas hipóxicas através da estratificação do corpo d'água adicionada ao aumento da demanda de oxigênio dos organismos em decorrência da elevação da taxa metabólica, são algumas das consequências da elevação térmica (Stramma et al., 2008).

O efeito combinado do aumento de temperatura e redução da concentração de oxigênio dissolvido tem o potencial de causar sérias mudanças na dinâmica do ecossistema. Esses efeitos são ampliados em ambientes de água rasa, como zonas costeiras e lagoas, e mais ainda em ambientes caracterizados por pouca renovação de água (Danovaro e Pusceddu, 2007).

Em altas temperaturas, a atividade metabólica de microrganismos é elevada podendo causar a hipóxia no ambiente através do aumento da demanda de oxigênio de fitoplânctons e bactérias. Esse maior consumo dos microrganismos reduz o oxigênio a níveis muito baixos e eleva, conseqüentemente, a demanda de oxigênio dos peixes (Diaz e Rosenberg, 2008).

O aumento da temperatura pode também intensificar a estratificação do corpo d'água reduzindo o suprimento de oxigênio nas camadas mais profundas, especialmente no verão (Wang et al., 2011).

A tolerância à temperatura e à hipóxia podem ser positivamente associadas para algumas espécies de peixes (Portner e Peck, 2010). Geralmente, peixes que habitam águas quentes são geralmente mais tolerantes a níveis mais baixos de oxigênio do que peixes de águas mais frias (Pientka e Parrish, 2002). Essa relação é uma consequência da redução da solubilidade do oxigênio na água em temperaturas elevadas, o que causa um aumento a demanda metabólica dos animais ectotérmicos (Diaz e Breitburg, 2009).

Oxigênio e temperatura podem também interagir para formar a “pressão térmica-oxigênio dissolvido”, onde o organismo através de um “trade-off”, entra em um confronto entre alterar sua fisiologia em função da temperatura ou do nível de oxigênio (Taylor et al., 2007).

Os limites de tolerância e a habilidade das espécies em se adaptar a novos regimes de temperatura, são fatores determinantes para o sucesso de uma população que está sujeita a alterações dessa variável (Portner e Knust 2007).

Metabolismo Aeróbico e Anaeróbico

A respiração aeróbica, também conhecida como metabolismo aeróbico, ocorre quando o oxigênio é absorvido e transferido para as células, onde é feita a conversão de alimento por energia (White e Campo 2004).

A taxa metabólica de repouso, conhecida como taxa metabólica basal é, normalmente, a taxa mínima da energia consumida necessária para manter os processos vitais. Quando um organismo é obrigado a gastar uma quantidade extra de energia em mecanismos de ajuste em função de alterações ambientais, a energia que seria direcionada para atividades mais complexas como crescimento e reprodução, são reduzidas (Claireaux e Lefrançois 2007).

A grande maioria dos animais utilizam o metabolismo aeróbico para a produção de energia devido ao alto rendimento de ATP, a vasta gama de substratos oxidáveis, e os produtos finais mais vantajosos em comparação ao do metabolismo anaeróbico (Rees et al. 2008).

Entretanto, em situações onde a concentração de oxigênio disponível para os tecidos é insuficiente para a produção aeróbica de ATP, ocorrem mudanças na principal via metabólica (glicólise) e o metabolismo anaeróbico vem a ser utilizado, o que geralmente é associado a mudanças nas atividades enzimáticas da glicólise (Pollock et al., 2007).

Com a concentração de oxigênio abaixo do crítico, a sobrevivência do animal se torna dependente da manutenção do balanço de energia celular em decorrência da redução do suprimento de energia aeróbica. Para manter o balanço energético celular, algumas espécies de peixes tolerantes reduzem temporariamente sua taxa metabólica através da diminuição da demanda energética e elevam a produção de ATP (Davies et al., 2011).

Na presença de oxigênio, o principal produto da glicólise aeróbica é o piruvato, o qual é destinado ao ciclo de Krebs para que se torne acetil-CoA e, posteriormente em citrato nas mitocôndrias por ação da enzima citrato sintase (CS). Em condições de hipóxia o produto final da glicólise, agora anaeróbica, é o lactato, convertido pela enzima LDH (Almeida-Val et al. 2011).

Parte do lactato produzido nos tecidos é transportado para a corrente sanguínea. Quando o ambiente antes hipóxico, retorna a um equilíbrio de oxigênio, o lactato é novamente convertido em piruvato, especialmente em tecidos bem oxigenados como fígado e músculos cardíacos. Dessa forma, concentrações de lactato no sangue podem ser utilizadas como indicadores do quanto o metabolismo anaeróbico está sendo utilizado (Sampaio 2008).

Mudanças na concentração de glicogênio nos tecidos estão também associadas às alterações de lactato sanguíneo durante hipóxia ou após o uso do metabolismo anaeróbico (Mandic et al. 2008).

Além da LDH, outras enzimas também contribuem para o conhecimento dos processos fisiológicos utilizados por peixes expostos à hipóxia. As enzimas do metabolismo oxidativo Citrato Sintase (CS) e Malato Desidrogenase (MDH), e a enzima glicolítica Piruvato Kinase (PK) tem sido utilizadas como medida da capacidade aeróbica e anaeróbica celular, e são indicadoras potenciais da exposição dos organismos a condições adversas (Tripathi e Verma 2004).

Embora as respostas metabólicas possam diferir em relação à espécie de peixe, habitat e hábito alimentar, a alteração do meio físico-químico pode promover respostas metabólicas como alteração dos níveis de enzimas nos tecidos, as quais podem proporcionar valiosas informações de relevância ecológica, indicando a condição do ambiente e a viabilidade das espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abilhoa, V., Da Silva, P.A. 2003. A alimentação de duas espécies de ciclídeos (Perciformes, Cichlidae) em um reservatório eutrofizado na região metropolitana de Curitiba e sua relação com o aparelho digestório.

Adham, K.G., Ibraim, H.M., Hamed, S.S., Saleh, R.A. 2002. A blood chemistry of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1757) under the impact of water pollution. *Aquatic Ecology*, 36: 549-557.

Altieri, A.H. 2008. Dead zones enhance key fisheries species by providing predation refuge. *Ecology*, 89: 2808-2818.

Almeida-Val, V.M.F., Farias, I.P., Silva, M.N.P., Duncan, W.P. 1995. Biochemical adjustment to hypoxia in Amazon Cichlids. *Braz. J. Med. Biochem. Res.*, 28: 1257-1263.

Almeida-Val, V.M.F., Oliveira, A.R., Silva, M.N.P., Ferreira-Nozawa, M.S., Araujo, R.M., Val, A.L., Nozawa, S.R. 2011. Anoxia- and hypoxia-induced expression of LDH-A* in the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinnis*. *Genetics and Molecular Biology*, 34, 2: 315-322

Anttila, K., Dhillon, R.S., Boulding, E.G., Farrell, A.P., Glebe, B.D., Elliott, J.A.K., Wolters, W.R., Schulte, P.M. 2013. Variation in temperature tolerance among families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level. *The Journal of Experimental Biology*, 216: 1183-1190.

Arend, K.K., Beletsky, D., De Pinto, J.V., Ludsin, S.A., Roberts, J.J., Rucinski, D.K., Scavia, D., Schwab, D.J., Hook, T.O. 2011. Seasonal and interannual effects of hypoxia on fish habitat quality in central Lake Erie. *Freshwater Biology*, 56: 366-383.

Bickler, P.E., Buck, L.T. 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: life with variable oxygen availability. *Annu. Rev. Physiol.* 69, 145-170.

Brander, K.M. 2007. Global fish production and climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104: 19709-19714.

Brauner, C.L., Val, A.L. 2006. Oxygen transfer. *The physiology of tropical fishes*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 277-306.

Chapman, L.J., Mackenzie, D.J. 2009. Behavioral responses and ecological consequences. Eds. *Hypoxia. Fish Physiology*. Academic Press, Amsterdam, 27: 25–77.

Chippari-Gomes, A.R. 2002. Adaptações metabólicas dos ciclídeos aos ambientes hipóxicos da Amazônia. Tese Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas. pp.148.

Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P., Paula-Silva, M.N., Oliveira, A.R., Almeida- Val, V.M.F. 2003. Hypoxia tolerance and adaptations in fishes: the case of amazon cichlids. (Eds) *Fish adaptation*. Science Publishers, INC, EUA. 37-54.

Chippari-Gomes, A.R., Gomes, L.C., Lopes, N.P., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. 2005. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 141: 347-355.

Claireaux, G., Lefrançois, C. 2007. Linking environmental variability and fish performance: integration through the concept of scope for activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 362: 2031–2041.

Danovaro, R., Pusceddu, A. 2007. Biodiversity and ecosystem functioning in coastal lagoons: does microbial diversity play any role. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 75 (1–2): 4–12.

Davies, R., Moyes, C.D., Wang, Y.S. 2011. Intra- and inter-specific variation in metabolic gene expression in relationship to environmental hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 159: 25–31.

Diaz, R.J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zone and consequences for marine ecosystems. *Science* 321, 926–929.

Diaz, R.J., Breitburg, D.L. 2009. Chapter 1, The hypoxic environment. In J.G. Richards, A.P. Farrell, C.J. Brauner, Eds. *Fish Physiology*, Vol 27. Academic Press, New York, pp 1-23.

Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Duffy, J.E., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, A.B., Knowlton, N. 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4:11-37.

Farrell, A.P. 2009. Environment, antecedents and climate change: lessons from the study of temperature physiology and river migration of salmonids. *Journal of Experimental Biology* 212: 3771–3780.

Farrell, A.P., Richards, J.G. 2009. An integrative synthesis of the responses of fish to hypoxia. In *Hypoxia, Fish Physiology*, Vol. 27 (Ed. J.G. Richards, A.P. Farrell and C.J. Brauner), pp. 448-503. San Diego: Elsevier Academic Press.

Ficke, A.D., Myrick, C.A., Hansen, L.J. 2007. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 17: 581-613.

Fitzgibbon, Q.P., Strawbridge, A., Seymour, R.S. 2007. Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Pisces : Sciaenidae). *Aquaculture*, 270: 358– 368.

Fu, S.J., Brauner, C.J., Cao, Z.D., Richards, J.G., Peng, J.L., Dhillon, R., Wang, Y.X. 2011. The effect of acclimation to hypoxia and sustained exercise on subsequent hypoxia tolerance and swimming performance in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Exp. Biol.*, 214: 2080-2088.

Hauser-Davis, R.A., Oliveira, T.F., Silveira, A.M., Silva, T.B., Ziulli, R.I. 2010. Case study: Comparing the use of nonlinear discriminating analysis and Artificial Neural Networks in the classification of three fish species: acaras (*Geophagus brasiliensis*),

tilapias (*Tilapia rendalli*) and mullets (*Mugil liza*). Ecological Informatics, 5: 474-478.

Huey, R.B., Kearney, M.R., Krockenberger, A., Holtum, J.A.M., Jess, M., Williams, S.E. 2012. Predicting organismal vulnerability to climate warming: roles of behavior, physiology and adaptation. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 367: 1665-1679.

Johnston, I.A., Temple, G.K. 2002. Review: thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. J. Exp. Biol., 205: 2305-2322.

Kullander, S.O. 2003. Family Cichlidae. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre. 605-606.

Leggatt, R.A., Iwama, G.K. 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. Rev Fish Biol Fisherier, 13: 237-246.

Mahler, D.I., Revell, L.J., Glor, R.E., Losos, J.B. 2010. Ecological opportunity and the rate of morphological evolution in the diversification of Greater Antillean anoles. Evolution, 64: 2731-2745.

Mandic, M., Lau, G.Y., Nijjar, M.M., Richards, J.G. 2008. Metabolic recovery in goldfish: a comparison of recovery from severe hypoxia exposure and exhaustive exercise. Comp Biochem Physiol C 148: 332–338.

Mandic, M., Sloman, K.A., Richards, J.G. 2009. Escaping to the surface: a phylogenetically independent analysis of hypoxia-induced respiratory behaviors in sculpins. Physiol Biochem Zool., 82: 730–8.

Mandic, M., Speers-Roesch, B., Richards, J.G. 2013. Hypoxia tolerance in sculpins is associated with high anaerobic enzyme activity in brain but not in liver or muscle. Physiol. Biochem. Zool. 86: 92-105.

Mark, F.C., Bock, C., Portner, H.O. 2002. Oxygen-limited thermal tolerance in

Antarctic fish investigated by MRI and P-MRS. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: 1254-1262.

Martin, R.A. 2003. "Fuel Economy of the White Shark". ReefQuest Center for Shark Research. 9 Feb. 2009.

Martinez, M.L., Chapman, L.J., Rees, B.B. 2009. Population variation in hypoxic responses of the cichlid *Pseudocrenilabrus multicolor victoria*. *Can. J. Zool.*, 87(2): 188-194.

Martinez, M.L., Raynard, E.L., Rees, B.B., Chapman, L.J. 2011. Oxygen limitation and tissue metabolic potential of the African fish *Barbus neumayeri*: roles of native habitat and acclimatization. *BMC Ecol.* 11, 2.

McNeil, D., Closs, G.P. 2007. Behavioural responses of a southeast Australian floodplain fish community to gradual hypoxia. *Freshw Biol*, 52: 412-420.

Perazzo, G.X., Nolero, R.B., Vicari, M.R., Gava, A., Cestari, M.M., 2013. Trends of karyotypical evolution in the pearl cichlid, *Geophagus brasiliensis*, from Southern Brazil. *Zoology*, 116: 286-292.

Petersen, L.H., Gamperl, A.K. 2011. Cod (*Gadus morhua*) cardiorespiratory physiology and hypoxia tolerance following acclimation to low-oxygen conditions. *Physiol. Biochem. Zool.*, 84: 18-31.

Pientka, B., Parrish, D.L. 2002. Habitat selection of predator and prey: Atlantic salmon and rainbow smelt overlap, based on temperature and dissolved oxygen. *Transactions of the American Fisheries Society*, 131: 1180–1193.

Pollock, M.S., Clarke, L.M.J., Dube, M.G. 2007. The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects. *Environ. Rev.* 15: 1–14.

Portner, H.O., Knust, R. 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science*, 315: 95-97.

Portner, H.O., Peck, M.A. 2010. Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology* 77: 1745–1779.

Rabalais, N.N., Diaz, R.J., Levin, L.A., Turner, R.E., Gilbert, D., Zhang, J. 2010. Dynamics and distribution of natural and human-cause hypoxia. *Biogeosciences*, 7: 585-619.

Rees, B.B., Boily, P., Williamson, L.A.C. 2008. Exercise and hypoxia induced anaerobic metabolism and recovery: a student laboratory exercise using teleost fish. *Advan in Physiol Edu*, 33: 72-77.

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.

Sampaio, F.G., Boijink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 147: 43-51.

Soares, M.G.M., Meneses, N.A., Junk, W.J. 2006. Adaptations of fish to oxygen depletion in a central Amazonian floodplain lake. *Hydrobiologia*, 568: 353–67.

Speers-Roesch, B., Richards, J.G., Brauner, C.J., Farrell, A.P., Hickey, A.J.R., Wang, Y.S., Renshaw, G.M.C. 2012. Hypoxia tolerance in elasmobranchs. I. Critical oxygen tension as a measure of blood oxygen transport during hypoxia exposure. *J. Exp. Biol.*, 215: 93-102.

Stierhoff, K.L., Targett, T.E., Miller, K. 2006. Ecophysiological responses of juvenile summer and winter flounder to hypoxia: experimental and modeling analyses of effects on estuarine nursery quality. *Marine Ecology Progress Series*, 325: 255–266.

Sunday, J.M., Bates, A.E., Dulvy, N.K. 2012. Thermal tolerance and the global

redistribution of animals. *Nat Clim Change*, 2: 686-90.

Taylor, J.C., Rand, P.S., Jenkins, J. 2007. Swimming behavior of juvenile anchovies (*Anchoa spp.*) in an episodically hypoxic estuary: implications for individual energetics and trophic dynamics. *Marine Biology*, 152: 939–957.

Thomas, P., Rahman, S., Khan, I.A., Kummer, J.A. 2007. Widespread endocrine disruption and reproductive impairment in an estuarine fish population exposed to seasonal hypoxia. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 274: 2693–2701.

Tripathi, G., Verma, P. 2004. Fenvalerate-induced changes in a catfish, *Clarias batrachus*: metabolic enzymes, RNA and protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 138C: 75-79.

Vaquier-Sunyer, R., Duarte, C.M. 2008. Thresholds for hypoxia and marine biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105: 15452–15457.

Wang, Y., Hu, M., Shin, P.K.S., Cheung, S.G. 2011. Immune responses to combined effect of hypoxia and high temperature in the green-lipped mussel *Perna viridis*. *Marine Pollution Bulletin*, 63: 201-208.

Whitaker, P.B., Shine, R. 2002. Thermal biology and activity patterns of the eastern brownsnake (*Pseudonaja textilis*): a radiotelemetric study. *Herpetologica* 58: 436–452.

White, M.E., Campo, F.M. 2004. *Investigations in Biology*. 3rd ed. The McGraw-Hill Co. Inc., New York, NY, USA.

Zhang, H., Ludsin, S.A., Mason, D.M., Adamack, A.T., Brandt, S.B., Zhang, X., Kimmel, D.G., Roman, M.R., Boicourt, W.C. 2009. Hypoxia-driven changes in the behavior and spatial distribution of pelagic fish and mesozooplankton in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 138 :80–9.

2.2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar as os ajustes fisiológicos e comportamentais de *Geophagus brasiliensis* expostos às condições de normóxia (6,0 mg/L ~100 mmHg) e hipóxia (1,5 mg/L ~30 mmHg) nas temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C.

Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da hipóxia e da temperatura sobre os parâmetros hematológicos de *G. Brasiliensis*.
- Avaliar as respostas metabólicas de *G. brasiliensis* através da atividade das enzimas MDH, LDH e CS nos tecidos do fígado, coração e músculo branco, após a exposição a duas diferentes condições de oxigênio e temperatura por 8 horas.
- Mensurar a taxa metabólica de *G. Brasiliensis* através do consumo de oxigênio e da contagem dos batimentos operculares após expor os indivíduos às temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C.

Ecofisiologia de *Geophagus brasiliensis* em função da temperatura e oxigênio dissolvido

RESUMO

A disposição de oxigênio e temperatura no ambiente são fatores primordiais para organismos aquáticos. Com a mudança climática, é esperado que os organismos se deparem com temperaturas bem acima de seu limite tolerável e com concentrações de oxigênio inferiores ao ideal. O presente estudo buscou avaliar o perfil metabólico e comportamental da espécie *Geophagus brasiliensis* através de análises dos parâmetros hematológicos hemoglobina e glicose, do glicogênio hepático e muscular, das atividades das enzimas LDH, MDH e CS após expor os indivíduos a concentrações de oxigênio de 1,5 mg/L e 6,0 mg/L combinadas com temperaturas 20°C, 24°C e 28°C, buscando assim, conhecer a sua resistência frente a essas condições. Foram quantificados também o consumo de oxigênio, a contagem de batimentos operculares concentração de perda de equilíbrio (PDE) dos indivíduos expostos às temperaturas citadas. Os indivíduos de *G. brasiliensis* apresentaram em condição de hipóxia um aumento significativo de glicose nas temperaturas de 20°C e 24°C. Os valores de hemoglobina aumentaram significativamente em hipóxia à 24°C. O glicogênio hepático foi significativamente reduzido em hipóxia à 24°C e 28°C. À 24°C e 28°C os indivíduos apresentaram um maior consumo de oxigênio em uma menor escala de tempo e, em todas as temperaturas houve uma redução significativa do consumo em hipóxia. A perda de equilíbrio dos animais ocorreu à uma maior concentração de oxigênio nos tratamento de 24°C e 28°C. A espécie apresentou a supressão metabólica como uma de suas principais estratégias de tolerância à hipóxia, bem como a utilização do metabolismo anaeróbico nessa condição. Os resultados apontam ainda a grande influencia do efeito sinérgico da temperatura e hipóxia nos mecanismos de respostas utilizados pelo *Geophagus brasiliensis*.

Palavras-Chave: Hipóxia, metabolismo energético, comportamento, vias aeróbicas e anaeróbicas.

ABSTRACT

The oxygen availability and temperature in the environment are major factors for aquatic organisms. With currently climate changes, it is expected that the animals might encounter temperatures above its tolerable limit and oxygen concentrations less than ideal. The aim of this study was to evaluate the metabolic and physiological profile of *G. brasiliensis* through analysis of hematological parameters lactate, hemoglobin and glucose, liver and muscle glycogen, the activities of the enzymes LDH, MDH and CS after exposing individuals to oxygen concentrations 1,5 mg/L and 6,0 mg/L combined with temperatures 20°C, 24°C and 28°C, and then, know their resistance front of these conditions. Individuals showed in hypoxia a significant increase in glucose in the temperatures of 20°C and 24°C, through substantially less at 28°C. The haemoglobin values were few greater at 28°C in normoxia, but there was no difference between the temperatures in hypoxia. The haematological parameters showed that this specie was not able to perform primary adjustments when exposed to hypoxia and higher temperature. Liver glycogen was significantly reduced by hypoxia at 28°C. At 24°C and 28°C individuals had higher oxygen consumption in a smaller time scale and, all the temperatures showed a significantly reduction on consumption in hypoxia. The loss of equilibrium on the animals occurred at a higher concentration of oxygen in the treatment of 24°C and 28°C. *G. brasiliensis* showed metabolic suppression as one of its main strategies of tolerance to hypoxia, and the use of anaerobic metabolism. The results also point to the influence of the synergistic effect of temperature and hypoxia in the mechanisms used by these specie.

Key-words: hypoxia, energy metabolism, behaviour, aerobic and anaerobic pathway.

2. INTRODUÇÃO

A emissão de carbono na atmosfera têm atingido os maiores níveis já mensurados e, com isso, influenciado todos os componentes do sistema climático (Ficke et al., 2007). O aumento de zonas hipóxicas através da estratificação do corpo d'água adicionada ao aumento da demanda de oxigênio dos organismos em decorrência da elevação da taxa metabólica, são algumas das consequências da elevação térmica (Stramma et al., 2008).

A combinação de alterações na temperatura e na concentração de oxigênio, oferece uma situação substancialmente crítica aos organismos aquáticos, em especial aos peixes. Organismos que persistem nessas condições, apresentam mecanismos de ajustes a níveis morfológicos, bioquímicos, fisiológicos, e/ou comportamentais (Martinez et al., 2006; Timmerman e Chapman, 2004). Quando as alterações excedem a capacidade de resposta dos organismos, a seleção atua permitindo adaptações evolutivas (Anttila, 2013).

Sabe-se que as espécies de ciclídeos amazônicas (Scott et al., 2008) e africanas (Chapman et al., 2002) são expostas a situações de hipóxia extrema em determinados períodos, o que os permitiram desenvolver uma grande plasticidade como forma de adaptação a esses ambientes. No entanto, pouco se conhece sobre o perfil metabólico das espécies provenientes dos ambientes de Mata Atlântica, onde as variações de oxigênio e temperatura ocorrem com uma menor frequência e intensidade. O grupo é de grande interesse para esse tipo de avaliação por possuírem respiração aquática obrigatória e principalmente por apresentarem morfologias e comportamentos bastante distintos refletindo o ambiente de onde são provenientes.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo conhecer a tolerância da espécie *G. brasiliensis* à hipóxia e temperatura elevada através de suas respostas fisiológicas e metabólicas sob influencia dessas condições, partindo da premissa de que essa é uma espécie que pertence a uma família conhecida principalmente pela sua resistência a oscilações ambientais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Aquisição e Aclimação dos Peixes*

Os exemplares de *Geophagus brasiliensis* ($8,31\text{g} \pm 0,87$) foram adquiridos em uma piscicultura particular localizada em Guarapari – ES e levados para laboratório, onde foram mantidos em condições padrões de aclimação por 30 dias (fotoperíodo natural, alimentados duas vezes ao dia, trocas de 70% da água semanais, parâmetros físico-químicos monitorados) à temperatura de 28°C. Após esse período, os peixes foram individualmente transferidos para aquários de 30 L onde foram aclimatizados por 14 dias na temperatura experimental em que seriam submetidos, 20°C ($20^\circ\text{C} \pm 0,09$), 24°C ($24,12^\circ\text{C} \pm 0,21$) ou 28°C ($28,04^\circ\text{C} \pm 0,11$) e concentração normal de oxigênio ($6,0\text{ mg/L} \pm 0,44$) monitorada através de um Oxímetro (YSI Pro 20). A redução da temperatura foi realizada gradativamente (dois dias) de 28 – 24 – 20°C. A mesma era controlada através de uma resistência de 110W colocada dentro do aquário acoplada a um termostato digital com precisão de uma casa decimal.

Os indivíduos foram alimentados duas vezes ao dia, tiveram seus aquários sifonados diariamente e, uma troca de 70% do volume de água foi feita semanalmente. Os parâmetros químicos de amônia total ($1,34\text{mg/L} \pm 0,21$), nitrito ($0,06\text{mg/L} \pm 0,03$) e dureza ($69,6\text{mg/L} \pm 6,92$) foram avaliados de acordo com APHA (1998) e, realizadas duas vezes por semana, antes e após a troca de água.

3.2 *Desenhos Experimentais*

Experimento I

Os peixes de cada grupo de temperatura foram transferidos individualmente para o aquário experimental de 30L contendo 10L de água e aeração constante, onde permaneceram por 24 horas antes do início do experimento. Foram inseridos no aquário um termostato, para que fosse mantida a temperatura experimental desejada, e uma câmara de leitura de oxigênio que tinha conectada em uma de suas extremidades um bomba submersa, e em outra era inserida a probe do aparelho Multiparâmetro que realizava as leituras da contração

de oxigênio e temperatura durante todo o experimento, formando assim, um sistema fechado de circulação de água.

Foram realizadas combinações das condições de oxigênio, normóxia ($6,06 \pm 0,25$ mg/L) e hipóxia ($1,48 \pm 0,18$ mg/L) com as temperaturas 20°C ($20,78 \pm 0,37^\circ\text{C}$), 24°C ($23,7 \pm 0,84^\circ\text{C}$), 28°C ($28,5 \pm 0,7^\circ\text{C}$), totalizando seis tratamentos com oito repetições para cada (n total= 48), e cada experimento teve duração de 8 horas. Para os tratamentos com condição de hipóxia, a aeração era removida no início do experimento e o aquário era totalmente fechado evitando assim qualquer troca gasosa com o ambiente. A redução de oxigênio foi gradativa (25% da saturação por hora) e realizada através da introdução de bolhas nitrogênio gasoso na água, de acordo com Chippari-Gomes et al (2005). Assim que a concentração estipulada de 1,5mg/L ($\sim 30\text{mmHg}$) era alcançada, iniciavam-se as 8 horas de experimento (Chippari-Gomes et al., 2005).

Ao final de cada experimento, os animais foram anestesiados com eugenol (1 mg/L) e tiveram o sangue coletado. Posteriormente, os animais foram sacrificados para a retirada dos tecidos do músculo, fígado e coração que foram preservados a -80°C até que fossem feitas as análises enzimáticas.

Análises Laboratoriais (para maiores detalhes dos procedimentos, ver Anexo I)

Parte do fígado e músculo foram destinados para as análises de glicogênio (Dubois et al., 1956) e o restante desses tecidos e o coração, foram utilizados nas análises de atividade das enzimas MDH, LDH e CS de acordo com Driedzic e Almeida-Val (1996) com modificações. O cálculo utilizado para determinar a atividade das enzimas foi de acordo com a equação:

$$\mu\text{moles subs. min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1} = \frac{(\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{fd (cubeta)} \times \text{fd (tampão)})}{6,22} / \text{Prot}$$

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. * Para a enzima CS o coeficiente de extinção molar do DTNB é 13,6, Prot = proteína (mg).

A quantidade de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

Experimento II

As medidas de consumo de oxigênio e batimentos operculares se deram em um segundo experimento. Cada grupo experimental (n=8 para cada temperatura) foi transferido individualmente para o aquário com capacidade de 1L e dotado de aeração, onde permaneciam por 24 horas até o início do experimento na sua respectiva temperatura de aclimatização: 20°C (20,58 ± 0,36°C), 24°C (24,17 ± 0,3°C) ou 28°C (28,51 ± 0,29°C).

Após as 24 horas, o aquário era fechado e isolado de trocas gasosas com o meio externo, e sua aeração era removida. A condição inicial de oxigênio era considerada normóxia (5,62 ± 0,34 mg/L). Os peixes foram mantidos nessa condição até perderem o equilíbrio, o que foi considerado o ponto final do experimento. As medidas de oxigênio e temperatura foram realizadas a cada 20 minutos e, dentro do mesmo intervalo de tempo, foi feita a contagem dos batimentos operculares durante 1 minuto. Com os resultados obtidos foi possível calcular o consumo de oxigênio (Boutilier et al., 1984), os valores de batimentos operculares por minuto (Chippari-Gomes et al., 2005) e a concentração de perda de equilíbrio (PDE).

A fórmula utilizada para o cálculo de consumo de oxigênio foi:

$$MO_2 = (\Delta PO_2 \times \alpha O_2 \times v) / (m \times t),$$

onde,

ΔPO_2 (mmHg) é a diferença entre os valores de PO_2 inicial e final em cada período de experimento, αO_2 ($\mu\text{mol}^{-1} \text{ mmHg}^{-1}$) é a solubilidade constante da água, v é o volume (litro) de água do aquário, m (g) é a biomassa total de peixe, t é o tempo (hora) equivalente à duração de cada experimento. O consumo de oxigênio (MO_2) e batimentos operculares foram expressos em $\mu\text{mol-O}_2 \text{ g}^{-1}\text{h}^{-1}$ e número de batimentos/minuto respectivamente.

3.3 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados quanto a sua normalidade através do teste de Shapiro-Wilk. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram normalizados através da transformação de log10 ou 1+ log10. Para as análises de parâmetros hematológicos e atividades enzimáticas em função da temperatura e condição de oxigênio, foi aplicada uma ANOVA dois fatores e para os dados de

consumo de oxigênio, perda de equilíbrio (PDE) e tempo de duração dos experimento foram analisados através de uma ANOVA simples. Posteriormente, o teste de Tukey foi realizado ($p < 0,05$), através do programa estatístico SigmaStat versão 12.5 (Systat Software, Inc.).

6. RESULTADOS

6.1 Experimento I

Parâmetros Hematológicos

Os valores dos parâmetros hematológicos representados na tabela 1 mostram um aumento significativo do metabólito glicose plasmática em indivíduos expostos à hipóxia (1,5mg/L ~ 30mmHg) nas temperaturas de 20°C e 24°C. Esse aumento não foi significativo à 28°C e também não apresentou diferença significativa entre as condições de oxigênio nessa temperatura. A concentração de hemoglobina aumentou significativamente em condição de hipóxia à 24°C. Os valores de lactato plasmático não diferiram entre as temperaturas e condições de oxigênio ($p > 0,05$).

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de *Geophagus brasiliensis* expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores estão apresentados em suas respectivas médias $\pm$ erro padrão.

Parâmetros Hematológicos	20°C	24°C	28°C
<i>Glicose Plasmática</i>			
<i>Normóxia</i>	33,97 $\pm$ 5,35 ^{Aa}	26,38 $\pm$ 7,96 ^{Aa}	29,95 $\pm$ 3,06 ^{Aa}
<i>Hipóxia</i>	144,66 $\pm$ 25,11 ^{Ba}	136,34 $\pm$ 29,7 ^{Ba}	36,51 $\pm$ 11,46 ^{Ab}
<i>Hemoglobina</i>			
<i>Normóxia</i>	1,96 $\pm$ 0,6 ^{aA}	1,06 $\pm$ 0,29 ^{aB}	2,57 $\pm$ 0,95 ^{aA}
<i>Hipóxia</i>	2,21 $\pm$ 0,33 ^{aA}	2,06 $\pm$ 0,47 ^{bA}	2,11 $\pm$ 0,60 ^{aA}
<i>Lactato Plasmático</i>			
<i>Normóxia</i>	0,98 $\pm$ 0,76 ^{aA}	0,62 $\pm$ 0,61 ^{aA}	0,54 $\pm$ 0,18 ^{aA}
<i>Hipóxia</i>	0,86 $\pm$ 0,89 ^{aA}	0,77 $\pm$ 0,65 ^{aA}	0,73 $\pm$ 0,36 ^{aA}

Glicogênio

A concentração de glicogênio muscular não diferiu entre os tratamentos ($p = 0,441$).

Em hipóxia, os valores de glicogênio hepático representados na figura 2 apresentaram uma redução significativa nas temperaturas 24°C e 28°C ($p < 0,05$).

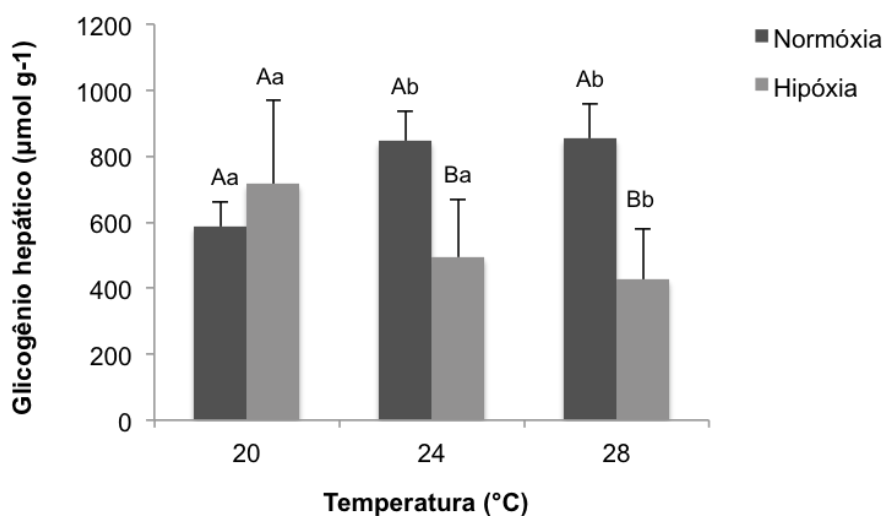
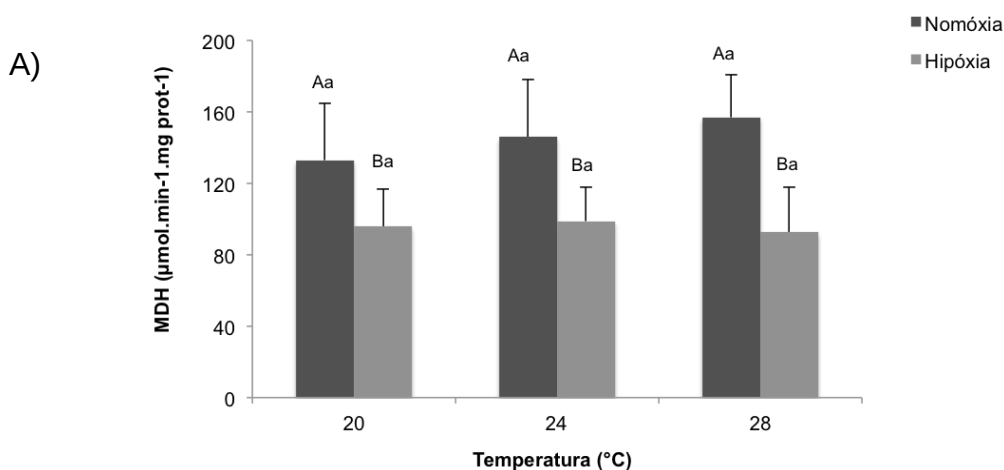


Figura 2. Concentração de glicogênio hepático em *G. brasiliensis* expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$.

Análises Enzimáticas

Nos tecidos do músculo branco e coração, a atividade da enzima MDH não diferiu entre as condições de oxigênio e temperaturas ($p > 0,05$) (Figura 3 B e C respectivamente). No entanto, sua atividade no fígado apresentou uma redução significativa em hipóxia ($p < 0,05$), mas sem diferença entre as temperaturas (Figura 3 A).



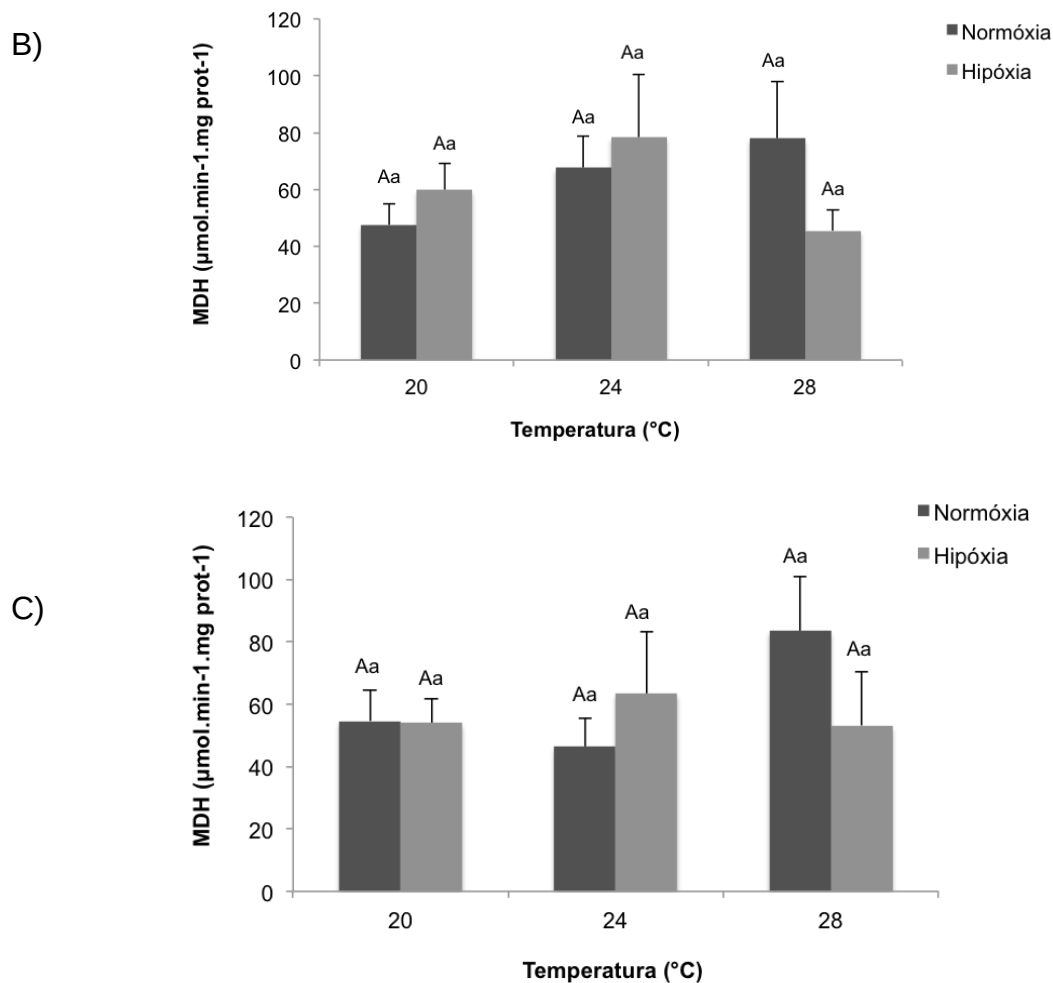


Figura 3. Atividade da enzima Malato Desidrogenase (MDH) nos tecidos do fígado (A), músculo branco (B) e coração (C) de exemplares de *G. brasiliensis* expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$.

A atividade da enzima LDH não apresentou diferença significativa entre as condições de oxigênio e temperaturas nos tecidos do fígado e coração ($p > 0,05$) (Figura 4 A e C respectivamente). No músculo, entretanto, houve uma diferença significativa da atividade dessa enzima à 28°C, onde a condição de normóxia apresentou uma maior atividade em relação à hipóxia ($p < 0,05$) (Figura 4 B).

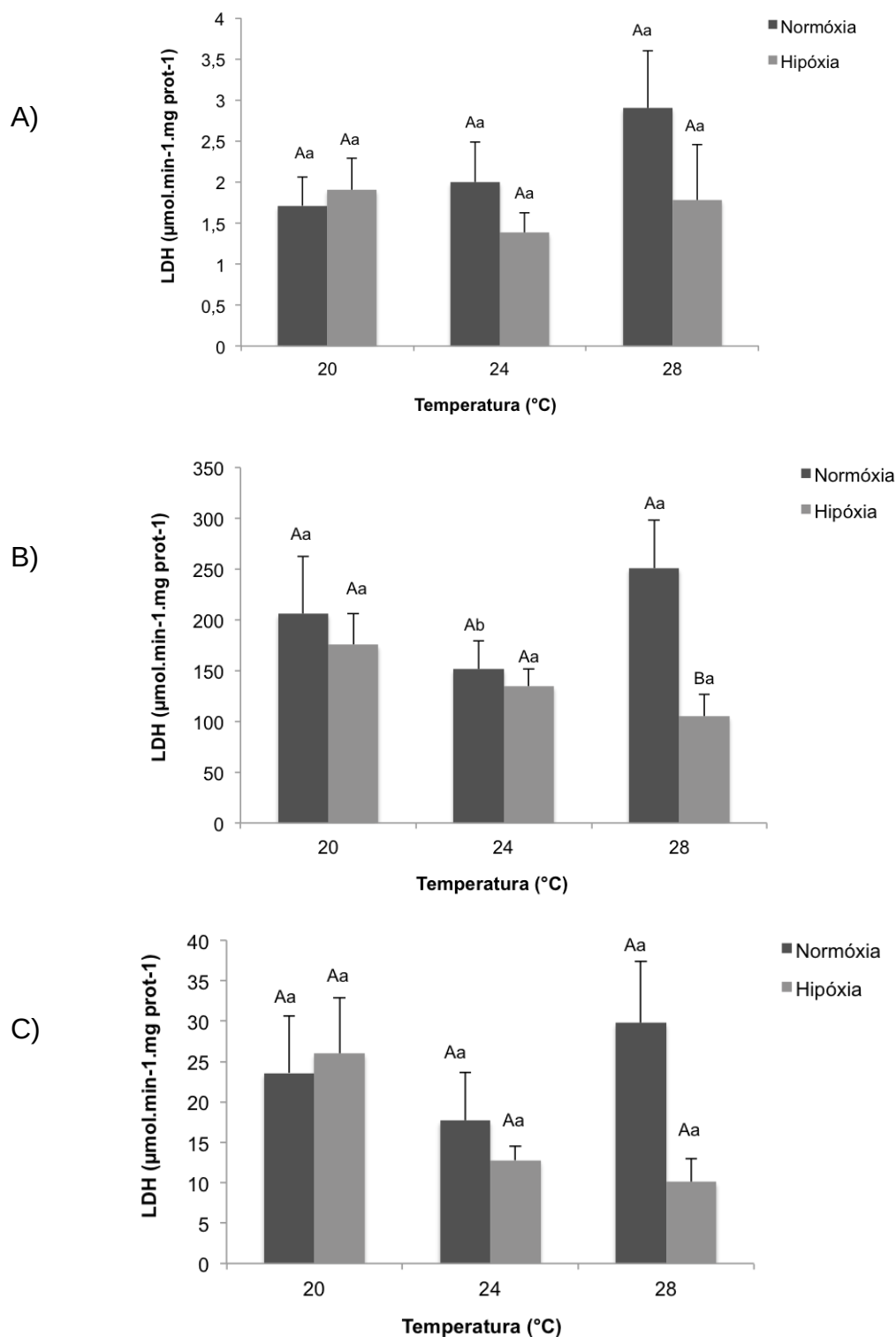


Figura 4. Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) nos tecidos fígado (A), músculo branco (B) e coração (C) de exemplares de *G. brasiliensis* expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$.

A atividade da enzima CS não foi diferente entre os tratamentos nos tecidos do fígado e músculo ($p > 0,05$) (Figura 5 A e B respectivamente). Já no coração, houve um aumento significativo da atividade nas temperaturas 28°C e 24°C em normóxia ($p < 0,05$) (Figura 5 C).

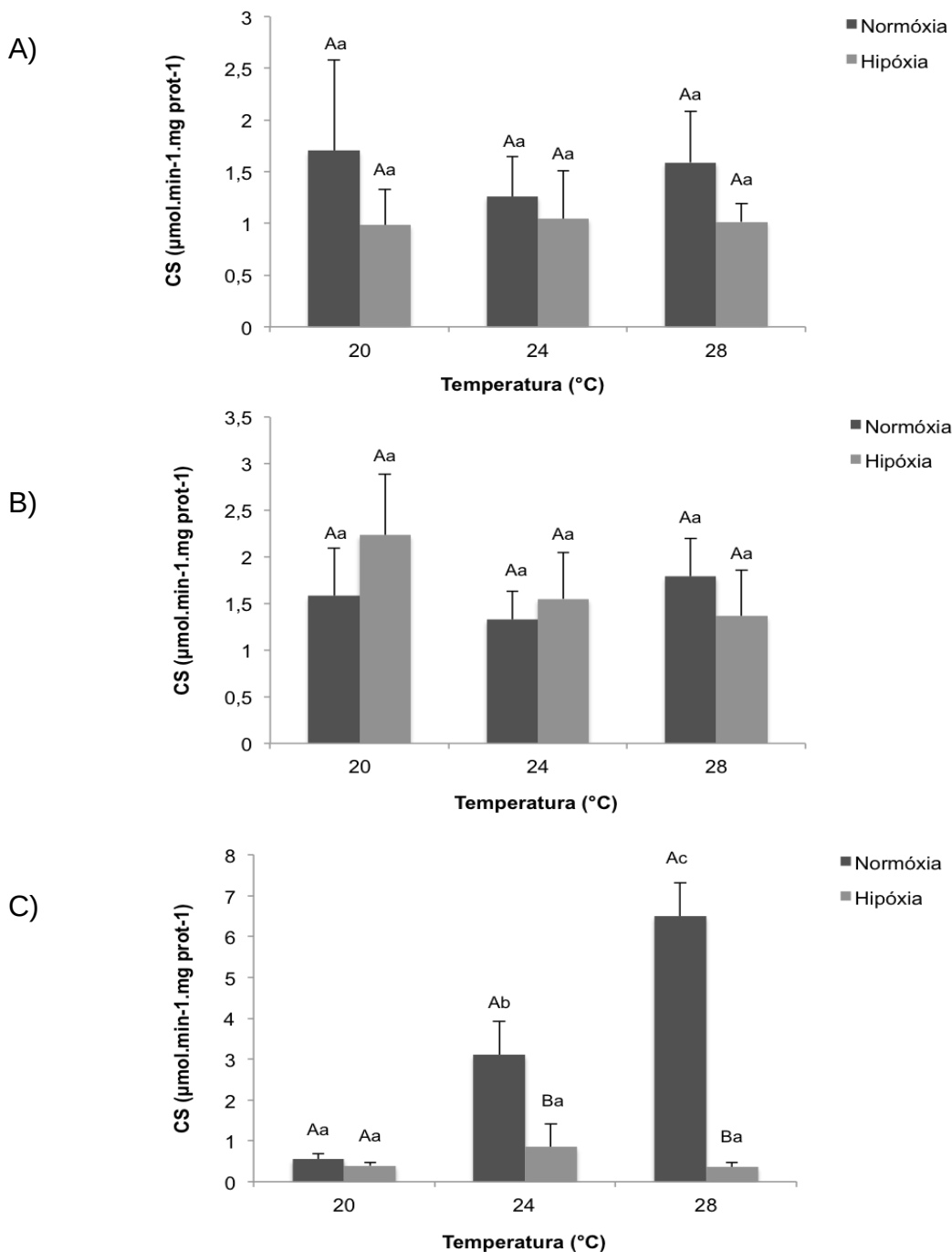


Figura 5. Atividade da enzima Citrato Sintase (CS) nos tecidos do músculo branco (A), coração (B) e fígado (C) de exemplares de *G. brasiliensis* expostos às condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) por 8 horas nas temperaturas 20°C, 24°C e 28°C. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras

minúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$.

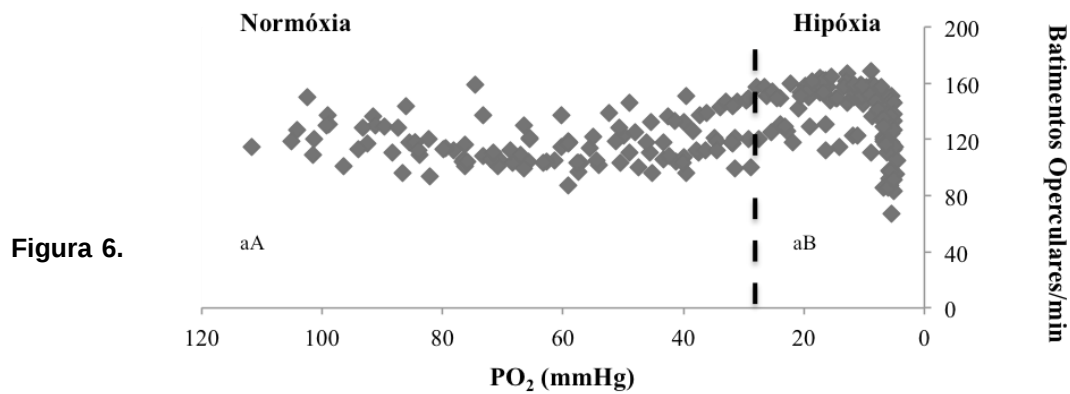
6.2 Experimento II

Os valores do tempo de duração dos experimentos e a concentração para a perda de equilíbrio, estão apresentados na tabela 2. O tempo de duração dos experimentos foi reduzido em função do aumento da temperatura, sendo os tratamentos à 24°C e 28°C significativamente menores do que à 20°C. A concentração na qual houve a perda de equilíbrio dos indivíduos, foi significativamente menor no tratamento de 20°C, não apresentando diferença significativa entre as demais temperaturas.

Tabela 2. Valores do tempo de duração dos experimentos e da concentração de O₂ em que houve a perda de equilíbrio (PDE) de exemplares *G. brasiliensis* expostos às temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa do mesmo tratamento entre as temperaturas estudadas, $p < 0,05$. Os valores estão apresentados em suas respectivas médias $\pm$ erro padrão.

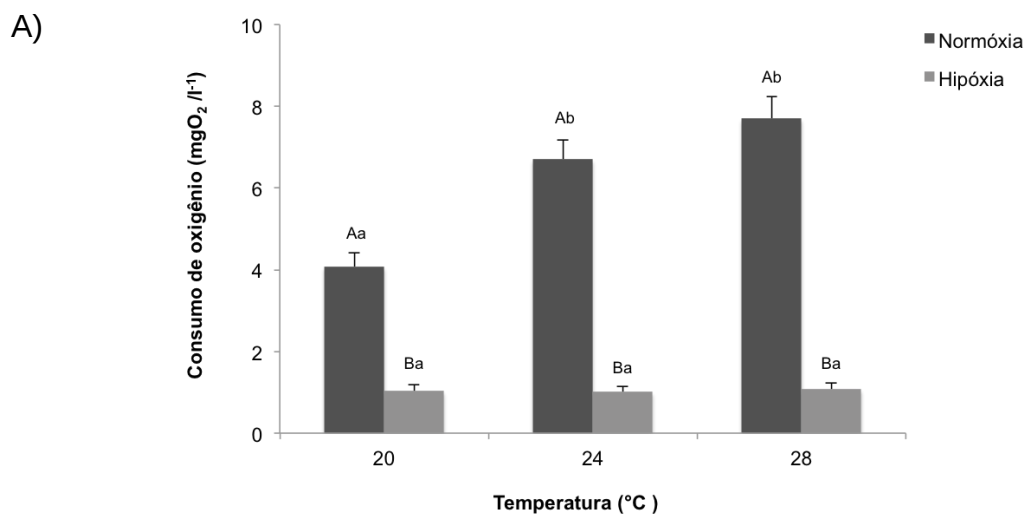
Temperatura (°C)	Tempo (min)	PDE (mmHg)
20	557 $\pm$ 41,30 ^a	5,23 $\pm$ 0,17 ^a
24	426,3 $\pm$ 27,30 ^b	7,41 $\pm$ 0,47 ^b
28	364,5 $\pm$ 27,22 ^b	6,12 $\pm$ 0,50 ^b

O consumo de oxigênio dos indivíduos quando em normóxia, foi diretamente correlacionado com o aumento da temperatura (figura 6). Em condição de hipóxia, os mesmos reduziram significativamente seu consumo, entretanto não houve diferença significativa entre as temperaturas nessa condição.



Consumo de oxigênio de *G. brasiliensis* nas condições de normóxia (~100mmHg) e hipóxia (~30mmHg) expostos às temperaturas de 20°C, 24°C e 28°C. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa para o mesmo tratamento nas temperaturas estudadas, $p < 0,05$.

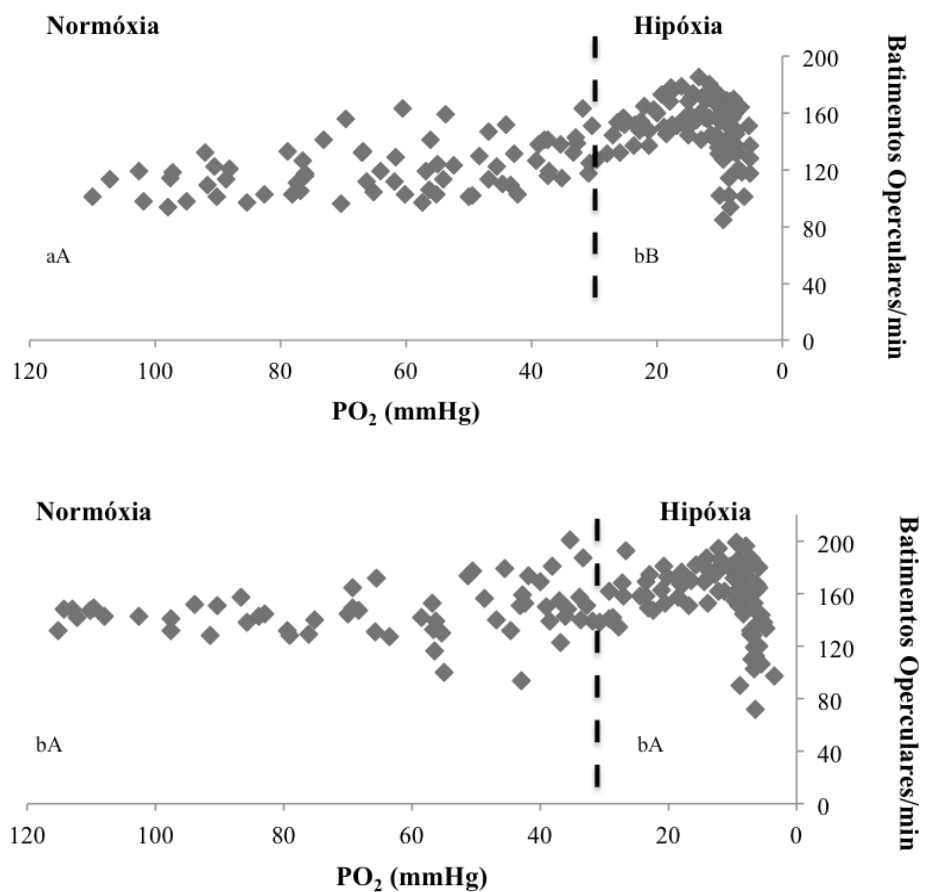
Os batimentos operculares aumentaram quando os animais foram expostos a um cenário de crítico de oxigênio (~15 mmHg), seguindo de um rápido decaimento (figura 7). O mesmo padrão foi observado para todas as temperaturas, no entanto, se mostrou mais expressivo à 28°C.



B)

C)

Figura 7.



Batementos operculares/min de *G. brasiliensis* em função da pressão de O₂ nas temperaturas de 20°C (A), 24°C (B) e 28°C (C). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os tratamentos de uma mesma temperatura, $p < 0,05$. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa do mesmo tratamento entre as temperaturas estudadas, $p < 0,05$.

O padrão de consumo de oxigênio dos exemplares de *G. Brasiliensis* (figuras 8 A, B, C) apresentou uma depleção mais acelerada do oxigênio nas temperaturas de 24°C e 28°C. Os indivíduos reduziram substancialmente o consumo a medida em que o oxigênio se tornou escasso e, em temperaturas maiores, resistiram por menos tempo à essa condição (20°C ± 360 min (6h), 24°C ± 240 min (4h), 28°C ± 180 min (3h)).

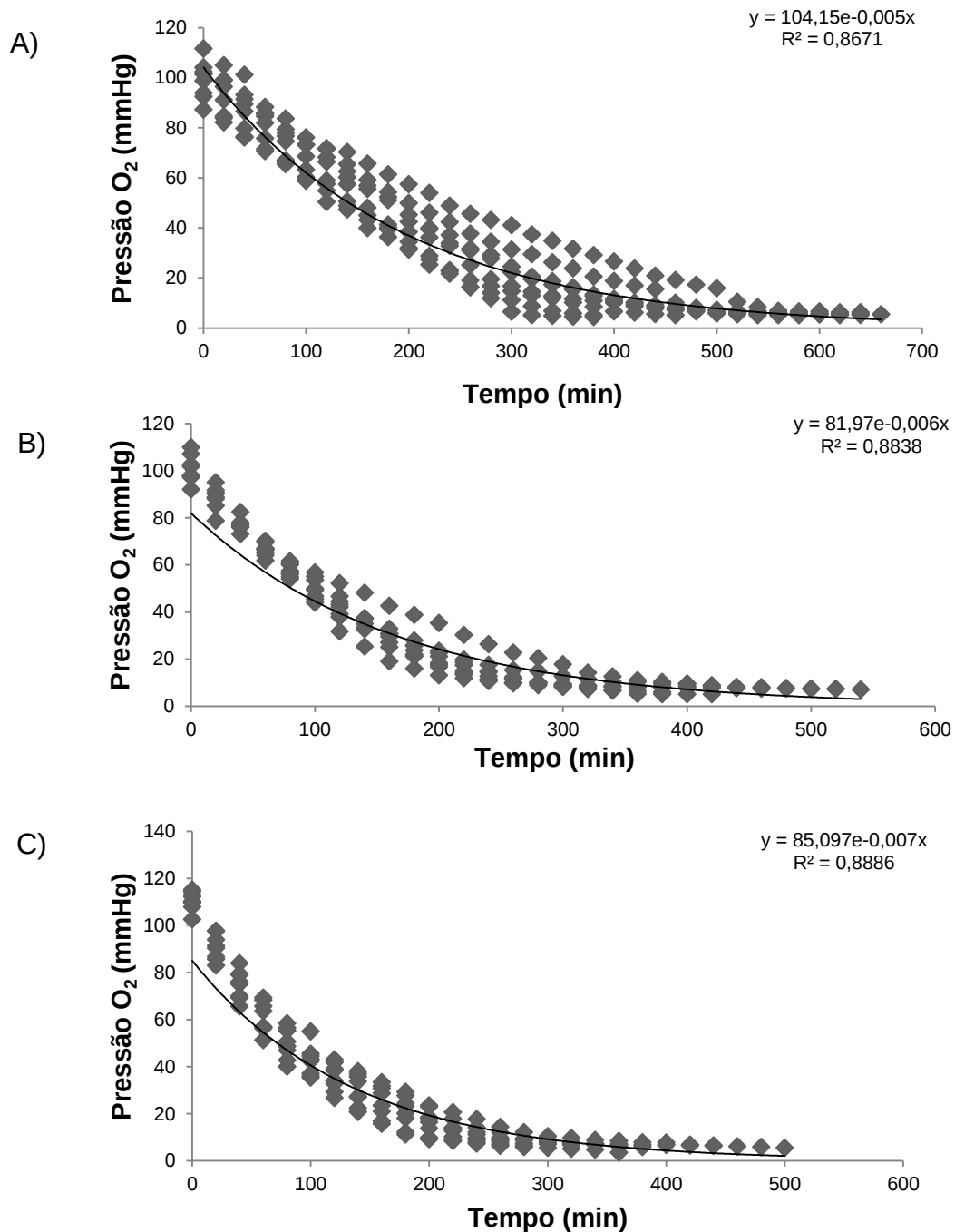


Figura 8. Valores da pressão de O₂ ao longo do tempo de duração dos experimentos com *G. brasiliensis* nas temperaturas de 20°C (A), 24°C (B) e 28°C (C).

7.DISSCUSSÃO

A baixa disponibilidade de oxigênio na água é um dos fatores que mais limita a ictiofauna e, requer ajustes em todos os níveis da organização biológica (Val, 2000).

Os ciclídeos neotropicais são exemplos da variação de tolerância interespecífica. O ciclídeo amazônico *Astronotus ocellatus* (acará-açu) é bastante conhecido por sua extrema habilidade em sobreviver em ambientes hipóxicos, podendo resistir por até 50 horas em níveis de saturação entre 5-20%, e até 6 horas na total ausência de oxigênio à uma temperatura de 28°C (Muusze et al., 1998). Em contrapartida, o ciclídeo também amazônico *Satanoperca jurupari* (jurupari), é pouco tolerante à hipóxia, resistindo menos que 20 minutos nessa condição (Chippari-Gomes et al., 2005).

7.1 Experimento I

Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos de peixes tem sido frequentemente utilizados como indicadores de estresses causados por condições ambientais. Ajustes no aumento da captação de oxigênio estão entre as mais importantes estratégias realizadas pelos peixes como forma de otimizar sua resistência em ambientes que sofrem oscilações dessa variável física (Ziskowski et al., 2008).

Os indivíduos quando expostos à hipóxia, apresentaram um aumento significativo da glicose plasmática nas temperaturas de 20°C e 24°C (tabela 1), demonstrando a importância desse metabólito no suprimento energético do organismo em situações de falta de oxigênio. No entanto, à 28°C, não houve diferença em sua concentração em função da disposição de oxigênio. Considerando que a reserva de glicogênio hepático foi mobilizada na condição de hipóxia à 28°C (figura 2), sugere-se que, a concentração quase inalterada da glicose nessa condição, se deve pela mobilização desse estoque energético, que é uma fonte essencial de energia capaz de produzir ATP na carência de oxigênio. Confirmando essa sugestão, Hochachka e Somero (1984), afirmam que quando as reservas de glicogênio do fígado são utilizadas durante um período de hipóxia, a redução da glicose é evitada. Comparando o efeito da hipóxia entre duas espécies de

elasmobrânquios, *Hemiscyllium ocellatum* e *Aptychotrema rostrata*, Speers-Roesch et al. (2012) não encontraram diferença significativa nas concentrações de glicose plasmática entre as condições de oxigênio em ambas as espécies, no entanto, houve também uma depleção da concentração de glicogênio nessa condição, corroborando também com os dados aqui obtidos.

No presente estudo, a concentração de hemoglobina aumentou significativamente em condição de hipóxia somente na temperatura de 24°C (tabela 1). Alguns teleósteos resistentes à hipóxia, não apresentam um aumento da concentração de hemoglobina e, até mesmo sua diminuição pode ocorrer quando expostos a baixas tensões de oxigênio. Essa redução é atribuída pela supressão da taxa metabólica refletindo a redução da oferta de oxigênio no ambiente, o que permite as espécies uma maior tolerância nessa condição (Speers-Roesch et al., 2010), principalmente em altas temperaturas onde a afinidade com O₂ é reduzida. À 28°C e baixa disponibilidade de oxigênio, os organismos se encontraram em uma situação bastante crítica devido a alteração desses dois importantes fatores físicos. Sabe-se que ao enfrentar situações ambientais desfavoráveis, a demanda energética do organismo é elevada em função dos mecanismos desenvolvidos para manter suas funções vitais. Devido a isso, é esperado que nessa condição, os indivíduos utilizem a supressão metabólica como forma de economizar energia, o que não ocorreu à temperatura de 24°C, indicando que esse pode ser um cenário onde o ajuste desse parâmetro ainda é factível.

A concentração de lactato não diferiu entre as temperaturas e condições de oxigênio. O acúmulo de lactato normalmente é uma resposta à hipóxia e um indício da utilização do metabolismo anaeróbico, já que esse é o produto final dessa via metabólica. No entanto, o lactato é rapidamente produzido e utilizado pelo organismo, e esse “turnover” é induzido pela hipóxia (Dunn e Hochachka, 1987). Assim, a ausência do acúmulo de lactato no sangue, não necessariamente indica que esse não foi produzido em um período de privação de oxigênio mas, pode sim, sugerir a realização de um importante ajuste metabólico para impedir o acúmulo de lactato na circulação (acidose) (Omlin e Weber, 2010). Indicando o efeito negativo da acidose metabólica, sua associação com a perda de equilíbrio (PDE) já foi evidenciada em peixes durante à hipóxia (DiAngelo e Heath, 1987; Van Raaij et al., 1994) e, a habilidade em reduzir a acidose pela diminuição da demanda energética

através da supressão metabólica já foi observada em espécies mais tolerantes (Jackson, 2004).

O conceito "oxigênio e capacidade limitada de tolerância térmica" (OCLTT) sugere que a diferença entre a demanda e a disponibilidade de oxigênio é um fator crítico que reflete a habilidade do animal em lidar com mudanças na temperatura e, propõe uma relação entre temperatura e oxigênio como fatores estressores que interagem em uma escala de tempo aguda e crônica (Portner e Peck, 2010). Esse conceito pode ser aplicado aos dados aqui obtidos, onde foi claramente notada a influência do efeito sinérgico de temperatura e hipóxia nos ajustes sanguíneos e metabólicos apresentados pelos organismos.

Glicogênio

O glicogênio é a principal reserva energética dos peixes. Em condições normais de oxigênio, quando a demanda energética é menor, o carboidrato é estocado em forma de glicogênio principalmente no fígado. Em situações de hipóxia e, conseqüentemente, uma maior exigência energética, o glicogênio é rapidamente utilizado para o abastecimento do metabolismo anaeróbico, reduzindo então sua concentração nos tecidos (Chippari-Gomes et al., 2005).

No presente estudo, os níveis de glicogênio do músculo branco não diferiram entre as temperaturas e concentrações de oxigênio. Entretanto, sua concentração no fígado, foi significativamente reduzida em situação de hipóxia a 24°C e 28°C, indicando sua utilização nesse tecido como uma importante fonte energética durante o período de baixa concentração de oxigênio e temperatura elevada, o que corrobora com os resultados obtidos por Omlin e Weber (2010).

Uma maior reserva e uma utilização mais lenta do estoque de glicogênio é associada com a tolerância de peixes à hipóxia (Vornanem et al., 2009). Em condição normal de oxigênio, os indivíduos apresentaram um grande estoque de glicogênio nas temperaturas de 24°C e 28°C, no entanto, à 28°C, a sua depleção foi maior quando em hipóxia, indicando assim, influência do efeito combinado de temperatura e oxigênio.

Os grandes determinantes da sobrevivência de peixes em hipóxia são a supressão metabólica, um grande estoque de glicogênio nos tecidos e, a habilidade de evitar a acidose (Lutz e Nilsson, 1997).

Análises Enzimáticas

A regulação metabólica é um importante mecanismo de tolerância em situações de maior demanda energética, como a ausência de oxigênio e o aumento da temperatura, sendo um fator determinante na distribuição geográfica de animais ectotérmicos.

A enzima MDH apresentou uma redução significativa em sua atividade no fígado quando em condição de hipóxia em todas as temperaturas estudadas. Essa redução indica a capacidade de supressão metabólica desse órgão como forma de poupar energia com sua manutenção e assim destiná-la para órgãos de maior exigência energética, como o coração. Além disso, por essa ser uma enzima que participa da produção de glicose (gliconeogênese) e o fígado ser um órgão extremamente importante na realização desse processo, a redução da MDH nesse tecido pode estar indicando a redução de armazenamento de glicogênio, o que corrobora com a redução de sua reserva sob influência da hipóxia observada nesse estudo (Figura 2).

A LDH é uma das mais importantes enzimas na ativação do metabolismo anaeróbico. Ela converte piruvato em lactato com a função de produzir ATP em períodos de escassez de oxigênio, indicando assim, através de sua presença nos tecidos, a capacidade do organismo em utilizar essa via glicolítica (Chippari-Gomes et al., 2005).

A enzima LDH apresentou um aumento significativo em sua atividade no músculo branco à 28°C em normóxia. Em temperaturas mais elevadas, a produção de ATP por vias aeróbicas é reduzida, ainda que em condições normais de oxigênio, o que é reflexo de um maior custo energético para a sustentação da homeostase, exigindo a utilização do metabolismo anaeróbico (Portner, 2004). Dessa forma, a grande fonte energética do músculo branco de *G. brasiliensis*, observada pelo esperado aumento da atividade da LDH já que esse é um tecido essencialmente anaeróbico, indica uma capacidade adaptativa da espécie de sobreviver em temperaturas mais elevadas, além de mostrar o importante papel da enzima LDH na sustentação energética durante períodos em que a energia é mais exigida (Hochachka e Somero, 2002). A atividade dessa enzima apresentou uma redução nessa mesma temperatura em condição de hipóxia. A capacidade desse tecido em manter sua função em condições hipóxicas através da utilização do metabolismo

anaeróbico, ainda que essa via glicolítica esteja reduzida, já foi observada em estudos anteriores (Almeida-Val et al., 1999).

A citrato sintase (CS) é uma enzima catalisadora da primeira etapa do ciclo de Krebs e serve como indicadora do metabolismo aeróbico. Comumente, é observada uma redução de sua atividade em tecidos de peixes expostos à hipóxia (Cooper et al., 2002).

No coração, a atividade da enzima CS apresentou valores bastante superiores em condições normais de oxigênio nas temperaturas de 24°C e especialmente 28°C. O aumento da atividade dessa enzima oxidativa indica a extrema dependência do metabolismo aeróbico deste tecido. Em contrapartida, sob influência da hipóxia, os valores se apresentaram significativamente reduzidos, o que sugere a realização da supressão metabólica como uma opção mais vantajosa em relação à ativação do metabolismo anaeróbico em períodos de baixa disponibilidade de oxigênio.

7.2 *Experimento II*

O aumento da temperatura em função das mudanças climáticas irá contribuir para o aumento da frequência e severidade da hipóxia nos ambientes aquáticos (Diaz e Breitburg, 2009). Independente da espécie ou história de vida, temperaturas mais elevadas resultam em um maior consumo de oxigênio dos peixes, como reflexo do aumento da demanda metabólica desses animais (Clark et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente estudo, confirmam a influência da temperatura no consumo dos animais, onde, o mesmo se apresentou maior e mais acelerado em indivíduos expostos às temperaturas de 24°C e 28°C quando em condições normais de oxigênio, indicando o aumento da taxa metabólica dos indivíduos nessas condições termiais.

A taxa metabólica basal tende a aumentar exponencialmente com o aumento da temperatura e, ao atingir seu maior valor, indica a capacidade máxima do organismo em abastecer os tecidos com oxigênio e de utilizar vias aeróbicas que são mais dispendiosas (Schulte et al., 2011). Assim, a supressão metabólica pode vir a ocorrer, ou vias anaeróbicas do metabolismo energético podem ser ativadas afim de manter as funções vitais do organismo (Portner e Peck, 2010).

A redução expressiva do consumo de oxigênio de *G. brasiliensis* em condição de hipóxia (figura 3), sugere a realização de supressão metabólica. A habilidade em realizar esse ajuste já foi observado em ciclídeos amazônicos. O acará-açu (*Astronotus ocellatus*), espécie conhecida por sua extraordinária resistência à hipóxia, é capaz de reduzir seu consumo para apenas 14% da taxa em condição de normóxia, quando exposto a uma pressão de 10mmHg (Scott et al., 2008).

A base desse padrão veio de antigas descobertas de Fry (1947) que observou que, enquanto a taxa metabólica aumentava exponencialmente com a temperatura, a taxa máxima metabólica depois de um primeiro aumento exponencial, se estabilizava e então começava a declinar.

Em hipóxia, os indivíduos apresentaram um tempo de resistência reduzido nas temperaturas mais elevadas, indicando uma diminuição da tolerância em função dessa variável, o que pode ser explicado pela maior exigência energética em altas temperaturas. À uma baixa pressão de oxigênio, a sobrevivência do animal depende da manutenção do balanço energético celular em decorrência da redução da oferta de energia aeróbica. Isso pode ser possível através do aumento da produção energética independente da disposição de O₂ na água (glicólise anaeróbica), e também com uma grande e reversível redução da taxa metabólica, diminuindo assim, a demanda energética celular (Richards, 2009).

No entanto, ainda que o organismo consiga manter seu balanço energético durante a hipóxia, o seu tempo de resistência nessa condição pode ser limitado pela disponibilidade da reserva de glicogênio e também pela acidose metabólica, causada pelo acúmulo de lactato nos tecidos na glicólise anaeróbica (Richards, 2009). Assim, a queda da concentração de glicogênio em hipóxia à 28°C, contribuiu para a redução do tempo de resistência dos indivíduos nessa condição.

Um estudo anterior com Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), indicou que a concentração de oxigênio considerada crítica para um organismo, se mostra menos sensível à temperatura em relação ao consumo de oxigênio de rotina (MO₂) (Mamun et al., 2013). Esse padrão pôde ser observado no presente estudo onde, apesar de ter o seu consumo mais elevado e a depleção do oxigênio ter ocorrido em um menor espaço de tempo nas temperaturas de 24°C e 28°C quando em condição de normóxia, o consumo dos indivíduos quando em hipóxia, não diferiu entre as temperaturas (figura 3).

Os indivíduos estudados apresentaram um aumento dos batimentos operculares quando a disposição do oxigênio se tornou extremamente baixa (~15mmHg) e, por não conseguirem manter sua frequência acelerada devido a contínua depleção do oxigênio, essa foi sucessivamente reduzida a valores bastante inferiores. Resultados semelhantes foram vistos por Butler et al., (2007) que, investigaram a relação entre a frequência da ventilação branquial e a disponibilidade de oxigênio com exemplares de Barramundi (*Lates calcarifer*) a uma temperatura de 28°C. A espécie mostrou um aumento na taxa de ventilação à uma tensão de oxigênio de aproximadamente 25mmHg seguido de uma queda acentuada a medida em que o oxigênio continuava a diminuir. A espécie amazônica *Astronotus ocellatus* também apresenta um aumento da frequência ventilatória quando exposta a tensões de ≤ 40 mmHg e, a 20mmHg, podendo elevar em até quatro vezes o número de batimentos em relação à normóxia. Entretanto, a 10mmHg, sua taxa passa a ter um declínio (Scott et al., 2008). Esses resultados sugerem que o aumento da frequência ventilatória é um mecanismo bastante utilizado por peixes quando expostos a períodos de hipóxia afim de manter a regulação do oxigênio.

A perda de equilíbrio de um indivíduo (PDE) é definida como a incapacidade do animal em manter sua orientação corporal (Fu et al., 2014) e, a concentração de oxigênio na qual ela ocorre é, frequentemente usada como indicadora de tolerância à hipóxia (Mandic et al., 2013). A concentração de oxigênio na qual ocorreu a perda de equilíbrio dos animais, foi maior nas temperaturas de 24°C e 28°C. Esse resultado corrobora com o fato de que, em temperaturas mais elevadas, a tolerância do organismo à hipóxia é reduzida como consequência do maior gasto energético exigido pela aceleração da taxa metabólica.

Respostas comportamentais como respiração na superfície da água (ASR), podem auxiliar na sobrevivência do animal em condições críticas de oxigênio, entretanto, essa resposta pode ser inibida em função do risco de predação (Sloman et al., 2008). Esse comportamento pôde ser observado nos exemplares de *G. brasiliensis*, onde os indivíduos recorreram à superfície da água na busca por oxigênio a medida em que a disposição desse gás se tornava escassa.

8. CONCLUSÕES

A espécie *Geophagus brasiliensis* se mostrou tolerante sob influencia da hipóxia, apresentando a realização da supressão metabólica como principal estratégia de otimização de sua resistência na ausência de oxigênio. A utilização do metabolismo anaeróbico também é um ajuste desenvolvido pela espécie como consequência da mobilização de suas reservas energéticas.

O efeito sinérgico dos fatores alta temperatura e baixa disponibilidade de oxigênio influenciam os mecanismos de respostas apresentados pela espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Val, V.M.F., Paula-Silva, M.N., Duncan, W.P., Lopes, N.P., Val, A.L., Land, S., 1999. Increase of anaerobic potential during growth of an Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. Survivorship and LDH regularion after hypoxia exposure. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), Biology of tropical fishes. INPA, Manaus, 437-448.

Boutilier, R.G., Heming, T.A., Iwama, G.K. 1984. Physico-chemical parameters for use in fish respiratory physiology. In Fish Physiology. Ed. Hoar and Randall. New York: Academic Press. pp. 401-430.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-254.

Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., West, T.L., 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. Jornal of Experimental Marine Biology and Ecology, 279: 1-20.

Diaz, R.J., Rosenberg, R., 2008. Spreading dead zone and consequences for marine ecosystems. Science 321: 926–929

Doney, S.C., Ruckleshaus, M., Duffy, J.E., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, A.B., Knowlton, N. 2012. Climate change impacts on marine ecosystems. Ann. Rev. Mar. Sci, 4:11-37.

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.

Duboie, M.G., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, P.A., Smith, F. 1956. Colorometric method for determination of sugars and related substances. Anal.

Chem., 28: 350-358.

Ficke, A.D., Myrick, C.A., Hansen, L.J. 2007. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 17: 581-613.

Fitzgibbon, Q.P., Strawbridge, A., Seymour, R.S. 2007. Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mullet, *Argyrosomus japonicus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture*, 270: 358-368.

Hochachka, P.W., Somero, G.N., 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton University Press, New Jersey, 537p.

Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, New York.

Kordas, R.L., Harley, Ch.D.V., O'Connor, M.I., 2011. Community ecology in a warming world: The influence of temperature on interspecific interactions in marine systems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 400: 218-226.

Mandic, M., Sloman, K.A., Richards, J.G. 2009. Escaping to the surface: a phylogenetically independent analysis of hypoxia-induced respiratory behaviors in sculpins. *Physiol Biochem Zool.*, 82: 730–8.

Martinez, M., Landry, C., Boehm, R., Manning, S., Cheek, A.O., Rees, B.B. 2006. Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. *J. Exp. Biol.* 209: 3851-3861.

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.

Nickum, J.G., Bart, H.L., Bowser, P.R., Greer, I.E., Hubbs, C., Jenkins, J.A., Macmillan, J.R., Rachlin, J.W., Rose, J.D., Soresen, P.W., Tomasso, J.R., 2004.

Guidelines for the use of fishes in research. American Fisheries Society, Bethesda, MD.

Pollock, M.S., Clarke, L.M.J., Dube, M.G. 2007. The effects of hypoxia on fishes: from ecological relevance to physiological effects. *Environ. Rev.*, 15:1–14.

Portner, H.O., 2004. Climate variability and the energetic pathways of evolution: the origin of endothermy in mammals and birds. *Physiological and Biochemical Zoology*, 77: 959-981.

Stierhoff, K.L., Targett, T.E., Miller, K. 2006. Ecophysiological responses of juvenile summer and winter flounder to hypoxia: experimental and modeling analyses of effects on estuarine nursery quality. *Marine Ecology Progress Series*, 325: 255–266.

Stramma, L., Johnson, G.C., Sprintall, J., Mohrholz, V. 2008. Expanding oxygen-minimum zones in the tropical oceans. *Science*, 320: 655-658.

Timmerman, C.M., Chapman, C.A. 2004. Behavioral and physiological compensation for chronic hypoxia in the Sailfin Molly (*Peocilia latipinna*). *Physiol. Biochem. Zool.*, 77: 601-610.

Val, A.L., 2000. Organic phosphates in the red blood of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 125A, 417-435.

Zhang, H., Ludsin, S.A., Mason, D.M., Adamack, A.T., Brandt, S.B., Zhang, X., Kimmel, D.G., Roman, M.R., Boicourt, W.C. 2009. Hypoxia-driven changes in the behavior and spatial distribution of pelagic fish and mesozooplankton in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 138 :80–9

ANEXO I

- Coleta de tecidos e órgãos

Os animais foram anestesiados com eugenol e tiveram o sangue coletado da veia caudal através de seringas adicionadas de EDTA para a realização das análises de glicose, lactato e hemoglobina. O material era transferido para tubos “eppendorf” e mantidos em gelo fundente. O plasma foi separado por centrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga (EPPENDORF - 5417R).

Após a coleta sanguínea, os animais foram sacrificados por secção cervical (Nickum et al., 2004), e tiveram retirados os tecidos do fígado, coração e músculo branco, também mantidos em gelo fundente. Parte do fígado e músculo foram pesados e transferidos para tubos de ensaio contendo 1mL de KOH (hidróxido de potássio) para as análises de glicogênio. O restante desses tecidos e o coração, foram imediatamente transferidos para freezer -80°C onde foram conservados até a realização das análises enzimáticas.

- Glicose plasmática

Os níveis de glicose plasmática foram determinados através do sistema enzimático colorimétrico Bioclin (K082-2) e expressos em mg/dL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro BioSpectro.

- Lactato plasmático

Os níveis de lactato plasmático foram determinados de acordo com o procedimento técnico da Katal (K11B) e os valores expressos em mmoles/L. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Molecular Device.

- Hemoglobina

A determinação de hemoglobina foi realizada com teste colorimétrico Bioclin (K023) e a leitura feita em espectrofotômetro BioSpectro.

- Glicogênio

A determinação da concentração de glicogênio hepático e do músculo branco foi realizada de acordo com Dubois et al., (1956) com modificações. A leitura foi feita em espectrofotômetro BioSpectro com um comprimento de onda de 480 nm, e sua concentração expressa em $\mu\text{mol g}^{-1}$.

- Preparação dos tecidos e obtenção dos extratos para a análise enzimática

Para a análise da enzima Citrato Sintase 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), e ajustado a um pH 7.4.

Nas análises das enzimas Lactato Desidrogenase e Malato Desidrogenase, foram utilizados o tampão Imidazol 150mM, contendo 1mM de EDTA e 1% de triton X-100, e ajustado a um pH 7,4.

Foram analisados os tecidos do músculo branco, fígado e coração. Esses foram homogeneizados manualmente, sempre preservados em gelo fundente. A diluição utilizada para o homogenado foi de 1:3 para fígado e músculo, e de 1:9 para coração. Eles foram posteriormente centrifugados durante 15 minutos a 13.000g em centrífuga (EPPENDORF 5417R) 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 em espectrofotômetro Molecular Device, de acordo com as técnicas revistas por Driedzic e Almeida-Val (1996) com modificações. Foram seguidos os seguintes protocolos:

1. MDH e LDH – 0,15 mM de NADH, 1mM de KCN em 50 mM de imidazol, pH 7,4. As reações da enzima LDH foram iniciadas com a adição de 1mM de ácido pirúvico, e da enzima MDH com a adição de 0,5 mM de ácido oxalacético.

2. CS – 0,25 mM DTNB, 75 mM Tris, pH 8,0. As reações foram iniciadas com a adição de 0,04 mM de Acetil coa e 0,5 mM de ácido oxalacético.

A determinação da atividade das enzimas PK, MDH e LDH foi feita com um comprimento de onda de 340 nm, e da enzima CS com um comprimento de onda de 490 nm.

O cálculo utilizado para determinar a atividade das enzimas foi de acordo com a equação:

$$\mu\text{moles subs. min}^{-1}.\text{mg prot}^{-1} = \frac{(\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{fd (cubeta)} \times \text{fd (tampão)})}{6,22} / \text{Prot}$$

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

- Para a enzima CS o coeficiente de extinção molar do DTNB é 13,6

Prot = Proteína (mg)