

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

BEATRIZ ENÓLA RIBEIRO DA SILVA

EFEITO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS SOBRE O METABOLISMO
ENERGÉTICO, ANTIOXIDANTE E NEUROLÓGICO DO TAMBAQUI (CUVIER,
1818)

MANAUS – AM

2019

BEATRIZ ENÓLA RIBEIRO DA SILVA

EFEITO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS SOBRE O METABOLISMO
ENERGÉTICO, ANTIOXIDANTE E NEUROLÓGICO DO TAMBAQUI (CUVIER,
1818)

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do curso
de Licenciatura em Ciências Biológicas
da Universidade do Estado do
Amazonas – UEA.

Orientadora: Dra. Rosilene Gomes da
Silva Ferreira

Coorientadora: Dra. Vera Maria Fonseca
de Almeida e Val

MANAUS – AM

2019

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

B369e	Silva, Beatriz Enóla Ribeiro da
	Efeito das mudanças climáticas sobre o metabolismo energético, antioxidante e neurológico do tabaqui (CUVIER, 1818) / Beatriz Enóla Ribeiro da Silva. Manaus : [s.n], 2019.
	55 f.: color.; 29 cm.
	TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.
	Inclui bibliografia
	Orientador: Rosilene Gomes da Silva Ferreira
	Coorientador: Vera Maria Fonseca de Almeida e Val
	1. Adaptação térmica. 2. tabaqui. 3. hipóxia. 4. estresse oxidativo. I. Rosilene Gomes da Silva Ferreira (Orient.). II. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Efeito das mudanças climáticas sobre o metabolismo energético, antioxidante e neurológico do tabaqui (CUVIER, 1818)

Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463



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

RELATÓRIO DE AVALIAÇÃO FINAL DO TCC IV (NOTA DA AP1)

ALUNO: <u>BRATIZ ÉNOLA RIBEIRO DA SILVA</u>
TÍTULO DO TCC: <u>EFEITO DAS MUDANÇAS CLIMÁTICAS SOBRE O METABOLISMO ENERGÉTICO, ANTIOXIDANTE E NEUROLÓGICO DO TAMBAQUI (CUIVIER, 1818).</u>

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador: <u>ROSILENE GOMES DA SILVA FERREIRA</u>	<u>9,8</u>
b) 1º avaliador(a): <u>DEREK FELIPE CAMPOS</u>	<u>8,6</u>
c) 2º avaliador(a): <u>SUSANA BRAZ MOTA</u>	<u>9,0</u>
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	<u>9,1</u>

MÉDIA DA NOTA: 9,1

Manaus, 13 de novembro de 2019

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

Orientador(a)

1º Avaliador(a)

2º Avaliador(a)

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar comigo em todos os momentos, por todo seu cuidado e proteção, por me dar forças e por tranquilizar meu coração nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Letícia e Wando, por todo amor, carinho, dedicação e conselhos, por sempre estarem ao meu lado e me incentivarem. Mesmo com todas as dificuldades, por nunca terem desistido de mim, e sempre estarem comigo, ajudando e apoiando em minhas escolhas.

Ao meu irmão, Wando Filho, por me entender e estar ao meu lado sempre que preciso, por se preocupar comigo, por todo carinho e paciência.

A minha orientadora, querida Dra. Rosilene Gomes Ferreira da Silva, por ter aceitado entrar nessa jornada comigo, pela oportunidade e por todos os ensinamentos.

A minha coorientadora, querida Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida Val, por ter me recebido praticamente desde o início da graduação no laboratório, por todos os ensinamentos, correções, conselhos, por ter acreditado em mim e neste trabalho.

A Dra. Fernanda Garcia Dragan, que foi a primeira pessoa a me instruir no mundo científico, eternamente grata por todos os ensinamentos e correções, e por ter me ajudado no início deste trabalho.

Ao Dr. Derek Campos, por ter aceitado contribuir com este trabalho, por todos os ensinamentos, sugestões e correções, e por sempre estar disposto a me ajudar e tirar dúvidas.

À Msc. Nazaré Paula, que sempre se dispôs a ajudar nos experimentos, coletas e correções.

A Susana, Júlia e Yasmim, por toda ajuda e apoio, por todas as conversas, risadas e por sempre torcerem por mim.

Aos meus queridos, Karoline, Victor, Maitê, Ruan e Catarina, por sempre estarem ao meu lado ao longo desses cinco anos, por toda amizade, compreensão e paciência, por me aceitarem do jeitinho que eu sou. Por serem meus incentivadores e por poder compartilhar momentos de alegria e tristezas, por entenderem os meus momentos de ausência e, mesmo assim, permanecerem ao meu lado.

Aos amigos que fiz ao longo da graduação e que sempre me ajudaram, Julliane, João Monteiro, Adriane, Vanessa e Glória. Por todos os momentos de alegria e por todos os obstáculos que vencemos ao longo desses cinco anos.

À querida Dona Ray, Claudia e dona Valzinha por todo apoio.

À equipe LEEM, por toda ajuda quando se fez necessária.

A todos os professores do Curso de Ciências Biológicas da UEA, pelos ensinamentos.

E por todas as pessoas que participaram dessa minha jornada e contribuíram de alguma forma para este trabalho.

Muito Obrigada.

"... *E só a fé nos faz chegar lá...*"

Harper Lee

RESUMO

As mudanças climáticas se tornaram um dos assuntos mais discutidos mundialmente. De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) (IPCC, 2014), está previsto um aumento de até 6 °C na atmosfera para o ano de 2100. Tais mudanças afetam diretamente o ambiente aquático amazônico e seus organismos, e se pode destacar dentre elas as alterações no pH, temperatura e oxigênio, além de acarretarem em danos aos organismos impondo ajustes comportamentais, bioquímicos e morfológicos. Entre esses organismos, está o tambaqui (*Colossoma macropomum*), uma espécie de alto valor comercial para a região e que possui diversas adaptações para enfrentar períodos de variações na temperatura e sazonalidade de oxigênio. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar como o efeito dos cenários climáticos e exposição à hipóxia interferem no metabolismo energético, antioxidante e neurológico de indivíduos da espécie. Para isso, os animais foram aclimatados por 30 dias nos cenários RCP2.6 e RCP8.5 (4,5 °C e 900 ppm de CO₂) (N=42) e submetidos subsequentemente à hipóxia por 6 horas (n=7); após isso, foram realizadas coletas de sangue para análises hematológicas, e tecidos como fígado, cérebro, músculo e coração para análises enzimáticas e danos. As variáveis do consumo de oxigênio nos mostram que a espécie tenta manter o desempenho de consumo quando mantidos no cenário extremo em normóxia e hipóxia. Para os parâmetros sanguíneos, a concentração de hemoglobina ([Hb]), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram elevadas ($p < 0,001$), indicando que os animais aumentam a hemoglobina circulante para tentar suprir melhor a demanda de oxigênio tecidual. Foi observada a elevação das concentrações de glicose quando em hipóxia para os dois cenários ($p < 0,001$), que é utilizada pelas vias alternativas. As análises enzimáticas catalase (CAT) e glutathione-S-transferase (GST) nos mostram que a espécie não apresenta respostas significativas para o cenário extremo nem para os danos em lipoperoxidação. Este é expresso para a cinética da LDH para o cenário extremo, e a AChE manteve-se quase inalterada para os dois cenários, havendo diferença somente no atual hipóxia ($p < 0,014$). Assim, os cenários extremos e condições de hipóxia podem condicionar estresse metabólico no animal interferindo nos ajustes necessários.

Palavras-chaves: Adaptação térmica; tambaqui; hipóxia; estresse oxidativo.

ABSTRACT

Climate change has become one of the most discussed issues worldwide. According to the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) (IPCC, 2014), an increase of up to 6 ° C in the atmosphere is predicted for the year 2100. These changes directly affect the Amazonian aquatic environment and its organisms. These include changes in pH, temperature and oxygen, as well as causing damage to organisms by imposing behavioral, biochemical and morphological adjustments. Among these organisms is tambaqui (*Colossoma macropomum*), a species of high commercial value for the region and that has several adaptations to face periods of variations in temperature and seasonality of oxygen. Thus, the objective of this work was to evaluate how the effect of climatic scenarios and exposure to hypoxia affect the energy, antioxidant and neurological metabolism of individuals of the species. For this, the animals were acclimated for 30 days in scenarios RCP2.6 and RCP8.5 (4.5 ° C and 900 ppm CO₂) (N = 42) and subsequently subjected to hypoxia for 6 hours (n = 7). After that, blood samples were collected for hematological analysis and tissues such as liver, brain, muscle and heart for enzymatic analysis and damage. The oxygen consumption variables show us that the species tries to maintain its consumption performance when kept in the extreme scenario in normoxia and hypoxia. For blood parameters, hemoglobin concentration ([Hb]), mean corpuscular hemoglobin (HCM) and mean corpuscular hemoglobin (CHCM) concentration were high (p <0.001), indicating that animals increase circulating hemoglobin to try to better supply tissue oxygen demand. Being observed the elevation of glucose concentrations when hypoxic for both scenarios (p <0.001) that is used by alternative pathways. The catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) enzymatic analyzes show us that the species does not present significant responses to the extreme scenario or lipoperoxidation damage. The same is expressed for LDH kinetics for the extreme scenario, and AChE remained almost unchanged for both scenarios, with a difference only in the current hypoxia (p <0.014). Thus, extreme scenarios and hypoxic conditions may condition metabolic stress in the animal interfering with the necessary adjustments.

Keywords: Thermal adaptation; tambaqui; hypoxia; oxidative stress.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Experimento com os animais submetidos aos cenários climáticos e hipóxia atual e extremo.....	25
Figura 2. MO ₂ do <i>C. macropomum</i> após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia.....	31
Figura 3. Níveis de glicose plasmática do <i>C. macropomum</i> após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia.....	35
Figura 4. Atividade enzimática da GST.....	38
Figura 5. Atividade enzimática da CAT.....	38
Figura 6. Danos ocasionados na lipoperoxidação.....	39
Figura 7. Cinética da LDH no coração (A) e músculo (B) do <i>C. macropomum</i> após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia.....	41
Figura 8. Atividade enzimática da AChE após exposição aos cenários.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso e comprimento dos animais expostos aos cenários climáticos atual e A2 e submetidos a hipóxia.....	24
Tabela 2. Parâmetros físico químicos da água dos aquários expostos aos cenários climáticos.....	29
Tabela 3. Dados hematológicos dos indivíduos de tambaqui expostos ao microcosmos por 30dias. Dados são apresentados como média e erro padrão da média.....	33

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

[Hb]	Hemoglobina
°C	Graus Celsius
µL	Microlitro
Abs	Absorbância
acetil-CoA	Acetil coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ATP	Adenosina trifosfato
B1	Cenário Brando
B ⁻¹	Massa corporal
CAT	Catalase
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
Cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
Fl	Fentolitro
g	Gramas
g/ dL	Grama por decilitro
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona-S-transferase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HO ₂ •	Hidroxila
Ht	Hematócrito
IPCC	Do inglês: Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas
Kg	Quilograma
K _m	Constante de Michaelis- Menten
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
LPO	Lipoperoxidação
Mg	Miligrama

mg/L	Miligramas por litro
mL	Mililitro
MO ₂	Taxa de respiração metabólica
Mol/ L	Unidade mol por litro
NADH	Nicotiamida adenina dinucleotídeo oxidada
Nm	Nanometro
O ₂	Oxigênio
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
Pg	Picogramas
pH	Potencial hidrogeniônico
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
Ppm	Partes por milhão
RBC	Contagem de hemácias
Rpm	Rotações por minuto
SEM	Erro padrão da média
SNC	Sistema nervoso central
VCM	Volume Corpuscular médio
V _{max}	Velocidade máxima da enzima
Vresp	Volume de câmara

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 MUDANÇAS CLIMÁTICAS E AMBIENTES AQUÁTICOS.	15
1.2 HIPÓXIA NOS AMBIENTES AMAZÔNICOS.....	16
1.3 A CINÉTICA DA ENZIMA LDH	18
1.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES E DANOS NA LIPOPEROXIDAÇÃO.....	19
1.5 A ENZIMA ACETILCOLINESTERASE	21
1.6 <i>Colossoma macropomum</i>	22
2. OBJETIVOS	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 AQUISIÇÕES DOS ANIMAIS	24
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
3.2.1 SALAS CLIMÁTICAS	24
3.2.2 EXPOSIÇÕES DOS ANIMAIS AOS CENÁRIOS CLIMÁTICOS.....	24
3.3. ANÁLISES DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA	26
3.4 ANÁLISES DOS PARÂMETROS SANGUÍNEOS	26
3.4.1 ANÁLISE DA GLICOSE	28
3.4.2 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	28
3.4.3 CONCENTRAÇÕES DE HEMOGLOBINA	28
3.4.4 HEMATÓCRITO	28
3.4.5 CONTAGEM DOS ENTRÓCITOS CIRCULANTES.....	28
3.4.6 CONSTANTES CORPUSCULARES	28
3.5 ANÁLISES ENZIMÁTICAS E DOS DANOS EM LPO	28
3.5.1 ANÁLISE ENZIMÁTICA DA CATALASE.....	28
3.5.2 ANÁLISE ENZIMÁTICA DA GLUTATIONA- S- TRANSFERASE	28
3.5.3 ANÁLISES DOS DANOS EM LIPOPEROXIDAÇÃO	28
3.5.4 ANÁLISE DA CINÉTICA ENZIMÁTICA DA LDH.....	29
3.5.5 ANÁLISE DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE	28
3.5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA	29

4.2 TAXA DE RESPIRAÇÃO METABÓLICA DOS ANIMAIS APÓS EXPOSIÇÃO AOS CENÁRIOS CLIMÁTICOS E PERÍODOS DE HIPÓXIA AGUDA.....	31
4.3 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	33
4.4 GLICOSE	35
4.5 ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	36
4.6 CINÉTICA ENZIMÁTICA DA LDH APÓS EXPOSIÇÃO AO CENÁRIO EXTREMO E HIPÓXIA	40
4.7 ACETILCOLINESTERASE APÓS EXPOSIÇÃO AOS CENÁRIOS CLIMÁTICOS E HIPÓXIA	42
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	443
REFERÊNCIAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

1.1 Mudanças climáticas e ambientes aquáticos

As recentes mudanças climáticas são reconhecidas pelo elevado nível de CO₂ atmosférico oriundo principalmente de atividades antrópicas, além de alterações na temperatura, oxigênio e precipitação. Esse aumento da temperatura atmosférica passou a ser agravado desde a Revolução Industrial, quando a concentração de CO₂ passou de 280 ppm e foi aumentando gradativamente até atingir os atuais 400 ppm (IPCC, 2014). Isso teve consequências graves, como a aceleração do aquecimento global e as mudanças climáticas (NOBRE et al., 2007), visto que o clima da Terra acompanha as mudanças da radiação solar de forma natural (FICKE; MYRICK; HANSEN, 2007).

De acordo com Kuo et al. (1990), a temperatura na Terra teve uma elevação de 0,5 °C entre 1880 e 1980, seguidas de elevações no CO₂. Esse processo de elevação da temperatura, causado principalmente pelo aumento do dióxido de carbono, ocorre devido à radiação de calor na atmosfera. O aumento dos gases do efeito estufa proporciona uma maior absorção da radiação terrestre e, conseqüentemente, contribui para o aquecimento global que irá favorecer as mudanças climáticas (CAO; CALDEIRA, 2008). À medida que a luz chega à Terra, ela se mostra na forma de luz visível e radiação infravermelha, boa parte dessa energia é emitida de volta para o espaço pelos gases do efeito estufa, e outra parte se mantém (CAO; CALDEIRA, 2008). Porém, os elevados níveis de CO₂ e outros gases tornam o ar mais concentrado e interferem na liberação da radiação da estratosfera, elevando as temperaturas na superfície.

De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) (IPCC, 2014), está previsto um aumento de até 6 °C na atmosfera para o ano de 2100 em algumas regiões do planeta e um aumento de 420 ppm a 940 ppm de CO₂ (PORTNER et al., 2014). As temperaturas globais nas últimas décadas já aumentaram para os continentes em 0,85 °C e para os oceanos em 0,55 °C (IPCC, 2007), e isso se tornou uma das questões mais discutidas mundialmente. Tais mudanças podem interferir diretamente na vida de organismos aquáticos e na qualidade dos ambientes em que vivem, de forma a perturbar o equilíbrio, uma vez que o ambiente aquático participa na retenção de calor e carbono atmosférico (YANIK; ASLAN, 2018).

Alguns estudos mostram que a temperatura na Amazônia pode aumentar de 3 °C a 5 °C para o próximo século (CÂNDIDO et al., 2007). Essas variações de temperatura e, conseqüentemente, de CO₂ podem interferir na disponibilidade de oxigênio nos ambientes aquáticos, além de alterarem a química desses locais (ESTEVES, 1998; ALMEIDA-VAL et al., 1993).

O CO₂, no ambiente aquático, é altamente reativo com a molécula de água, formando o ácido carbônico (H₂CO₃), que sofre uma dissociação formando íons de hidrogênio (H⁺) e bicarbonato (HCO₃⁻); já na segunda dissociação, originam íons de hidrogênio e carbonato (CO₃²⁻). Assim, ocorre em três formas principais: carbono inorgânico livre (CO₂ + H₂CO₃), íons de bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻) (ESTEVES, 1998; CAO; CALDEIRA, 2008). Isso determina a acidez dos ecossistemas aquáticos, pelo aumento das concentrações de íons de H⁺, os quais modificarão o pH e, subseqüentemente ao aumento de emissões de CO₂, esses ambientes podem se tornar altamente acidificados e provocar além de alterações físicas e químicas, modificações nas comunidades de peixes, como alterações na absorção e transporte de oxigênio, além da regulação iônica (LENHART; STEINBERG, 1984). De acordo com Cao e Caldeira (2008), essas modificações nos ambientes aquáticos são mais acentuadas nos ambientes marinhos tropicais, tendo efeitos diretos nas espécies como interferência no crescimento e reprodução. Pouco se sabe sobre tais modificações nos ambientes amazônicos, mas há a necessidade de compreender estas mudanças para a conservação das espécies locais (CAMPOS et al., 2019).

1.2 Hipóxia nos ambientes amazônicos

A bacia amazônica compreende uma área de aproximadamente 7 milhões de km² (SIOLI, 1990), dos quais 4,4 milhões estão em território brasileiro. Uma das características desse ecossistema são as áreas de várzea e igapós, regiões ricas em alimentos para diversas espécies da ictiofauna (SIOLI, 1984; JUNK et al., 1989). Como consequência dessa abundância de espécies de peixes recorrentes por migrações e os microrganismos presentes, essas áreas sofrem períodos de hipóxia pela grande demanda de oxigênio (SIOLI, 1990; VAL et al., 2004; ALMEIDA-VAL et al., 2006). Esse fato expõe as espécies de peixes amazônicos a períodos estressantes, e exigiu, durante processos evolutivos, que as espécies desenvolvessem diferentes ajustes, tanto morfológicos, quanto fisiológicos e

moleculares, refletindo na dinâmica de cada espécie, afetando respiração, habitat e alimentação (ALMEIDA-VAL; FARIAS, 1996; JUNK et al., 1983). Uma destas adaptações foi a do *Colossoma macropomum*, que se utiliza da expansão labial para melhor absorver o oxigênio dissolvido na camada aquática superficial mais rica em oxigênio, técnica também utilizada pela *Brycon sp.* Outras espécies desenvolveram a respiração área, intestinal ou estomacal, aumento da ventilação branquial, aumento de hemácias circulantes e mecanismos de supressão metabólica (ESTEVES, 1998; ALMEIDA-VAL et al., 1993; VAL; ALMEIDA-VAL, 1995; BRAUN, 1983). Junk et al. (1983), em estudos no lago Camaleão, perceberam que nos períodos de cheia ocorrem concentrações críticas de oxigênio dissolvido, e isso possibilitou a adaptação de algumas espécies para área. Tais adaptações ainda estão em processo para as espécies de peixes amazônicos, frente às mudanças climáticas e à disponibilidade de oxigênio que se encontram nos rios, lagos e igarapés (VAL et al., 1998).

Os eventos de hipóxia ocorrem naturalmente na Amazônia, interferindo na disponibilidade de oxigênio nas águas de seus ecossistemas ao longo do dia e exigindo que os peixes nadem até a camada superficial de água rica em oxigênio dissolvido (ALMEIDA-VAL et al., 1993). Isso acaba expondo os indivíduos à vulnerabilidade predatória tanto aquática como aérea (KRAMER et al., 1983). De acordo com Val et al. (1998), a camada superficial da coluna d'água apresenta mais de 90% da dissolução de O₂. Essa dissolução do oxigênio no ambiente depende de dois fatores, temperatura e pressão (ESTEVES, 1998) e, em consequência dos aumentos nas emissões de CO₂, podem ser alteradas.

Nos mares, em virtude das mudanças climáticas, as áreas hipóxicas já são comumente conhecidas como *zonas mortas*, forçando a fuga de espécies endêmicas (LEVEELAHTI, 2013). Em peixes amazônicos, esta é uma das respostas mais recorrentes para baixos níveis de oxigênio (VAL et al., 1998; ALMEIDA-VAL et al., 1993).

De acordo com Röpke et al. (2017), mudanças nas precipitações de sub-bacias amazônicas têm afetado a duração dos ciclos de cheias e secas e interferido na vida aquática; esses fatores estão relacionados às variações ambientais, visto que a disponibilidade de oxigênio no ambiente amazônico está em constante mudança (VAL et al., 1998). Mudanças que estão relacionadas tanto à temperatura quanto ao oxigênio e CO₂ podem interferir no desenvolvimento dessas espécies, pro

exemplo, em seu crescimento, reprodução, alimentação, migrações e as próprias adaptações morfológicas e fisiológicas de cada espécie (VAL et al., 1998). As mudanças podem afetar diretamente os organismos ectotérmicos, interferindo na energia cinética de moléculas e reações bioquímicas que utilizam (MADEIRA et al., 2012; SOMERO, 2010) e, posteriormente, no desempenho desses animais, pois seu metabolismo varia em função da temperatura corporal, já que esses organismos não podem regular sua temperatura e ela se iguala ao ambiente (FICKE et al., 2007). Uma vez que as espécies de peixes amazônicos tendem a viver perto de suas preferências térmicas, tais mudanças podem ser prejudiciais à sua adaptação (PÖRTNER; FARRELL, 2008; CAMPOS et al., 2017), pois se prevê que as populações tropicais são mais vulneráveis a mudanças climáticas que as temperadas, por já se manterem em faixas de preferência térmica (ROSA et al., 2016).

1.3 A cinética da enzima LDH

À medida que as mudanças climáticas ocorrem, exige-se que os organismos aquáticos mudem suas respostas adaptativas, de modo que nem todos conseguirão suprir essas modificações de nível bioquímico e fisiológico (FIELDS et al., 1993). Alterações relacionadas à temperatura e ao oxigênio afetam diretamente os organismos ectotérmicos, alterando suas respostas energéticas além de interferências ocasionadas pelo CO₂, que podem interromper o equilíbrio ácido-base (ROSA et al., 2016; VINAGRE et al., 2012).

Para os peixes, as baixas concentrações de oxigênio e os aumentos de temperatura e CO₂ induzem ao aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.37), uma enzima de controle do metabolismo energético responsável pela conversão do piruvato em lactato com a utilização do NADH no final da via glicolítica (NELSON; COX, 2014; ALMEIDA-VAL; VAL, 1993). A enzima é formada por dois peptídeos diferentes, gerados a partir da transcrição e tradução de dois genes, *ldh-a* e *ldh-b*. A enzima é um tetrâmero que apresenta duas subunidades diferentes, do tipo A e B, em que A também pode ser chamada de M para músculo e B, de H para o coração; também se ressalta que podem apresentar cinco isoformas distintas A₄, A₃B, A₂B₂, AB₃ e B₄ (NELSON; COX, 2014; STOREY, 2016; ALMEIDA-VAL; VAL, 1993).

A LDH é uma enzima terminal da glicólise anaeróbica, responsável por realizar a redução do piruvato em lactato e por regenerar o NAD^+ para seguir com a produção da demanda energética (NELSON; COX, 2014; MOYES; SCHULTE, 2010). A atividade da enzima é normalmente cessada quando desnatura. Essa desnaturação pode ocorrer por influência da temperatura, uma vez que as enzimas da LDH possuem uma faixa de tolerância, com uma atividade ótima conforme as condições do ambiente (ARGOS et al., 1979; MOYES; SCHULTE, 2010). Entretanto, a sensibilidade das isoformas A_4 e B_4 é bem diferente, sendo esta última menos sensível a mudanças térmicas do que a primeira (ALMEIDA-VAL; VAL, 1993).

Tais isoenzimas da LDH apresentam diferentes constantes de Michaelis-Menten (K_m). O K_m é uma propriedade cinética da enzima, assim como a Velocidade máxima (V_{max}), sendo essas duas propriedades específicas de cada enzima (NELSON; COX 2014; MOYES; SCHULTE, 2010). A constante K_m está relacionada à eficiência catalítica das enzimas, indicando a afinidade do seu ambiente celular com o substrato de reação (HOCHACHKA; SOMERO, 1968). O valor de K_m é definido como a quantidade de substrato suficiente para ativar a enzima na metade de sua velocidade máxima. Assim, quanto maior o K_m , menor é a eficácia da enzima ao substrato. Sendo os efeitos da temperatura na afinidade da enzima mais importante que sua velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Os valores de K_m baixos indicam que a enzima tem uma afinidade alta pelo substrato e, conseqüentemente, suas respostas às variações externas afetam o sistema fisiológico dos organismos (MOYES; SCHULTE, 2010; HOCHACHKA; SOMERO, 1968). Estudos realizados por Somero e Dong (2009) mostram que, para *Lottia austrodigitalis*, os efeitos climáticos refletem de forma diferenciada para K_m , e, quando comparado com outra espécie, possui uma melhor adaptação a alterações na temperatura. Para Fields et al. (1993), se as mudanças climáticas não forem extremas, podem possibilitar que as espécies adquiriram ajustes para atuarem sobre as variações ambientais, incluindo alterações nas concentrações de enzimas como a própria LDH e sua cinética.

1.4 Enzimas antioxidantes e danos na lipoperoxidação

Mudanças de temperatura e oxigênio nos ambientes aquáticos têm sido um dos sinais das mudanças climáticas nas últimas décadas (NAVARRO et al., 2018). Tais alterações de temperatura e oxigênio estimulam o surgimento de espécies reativas de oxigênio (EROS), concomitantemente ao aumento de CO_2 nos

ambientes aquáticos, o que resulta no aumento de íons de hidrogênio (H^+) (CAO; CALDEIRA, 2008; MADEIRA et al., 2012; ESTEVES, 1998).

As variações ambientais podem aumentar as EROS, e o organismo dos animais tendem a manter o balanço redox, quantidade de antioxidantes e espécies reativas, porém, quando este equilíbrio é interrompido, acontece o estresse oxidativo (LEVEELAHTI et al., 2014). As EROS atuam naturalmente como transportadores de elétrons para as reações bioquímicas, além de participarem da produção de ATP (HALLIWELL, 2000). Esses radicais são moléculas de átomos ou íons desemparelhados e altamente reativos (HALLIWELL, 2006). A geração dos radicais livres ocorre nas mitocôndrias e no citoplasma, sendo a mitocôndria a principal geradora das EROS que, em excesso, ocasionam o estresse oxidativo (VAN DER OOST et al., 2003). Quando os níveis de CO_2 encontram-se elevados, podem influenciar no aumento dos íons de H^+ , essa acidose produzida estimula a produção celular das EROS (ARBOGAST; REID, 2004) o que ocasiona danos teciduais aos peixes, e impede as trocas gasosas como oxigênio, já que podem sofrer obstrução do epitélio branquial (ESTEVES, 1998). Baixas concentrações de oxigênio tecidual também podem influir no surgimento das EROS.

Além do CO_2 , alterações nos níveis de O_2 no ambiente aquático, ocasionados por influência da temperatura, resultam na produção excessiva das EROS, pois os elétrons estão mais aptos a escaparem da cadeia transportadora de elétrons e se ligarem ao oxigênio molecular (LUSHCHAK, 2011). A hipóxia aumenta a produção das EROS, sendo mais agressiva no surgimento das espécies reativas do que a normóxia e anóxia (LEVEELAHTI, 2013). Durante a reoxigenação dos tecidos após períodos de hipóxia ou anóxia, ocorre uma superprodução das EROS, a hipóxia já prepara o organismo para o estresse oxidativo por conta da demanda de oxigênio (LEVEELATHI et al., 2013; HALLIWELL, 2006; HALLIWELL, 2000).

O oxigênio, quando reduzido de forma incompleta, proporciona a formação dos intermediários reativos (VAN DER OOST et al., 2003). O oxigênio é reduzido pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (LUSHCHAK, 2011) podendo formar o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a hidroxila (HO_2^{\bullet}), apesar de o H_2O_2 não ser um radical livre, pois não apresenta elétrons desemparelhados, mas participa na geração do HO_2^{\bullet} que é altamente reativo (SCANDALIOS, 2005). Esses radicais podem oxidar lipídios, proteínas e o DNA. As EROS podem reagir com diferentes moléculas, alterando a sua estrutura e

impedindo o seu desempenho (LUSHCHAK, 2011; SCANDALIOS, 2005). Assim, uma das lesões ocasionadas é a lipoperoxidação (LPO), influenciando na fluidez e permeabilidade das membranas, comprometendo o seu funcionamento e podendo levar ao seu rompimento (HALLIWELL, 2006). Os radicais livres, quando produzidos em excesso, são controlados pelas enzimas antioxidantes, destacando a glutathione-S – transferase (GST, E.C. 2.5.1.1.8), que catalisa a conjugação da glutathione reduzida (GSH), transformando em compostos fáceis de serem degradados e liberados, além de atuar na segunda fase da biotransformação; e a catalase (CAT, E.C.1.15.1.1), que atua somente nas moléculas de H₂O₂ (VAN DER OOST et al., 2003).

1.5 A enzima acetilcolinesterase

Alguns trabalhos mostram como os efeitos das mudanças climáticas podem afetar os organismos ectotérmicos, como a temperatura e o CO₂, que agem na interferência do funcionamento da acetilcolinesterase (AChE) (AChE, E.C.3.1.1.7) (MELO; AGOSTINHO; OLIVEIRA, 2003; ADAMS, 1992; MURPHY, 1986; ROSA et al., 2016). O excesso de CO₂ nos ambientes aquáticos, junto ao estresse térmico, contribui para o aumento de antioxidantes, os quais afetarão as fendas sinápticas posteriormente. Isso ocasiona danos ao organismo, como ansiedade, super estimulação do sistema nervoso, distúrbios sensoriais e morte (GUPTA, 2006; TÕUGU, 2001; ROSA et al., 2016). Estudos mostram que altas temperaturas e CO₂ condicionam desregulação no balanço iônico em prótons receptores de neurotransmissores como das células ácido γ-aminobutírico A (GABAA) (SAMPAIO et al., 2016).

A acetilcolinesterase desempenha um papel fundamental na hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) do sistema nervoso autônomo, sendo sintetizada a partir da colina. Desta forma, regula a transmissão do impulso nervoso nas fendas sinápticas (MOYES; SCHULTE, 2010; ADAMS, 1992; MURPHY, 1986). A mitocôndria é responsável pela produção da acetil-CoA, que se combina à colina, formando a ACh e liberando a coenzima A (MOYES; SCHULTE, 2010). A ACh se expande na sinapse e se liga a receptores pós-sinápticos (MOYES; SCHULTE, 2010; GUPTA, 2006). A interferência do funcionamento da AChE proporciona o acúmulo da acetilcolina nas sinapses, interrompendo o funcionamento neural; assim, pode apresentar inibição por excesso de substrato, que interrompem a entrada do

sítio ativo central, o que condiciona danos ao animal (GUPTA, 2006). Diante das mudanças climáticas, essa enzima pode sofrer alterações nas suas respostas, como já descrito por Campos et al. (2019) para espécies de peixes amazônicos, e por Rosa et al. (2016) para o tubarão *Chiloscyllium punctatum*. Assim, saber como as espécies de peixes amazônicos responderão a tais variações se faz necessário, de modo que é uma enzima fundamental no funcionamento normal do animal.

1.6 *Colossoma macropomum*

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818), pertence à família Serrasalminidae da ordem Characiformes (MIRANDE, 2010), habita as bacias Amazônica e do Orinoco, e pode ser encontrado no Brasil e em países fronteiriços (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998). Possui um corpo robusto, podendo pesar 30 kg e medir um metro de comprimento, possui dentes molariformes e é considerado um animal onívoro, alimenta-se de frutos e sementes e alguns zooplânctons (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998). Possui adaptações que permitem viver em ambientes de águas claras, brancas ou pretas (SANTOS et al., 2006), e apresenta um comportamento migratório sazonal. Além disso, pode aumentar a taxa de ventilação branquial quando em condições de baixa oxigenação tecidual, também eleva seus níveis de glicose e lactato para supressão metabólica e aumenta a atividade de enzimas como a LDH, além de redução da hemoglobina circulante em condições de hipóxia (ALMEIDA-VAL; VAL, 1993; VAL 1995). Em condições de hipóxia desenvolve um edema labial, para melhor captação da água mais rica em oxigênio que ocorre na superfície, regredindo o lábio em concentrações normais de oxigenação (VAL et al., 1998).

Alguns estudos já relataram o efeito das mudanças climáticas, como o aumento de temperatura e CO₂ sobre a espécie e os danos que podem ser ocasionados. Dragan et al. (2014), após exposição da espécie nos cenários climáticos por 30 dias e CO₂ elevado, observaram que ocorrem alterações no hematócrito e estresse metabólico. Para Oliveira e Val (2017), a espécie apresentou aumento no consumo alimentar e ganho de peso para todos os cenários juntamente com o aumento dos parâmetros hematológicos. Outros trabalhos mostram que aumentos na temperatura e CO₂ aumentam as quebras no DNA de eritrócitos após exposição aos cenários, além de provocar alterações nos parâmetros hematológicos e um desbalanço entre os íons plasmáticos (PRADO-LIMA; VAL, 2016).

Por ser um animal comercialmente valorizado na região e gerar renda para a população local, é necessário estudar possíveis situações que prejudiquem a espécie e conseqüentemente sua produção. Dessa forma, o presente trabalho verificou o efeito da hipóxia e dos cenários climáticos sobre a atividade das enzimas do metabolismo oxidativo (CAT e GST), anaeróbico (LDH) e neurológico (AChE), uma vez que essas enzimas atuam como biomarcadores de condições estressantes no organismo. Visando uma melhor compreensão dos ajustes fisiológicos que a espécie apresenta frente às futuras mudanças climáticas, considerando que a hipóxia é de ocorrência natural e que o aumento da temperatura é um fator iminente nos dias de hoje.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito dos cenários climáticos e exposição à hipóxia no metabolismo energético, antioxidante e neurológico de indivíduos da espécie *Colossoma macropomum*.

2.2 Objetivos específicos

- i. Verificar o efeito dos cenários climáticos e da hipóxia aguda sobre o metabolismo energético;
- ii. Analisar as alterações no metabolismo antioxidante do tambaqui após exposição aos cenários climáticos e hipóxia aguda;
- iii. Verificar a influência dos cenários climáticos e da hipóxia aguda sobre os parâmetros hematológicos do tambaqui;
- iv. Avaliar a influência dos cenários climáticos e da hipóxia aguda sobre os parâmetros cinéticos da enzima LDH;
- v. Verificar se há alterações na atividade neurológica do tambaqui após exposição aos cenários climáticos e hipóxia aguda.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aquisições dos animais

Juvenis de *Colossoma macropomum* foram obtidos na Piscicultura de Balbina – AM (SEPROR) e transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/ CBIO/ INPA). No laboratório, os animais foram aclimatados por 30 dias, com aeração constante, recebendo alimentação com 32% de proteína bruta uma vez ao dia. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos experimentos. O experimento está de acordo com o CEUA do INPA, sob protocolo n° 032/2016.

3.2 Delineamento experimental

3.2.1 Salas climáticas

Os cenários climáticos compõem um sistema de salas integradas que simulam as mudanças climáticas para o ano de 2100 conforme o quarto relatório do IPCC (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas) (IPCC, 2007). O sistema é caracterizado por quatro salas, simulando os cenários: atual (RCP2.6) (temperatura, dióxido de carbono e umidade, os quais seguem em tempo real os valores encontrados na floresta de terra firme), funcionando como sala controle; brando (RCP4.5), com aumento de 1,5 °C na temperatura e 200 ppm a mais de CO₂, moderado (RCP6.0), com aumento de 2,5 °C na temperatura e 400 ppm a mais de CO₂; e extremo (RCP8.5) aumento de 4,5 °C na temperatura e 900 ppm a mais de CO₂. Para o presente trabalho, foram utilizados o cenário atual e extremo.

3.2.2 Exposições dos animais aos cenários climáticos

Para a experimentação foram utilizados 42 tambaquis com média de peso e comprimento conforme disposto na Tabela 1. Foram utilizados 14 tanques experimentais, sendo sete tanques mantidos no cenário atual e sete mantidos no cenário extremo, cada tanque recebeu três indivíduos da espécie. Os tanques estavam com aeração constante e os animais sendo alimentados diariamente com ração comercial com 32% proteína bruta. Os animais foram mantidos nessas condições de aclimação por 30 dias e, posteriormente, as coletas foram realizadas.

As coletas aconteceram em quatro tempos, com 27, 28, 29 e 30 dias de experimentação. Em cada uma das coletas, um indivíduo de cada tanque experimental foi retirado. Os animais coletados foram submetidos à respirometria em normóxia (primeira coleta, 27 e 28 dias) e hipóxia (segunda coleta, 29 e 30 dias) conforme os seus respectivos cenários de aclimação para mensuração da taxa de respiração metabólica (MO_2) ($n=7$). Para a submissão à normóxia, manteve-se a aeração constante durante o tempo de leitura. Para submissão à hipóxia, a aeração foi suspensa e borbulhado nitrogênio gasoso até que o nível de oxigênio fosse estabilizado em 1 mg/L, tendo duração de duas horas para aclimação e quatro horas para mensuração ($n=7$). A respirometria ocorreu utilizando sete câmaras individuais, cada uma com 1,7 L, com sensores conectados a cabos de fibra ótica e ligados ao aparelho OXY-4 (Loligo Systems). A respirometria de cada grupo teve duração de seis horas, sendo duas horas para adaptação dos peixes às câmaras e quatro para verificação do MO_2 ($mg\ O_2\ kg^{-1}\ h^{-1}$), possuindo três fases: circulação, espera e consumo. As fases foram de circulação 180s, 120s de espera e 300s de consumo, tendo uma duração de 10 minutos por loop. Com cálculo da taxa após as quatro horas, para MO_2 ($\mu LO_2 \cdot h^{-1} \cdot kg$) = $-\Delta O_{resp} B^{-1}$, onde em que $-\Delta O$ está relacionado com a taxa de variação na concentração de oxigênio, V_{resp} é o volume das câmaras e B^{-1} como a massa corporal do animal (kg).

Após a respirometria, os animais foram medidos e eutanasiados com corte na coluna cervical, conforme as normas do CONCEA, e o sangue foi coletado por punção na veia caudal com seringa heparinizada; os demais tecidos, coração, cérebro e fígado foram coletados com auxílio de instrumentos cirúrgicos apropriados. Os tecidos foram acondicionados em tubos eppendorfs de 2 ml, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer $-80\ ^\circ C$ até o momento das análises.

Tabela 1. Peso e comprimento dos animais expostos aos cenários climáticos atual e extremo submetidos à hipóxia

		Peso (g)	Comprimento (cm)
Normóxia	Atual	55,71 ± 9,22	11,52 ± 0,61
	Extremo	63,57 ± 9,61	12,38 ± 0,60
Hipóxia	Atual	55 ± 7,15	11,74 ± 0,50
	Extremo	55,71 ± 9,53	12 ± 0,72

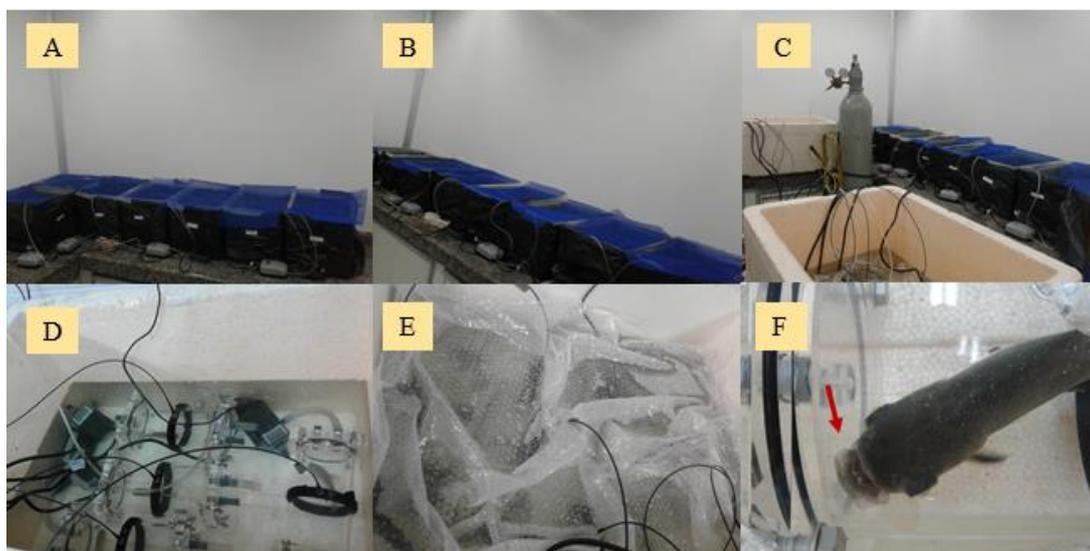


Figura 1. As figuras estão relacionadas as etapas experimentais. As figuras A) e B) são referentes a montagem dos experimentos nas salas climáticas e exposição por 30 dias em cada. C) Está referente à etapa de respirometria, representadas nas letras D) e E) respectivamente, exposição dos animais em normóxia e hipóxia (1mg/L) e na F a formação da expansão labial do animal em baixas concentrações de oxigênio no cenário extremo

Fonte: Autoria própria

3.3. Análises dos parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água foram verificados diariamente usando o medidor de oxigênio e temperatura digital YSI 85, o pH com auxílio do pHmetro (OHAUS STARTER 3100), a amônia com a utilização do espectrofotômetro SPECTRAMAX PLUS com leitura em placa (540 nm) e CO₂ por titulação em seringa (BOYD; TUCKER, 1992).

3.4 Análises dos parâmetros sanguíneos

3.4.1 Análise da glicose

Amostras de plasma foram utilizadas para medir glicose com o kit comercial Glucose Liquicolor InVitro (10 µL STD, 1000 µL RGT), com leitura em espectrofotômetro em 500 nm no aparelho SPECTRAMAX PLUS.

3.4.2 Análises hematológicas

Para as análises hematológicas, foram realizados os seguintes parâmetros: hemoglobina ([Hb]), hematócrito (Ht), contagem de eritrócito (RBC), volume

corpúscular médio (VCM), hemoglobina corpúscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpúscular média (CHCM) e verificação de glicose.

3.4.3 Concentrações de Hemoglobina

O sangue coletado foi utilizado para medir a hemoglobina [Hb] (g/ dL) de acordo com Kampen e Zijlstra (1964) com o método da ciano-hemoglobina (2 mL de solução Drabkin e 10 µL de sangue, 10 minutos em repouso) com leitura de absorbância com a utilização de cubeta de plástico, sendo a solução de Drabkin utilizada como o branco, as leituras foram realizadas com a utilização de espectrofotômetro em 540 nm.

Determinação da concentração de hemoglobina:

$$\text{g \% Hb} = \text{Abs (540 nm)} \times 0,146 \times \text{diluição da amostra}$$

3.4.4 Hematócrito

O hematócrito (Ht) (%) foi realizado utilizando a técnica de micro-hematócrito, com tubos capilares e amostras de sangue total. As amostras foram realizadas em duplicata para cada animal, o sangue foi coletado pelo micro-hematócrito e centrifugado na centrífuga FANEM 211N por 10 minutos a 12000 mil rpm e posteriormente realizou-se a leitura da taxa de sedimentação dos eritrócitos com cartão de leitura (BROW, 1976).

3.4.5 Contagens de eritrócitos circulantes

A contagem de hemácias foi determinada por meio da diluição de amostras de sangue com a solução de formol citrato (2 mL Formol citrato, 10 µL sangue), as contagens foram realizadas com o auxílio da câmera de Neubauer e microscópio óptico (LEICA DM 500), realizadas nos quadrantes das extremidades e central (KAMPER; ZIJLSTRA, 1964).

3.4.6 Constantes corpusculares

O cálculo das constantes corpusculares (VCM, HCM e CHCM) estão de acordo com o método descrito por Brow (1976):

Volume corpúscular médio (VCM)

$$\text{VCM } (\mu\text{m}^3) = \text{Ht} \times 10 / \text{RBC}$$

Hemoglobina corpuscular média (HCM)

$$\text{HCM } (\mu\text{g}) = [\text{Hb}] \times 10 / \text{RBC}$$

Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)

$$\text{CHCM } (\%) = [\text{Hb}] / \text{Ht} \times 100$$

3.5 Análises enzimáticas e dos danos em LPO

3.5.1 Análise enzimática da catalase

A atividade da catalase (CAT) foi verificada utilizando o fígado, com a taxa de inibição do substrato peróxido de hidrogênio (100 μL e 100 mL de água destilada), acrescentando 1 mL da solução e 5 mL do tampão catalase (1M Tris, 5 mM EDTA). Para a leitura, foi utilizada cubeta de quartzo com 990 μL do meio de reação e 10 μL de amostra com leitura de 1 minuto em 240 nm em espectrofotômetro expressos em μM (BEUTLER, 1975). Para o cálculo das análises, foi utilizado o teor proteico, 1 μL da amostra e 209 de Bradford, com leitura em placa em espectrofotômetro em 595 nm (BRADFORD, 1976) para todas as antioxidantes.

3.5.2 Análise enzimática da glutathiona-S- transferase

A atividade da glutathiona-S – transferase (GST) no fígado foi realizada com o homogeneizado e o 1-cloro 2,4-dinitrobenzeno (CDNB). A solução de reação possui 50 mM de CDNB diluído em 1mL de ETANOL 100%, 25 mM de GSH dissolvidos em 0,1 M de tampão fosfato pH7, com leitura em 340nm (KEEN et al., 1976). Para a leitura, foram utilizados 15 μL de amostra e 235 μL da solução e adicionado 10 μL de GSH em placa com leitura em espectrofotômetro (KEEN et al., 1976).

3.5.3 Análises dos danos em lipoperoxidação

A análise dos danos da lipoperoxidação (LPO) foi realizada utilizando o fígado, através do sobrenadante obtido pela homogeneização do tecido (20 mM de tris – base, 1 mM de EDTA, 1 mM de dithiothreitol, 500 mM de sucrose e 150 mM de KCL), onde foram centrifugados por 30 minutos a 9000 rpm a 4 °C (este homogeneizado foi utilizado para todas as enzimas antioxidantes).

A peroxidação lipídica foi determinada pela oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} na presença do alaranjado xilenol (Ferrous Oxidation- Xylenol Orange) (JIANG et al.,

1991). Cerca de 100 μ L do homogeneizado foram tratados com 100 μ L de TCA (12%) e centrifugados por 10 minutos a 5000 rpm (JIANG et al., 1991). Na sequência, cerca de 30 μ L de amostra e 270 μ L da mistura reativa (alaranjado xilenol 100 μ M, FeSO₄ 250 μ M, ácido sulfúrico 25 mM, butilato de hidroxitolueno 4mM, diluídos em metanol 90%) foram acrescentados em placa, e cobertos por 30 minutos sem presença de luz, e posteriormente realizou-se a leitura em espectrofotômetro em 560 nm (JIANG et al., 1991).

3.5.4 Análise da cinética enzimática da LDH

A atividade da cinética da LDH do coração e músculo foi verificada utilizando o substrato piruvato com leitura em placa em espectrofotômetro com o comprimento de onda 340 nm (DRIEDZIC; ALMEIDA-VAL, 1996). Os tecidos foram homogeneizados com o auxílio de pistilo com o tampão de homogeneização (Imidazol 150 mM, EDTA 1 mM, Triton X 500 μ L, 50 mL H₂O destilada, pH 7,4) onde foram centrifugados durante 15 minutos a 15000 g a 4 °C. As leituras foram realizadas em cubetas de 1000 μ L, sendo utilizado 2 μ L do homogeneizado para o coração e 5 μ L para o músculo (2 μ L; tampão + piruvato= 1000 μ L) (DRIEDZIC; ALMEIDA-VAL, 1996). Para as análises, foram utilizadas oito concentrações de piruvato: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 5,0 e 10,0 μ L. Para 0,05 a 1,0 μ L utilização de 1 mM de piruvato, 5,0 e 10,0 μ L foram 10 mM de piruvato.

A cinética enzimática foi calculada conforme a equação de Michaelis-Menten (MOYES; SCHULTE, 2010), a partir da atividade da enzima em várias concentrações de piruvato. A K_m é definida como a concentração que a velocidade de reação enzimática é metade de V_{max} . A inclinação da reta dá-se por K_m/V_{max} (NELSON; COX, 2008).

3.5.5 Análise da atividade da acetilcolinesterase

A atividade da AChE foi determinada de acordo com o método de Ellman et al. (1961). O cérebro foi utilizado para medir a atividade da acetilcolinesterase, o tecido foi diluído 5x em tampão de homogeneização (K₂HPO₄, KH₂PO₄, 50 mL de glicerol diluído em 200 mL de água MilliQ) e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas em 900 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Depois de retirado o sobrenadante, centrifugou-se novamente a 12900 rpm a 4 °C. Para a leitura, foram

utilizados 200 μ L de DTNB e 50 μ L de substrato pipetados em placa com leitura em espectrofotômetro em 415 nm.

3.5.6 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizada uma ANOVA two-way verificando oxigênio x temperatura, tanto para hematologia, respirometria e dados enzimáticos e dados (ZAR, 1984). O nível de significância admitido será de 95% ($P < 0,05$). Para as análises estatísticas será utilizado o pacote estatístico SigmaPlot 11.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros físico-químicos da água

Os parâmetros físico-químicos da água (Tabela 2) nos cenários expostos mostraram diferença significativa. O cenário climático extremo apresentou maior temperatura, CO_2 e menor disponibilidade de oxigênio e pH, o que indica que tais mudanças na sala refletem na qualidade do ambiente aquático e conseqüentemente no desempenho do animal. A redução do pH no cenário extremo pode ser explicada pelo aumento do dióxido de carbono que, ao reagir com as moléculas de água, formam íons de H^+ e HCO_3^- e reduz as concentrações de CO_3 , podendo tornar o pH da água dos aquários mais ácido. Além disso, valores baixos de pH influenciam na perda de íons, sódio e cloreto do organismo dos peixes. Os aquários expostos no cenário RCP8.5 apresentaram maior concentração de amônia na água, o que pode exigir um desempenho metabólico maior; ademais, dois processos podem estar relacionados, quais sejam, o aumento da fluidez de membrana e, portanto, maior excreção de amônia ou o aumento da atividade de catabolismo de proteínas para manter as necessidades energéticas.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos da água para os 30 dias de exposição aos cenários climáticos

Cenário	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	O_2 mg/L	pH	Amônia (mMol/ L)	CO_2 (ppm)
Atual	24,06 \pm 0,760	7,69 \pm 0,482	7,07 \pm 0,388	0,24 \pm 0,01	9,2 \pm 1,034
Extremo	28,66 \pm 0,805	6,88 \pm 0,701	6,73 \pm 0,325	1,11 \pm 0,88	16,3 \pm 1,246

4.2 Taxa de respiração metabólica dos animais após exposição aos cenários climáticos e períodos de hipóxia aguda

A taxa de consumo de oxigênio (MO_2) se manteve para os animais expostos no cenário atual em normóxia, sendo possível observar que a temperatura e o CO_2 não interferiram no metabolismo aeróbico. Portanto, indica certa capacidade de aclimatação. Já para os animais expostos no cenário atual em hipóxia, é possível observar uma redução na taxa metabólica desses animais ($p < 0,042$), sendo uma resposta comum da espécie em ambientes naturais. Assim, ocorreu diferença entre os dois grupos no cenário atual de normóxia e hipóxia. Para os indivíduos expostos ao cenário extremo sob condições de temperatura ($28\text{ }^\circ\text{C}$) e CO_2 elevados, é possível verificar um aumento na taxa metabólica em normóxia e em hipóxia ($p < 0,042$). Isso pode ser explicado pelo fato de o animal não conseguir reduzir a taxa metabólica quando em condições extremas, indicando uma perda na capacidade de ajustes fisiológicos para a espécie. A taxa metabólica apresentou diferença entre os cenários atual e extremo em hipóxia ($p < 0,042$) (Figura 2), mostrando as dificuldades do animal de manter o metabolismo.

A taxa metabólica é utilizada para demonstrar o desempenho e as adaptações dos animais sob as mudanças relacionadas ao oxigênio que podem ou não estarem relacionadas com a disponibilidade de CO_2 e temperatura (BAKER et al., 2017). De forma que o oxigênio funciona como um fator limitante para o funcionamento dos processos metabólicos do animal, quando precisam realizar ajustes para suprir a demanda energética. Neste caso, o tambaqui protege seu consumo de oxigênio utilizando dos ajustes da expansão labial, além de respostas fisiológicas (ALMEIDA-VAL et al., 1993), o que foi possível observar nos animais expostos ao cenário extremo. Em algumas concentrações inferiores, espécies de animais não conseguem fazer esses ajustes, onde já se encontram em um estado de saturação crítica de oxigênio, principalmente sob condições elevadas de temperatura e CO_2 (REMEN et al., 2015). Experimentos com o peixe *Astronotus crassipinnis* submetidos à hipóxia e anóxia, mostraram que o animal exposto em normóxia apresentou uma redução na taxa metabólica após 2 horas (CHIPPARI-GOMES et al., 2005), o mesmo fato foi observado no trabalho de Heinrichs-Caldas (2016) para a mesma espécie, após 3 horas de submissão à hipóxia.

Em experimentos com *Apistogramma agassizii*, *Pyrrhullina brevis* e *Hyphessobrychon melazonatus* sob influência dos cenários climáticos, com

aumentos de temperatura, CO₂ e diminuição do pH, Campos et al. (2019) observaram que as espécies apresentaram taxas diferentes de mortalidade e aumento da taxa metabólica para todas as espécies. Isso mostra como os mecanismos de adaptação são específicos para cada espécie e podem ser essenciais frente às mudanças climáticas, de modo que, espécies que não apresentam respostas a variações ambientais terão maiores dificuldades de sobrevivência.

Em outro estudo com peixes tropicais e subtropicais, após 16 dias de hipóxia, as espécies tropicais reduziram a taxa metabólica comparado as subtropicais que mantiveram a taxa de consumo elevadas (COLLINS; CLARK; CARTON, 2016). As variações na temperatura no metabolismo desses animais resultam em uma demanda maior de O₂ enquanto a hipóxia limita essa disponibilidade acarretando em danos como desempenho de crescimento e reprodução (ALTIERI; GEDAN, 2015; CADIZ et al., 2018). Porém, a aclimatação hipóxica é conservada em muitas espécies de peixes, mostrando sua plasticidade fisiológica como estratégia de sobrevivência (COLLINS; CLARK; CARTON, 2016). Nota-se que o tambaqui possui mecanismos fisiológicos para situações críticas de hipóxia e elevadas temperaturas, até a estabilização do oxigênio na água, para o presente estudo a espécie apresentou dificuldades no desempenho da taxa metabólica.

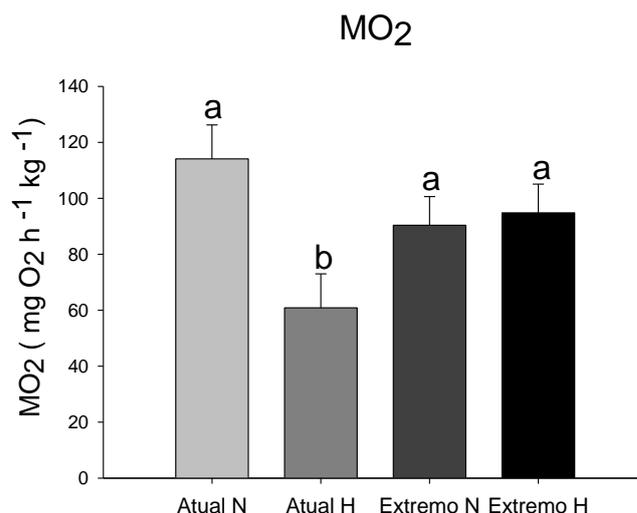


Figura 2. Taxa metabólica do *C. macropomum* após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia. Para concentrações de 1 mg/L de oxigênio em hipóxia. Letras diferentes significam diferença estatística no mesmo cenário e entre os cenários (two-way ANOVA, $p < 0,05$). Valores são média \pm SEM (n=7)

Fonte: Autoria própria

4.3 Parâmetros hematológicos

Os resultados obtidos nas análises hematológicas dos animais expostos ao cenário atual e extremo (Tabela 3) apresentaram variações para hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]), RBC (*red blood cell*), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Os animais submetidos ao cenário atual em hipóxia apresentaram um aumento ($p < 0,001$) na taxa de (Ht) em comparação com o cenário atual em normóxia. Para a ([Hb]), foi possível observar um decréscimo quando os animais estavam em hipóxia em comparação com normóxia no cenário atual ($p < 0,001$). O mesmo valor foi expresso para HCM e CHCM ($p < 0,001$) quando os animais estavam sob condições do cenário atual em hipóxia comparado à normóxia. Porém, ocorreu elevação do RBC ($p < 0,001$) em concentrações de hipóxia no cenário atual. Em relação ao cenário extremo, foi possível observar um aumento para ([Hb]), RBC, HCM e CHCM ($p < 0,001$) em comparação ao cenário extremo em normóxia. Havendo diferença entre os cenários atual e extremo em hipóxia para ([Hb]), RBC, HCM e CHCM ($p < 0,001$), com elevação dessas para o cenário extremo em hipóxia. Não ocorrendo diferença do volume corpuscular médio (VCM) em nenhum dos grupos.

As análises hematológicas permitem verificar a capacidade respiratória das espécies assim como a imunidade desses animais (SANTOS; TAVARES-DIAS 2011; TAVARES-DIAS; MORAIS 2004; FALCE, 2009). Os parâmetros sanguíneos irão refletir as condições e alterações fisiológicas de cada animal, funcionando como uma ferramenta de identificação de estresse proporcionada pelo ambiente e mudanças climáticas, e identificação de estados anêmicos que são perceptíveis com a redução de eritrócitos e do hematócrito, e processos infecciosos, como outros problemas homeostáticos (OLIVEIRA, 2009; TAVARES-DIAS et al., 2009; ARAÚJO et al., 2011). Alterações de temperatura, CO₂, concentração de oxigênio na água podem interferir diretamente no equilíbrio ácido-base do sangue dos peixes. Tais alterações ocorrem pelas altas concentrações de CO₂ que irá contribuir para a formação de íons de H⁺. Além disso, altas temperaturas estão relacionadas à dissolução do CO₂ no ambiente aquático e, conseqüentemente, na diminuição da diluição de moléculas de O₂ na água. Tanto as altas temperaturas como a hipercapnia contribuem para uma baixa afinidade do O₂ pela hemoglobina (BOYD, 1996). Altas concentrações de CO₂ debilitam o metabolismo dos peixes, reduz o consumo do oxigênio e uso da glicose, aumentando-a no sangue. De acordo com

Boyd (1996), ainda há a relação exercida pelo CO₂ e pH sobre a afinidade do oxigênio pela hemoglobina, determinado de efeito Root.

Nos trabalhos de Dragan (2014) e de Oliveira e Val (2017) para o *Colossoma macropomum*, ocorreu um aumento do hematócrito quando os animais estavam no cenário atual e extremo com 30 dias de experimento, sendo possível observar no presente estudo para os animais do cenário extremo em hipóxia. A elevação de hematócrito e hemoglobina elevam a concentração de oxigênio nos tecidos sanguíneos, dando condições em períodos de pouca oxigenação (SCHULTE, 2015). No trabalho de Ferreira (2008), foi possível verificar no tambaqui o aumento do hematócrito para animais condicionados à hipóxia e fadiga para a mesma concentração de 1 mg/L e 0,5 mg/L de oxigênio dissolvido. Para o peixe *Astronotus ocellatus* exposto à hipóxia por 20h, um aumento do Ht e, para a exposição até 4h, uma diminuição para [Hb], Ht, e CHCM (RICHARDS et al., 2007). Nesse sentido, possível verificar a diminuição no presente trabalho para [Hb] e CHCM e HCM no cenário atual para o mesmo tempo de exposição de 4h em hipóxia em relação ao cenário atual em normóxia o que é uma resposta natural do animal. Quando comparados os dados dos dois cenários, é possível observar que o tambaqui mantém os parâmetros elevados desde o cenário extremo em normóxia e mantém quando está em condições de hipóxia, o que mostra que a espécie já mostrava condições de estresse impostas pelos cenários e precisava ter um desempenho maior.

Tabela 3. Dados hematológicos dos indivíduos de tambaqui expostos ao microcosmos por 30dias. Dados são apresentados como média e erro padrão da média¹

Tratamento	Ht (%)	[Hb] (g/ dL)	RBC (x 10 ⁶ μ ³)	VCM (fl)	HCM (pg)	CHCM (%)
Atual Normóxia	29,78 ± 0,7	8,55 ± 0,08	1,49 ± 0,08	202,67 ± 8,71	58,45 3,46	28,75 0,85
Atual Hipóxia	34,57 ± 0,52 ^a	5,18 ± 0,09 ^a	1,94 ± 0,09 ^a	179,41 ± 8,1	21,6 ± 1 ^a	12,14 ± 0,68 ^a
Extremo Normóxia	30,57 ± 1,34	7,92 ± 0,12	1,48 ± 0,13	206,28 ± 14,74	52,5 ± 3,41	25,86 ± 0,94
Extremo Hipóxia	31,85 ± 0,93	8,4 ± 0,05 ^b	1,59 ± 0,05 ^b	200,9 ± 10,41	53,18 ± 3,27 ^b	26,43 ± 0,69 ^b

Fonte: Autoria própria

¹ As letras representam diferença estatística entre os cenários e entre os tratamentos.

4.4 Glicose

A glicose plasmática para hipóxia aumentou em relação ao cenário controle em normóxia (Figura 3). Para os dois cenários atual e extremo, a concentração de glicose se manteve elevada para hipóxia ($p < 0,001$) em relação à normóxia, mas não ocorrendo diferença entre os cenários. A disponibilidade de glicose no sangue depende de vários fatores, onde os níveis estão correlacionados com a taxa metabólica (POLAKOF et al., 2011). Altas temperaturas e CO_2 influenciam nas trocas gasosas do organismo do animal, podendo diminuir a utilização da glicose e aumentando no sangue. A glicose é convertida em ATP para suprir a demanda energética, estando diretamente relacionada com a via glicolítica, ela será convertida em piruvato em baixa oxigenação tecidual, que terá como produto final o lactato (PORCHAS; CÓRDOVA; ENRIQUEZ, 2009, 2009; MANDIC; SPEERS-ROESCH; RICHARDS, 2012).

Alguns estudos sobre a glicose dos peixes revelam que, ao longo do tempo, o metabolismo desses animais sofreu adaptações para suprir a ausência de alimentos e baixas concentrações de oxigênio, ocasionadas pelas mudanças ambientais (POLAKOF et al., 2011). Sob condições de estresse, respostas são emitidas do corpo do animal, conhecidas como respostas primárias e secundárias, sendo a primeira percebida pelo sistema nervoso central (SNC), proporcionando a liberação de hormônios, e a segunda decorre dessas liberações, causando mudanças no sangue e tecidos, como o aumento da glicose plasmática (PORCHAS; CÓRDOVA; ENRIQUEZ, 2009). A glicose pode ser adquirida por dois modos, tanto pela gliconeogênese como pelos estoques de glicose que serão utilizados pelo metabolismo do animal, além da influência dos altos ou baixos níveis de glicose extracelular que podem contribuir para o metabolismo em hipóxia (CLOW; SHORT; DRIEDZIC, 2017; MARTINEZ, 2006). No trabalho de Chippari-Gomes et al., (2005) com *Astronotus crassipinnis* e *Symphysodon aequifasciatus*, as espécies foram expostas em normóxia, hipóxia e anóxia e apresentaram o glicogênio elevado. Mesmo resultado encontrado para o experimento realizado com o bacalhau do Atlântico, truta arco-íris e peixe-lapa expostos à hipóxia, a taxa do metabolismo da glicose foi elevada após diferentes exposições térmicas e de CO_2 (CLOW; SHORT; DRIEDZIC, 2017). De acordo com Chippari-Gomes (2005), essas altas concentrações de glicose plasmática em hipóxia são devidas a gliconeogênese hepática.

No presente trabalho foi possível observar a diferença na glicose dos grupos em normóxia e hipóxia, indicando que esses animais estavam em condições de estresse e, conseqüentemente, elevaram a produção da glicose para suprir a demanda das vias do metabolismo anaeróbico para produção de ATP.

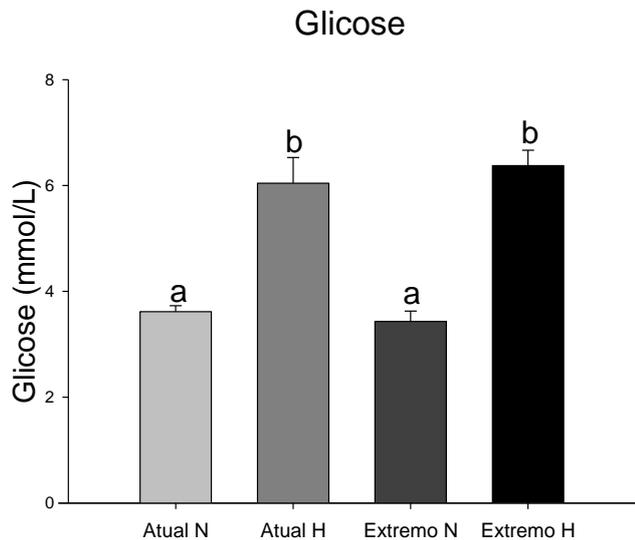


Figura 3. Elevação da glicose do *C. macropomum* após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia. Letras diferentes significam diferença estatística no mesmo cenário e entre os cenários (two-way ANOVA, $p < 0,05$). Valores são média \pm SEM ($n=7$).

Fonte: Autoria própria

4.5 Enzimas antioxidantes

As análises enzimáticas para GST e CAT no fígado de tambaqui, após exposição de 30 dias nos cenários climáticos, foram determinadas e apresentadas nas figuras 4 e 5. A GST (Figura 4) e os danos na LPO (Figura 6) apresentaram diferença significativa para o cenário atual em normóxia e hipóxia ($p < 0,019$), para o cenário extremo as enzimas e danos não foram significativos, não havendo respostas das enzimas antioxidantes. O mesmo se fez presente na atividade da CAT ($p < 0,05$), não expressando diferenças significativas em suas atividades entre os cenários e entre grupos em cada cenário (Figura 5).

De acordo com Welker et al. (2013), as condições de pouca oxigenação tecidual podem condicionar estresse no animal, e a redução de temperatura e CO_2 podendo reduzir o metabolismo oxidativo. Em contrapartida, as temperaturas elevadas podem aumentar os danos e respostas das antioxidantes. Sabe-se que o ambiente amazônico é conhecido pelas oscilações da concentração de oxigênio ao

longo do dia (VAL; ALMEIDA-VAL, 1995). Sendo o oxigênio necessário para suprir a demanda energética aeróbica, essas mudanças na disponibilidade de oxigênio em ambientes aquáticos, que podem variar de anóxicos a hiperóxicos podem elevar as EROS (ZHANG et al., 2016). Espécies que mostram antioxidantes aumentadas em ambientes anóxicos e hipóxicos utilizam-se dessas defesas para, após a reoxigenação tecidual, desenvolver uma explosão de produção de EROS (HERMES-LIMA et al., 2015). Geralmente, isso ocorre quando essas espécies não conseguem se deslocar de áreas hipóxicas, o que provoca tais respostas fisiológicas e na expressão gênica (LEVEELAHTI, 2013). A formação das EROS ocorre a partir de elétrons que escapam da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e NADH-oxidase (PELSTER et al., 2016). Para Lushchak (2011), em algumas ocasiões, a diminuição da temperatura e oxigênio podem ocasionar o estresse, que podem ser explicados por duas razões: a diminuição da temperatura enfraquece o sistema de produção de EROS ou aumenta a produção das EROS.

O estresse oxidativo ocasionado pode condicionar danos severos no organismo do animal, caracterizado por ser um estado de oxidação tecidual desregulada, causando perturbação no balanço redox, levando a um distúrbio na homeostase celular e possível morte (LUSHCHAK, 2011; MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016). O que pode se agravar com as mudanças climáticas pelo crescente aumento de CO₂ que tem uma forte contribuição para a formação de EROS. As enzimas de defesas como a GST são de suma importância para a fase II da biotransformação, participando na conjugação do xenobiótico com o tripéptido exógeno e reduzindo a glutathione e, posteriormente, eliminando esses metabólitos do organismo. Ela desempenha um papel fundamental na defesa do organismo contra o dano oxidativo e peroxidação do DNA (RINALDI et al., 2002; VAN DER OOST et al., 2003; SADAUSKAS–HENRIQUE, 2014).

Alguns trabalhos mostram a atividade da enzima, como para *Spaurus aurata* expostos a diferentes temperaturas, não apresentaram respostas para os tecidos analisados, somente para músculo. Leveelahti (2013) verificou que, para *Hemiscyllium ocellatum*, *Gasterosteus aculeatus* e truta-arco-íris, em condições de hipóxia e temperaturas elevadas, as defesas não diferem das usadas para CAT e GST e nem os danos ocasionados, o que corrobora nossos dados. A CAT, que atua sobre o peróxido de hidrogênio, já foi verificada para diferentes espécies de peixes como *Leiostomus xanthurus* exposto à hipóxia, sem variações na sua atividade

(COOPER et al., (2002). Outros trabalhos, como o Johannsson et al. (2018) para *Cyphocharax abramoides*, mostram que a exposição à hipóxia e análise de diferentes tecidos podem expressar respostas de formas variadas, assumindo que os períodos de hipóxia são mais agressivos ao animal. Campos et al. (2019) mostram que *Apistogramma agassizzi* e *Pirrhullina af. brevis* aumentam seus sistemas de defesa antioxidantes para os cenários climáticos com elevações de temperatura e CO₂ tanto para GST como CAT. Para *Dicentrarchus labrax L* sobre efeitos de temperatura, seus sistemas de defesa também aumentam (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2014); o que também foi observado por Vinagre et al., (2012) e Maisano et al., (2016). Além disso, Rosa et al. (2016), em experimentos com *Chiloscyllium punctatum* expostos a elevadas temperaturas, CO₂ e pH baixos, mostra que as defesas variam nos tecidos, para o músculo as defesas da CAT e SOD não se expressaram em comparação com as defesas do cérebro. Mas, encontrou diferenças significativas em seu estudo anterior para os cenários de 2100 (ROSA et al., 2014).

O aumento das defesas pode estar relacionado aos danos da LPO. Ela ocorre em consequência do estresse oxidativo, decorrente da oxidação de ácidos graxos poli insaturados, quando seus níveis de danos estão elevados, mostra que as enzimas de defesa não foram suficientes para lidar com as EROS (RINALDI et al., 2002; ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2014; VAN DER OOST et al., 2003). De acordo com Campos et al. (2019), apesar do aumento do sistema de defesas antioxidantes, ele pode não ser suficiente para minimizar os danos ocasionados em lipoperoxidação. No presente trabalho foi possível observar a diminuição da GST e LPO tecidual no fígado e nenhuma resposta para CAT, o que nos permite compreender que o animal teve o sistema de produção das EROS reduzido, não ocorrendo elevação das enzimas antioxidantes. Isso possibilita que não apresentem capacidade das defesas antioxidantes quando expostos no cenário extremo como condições elevadas para temperatura e CO₂ e sob condições de hipóxia. Para algumas espécies, essa resposta possui uma curta duração do sistema antioxidante, seguida de declínio e estabilização das enzimas e danos.

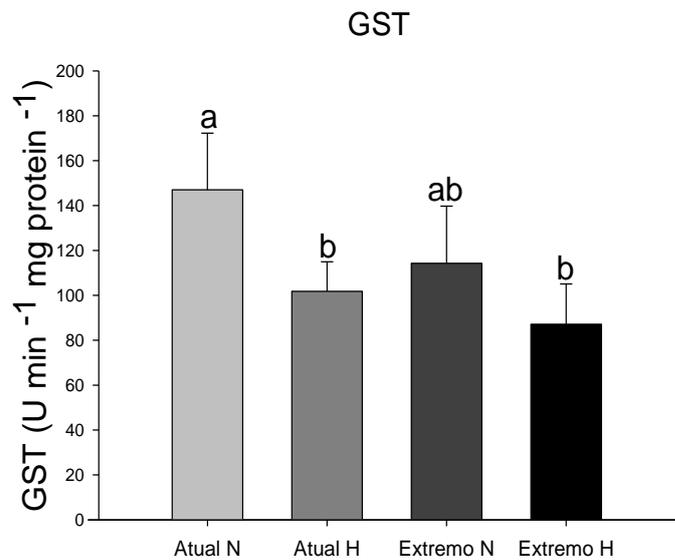


Figura 4. Atividade enzimática da GST no fígado do *C. macropomum* após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia. Letras diferentes significam diferença estatística no mesmo cenário e entre os cenários (two-way ANOVA, $p < 0,05$). Valores são média \pm SEM (n=6)

Fonte: Autoria própria

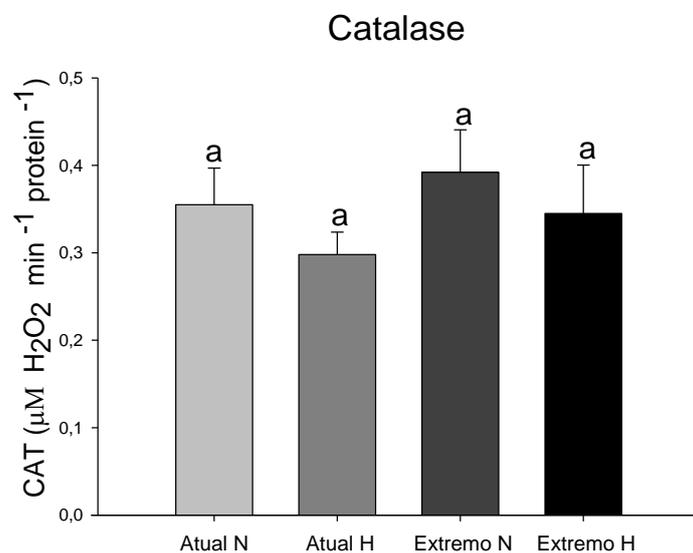


Figura 5. Atividade enzimática da CAT no fígado do *C. macropomum* após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia. Letras diferentes significam diferença estatística no mesmo cenário e entre os cenários (two-way ANOVA, $p < 0,05$). Valores são média \pm SEM (n=6).

Fonte: Autoria própria

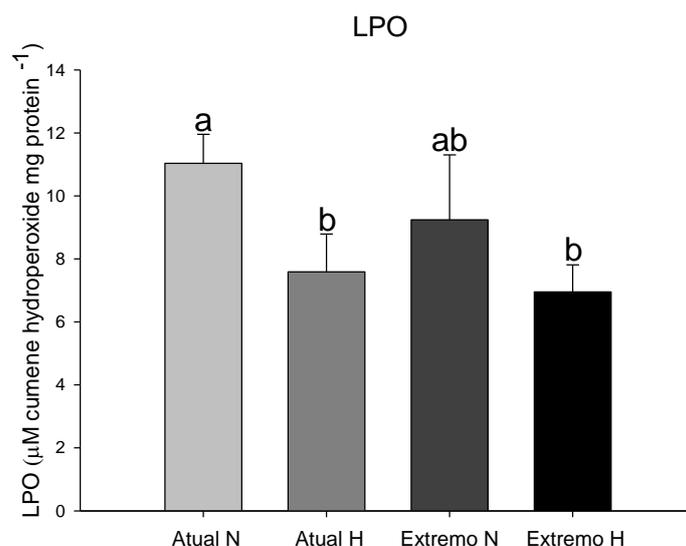


Figura 6. Atividade da LPO no fígado do *C. macropomum* após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia. Letras diferentes significam diferença estatística no mesmo cenário e entre os cenários (two-way ANOVA, $p < 0,05$). Valores são média \pm SEM ($n=6$).

Fonte: Autoria própria

4.6 Cinética enzimática da LDH após exposição ao cenário extremo e hipóxia

A cinética da LDH no coração dos animais expostos ao cenário atual e extremo mostrou diferença significativa ($p < 0,001$) (Figura 7) após 30 dias de exposição. Os animais expostos ao cenário atual apresentaram diferença para normóxia e hipóxia ($p < 0,001$), com elevação da K_m quando submetidos à hipóxia. Para o cenário extremo, não ocorreu diferença significativa entre as duas exposições em normóxia e hipóxia, mas ocorreu diferença entre os dois cenários em normóxia ($p < 0,001$). Os animais no cenário extremo em normóxia apresentaram aumento do perfil de saturação da LDH ($p < 0,050$) para as concentrações utilizadas. Apesar de não mostrarem diferença significativa no cenário extremo entre os dois grupos, eles mantiveram a K_m da LDH elevadas.

Para a cinética da LDH no músculo branco, ocorreu diferença no cenário atual entre normóxia e hipóxia ($p < 0,001$) (Figura 7), mostrando um aumento da K_m quando os animais foram submetidos à respirometria em hipóxia. Isso também foi observado entre os cenários atual e extremo em normóxia; para o cenário extremo, a K_m da LDH manteve-se elevada, o que foi igualmente notado quando os animais estavam em hipóxia, mostrando, assim, uma baixa afinidade da enzima pelo substrato.

Muitos estudos já foram desenvolvidos a respeito das propriedades da LDH nos organismos, com suas diferentes isoformas. Sabe-se que as suas isoformas operam simultaneamente no citoplasma, o qual desempenha funções diferenciadas e pode apresentar alterações na sua cinética após exposição a diferentes temperaturas, baixas concentrações de oxigênio e altas de CO₂ (ZAKHARTSEV et al., 2004). Várias espécies de peixes desenvolveram mecanismos de defesa adaptativos para enfrentar as alterações as variações climáticas tanto para temperatura como CO₂, mecanismos que podem modificar a sua fisiologia e morfologia (STOREY, 2016; ALMEIDA-VAL; SCHWANTEST; VAL, 1991). Estudos realizados por Almeida-Val et al. (1991), verificaram como a temperatura e pH influenciam diretamente nas propriedades da LDH e na K_m do tambaqui. Para o peixe *Genus Sphyraena*, foram observadas diferenças na K_m após exposição a diferentes temperaturas (ZAKHARTSEV et al., 2004). Os dados do presente estudo se assemelham aos de Dragan (2014) para coração e músculo branco, após exposição de 30 dias do tambaqui aos diferentes cenários com diferenças para temperatura e aumentos de CO₂.

Storey (2016) descreve que a LDH é uma das enzimas mais utilizadas para investigar os efeitos da temperatura na catálise enzimática, bem como mutações gênicas. Sabendo que as variações ambientais estão intimamente relacionadas à distribuição e sobrevivência de espécies, a adaptação de proteínas à temperatura como a LDH, e o perfil de saturação do piruvato para designar a K_m , tem sido alvo de estudos para saber como tais variações de temperatura e CO₂ podem influenciar no seu funcionamento (SOMERO, 2010; NIKCEVIC et al., 2017; PANEPUCCI et al., 2000). Estudos desenvolvidos com *Slamo trutta*, após exposição térmica, obtiveram respostas variáveis para a K_m da LDH, conforme as diferentes temperaturas de aclimação, o que mostra que a atividade da enzima está relacionada com a temperatura podendo ser danosa a sua atividade (NIKCEVIC et al., 2017). Para *Rhinelepis strigosa* exposto à normóxia e hipóxia, a K_m da LDH apresentou diferenças conforme as variações de aclimação, mostrando que diferentes flutuações do oxigênio podem resultar em mudanças na atividade enzimática da LDH, tanto a temperatura como as variáveis de concentração de oxigênio e CO₂ podem ser letais as respostas fisiológicas de espécies (PANEPUCCI et al., 2000). Rosa et al. (2016), para *Chiloscyllium punctatum*, observaram maior atividade da LDH para temperaturas elevadas e pH baixo. Para Ferreira, Almeida-Val e

Schawantes (1991) ao estudarem as adaptações de 27 espécies de peixes amazônicos, observaram que elevados níveis de temperatura, baixa concentração de oxigênio e elevados níveis de CO₂, dentre as espécies verificadas 93% apresentaram expressões para a LDH sob tais condições.

O presente estudo apresentou respostas da K_m da LDH elevadas para o cenário extremo para coração e músculo branco se comparado ao controle, ao passo que, no trabalho de Dragan (2014), valores para músculo se mantiveram elevados quando esses animais estavam no cenário extremo em normóxia. Quando em hipóxia, os valores se mostraram elevados para o presente estudo, indicando que a enzima apresenta dificuldades ao se ligar ao piruvato, quanto maior o valor de K_m , menor é sua afinidade ao substrato (NELSON; COX, 2014). O que nos mostra que a espécie pode ser suscetível a mudanças climáticas, de modo a apresentar vulnerabilidade a tais variações ambientais e, conseqüentemente, provocar dificuldades adaptativas.

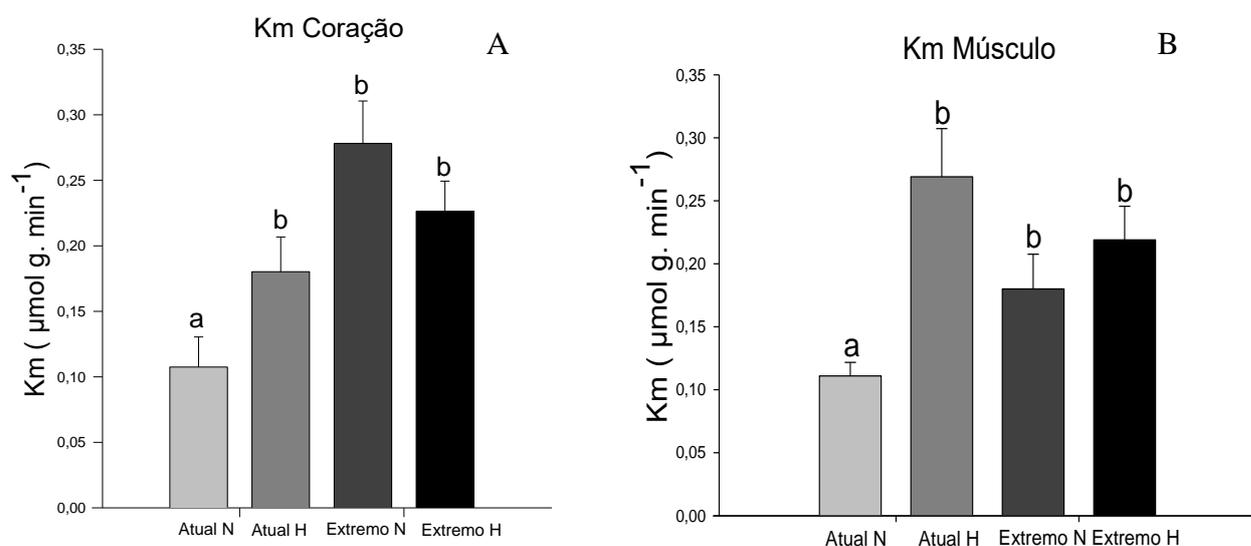


Figura 7. Cinética da LDH no coração (A) e músculo (B) do *C. macropomum* após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia. Letras diferentes significam diferença estatística no mesmo cenário e entre os cenários (two-way ANOVA, $p < 0,05$). Valores são média \pm SEM ($n=6$).

Fonte: Autoria própria

4.7 Acetilcolinesterase após exposição aos cenários climáticos e hipóxia

As atividades do neurotransmissor (AChE) no cérebro do tambaqui foram determinadas e apresentadas na Figura 8. A atividade da acetilcolinesterase foi significativa para os animais expostos no cenário atual em normóxia e hipóxia

($p < 0,014$). Os animais expostos ao cenário extremo não apresentaram respostas significativas para os dois grupos, normóxia e hipóxia e nem diferenças entre os dois cenários.

A acetilcolinesterase funciona como um biomarcador para peixes devido a sua alta sensibilidade e a capacidade de manter sua atividade perto do seu limite máximo (ASSIS et al., 2012; KUMAR; KRISHNANI; SINGH, 2019). Encontrada nas junções neuromusculares e sinapses colinérgicas localizadas no sistema nervoso central, que atua na transmissão sináptica, impedindo disparos nas terminações nervosas (KUMAR; KRISHNANI; SINGH, 2019; MOYES; SCHULTE, 2010). Esta função da enzima depende de duas características fundamentais: sua velocidade de processamento e a localidade nas fendas, sendo capaz de degradar 300 mil moléculas de acetilcolina por minuto (CEYLAN; ERDOĞAN, 2017). A acetilcolinesterase irá atuar na desativação da acetilcolina, fazendo a hidrólise de forma rápida (SILMAM; SUSSMAN, 2005). A enzima está envolvida em diversos processos, como apoptose, inflamação e estresse (CEYLAN; ERDOĞAN, 2017). O rompimento da função nervosa proporcionado pela enzima ocorre pelo acúmulo da acetilcolina na fenda sináptica, o que provoca a perda de AChE e podendo levar o animal à morte (ASSIS et al., 2012). Um estudo realizado com juvenis de *Dicentrarchus labrax L* para 30 dias de exposição em diferentes temperaturas mostra que a espécie aumenta a capacidade das atividades para AChE e apresenta aumento das antioxidantes e danos em LPO (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2014). Hogan (1971) observou para AChE em Bluegills, que seus níveis estavam diretamente relacionados com a temperatura, oxigênio e CO₂ na água. Para *Danio rerio* apresentou ótima atividade para altas temperaturas e pH alcalinos para músculo e cérebro (MARINHO et al., 2019).

Estudo com tambaqui e AChE a diferentes exposições como óleo mostra que a atividade da enzima diminui drasticamente (KOCHHANN et al., 2015), sendo também observado para AChE no tambaqui exposto a pesticidas (ASSIS et al., 2008). Para *Tapes decussatus* e *Tapes laeta*, mostra-se inibição da AChE para ambas as espécies, principalmente em temperaturas alevadas e condições de hipóxia (MAISANO et al., 2016). Estudos com *Oncorhynchus mykiss* expostos à hipóxia mostram que a atividade da AChE se mantém elevada (HØY et al., 1991).

No presente trabalho é possível observar que os valores da atividade da AChE (Figura 8) não diferem de outros cenários, somente no controle, e reduzindo

no cenário extremo, apontando que possivelmente havia um acúmulo de ACh nas fendas sinápticas. Campos et al., (2019) mostram que *Apistogramma agassizzi* e *Pyrrhulina af. brevis* aumentaram a AChE nos cenários climáticos extremos, sugerindo que altas temperaturas e CO₂ provocam distúrbios de modo a afetar o sistema colinérgico. Høy et al. (1991) descrevem que a deficiência no oxigênio aumenta o efeito inibitório da AChE para algumas espécies, sendo verificada no nosso trabalho a redução no cenário extremo. Rosa et al. (2016), para *Chiloscyllium punctatum*, observaram que as respostas da AChE eram maiores quando os animais estavam sob condições de temperatura elevadas e pH baixos. No presente estudo, foi possível observar que os níveis da AChE se mantiveram semelhantes indicando possíveis acúmulos nas fendas.

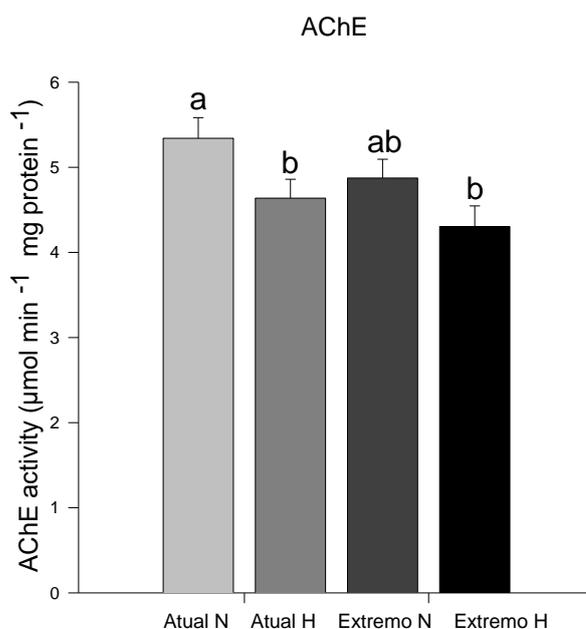


Figura 8. Atividade de acetilcolinesterase cerebral do *C. macropomum* após exposição de 30 dias aos cenários climáticos (IPCC, 2014) atual e extremo e períodos de hipóxia. Letras diferentes significam diferença estatística no mesmo cenário e entre os cenários (two-way ANOVA, $p < 0,05$). Valores são média \pm SEM (n=6)

Fonte: Autoria própria

5. CONCLUSÃO

O tambaqui apresentou uma baixa plasticidade térmica, sendo possível observar que os cenários climáticos e condições de hipóxia podem condicionar estresse metabólico na espécie afetando as suas respostas fisiológicas. A espécie parece ser mais vulnerável a mudanças climáticas e condições de hipóxia para o cenário extremo. Apresenta alterações metabólicas para as defesas antioxidantes,

havendo um enfraquecimento quando mantidos nos cenários extremos, isso também foi observado para a K_m , que apresentou inibição a altas concentrações de piruvato, sendo mais elevada em condições de hipóxia. Para a AChE, as respostas mantiveram-se quase inalteradas, porém indicando que havia um acúmulo de ACh nas fendas. Esses resultados mostram que os cenários climáticos futuros podem ter impactos severos no desempenho da espécie, de modo que o aumento da temperatura e CO_2 afetam diretamente o animal, uma vez que, o tabaqui é uma espécie de alto valor comercial, isso implicaria tanto na conservação da espécie como na economia local.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, H. R. Drogas que atuam sobre os sistemas nervosos somático e autonômico. In: BOOTH, N, H.; McDONALD, L. E. **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 57-109, 1992.
- ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of Temperature in Juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) Biomarker Responses and Behaviour: Implications for Environmental Monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, n. 1, p. 45-55, 2014.
- ALMEIDA-VAL, V. M.; VAL, A. L. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry**, v. 105, n. 1, p. 21-28, 1993.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; SCHWANTEST, M. L. B.; VAL, A. L. LDH isozymes in amazon fish- II. Temperature and pH effects on LDH Kinetic properties from *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 98B, n. 1, p. 79-86, 1991.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; CHIPPARI-GOMES, A.; LOPES, N. P. Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the amazon. **The Physiology of Tropical Fishes**, v. 21, p. 443-455, 2006.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; FARIAS, I. P. Respiration in fish of the Amazon: Metabolic adjustments to chronic hypoxia. In: VAL, AL; ALMEIDA-VAL, VMF; RANDALL, DJ (eds). **Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon**. INPA, Manaus, p. 257-271, 1996.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; HOCHACHKA, P. W. Hypoxia tolerance in amazon fishes: status of an under-explored biological "goldmine". In: HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L.; SICK, T.; ROSENTHAL, M.; THILLART, G. V. den. (Eds). **Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation**. Boca Raton, CRC Press, p. 435-445, 1993.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; FARIAS, I. P.; PAULA-SILVA, M. N.; DUNCAN, W. P.; VAL, A. L. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlid. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 1257-1263, 1995.
- ALTIERI, A. H.; GEDAN, K. B. Climate change and dead zones. **Global Change Biology**, v. 21, n. 4, p. 1395-1406, 2015.
- ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. ed. Brasília: Sociedade Civil Mamirauá /CNPq, p. 186, 1998.
- ARBOGAST, S.; REID, M. Oxidant activity in skeletal muscle fibers is influenced by temperature, CO₂ level, and muscle-derived nitric oxide. **Physiol Regul Integr Comp Physiol**, p. 287: 698-705, 2004.

ARGOS, P.; ROSSMANN, M. G.; GRAU, U. M.; ZUBER, H.; FRANK, G.; TRATSCHIN, J. D. Thermal stability and protein structure. **Biochemistry**, V. 18, p. 5698-5703, 1979.

ASSIS, C. R. D.; LINHARES, A. G.; OLIVEIRA, V. M.; FRANÇA, R. C. P.; CARVALHO, E. V. M. M.; BEZERRA, R. S.; CARVALHO-JUNIOR, L. B. Comparative effect of pesticides on brain acetylcholinesterase in tropical fish. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 141–150, 2012.

BAKER, D. W.; HUDSON, M.E.; FROST, E.J.; SEWELL, M.A.. Repeated measurement of $\dot{M}O_2$ in small aquatic organisms: a manual intermittent flow respirometer using off-the-shelf components. **Journal of Applied Physiology**, v. 124, n. 3, p. 741-749, 2017.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods**. 2. ed. New York: Grune e Stratton, p. 160, 1975.

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

BROWN, B. A. Hematology principles and procedures. 2. ed. Philadelphia: **Lea e Febiger**, p. 358, 1976.

BOYD, C. E.; TUCKER C. S. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. **International Center for Aquaculture and Aquatic Environment**. Auburn University, p.183, 1992.

BOYD, C.E. **Water quality in ponds for aquaculture**. Hatay: Shrimp Mart, p. 482, 1996

CADIZ, L.; ZAMBONINO-INFANTE, J. L.; QUAZUGUEL, P.; MADEC, L. Metabolic response to hypoxia in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) displays developmental plasticity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 215, p. 1–9, 2018.

CAMPOS, D. F.; JESUS, T. F.; KOCHHANN, D.; HEINRICHS-CALDAS, W.; COELHO, M. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Metabolic rate and thermal tolerance in two congeneric Amazon fishes: *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 and *Paracheirodon simulans* Géry, 1963 (Characidae). **Hydrobiologia**, v. 789, n. 1, p. 133-142, 2017.

CAMPOS, D. F.; BRAZ-MOTA, S.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. VAL, A. L. Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. **Ecological Indicators**, v. 101, n. September 2018, p. 533-540, 2019.

CÂNDIDO, L. A.; MANZI, A. O.; TOTA, J.; TEIXEIRA-SILVA, P. R.; MORENO-SILVA, F. S.; SANTOS, R. M. N.; CORREIA, F. W. S. O clima atual e futuro da Amazônia nos cenários do IPCC: a questão da savanização. **Ciência e Cultura**, v.

59, n. 3, São Paulo, p. 1-4, 2007.

CAO, L.; CALDEIRA, K. Atmospheric CO₂ stabilization and ocean acidification. **Geophysical Research Letters**, v. 35, n. 19, p. 1–5, 2008.

CEYLAN, H.; ERDOĞAN, O. Cloning, expression, and characterization of human brain acetylcholinesterase in *Escherichia coli* using a SUMO fusion tag. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, n. 1, p. 77–87, 2017.

CHIPPARI-GOMES, A. R. et al. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 141, n. 3, p. 347–355, 2005.

CLOW, K. A.; SHORT, C. E.; DRIEDZIC, W. R. Low levels of extracellular glucose limit cardiac anaerobic metabolism in some species of fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 220, n. 16, p. 2970–2979, 2017.

COLLINS, G. M.; CLARK, T. D.; CARTON, A. G. Physiological plasticity v. inter-population variability: Understanding drivers of hypoxia tolerance in a tropical estuarine fish. **Marine and Freshwater Research**, v. 67, n. 10, p. 1575–1582, 2016.

COOPER, R. U.; CLOUGH, L. M.; FARWELL, M. A.; WEST, T. L. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 279, n. 1–2, p. 1–20, 2002.

DRAGAN, F.G. Respostas fisiológicas e metabólicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) às alterações climáticas previstas pelos diferentes cenários do IPCC para o ano de 2100. Dissertação de mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Biologia de Água Doce e Pesca Interior, Manaus, Amazonas.p. 1-82, 2014

DRIEDZIC, W. R.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and the fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). **Journal of Experimental Zoology**, n. 274, vol. 6, p. 327-333, 1996.

ESTEVEES, F.A. Fundamentos de Limnologia. **Interciência**, ed. 2,p. 1-602. 1998.

ELLMAN, G.; COURTNEY, K.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, p. 88–90, 1961.

FICKE, A. D.; MYRICK, C. A.; HANSEN, L. J. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. **Rev Fish Biol Fisheries**, p. 17:581-613, 2007.

FIELDS, P. A.; GRAHAM, J. B.; ROSENBLANT, R. H.; SOMERO, G. N. Effects of expected global climate change on marine faunas. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 10, p. 361–367, 1993.

FERREIRA, M.S. 2006. **Certificado de vigor físico para o tabaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818)**. Dissertação (Mestrado em Biologia Tropical de Recursos Naturais). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2006

GUPTA, R. C. Classification and Uses of organophosphates and Carbamates. **Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds**, p. 5–24, 2006.

HERMES-LIMA, M.; MOREIRA, D. C.; RIVERA- INGRAHAM, G.; GIRAUD-BILLOUD, M.; GENARO-MATTOS, T. C.; CAMPOS, E. G. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 1122–1143, 2015.

HEINRICHS-CALDAS, W. **Expressão do gene HIF-1a durante a exposição do ciclídeo *Astronotus crassipinnis* (Heckel, 1840) à hipóxia**. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 50p, 2016.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. The adaptation of enzymes to temperature. **Comparative Biochemistry And Physiology**, v. 27, n. 3, 1968.

HOGAN, J. W. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 5, n. 4, p. 347-353, 1971.

HOY, T.; HORSBERG, T. E.; WICHSTROM, R. Inhibition of acetylcholinesterase in rainbow trout following dichlorvos treatment at different water oxygen levels. **Aquaculture**, v. 95, p. 33-40, 1991.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiol**, vol. 14. p. 312- 322, 2006.

HALLIWELL, B. **The antioxidant paradox**. *Lancet*, p. 355: 1179–1180, 2000.

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

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). Summary for Policymakers. In: SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K.B.; TIGNOR, M.; MILLER, H.L. (Eds). **Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, United States of America, p. 1-17, 2007.

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

JOHANSSON, O. E.; GIACOMIN, M.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; CAMPOS, D.; BRAZ-MOTA, S.; HEINRICHS-CALDAS, W.; BAPTISTA, R.; WOOD, C. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Does hypoxia or different rates of re-oxygenation after hypoxia induce an oxidative stress response in *Cyphocharax abramoides* (Kner 1858), a Characid fish of the Rio Negro?. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, v. 224, p. 53–67, 2018.

JUNK, W. J. Aquatic habitats in Amazonia. **The Environmentalist**. n. 3, vol. 5, p. 24-35, 1983.

JUNK, W.J.; BAYLEY, P. B.; SPARKS, R.E. The flood-pulse concept in river-floodplain systems. In: DODGE, D. (Ed.) **Proceedings of the International Large River Symposium. Canadian Special Publications of Fisheries and Aquatic Science**. v. 106, p. 110-127, 1989.

KAMPER, E. J.; ZIJLSTRA, W. G. Erythrocytometric methods and their standardization. **Clin Chim Acta**, v. 6, p. 538-542, 1964.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferase. **The journal of biological chemistry**, p. 251, 6183-6188, 1976.

KRAMER, D. L.; MANLEY, D.; BOURGEOIS, R. The effect of respiratory mode and oxygen concentration on the risk of aerial predation in fishes. **Canadian Journal of Zoology**, n. 61, vol. 3, p. 653-665, 1983.

KOCHHANN, D.; CAMPOS, D. F.; VAL, A. L.. Biochemical and behavioral responses of the Amazonian fish *Colossoma macropomum* to crude oil: The effect of oil layer on water surface. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 111, p. 32–41, 2015.

KUMAR, N.; KRISHNANI, K. K.; SINGH, N. P. Oxidative and Cellular Metabolic Stress of Fish: An Appealing Tool for Biomonitoring of Metal Contamination in the Kolkata Wetland, a Ramsar Site. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 3, p. 469–482, 2019.

KUO, C.; LINDBERG, C.; THOMSON, D. J. Coherence established between atmospheric carbon dioxide and global temperature. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 709–714, 1990.

LENHART, B.; STEINBERG, C. Limnologische und chemische Auswirkungen der Versauerung von Kalkarmen oberflächengewässern. **Informationsberichte bayer, Landsamt**, p. 4:1-203, 1984.

LEVEELAHTI, L. **Hypoxia inducible factor 1a in aquatic vertebrates - Temperature and ROS as potential regulators**. p. 1–68, 2013.

LEVEELAHTI, L. et al. Revisiting redox-active antioxidant defenses in response to hypoxic challenge in both hypoxia-tolerant and hypoxia-sensitive fish species. **Fish**

Physiology and Biochemistry, v. 40, n. 1, p. 183–191, 2014.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011.

MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; VINAGRE, C.. Thermal tolerance and potential impacts of climate change on coastal and estuarine organisms. **Journal of Sea Research**, v. 70, p. 32–41, 2012.

MADEIRA, D.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 324–331, 2016.

MAISANO, M.; NATALOTTO, A. N.; GIANNETTO, A.; CAPELLO, T.; OLIVA, S.; PARRINO, V.; SANFILIPPO, M.; MAURECI, A.. Influences of Environmental Variables on Neurotransmission, Oxidative System, and Hypoxia Signaling on Two Clam Species from a Mediterranean Coastal Lagoon. **Journal of Shellfish Research**, v. 35, n. 1, p. 41–49, abr. 2016.

MANDIC, M.; SPEERS-ROESCH, B.; RICHARDS, J. G. Hypoxia Tolerance in Sculpins Is Associated with High Anaerobic Enzyme Activity in Brain but Not in Liver or Muscle. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 86, n. 1, p. 92–105, 2012.

MARINHO, C. S. et al. Characterization and kinetic study of the brain and muscle acetylcholinesterase from *Danio rerio*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 222, n. December 2018, p. 11–18, 2019.

MARTINEZ, M. L. Effects of long-term hypoxia on enzymes of carbohydrate metabolism in the Gulf killifish, *Fundulus grandis*. **Journal of Experimental Biology**, v. 209, n. 19, p. 3851–3861, 2006.

MELO, J. B.; AGOSTINHO, P.; OLIVEIRA, C. R. Involvement of oxidative stress in the enhancement of acetylcholinesterase activity induced by amyloid beta-peptide. **Neuroscience Research**, v. 45, n. 1, p. 117–127, 2003.

MIRANDE, J. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotrop Ichthyol**, p. 8 (3): 385-568, 2010.

MOYES, C. P.; SCHULTE, P. M. **Princípios de Fisiologia Animal**. 2. ed. Editora Artmed, p. 792, 2010.

MURPHY, S. D. Pesticides. In: MURPHY, S. D. **The Basic Science of Poisons**, p. 519-581, 1986.

NAVARRO, J. M.; PASCHKE, K.; ORTIZ, A.; VARGAS-CHACOFF, L.; PARDO, L. M.; VALDIVIA, N. The Antarctic fish *Harpagifer antarcticus* under current temperatures and salinities and future scenarios of climate change. **Progress in Oceanography**, p. 1-15, 2018.

NIKCEVIC, M.; MICKOVIC, B.; GACIC, Z.; ZIVADINOVIC, D.. Thermal sensitivity of white muscle lactate dehydrogenase isolated from a lake trout, (*Salmo trutta*), inhabiting lake Plav, Montenegro. **Environmental Biology of Fishes**, v. 100, n. 5, p. 535–549, 2017.

NOBRE, C. A.; SAMPAIO, G.; SALAZAR, L. Mudanças climáticas e Amazônia. **Ciência e Cultura**, p. 1-6, 2007.

NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger principios de bioquímica*. 6ª.ed. São Paulo, p. 1336, 2014.

OLIVEIRA, A. M.; VAL, A. L. Effects of climate scenarios on the growth and physiology of the Amazonian fish tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Characiformes: Serrasalminidae). **Hydrobiologia**, v. 789, n. 1, p. 167–178, 2017.

PANEPUCCI, L. et al. Changes in lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities during hypoxia and after temperature acclimation in the armored fish, *Rhinelepis strigosa* (Siluriformes, Loricariidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, n. 2, p. 353–360, maio 2000.

PELSTER, B.; GIACOMIN, M.; WOOD, C. M.; VAL, A. L.. Improved ROS defense in the swimbladder of a facultative air-breathing erythrinid fish, jeju, compared to a non-air-breathing close relative, traíra. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 186, n. 5, p. 615–624, 2016.

POLAKOF, S.; MOMMSEN, T. R.; SOENGAS, J. L. Glucosensing and glucose homeostasis: from fish to mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, p. 123-149, 2011.

PORCHAS, M. M.; CÓRDOVA, L. R. M.; ENRIQUEZ, R. R. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress? **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 2, p. 158–178, 2009.

PORTNER, H. O.; KARL, D. **Ocean systems**. cap. 6, p. 411-484, 2014.

PÖRTNER, H.O.; FARRELL, A.P.. Physiology and climate change. **Science**, p. 322 (5902), 690–692, 2008.

PRADO-LIMA, M.; VAL, A. L. Transcriptomic characterization of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) exposed to three climate change scenarios. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–21, 2016.

REMEN, M.; NEDERLOF, M. A. J.; FOLKEDAL, O.; THORSHEIM, G.; SITJABOBADILLA.; PÉREZ-SÁNCHEZ, J.; OPPEDAL, F.; OLSEN, R. E. Effect of temperature on the metabolism, behaviour and oxygen requirements of *Sparus aurata*. **Aquaculture Environment Interactions**, v. 7, n. 2, p. 115–123, 2015.

RICHARDS, J. G.; WANG, Y. S.; BRAUNNER, C. J.; GONZALEZ, R. J.; PATRICK, M. L.; SCHULTE, P. M.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.

Metabolic and ionoregulatory responses of the Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*, to severe hypoxia. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 177, n. 3, p. 361–374, 2007.

ROSA, R.; PAULA, J. R.; SAMPAIO, E.; PIMENTEL, M.; LOPES, A. R.; BAPTISTA, M.; GUERREIRO, M.; SANTOS, C.; CAMPOS, D.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; CALADO, R.; DINIZ, M.; REPOLHO, T. Neuro-oxidative damage and aerobic potential loss of sharks under elevated CO₂ and warming. **Marine Biology**, v. 163, n. 5, p. 1–10, 2016.

ROPKE, C. P.; AMADIO, S.; ZUANON, J.; FERREIRA, E. J. G.; DEUS, C. P.; PIRES, T. H. S.; WINEMILLER, K. O. Simultaneous abrupt shifts in hydrology and fish assemblage structure in floodplain lake in the central Amazon. **Scientific reports**, p. 1-10, 2017.

SADAUSKAS-HENRIQUE, H. **Efeitos subletais da poluição por petróleo e derivados sobre peixes da Amazônia (Amazonas, Brasil)**. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior). Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, p. 195, 2014.

SAMPAIO, E.; MAULVAULT, A. L.; LOPES, V. M.; PAULA, J. R.; BARBOSA, V.; ALVES, R.; PAUSÃO-FERREIRA, P.; REPOLHO, T.; MARQUES, A.; ROSA, R. Habitat selection disruption and lateralization impairment of cryptic flatfish in a warm, acid, and contaminated ocean. **Marine Biology**, v. 163, n. 10, p. 1–10, 2016.

SANTOS, R.B.S.; TAVARES-DIAS, M. Células sanguíneas e resposta hematológica de *Oxydoras niger* (Pisces, Doradidae) oriundos da bacia do médio rio Solimões, Estado do Amazonas (Brasil), naturalmente parasitados. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, n. 36, vol. 4, p. 283-292, 2011.

SANTOS, G.; FERREIRA, E.; ZUANON, J. Peixes comerciais de Manaus. **PróVarzea- Projeto Manejo dos Recursos Naturais da Várzea**, 2006.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995–1014, 2005.

SILMAN, I.; SUSSMAM, J. Acetylcholinesterase: classical and nonclassical functions and pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 5, p. 293-302, 2005.

SIOLI, H. **Amazônia. Fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais**. Petrópolis: Vozes, 1990.

SIOLI, H. The Amazon and its affluent: hydrographic, morphology of the river courses and river types. In: Sioli, H. (Ed.). **The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin**. Dordrecht: Dr W. Junk Publishers, 1984. p. 127-165.

SOMERO, G. N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. **J Exp Biol**, p. 213: 912-920, 2010.

SOMERO, G. N.; DONG, Y. Temperature adaptation of cytosolic malate dehydrogenases of limpets (genus *Lottia*): differences in stability and function due to minor changes in sequence correlate with biogeographic and vertical distributions. **Journal of Experimental Biology**, p. 2012: 169-177, 2009.

STOREY, K. B. Comparative enzymology—new insights from studies of an “old” enzyme, lactate dehydrogenase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 199, p. 13–20, set. 2016.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: FMRP-USP, 2004.

TAVARES-DIAS, M.; DAMATTA, R.A.; RIBEIRO, M.L.S.; CARVALHO, T.M.U.; NASCIMENTO, J.L.M. **Caracterização morfológica e funcional de leucócitos de peixes**. Manaus: Embrapa, 2009.

TÕUGU, V. Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and inhibition. **Current Medicinal Chemistry Central Nervous System Agents**, p. 155-170, 2001.

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

VAL, A.L.; SILVA, M.N.P.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, v.33, n.2, p. 107-114, 1998

VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. The Amazon ichthyofauna. *In*: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. (Eds). **Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects**. Springer, Verlang, Berlim, Heidelberg. p. 29-30, 1995.

VAL, A.L. Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n. 28, p. 1119-1127, 1995.

VAL, A.L.; PAULA-SILVA, M.N.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. Estresse em peixes – Ajustes Fisiológicos e Distúrbios Orgânicos. *In*: RANZAN-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.d.I.A.P. (Eds.). **Sanidade de Organismos Aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 75-88.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**, v. 23, p. 274–279, 2012.

YANIK, T.; ASLAN, I. Impact of global warming on aquatic animals. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 50, n. 1, p. 353–363, 2018.

WELKER, A.F.; MOREIRA, D.C.; CAMPOS, E.G.; HERMES-LIMA, M. 2013. Role of redox metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen

availability. **Comp Biochem Physiol Part A Molec Integ Physiol**, n. 165, p. 384-404, 2013.

ZAR, J.K. **Biostatistical analysis**. 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1984.

ZAKHARTSEV, M.; JOHANSEN, T.; PORTNER, H. O.; BLUST, R. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. **Journal of Experimental Biology**, v. 181, n. 1, p. 213–232, 2003.

ZHANG, G. et al. Modulated expression and enzymatic activities of Darkbarbel catfish, *Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and reoxygenation. **Chemosphere**, v. 151, p. 271–279, 1 maio 2016.