



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA NORMAL SUPERIOR
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

Efeitos da aclimação à hipóxia crônica e intermitente na tolerância do ciclídeo-anão
Apistogramma agassizii

ANNE TEREZINHA FERNANDES DE SOUZA

Manaus – AM
2021

ANNE TEREZINHA FERNANDES DE SOUZA

Efeitos da aclimatação à hipóxia crônica e intermitente na tolerância do ciclídeo-anão
Apistogramma agassizii

Orientadora: Cristina Motta Buhrnheim, Dra.

Coorientador: Waldir Heinrichs Caldas, MSc.

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC
apresentado como parte dos requisitos para
obtenção do grau de Licenciado em Ciências
Biológicas pela Universidade do Estado do
Amazonas

Manaus – AM
2021

Ficha Catalográfica

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

A613e Souza, Anne Terezinha Fernandes de
Efeitos da aclimação à hipóxia crônica e intermitente na tolerância do ciclídeo- anão *Apistogramma agassizii* / Anne Terezinha Fernandes de Souza. Manaus : [s.n], 2021.
34 f.: il.; 31 cm.

TCC - Graduação em Ciências Biológicas - Licenciatura
- Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2021.
Inclui bibliografia
Orientador: Cristina Motta Buhnheim
Coorientador: Waldir Heinrichs Caldas

1. Hipóxia. 2. *Apistogramma agassizii*. 3. Metabolismo aeróbico e anaeróbico. I. Cristina Motta Buhnheim (Orient.). II. Waldir Heinrichs Caldas (Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV. Efeitos da aclimação à hipóxia crônica e intermitente na tolerância do ciclídeo- anão *Apistogramma agassizii*


Elaborado por Jeane Macelino Galves - CRB-11/463

AVALIAÇÃO DA BANCA AVALIADORA

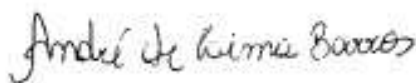
BANCA EXAMINADORA	NOTAS ATRIBUÍDAS
a) Professor orientador:	9,5
b) 1º avaliador(a):	9,1
c) 2º avaliador(a):	9,6
MÉDIA DA NOTA (a+b+c)/3	9,4

MÉDIA DA NOTA: 9,4

Manaus, 12 de julho de 2021

ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA AVALIADORA

Coordenador MSc. Waldemar K. Caldas



1º Avaliador - Dr. André Lima Barros



2º Avaliadora – MSc. Yasmin Tavares Dantas

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe (*In memoriam*), que está acompanhando todo o meu esforço e sucesso como uma estrela que brilha no céu, Marina Fernandes Marques, por sempre me incentivar a correr atrás dos meus sonhos, por ser meu exemplo de luta e dedicação, por todo amor e ensinamento que foram fundamentais para o meu desenvolvimento pessoal. Gostaria muito de comemorar essa conquista pessoalmente com a Sra, mas sei que apesar de tudo sempre estaremos juntas. Essa conquista é toda nossa, mãe.

À professora Dra. Vera Val por sua orientação, atenção, ensinamentos e por abrir as portas para uma área inusitada e importante na minha carreira acadêmica.

Ao meu pai científico e coorientador, Dinho (Waldir Caldas), por sempre acreditar no meu potencial, até mesmo quando eu desacreditava, por sempre me fazer rir, me deixar desesperada achando que não íamos conseguir finalizar o projeto e me mostrar que em tudo podemos dar um jeito, você foi fundamental para eu chegar até aqui. Muito obrigada por me fazer descobrir o mundo da pesquisa e ajudar durante esses anos juntos, sou muito grata por todo o ensinamento e amizade.

À minha orientadora, Cristina Motta, que aceitou entrar nessa jornada comigo, por todas as disciplinas feitas juntas e por mostrar a todos os seus alunos o seu amor pela zoologia, você é uma pessoa muito iluminada.

Ao meu bem, Italo Almeida, por sempre estar comigo, por me apoiar e incentivar. Você foi o melhor ouvinte que eu poderia ter nas minhas diversas prévias e foi o ombro amigo que mais me ajudou durante todo esse percurso.

Às minhas amigas da graduação, Natália Leão e Leticia Oka, por toda conversa, companheirismo, grupos de estudos, desesperos horas antes das provas e apresentações, pelas diversas reuniões no google meets no período de quarentena, esses cinco anos de graduação foram mais leves com vocês. Serei eternamente grata por termos nos conhecido nas primeiras semanas aula e continuar juntas até agora, vocês foram meu porto seguro em muitos momentos e a melhor dupla que eu poderia ter me relacionado na UEA, que venham muitos anos de amizade juntas.

Às minhas amigas Angélica Soares, Milena Bragança, Janaina Thaís e Mayara Kadmah obrigada por todo apoio, incentivo e festinhas que deixaram cada momento mais leve, divertido e prazeroso.

A todos os colegas do LEEM pelos seminários e debates que ajudaram direta ou indiretamente nesse trabalho. Ao INPA por disponibilizar o laboratório usado nessa pesquisa.

Ao projeto INCT-ADAPTA, fomentado pelas agências CNPq, CAPES e FAPEAM, pelo recurso para a elaboração desse projeto.

RESUMO

Os peixes amazônicos apresentam inúmeras estratégias ligadas à captação de oxigênio em respostas aos períodos de escassez do mesmo em meio aquático, levando-os ao desenvolvimento de diversos mecanismos adaptativos, sejam eles fisiológicos, morfológicos, bioquímicos ou genéticos. Peixes amazônicos encontram ausência de oxigênio nos seus habitats durante o período sazonal e/ou diário e como respostas a essas variações, os efeitos fisiológicos da hipóxia crônica e intermitente ainda são mal compreendidos. Este estudo buscou avaliar as respostas metabólicas do ciclídeo-anão *Apistogramma agassizii* afetadas pela exposição à hipóxia crônica e intermitente. Grupos de adultos do ciclídeo foram expostos à hipóxia (abaixo de $1 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) ou normóxia ($6,48 \pm 0,04 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$) por períodos que variam de 96 horas para a hipóxia crônica e de 1 a 4 semanas para hipóxia intermitente. Posteriormente o tempo de perda de equilíbrio em hipóxia, consumo de oxigênio e atividade das enzimas lactato desidrogenase e citrato sintase foram medidos após o tempo de aclimação em hipóxia de cada grupo experimental. As exposições de ciclídeos a baixa concentração de oxigênio mostraram um aumento gradativo no tempo de perda de equilíbrio da espécie, adultos aclimatados durante 4 semanas à hipóxia intermitente tiveram maiores reduções da taxa metabólica de 46% ($P = <0,0017$, $F = 38,80$) e maior *LOE* que chegou a 90 minutos ($P = <0,04$, $F = 12,265$). A redução da atividade da enzima citrato sintase, acompanhada do aumento da atividade da enzima lactato desidrogenase demonstra que o ciclídeo-anão aumenta o seu potencial anaeróbico conforme a espécie é exposta à hipóxia crônica e intermitente. Ao ser submetido à hipóxia intermitente por 4 semanas a espécie mostrou ativar o metabolismo anaeróbico com maior eficiência, onde conseguiu regular o consumo de oxigênio e as vias metabólicas, enquanto ao ser submetido à hipóxia crônica, o ciclídeo ativa apenas as vias metabólicas. Este estudo demonstra que o ciclídeo-anão *Apistogramma agassizii* possui uma grande plasticidade fenotípica para lidar com as variações de oxigênio dissolvido.

Palavras-chave: Hipóxia; *Apistogramma agassizii*; metabolismo anaeróbico e aeróbico.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Variação diária das concentrações de oxigênio dissolvido na região do Lago Catalão no mês de agosto de 2001. Adaptado.	10
Figura 2. Exemplar macho de <i>Apistogramma agassizii</i>	13
Figura 3. Exemplar fêmea de <i>Apistogramma agassizii</i>	14
Figura 4. Demonstração do sistema experimental. Tanques de aclimatação à hipóxia intermitente, contendo 15 indivíduos de <i>Apistogramma agassizii</i> cada.	17
Figura 5. Tanques de aclimatação à hipóxia crônica e normóxia, contendo 15 indivíduos de <i>Apistogramma agassizii</i> cada.	18
Figura 6. Coleta dos tecidos (músculo esquelético branco) de <i>Apistogramma agassizii</i>	18
Figura 7. Músculo esquelético branco de um indivíduo de <i>Apistogramma agassizii</i>	19
Figura 8. Indivíduos de <i>Apistogramma agassizii</i> condicionados a câmaras respirométricas.	20
Figura 9. Pressão crítica de oxigênio (PO_{2Crit}) após diferentes tempos de aclimatação à hipóxia. Dados como média \pm SEM.	23
Figura 10. Tempo para perda de equilíbrio (LOE_{hip}) de <i>Apistogramma agassizii</i> após diferentes tempos de aclimatação. Dados como média \pm SEM. Asterisco indica diferença estatística entre os diferentes tratamentos.	24
Figura 11. Taxa de consumo de oxigênio (MO_2) do <i>Apistogramma agassizii</i> após diferentes tempos de aclimatação à hipóxia. Dados como média \pm SEM. Asteriscos indicam diferenças entre o consumo de oxigênio do grupo levado à hipóxia em relação ao grupo que ficou em normóxia constante.	24

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água utilizada ao longo do experimento com <i>Apistogramma agassizii</i> . Os dados estão apresentados como média \pm SEM. ..	22
Tabela 2. Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH) e citrato sintase (CS) no músculo esquelético do <i>Apistogramma agassizii</i> (n = 6 \pm SEM) expostos à hipóxia intermitente e crônica de 96 horas.	25

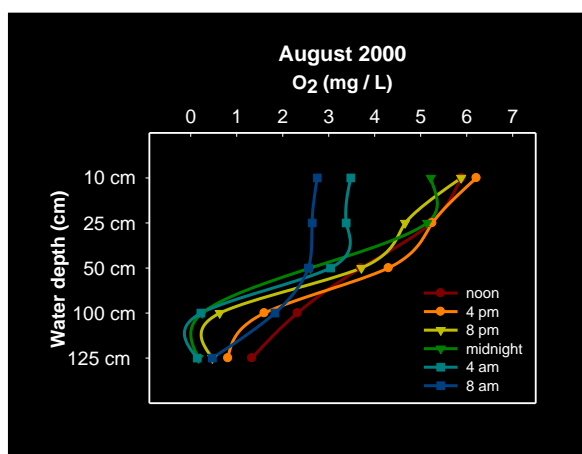
SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	7
LISTA DE TABELA.....	8
1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL.....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 AQUISIÇÃO DOS ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO.....	15
3.2 ACLIMATAÇÃO EXPERIMENTAL DE HIPÓXIA	15
3.3 TOLERÂNCIA FISIOLÓGICA.....	19
3.3.1 TAXA METABÓLICA	19
3.3.2 PERDA DE EQUILÍBRIO (LOE).....	20
3.4 ANÁLISE DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS.....	21
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
4. RESULTADOS	22
4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	22
4.2 ANÁLISE RESPIROMÉTRICA	22
4.3 AJUSTES METABÓLICOS ENZIMÁTICOS.....	25
5. DISCUSSÃO.....	25
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
7. REFERÊNCIAS.....	30

1. INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos amazônicos apresentam diferentes desafios aos organismos que neles habitam, levando-os ao desenvolvimento de diversos mecanismos adaptativos (VAL et al., 2016), um desses desafios é a variação da disponibilidade de oxigênio, uma variação físico-química que apresenta efeito direto sobre os animais aquáticos (VAL e ALMEIDA-VAL, 1996; HEINRICHS-CALDAS et al., 2019). Anualmente ocorre a mudança no ciclo das águas, resultando em períodos de enchente, cheia, vazante e seca. Nesses períodos há uma variação nos níveis de oxigênio, criando assim ambientes hipóxicos, que possuem baixas quantidades de oxigênio dissolvido, variando de concentrações de 1% a 30% ou ambientes anóxicos, onde o oxigênio dissolvido chega a 0% (VAL e ALMEIDA-VAL, 1996). Além disso, ocorrem as variações diárias, podendo ser mais críticas, variando de uma concentração supersaturada durante o dia, até concentrações que chegam a zero durante a noite (JUNK et al., 1983; VAL e ALMEIDA-VAL, 2005; SOUZA, 2017). Na figura 1 observa-se a variação diária das concentrações de oxigênio dissolvido na região do Lago Catalão (CHIPPARI-GOMES, 2002, dados não publicados) além da relação da profundidade com a disponibilidade de oxigênio.

Figura 1. Variação diária das concentrações de oxigênio dissolvido na região do Lago Catalão no mês de agosto de 2001. Adaptado.



Essas variações causam grandes impactos na distribuição dos peixes, pois os mesmos precisam desenvolver ajustes metabólicos para continuar neste habitat (HEINRICHS-CALDAS et al., 2019). A hipóxia crônica surge como resultado da eutrofização do ecossistema aquático e pode levar ao declínio da população e

mudanças na estrutura da comunidade, eliminando espécies sensíveis à hipóxia. (WU, RSS, 2002; HEINRICHS-CALDAS et al., 2019)

Peixes que se encontram em ambientes hipóxicos tentam manter o suprimento de ATP celular aumentando o transporte de O₂ ou aumentando o uso do metabolismo anaeróbico, todavia alguns organismos tolerantes conseguem reduzir as demandas de ATP por meio da depressão ativa da taxa metabólica de repouso, reduzindo os processos energeticamente caros, como a síntese de proteínas, o transporte de íons, redução na demanda de ATP celular e diversas alterações fisiológicas (BICKLER e BUCK, 2007 ; WOOD et al., 2007 , 2009 ; DE BOECK et al., 2013), sendo essa uma estratégia de diminuir o requerimento pelo oxigênio. No estudo de Heinrichs-Caldas e colaboradores (2019), foi observado que a espécie de ciclídeo *Astronotus crassipinnis*, uma espécie altamente tolerante à hipóxia, apresenta uma alta capacidade de redução da taxa metabólica (57%), quando exposto à hipóxia, característica que está relacionada com a tolerância da espécie, corroborando com dados encontrados por Chippari-Gomes e colaboradores (2005) que observaram que o ciclídeo *Symphysodon aequifasciatus* apresentou uma redução metabólica de apenas 32%, característica que o classificou como uma espécie pouco tolerante a baixa concentração de oxigênio.

Das estratégias de adaptação identificadas nos peixes, a ativação do metabolismo anaeróbico e a supressão da demanda de energia, dependem de ajustes na atividade de enzimas marcadoras. Almeida-Val et al. (1995) observaram uma redução significativa na atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) no fígado, coração e cérebro do ciclídeo *Cichlosoma amazonarum* exposto a hipóxia severa (± 30 mmHg) por um período de 51 dias. Todavia, nenhuma modificação da atividade da enzima LDH foi observada no músculo esquelético. A supressão das atividades da LDH em alguns peixes, como o *C. amazonarum*, pode ser devida a supressão geral das rotas anaeróbicas como resultado da redução total do metabolismo desta espécie de peixe.

A distribuição dessas isoenzimas da Lactato Desidrogenase (LDH) nos tecidos dos ciclídeos da Amazônia está relacionada com a habilidade desses animais em tolerar ambientes hipóxicos (ALMEIDA-VAL et al., 1995). Estudos realizados *in vitro* com sistemas de mamíferos revelaram que muitos genes induzidos pela hipóxia são regulados por uma proteína de ligação do DNA, conhecida como fator induzido pela hipóxia (HIF-1 do inglês – *Hypoxia Inducible*

Factor) (WANG & SEMENZA, 1993; BUNN & POYTON, 1996). Essa proteína, quando recebe o sinal de um sensor de oxigênio por meio de uma reação de oxirredução, ativa a transcrição de genes induzíveis pela hipóxia, tais como uma variedade de enzimas glicolíticas, como a hexoquinase, lactato desidrogenase, piruvato quinase (SEMENZA et al., 1994, 1996; ARANY et al., 1996; CHIPPARIGOMES, 2002).

A tolerância orgânica pode surgir a partir da exposição a um estressor ainda em estágio embrionário e larval, conferindo alterações na maquinaria gênica que, mais tarde irão permitir a sobrevivência biológica. A hipóxia intermitente ou crônica pode causar redução no consumo de ração, redução no crescimento, aumento de doenças e mortalidade em peixes (REMEN, et al. 2013; YANG et al., 2013), e seus efeitos são mal compreendidos. Há evidências de que a exposição a episódios repetidos de hipóxia compromete o crescimento em algumas espécies de peixes (salmão do Atlântico, *Salmo salar* e bagre do sul, *Silurus meridionalis*) (STIERHOFF et al., 2003; MCNATT e RICE, 2004), além de auxiliarem na tolerância a esse estressor em algumas espécies. Ho e Burggren (2012) observaram que a exposição de indivíduos adultos de peixes-zebra (*Danio rerio*) à hipóxia crônica, em diferentes períodos de tempo, confere resistência à prole, entretanto seus resultados mostraram que essa resistência era dependente do tempo, pois casais expostos à uma única semana de hipóxia produziram larvas de peixes-zebra menos resistentes a uma primeira exposição à hipóxia aguda, enquanto os casais aclimatados de 2 a 4 semanas tiveram efeitos diretos nas larvas, através de alterações no comprimento do corpo e resistência à hipóxia, corroborando com dados encontrados por Gracey e colaboradores (2001) que observou a regulação positiva de genes envolvidos com a hipóxia aumenta dramaticamente após 6 dias de exposição à hipóxia.

Os peixes da família Cichlidae são frequentemente estudados devido à sua complexidade comportamental, além de possuírem uma morfologia diversa, abrangendo espécies de médio (*Cichla* spp) a pequeno porte (*Apistogramma* spp), permitindo que espécies dessa família sejam encontradas nos diferentes ambientes aquáticos da região, além de serem animais altamente tolerantes à hipóxia. *Apistogramma agassizii* é uma espécie de ciclídeo-anão encontrado em correntes de água clara e preta, ao longo do rio Amazonas-Solimões, é um ciclídeo de pequeno porte onde em fase adulta o macho pode chegar a ter 60 mm e a fêmea 30 mm, ocupa ambientes de lagos e igarapés, os indivíduos da espécie vivem em

associação com substratos como troncos, raízes e folhas, utilizando-os como local de refúgio e forrageamento. Os machos de *A. agassizii* são maiores, mais coloridos e com as nadadeiras mais prolongadas em comparação com as fêmeas (Figuras 2 e 3) (OLIVEIRA, J. C., 2016). Por terem cores atraentes e possuírem pequeno porte, os membros da espécie apresentam importância no mercado ornamental (MENDONÇA & CAMARGO, 2006). Além disso, as espécies do gênero *Apistogramma* formam hierarquias de dominância, o que os torna territorialistas por natureza, sendo esta uma das suas características mais importantes para os estudos de hipóxia, pois os indivíduos dessa espécie conseguem tolerar esse estressor e, na sua grande maioria, não demonstram mecanismo de fuga.

Figura 2. Exemplar macho de *Apistogramma agassizii*.



Fonte: OLIVEIRA, 2016

Figura 3. Exemplar fêmea de *Apistogramma agassizii*.



Fonte: OLIVEIRA, 2016

Com as previsões de aquecimento global, aumento da urbanização, poluição e outras causas antrópicas, as variações de oxigênio nos ambientes podem se tornar mais intensas em algumas regiões amazônicas, resultando no aumento da temperatura máxima e na maior incidência e duração de períodos de hipóxia, aumentando os desafios para peixes que habitam os ambientes tropicais. Com isso, é importante entender como esses animais modulam o metabolismo anaeróbico em períodos severos de hipóxia crônica e intermitente e, como essa exposição pode, ou não, aumentar a tolerância desses animais a esse estressor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da aclimação à hipóxia crônica e intermitente sobre o metabolismo e a tolerância do ciclídeo-anão *Apistogramma agassizii*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o quanto consumo de oxigênio (MO_2), perda de equilíbrio (LOE) e pressão crítica de oxigênio (P_{crit}) está relacionado à tolerância

Apistogramma agassizii após a aclimação à hipóxia crônica e intermitente;

- Observar se há relação entre a tolerância adquirida e a variação na atividade da Lactato Desidrogenase e Citrato Sintase do ciclídeo-anão *Apistogramma agassizii* após a exposição à hipóxia crônica e intermitente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aquisição dos animais e aclimação

Noventa indivíduos de *Apistogramma agassizii* de ambos os sexos foram comprados de um fornecedor comercial na loja Fish & Cia Aquários, localizada na cidade de Manaus, Amazonas. Foram transportados em sacos plásticos para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), localizado no Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), onde foram mantidos em tanques de polietileno, com capacidade de 150 L (Fortlev), sob aeração constante em temperatura ambiente ($26,8 \pm 0,45$ °C) e mudanças regulares de água, por um período de 30 dias, para aclimação. Durante a aclimação, os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial contendo 47,5% de proteína até 24 horas antes de iniciarmos o experimento. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as normas do Guia Brasileiro de Uso e Cuidado de Animais do CONCEA, sob autorização do Comitê de Ética do INPA (CEUA/INPA, protocolo nº 054/2017). Os experimentos seguintes foram realizados em ambientes fechados, durante a manhã, das 08:00 às 11:00 horas.

3.2 Aclimação experimental de hipóxia

Os noventa exemplares de *A. agassizii* foram divididos em seis tanques de aclimação, cada tanque continha 15 indivíduos. Os peixes foram colocados em aquários separados, os grupos experimentais (n= 10 por tempo) foram expostos à hipóxia intermitente durante diferentes períodos de tempo (1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas), à hipóxia crônica de 96 horas e um grupo controle que ficou em normóxia constante durante as 4 semanas de aclimação (Figura 4 e 5).

Utilizamos uma quantidade de 5 indivíduos a mais caso houvesse morte de algum deles ao decorrer do experimento.

Vinte e quatro horas antes do experimento deu-se início ao período de aclimatação dos peixes nos tanques experimentais. Os tanques eram dotados de sistema de aeração e de temperatura controlada ($25,8 \pm 0,29$ °C).

Após as 24 horas da transferência dos peixes para os tanques de aclimatação a concentração de oxigênio foi reduzida, para iniciar a hipóxia nos tanques experimentais, a partir do borbulhamento de nitrogênio gasoso para diminuir a concentração de oxigênio, por meio de deslocamento, até atingir concentrações em torno de 1,00 mg/L. A concentração de oxigênio escolhida foi abaixo do PO_{2crit} dessa espécie ($1,46 \pm 0,08$ mgO₂.L⁻¹), para garantir que os peixes estavam ativando o metabolismo anaeróbico neste período de aclimatação. A hipóxia crônica foi mantida borbulhando a água com gás nitrogênio. Depois de atingir a concentração de oxigênio desejada ($0,77 \pm 0,08$ mgO₂.L⁻¹) o fluxo de gás foi interrompido e os peixes foram mantidos nessa condição por 96 horas consumindo o oxigênio disponível, sendo que, no decorrer desse período, foi medido, a cada 24 horas, a concentração de oxigênio e temperatura da água, com sondas YSI-55, tanto no grupo em hipóxia crônica quanto no grupo em normóxia. A hipóxia intermitente foi mantida usando a mesma metodologia da hipóxia crônica. Após a concentração desejada ($0,84 \pm 0,05$ mgO₂.L⁻¹) ser atingida, os peixes foram mantidos na condição experimental por 3 horas pela manhã, das 08:00 até às 11:00 horas, durante 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas e 1 semana sendo que, no decorrer desse período, foi medido, a cada 1 hora, a concentração de oxigênio e temperatura da água, tanto no grupo em hipóxia quanto no grupo em normóxia. Ao atingir às 3 horas em hipóxia intermitente, a aeração foi retornada no grupo experimental, o que durou $19,60 \pm 0,37$ min, até atingir os níveis normais de oxigenação ($6,48 \pm 0,04$ mgO₂.L⁻¹). Os peixes foram impedidos de respirar na superfície da água com uma barreira de plástico bolha. Em todos os experimentos de aclimatação à hipóxia, os peixes foram alimentados.

No último dia de aclimatação, depois de decorrer às 96 horas em hipóxia crônica, foram removidos 8 indivíduos aleatoriamente de cada tanque, pesados (normóxia: $0,41 \pm 0,03$ g e hipóxia crônica: $0,40 \pm 0,05$ g) e transportados para a sala respirométrica, depois de 24 horas de recuperação foram realizadas as análises de tolerância, por meio da perda de equilíbrio (LOE), e a taxa metabólica

dos animais, conforme os indivíduos iam sendo liberados das câmaras respirométricas eles eram eutanasiados por um corte na medula espinhal. O mesmo procedimento foi realizado com o grupo de hipóxia intermitente, no último dia de aclimação depois de decorrer às 3 horas de exposição à hipóxia intermitente, foram removidos 8 indivíduos aleatoriamente de cada tanque, pesados (normóxia: $0,93 \pm 0,09$ g e hipóxia intermitente: $1,02 \pm 0,11$ g) e transportados para a sala respirométrica para análises de tolerância através do LOE , MO_2 e PO_{2crit} , no final da análise os peixes eram eutanasiados. Em seguida esses indivíduos retornaram para o seu tanque experimental e foi deixado decorrer 24 horas de recuperação, após esse tempo 10 indivíduos foram escolhidos de forma aleatória e mortos, foram coletadas amostras do músculo esquelético branco (Figura 6 e 7), congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C para posterior análise enzimática.

Figura 4. Demonstração do sistema experimental. Tanques de aclimação à hipóxia intermitente, contendo 15 indivíduos de *Apistogramma agassizii* cada.



Figura 5. Tanques de aclimação à hipóxia crônica e normóxia, contendo 15 indivíduos de *Apistogramma agassizii* cada.



Figura 6. Coleta dos tecidos (músculo esquelético branco) de *Apistogramma agassizii*.



Figura 7. Músculo esquelético branco de um indivíduo de *Apistogramma agassizii*.



3.3 Tolerância fisiológica

3.3.1 Taxa metabólica

Taxa de consumo de oxigênio (MO_2) e tensão crítica de oxigênio (PO_{2crit}) foram determinadas utilizando a metodologia de trabalhos anteriores (CAMPOS et al., 2016; HEINRICHS-CALDAS et al., 2019). Quando finalizava os dias de exposição de um dos grupos experimentais (96 horas, 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas) oito indivíduos eram retirados aleatoriamente do tanque para serem mantidos durante a noite em câmaras respirométricas, até a recuperação do seu manuseio, as câmaras possuíam água com aeração e temperatura controlada em 28°C. Foi utilizado DAQ-M (Loligo System, Tjele, Dinamarca) que trabalha em ciclos de recirculação, onde para medir o consumo de oxigênio foram utilizadas as seguintes etapas: descarga (180 s), espera (120 s), e medição (300 s), cada etapa possui um tempo a se determinar, ou seja, um “loop”, e cada “loop” durou 10 minutos. O teste de PO_{2crit} durou aproximadamente 4 horas para cada peixe. O ciclo de recirculação foi controlado pelo software AutoResp (Loligo System, Tjele, Dinamarca). A medição de oxigênio nas câmaras ocorreu com a utilização de cabos ópticos que se conectam a OXY-4 ou Witrox-4 (Loligo System, Tjele, Dinamarca) e pontos de sensores que estavam ligados nas câmaras (Figura 8).

Para o cálculo do MO_2 foi utilizado a seguinte fórmula:

$$MO_2 = -\Delta O \cdot V_{resp} \cdot B^{-1},$$

Onde,

ΔO é a taxa de variação na concentração de oxigênio

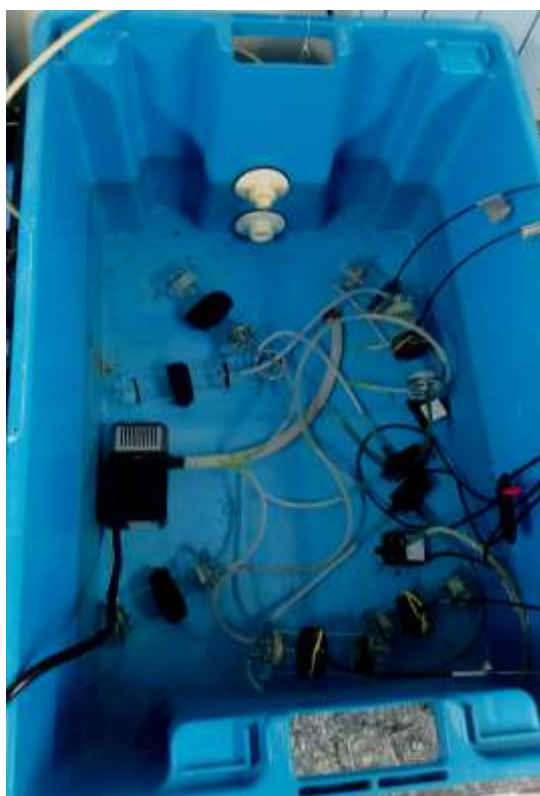
V_{resp} é o volume da câmara respirométrica

B é a massa do indivíduo (kg).

3.3.2 Perda de equilíbrio (LOE)

Após as análises de consumo de oxigênio, o oxigênio foi reduzido dentro das câmaras respirométricas até uma concentração de $0,4 \text{ mg} \pm 0,05 \text{ O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$ para as análises do tempo de perda de equilíbrio (LOE) e o tempo que os indivíduos permaneceram nessa condição foi monitorado até quando observado qualquer sinal de perda de equilíbrio. Nestas condições foram anotados o tempo e a concentração de oxigênio. Sequencialmente, o peixe foi removido do tanque experimental e colocado em um tanque bem oxigenado para recuperação.

Figura 8. Indivíduos de *Apistogramma agassizii* condicionados a câmaras respirométricas.



3.4 Análise das atividades enzimáticas

Para as análises das atividades enzimáticas, foi retirada uma amostra do músculo esquelético branco, sendo homogeneizado em solução tampão específica e centrifugados para coleta do sobrenadante. Posteriormente foi adicionado o substrato para o início da reação, buscando a detecção da atividade para a Lactato Desidrogenase (LDH; EC 1.1.27) e Citrato Sintase (CS; EC 4.1.3.7). Para o músculo, 0,01 g de tecido foram homogeneizados em um tampão imidazólico 10x (imidazol 50 mM, EDTA 1 mM e 1% Triton x-100 em pH 7,4) e centrifugados a 10.000xg em uma Centrífuga Refrigerada 5430 R (Eppendorf, Hamburg, GE) durante 15 minutos a 4 °C. Os protocolos para as reações enzimáticas são as seguintes:

- **LDH (EC 1.1.27)** - foi realizado em placa de 300 µL de 96 poços contendo a solução tampão com 0,15 mM de NADH, 1 mM de KCN e 50 mM de imidazol, pH 7,4 a 25°C. Foi utilizado para o substrato 1 mM (baixa concentração) de piruvato para as reações da LDH, as taxas de inibições do piruvato foram calculadas para obter os valores de inibição da LDH.
- **CS (EC 4.1.3.7)** - Sua solução tampão foi: 0,25 mM de DTNB (ácido dithio-bis-2-nitrobenzóico) 75 mM base de Tris, pH 8,0 a 25°C, onde as reações foram iniciados com 0,04 mM acetil-Co-A e teve como substrato 0,5 mM de ácido oxalacético.

Foram realizadas triplicatas a 28°C, a determinação das atividades enzimáticas foi feita usando o espectrofotômetro de placa SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), a proteína total foi quantificada após o ensaio de Bradford (Bradford, 1976).

3.5 Análise estatística

As análises estatísticas para todas as metodologias foram obtidas por intermédio do programa SigmaStat (v. 3.5) e os gráficos foram feitos no SigmaPlot (v. 12.0). Os valores das atividades enzimáticas foram examinados por meio da Análise de Variância – critério único (Anova one-way), seguindo por testes comparativos de comparação múltipla de Tukey e Holm-Sidak. O nível de significância foi mantido de

95% ($p > 0,05$) em todos os testes. Os dados estão apresentados como média e SEM ($n=10$).

4. RESULTADOS

4.1 Parâmetros físico-químicos

Não houve variação na temperatura entre os grupos experimentais. A concentração de oxigênio dissolvido mostrou diferença estatística do grupo controle com o grupo de hipóxia intermitente (H1, H2, H3 e H4) e crônica (todos $P = <0,001$, $F = 12,69$) (Tabela 1). Durante o experimento de aclimação à hipóxia intermitente, três fêmeas morreram no grupo experimental de 4 semanas e duas fêmeas e um macho morreram no grupo controle.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água utilizada ao longo do experimento com *Apistogramma agassizii*. Os dados estão apresentados como média \pm SEM.

Tratamento	Oxigênio (mg/L^{-1})	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)
Normóxia	$7,15 \pm 0,19$	$25,21 \pm 1,32$
Hipóxia Crônica (96h)	$0,74 \pm 0,09$	$27,68 \pm 0,20$
H1 Intermitente	$0,89 \pm 0,04^*$	$24,98 \pm 2,56$
H2 Intermitente	$0,88 \pm 0,04^*$	$25,23 \pm 0,25$
H3 Intermitente	$0,85 \pm 0,05^*$	$25,24 \pm 0,22$
H4 Intermitente	$0,83 \pm 0,05^*$	$25,24 \pm 0,24$

(*) Representa diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos. ($p < 0,05$)

4.2 Análise Respirométrica

Os indivíduos de *Apistogramma agassizii* expostos a diferentes tempos de aclimação à hipóxia, expressaram respostas diferentes no tempo de perda de equilíbrio (LOE_{hip}) e na taxa de consumo de oxigênio (MO_2). No presente trabalho, o PO_{2crit} (Figura 9) não mostrou modulação, não apresentando diferença estatística entre os grupos analisados ($P = <0,113$, $F = 0,792$).

Foi observado um aumento gradativo no tempo de perda de equilíbrio nos ciclídeos, ao compararmos os diferentes tempos de aclimação observou-se que quanto maior foi o tempo de exposição à hipóxia, maior foi o LOE_{hip} para essa espécie. Indivíduos aclimatados durante 4 semanas à hipóxia intermitente apresentaram um aumento no LOE_{hip} quando comparado com a normóxia ($P = <0,04$, $F = 12,265$).

É possível observar nas figuras 10 e 11 que dentro do próprio grupo de hipóxia intermitente tivemos resultados diferentes, os grupos experimentais que ficaram durante 2 semanas e 4 semanas tiveram resultados semelhantes, visto que durante a segunda semana em hipóxia intermitente os ciclídeos modularam mais o metabolismo anaeróbico, aumentando o seu tempo de LOE_{hip} e diminuindo o seu consumo de oxigênio quando comparado com o grupo em normóxia, já na terceira semana de aclimação não houve modulação na taxa de consumo de oxigênio.

Figura 9. Pressão crítica de oxigênio (PO_{2Crit}) após diferentes tempos de aclimação à hipóxia. Dados como média \pm SEM.

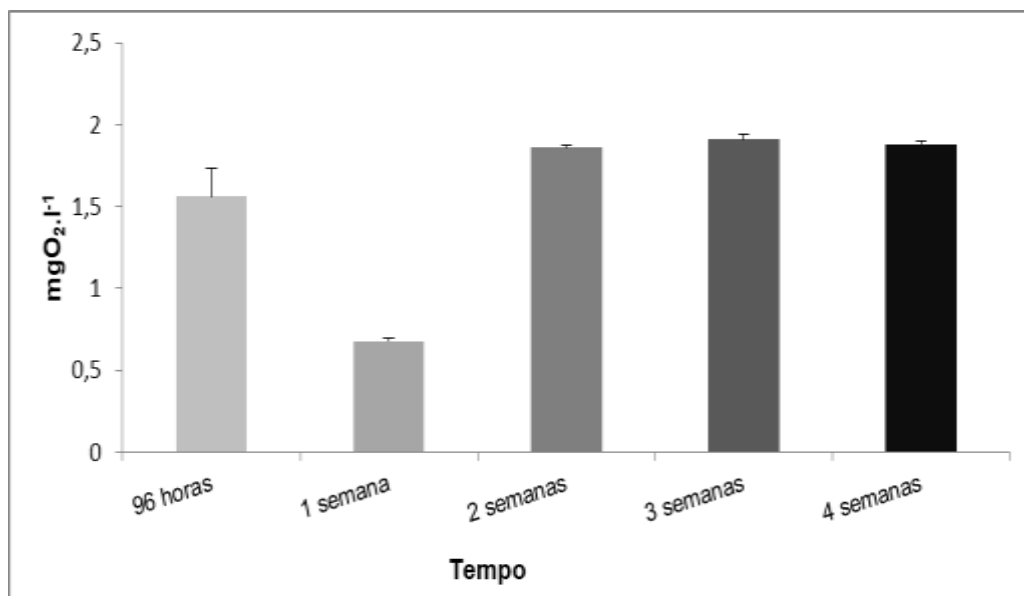


Figura 10. Tempo para perda de equilíbrio (LOE_{hip}) de *Apistogramma agassizii* após diferentes tempos de aclimação. Dados como média \pm SEM. Asterisco indica diferença estatística entre os diferentes tratamentos.

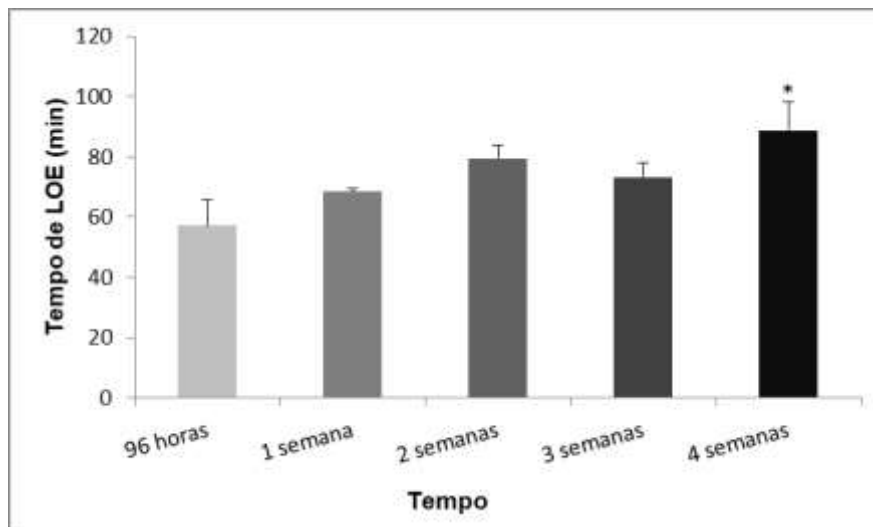
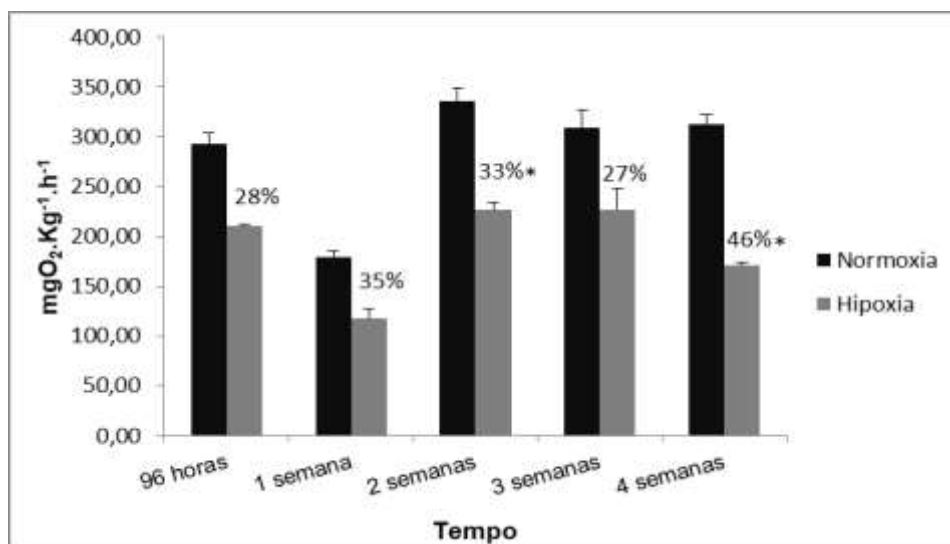


Figura 11. Taxa de consumo de oxigênio (MO_2) do *Apistogramma agassizii* após diferentes tempos de aclimação à hipóxia. Dados como média \pm SEM. Asteriscos indicam diferenças entre o consumo de oxigênio do grupo levado à hipóxia em relação ao grupo que ficou em normóxia constante.



Os resultados mostram que a exposição prolongada a hipóxia intermitente modula as respostas metabólicas dos indivíduos para um metabolismo anaeróbico, os grupos que ficaram em hipóxia intermitente durante 2 e 4 semanas tiveram as maiores reduções da taxa metabólica, sendo o grupo de 2 semanas com 33% e o grupo de 4 semanas com uma alta redução de 46% ($P = <0,007$, $F = 10,14$; $P =$

<0,0017, F= 38,80, respectivamente) (Figura 11) quando comparado com os demais grupos e maior tempo de LOE_{hip} (90 minutos) (Figura 10).

4.3 Ajustes metabólicos enzimáticos

A atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) aumentou após a segunda semana de exposição à hipóxia intermitente (P= <0,0015, F= 30,046) (Tabela 2), enquanto no grupo de hipóxia crônica houve uma diminuição da atividade da enzima quando comparado com o grupo controle (P= <0,071, F= 4,068). Foram calculadas a razão entre a atividade da enzima CS em relação à LDH (CS/LDH) para o músculo, observa-se nesta tabela que a razão da CS/LDH são menores que 1 no músculo dessa espécie (P= <0,002, F= 21,872), refletindo no aumento da atividade da LDH.

Tabela 2. Atividade enzimática da lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH) e citrato sintase (CS) no músculo esquelético do *Apistogramma agassizii* (n = 6 ± SEM) expostos à hipóxia intermitente e crônica de 96 horas.

Músculo	Músculo		
	LDH	CS	CS/LDH
Normóxia	2,65 ± 0,42	0,43 ± 0,14	0,16 ± 0,06
96h	0,63 ± 0,071	0,17 ± 0,02*	0,27 ± 0,05*
H1	0,51 ± 0,28	0,12 ± 0,02*	0,23 ± 0,05*
H2	4,05 ± 0,001*	0,31 ± 0,05*	0,08 ± 0,01*
H3	4,3 ± 0,007*	0,18 ± 0,01*	0,04 ± 0,01*
H4	5,6 ± 0,001*	0,09 ± 0,01*	0,02 ± 0,009*

(*) Representa diferença estatística significativa entre os diferentes tratamentos. (p<0,05)

5. DISCUSSÃO

Os ciclídeos apresentam uma grande diferença quanto à tolerância à hipóxia. Alguns peixes são altamente tolerantes à hipóxia, podendo até passar horas em anóxia, como o *Astronotus ocellatus* (MUUSZE et al., 1998) e o *Astronotus crassipinnis* (CHIPPARI-GOMES et al., 2005; HEINRICHS-CALDAS et al., 2019). No presente trabalho observamos que o *A. agassizii* é moderadamente tolerante à hipóxia, assim como os ciclídeos *Heros* sp e *Geophagus* aff. *altifrons* (CHIPPARI-GOMES et al., 2000) e a espécie *Symphysodon aequifasciatus* (CHIPPARI-GOMES et al., 2005).

Os valores para os parâmetros da água sofreram variação entre os diferentes grupos de aclimação, no entanto, eles permanecem dentro do padrão de qualidade de água para os peixes (WETZEL, 1993; ARANA, 1997). Os ciclídeos possuem a capacidade de suportar a variação no oxigênio dissolvido desde que o mesmo se mantenha entre o tolerável para a determinada espécie. Levando isto em consideração, apesar da diferença de oxigênio dissolvido entre os tratamentos, o mesmo permaneceu abaixo do PO_{2crit} da espécie estudada, auxiliando na ativação do metabolismo anaeróbico sem que o *A. agassizii* perdesse o equilíbrio dentro do tanque experimental, estando dentro da faixa de tolerância da espécie.

Três fêmeas do grupo experimental de hipóxia intermitente por 4 semanas, morreram durante o experimento e duas fêmeas e um macho do grupo controle também morreram. Como todas as fêmeas que morreram estavam ovadas, sugerimos que o seu gasto energético era maior e, por isso, houve uma maior taxa de mortalidade. Um trabalho sobre custo fisiológico da reprodução foi realizado com fêmeas de *Drosophila melanogaster* (mosca) mostrando que fêmeas que produziram ovos foram mais susceptíveis aos estresses oxidativo e gasto energético (SALMON *et al.* 2001). Diversos trabalhos foram produzidos buscando avaliar o esforço dos animais no período reprodutivo e, de modo geral, os resultados mostraram mais estresse oxidativo nos animais com maior esforço reprodutivo e menos estresse oxidativo nos animais em reprodução, especialmente quando se trata das fêmeas (DOWLING e SIMMONS 2009; METCALFE e MONAGHAN 2013; BLOUNT *et al.* 2016). Algumas fêmeas que se encontravam no período reprodutivo, ao decorrer da exposição à hipóxia intermitente morreram, mas como o N utilizado no projeto foi baixo para avaliar a taxa de mortalidade, é preciso dar continuidade aos estudos por meio de novos experimentos e realizar mais análises bioquímicas, genéticas e fisiológicas, para complementar o entendimento dos mecanismos que levam à diminuição da sobrevivência das fêmeas de *A. agassizii* expostas à baixa concentração de oxigênio.

Nossos resultados mostram que o mecanismo de redução da taxa metabólica em hipóxia ocorreu em ambas às aclimações, entretanto, o consumo de oxigênio desses indivíduos é diferente entre os grupos de aclimação, o que já era esperado, uma vez que a hipóxia crônica e a hipóxia intermitente têm efeitos diferentes sobre os metabolismos desses animais. No grupo de 2 semanas observamos um aumento na redução na taxa metabólica de 33%, e um aumento na redução da taxa

metabólica de 46% no grupo de 4 semanas. A diminuição da taxa de consumo de oxigênio é uma resposta para sustentar o metabolismo de animais aclimatados à hipóxia (BOROWIEC et al., 2015, 2018), refletindo no impacto combinado de diversas alterações fisiológicas, tais como o ajuste no metabolismo anaeróbico e redução da demanda de ATP celular. Nosso resultado corrobora com o trabalho de Chippari-Gomes e colaboradores (2005), os autores observaram que a espécie menos tolerante, *S. aequifasciatus*, teve uma redução menor, de 32% e a mais tolerante, *A. crassipinnis*, diminuiu o consumo de oxigênio significativamente, onde depois foi observada que a espécie possui uma alta redução da taxa metabólica de 57% (HEINRICHS-CALDAS et al., 2019), quanto maior a redução do MO_2 , mais tolerante é a espécie, permitindo a exploração de habitats onde a hipóxia é comum, como as áreas de várzea.

O LOE é uma medida utilizada para verificar a tolerância fisiológica de peixes a estressores, como temperatura ou oxigênio, por exemplo (BOROWIEC et al., 2015; CAMPOS et al., 2019). Como esperado, houve aumento no tempo de perda de equilíbrio nos animais, aclimatados à hipóxia intermitente, indicando que a aclimação a baixas concentrações de oxigênio e de forma prolongada aumenta a tolerância desse animal à hipóxia, resultados semelhantes foram encontrados no trabalho de Borowiec e colaboradores (2015), ao analisarem as estratégias fisiológicas de *Fundulus heteroclitus* observaram que a concentração de oxigênio no momento da perda de equilíbrio dos animais expostos à hipóxia severa foi reduzida em animais aclimatados à hipóxia por sete dias, indicando uma tolerância maior para indivíduos desse grupo, o que pode ser associado com uma melhora na capacidade oxidativa e maior eficiência a captação do oxigênio (BOROWIEC et al., 2015, 2018).

A LDH é uma enzima indicadora de metabolismo anaeróbico. Desse modo, era esperado que sua atividade fosse aumentada à medida que o oxigênio diminuísse. A citrato sintase (CS) é uma enzima indicadora do metabolismo aeróbico, participando da primeira etapa do ciclo de Krebs, possuindo maior atividade quando o organismo precisa de mais energia. Como esperado, sua atividade foi reduzida significativamente nos grupos experimentais, apesar de ter mostrado um resultado mais elevado no grupo que ficou sendo aclimatado em hipóxia crônica. Observando os valores da CS, notamos que no grupo de 2 e 3 semanas em hipóxia intermitente, mostraram um aumento na atividade da enzima,

indicando que nesse período apesar da atividade da LDH estar aumentando, há uso das vias aeróbicas.

A redução da atividade da enzima CS, acompanhada do aumento da atividade da enzima LDH em ambos os grupos experimentais, demonstra que a espécie aumenta seu potencial anaeróbico conforme as exposições à hipóxia crônica e intermitente aumentam. Em hipóxia crônica a atividade da enzima LDH se mostrou maior quando o ciclídeo foi colocado à baixa concentração de oxigênio constante, corroborando com os dados encontrados no trabalho de Obirikorang e colaboradores (2020), os autores observaram que a exposição à hipóxia crônica da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) traz menos prejuízo à espécie do que a hipóxia intermitente, além de mostrar uma maior adaptação da espécie à baixa concentração de oxigênio por um tempo prolongado. Nos presentes resultados (tabela 2), observa-se que a hipóxia crônica por requerer mais da espécie, consegue modular o seu metabolismo rapidamente, fazendo com que o ciclídeo aumente a ativação do metabolismo anaeróbico. Porém, a hipóxia intermitente difere da hipóxia crônica como um estressor, e oferece oportunidade de recuperação durante os períodos de hipóxia, por isso durante as primeiras semanas em hipóxia intermitente os valores de LDH eram menores. Resultados semelhantes foram encontrados por Borowiec e colaboradores (2015) que concluíram que a hipóxia intermitente aumenta a tolerância de *Fundulus heteroclitus* e que os mecanismos utilizados são distintos daqueles usados na hipóxia constante.

As variações na expressão da LDH foram descritas por estarem relacionadas com as preferências metabólicas e características adaptativas dos peixes aos ambientes hipóxicos da Amazônia (ALMEIDA-VAL et al., 1993). O músculo branco é um tecido preferencialmente anaeróbico e como era de se esperar houve aumento na atividade da enzima LDH. Segundo Hochachka & Somero (1984) as enzimas glicolíticas possuem níveis maiores no músculo branco do que em qualquer outro tecido ou órgão de um vertebrado.

A razão CS/LDH nos indica que o músculo branco do ciclídeo-anão *A. agassizii* é um tecido anaeróbico, uma vez que o resultado dessa razão ficou abaixo de 1, o que nos indica a capacidade natatória de arranque, visto que essa espécie é territorialista, resultados semelhantes foram observados por Chippari-Gomes e colaboradores (2002) ao analisar nove espécies de ciclídeos que tiveram o mesmo resultado na razão CS/LDH e MDH/LDH.

Em um trabalho realizado por Chippari-Gomes e colaboradores (2005) foi observado que duas espécies de ciclídeos, quando expostas à hipóxia, apresentam respostas diferentes frente a esse estressor. As duas espécies estudadas (*Astronotus crassipinis* e *Symphysodon aequifasciatus*) apresentam, como estratégias, a diminuição no metabolismo aeróbico e o aumento no metabolismo anaeróbico, sendo que a espécie *Astronotus crassipinis* apresentou maior resposta anaeróbica, relacionada ao aumento da atividade da enzima anaeróbica Lactato Desidrogenase (LDH) e diminuição da enzima aeróbica Citrato Sintase (CS), o que configurou esta espécie como a mais tolerante entre as duas, concluindo-se que a tolerância desses animais está relacionada ao seu habitat e estilo de vida. Apesar da espécie estudada não ser a mais tolerante dentre os ciclídeos, observamos que possui os mesmos mecanismos de ativação das vias anaeróbica, mostrando a sua adaptação e tolerância frente ao estressor que é a hipóxia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho investigou os efeitos de aclimação à hipóxia crônica e intermitente no metabolismo celular do ciclídeo-anão *Apistogramma agassizii*. A exposição à hipóxia intermitente mostrou ativar o metabolismo anaeróbico da espécie com maior eficiência tendo uma maior atividade da LDH e redução da atividade da CS após 4 semanas de aclimação, entretanto, ao ser submetido a hipóxia crônica, o ciclídeo ativa as vias anaeróbicas através da regulação enzimática. Observamos que existem diferentes estratégias para lidar com a exposição à hipóxia crônica e intermitente. O *A. agassizii* mostrou desenvolver uma tolerância orgânica relacionada com o metabolismo anaeróbico, pois o grupo que foi exposto à hipóxia por 1 semana apresentou um *LOE* menor quando comparado ao grupo de 4 semanas (90 minutos), ativando o metabolismo anaeróbico por meio da depressão metabólica e aumento da atividade da enzima LDH, indicando uma maior plasticidade fenotípica para lidar com as variações do oxigênio dissolvido, sem a necessidade de ativação do metabolismo aeróbico, resultado observado pela não modulação do PO_{2crit} e diminuição da atividade da enzima CS.

A aclimação à hipóxia intermitente aumenta a tolerância do ciclídeo-anão *A. agassizii* e os mecanismos envolvidos parecem ser distintos daqueles da hipóxia

crônica. Os resultados aqui apresentados mostram que a hipóxia intermitente modula tanto regulação metabólica, quanto a diminuição do consumo de oxigênio e aumento do tempo de perda de equilíbrio em hipóxia, enquanto a exposição à hipóxia crônica parece estar relacionada mais com a regulação metabólica. Os peixes que são rotineiramente expostos à hipóxia intermitente em seu habitat natural, como o ciclídeo-anão, podem usar estratégias exclusivamente desenvolvidas para lidar com a hipóxia intermitente. À medida que a exposição a hipóxia aumentar nos ambientes aquáticos, será necessário avaliar como esse padrão de exposição à hipóxia influencia nos organismos aquáticos, principalmente naqueles indivíduos que se encontram no período reprodutivo, onde o estresse oxidativo é maior. Esses resultados nos mostram que é necessário analisar quais os efeitos da hipóxia sobre as adaptações fisiológicas e bioquímicas em diferentes sexos sejam no período reprodutivo, ou não, a fim de entender os mecanismos que levam a tolerância da espécie.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L.; HOCHACHKA, P. W. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: Status of a under-explored biological “goldmine”. *In* **Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation**. 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 cichlids. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 28: 1257-1263. 1995.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F. *et al.* Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. 125: 219–226. 2000.
- ARANA, L. V. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. 1ª edição. UFSC, Florianópolis, 166p. 1997.
- ARANY, Z.; HUANG, L.E.; ECKNER, R. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the América**, 93: 12969-12973. 1996.
- BICKLER, P.E.; BUCK, L.T. Hypoxia Tolerance in Reptiles, Amphibians, and Fishes: Life with Variable Oxygen Availability. **Annual Review of Physiology**. 69: 145-70. 2007.
- BOROWIEC, B.G.; DARCY, K.L.; GILLETTE, D.M.; SCOTT, G.R. Distinct physiological strategies are used to cope with constant hypoxia and intermittent hypoxia in killifish

(*Fundulus heteroclitus*). **The Journal of Experimental Biology**, vol. 218: p.1198-1211, 2015.

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

BRUICK, R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. **Genes Development**. 17: 2614–2623. 2003.

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

BUNN, H.F. & POYTON, R.O. Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. **Physiological Reviews**, 76: 839-885. 1996.

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

CHIPPARI-GOMES, A.R., PAULA-SILVA, M.N., VAI, A.L., BICUDO, I.E.P.W., ALMEIDA-VAL, V.M.F. Hypoxia tolerance in amazon cichlids. In: Almeida-Val, V.M.F.; Gonzales, R.; MacKinlay, D. (Eds.). **Evolution of Physiological and Biochemistry Traits in Fish**. 43-54. 2000.

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; VAL, A. L., ALMEIDA-VAL, V. M. F. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 141:347-355. 2005.

DE BOECK, G.; WOOD, C. M.; IFTIKAR, F. I.; MATEY, V.; SCOTT, G.R.; SLOMAN, K. A.; NAZARÉ PAULA E SILVA, M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. and VAL, A. L. Interactions between hypoxia tolerance and food deprivation in Amazonian oscars, *Astronotus ocellatus*. **The Journal of Experimental Biology**, vol. 216, 4590-4600, 2013.

GRACEY, A. Y.; TROLL, J. V.; SOMERO, G.N. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 98, 1993-1998. 2001

HEINRICHS-CALDAS, W., CAMPOS, D.F., PAULA-SILVA, M.N., & ALMEIDA-VAL, V.M.F. Oxygen-dependent distinct expression of hif-1 α gene in aerobic and anaerobic tissues of the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinnis*. **Comparative biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. 227: 31-38. 2019.

HERCOS, A. P.; QUEIROZ, H. L. & ALMEIDA, H. L. **Peixes Ornamentais da Reserva Anamá**. Tefé: IDSM, 241 p. 2009.

- HO, D. H.; BURGGREN, W.W. Parental hypoxic exposure confers offspring hypoxia resistance in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**. 215: 4208-4216. 2012.
- HOCHACHKA, P.W. & SOMERO, G.N. Biochemical Adaptation. **Princeton University Press**, New Jersey. 537p. 1984.
- JUNK, W. J., SOARES, G. M. AND CARVALHO, F. M. Distribution of fish species in a lake of the Amazon river floodplain near Manaus (Lago Catalao), with special reference to extreme oxygen conditions. **Amazoniana: Limnologia e Oecologia Regional Systematis Fluminis Amazonas**. 7: 397–431. 1983.
- MANDIC, M.; REGAN, M.D. Can variation among hypoxic environments explain why different fish species use different hypoxic survival strategies? **Journal of Fish Biology**. 2018.
- MENDONÇA, M.; CAMARGO, M. Etnoecologia da produção de peixes ornamentais num Setor do Médio Rio Solimões, Flona de Tefé e Reservas Mamirauá e Amanã – Estado do Amazonas. **Uakari**. 2: 53-61. 2006.
- METCALFE, N.B.; MONAGHAN, P. Does reproduction cause oxidative stress? An open question. **Trends in Ecology & Evolution**, 28: 347–350. 2013.
- MCNATT, R.A.; RICE, J.A. Hypoxia-induced growth rate reduction in two juvenile estuary-dependent fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 311: 147-156. 2004.
- NIKINMAA, M.; REES, B. B. Oxygen-dependent gene expression in fishes. **American Journal Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 288: 1079-1090. 2005.
- OBIRIKORANG, K.A.; ACHEAMPONG, J.N.; DUODU, C.P.; SKOV, P.V. Growth, metabolism and respiration in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to chronic or periodic hypoxia. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, 248: 110768.
- OLIVEIRA, Jomara Cavalcante de. **Táticas reprodutivas de *Apistogramma agassizii* (Perciformes: Cichlidae) em lagos e igarapés do médio Solimões, Amazonas - Brasil/ Manaus: [s.n], 2016.**
- SALMON, A.B.; MARX, D.B.; HARSHMAN, L.G. A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*. stress susceptibility. **Evolution**, 55: 1600–1608. 2001.
- SAROGLIA, M. HIF1a mRNA levels in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) exposed to acute and chronic hypoxia. **The Company of Biologists – Journal of Experimental Biology**. 39: 4009–4015. 2012.
- SEMENZA, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia inducible factor 1. **The Journal of Biological Chemistry**, 269: 23757-23763. 1994.

- SEMENZA, G. L. Hypoxia-inducible factor 1: Master regulator of O₂ homeostasis. **Current Opinion in Genetics & Development**. 8: 588-594. 1998.
- SEMENZA, G. L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. **Journal of Applied Physiology**. 88: 1474–1480. 2000.
- SOITAMO, A. J., RABERGH, C. M. I., GASSMANN, M., SISTONEN, L., NIKINMAA, M. Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1 α) from rainbow trout. **Journal of Biological Chemistry**. 276: 19699–19705. 2001.
- SOUZA, S.S. Respostas fisiológicas, genotóxicas, histopatológicas e genéticas da espécie *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) contaminada por naftaleno e exposta a hipóxia/ Samara Silva de Souza. --- Manaus: [s.n], 2017. xi, 51 f. : il. color
- SOUZA, A.T.F.; HEINRICHS-CALDAS, W.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Efeitos de diferentes períodos de aclimação à hipóxia intermitente no Cichlidae *Apistogramma agassizii***, 2019 (*in prep.*)
- STIERHOFF, K.L.; TARGETT, T.E.; GRECAY, P.A. Hypoxia tolerance in the mummichog: the role of access to the water surface. **Journal of Fish Biology**. 63: 580-592. 2003.
- TARIQ, M. *et al.* Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) is essential for HIF-1 α activation in hypoxia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 30: 1-8. 2016.
- THOMAS, P., RAHMAN, S., IZHAR, A., KRUMMER, K., KRUMMER, J. A. Widespread endocrine disruption and reproductive impairment in an estuarine fish population exposed to seasonal hypoxia. **Proceedings of the Royal Society B**. 274: 2693-2701. 2007.
- VAL, A.L. *Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon*. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds.), **Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon**, INPA, Manaus, Brazil, 59-73p. 1996.
- VAL, A. L., FEARNside, P. M., ALMEIDA-VAL, V. M. F. Environmental disturbances and fishes in the Amazon. **Journal of Fish Biology**. 89: 192-193. 2016.
- WANG, G.L. & SEMENZA, G.L. General involvement of hypoxia inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. **Proceedings of the National Academic of Sciences of the América**, 90: 4304-4308. 1993.
- WETZEL, R. G. **Limnologia**. 2^a ed. Editora Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 111p. 1993.
- WOOD, C. M.; IFTIKAR, F. I.; SCOTT, G. R.; DE BOECK, G.; SLOMAN, K. A.; MATEY, V.; VALDEZ DOMINGOS, F. X.; DUARTE, R. M.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. and VAL, A. Regulation of gill transcellular permeability and renal function during acute hypoxia in the Amazonian oscar (*Astronotus ocellatus*): new angles to the

osmorepiratory compromise. **Journal of Experimental Biology**. 212, 1949-1964. 2009.

WU RSS. Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. **Mar Pollut Bull** 45:35–45. 2002.

YANG, H.; CAO, Z.D.; FU, S.J. The effects of diel-cycling hypoxia acclimation on the hypoxia tolerance, swimming capacity and growth performance of southern catfish (*Silurus meridionalis*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**. 165: 1949-1964. 2013.