

METABOLISMO ANAERÓBICO DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*) SUBMETIDO À HIPÓXIA E À FADIGA

José do Espírito SANTO-JÚNIOR¹; Márcio SOARES-FERREIRA²; Adalberto Luís VAL³

¹Bolsista PAIC/FAPEAM-INPA; ²Coorientador FAPEAM/INPA; ³Orientador CBIO/INPA

1. Introdução

Peixes, como o tambaqui (*Colossoma macropomum*), entre outros, revelam estratégias de adaptação e sobrevivência em ambientes hipóxicos e/ou anóxicos (Almeida-Val *et al.* 1995; Val 1995, 1996). Como alternativa usam uma combinação de ajustes eritrocitários, supressão metabólica e ativação do metabolismo anaeróbico com ajustes da atividade de algumas enzimas (Chippari-Gomes *et al.* 2005). A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima chave no controle do metabolismo energético dos peixes, catalisando a interconversão de piruvato à lactato e regulando os níveis deste metabólico de acordo com a disponibilidade de oxigênio (Almeida-Val *et al.* 1995, 2011). Diferenças nas propriedades da atividade enzimática da LDH podem ser devidas às diferentes maneiras com que o lactato é manipulado pelos dois principais tipos de músculo. O músculo vermelho, predominantemente aeróbico e rico em mioglobina, é capaz de oxidar diretamente o lactato, produzido por ele mesmo ou pelo músculo branco, quando o oxigênio está disponível, e o músculo branco, predominantemente anaeróbico, produz o lactato como subproduto que posteriormente é oxidado pelo músculo vermelho ou pelo fígado (Weiser *et al.* 1987; Moyes e West 1995). O estudo e caracterização da atividade enzimática nos diferentes tipos de compartimentos do tambaqui em diferentes condições são de extrema importância para um melhor entendimento dos processos evolutivos que permitem sua completa adaptação aos ambientes hipóxicos amazônicos. O objetivo do presente estudo foi analisar o metabolismo anaeróbico do tambaqui (*Colossoma macropomum*) exposto à hipóxia e fadiga, condições que supostamente aumentariam a atividade das enzimas relacionadas à produção de energia, com geração de lactato.

2. Material e Métodos

Experimento 1 – Hipóxia com acesso à superfície da água

Exemplares de tambaqui, adquiridos de piscicultores da região, passaram por um processo de aclimação de 30 dias em tanques, antes do início dos experimentos. Foi montado um sistema de aeração para as câmaras experimentais e, em seguida, 12 animais foram transferidos dos tanques para as câmaras experimentais de aproximadamente 20L onde ficaram mantidos em aeração constante e troca de 70% de água na metade do tempo de aclimação que foi de 24 horas. Após a aclimação, a aeração de 6 câmaras foi desligada e injetado nitrogênio gasoso na água até que a concentração de oxigênio baixasse para aproximadamente 0,5 mg/L, permanecendo as demais câmaras em normóxia. Aos peixes foi permitido coletar água na superfície, sabidamente mais oxigenada, para realizarem trocas gasosas. Os peixes, após os períodos de 6, 12, 24 horas nessas condições, em experimentos separados, foram coletados, anestesiados com MS-222 (Sigma® A5040-25G) na concentração de 3g/L e sacrificados de acordo com as normas do CEUA – INPA, para depois terem os tecidos retirados para armazenamento em -80°C e análises posteriores.

Experimento 2 – Hipóxia sem acesso à superfície da água

Doze peixes foram mantidos nas condições de aclimação por 24 horas e cerca de 70% da água das câmaras foi trocada na metade desse período. Após aclimação, a aeração de 6 câmaras foi desligada e injetado nitrogênio gasoso na água até que a concentração de oxigênio baixasse para aproximadamente 0,5 mg/L, permanecendo as demais câmaras em normóxia. Os peixes foram impedidos de respirarem na superfície por meio da instalação de uma camada plástica, permanecendo nessas condições por uma hora. Em seguida os tecidos foram coletados conforme já mencionado.

Experimento 3 – Fadiga

Este experimento foi baseado no teste de fadiga elaborado por Brett (1964), no qual os peixes são transferidos para o túnel de natação, dotado de bombas controladas por computadores, que é capaz de aumentar a velocidade da água em 10 cm/s a cada 30 minutos, até a fadiga dos peixes. Os peixes foram considerados fadigados quando permaneceram apoiados na grade posterior do túnel por mais de cinco segundos. Embora 12 peixes tenham sido transferidos para o túnel, após o período de duas horas de aclimação, seis deles foram retirados e tiveram os tecidos coletados para análises conforme já mencionado (referidos como controle), e somente os seis restantes foram submetidos ao incremento de velocidade até a fadiga, para então terem os tecidos coletados.

Técnicas Analíticas

Os tecidos analisados foram: tecido muscular vermelho, coletado ao longo da coluna vertebral, da cabeça até a parte caudal; e tecido muscular branco coletado da parte anterior dorsal pouco acima das vértebras. Depois do armazenamento em -80°C por alguns dias foram homogeneizados em tampões específicos e

centrifugados para coleta do sobrenadante. Para atividade enzimática da Lactato desidrogenase (LDH) tecidual foi utilizado o método da extinção da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida (NADH) pela LDH endógena, a partir da adição de piruvato (1mM) como substrato. A taxa de extinção do NADH foi monitorada ao logo de dois minutos com espectrofotômetro Spectramax ajustado para 340 nm. A análise do lactato foi feita por técnica similar, porém foi feito o monitoramento da transformação de NAD⁺ em NADH, a partir da adição da enzima LDH exógena que reagiu com o lactato da amostra. A análise estatística foi feita por intermédio do programa Sigma Plot, aplicando-se teste *t* separadamente para cada tipo de músculo.

3. Resultados e Discussão

Os dados revelam que a exposição à hipóxia, quando os animais são permitidos acessarem a camada superficial da água, mais rica em oxigênio, não causa alterações na Lactato Desidrogenase (LDH) (Figura 1A) seja no músculo branco ou vermelho, assim como não ocorreu acúmulo de lactato tecidual em nenhum dos dois músculos (Figura 1B). A exposição dos peixes pelos períodos de 12 e 24 horas de hipóxia, nas mesmas condições, também não causou nos peixes nenhuma alteração na atividade da LDH e nem acúmulo de lactato tecidual. Isso indica que durante a exposição a esta condição, os peixes foram capazes de suprir toda a demanda de oxigênio necessária aos músculos analisados. É conhecido que esses peixes possuem diversas estratégias de sobrevivência em situações de hipóxia, como por exemplo, expansão dos lábios inferiores que funcionaria para facilitar a captura da água superficial, mais rica em oxigênio, além de ajustes metabólicos e eritrocitários que melhoram a eficiência respiratória (Almeida-Val 1995; Val 1995, 1996; Val *et al.* 2011). Ao contrário da ausência de efeito devido à hipóxia com acesso à superfície, no experimento de hipóxia sem acesso à superfície, houve aumento da atividade da LDH no músculo branco e diminuição no vermelho (Figura 2A), assim como o acúmulo de lactato no músculo branco (Figura 2B). É conhecido que há diferenças na função da LDH nos dois tipos de músculo, sendo que no branco, sua função principal é participar da geração de energia na forma de ATP sem a presença de oxigênio, enquanto que no vermelho, a função também é inversa, reconvertendo em piruvato o lactato gerado localmente ou aquele liberado pelo músculo branco, numa reação dependente de oxigênio (Chippari-Gomes 2002; Lopes 2003). Essa dependência de oxigênio para o funcionamento da LDH do músculo vermelho foi, provavelmente, a causa da sua diminuição (Figura 2A), já que não havia oxigênio na água. A manutenção de níveis normais de lactato no músculo vermelho, diferentemente do ocorrido no músculo branco (Figura 2B), indica que durante hipóxia severa a musculatura vermelha sofre rapidamente algum tipo de supressão metabólica e diminui a geração de ATP. No experimento no qual se conduziu os peixes até a fadiga, não foi observada alteração na atividade da LDH em nenhum dos dois tipos de músculo (Figura 3A), embora se tenha observado aumento da concentração de lactato na musculatura branca. Isso indica que o desempenho natatório assim como a fadiga não estão relacionados com a atividade da LDH nos músculos analisados; porém, ficou claro que há acúmulo de lactato, o que pode contribuir para a fadiga (Davison 1997; Peak e Farrel 2004). A figura 3B indica que o exercício, quando aplicado pelo teste de Ucrit, não gera acúmulo de lactato na musculatura vermelha e, portanto, a contribuição destas fibras para o desempenho pode estar mais relacionada com a disponibilidade de glicogênio (Webb 1998), sendo altamente recomendado que ele seja quantificado nos próximos experimentos.

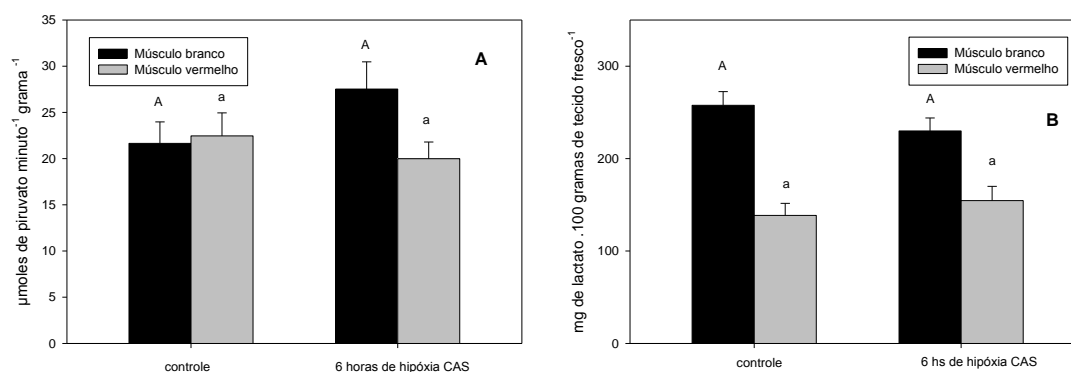


Figura 1 - Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) (A) e níveis de lactato tecidual (B) de exemplares de tambaqui submetidos à hipóxia ($\pm 0,5$ mg/L de oxigênio), com acesso à superfície da água, por 6 horas, e de animais mantidos em normóxia (controle), com aproximadamente 6 mg/L de oxigênio. Reação da LDH foi testada adicionando-se 1 mM de piruvato para verificar a atividade e 10 mM de piruvato para se verificar a inibição da enzima. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para o músculo branco e letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos para o músculo vermelho. Dados mostrados como média e erro padrão da média (n=6). ANOVA *one-way* aplicada separadamente para cada tipo de músculo (LDH) ou teste *t* (lactato).

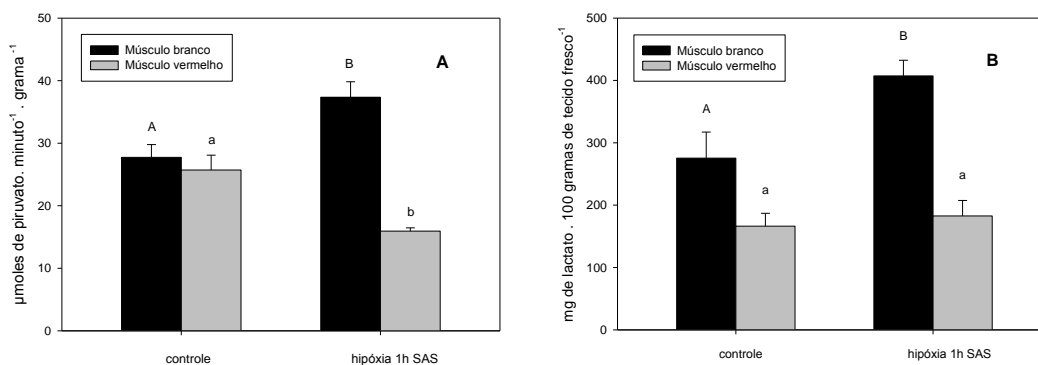


Figura 2 - Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) (A) e níveis de lactato tecidual (B) de tambaqui submetidos à hipóxia ($\pm 0,5$ mg/L de oxigênio) e sem acesso à superfície da água (SAS), por 1 hora, e de animais mantidos em normóxia (controle), com aproximadamente 6 mg/L de oxigênio. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para o músculo branco e letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos para o músculo vermelho. Dados mostrados como média e erro padrão da média (n=6). Teste *t* aplicado separadamente para cada tipo de músculo.

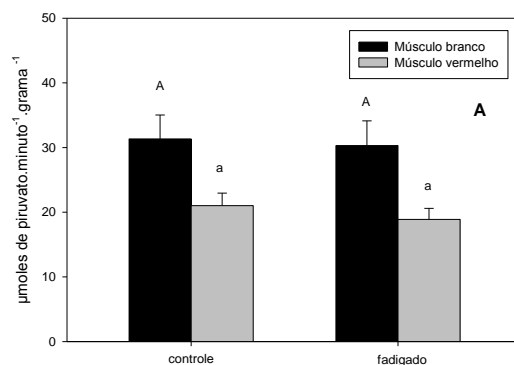


Figura 3 - Atividade da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) (A) e níveis de lactato tecidual (B) de exemplares de tambaqui submetidos a natação forçada até a fadiga (fad.), por meio do protocolo de Ucrit (Brett 1964) e de animais mantidos em repouso dentro do túnel de natação. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os tratamentos para o músculo branco e letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos para o músculo vermelho. Dados mostrados como média e erro padrão da média (n=6). Teste *t* aplicado separadamente para cada tipo de músculo.

4. Conclusão

Podemos concluir que em condições de hipóxia o tambaqui pode obter a quantidade de oxigênio suficiente na superfície da água de maneira a não ter que usar o metabolismo anaeróbico. Ainda, podemos concluir que a LDH está fortemente relacionada à manutenção orgânica em condições de hipóxia em tambaqui, mas não aumenta sua atividade durante a natação forçada aplicada pelo teste de Ucrit.

5. Referências Bibliográficas

- Almeida-Val, V.M.F.; Farias, I.P.; Paula-Silva, M.N.; Duncan, W.P. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon Cichlids. *Braz. J. Med. Biol Res.*, 28(11-12):1257-63.
- Brett, J.R. 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *J. Fish Res. Board Can.*, 21: 1183-1226.
- Chippari-Gomes A.R.; Gomes, L.C.; Lopes, N.P.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 2005. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comp. Biochem Physiol.*, 141(B): 347-355.
- Davison, W. 1997. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 117(A): 67-75.
- Gomes, A.R.C. 2002. Adaptações metabólicas dos ciclídeos aos ambientes hipóxicos da Amazônia. Tese de Pós-Graduação. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 152 pp.
- Lopes, N.P. 2003. Ajustes metabólicos em sete espécies siluriformes sob condições hipóxicas: Aspectos adaptativos. Tese de Pós-Graduação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas. 175 pp.
- Moyes, C.D.; West, T.G. 1995. Exercise metabolism of fish, p. 367-392. In: Hochachka and Mommsen (eds.). *Biochemistry and molecular biology of fishes*, vol. 4. Elsevier Science.

- Peak, S.J.; Farrel, A.P. 2004. Locomotory behaviour and post-exercise physiology in relation to swimming speed, gait transition and metabolism in 53 free-swimming smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *J. Exp. Biol.*, 207: 1563-1575.
- Val, A.L. 1995. Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28: 1119-1127.
- Val, A.L. 1996. Surviving Low Oxygen Levels: Lessons From Fishes of the Amazon, p. 59-70. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D. J. (eds.). *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. INPA, Manaus, Brazil.
- Val, V.M.F.; Oliveira, A.L.; Silva, M.N.P.; Ferreira-Nozawa M.S.; Araújo, R.M.; Val, A.L.; Nozawa, S.R. 2011. Anoxia and hypoxia induced expression of LDH in Amazon Oscar, (*Astronotus crassipinis*). *Gen. Mol. Biol.*, 34(2):315-322.
- Webb, P.W. 1998. *Swimming. The Physiology Of Fishes*. Evans, D. H.; Claiborne, J. B. (editors); CRC, Taylor & Francis.
- Weiser, W.; Lackner, R.; Hinterleiter, S.; Platzer, U. 1987. Distribution and proprieties of lactate dehydrogenase isoenzymes in red and White muscle of freshwater fish. *Fish Physiol. Biochem.*, 3: 151-162.