# INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG GCBEV

CONTROLE MOLECULAR DOS NÍVEIS ERITROCITÁRIOS DE GTP EM Colossoma macropomum (CHARACIFORMES, Cuvier 1818) EM HIPÓXIA

VINÍCIUS FARIA DE OLIVEIRA

Manaus - Amazonas Junho, 2017

# VINÍCIUS FARIA DE OLIVEIRA

# CONTROLE MOLECULAR DOS NÍVEIS ERITROCITÁRIOS DE GTP EM Colossoma macropomum (CHARACIFORMES, Cuvier 1818) EM HIPÓXIA

Orientador: Adalberto Luis Val, Dr.

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Fonte financiadora: INCT-ADAPTA: CNPq/FAPEAM

Manaus - Amazonas Junho, 2017 Oliveira, Vinícius Faria de

Título da dissertação: Controle molecular dos níveis eritrocitários de GTP em Colossoma macropomum

(Characiformes, Cuvier 1818) em hipóxia Dissertação Mestrado --- INPA, Manaus, 2017

Orientador: Adalberto Luís Val

Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva

# Sinopse:

A espécie *Colossoma macropomum* possui a capacidade de reduzir o conteúdo do fosfato eritrocitário GTP em situação de hipóxia; no entanto, o mecanismo responsável por esse fenômeno ainda permanece desconhecido. Neste estudo demonstramos uma correlação entre o aumento da expressão relativa de dois fatores eucarióticos de iniciação da tradução (eIFs) e a queda nos níveis intraeritrocitários do fosfato orgânico GTP. Aparentemente, um momento transitório de regulação positiva de inúmeros genes necessários a reestruturação metabólica direcionada à hipóxia acarreta em um acréscimo transitório na síntese de proteínas, fazendo com que as moléculas de GTP sejam consumidas na etapa de formação da maquinaria de tradução.

Palavras-chave: eIFs, fosfatos orgânicos, GTP, hipóxia, oxigênio.

# Agradecimentos

#### A Deus.

Ao meu orientador Dr. Adalberto Luis Val, pela confiança a mim conferida, ensinamentos e incentivo. Agradeço-o especialmente por acreditar que eu poderia desenvolver um trabalho dentro de um campo novo e desafiador, cujas técnicas eu desconhecia quase completamente.

A Dra. Giovanna Bataglion e ao Dr. Clecio Klitsky por desenvolverem o método de quantificação dos fosfatos orgânicos via LC-MS MS, tão importante para o cumprimento dos objetivos propostos com essa pesquisa.

A minha esposa Monique Emanuelle por tanta ajuda prestada e pelo incentivo constante quando as dificuldades pareciam grandes demais. Seu apoio foi fundamental.

A MSc. Nazaré Paula da Silva por todo o suporte material no laboratório. Obrigado ainda pela franqueza, você faz a gente perceber que o tempo passa e é preciso fazer as coisas logo. Sou grato ainda por você mostrar onde ficam as "panelas" dentro do laboratório; foi muito importante para o aprendizado das diversas técnicas.

A duas amigas que tive o privilégio de fazer neste tempo, Samara e Raissa, a ajuda de vocês durante todas as etapas deste trabalho foi fundamental. Obrigado pelos tantos momentos divertidos que serão sempre lembrados com muita saudade.

Ao amigo Geovani, outra pessoa que foi um pilar de apoio desde o início desta caminhada. Obrigado por compartilhar um pouco do seu conhecimento comigo, isso foi decisivo ao longo desses dois anos.

A Vanessa, pela ajuda prestada durante as coletas. Recém chegada ao grupo à época não hesitou em ajudar na construção deste trabalho, muito obrigado.

Aos técnicos MSc. Reginaldo e MSc. Rogério, pela ajuda na etapa de quantificação dos fosfatos eritrocitários e em outros momentos que necessitei de auxílio na rotina do laboratório. Agradeço também a Kátia, por me ajudar a entender um pouco dos equipamentos do sistema LC-MS MS quando do momento da qualificação.

Ao amigo Marcos Prado por abrir as portas do LEEM ao me apresentar ao Dr. Adalberto Val e ainda por fornecer as sequências para desenho dos *primers* dos genes investigados neste estudo. Obrigado por tanta confiança na minha capacidade, tem sido uma honra pela segunda vez compartilhar um orientador.

Ao Dinho pela receptividade e por sempre mostrar-se disponível para ajudar quando as dúvidas surgiam.

Aos membros da banca do exame de qualificação Dra. Alzira, Dra. Vera e Dr. Clécio, por me julgarem capaz de desenvolver o projeto de mestrado.

A Érika e Luciana pelo auxílio prestado em algumas etapas das técnicas de biologia molecular.

Ao Arlan pelas dicas sobre cuidados necessários à aclimatação dos espécimes de tambaqui, pelas explicações sobre estatística e por ter doado seus exemplares de tambaqui para que eu pudesse concluir os experimentos.

Ao Dr. Márcio por me ensinar a técnica de quantificação de lactato plasmático.

Aos amigos do LEEM, Jéssica, Érika, Priscila, Ricardo, Jonathan, Fernando, Danilo, Suzana, Derek, Katia, Carol e Karina.

A dona Rai e a Claudinha, duas das pessoas mais prestativas que já conheci e que nos fazem sentir como se já fizéssemos parte da equipe do LEEM há anos.

Aos coordenadores e conselheiros do PPG GCBEv, por apreciarem a situação que enfrentei quando não obtive a licença da SEDUC/AM em tempo hábil e homologarem minha matrícula, garantindo minha permanência no programa.

Ao ex-secretário de educação do estado do Amazonas Rossieli Soares por atender o meu pedido de licença e tornar possível a realização do mestrado.

Aos amigos Ariadne Gama e Manoel Rodrigues, gestores à época na escola que eu trabalhava. Obrigado por terem ajudado com tudo o que estava ao alcance para que eu pudesse cursar o mestrado.

Aos meus familiares, especialmente meus pais Luis e Deuse. Minha família é a maior fonte de motivação para realização dos objetivos que estabeleci.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA.

Ao PPG GCBEv, pela oportunidade de investigarmos as maravilhas da evolução do ambiente amazônico por meio das ferramentas da genética, uma ciência cativante.

Ao INCT-ADAPTA pelo financiamento deste projeto.

Agradeço aos colegas de turma, Danilo, Leandro, Renzo, Thailiny, Vanessa, Valéria, José, Ruben, Ugo, Ivan e Israela pelos dias de aprendizado compartilhados.

Aos professores do GCBEv que ao ministrarem cada disciplina, contribuíram com a formação pessoal de cada aluno.

A você de que alguma forma contribuiu para realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

#### Resumo

Eventos de hipóxia são comuns nos ecossistemas aquáticos da Amazônia. Como resultado, inúmeros ajustes adaptativos voltados a otimizar a captação de oxigênio são conhecidos nos peixes dessa região, que incluem, entre outros, aumento dos batimentos operculares, liberação de células sanguíneas na circulação, supressão metabólica e redução da concentração dos fosfatos orgânicos nos eritrócitos. O principal objetivo deste estudo foi desvendar como ocorre a regulação da concentração do trifosfato de guanosina ([GTP]) nas células vermelhas do tambaqui em hipóxia. O GTP diminui a eficiência no transporte de oxigênio porque atua como modulador negativo da afinidade da hemoglobina com O2. Dessa forma, a diminuição da [GTP] em hipóxia representa uma estratégia para melhorar a transferência de oxigênio para os tecidos. Um importante processo celular que pode estar envolvido com a queda na concentração de GTP nos eritrócitos é a síntese de proteínas, especificamente a etapa de tradução. Nesse ponto atua um elemento denominado eIF2α, o qual necessita de GTP para poder recrutar o RNAt<sup>Met</sup>i e dar continuidade à formação da maquinaria de tradução. Sendo assim, investigamos a expressão relativa de dois eIFs (eIF2α e eIF3A) por meio de PCR em tempo real e quantificamos o GTP nos eritrócitos de juvenis de tambaqui expostos à normóxia, quatro exposições à hipóxia (<1 mgO<sub>2</sub>/L) (30, 140, 200 e 260 min) e recuperação da hipóxia (240 e 480 min) em >6.0 mgO<sub>2</sub>/L. Nossos resultados mostraram claro aumento da expressão relativa dos dois genes analisados em praticamente todos os tempos de exposição à hipóxia; já que apenas no tempo 30 min o gene eIF2α não apresentou-se elevado em relação ao grupo controle. As concentrações de GTP sofreram forte redução até o grupo exposto a 140 min de hipóxia, mantendo-se praticamente estável até 480 min de recuperação. Sendo assim, notamos que a queda na [GTP] ocorreu entre os tempos 30 min e 140 min de hipóxia. Confirmamos que os exemplares de Colossoma macropomum estavam em hipóxia por meio dos altos níveis de glicose e lactato plasmáticos quantificados nos animais submetidos a baixa disponibilidade de oxigênio na água. O incremento na expressão relativa dos eIFs ao mesmo tempo em que houve a brusca redução na concentração de GTP nos eritrócitos do tambaqui constitui evidência a favor da relação entre intensidade da síntese de proteínas e consumo de moléculas de GTP. No entanto, durante a hipóxia, ocorre uma séria supressão metabólica para estabelecer um equilíbrio entre a produção e o consumo de ATP, uma vez que a principal fonte geradora desse composto encontra-se comprometida. Isso resulta em uma diminuição global na síntese de proteínas. Por outro lado, inúmeros genes ligados aos mecanismos de resposta à hipóxia são regulados positivamente, aumentando seus transcritos na célula, os quais, para se tornarem produtos funcionais dependem de uma elevação da taxa de tradução, mesmo que apenas transitória. Esse fenômeno contribui para a reorganização metabólica, essencial para maior resistência dos organismos à hipóxia.

Palavras-chave: hipóxia, oxigênio, fosfatos eritrocitários, GTP, eIF, tradução proteica.

#### **Abstract**

Hypoxia events are common in the aquatic ecosystems of the Amazon. As a result, numerous adaptive adjustments to optimize oxygen uptake are known in the fish of this region, including, but not limited to, increased opercular beats, the release of circulating blood cells, metabolic suppression, and reduction of organic phosphate concentration in erythrocytes. This study aimed to find out how the regulation of the concentration of guanosine triphosphate ([GTP]) occurs in the red cells of tambaqui exposed to hypoxia. GTP by acting as a negative modulator of the affinity of hemoglobin with O<sub>2</sub> decreases oxygen uptake; thus, a reduction of [GTP] in hypoxia represents a strategy to improve the transfer of oxygen to tissues. An important cellular process that may be involved in the reduction of GTP levels in erythrocytes is the synthesis of proteins, specifically the translation stage. At this point there is an element designate eIF2a, which requires GTP to be able to recruit the RNAt<sup>Met</sup>i and continue the formation of the translation machinery. Thus, we investigated the relative expression of two eIFs (eIF2α and eIF3A) by real-time PCR and quantified the GTP in erythrocytes of tambaqui juveniles exposed to normoxia, four exposures to hypoxia (<1 mgO<sub>2</sub>/L) (30, 140, 200 e 260 min) and recovery from hypoxia (240 e 480 min) in >6.0 mgO<sub>2</sub>/L. Our results showed an increase in the relative expression of the two genes analyzed at practically all times of exposure to hypoxia. eIF2α gene was not elevated relatively to the control group at 30 min only. The concentrations of GTP were sharply reduced until the group exposed to 140 min of hypoxia, remaining practically stable until 480 min of recovery. In this way, we noticed that the decrease in the [GTP] occurred between the 30 and 140 min of hypoxia. We confirmed that Colossoma macropomum specimens were hypoxic by high plasma levels of glucose and lactate of animals subjected to low oxygen availability in water. The increase in the relative expression of the eIFs at the same time as a sharp reduction in the GTP concentration in the tambaqui erythrocytes a relationship between the intensity of the protein synthesis and the consumption of GTP molecules. However, during hypoxia, a severe metabolic suppression occurs to establish a balance between production and consumption of ATP, since the primary source of this compound is compromised. As a consequence an overall decrease in protein synthesis is observed. On the other hand, many genes linked to the mechanisms of hypoxia response are regulated positively, increasing their transcripts in the cell, which, to become functional products, depend on an elevation of the translation rate, even if only transient. This phenomenon contributes to the metabolic reorganization, essential for greater resistance of organisms to hypoxia.

**Key words:** hypoxia, oxygen, red cell phosphates, GTP, eIF, protein translation.

# Sumário

Lista de figuras	viii
1. Introdução	1
1.1 O papel dos eIFs na formação da maquinaria de tradução proteica em vertebrados	5
1.2 Regulação da tradução de proteínas envolvendo eIF2α e GTP em hipóxia	7
1.3 Expressão de genes ligados às respostas à hipóxia	9
2. Justificativa	10
3.1 Objetivo geral	12
3.2 Objetivos específicos	12
Referências bibliográficas	12
Capítulo I	17
1. Introdução	19
2. Material e métodos	21
2.1 Aquisição e aclimatação dos espécimes de <i>Colossoma macropomum</i>	21
2.2 Experimento	22
2.3 Parâmetros hematológicos, glicose e lactato plasmáticos	22
2.4 Obtenção de extrato sanguíneo e quantificação de fosfatos eritrocitários	23
2.5 Extração de RNA total e síntese de cDNA	24
2.6 Confecção e sequência dos <i>primers</i> utilizados	24
2.7 PCR em tempo real	25
2.8 Procedimentos estatísticos	26
3. Resultados	26
3.1 Parâmetros hematológicos e constantes corpusculares	26
3.2 Glicose e lactato plasmáticos	
3.3 ATP e GTP em eritrócitos de tambaqui	28
3.4 Expressão dos genes eIF2α e eIF3A	
4. Discussão	31
4.1 Parâmetros hematológicos	
4.2 Glicose e lactato plasmáticos	
4.3 Redução da [GTP] em hipóxia	
4.4 Expressão relativa dos genes eIF2α e eIF3A	
Referências	30

# Lista de figuras

#### Introdução geral

- **Figura 1.** (A) Representação esquemática da hemoglobina incluindo os grupos heme no interior de cada uma das cadeias alfa e beta. Em B temos a Hb no estado T e após ter seus quatro sítios de ligação heme associados ao oxigênio, provocando uma pequena rotação na estrutura do tetrâmero e assumindo o estado R. Fonte da imagem: Berg et al. 2012.
- **Figura 2.** Representação simplificada da formação da maquinaria de tradução do RNAm envolvendo os eIFs, subunidades ribossomais 40S e 60S e Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>. 4G=eIF4G, 4E=eIF4E, 4A=eIF4A, PABP=Proteína de ligação à cauda poli A, 1A=eIF1A, eIF3= complexo formado por dez eIFs nomeados de eIF3A a eIF3J.

# Capítulo I

- **Figura 1** Glicose plasmática de exemplares de *Colossoma macropomum* (n=5) em normóxia e submetidos à hipóxia (0, 30, 140, 200 e 260 min; círculos vazados) e recuperação da hipóxia (dois últimos círculos vazados). Os dados referentes aos grupos controle estão representados pelos círculos sólidos. O asterisco indica onde houve diferença entre um tratamento e seu respectivo controle; p<0.001.
- **Figura 2** Lactato plasmático de exemplares de *Colossoma macropomum* (n=5) em normóxia e submetidos à hipóxia (0, 30, 140, 200 e 260 min; círculos vazados) e recuperação da hipóxia (dois últimos círculos vazados). O asterisco indica onde houve diferença entre um tratamento e seu respectivo controle; p<0.001.
- **Figura 3** Concentração de ATP nos eritrócitos de *Colossoma macropomum* (n=5) submetidos à hipóxia (0, 30, 140, 200 e 260 min; círculos vazados) e recuperação da hipóxia (dois últimos círculos vazados). Os dados referentes aos grupos controle estão representados pelos círculos sólidos. O asterisco indica diferença entre um tratamento e seu respectivo controle; p<0.05.
- **Figura 4** Concentração de GTP nos eritrócitos de *Colossoma macropomum* (n=5) submetidos à hipóxia (0, 30, 140, 200 e 260 min; círculos vazados) e recuperação da hipóxia (dois últimos círculos vazados). Os dados referentes aos grupos controle estão representados pelos círculos sólidos. O asterisco indica diferença entre um tratamento e seu respectivo controle; p<0.05.
- **Figura 5** Expressão relativa do gene eIF2α no figado de *Colossoma macropomum* em normóxia (C), hipóxia (H) e recuperação da hipóxia (R). O asterisco indica diferença em relação ao grupo controle (p<0.05). Normalização realizada a partir dos genes de referência 18S, Tubulina e β-actina.
- **Figura 6** Expressão relativa do gene eIF3A no fígado de *Colossoma macropomum* em normóxia (C), hipóxia (H) e recuperação da hipóxia (R). O asterisco indica diferença em relação ao grupo controle (p<0.001). Normalização realizada a partir dos genes de referência 18S, Tubulina e β-actina.

# Lista de siglas, abreviações e unidades de medida

[ATP] Concentração de adenosina trifosfato

[GTP] Concentração de guanosina trifosfato

[OD] Concentração de oxigênio dissolvido

μL Microlitro

μm<sup>3</sup> Micrômetro cúbico

µmol/mL Micromol por mililitro

ATP Adenosina trifosfato

cDNA DNA complementar

CHCM Concentração de hemoglobina corpuscular média

DNA Ácido desoxirribonucleico

DPG 2,3 difosfoglicerato

eIF Fator Eucariótico de Iniciação da Tradução

EPO Eritropoietina

ERH Elemento de resposta à hipóxia

F Forward

GDP Guanosina difosfato

GTP Guanosina trifosfato

Hb Hemoglobina

HCM Hemoglobina corpuscular média

Ht Hematócrito

HIF Fator induzido por hipóxia

IPP Inositol pentafosfato

LC-MS/MS Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de

massas

KOH Hidróxido de potássio

mg/dL Miligrama por decilitro

mg/L Miligrama por litro

min Minutos

NTP Nucleosídeo trifosfato

O<sub>2</sub> Gás oxigênio

OD Oxigênio dissolvido

PABP Proteína de ligação à cauda poli-A

PO<sub>crit</sub> Pressão crítica de oxigênio

PERK Kinase residente no retículo endoplasmático

pg Picograma

pH Potencial de hidrogênio

R Reverse

RBC Red blood cell

RNAm Ácido ribonucléico mensageiro

RNAr Ácido ribonucleico ribossômico

RNAt Ácido ribonucleico transportador

RNAt<sup>Met</sup>i RNA transportador contendo o anticódon da metionina

rpm Rotações por minuto

RSA Respiração de superfície aquática

RT-PCR Reação em cadeia da polimerase em tempo real

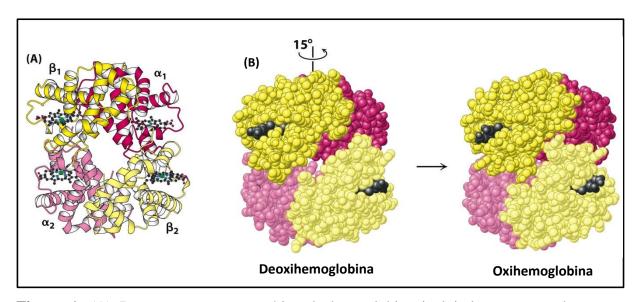
VCM Volume corpuscular médio

# 1. Introdução

Diferente do que acontece com a maioria dos animais terrestres, os peixes não dispõem de um suprimento constante de oxigênio devido às alterações sazonais e diurnas na sua disponibilidade, sendo esta uma característica comum em águas naturais (revisado por Val e Almeida-Val 1995; Hochachka e Somero 2002). Diaz e Rosenberg (1995) definem como hipóxia a condição observada em ambientes aquáticos nos quais a concentração de oxigênio dissolvido é menor que 2.8 mgO<sub>2</sub>/L. Para sobreviver às baixas concentrações de oxigênio, os peixes da Amazônia têm desenvolvido múltiplas respostas adaptativas como respiração aérea obrigatória ou facultativa (Johansen e Lenfant 1967; Johansen et al. 1978; Randall et al. 1978; Saint-Paul 1984; Randall 1990; Brauner et al. 1995), ajustes voltados à melhora na transferência de oxigênio para os tecidos, além de redução da taxa metabólica (Val e Almeida-Val 1995; Val 1996).

As adaptações listadas acima são importantíssimas, uma vez que permitem ao organismo a reestruturação metabólica essencial para que uma dada espécie responda de modo eficiente durante eventos de hipóxia, pois quando o organismo é capaz de manter a captação de oxigênio em níveis que atendem suas demandas fisiológicas, mesmo sob condições críticas de disponibilidade, pode-se dizer que seu grau de tolerância à hipóxia é alto. Isso reflete, em parte, o quão bem adaptada uma espécie está frente às constantes variações na concentração de oxigênio dissolvido (Hughes 1973). Além das adaptações comportamentais, há outras igualmente importantes no nível molecular; essas incluem alterações na função da hemoglobina (Hb), a proteína responsável pela tomada e liberação de oxigênio nos vertebrados (Riggs 1979).

Primeiro, é importante esclarecer quais características da própria proteína permitem que sua função possa sofrer regulação. A molécula de hemoglobina dos vertebrados tem duas partes: (1) a parte de globina, uma proteína composta por quatro cadeias de polipeptídeos altamente dobradas (duas subunidades α e duas subunidades β), e (2) quatro grupos não proteicos contendo ferro, conhecidos como grupos heme, cada um dos quais vinculados a um dos polipeptídeos (Weber e Wells 1989). Quando não está ligada ao O<sub>2</sub>, a Hb é conhecida como hemoglobina reduzida ou desoxihemoglobina; em contrapartida, quando combinada com O<sub>2</sub>, recebe a denominação de oxihemoglobina (Figura 1). A oxigenação envolve mudanças na conformação da Hb, conferindo dois estados conformacionais diferentes, designados como tenso (T) e relaxado (R) (Weber 1996).



**Figura 1.** (A) Representação esquemática da hemoglobina incluindo os grupos heme no interior de cada uma das cadeias alfa e beta. Em B temos a Hb no estado T (Tenso) e após ter seus quatro sítios de ligação heme associados ao oxigênio, provocando uma pequena rotação na estrutura do tetrâmero e assumindo o estado R (Relaxado). Fonte da imagem: Berg et al. 2012.

As adaptações ligadas à função da Hb são determinadas por diferenças na sua estrutura molecular que, por sua vez, tem influências na sensibilidade intrínseca com o O<sub>2</sub> e no grau de interação com os moduladores alostéricos, como visto em hemoglobinas de diversas espécies de peixes (Val et al. 1985; Val et al. 1990; Val et al. 1992; Weber 1996; Val et al. 2015). Existe na estrutura da Hb um sítio de ligação regulatório ao qual se associam compostos químicos chamados de moduladores alostéricos (do grego *allos* = outro e *stereos* = sólido/forma). A interação desses elementos com o sítio específico afeta a atividade da proteína, a qual pode ser otimizada ou suprimida, dependendo do efeito causado pela ligação do modulador (Voet et al. 2002). O próprio oxigênio pode agir como modulador da função da Hb, pois uma vez ligada a primeira molécula de O<sub>2</sub> a um dos grupos heme, a ancoragem das demais moléculas é facilitada cooperativamente; por outro lado, quando a Hb está com seus quatro sítios ligantes livres a ligação ao O<sub>2</sub> é mais difícil (Riggs 1979; Perutz 1982; Weber 1996).

Em muitos animais, como mamíferos, aves, répteis e peixes, já foi registrada a ocorrência de uma importante classe de moduladores da afinidade Hb-O<sub>2</sub>: os fosfatos orgânicos eritrocitários (revisado por Val 2000). De modo geral, os nucleosídeos trifosfatos (NTPs) se ligam a resíduos de aminoácidos específicos na entrada da cavidade central entre as duas cadeias β da hemoglobina, diminuindo a afinidade com o oxigênio por meio da

estabilização do estado de baixa afinidade (estado T) da molécula de hemoglobina (Weber et al. 1976; revisado por Nikinmaa 1992). Nos peixes e em outros vertebrados ectotérmicos, o fosfato encontrado em maior frequência exercendo tal função nos eritrócitos é o ATP (trifosfato de adenosina), enquanto o pentafosfato inositol (IPP) e o 2,3 difosfoglicerato (DPG) são encontrados predominantemente em aves e mamíferos, respectivamente. O GTP (trifosfato de guanosina) é o fosfato encontrado em maior proporção e frequência nos eritrócitos de peixes amazônicos (Weber 1996; Val 2000; Val et al. 2015).

O aumento da afinidade da Hb com o O2 está associada com a redução na concentração de fosfatos orgânicos nos eritrócitos, o que eleva diretamente a cooperatividade de ligação com o oxigênio por meio da diminuição da interação alostérica entre os moduladores e a Hb (Wood e Johansen 1973; Val et al. 1990). O GTP atua mais intensamente sobre a afinidade da Hb com o O<sub>2</sub> do que o ATP, nas espécies de peixes nas quais ambos estão presentes como enguia, truta, carpa, tilápia, tambaqui e curimatã (Weber et al. 1975; Lykkeboe et al. 1975; Marcon e Val 1996; Val et al. 2015). Weber e Lykkeboe (1978) explicam que o ATP se complexa com cátions bivalentes e apresenta por isso forte inibição, o que resulta, aparentemente, num papel principal do GTP em espécies que apresentam adaptação à hipóxia e que possuem os dois moduladores. Além disso, é possível supor que o conteúdo de ATP é prioritariamente comprometido com a atividade metabólica como fonte energética nos eritrócitos dos peixes (Weber 2000). Outra alternativa proposta por Feuerlein e Weber (1994), visando explicar a regulação mais potente do GTP do que do ATP sobre a função da Hb, diz respeito à presença de uma ligação de hidrogênio a mais no GTP do que no ATP e, baseado nisso, os autores defendem que a modulação mais efetiva do GTP ocorre devido a maior possibilidade de formação de ligações de hidrogênio, conferindo, dessa forma, vantagem à molécula quando compete com o ATP pelo mesmo sítio de ligação (Weber et al. 1976).

Após a descoberta da forte interação entre os fosfatos orgânicos e a Hb, muitos estudos realizados com intuito de caracterizar e compreender os mecanismos de adaptação à hipóxia nos peixes incluíram a quantificação dos NTPs, tanto em espécies tropicais quanto naquelas de regiões temperadas (Monteiro et al. 1987; Val et al. 1990; Val et al. 1992; Alemeida-Val et al. 1993; Val et al. 1994). Na Amazônia, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) tem servido como modelo para investigação das adaptações à hipóxia desde a década de 1980. Essa espécie de characiforme apresenta um amplo conjunto de adaptações aos diversos desafios impostos pelo ecossistema aquático da região. Entre os ajustes clássicos apresentados pelo tambaqui quando exposto à hipóxia severa está a realização da respiração

na superfície aquática, a qual é melhor executada nessa espécie por conta da projeção labial, que possibilita a captação da água superficial da coluna d'água mais rica em O<sub>2</sub> para a região branquial. Além disso, essa espécie é capaz de aumentar a frequência dos batimentos operculares para garantir máxima eficiência na tomada de O<sub>2</sub> durante os períodos de estresse (Sundin et al. 2000; Fagundes 2012).

No tambaqui já foi comprovado o efeito da hipóxia sobre a concentração dos fosfatos orgânicos, com redução mais acentuada do GTP que de ATP (Val 1986; Marcon e Val 1996). Val et al. (1998) relatam que os níveis de fosfatos orgânicos nos eritrócitos foi mantido sob níveis similares àqueles observados para indivíduos do grupo controle quando o acesso à lâmina d'água foi mantido. Porém, quando comparados aos indivíduos que não puderam realizar a RSA (Respiração na Superfície Aquática, Kramer e McClure 1982), notou-se que os níveis dos fosfatos foram consideravelmente menores. A interpretação proposta pelos autores apoia-se no fato de o tambaqui conseguir tomar ar da camada superficial da água quando a RSA é possibilitada, o que é esperado em ambiente natural, pois isso permite ao animal manter uma melhor captação de oxigênio, possibilitando regular o metabolismo e atenuar os efeitos da hipóxia.

Recentemente, outra espécie de Characiforme amazônico (*Prochilodus nigricans*, curimatã) foi investigada por Val et al. (2015) com o intuito de elucidar as adaptações moleculares em resposta à hipóxia envolvendo o controle eritrocitário dos níveis de ATP e GTP. Eles registraram variações significativas nas concentrações dos fosfatos durante a transição da normóxia para hipóxia e vice-versa. Na situação inicial, os níveis de GTP foram quatro vezes mais altos do que os de ATP nos eritrócitos; em contrapartida, sob condição de hipóxia os autores notaram redução de um quarto na concentração de GTP após três horas de exposição, enquanto o ATP não teve seus níveis afetados. De acordo com os autores, as diferenças evidenciadas entre a quantidade de ambos os fosfatos, com o GTP sendo regulado intensamente sob hipóxia severa, podem estar relacionadas ao motivo desse último ser um regulador da afinidade da Hb com o O<sub>2</sub> mais potente que o ATP.

A redução da concentração dos fosfatos orgânicos eritrocitários em peixes submetidos à hipóxia é uma característica bem documentada como exposto acima. Fatores como estágio do ciclo de vida, interação com cátions divalentes, além da influência de variáveis ambientais, como mudanças do pH, aumento de temperatura, quantidade de oxigênio dissolvido, presença de sulfeto de hidrogênio, nitritos, alumínio na água, bem como características comportamentais como migração, longos períodos de privação de alimento, ocorrência de respiração aérea obrigatória ou acessória, podem influenciar na quantidade de NTPs (revisado

por Val 2000). Contudo, os mecanismos propriamente ditos, que levam à queda das concentrações dos fosfatos orgânicos nos eritrócitos ainda precisam ser elucidados.

Uma possibilidade não explorada até o momento que pode estar relacionada à drástica redução da concentração intraeritrocitária especificamente de GTP é o consumo dessa molécula durante a etapa de tradução gênica para a síntese de proteínas. Embora, durante a hipóxia ocorra considerável supressão metabólica, muitas proteínas são criticamente requeridas, tornando sua síntese um fenômeno importante para garantir melhor resistência ao estresse imposto pela baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido na água (Lewis et al. 2007; Richards 2009).

#### 1.1 O papel dos eIFs na formação da maquinaria de tradução proteica em vertebrados

A síntese de um polipeptídeo envolve diversos passos, incluindo grande número de elementos e alto nível de complexidade. A decodificação da informação presente na molécula de DNA começa com a transcrição, por meio da qual são produzidos os RNAs, destacando-se que quase 95% é RNAt e RNAr (RNAs funcionais) e os restantes 5% são RNAm, os quais podem ser traduzidos e originar proteínas (Griffiths et al. 2008). A etapa seguinte consiste na tradução da informação do RNAm em um produto funcional. Nesse momento ocorre a participação de vários elementos denominados, em conjunto, fatores eucarióticos de início da tradução abreviados como eIFs (do inglês: *Eukaryotic Initiation Factor*). Como o próprio nome sugere, tais componentes atuam em conjunto para formar a complexa maquinaria que permitirá a iniciação da tradução do RNAm como descrito a seguir (Marintchev e Wagner 2004). As principais etapas mencionadas estão esquematicamente representadas na figura 2.

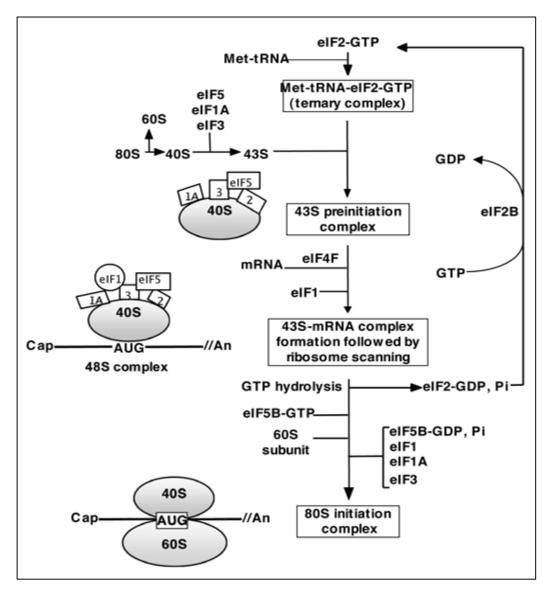
Inicialmente é formado o complexo ternário, constituído pelo metionil-tRNA iniciador (Met-tRNA<sub>i</sub>) e pelo GTP complexado ao eIF2. A seguir ocorre a ligação do complexo ternário à subunidade ribossomal 40S, a qual é promovida pelo eIF1, eIF1A, eIF5 e o complexo eIF3, resultando na formação da subunidade 43S ou complexo de pré-iniciação. Um segundo conjunto, chamado eIF4F (composto por eIF-4A helicase, eIF4E, eIF4G e PABP – proteína de ligação à cauda poli A), se liga ao *cap*, uma sequência de nucleotídeos presente na ponta 5' de praticamente todos os RNAm eucarióticos. Ao mesmo tempo que a PABP associa-se à cauda poli A do RNAm, eIF4G promove a ligação entre eIF4E e PABP. Nessa fase já estão ligados à subunidade ribossomal 40S o complexo de pré-iniciação (43S) e o RNAm ligado ao complexo eIF4F, sendo o passo seguinte executado pelo eIF4A helicase, o qual percorre a sequência de bases do RNAm para remover estruturas secundárias que possam ter sido formadas e que dificultariam o encontro do códon AUG (metionina) para ter início a tradução

efetivamente (Lee et al. 2002; Griffiths et al. 2008; Kenneth e Rocha 2008; Hinnebusch e Lorsch 2012).

Uma vez removidas as estruturas secundárias, o complexo 43S percorre a fita de RNAm até encontrar o códon iniciador AUG. Sendo reconhecido o AUG, o complexo 43S fica retido e eIF2-GTP é hidrolisado à eIF2-GDP pela ação da GTP-ase eIF5B. Nesse momento ocorre a liberação de todos os eIFs a partir da saída de eIF2 enquanto eIF-5B catalisa a ligação da subunidade ribossomal maior 60S formando o complexo de iniciação 80S contendo o Met-tRNAi pareado ao códon AUG no sítio P tendo início a etapa de elongação da síntese proteica (Lee et al. 2002; Hinnebusch e Lorsch 2012).

O GTP complexado a proteínas (proteínas G) exerce uma série de papéis cruciais na regulação do crescimento e diferenciação celular e é um componente decisivo na síntese de proteínas, participando na via de sinalização do início da tradução e no transporte proteico (Lee et al. 2002) e, também, como fonte de energia na fase de alongamento do processo de tradução do RNAm, onde duas moléculas de GTP são hidrolisadas a cada resíduo de aminoácido corretamente adicionado ao polipeptídeo nascente (Nelson e Cox 2009).

Baseado nisso, é possível supor que os níveis de GTP nos diversos tipos celulares tenha seus níveis regulados a partir do controle da síntese proteica, pois a redução desse trifosfato nos eritrócitos do tambaqui pode ser o resultado de uma elevada taxa de transcrição nos primeiros minutos de exposição à hipóxia severa, como resultado da produção de proteínas ligadas aos ajustes fisiológicos em resposta a tal estresse (Fagundes 2012; Ilan et al. 2017). É importante salientar que tal possibilidade só é viável em exposição aguda à hipóxia, pois longo tempo sob baixa disponibilidade de oxigênio provoca uma redução geral da taxa metabólica e, inevitavelmente, todos os processos que demandam muita energia são suprimidos (Hochachka 1996; Blais et al. 2004; Lewis et al. 2007).



**Figura 2.** Representação simplificada da formação da maquinaria de tradução do RNAm envolvendo os eIFs, subunidades ribossomais 40S e 60S e Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>. 4G=eIF4G, 4E=eIF4E, 4A=eIF4A, PABP=Proteína de ligação à cauda poli A, 1A=eIF1A, eIF3= complexo formado por dez eIFs nomeados de eIF3A a eIF3J. Fonte da imagem: López-Lastra et al. (2005).

# 1.2 Regulação da tradução de proteínas envolvendo eIF2α e GTP em hipóxia

Quando o suprimento de oxigênio aos tecidos é insuficiente, ocorre redução drástica da fosforilação oxidativa resultando, por sua vez, na diminuição do conteúdo de ATP disponível nas células (Richards 2009). Como durante a síntese proteica há considerável gasto energético, em hipóxia os organismos não conseguem manter esse processo nos níveis em que a captação de oxigênio atende às demandas metabólicas. Embora ocorra uma queda súbita nos níveis de transcritos de RNAm mesmo após um curto período de exposição à hipóxia severa,

existe um amplo conjunto de genes que têm sua expressão estimulada pela baixa oferta de oxigênio (Nikinmaa e Rees 2005; Van den Beucken et al. 2006).

Van den Beucken et al. (2006), buscando compreender como se dá a supressão da produção de proteínas em células humanas cancerosas sob hipóxia severa, observaram que pode haver forte inibição da etapa de tradução do RNAm a partir da fosforilação de eIF2α, sendo necessário para tanto a ativação de uma proteína em resposta ao estresse do retículo endoplasmático, a PERK (*Endoplasmic reticulum resident kinase*). Embora tal efeito não seja duradouro ele permite que a síntese de proteínas permaneça reduzida até iniciar o segundo mecanismo de inibição (Blais et al. 2004; Van den Beucken et al. 2006).

Em hipóxia severa, a fosforilação de eIF2α (uma subunidade de eIF2) na posição da serina 51 bloqueia a formação do complexo ternário devido à inibição da atividade de eIF2B, que é responsável por promover a transição de eIF2-GDP para eIF2-GTP. Esse fenômeno é intensificado devido à maior quantidade de eIF2α do que eIF2B nas células, sendo assim, mesmo um pequeno aumento da fosforilação de eIF2α é suficiente para baixar drasticamente a iniciação da tradução (Van den Beucken et al. 2006). A segunda etapa responsável por manter a supressão da síntese de proteínas é garantida pela ação de mTOR (mammalian target of rapamycin – mTOR), um elemento capaz de fosforilar tanto direta quanto indiretamente alguns dos fatores eucarióticos de iniciação da tradução como eIF4E, eIF4A e eIF4G que, por sua vez, participam do recrutamento das subunidades ribossomais para o RNAm (revisado por Hay e Sonenberg 2004).

A compreensão dos mecanismos moleculares relacionados com a regulação da expressão gênica somados ao avanço das técnicas da biologia molecular, possibilitaram investigações que envolvem tanto a informação presente no genoma quanto a função de seus produtos, as proteínas e enzimas. Desde o início da última década, os pesquisadores usaram ferramentas de sequenciamento e amplificação de DNA para realizar abordagens sobre expressão gênica diferencial, relacionando-as às mudanças ambientais a que os organismos estão sujeitos (Fagundes 2012; Baptista et al. 2016; Prado-Lima e Val 2016).

A fosforilação de eIF2 $\alpha$  mostrou recentemente estar envolvida com a regulação da expressão dos genes das subunidades da hemoglobina (Ilan et al. 2017). O aumento do conteúdo de hemoglobina no sangue já foi evidenciado em muitas espécies de peixes submetidas à hipóxia (Val et al. 1990; Affonso et al. 2002; Val et al. 2015). A síntese de Hb só é possível por meio da produção das subunidades globina  $\alpha$  e  $\beta$  que, quando unidas compõem o tetrâmero  $2\alpha 2\beta$ . Ilan e colaboradores (2017) descobriram que a fosforilação do eIF2 $\alpha$  intercede no processo de *splicing* (remoção dos íntrons do pré-RNAm) do RNAm da

globina humana. O mecanismo reside na dependência da formação do spliceossoma pelo eIF2α fosforilado na serina 51. Isso ficou evidente quando os autores testaram um eIF2α mutante não fosforilável que não permitiu o *splicing* do pré-RNAm da β-globina. Em hipóxia, a fosforilação do eIF2α é a primeira via de inibição da síntese de proteínas relacionada à etapa de iniciação (Koritzinsky et al. 2006); todavia, a descoberta feita por Ilan et al. (2017) revela que mesmo impedido de participar da formação do complexo ternário por estar fosforilado, eIF2α atua no processamento do RNAm de um gene cujo produto final sempre é requerido de modo intenso quando o transporte de oxigênio precisa ser melhorado.

A análise quantitativa do RNA polissômico usando RT-PCR (Reação de Polimerização em Cadeia em Tempo Real), indica que a eficiência da tradução de genes individuais é dinâmica, estando susceptível a profundas mudanças durante momentos de hipóxia devido à fosforilação e subsequente desfosforilação de eIF2α (Koritzinsky et al. 2006). Nesse trabalho, no qual foram investigados os mecanismos de controle de tradução sob hipóxia, Koritzinsky e colaboradores (2006) sugerem que a hipóxia aguda ou prolongada regula a tradução do RNAm por meio de vias distintas, influenciando de forma decisiva sobre a expressão de muitos genes. Os genes ligados ao metabolismo aeróbico tendem a sofrer diminuição da expressão, enquanto os genes envolvidos nas vias anaeróbicas sofrem regulação positiva (Nikinmaa e Rees 2005).

#### 1.3 Expressão de genes ligados às respostas à hipóxia

Um número considerável de processos fisiológicos é alterado em peixes expostos à hipóxia. Nosso interesse sobre as interações do oxigênio com a fisiologia dos organismos já constitui um campo de pesquisa consolidado, especialmente no que se refere aos ajustes na expressão gênica quando a concentração do gás é escassa, pois esta área da biologia recebeu bastante atenção após a descoberta do fator induzido por hipóxia (HIF – do inglês *Hypoxia Inducible Factor*) (Hochachka 1986; Nikinmaa e Rees 2005; Kenneth e Rocha 2008).

A descoberta do fator induzido por hipóxia (HIF) se deu enquanto eram realizados estudos da expressão do gene da eritropoietina (EPO) em mamíferos (Nikinmaa e Rees 2005; Kenneth e Rocha 2008). Os estudos posteriores à descoberta revelaram que além de induzir a expressão de EPO em hipóxia, o HIF também é transcrito nos mais diversos tipos celulares e atua estimulando a transcrição de uma variedade de genes envolvidos no metabolismo, angiogênese, eritropoiese, função imune, produção de enzimas gicolíticas e no crescimento (Bashan et al. 1992; Pugh et al. 2002; Bracken et al. 2003; Hardy et al. 2012; Baptista et al. 2016).

Os genes que têm a transcrição regulada pelo HIF durante eventos de baixa disponibilidade de oxigênio sofrem esse efeito devido ao aumento da concentração da subunidade HIF-1α do HIF. A produção de HIF-1α é constante nos organismos, todavia essa proteína é rapidamente degradada. Tal processo é mediado por um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD), onde resíduos conservados de prolina e asparagina específicos do HIF-1α são modificados covalentemente por meio da ação de hidroxilases, sendo por isso reconhecidos pela proteína von-Hippel-Lindau (pVHL) ubiquitinizadas e degradadas pela via proteossômica (Bracken et al. 2003; Nikinmaa e Rees 2005; Baptista et al. 2016).

Contudo, em condições de hipóxia a hidroxilação dos resíduos de prolina e asparagina não ocorre, uma vez que o efeito só é conseguido na presença constante de oxigênio. Assim, a degradação de HIF-1α não é realizada e a proteína se acumula no núcleo celular. Por fim, os genes que possuem uma região regulatória denominada elemento de resposta à hipóxia (ERH), a qual permite a especificidade da ligação com o HIF-1α serão regulados positivamente (Bracken et al. 2003; Nikinmaa e Rees 2005; Baptista et al. 2016).

Muitos desses genes estão relacionados com a montagem de um escopo metabólico direcionado às adaptações à hipóxia. Embora, de acordo com Koritzinsky et al. (2006), ocorra diminuição da taxa de tradução proteica como resultado da fosforilação de eIF2 na sua subunidade α, é possível que isso constitua um mecanismo de reprogramação da síntese proteica, de modo a priorizar a tradução dos transcritos de RNAm dos genes que estão sofrendo regulação positiva pelo HIF nos primeiros minutos de hipóxia, desencadeado a partir da sinalização do baixo suprimento de O<sub>2</sub> no interior da célula (Hochachka 1996; Van den Beucken et al. 2006).

# 2. Justificativa

O tambaqui é uma espécie nativa da Amazônia e amplamente estudada. Trata-se de um organismo com grande capacidade de resistir às variações ambientais comuns na região, como oscilações da temperatura e baixas concentrações de oxigênio dissolvido. Quando exposto à hipóxia severa o tambaqui regula a quantidade dos seus dois principais fosfatos orgânicos, o GTP e o ATP. O GTP é o fosfato presente em maior quantidade nos eritrócitos do tambaqui e sua concentração é regulada muito mais intensamente e em curto espaço de tempo se comparada ao que ocorre com os demais fosfatos orgânicos (Val 2000).

O GTP presente nos eritrócitos do tambaqui atua como um potente modulador negativo da afinidade da hemoglobina com o oxigênio; portanto, sua diminuição em hipóxia está ligada à otimização da capacidade de transporte de oxigênio pelas hemoglobinas, um ajuste crítico para sobrevivência em hipóxia (Val 2000). Embora esse fenômeno seja uma característica comum para inúmeras espécies de peixes, o mecanismo por trás da súbita redução da quantidade de GTP nos eritrócitos até o momento não foi esclarecido. Para construir a proposta deste estudo buscamos compreender qual processo celular é dependente do consumo de moléculas de GTP e ao mesmo tempo afetado sob a situação de hipóxia. Por conseguinte, chegamos a estreita relação existente entre a tradução do RNAm e o consumo de GTP durante a síntese de proteínas (Antoun et al. 2003). Baseado nisso, decidimos investigar a taxa de expressão de genes requeridos na etapa de iniciação da síntese proteica, os eIFs, pois a hipóxia traz consigo a necessidade de uma emergencial reorganização metabólica que, por sua vez, demanda inúmeras proteínas envolvidas nas vias fisiológicas que têm seu ritmo acelerado quando a oferta de oxigênio é limitada. Portanto, o nível de expressão dos eIFs pode ser indicativo da regulação da síntese proteica, podendo evidenciar uma correlação entre aumento repentino da produção de proteínas específicas e queda acentuada nos níveis eritrocitários de GTP.

Dessa maneira será possível compreender de que forma o baixo suprimento de oxigênio sinaliza às células a necessidade de ajustes na síntese de proteínas, um processo de elevado custo energético e que é finamente controlado durante momentos de hipóxia. Adicionalmente, poderemos esclarecer qual a relação entre o controle da síntese proteica e os níveis intraeritrocitários de GTP. Portanto, esta investigação pode fornecer valiosas informações a respeito das adaptações moleculares da espécie *Colossoma macropomum* diante das exigências ambientais a que está sujeita, envolvendo as características funcionais da hemoglobina, bem como da regulação da produção de proteínas em diferentes momentos sob hipóxia.

# 3.1 Objetivo geral

Determinar de que forma se dá o controle dos níveis eritrocitários de trifosfato de guanosina (GTP) na espécie *Colossoma macropomum* em hipóxia por meio do estudo da expressão de genes ligados à tradução proteica.

# 3.2 Objetivos específicos

- Verificar a dinâmica da concentração dos fosfatos orgânicos eritrocitários ATP e GTP
  em diferentes tempos de exposição à hipóxia;
- Avaliar o perfil da expressão de dois Fatores Eucarióticos de Iniciação da Tradução (eIF2α e eIF3A) em normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia em juvenis de *C. macropomum*;
- Realizar análise comparativa relacionando o padrão de expressão dos genes eIF2α e eIF3A às concentrações de GTP em juvenis de *C. macropomum* em normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia.
- Determinar, a partir dos resultados obtidos, se há relação direta entre controle da taxa de tradução do RNAm e a redução dos níveis do fosfato orgânico GTP nos eritrócitos de *C. macropomum* em hipóxia.

# Referências bibliográficas

- Affonso, E.G.; Polez, V.L.P.; Correa, C.F.; Mazon, A.F.; Araujo, M.R.R.; Moraes, G.; Rantin, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133:375-382.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an under-explored biological « goldmine ». *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*,435-445.
- Baptista, R.B.; Souza-Castro, N.; Almeida-Val, V.M.F. 2016. Acute hypoxia up-regulates HIF-1α and VEGF mRNA levels in Amazon hypoxia-tolerant Oscar (*Astronotus ocellatus*). Fish physiology and biochemistry, 42:1307-1318.
- Bashan, N.; Burdett, E.; Hundal, H.S.; Klip, A. 1992. Regulation of glucose transport and GLUT1 glucose transporter expression by O<sub>2</sub> in muscle cells in culture. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 262:C682-C690.
- Blais, J.D.; Filipenko, V.; Bi, M.; Harding, H.P.; Ron, D.; Koumenis, C.;... Bell, J.C. 2004. Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Molecular and cellular biology*, 24:7469-7482.

- Bracken, C.P.; Whitelaw, M.L.; Peet, D.J. 2003. The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60:1376-1393.
- Brauner, C.J.; Ballantyne, C.L.; Randall, D.J.; Val, A. L. 1995. Air breathing in the armoured catfish (*Hoplosternum littorale*) as an adaptation to hypoxic, acidic, and hydrogen sulphide rich waters. *Canadian Journal of Zoology*, 73:739-744.
- Diaz, R.J.; Rosenberg, R. 1995. Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *Oceanography and Marine Biology an Annual Review*, 33:245-303.
- Fagundes, D.B. 2012. *Identificação de genes potencialmente envolvidos na formação do edema labial na espécie Colossoma macropomum (Cuvier, 1818) (Characiformes: Serrasalmidae)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 80 pp.
- Feuerlein, R.; Weber, R. 1994. Rapid and simultaneous measurement of anodic and cathodic haemoglobins and ATP and GTP concentrations in minute quantities of fish blood. *Journal of experimental biology*, 189:273-277.
- Griffiths, A.J.F.; Wessler, S.R.; Lewontin, R.C.; Carrol, S.B. 2008. *Introdução à Genética*. 9da ed. W. H. Freeman and Company, New York and Basingstore, 712p.
- Hardy, K.M.; Follett, C.R.; Burnett, L.E.; Lema, S.C. 2012. Gene transcripts encoding hypoxia-inducible factor (HIF) exhibit tissue-and muscle fiber type-dependent responses to hypoxia and hypercapnic hypoxia in the Atlantic blue crab, Callinectes sapidus. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 163:137-146.
- Hay, N.; Sonenberg, N. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*, 18:1926-1945.
- Hinnebusch, A.G.; Lorsch, J.R. 2012. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4:a011544-a011544.
- Hochachka, P.W. 1986. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*, 231:234-242.
- Hochachka, P.W. 1996. Oxygen sensing and metabolic regulation: short, intermediate, and long term roles. Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon. AL Val, VMF Almeida-Val, and DJ Randall (Eds). INPA, Manaus, 233-256.
- Hochachka, P.W.; Somero, G.N. 2002. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. (S.l.): Oxford University Press.
- Hughes, G.M. 1973. Respiratory responses to hypoxia in fish. *American Zoologist*, 13:475-489.
- Johansen, K.; Lenfant, C. 1967. Respiratory function in the South American lungfish, *Lepidosiren paradoxa* (Fitz). *Journal of Experimental Biology*, 46:205-218.

- Johansen, K.; Mangum, C.P.; Weber, R.E. 1978. Reduced blood O<sub>2</sub> affinity associated with air breathing in osteoglossid fishes. *Canadian Journal of Zoology*, 56:891-897.
- Kenneth, N.S.; Rocha, S. 2008. Regulation of gene expression by hypoxia. *Biochemical Journal*, 414:19-29.
- Koritzinsky, M.; Magagnin, M.G.; van den Beucken, T.; Seigneuric, R.; Savelkouls, K.; Dostie, J.;... Voncken, J.W. 2006. Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. *The EMBO journal*, 25:1114-1125.
- Kramer, D.L.; McClure, M. 1982. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 7:47-55.
- Lee, J.H.; Pestova, T. V; Shin, B.-S.; Cao, C.; Choi, S.K.; Dever, T.E. 2002. Initiation factor eIF5B catalyzes second GTP-dependent step in eukaryotic translation initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:16689-16694.
- Lewis, J.M.; Costa, I.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Gamperl, A.K.; Driedzic, W.R. 2007. Responses to hypoxia and recovery: repayment of oxygen debt is not associated with compensatory protein synthesis in the Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. *Journal of Experimental Biology*, 210:1935-1943.
- López-Lastra, M.; Rivas, A.; Barría, M. I. 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biological research*, 38(2-3), 121-146.
- Lykkeboe, G.; Johansen, K.; Maloiy, G.M.O. 1975. Functional properties of hemoglobins in the teleost *Tilapia grahami*. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology*, 104:1-11.
- Marcon, J.L.; Val, A.L. 1996. Intraerythrocytic phosphates in *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus* (Pisces) of the Amazon. Dans *International Congress of the Biology of Fishes. The Physiology of Tropical Fish. San Francisco. American Fisheries Society*,.
- Marintchev, A.; Wagner, G. 2004. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Quarterly reviews of biophysics*, 37:197-284.
- Monteiro, P.J.C.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. de. 1987. Biological aspects of Amazonian fishes. Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates, and whole blood Bohr effect of *Mylossoma duriventris*. *Canadian journal of zoology*, 65:1805-1811.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2009. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5da ed. University of Wisconsin-Madison, Wisconsin, USA, 1274p.
- Nikinmaa, M. 1992. Membrane transport and control of hemoglobin-oxygen affinity in nucleated erythrocytes. *Physiological Reviews*, 72:301-321.
- Nikinmaa, M.; Rees, B.B. 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288:R1079-R1090.

- Perutz, M.F. 1982. Stereochemistry of cooperative effects in fish and amphibian haemoglobins. *Nature*, 299:421-426.
- Prado-Lima, M.; Val, A.L. 2016. Transcriptomic characterization of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) exposed to three climate change scenarios. *PloS one*, 11:e0152366-e0152366.
- Pugh, C.W.; Maxwell, P.H.; Ratcliffe, P.J. 2002. Oxygen mediated gene regulation. *Nephrology*, 7:.
- Randall, D. 1990. Control and co-ordination of gas exchange in water breathers. *Dans Vertebrate Gas Exchange*, (pp. 253-278). (S.l.): Springer.
- Randall, D.J.; Farrell, A.P.; Haswell, M.S. 1978. Carbon dioxide excretion in the pirarucu (*Arapaima gigas*), an obligate air-breathing fish. *Canadian Journal of Zoology*, 56:977 -982.
- Richards, J.G. 2009. Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. *Fish physiology*, 27:443-485.
- Riggs, A. 1979. Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes: an overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 62:257-272.
- Saint-Paul, U. 1984. Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalmidae. *Environmental biology of fishes*, 11:53-62.
- Sundin, L.; Reid, S.G.; Rantin, F.T.; Milsom, W.K. 2000. Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Journal of Experimental Biology*, 203:1225-1239.
- Val, A.L. 1986. Hemoglobinas de Colossoma macropomum, Cuvier, 1818 (Characoidei, pisces): aspectos adaptativos. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia /Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e tecnológico /Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 112 pp.
- Val, A.L. 1996. Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. The Physiology of Tropical Fishes, 21:59-73.
- Val, A.L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiology*,.
- Val, A.L.; Affonso, E.G.; Souza, R.H.S.; Almeida-Val, V.M.F.; Moura, M.A.F. 1992. Inositol pentaphosphate in the erythrocytes of an Amazonian fish, the pirarucu (*Arapaima gigas*). *Canadian Journal of Zoology*, 70:852-855.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. de. 1995. Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspect. (S.l.): Springer.
- Val, A.L.; de Almeida-Val, V.M.F.; Affonso, E.G. 1990. Adaptative features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 97:435-440*.

- Val, A.L.; Gomes, K.R.M.; de Almeida-Val, V.M.F. 2015. Rapid regulation of blood parameters under acute hypoxia in the Amazonian fish *Prochilodus nigricans*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 184:125-131.
- Val, A.L.; Mazur, C.F.; Salvo-Souza, R.H.; Iwama, G.K. 1994. Effects of experimental anaemia on intra-erythrocytic phosphate levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of fish biology*, 45:269-277.
- Val, A.L.; Schwantes, A.R.; de Almeida-Val, V.M.F.; Schwantes, M.L.B. 1985. Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect from lotic and lentic *Hypostomus regani* populations (São Paulo-Brasil). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 80:737-741.
- Val, V.M.F.; AL, S. 1998. *Hypoxi*a adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. *African Zoology*, 33:107-114.
- Van den Beucken, T.; Koritzinsky, M.; Wouters, B.G. 2006. Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer biology & therapy*, 5:749-755.
- Voet, D.; Voet, J.G.; Pratt, C.W. 2002. Fundamentos de Bioquímica. 2da ed. Artmed, Porto *Alegre, RS, BRA, 1040 p.*
- Weber, R.E. 1996. Hemoglobin adaptations in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity. Dans *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon*,. (S.l.): INPA.
- Weber, R.E. 2000. Adaptations for oxygen transport: lessons from fish hemoglobins. *Dans Hemoglobin function in vertebrates*, (pp. 23-37). (S.l.): Springer.
- Weber, R.E.; Lykkeboe, G. 1978. Respiratory adaptations in carp blood influences of hypoxia, red cell organic phosphates, divalent cations and CO<sub>2</sub> on hemoglobin-oxygen affinity. *Journal of comparative physiology*, 128:127-137.
- Weber, R.E.; Lykkeboe, G.; Johansen, K. 1975. Biochemical aspects of the adaptation of hemoglobin-oxygen affinity of eels to hypoxia. *Life sciences*, 17:1345-1349.
- Weber, R.E.; Lykk*eboe, G.;* Johansen, K. 1976. Physiological properties of eel haemoglobin: hypoxic acclimation, phosphate effects and multiplicity. *Journal of Experimental Biology*, 64:75-88.
- Weber, R.E.; Wells, R.M.G. 1989. Hemoglobin structure and function. *Dans Lung biology in health and disease*, (pp. 279-310). (S.l.): Marcel Dekker, Inc.
- Wood, S.C.; Johansen, K. 1973. Organic phosphate metabolism in nucleated red cells: influence of hypoxia on eel HbO<sub>2</sub> affinity. *Netherlands Journal of Sea Research*, 7:328 -338.

# Capítulo I

A regulação da tradução proteica relaciona-se com a concentração de GTP nos eritrócitos de tambaqui em hipóxia?

Manuscrito formatado para a Revista Journal of Comparative Physiology – part B

A regulação da tradução proteica relaciona-se com a concentração de GTP nos eritrócitos de tambaqui em hipóxia?

# Oliveira V. Faria de1\* & Adalberto Luis Val1

<sup>1</sup>Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil

Email: vincius.oliveira@inpa.gov.br

Email: dalval@inpa.gov.br

#### Abstract\*

A espécie Colossoma macropomum, por exemplo, quando exposta à hipóxia reduz drasticamente a concentração do seu principal fosfato eritrocitário, o GTP. Essa estratégia visa diminuir a influência que o GTP exerce sobre a hemoglobina, pois ele afeta negativamente a afinidade da proteína com o oxigênio. No estudo que conduzimos usamos a PCR em tempo real para determinar a expressão relativa de dois genes (eIF2α e eIF3A) essenciais para a formação da maquinaria de tradução do RNAm, com o intuito de verificar uma correlação entre intensidade da síntese de proteínas e redução da concentração de GTP nos eritrócitos de tambaqui exposto a diferentes tempos de hipóxia (30, 140, 200 e 260 minutos) abaixo de 1.0 mgO<sub>2</sub>/L. Usamos como indicadores de que os exemplares de C. macropomum estavam em hipóxia os altos níveis de glicose e lactato determinados em amostras do plasma. Notável aumento da expressão relativa dos eIFs foi observada em quase todos os tempos de hipóxia testados, sendo a única exceção o gene eIF2α para os animais expostos a apenas 30 minutos de hipóxia. A queda expressiva nas concentrações de GTP só foi verificada a partir do grupo da hipóxia severa (140 min); porém, como não sofreu mais alteração nos grupos seguintes, fica evidente que a diminuição da [GTP] se deu no espaço de tempo entre os grupos 30 min e 140 min de hipóxia. Durante a síntese de proteínas o GTP é consumido na etapa de tradução após associar-se ao eIF2α e sofrer hidrólise pela GTPase eIF5B. Existe gasto de GTP também na fase elongação, pois à medida que um novo aminoácido é adicionado ao polipeptídeo crescente, duas moléculas GTP são convertidas a GDP. Consideramos o aumento da expressão relativa dos genes eIF2α e eIF3A simultâneo à redução de GTP nos eritrócitos um indício de que durante a síntese de compostos necessários à reestruturação metabólica imposta pela exposição à hipóxia, ocorre um aumento da síntese proteica. Devido ao alto custo energético da síntese de proteínas, esse mecanismo precisa ser transitório. Caso nossa proposta esteja correta, os benefícios imediatos ao tambaqui seriam a reorganização do escopo metabólico de forma mais rápida e diminuição da modulação negativa do GTP sobre a afinidade da Hb com o O2.

Palavras-chave: eIF2α, eritrócitos, GTP, hipóxia, oxigênio, síntese proteica

<sup>\*</sup>Resumo adaptado de acordo com as normas da revista.

# 1. Introdução

Os peixes são organismos dependentes do metabolismo aeróbico para manutenção e controle da homeostase. Apesar disso muitas espécies têm de suportar momentos em que a oferta de oxigênio é bastante limitada (Val et al. 1990; Almeida-Val e Farias 1996; Val 1996; Scott et al. 2016). Por isso, adaptações voltadas a um melhor desempenho sob tal condição está presente nos peixes em diferentes regiões do planeta (Weber 2013; Urbina e Glover 2012; Val et al. 2015). Os ecossistemas aquáticos da Amazônia são marcados por eventos de hipóxia. Nos rios e lagos da região, o oxigênio dissolvido pode variar tanto sazonalmente quanto no curto espaço de um dia, podendo atingir níveis inferiores a 1.0 mgO<sub>2</sub>/L, fenômeno esse que tem um efeito crítico sobre a sobrevivência dos mais variados organismos aquáticos (Kramer et al. 1978; Val et al. 1990). Um importante conjunto de adaptações à hipóxia já é conhecido nas espécies amazônicas, como por exemplo, a busca por águas normóxicas, elevação da taxa de ventilação branquial, respiração na superfície aquática (ASR), liberação de células vermelhas na circulação a partir da contração esplênica, atenuação da taxa metabólica, desenvolvimento de projeção no lábio, ativação dos mecanismos de geração de ATP por vias independentes do oxigênio, redução da concentração dos fosfatos orgânicos eritrocitários, entre outros (revisado por Val e Almeida-Val 1995).

A última dentre as estratégias listadas acima tem sido observada em inúmeras espécies desde a década de 1970, incluindo peixes de diferentes grupos taxonômicos (revisado por Val 2000). O benefício advindo da redução da quantidade de fosfatos orgânicos nos eritrócitos está relacionado ao efeito modulador negativo que estes exercem sobre a afinidade das Hb com o O<sub>2</sub> (Weber 2013). Essa proteína, cuja importância para garantia do suprimento adequado de oxigênio aos tecidos é indiscutível, é formada por quatro cadeias polipeptídicas  $(2\alpha \text{ e } 2\beta)$  com um grupo heme no interior de cada uma (Jensen et al. 1998). Os fosfatos orgânicos agem diminuindo a afinidade da Hb com o O2, uma vez que se ligam à cavidade existente entre as quatro unidades do tetrâmero estabilizando-a no estado tenso (T), uma condição em que a Hb apresenta menor afinidade de ligação com o oxigênio (Weber et al. 1976). Em hipóxia há necessidade emergencial de otimizar a tomada de oxigênio, exigindo que a afinidade Hb-O<sub>2</sub> aumente significativamente, condição essa estabelecida, a priori, pela rápida diminuição da concentração dos fosfatos orgânicos no interior dos eritrócitos (Val et al. 1990; Val et al. 1995; Affonso et al. 2002). Porém, apenas isso não é suficiente para garantir a sobrevivência do organismo ao longo da hipóxia, uma vez que é preciso haver uma reestruturação metabólica de modo a possibilitar a condição ideal para enfrentar o estresse

hipóxico. Essa reorganização metabólica envolve a regulação da expressão gênica, bem como síntese de proteínas (Gracey e Somero 2001; Nikinmaa e Rees 2005).

A principal fonte de moléculas de ATP é a fosforilação oxidativa, um processo no qual a participação do oxigênio como aceptor de elétrons é indispensável, logo, todos os processos celulares com demandas energéticas tendem a ter o ritmo diminuído para se estabelecer um equilíbrio entre a oferta e o consumo de ATP quando há suprimento limitado de O<sub>2</sub> (Boutilier 2001). A síntese de proteínas envolve significativo custo energético para as células e por esse motivo sua regulação em hipóxia tem prioridade para garantir a sobrevivência (Storey e Storey 2004). Como consequência da diminuição do ritmo de produção de novas proteínas muitos genes têm igualmente sua taxa de expressão afetada; entretanto, a hipoxemia no organismo ocasiona a elevação da intensidade de algumas vias metabólicas importantes para as respostas fisiológicas à hipóxia como, gliconeogênese, glicólise, angiogênese e hematopoiese (Almeida-Val et al. 1994; Kumar et al. 2010). Por conseguinte, os genes codificadores das diversas proteínas presentes nessas vias podem sofrer regulação positiva nas primeiras horas de exposição à hipóxia, aumentando significativamente seus níveis de RNAm. A disponibilização de RNAm compreende apenas a primeira etapa da síntese proteica, o passo seguinte consiste na tradução dos transcritos após remoção dos íntrons. Nessa fase é necessário a participação de um conjunto de elementos denominados fatores eucarióticos de início da tradução, os eIFs. Os eIFs atuam recrutando RNAt, RNAm e subunidades ribossomais, além de realizar o escaneamento do RNAm em busca do códon iniciador AUG e desempenhar papel enzimático crucial ao hidrolisar GTP a GDP, passo efetuado pela ação da GTPase eIF5B. Após a completa montagem da maquinaria de tradução e associação das subunidades ribossomais ao RNAm e ao RNAti<sup>Met</sup> (RNA transportador contendo o anticódon da metionina, o primeiro aminoácido a ser adicionado à futura proteína em praticamente todos os vertebrados) tem início a etapa de elongação, oportunidade na qual são consumidas duas moléculas de GTP a cada novo aminoácido adicionado a cadeia polipeptídica crescente (Trachsel 1991; Dever e Green 2012).

Devido ao papel crucial na iniciação da tradução, alguns eIFs estão envolvidos em mecanismos de controle da intensidade da síntese proteica. O complexo eIF2, por exemplo, pode ter sua subunidade eIF2α fosforilada e isso acarreta o bloqueio da transição eIF2-GDP para eIF2-GTP catalisada pelo eIF2B. Esse passo é requerido para a formação do complexo ternário, um conjunto formado pelo RNAt<sub>i</sub><sup>Met</sup> ligado ao eIF2-GTP e que facilita a ligação a subunidade ribossomal 40S (Koritzinsky et al. 2006). O resultado da fosforilação de eIF2α é uma rápida inibição da iniciação da tradução, influenciando por isso na expressão de

inúmeros genes logo nos primeiros minutos de hipóxia (Koritzinsky et al. 2006). Todavia, a inibição ocasionada por essa via é transitória e é possível que esteja muito mais ligada ao rearranjo do escopo metabólico, no sentido de priorizar a síntese de proteínas dos genes relacionados com as adaptações à hipóxia, do que com o bloqueio da tradução proteica por várias horas simplesmente (Koumenis et al. 2002; Koritzinsky et al. 2006; Ilan et al. 2017).

Compreendida a dependência entre tradução do RNAm e a disponibilidade de trifosfato de guanosina (GTP), estabelecemos como objetivo principal neste estudo, determinar se o controle da etapa de iniciação da tradução proteica está diretamente ligado a acentuada queda das concentrações de GTP nos eritrócitos de peixes. Usamos como modelo a espécie *Colossoma macropomum*, um characiforme bastante resistente aos inúmeros desafios ambientais da região amazônica como baixa concentração de oxigênio dissolvido [OD], altas temperaturas e mudanças no pH da água (Aride et al. 2004; Prado-Lima e Val 2016; Wood et al. 2017). Nossa estratégia consistiu no uso da PCR em tempo real para determinar a quantidade de transcritos de RNAm dos genes eIF2α e eIF3A, bem como quantificar a concentração intraeritrocitária de GTP em espécimes de *C. macropomum* submetidos à normóxia, hipóxia em quatro tempos de exposição e recuperação da hipóxia. Os dois genes utilizados foram escolhidos como indicadores da taxa de tradução para a síntese proteica, bem como pela característica associação entre eIF2α e GTP e por eIF3A fazer parte do maior complexo dentre todos os eIFs, o eIF3.

# 2. Material e métodos

# 2.1 Aquisição e aclimatação dos espécimes de Colossoma macropomum

Os exemplares de tambaqui destinados aos experimentos foram obtidos na piscicultura Fazenda Santo Antônio (02°44'802'S, 059°28'836"W, Amazonas, Brasil) e transferidos para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas. Os peixes foram colocados em tanques de polietileno com volume de água de 2500 litros equipado com sistema de aeração automático, aparato de filtragem da água com passagem através de luz ultravioleta para controle de parasitas. Foi obedecido o fotoperíodo natural da região amazônica (12 horas dia e 12 horas noite) e a alimentação se deu por meio de fornecimento de ração comercial (36% de proteína bruta) até a saciedade aparente. Todos os procedimentos de manejo dos animais ao longo do desenvolvimento deste trabalho foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais do INPA – CEUA/INPA (número do protocolo: 052/2015).

#### 2.2 Experimento

Quatorze exemplares de *Colossoma macropomum* foram divididos em dois grupos e colocados em duas caixas com volume de 70 litros. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início do período de aclimatação de 72 horas, ao longo do qual foram monitorados pH, temperatura, oxigênio dissolvido, além de efetuada troca de 25% da água a cada 12 horas. Após a aclimatação foram coletados dois peixes, sendo um de cada caixa. A seguir, na caixa experimental, foi iniciada a injeção de nitrogênio gasoso para diminuir a concentração de oxigênio até o nível de 2.0 mgO<sub>2</sub>/L, a partir desse ponto a injeção de nitrogênio foi interrompida e o consumo pela respiração dos peixes causou a diminuição da [OD] até hipóxia severa. No momento em que a [OD] pré-estabelecida era atingida procedia-se a coleta, retirando-se primeiro um indivíduo da caixa experimental e, a seguir, um da caixa controle (tabela 1). Esse experimento foi repetido oito vezes (n=8) até que todos os grupos tanto da hipóxia quanto da normóxia estivessem formados (massa 93.1±1.0g; comprimento padrão 16.0±0.13cm).

Tabela 1: Esquema de condução das coletas na caixa experimental e na caixa controle.

Caixa experimental			Caixa controle		
Coleta	[OD] mgO <sub>2</sub> /L	Grupos	Grupos	[OD] mgO <sub>2</sub> /L	Coleta
1	7.0	Hipóxia 0 minuto*	Controle 0 minuto	7.0	1
2	1.0	Hipóxia 30 min	Controle 30 min	7.0	2
3	0.5	Hipóxia 140 min	Controle 140 min	7.0	3
4	0.5	Hipóxia 200 min	Controle 200 min	7.0	4
5	0.5	Hipóxia 260 min	Controle 260 min	7.0	5
6	7.0	Recuperação 240 min	Controle rec. 240 min	7.0	6
7	7.0	Recuperação 480 min	Controle rec. 480 min	7.0	7

<sup>\*</sup>Grupo adotado como controle nas análises de expressão gênica e lactato plasmático.

# 2.3 Parâmetros hematológicos, glicose e lactato plasmáticos

Para coleta das amostras de sangue foi realizada punção da veia caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas. Os parâmetros hematológicos e plasmáticos avaliados foram: hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), número de eritrócitos circulantes (RBC) e a partir dos valores obtidos nessas análises foram determinadas as constantes corpusculares Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM). O plasma foi obtido por meio de centrifugação do

sangue durante 5 minutos a 3000 rpm, que foi utilizado para quantificação de glicose e lactato.

Para determinação do Ht, amostras de sangue foram transferidas para tubos de microhematócrito e centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm com posterior leitura do porcentual (%) de sedimentação feita com o uso de uma escala padronizada (Navarro e Pachaly 1994). A concentração de hemoglobina (mg/L) foi mensurada utilizando-se 10µl de sangue diluído em dois ml do reagente de Drabkin, segundo especificações descritas por Kampen e Zijlstra (1964). O número de eritrócitos no sangue (10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>) foi estimado por meio da diluição de 10 µl de sangue em 2 ml de solução formol citrato (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> 38g, CH<sub>2</sub>O 20 ml, água destilada 1L qsp) seguido da contagem das células em câmera de Neubauer, em microscópio óptico usando aumento de 40x (Navarro e Pachaly 1994). As constantes corpusculares VCM (µm<sup>3</sup>), HCM (pg) e CHCM (%) foram obtidas a partir dos valores correspondentes ao número de eritrócitos circulantes, ao hematócrito e à concentração de hemoglobina, aplicando-se as fórmulas estabelecidas por Brown (1993) para cada medida. A glicose plasmática foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico usando o kit comercial Glucose Liquicolor (*InVitro*®, Brasil), seguindo as especificações do fabricante. Os níveis de lactato no plasma (mg/dL) foram determinados consoante instruções descritas em procedimento técnico do fabricante (Sigma Chemical Co., EUA).

# 2.4 Obtenção de extrato sanguíneo e quantificação de fosfatos eritrocitários

De cada amostra de sangue foram coletados 200 μL e adicionados a 200 μL de ácido perclórico 8% para lise das células e liberação dos fosfatos. Na sequência, foi aplicado um vórtex de 10 segundos e depois centrifugação durante 10 minutos a 14000 rpm. 200 μL do sobrenadante foram retirados e transferidos para um microtubo contendo 23 μL de hidróxido de potássio 6M (KOH 6M) (Bartlett 1959) para neutralização, sendo as amostras armazenadas em freezer -80°C. Antes de submeter os extratos sanguíneos à técnica LC-MS/MS (Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada à Espectrometria de Massas), os mesmos foram descongelados e centrifugados mais três vezes (5 min/14000rpm) para máxima eliminação de sais e restos proteicos. De cada amostra foi coletado 10 μL e diluído em 990 μL de solução aquosa de acetato de amônio 2 mM em um *vial*. As análises foram realizadas em modo MRM monitorando-se as transições da razão massa/carga (*m/z*) características para os fosfatos de interesse. As transições monitoradas foram 506.0>158.8 e 522.2>158.8 para ATP e GTP, respectivamente. As corridas foram conduzidas em fase móvel de acetato de amônio 2mM, com vazão de 125 μL/min, coluna cromatográfica Zorbax Eclipse XBD-C18 e

tempo de análise por amostra de 6 minutos, de acordo com protocolo desenvolvido e implantado no LEEM/INPA. Uma curva padrão foi construída com oito pontos a partir de diluições em série de uma solução contendo ATP e GTP a 50 μmol/mL (ATP R²: 0.9989; GTP R²: 0.9991), os pontos estabelecidos foram 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 15, 25 e 50 (μmol/mL). Três quantificações foram realizadas para cada ponto da curva, bem como para cada amostra submetida, de modo que confirmássemos os valores obtidos por meio da repetibilidade.

# 2.5 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Para realização das análises de expressão gênica dos eIFs selecionamos o fígado como órgão indicador da intensidade da taxa de tradução. O tecido hepático pode fornecer um panorama geral do controle da síntese proteica no organismo decorrente do seu amplo conjunto de funções com influência sobre a homeostase energética. Dentre estas funções temos: principal sítio de síntese, metabolismo, armazenamento e distribuição de proteínas, carboidratos e lipídios processados (Bechmann et al. 2012); órgão hematopoiético podendo conter reservas de hemoglobina (Xia et al. 2016); principal órgão de síntese das proteínas plasmáticas (Miller et al. 1951).

Foi extraído o RNA de amostras de fígado de tambaqui (n=5) utilizando o método do  $TRIzol^{\otimes}$  Reagent (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies, EUA) conforme instruções do fabricante. O grau de pureza e a concentração das amostras de RNA total foram verificadas no equipamento NanoDrop\(\text{\omega}\) 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, EUA). A integridade do RNA extraído foi verificada por meio de realização de corrida eletroforética em gel de agarose 1%. Previamente à síntese de cDNA foi realizado o tratamento das amostras com o kit DNase I (Invitrogen, Life Technologies, EUA) com o objetivo de eliminar fragmentos de DNA genômico. De cada amostra foi utilizado 500 ng de RNA para a síntese de cDNA, a qual foi realizada de acordo com as instruções presentes no kit Platus Transcriber RNase H-cDNA First Strand (Sinapse inc\(^{\text{\omega}}\), Brasil) com posterior checagem da concentração e grau de pureza no equipamento usado para o mesmo fim para o RNA, alterando apenas o método para cDNA.

#### 2.6 Confecção e sequência dos *primers* utilizados

As sequências necessárias para confecção dos *primers* foram obtidas a partir do transcriptoma do tambaqui publicado por Prado-Lima e Val (2016), sendo que os autores cederam gentilmente os *contigs* dos genes eIF2α e eIF3A, que foram validados por meio da ferramenta BLASTn disponível no NCBI (<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>) a qual permite a

verificação do grau de similaridade entre sequências comparadas. O *software PrimerExpress* 3.0 (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) foi usado para desenho dos *primers* de ambos eIFs usados neste trabalho. Para a normalização do perfil de expressão dos genes alvos utilizou-se três genes endógenos, o ribossomal 28S (cedido por Silva et al. 2017), tubulina e β-actina, esses últimos confecionados por Prado-Lima e Val (2016). Na tabela abaixo estão os principais parâmetros dos *primers* usados na PCR em tempo real para determinação da expressão relativa dos genes de interesse.

Tabela 2: Primers usados na PCR em tempo real.

Gene	Sequência do primer (5'- 3')	Eficiência	$\mathbb{R}^2$	
EIF2α	(F) CTTGTTTGGCTGGTGCAATG	100.122	0.990	
	(R) CGGCAGATCGAAAGACTTCAC	100.122	0.990	
EIF3A	(F) CGTAACCAACTGACAGCCATG	101.496	0.989	
	(R) GGTGATGCTCCTCTCGCTCT	101.490	0.969	
28S	(F) CGGGTTCGTTTGCGTTAC	98.190	0.990	
	(R) AAAGGGTGTCGGGTTCAGAT	90.190	0.990	
Tubulina	$(F) {\sf GACGTGGTGCCCAAAGATGT}$	98.068	0.985	
	(R) TGGATGGTGCGCTTGGT	90.000	0.963	
β-actina	$(F)\: {\sf GCTCCCCTGAGCGTAAATACT}$	100.525	0.990	
	(R) TGGACAGGGAGGCCAAGAT	100.323	0.770	

### 2.7 PCR em tempo real

A expressão dos genes eIF2α e eIF3A foi analisada por meio da PCR em tempo real (RT-PCR) com o equipamento ViiA7 Dx da Life Technologies (*Applied Biosystems*, EUA). Em uma microplaca de 96 poços adicionamos 1.0 μL of cDNA de *C. macropomum* em triplicata para cada amostra de todos os grupos experimentais (n=5). Em seguida, foi adicionado aos poços destinados à análise de cada gene 1.0 μL de *primer forward* e 1.0 μL do *primer reverse* (eIF2α 2.0 pmol, eIF3A 2.2 pmol, 28S 2.5 pmol, Tubulina 2.0 pmol e β-actina 2.0 pmol), 2.0 μL de água de livre de nucleasse (*Ambion, Life Technologies*, EUA) e 5 μL SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*, EUA) resultando em um volume total de 10 μL. As reações ocorreram sob as seguintes condições: aquecimento durante 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C; sequência de 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos seguido de 1 minuto a 60 °C (temperatura de anelamento de todos os *primers*). As diferenças na expressão gênica foram determinadas pelo método 2-ΔΔCt (Pfaffl 2001).

#### 2.8 Procedimentos estatísticos

Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média. Para detecção de diferenças entre os tratamentos realizados foi usada uma Anova de dois fatores (Anova Two Way), as variáveis preditoras foram concentração de oxigênio dissolvido na água (hipóxia ou normóxia) e tempo de exposição à hipóxia. A *posteriori* foi usado o teste de Tukey adotandose 5% como nível de significância para determinação dos tratamentos diferentes significaticamente. O programa SigmaStat 3.5® foi usado para realização de todos os testes.

#### 3. Resultados

# 3.1 Parâmetros hematológicos e constantes corpusculares

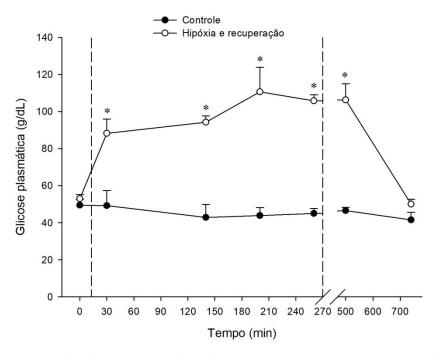
A tabela 3 abaixo contém os dados referentes aos parâmetros hematológicos. Houve aumento do hematócrito nos animais dos grupos com 30, 140, 200 e 260 minutos de hipóxia em comparação com os respectivos controles. Nesses mesmos grupos o teste estatístico detectou diminuição em relação aos animais em normóxia no parâmetro concentração de hemoglobina corpuscular média, CHCM. Apenas no grupo exposto à meia hora de hipóxia houve pequeno incremento na concentração de hemoglobina, no entanto, o valor quantificado difere menos de uma unidade dos demais grupos da hipóxia. Aumento do volume celular, indicado pelo VCM, só foi observado nos grupos submetidos a 200 e 260 minutos de exposição à hipóxia.

**Tabela 3:** Parâmetros hematológicos e constantes corpusculares de espécimes de *Colossoma macropomum* sob normóxia (todos os grupos controle), hipóxia e subsequente recuperação da hipóxia. A presença de asterisco indica diferença entre os tratamentos normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia (p<0.05).

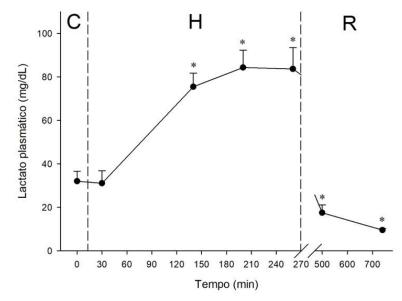
Grupos	Ht (%)	Hb (mg/l)	$RBC (x10^6/mm^3)$	VCM (µm <sup>-3</sup> )	HCM (pg)	CHCM (%)
Hipóxia 0 min	24,4±1,55	10,0±0,55	1,50±0,06	135,9±11,7	57,7±3,69	42,8±3,91
Controle 0 min	$24,0\pm1,93$	$10,1\pm0,33$	$1,67\pm0,18$	134,9±9,63	$56,7\pm2,51$	$42,5\pm2,05$
Hipóxia 30 min	28,9±1,98*	10,8±0,69*	$1,90\pm0,26$	137,0±6,41	$54,0\pm1,32$	38,7±0,63*
Controle 30 min	$22,5\pm2,50$	$9,6 \pm 0,49$	$1,67\pm0,20$	129,4±11,3	$54,9\pm6,13$	43,4±3,09
Hipóxia 140 min	28,1±1,08*	$10,0\pm0,84$	$1,89\pm0,27$	130,2±12,9	$54,4\pm 5,98$	37,8±1,44*
Controle 140 min	$21,9\pm1,02$	$9,3 \pm 0,36$	$1,68\pm0,07$	130,6±6,08	$56,6\pm5,24$	$42,8\pm1,68$
Hipóxia 200 min	27,3±0,75*	$10,1\pm0,34$	$1,79\pm0,13$	165,4±12,0*	$59,5\pm5,06$	37,4±1,62*
Controle 200 min	$22,7\pm1,03$	$10,2\pm0,44$	$1,69\pm0,12$	130,1±9,43	$57,2\pm2,05$	$42,4\pm1,50$
Hipóxia 260 min	30,0±0,86*	$10,1\pm0,48$	$1,91\pm0,04$	150,1±6,42*	$53,0\pm2,70$	35,9±0,93*
Controle 260 min	$22,0\pm2,80$	$9,9 \pm 0,70$	$1,71\pm0,20$	115,7±11,1	$52,5\pm5,53$	$43,5\pm2,20$
Recuperação 240 min	$25,9\pm1,51$	$10,6\pm0,70$	$1,90\pm0,26$	135,0±15,3	$52,9\pm2,83$	$42,8\pm1,85$
Controle rec. 240 min	$24,5\pm2,06$	$10,3\pm0,84$	$1,81\pm0,17$	$128,4\pm13,3$	57,7±3,17	43,6±2,31
Recuperação 480 min	$20,2\pm1,09$	$9,3 \pm 0,34$	$1,70\pm0,11$	$116,9\pm10,0$	$54,5\pm2,17$	$46,5\pm2,35$
Controle rec. 480 min	$21,8\pm2,68$	$9,7 \pm 0,80$	$1,67\pm0,34$	$118,4\pm6,18$	$55,8\pm4,46$	$46,9\pm1,64$

### 3.2 Glicose e lactato plasmáticos

A partir dos primeiros grupos de tambaqui expostos à hipóxia já houve expressivo aumento da concentração de glicose no plasma (Fig. 1). Os valores permaneceram elevados em relação àqueles observados em cada grupo controle, retornando à situação inicial após oito horas de recuperação da hipóxia. Para o lactato, houve claro aumento nas concentrações quantificadas para os grupos de animais expostos a 140, 200 e 260 minutos de hipóxia severa (0.5 mgO<sub>2</sub>/L) (Fig. 2). Após 240 e 480 minutos de recuperação da hipóxia, os valores do lactato plasmático dimiuíram significativamente para concentrações um pouco menores que a registrada no grupo controle (C).



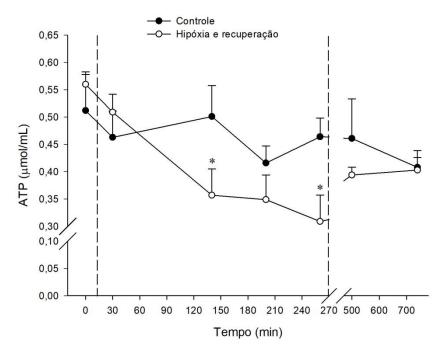
**Figura 1** Glicose plasmática de exemplares de *Colossoma macropomum* (n=5) em normóxia e submetidos à hipóxia (0, 30, 140, 200 e 260 min; círculos vazados) e recuperação da hipóxia (dois últimos círculos vazados). Os dados referentes aos grupos controle estão representados pelos círculos sólidos. O asterisco indica onde houve diferença entre um tratamento e seu respectivo controle; p<0.001.



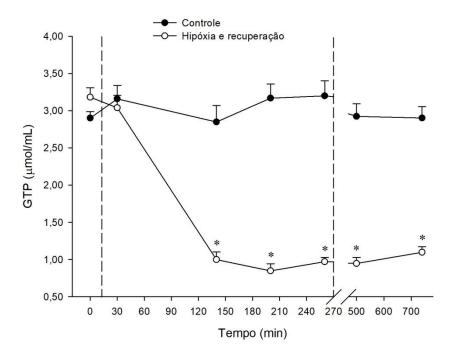
**Figura 2** Lactato plasmático de exemplares de *Colossoma macropomum* (n=5) em normóxia e submetidos à hipóxia (0, 30, 140, 200 e 260 min; círculos vazados) e recuperação da hipóxia (dois últimos círculos vazados). O asterisco indica onde houve diferença entre um tratamento e seu respectivo controle; p<0.001.

## 3.3 ATP e GTP em eritrócitos de tambaqui

Houve redução das concentrações de ambos os fosfatos analisados; entretanto, a diminuição acentuada só foi observada nos grupos submetidos à hipóxia severa (0.5 mgO<sub>2</sub>/L) para os três tempos testados (140, 200 e 260 min; Fig. 3). A partir do terceiro grupo da hipóxia a concentração de ATP exibiu redução de aproximadamente 20%, sendo observado um contínuo descréscimo mas de pequena proporção. Após o restabelecimento da normóxia, isto é, o início da recuperação, os valores quantificados nos dois tempos não mostraram diferença significativa quando comparados com os controles, sendo notado sinal de retorno da [ATP] aos níveis pré-hipóxia. A queda na concentração intraeritrocitária de GTP quantificada a partir do terceiro grupo da hipóxia (140 min) foi bem maior do que para o ATP. Nos peixes submetidos à hipóxia severa (140, 200 e 260 min), os níveis de GTP diminuíram para cerca de um terço das concentrações obtidas em normóxia (controles). Essa condição permaneceu inalterada mesmo após 240 e 480 minutos de recuperação (Fig. 4). É importante mencionar que há seis vezes mais GTP do que ATP nos eritrócitos de tambaqui em normóxia, assim, proporcionalmente a queda na [GTP] é muito maior do que a redução na [ATP].



**Figura 3** Concentração de ATP nos eritrócitos de *Colossoma macropomum* (n=5) submetidos à hipóxia (0, 30, 140, 200 e 260 min; círculos vazados) e recuperação da hipóxia (dois últimos círculos vazados). Os dados referentes aos grupos controle estão representados pelos círculos sólidos. O asterisco indica diferença entre um tratamento e seu respectivo controle; p<0.05.



**Figura 4** Concentração de GTP nos eritrócitos de *Colossoma macropomum* (n=5) submetidos à hipóxia (0, 30, 140, 200 e 260 min; círculos vazados) e recuperação da hipóxia (dois últimos círculos vazados). Os dados referentes aos grupos controle estão representados pelos círculos sólidos. O asterisco indica diferença entre um tratamento e seu respectivo controle; p<0.05.

### 3.4 Expressão dos genes eIF2α e eIF3A

Em relação ao controle (C) a expressão do gene eIF2α aumentou 2, 1.90 e 2.35 vezes nos exemplares de tambaqui expostos à hipóxia severa nos tempos 140, 200 e 260 minutos, respectivamente (Fig. 5). Também registramos incremento de 2 vezes mesmo para o grupo com 240 min de recuperação da hipóxia (tempo 500 na fig. 5). Para o gene eIF2α a recuperação só mostrou efeito após 480 minutos sob condições normais de OD na água, evidenciado pela redução dos transcritos para 1.60 vezes, valor inferior aos observados nos grupos da hipóxia severa, mas ainda superior àquele registrado nos peixes do grupo controle e também no grupo 30 min de hipóxia. Para o gene eIF3A ocorreu aumento da expressão de 2.30 vezes a partir do primeiro grupo exposto à hipóxia aumentando para 2.90, 3.45 e 3.50 nos tempos mais longos de exposição à hipóxia (140, 200 e 260 min)(Fig. 6). Após 240 e 480 minutos de recuperação da hipóxia, a expressão do gene eIF3A retornou para os níveis similares ao do grupo controle.

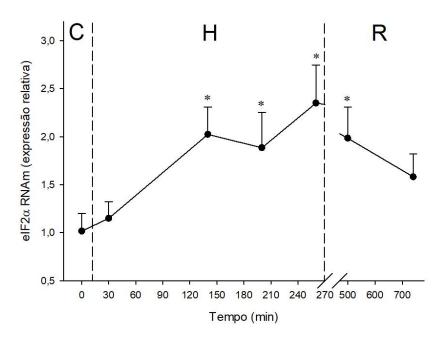
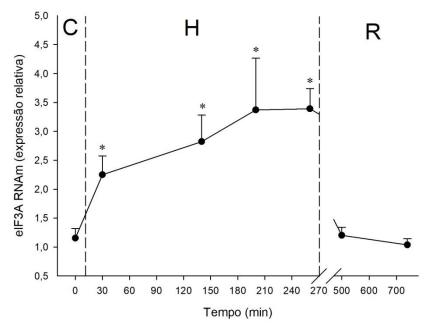


Figura 5 Expressão relativa do gene eIF2 $\alpha$  no figado de *Colossoma macropomum* em normóxia (C), hipóxia (H) e recuperação da hipóxia (R). O asterisco indica diferença em relação ao grupo controle (p<0.05). Normalização realizada a partir dos genes de referência 18S, Tubulina e  $\beta$ -actina.



**Figura 6** Expressão relativa do gene eIF3A no fígado de *Colossoma macropomum* em normóxia (C), hipóxia (H) e recuperação da hipóxia (R). O asterisco indica diferença em relação ao grupo controle (p<0.001). Normalização realizada a partir dos genes de referência 18S, Tubulina e β-actina.

## 4. Discussão

# 4.1 Parâmetros hematológicos

Sendo o tecido responsável pela captação e entrega de oxigênio no organismo, o sangue mostra-se sensível às variações das concentrações desse gás na água. Logo que os sensores presentes nos arcos branquiais do tambaqui detectam a baixa disponibilidade do gás, diversas respostas são estimuladas (Saint-Paul 1984; Sundin et al. 2000; Florindo et al. 2006). Um exemplo é a liberação de catecolaminas, um hormônio que estimula contrações esplênicas no baço ocasionando a liberação de eritrócitos jovens na circulação podendo ocasionar aumento do hematócrito em peixes submetidos à hipóxia (Perry et al. 1989; Perry e Gilmour 1996). No presente estudo notamos aumento do hematócrito e diminuição da CHCM em todos os tempos de exposição à hipóxia e, adicionalmente, detectamos incremento no volume celular nos peixes expostos a 200 e 260 minutos de hipóxia (Tabela 3). Com a rápida liberação de novas células vermelhas na circulação, o que parece ocorrer nos primeiros minutos de hipóxia, a produção de hemoglobina não acontece na mesma velocidade, dessa forma a redução da CHCM é um sinal claro de que existe uma menor concentração de hemoglobina por eritrócito em comparação aos peixes da normóxia. Apesar disso, certamente mais células vermelhas conferem importante benefício a troca gasosa.

À medida que a disponibilidade de oxigênio torna-se crítica para a sobrevivência dos peixes as respostas fisiológicas são importantes. O incremento no número de eritrócitos permite maior captação do oxigênio pelas brânquias, pois associado com o aumento dos batimentos operculares permite uma melhor tomada de O<sub>2</sub>. Se a situação de hipóxia continuar, ocorre a síntese de hemoglobina nos eritrócitos jovens podendo auxiliar na manutenção do suprimento de oxigênio durante várias horas nas espécies mais tolerantes à hipóxia (Nikinmaa 2001; Affonso et al. 2002; Xia et al. 2016). Alterações nos parâmetros hematológicos são clássicas em peixes submetidos à hipóxia e claramente refletem a reorganização metabólica em resposta a reduzida [OD] desenhadas para a manutenção da tomada de O<sub>2</sub>. Isso já foi observado em inúmeras espécies amazônicas incluindo o tambaqui (Val et al. 2015; Baptista et al. 2016; Silva et al. 2017).

### 4.2 Glicose e lactato plasmáticos

A hipoxemia compromete a etapa mitocondrial do catabolismo dos produtos da glicólise, pois a função do oxigênio como aceptor de elétrons na cadeia respiratória encontrase fortemente suprimida. Por isso, para manter as funções vitais, as células ativam as vias anaeróbicas de produção de ATP como a glicólise e a transferência direta de grupos fosfato a partir de intermediários fosforilados como a creatina fosfato (Bessman e Carpenter 1985; Churchill et al. 1994). Intensificar a glicólise quando a fosforilação oxidativa fica parcialmente comprometida permite aos peixes a continuidade da geração de ATP, embora em proporção muito menor quando comparado ao rendimento energético obtido nas mitocôndrias. A glicose necessária para produção de ATP via glicólise anaeróbica é obtida a partir das reservas de glicogênio do fígado (Knox et al. 1980). A glicogenólise, processo no qual as moléculas de glicogênio são hidrolisadas até glicose, é ativada e com isso o nível plasmático de glicose se eleva consideravelmente. Isso foi observado em todos os grupos da hipóxia e também nas amostras obtidas dos animais que passaram por 240 minutos de recuperação. Nos indivíduos recuperados durante 480 minutos, entretanto, a concentração de glicose no plasma foi similar ao nível quantificado nos animais controle, indicando assim, um retorno à situação observada antes da hipóxia (Fig. 1).

Após a glicólise, um dos três destinos possíveis das moléculas de piruvato resultantes é a fermentação láctica. A célula toma esse caminho quando o suprimento de oxigênio é limitado (Almeida-Val e Farias 1996). Nossos resultados sugerem claramente o uso dessa via, pois nos três grupos onde a exposição à hipóxia durou mais tempo (140, 200 e 260 min) e as concentrações de oxigênio da água foram as mais baixas (0,5 mgO<sub>2</sub>/L) os níveis de lactato no

plasma praticamente triplicaram (H, Fig. 2). Ambos os grupos de recuperação da hipóxia mostraram concentração plasmática de lactato equivalente à quase metade daquelas observadas no grupo controle (C) e no grupo exposto a apenas 30 minutos de hipóxia a 1.0 mgO<sub>2</sub>/L. Isso sugere que, vencido o momento de estresse, a enzima lactato desidrogenase é capaz de converter as moléculas de lactato à piruvato, este último utilizado na respiração mitocondrial para geração de ATP (Almeida-Val et al. 1994; Kim et al. 2006).

# 4.3 Redução da [GTP] em hipóxia

Além da ativação das vias anaeróbicas de geração de ATP, outra estratégia que permite aumentar a resistência do tambaqui à condição de hipóxia é a regulação dos seus fosfatos eritrocitários (Marcon e Val 1996; Val et al. 1998; Val 2000; Affonso et al. 2002). Os fosfatos orgânicos são moduladores negativos da afinidade de ligação da hemoglobina com o oxigênio. Eles interagem com o tetrâmero estabilizando-o no estado tenso (T), a forma que a Hb possui menor afinidade pelo O<sub>2</sub> (Benesch e Benesch 1974; Weber 1996). No tambaqui, o trifosfato de guanosina (GTP) funciona como o principal fosfato modulador da afinidade da Hb com o O<sub>2</sub> e, dessa forma, a redução das concentrações de GTP nos eritrócitos tem grande importância durante a hipóxia severa. A redução do GTP intraeritrocitário resulta numa maior capacidade de tomada de oxigênio em ambientes com baixa disponibildiade do gás; portanto, uma menor pressão parcial de oxigênio (PO<sub>2</sub>) é requerida para saturar 50% das hemoglobinas circulantes (Weber e Lykkeboe 1978).

Entretanto, a redução na concentração intraeritrocitária de fosfatos orgânicos só ocorre quando o consumo interno de O<sub>2</sub> torna-se estreitamente dependente da disponibilidade do gás dissolvido na água, isto é, quando a oferta de O<sub>2</sub> é escassa e o organismo precisa criar um rápido balanço entre a captação e o consumo, condição em que o organismo atinge seu P<sub>crit</sub> (Pörtner e Grieshaber 1993). O P<sub>crit</sub> do tambaqui ocorre a partir da concentração de 2.0 mgO<sub>2</sub>/L (Saint-Paul 1984); contudo, essa medida pode sofrer influência da temperatura e do acesso ou não à lâmina superior da coluna d'água, pois temperaturas mais altas (acima de 30°C) prejudicam a solubilidade do oxigênio na água e a respiração na superfície aquática (RSA) que possibilita melhor absorção de O<sub>2</sub> pelas brânquias do tambaqui (Val et al. 1998). No presente estudo, houve redução das concentrações de GTP somente após o início da hipóxia severa correspondente ao tempo 140 min; entretanto, com base nos dados obtidos, há forte evidência que o decréscimo do GTP nos eritrócitos ocorreu entre os tempos 30 min e 140 min de hipóxia, pois a partir desse ponto os níveis de GTP nos eritrócitos permaneceu estável e não retornou à concentração inicial mesmo após 480 min de recuperação (Fig. 4). O

primeiro grupo submetido à hipóxia foi exposto a apenas 30 min a 1.0 mgO<sub>2</sub>/L, enquanto os animais dos grupos com tempo de exposição de 140, 200 e 260 min, experimentaram uma condição de hipóxia severa com nível de 0.5 mgO<sub>2</sub>/L na água, correspondendo, portanto, a uma [OD] bem abaixo do P<sub>crit</sub> da espécie. Como em nenhum momento os exemplares de tambaqui puderam realizar a RSA, a queda nos níveis de GTP ocorreu como parte do conjunto de estratégias para otimizar o máximo possível a utilização do O<sub>2</sub> disponível.

# 4.4 Expressão relativa dos genes eIF2α e eIF3A

A principal proposta desse estudo foi investigar se existe uma relação direta entre a síntese proteica e a drástica redução da concentração de GTP nos eritrócitos de tambaqui em hipóxia. Na etapa de tradução para a síntese de proteínas o GTP tem papel fundamental, ele é requerido pelo fator eucariótico de início da tradução 2α para formação do complexo ternário, o qual é um componente essencial para a completa e correta formação da maquinaria de tradução (Walton e Gill 1975). Como a hipóxia obriga o organismo a promover uma desaceleração do metabolismo devido à baixa oferta energética, os estudos levaram a um consenso entre os especialistas de que a síntese de proteínas é finamente controlada e diminuída (Storey e Storey 2004; Richards 2009). Sendo a síntese proteica o processo celular de maior demanda energética é muito importante sua regulação em situações de oferta reduzida de oxigênio de modo que se possa manter a homeostase. No entanto, outros trabalhos apontam que para uma resposta adequada à hipóxia os animais precisam produzir um conjunto de elementos, incluindo proteínas, enzimas e hormônios com papel chave no estabelecimento do novo cenário metabólico, este último dependente do grau de hipóxia e do tempo de exposição (revisado por Hochachka 1996).

No presente trabalho usamos a PCR em tempo real para determinar a expressão relativa de dois genes que codificam proteínas essenciais da maquinaria de tradução, o eIF2α e o eIF3A. Para o primeiro gene, o aumento dos transcritos ocorreu no intervalo entre a exposição a 30 min e 140 min de hipóxia; contudo, até nos indivíduos do grupo com quatro horas de recuperação os transcritos de RNAm ainda se apresentaram com o dobro do número registrado nos animais do grupo controle, havendo uma leve queda somente no último grupo (480 min de recuperação). O gene eIF3A também apresentou aumento da quantidade de transcritos de RNAm desde o primeiro tempo de exposição à hipóxia (Fig. 6). Para esse gene, no grupo onde houve o menor tempo de exposição à hipóxia (30 min), o número de transcritos de RNAm foi 2.30 vezes maior que no grupo controle, nos grupos seguintes a quantidade continuou crescente sendo observado os maiores valores (2.90, 3.45 e 3.50 vezes) nos tempos

140, 200 e 260 min de hipóxia a 0.5 mgO<sub>2</sub>/L. Para ambos os tempos de recuperação, os transcritos de RNAm de eIF3A retornaram aos níveis pré-hipóxia. O amplo aumento dos transcritos para os dois genes registrados em praticamente todos os tempos em que os peixes foram submetidos à hipóxia (única exceção foi o tempo 30 min para o gene eIF2α) trazem consigo um questionamento que exige respostas, especialmente, se considerarmos a expressão relativa dos eIFs como indicadores absolutos de aumento da taxa de tradução proteica. A questão é: por que, em hipóxia severa, a tradução proteica no tambaqui eleva-se consideravelmente?

Em princípio, não acreditamos que a tradução proteica tenha se mantido aumentada durante todos os tempos de exposição à hipóxia severa, especialmente nos dois tempos mais longos. Sugerimos um aumento na síntese de proteínas entre a exposição a 30 min e 140 min de hipóxia, já que os peixes coletados após este período apresentavam-se em hipóxia acentuada, considerando os níveis de glicose e lactato plasmáticos quantificados (Figs. 1 e 2). Soma-se a isso o fato de somente a partir do grupo exposto a 140 min de hipóxia observarmos a queda substancial nos níveis de GTP, acompanhada pelo incremento na quantidade de RNAm dos genes eIF2α e eIF3A, os quais já mostravam o dobro de transcritos em comparação com o controle (C)(Figs. 5 e 6). Com base nesses dados ratificamos a explicação de que quando houve o estabelecimento da hipóxia no organismo, o reajuste metabólico teve início e no nível genético a expressão de genes cruciais à sobrevivência foi modulada, acarretando em seguida, regulação da velocidade da tradução do RNAm. No entanto, ainda resta esclarecer por que nos dois maiores tempos de hipóxia (200 e 260 min a 0.5mgO<sub>2</sub>/L) as concentrações de RNAm são bem maiores que as observadas para os dois genes nos peixes em normóxia.

A explicação para esses achados é até certo ponto bastante simples. Para degradar os transcritos de RNA as células precisariam dispender uma significativa quantidade de energia, contudo, dada a condição da baixa disponibilidade de ATP na célula, certos processos precisam ser priorizados como a regulação iônica, para citar um exemplo (Boutilier e St-Pierre 2000). Estabelecer um equilíbrio entre a produção e o consumo de ATP quando sua oferta é limitada constitui um dos primeiros mecanismos adaptativos dos vertebrados à hipóxia (Storey e Storey 2004). Sendo assim, não só os transcritos dos eIFs avaliados aqui, mas também de centenas de outros genes que podem ter sido regulados positivamente entre os tempos 30 e 140 min, não foram degradados e por isso permaneceram nas células do fígado mesmo nos exemplares de tambaqui submetidos a 200 e 260 min de hipóxia.

Além da supressão do metabolismo aeróbico, característica da hipóxia, também ocorre ativação de um importante mecanismo de geração de ATP independente do oxigênio, a glicólise anaeróbica. Ton e colaboradores (2003) forneceram evidência favorável a isso em estudo com a espécie *Danio rerio*. Sob baixa disponibilidade de O<sub>2</sub>, eles registraram aumento do nível de RNAm de vários genes ligados à glicólise (fosfoglicerato mutase, fosfoglicerato kinase, enolase, aldolase e lactato desidrogenase); em contrapartida, genes com função característica no metabolismo aeróbico como succinato desidrogenase, malato desidrogenase e citrato sintase, mostraram redução dos seus níveis de RNAm. Em outro estudo com a mesma espécie, van der Meer et al. (2005) registraram um declínio geral nos transcritos de RNAm dos genes envolvidos no ciclo de Krebs e na cadeia transportadora de elétrons, principais vias para produção de ATP quando há disponibilidade adequada de oxigênio.

O presente trabalho é o primeiro no qual foi investigada a expressão relativa dos fatores eucarióticos da tradução (eIFs) em uma espécie amazônica. Entretanto, um estudo recente forneceu dados sobre expressão relativa do gene HIF (Hypoxia Inducible Factor) para a mesma espécie que utilizamos (Silva et al. 2017). Esse gene, objeto de muitas investigações a respeito das respostas à hipóxia no nível genético, tem função reguladora comprovada sobre mais de uma centena de genes ligados aos ajustes fisiológicos direcionados à hipóxia (Hochachka 1996; Nikinmaa e Rees 2005; Ratcliffe 2017); portanto, é plausível considerar que os genes regulados positivamente pelo HIF dependeriam de uma elevação da taxa de tradução para a síntese completa das proteínas. Sendo assim, seu efeito também relaciona-se, indiretamente, aos eIFs. A respeito dos achados de Silva et al. (2017), os juvenis de tambaqui expostos a seis horas de hipóxia severa apresentaram redução da quantidade de transcritos de RNAm do gene HIF-1α, sugerindo que tal gene não exerce regulação positiva sobre genes voltados às adaptações à hipóxia. Como a ação do HIF sobre a regulação gênica é específica para os diferentes grupos de organismos, apresentando também peculiaridades quanto aos tipos de tecidos (Soitamo et al. 2001), existe a possibilidade de que no tambaqui o mecanismo de adaptação ao desafio da hipóxia não seja desencadeado apenas pelo HIF.

O próprio eIF2α têm importante papel na adaptação à hipóxia devido sua regulação com efeito decisivo sobre a intensidade da tradução de proteínas (Koumenis et al. 2002; Koritzinsky et al. 2006). Contudo, evidências recentes mostraram que esse elemento tem efeito mais amplo em situação de hipóxia, uma vez que afeta, por exemplo, a síntese de unidades da hemoglobina como demonstrado por Ilan et al. (2017). Tais autores descobriram que a fosforilação do eIF2α intercede no processo de *splicing* (remoção dos íntrons do pré-RNAm) do RNAm da globina humana. O mecanismo reside na dependência da formação do

spliceossoma pelo eIF2α fosforilado na serina 51, isso ficou evidente quando eles testaram um eIF2α mutante não fosforilável que não permitiu o *splicing* do pré-RNAm da β-globina. Em hipóxia, a fosforilação do eIF2α é a primeira via de inibição da síntese de proteínas relacionada à etapa de iniciação (Koritzinsky et al. 2006). Todavia, a descoberta feita por Ilan et al. (2017) revela que mesmo impedido de participar da formação do complexo ternário por estar fosforilado, eIF2α atua no processamento do RNAm de um gene cujo produto final sempre é requerido de modo intenso quando o transporte de oxigênio precisa ser melhorado.

O gene eIF3A, o qual mostrou aumento superior de RNAm em relação ao eIF2α (Fig. 6) tem como papel principal a associação à subunidade 40S do ribossomo, fenômeno crucial durante a formação da maquinaria de tradução para síntese de proteínas (Marintchev e Wagner 2004). Dessa forma, a elevação da expressão relativa do gene eIF3A sugere uma intensa atividade no fígado ligada à síntese dos elementos que participam das respostas à hipóxia. Uma recente publicação (Beck et al. 2016) forneceu dados do transcriptoma de um peixe híbrido resultante do cruzamento das espécies Morone saxatilis e Morone chrysops submetido à hipóxia severa por quatro horas. 587 genes foram regulados positivamente no fígado, indicando com isso que esse órgão sofre considerável efeito da hipoxemia, e, em contrapartida, inicia uma expressiva reorganização do seu metabolismo contribuindo para manter a homeostase do organismo como um todo. Isso resultaria em um aumento da demanda dos fatores eucarióticos de início da tradução como eIF2\alpha e eIF3A, ocasionando incremento na expressão relativa desses genes como observamos no presente estudo. Há poucos estudos sobre eIFs aumentando o nível de expressão em situação de hipóxia, especialmente para peixes, pois a maioria das pesquisas se concentra nas questões envolvendo mamíferos ou no espécie S. cerevisae (Hinnebusch 2014). O trabalho de Li e colaboradores (2016) constitui um exemplo desse tipo de abordagem. Esses autores, investigando a capacidade regenerativa de células cardíacas de ratos submetidas a um tratamento de hipóxia severa, registraram aumento de 50% tanto de transcritos de RNAm quanto da proteína eIF3A. Li et al. (2016) explicaram tais dados como resultado do importante papel exercido por eIF3A, pois além de participar da tradução proteica ele ainda influencia na regulação do ciclo celular. No tecido hepático de tambaqui onde determinamos a expressão, a quantidade de transcritos do gene eIF3A triplicou durante a hipóxia severa.

Por fim, com base nos dados que obtivemos e naqueles disponíveis na literatura concluímos que houve elevação da velocidade da tradução proteica no início da hipóxia severa. A regulação positiva de um amplo conjunto de genes comprometidos com o ajuste fisiológico frente à hipóxia pode ser o causador da elevação repentina e transitória da síntese

de proteínas. Uma evidência clara da reestruturação metabólica que o tambaqui realiza em hipóxia, foi a utilização da glicólise anaeróbica confirmada por meio da maior concentração plasmática de glicose e lactato nos espécimes submetidos à hipóxia. Esse processo de geração de ATP associado a redução do metabolismo aeróbico, possivelmente, é o que garante que a diminuiçao das concentrações de ATP não seja tão forte nos eritrócitos. Como esperado, os níveis intraeritrocitários de GTP reduziram-se para quase um terço da concentração observada em normóxia, diminuição essa que ocorreu na transição entre uma exposição curta (30 min) e o primeiro tempo de hipóxia severa (140 min). Simultaneamente houve elevação dos transcritos de RNAm dos genes eIF2 $\alpha$  e eIF3A. Esse achado compreende um forte indício da existência de uma correlação entre o controle da síntese de proteínas no organismo e a diminuição da concentração de GTP nos eritrócitos.

#### Referências

- Affonso EG, Polez VLP, Correa CF (2002) Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol 133:375–382.
- Almeida-Val VMF, Farias IP (1996) Respiration in fish of the Amazon: metabolic adjustments to chronic hypoxia. Physiolgy Biochem fishes Amaz Manaus INPA 257–271.
- Almeida-Val VMF, Val AL, Hochachka PW (1993) Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an under-explored biological "goldmine." Surviv Hypoxia Mech Control Adapt 435–445.
- Aride PHR, Roubach R, Val AL (2004) Water pH in central Amazon and its importance for tambaqui (*Colossoma macropomum*) culture.
- Baptista RB, Souza-Castro N, Almeida-Val VMF (2016) Acute hypoxia up-regulates HIF-1α and VEGF mRNA levels in Amazon hypoxia-tolerant Oscar (*Astronotus ocellatus*). Fish Physiol Biochem 42:1307–1318.
- Bartlett GR (1959) Phosphorus assay in column chromatography. J Biol Chem 234:466–468.
- Beck BH, Fuller SA, Li C (2016) Hepatic transcriptomic and metabolic responses of hybrid striped bass (*Morone saxatilis*× *Morone chrysops*) to acute and chronic hypoxic insult. Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics 18:1–9.
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G (2012) The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. J Hepatol 56:952–964.
- Benesch RE, Benesch R (1974) The mechanism of interaction of red cell organic phosphates with hemoglobin. Adv Protein Chem 28:211–237.
- Bessman SP, Carpenter CL (1985) The creatine-creatine phosphate energy shuttle. Annu Rev Biochem 54:831–862.
- Boutilier RG (2001) Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. J Exp Biol 204:3171–3181.
- Boutilier RG, St-Pierre J (2000) Surviving hypoxia without really dying. Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol 126:481–490.
- Brown BA (1993) Hematology: principles and procedures. Lippincott Williams & Wilkins
- Churchill TA, Cheetham KM, Simpkin S (1994) Liver metabolism in cold hypoxia: a comparison of energy metabolism and glycolysis in cold-sensitive and cold-resistant mammals. J Comp Physiol B Biochem Syst Environ Physiol 164:396–404.
- Dever TE, Green R (2012) The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes. Cold Spring Harb Perspect Biol 4:a013706.
- Eckardt K-U, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Kurtz A (1993) Oxygen-dependent expression of the erythropoietin gene in rat hepatocytes in vitro. Pflügers Arch Eur J Physiol 423:356–364.
- Florindo LH, Leite CAC, Kalinin AL (2006) The role of branchial and orobranchial O<sub>2</sub>

- chemoreceptors in the control of aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): progressive responses to prolonged hypoxia. J Exp Biol 209:1709–1715.
- Garcia-Navarro CEK, Pachaly JR (1994) Manual de hematologia veterinária. Varela
- Gracey AY, Troll J V, Somero GN (2001) Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. Proc Natl Acad Sci 98:1993–1998.
- Hinnebusch AG (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. Annu Rev Biochem 83:779–812.
- Hochachka PW (1996) Oxygen sensing and metabolic regulation: short, intermediate, and long term roles. Physiol Biochem fishes Amaz AL Val, VMF Almeida-Val, DJ Randall (Eds) INPA, Manaus 233–256.
- Ilan L, Osman F, Namer LS (2017) PKR activation and eIF2α phosphorylation mediate human globin mRNA splicing at spliceosome assembly. Cell Res 27:688.
- Jensen FB, Fago A, Weber RE (1998) Hemoglobin Structure and Function. In: Fish Physiology. pp 1–40
- Kim J, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang C V (2006) HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab 3:177–185.
- Knox D, Walton MJ, Cowey CB (1980) Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues. Mar Biol 56:7–10.
- Koritzinsky M, Magagnin MG, van den Beucken T (2006) Gene expression during acute and prolonged hypoxia is regulated by distinct mechanisms of translational control. EMBO J 25:1114–1125.
- Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M (2002) Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2α. Mol Cell Biol 22:7405–7416.
- Kramer DL, Lindsey CC, Moodie GEE, Stevens ED (1978) The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. Can J Zool 56:717–729.
- Kramer DL, McClure M (1982) Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes. Environ Biol Fishes 7:47–55.
- Kumar V, Sahu NP, Pal AK, (2010) Modulation of key enzymes of glycolysis, gluconeogenesis, amino acid catabolism, and TCA cycle of the tropical freshwater fish *Labeo rohita* fed gelatinized and non-gelatinized starch diet. Fish Physiol Biochem 36:491–499.
- Lai JCC, Kakuta I, Mok HOL (2006) Effects of moderate and substantial hypoxia on erythropoietin levels in rainbow trout kidney and spleen. J Exp Biol 209:2734–2738.
- Liang D, Chang JR, Chin AJ (2001) The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. Mech Dev

- 108:29-43.
- Li WQ, Li XH, Wu YH (2016) Role of eukaryotic translation initiation factors 3a in hypoxia-induced right ventricular remodeling of rats. Life Sci 144:61–68. doi: 10.1016/j.lfs.2015.11.020
- Mairbaurl H, Weber R (2012) Oxygen Transport by Hemoglobin. Compr Physiol 2:1463–1489.
- Marcon JL, Val AL (1996) Intraerythrocytic phosphates in *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus* (Pisces) of the Amazon. In: International Congress of the Biology of Fishes. The Physiology of Tropical Fish. San Francisco. American Fisheries Society.
- Marintchev A, Wagner G (2004) Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. Q Rev Biophys 37:197–284.
- Miller LL, Bly CG, Watson ML, Bale WF (1951) The dominant role of the liver in plasma protein synthesis. J Exp Med 94:431–453.
- Nikinmaa M (2001) Haemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. Respir Physiol 128:317–329.
- Nikinmaa M, Rees BB (2005) Oxygen-dependent gene expression in fishes. Am J Physiol Integr Comp Physiol 288:R1079–R1090.
- Perry S, Gilmour K (1996) Consequences of catecholamine release on ventilation and blood oxygen transport during hypoxia and hypercapnia in an elasmobranch *Squalus acanthias* and a teleost *Oncorhynchus mykiss*. J Exp Biol 199:2105–2118.
- Perry SF, Kinkead R, Gallaugher P, Randall DJ (1989) Evidence that hypoxemia promotes catecholamine release during hypercapnic acidosis in rainbow trout (*Salmo gairneri*). Respir Physiol 77:351–363.
- Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res 29:e45–e45.
- Pörtner H-O, Grieshaber MK (1993) Critical PO<sub>2</sub> (s) in oxyconforming and oxyregulating animals gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In: The vertebrate gas transport cascade adaptations to environment and mode of life (JEPW Bicudo, ed) CRC Press, Boca Raton FL. pp 330–357
- Prado-Lima M, Val AL (2016) Transcriptomic characterization of tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) exposed to three climate change scenarios. PLoS One 11:e0152366.
- Ratcliffe PJ (2017) Signalling hypoxia by protein hydroxylation: Transcriptional architecture of the HIF response. FASEB J 31:100–101.
- Richards JG (2009) Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. Fish Physiol 27:443–485.
- Saint-Paul U (1984) Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomum*, Serrasalmidae. Environ Biol fishes 11:53–62.
- Scott GR, Matey V, Mendoza J-A (2017) Air breathing and aquatic gas exchange during

- hypoxia in armoured catfish. J Comp Physiol B 187:117–133.
- Silva GS da, Fé LML, Silva M de NP da, Val VMF de A (2017) Ras oncogene and Hypoxiainducible factor-1 alpha (hif-1α) expression in the Amazon fish *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) exposed to benzo [a] pyrene. Genet Mol Biol 0.
- Soitamo AJ, Råbergh CMI, Gassmann M (2001) Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1α) from Rainbow Trout accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension. J Biol Chem 276:19699–19705.
- Souza R, Val A (1990) Parámetros hematológicos (Série vermelha) de *Arapaima gigas* (Osteoglossidormes) durante o primeiro ano de vida em cativerio.
- Storey KB, Storey JM (2004) Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls. Biol Rev 79:207–233.
- Sundin L, Reid SG, Rantin FT, Milsom WK (2000) Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui (*Colossoma macropomum*). J Exp Biol 203:1225–1239.
- Ton C, Stamatiou D, Liew C-C (2003) Gene expression profile of zebrafish exposed to hypoxia during development. Physiol Genomics 13:97–106.
- Trachsel H (1991) Translation in eukaryotes. Crc Press
- Urbina MA, Glover CN (2012) Should I stay or should I go?: Physiological, metabolic and biochemical consequences of voluntary emersion upon aquatic hypoxia in the scaleless fish *Galaxias maculatus*. J Comp Physiol B 182:1057–1067.
- Val AL (2000) Organic phosphates in the red blood cells of fish. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 125:417–435.
- Val AL (1996) Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. Physiol Trop Fishes 21:59–73.
- Val AL, de Almeida-Val VMF (1995) Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspect. Springer
- Val AL, de Almeida-Val VMF, Affonso EG (1990) Adaptative features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). Comp Biochem Physiol Part B Comp Biochem 97:435–440.
- Val AL, Gomes KRM, de Almeida-Val VMF (2015) Rapid regulation of blood parameters under acute hypoxia in the Amazonian fish *Prochilodus nigricans*. Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol 184:125–131.
- Val VMF, Silva AL (1998) Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. African Zool 33:107–114.
- van der Meer DLM, van den Thillart GE, Witte F (2005) Gene expression profiling of the long-term adaptive response to hypoxia in the gills of adult zebrafish. Am J Physiol Integr Comp Physiol 289:R1512–R1519.
- Van Kampen EJ, Zijlstra WG (1961) Standardization of hemoglobinometry II. The

- hemiglobincyanide method. Clin Chim acta 6:538–544.
- Weber RE (2013) Intraspecific adaptation of hemoglobin function in fish to oxygen availability. In: Invited Lectures: Proceedings of the Third Congress of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry, August 31-September 3, 1981, Noordwijkerhout, Netherlands. Elsevier, p 87
- Walton GM, Gill GN (1975) Nucleotide regulation of a eukaryotic protein synthesis initiation complex. Biochim Biophys Acta (BBA)-Nucleic Acids Protein Synth 390:231–245.
- Weber RE (1996) Hemoglobin adaptations in Amazonian and temperate fish with special reference to hypoxia, allosteric effectors and functional heterogeneity. In: Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon. INPA,
- Weber RE, Lykkeboe G (1978) Respiratory adaptations in carp blood influences of hypoxia, red cell organic phosphates, divalent cations and CO2 on hemoglobin-oxygen affinity. J Comp Physiol 128:127–137.
- Weber RE, Lykkeboe G, Johansen K (1976) Physiological properties of eel haemoglobin: hypoxic acclimation, phosphate effects and multiplicity. J Exp Biol 64:75–88.
- Wood CM, de Souza Netto JG, Wilson JM (2017) Nitrogen metabolism in tambaqui (*Colossoma macropomum*), a neotropical model teleost: hypoxia, temperature, exercise, feeding, fasting, and high environmental ammonia. J Comp Physiol B 187:135–151.
- Xia M, Chao Y, Jia J (2016) Changes of hemoglobin expression in response to hypoxia in a Tibetan schizothoracine fish, *Schizopygopsis pylzovi*. J Comp Physiol B 186:1033–1043.