

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E
PESCA INTERIOR – BADPI

**O custo oxidativo da reprodução predomina em fêmeas ou machos de
Semaprochilodus taeniurus?**

ROSA KARINA SOLIS GARCIA

Manaus - Amazonas
Julho, 2018

ROSA KARINA SOLIS GARCIA

**O custo oxidativo da reprodução predomina em fêmeas ou machos de
Semaprochilodus taeniurus?**

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 Ciências Biológicas, área de concentração Biologia de Água Doce e Pesca Interior

ATA DA DEFESA PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E PESCA INTERIOR

No dia 16 de agosto de 2018, às 09:00 horas, no Auditório do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM, Campus I – INPA, reuniu-se a Banca Julgadora da **DEFESA PÚBLICA de MESTRADO**, composta pelas seguintes Doutoradas, membros titulares: Sidineia Aparecida Amadio, Talita Laurie Lustosa do Carmo e Vera Maria Fonseca de Almeida e Val ; tendo como membros suplentes: Claudia Pereira de Deus e Eliana Feldberg, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO da discente **ROSA KARINA SOLIS GARCIA**, intitulada: **“O CUSTO OXIDATIVO DA REPRODUÇÃO PREDOMINA EM FÊMEAS OU MACHOS DE *Semaprochilodus taeniurus*?”**. O estudo foi conduzido sob a orientação do Dr. Adalberto Luis Val, do INPA.

Após a exposição da aula, dentro do tempo regulamentar, a discente foi arguida oralmente pelos membros da Banca Julgadora, tendo recebido o conceito final:

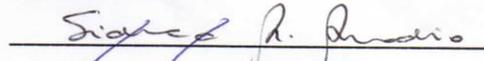
- Aprovada (o) por unanimidade
 - Aprovada (o) por maioria
 - Reprovada

MENÇÃO: - Com “Distinção”

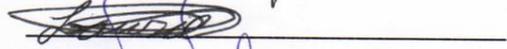
- Com “Distinção e Louvor”

Foi lavrada a ata e assinada pelos membros presentes da Banca Julgadora.

Sidineia Aparecida Amadio -INPA



Talita Laurie Lustosa do Carmo - UFAM



Vera Maria F. de Almeida e Val – INPA



Claudia Pereira de Deus – INPA

Eliana Feldberg - INPA


Dra. Claudia Pereira de Deus
Coordenadora do PPG BADPI
PO. 244/2016 – INPA/MCTIC-PR



Esta Ata é um documento de comprovação único e exclusivo da Defesa Pública, não podendo ser usado para outro fim. O ÚNICO documento que comprova a titulação de MESTRE e DOUTOR é o respectivo DIPLOMA. O Regulamento do BADPI estabelece no seu Artigo 71 que, “Ao discente que houver completado todos os requisitos contidos nos Regulamentos Geral dos PPGs do INPA e do BADPI será conferido o título de Mestre ou Doutor, qualificado pela denominação do programa aprovado na CAPES completado com indicação, no diploma, da área de concentração, quando for o caso.” Para obtenção do título o estudante deve cumprir ainda, o exigido nos Arts. 72, 73 e 74 do Regulamento do BADPI.

G216 Garcia, Rosa Karina Solis
O custo oxidativo da reprodução predomina em fêmeas ou machos de *Semaprochilodus taeniurus* / Rosa Karina Solis Garcia. --
- Manaus: [s.n.], 2018.
25 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2018.
Orientador : Adalberto Luis Val, Dr.

Área de concentração : Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Estresse oxidativo. 4. Fase reprodutiva. 5. Peixes migratórios. I. Título.

CDD 597.5

Sinopse:

Estudou-se a diferença do custo oxidativo da reprodução em fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus* na bacia amazônica.

Palavras-chave: peixes migratórios, reprodução, estresse oxidativo, antioxidantes.

Dedicatória

Aos meus pais Olga e Javier e minha irmãzinha Maria Paz apesar da distancia, eles são um suporte para mim em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

A Deus que me ajudou a superar todos os obstáculos e conseguir resultados e aprendizados maravilhosos neste mundo de “pesquisa” que somente os que conhecemos podemos entender o quão é difícil e ao mesmo tempo o quão gratificante é.

A Vera Val, por ser uma pessoa maravilhosa o tempo todo, com um sorriso tão bonito, dando abraços de mãe para gente, nos alunos do leem.

A todos os alunos/as do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/INPA), cada um de vocês ajudou de alguma forma para que este trabalho seja concluído. Com cada um eu aprendi uma coisa nova, e absolutamente tudo o que eu sei fazer hoje na bancada e fora da bancada, aprendi com vocês. Vou ser grata a isso sempre.

A todas as pessoas que foram para campo comigo na procura do jaraqui tantas vezes, umas seis vezes se me lembro bem. Muito obrigada porque todos vocês deram de seu tempo e disposição para ajudar ficando dias comigo no médio do Rio Negro.

Ao Sr. Marcio e os seus colegas pescadores, e claro o Missi um grande pescador, ribeirinho do Catalão, por que sem vocês eu nunca ia conseguir o jaraqui. A espera do cardume foi mais divertida aquele dia no barco, tomando café e escutando experiências maravilhosas sob o jaraqui que a cada ano eles aguardam durante a época da migração.

Ao BADPI, aos professores do curso e ao Inpa, porque sendo estrangeira me deram a possibilidade de fazer parte do programa e estudar na Amazônia.

A Naza, Claudinha, dona Rai e Raquel fazem a nossa vida de alunos um pouco mais fácil, porque a parte burocrática não é muito legal de lidar.

A Dona Val por todos os cafés, torradas, pão de leite, por salvar a fome depois de tantas horas de trabalhar na bancada, uma pessoa muito legal.

A Dona Elci e suas estagiarias porque sempre me auxiliaram com a papelada do BADPI.

A FAPEAM por pagar minha bolsa de estudos, a qual usei para financiar os meus campos na Amazônia.

Ao ADAPTA por financiar parte dos meus campos e todos os reagentes que foram precisos para realizar as análises.

Ao Raul por ser mais que um namorado, um amigo estando do meu lado o tempo todo, brindando-me com a sua ajuda em todos os sentidos, especialmente corrigindo o português deste trabalho. E finalmente,

Ao meu querido orientador Adalberto Luis Val, porque sempre confiou em mim desde o começo e me deu a oportunidade de ser a sua aluna quando ninguém mais fez. Isso é uma das

coisas mais importantes para mim; e uma das razões de eu concluir com muita satisfação este trabalho.

Resumo

As migrações longas são realizadas por animais para vários fins ecológicos, sendo o reprodutivo um dos mais importantes. Durante esse processo, a demanda de energia do animal é aumentada, induzindo adaptações no nível fisiológico, para lidar com esse estado de consumo energético elevado, e consequente “estresse oxidativo” associado. Com o objetivo de testar o “estresse oxidativo”, suposto custo fisiológico decorrente da reprodução, em fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus*, foram realizadas análises de parâmetros hematológicos, análises enzimáticas e danos oxidativos no coração e fígado de indivíduos no final da migração reprodutiva, coletados no rio Negro, na região do Lago Catalão, Bacia Amazônica. Os parâmetros hematológicos analisados foram: hematócrito, concentração de hemoglobina, número de eritrócitos e constantes corpusculares (VCM, HCM, CHCM) e os níveis plasmáticos de glicose e lactato. O estresse oxidativo foi quantificado de maneira indireta por meio de medidas das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase) e, de maneira direta por meio da análise de marcadores de danos oxidativos, o ensaio cometa, que mede danos na molécula de DNA, e lipoperoxidação, que mede danos causados nos lipídeos da membrana celular. Os resultados mostraram valores maiores da hemoglobina corpuscular média (HCM), glicose, glutathione-S-transferase, superóxido dismutase, lipoperoxidação e danos no DNA nos machos comparado às fêmeas. O único parâmetro observado com valor mais alto nas fêmeas foi o número de eritrócitos. Com base nos resultados, concluímos que, o estresse oxidativo foi maior nos machos do que nas fêmeas, mostrando que, nessa espécie de peixe migratório, a reprodução parece produzir um custo fisiológico maior nos machos que nas fêmeas.

Palavras chaves: espécies reativas de oxigênio, enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, fase reprodutiva, peixes migratórios.

Abstract

Long migrations are carried out by animals for various ecological purposes, with reproduction being one of the most important. During this process, the energy demand of the animal is increased, requiring adjustments at the physiological level to deal with high energy consumption, and consequent associated "oxidative stress". In order to test the "oxidative stress" as physiological cost of reproduction in females and males of *Semaprochilodus taeniurus*, hematological parameters, antioxidant enzyme analyzes and oxidative damage in the heart and liver of individuals were measured at the end of the reproductive migration in specimens of *Semaprochilodus taeniurus* collected in the Negro River, near the Lake Catalão, Amazon Basin. The hematological parameters analyzed were: hematocrit, hemoglobin concentration, number of erythrocytes and corpuscular constants (MCV, HCM, CHCM) and plasma glucose and lactate levels. Oxidative stress was indirectly quantified throughout measurements of the antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase) and, directly by measuring oxidative damage markers using the comet assay, which measures of damage levels to the DNA molecule, and the lipid peroxidation, which indicates damage to cell membrane lipids. The results showed higher values of mean corpuscular hemoglobin (HCM), glucose, glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, lipoperoxidation and DNA damage in males compared to females. The number of erythrocytes was high in females. Based on the results, we conclude that oxidative stress was higher in males than in females, showing that, in this species of migratory fish, reproduction seems to produce a higher physiological cost in males than in females.

Key words: reactive oxygen species, antioxidant enzymes, oxidative stress, reproductive phase, migratory fish.

Sumário

1 Introdução.....	1
1.1 Objetivo	4
Comparar o custo oxidativo da reprodução em machos e fêmeas de <i>Semaprochilodus taeniurus</i>	4
2 Materiais e Métodos	4
2.1 Coleta dos <i>Semaprochilodus taeniurus</i>	4
2.2 Coleta do Material Biológico	5
2.2.1 Coleta de sangue	5
2.2.2 Coleta dos tecidos	5
2.3 Análises Hematológicas	6
2.3.1 Concentração de Hemoglobina ([Hb]).....	6
2.3.2 Contagem de Eritrócitos (RBC).....	6
2.3.3 Determinação das Constantes corpusculares	6
2.4 Análises dos parâmetros bioquímicos	7
2.4.1 Determinação da Glicose plasmática	7
2.4.2 Determinação do Lactato plasmático.....	7
2.5 Análises Enzimáticas	7
2.5.1 Preparação dos Tecidos.....	7
2.5.2 Superóxido dismutase (SOD).....	8
2.5.3 Catalase (CAT)	8
2.5.5 Glutationa-S-Transferase (GST).....	9
2.6 Lipoperoxidação (LPO).....	9
2.7 Ensaio cometa.....	10
2.8 Concentração da proteína	11
2.9 Análises Estatísticas	11
3 Resultados.....	11
3.1 Parâmetros Hematológicos	11
3.2 Parâmetros bioquímicos.....	12
3.3 Análises Enzimáticas	13
3.3.1. Superóxido dismutase (SOD)	13
3.3.2 Catalase (CAT)	13
3.3.3. Glutationa peroxidase (GPx).....	14
3.4.4. Glutationa S transferase (GST).....	14
3.4.5. Lipoperoxidação (LPO)	15
3.4.6 Ensaio Cometa	15
4 Discussão	16
5 Referências Bibliográficas.....	21

1 Introdução

A família *Prochilodontidae* possui uma ampla distribuição no continente sul americano, estando presente em todos os países, com exceção do Chile. Dentro dessa família se encontram vinte e uma espécies distribuídas em três gêneros. A maioria realiza migrações de até 1500 km (Der Sleen e Albert 2018). O gênero *Semaprochilodus* se encontra distribuído somente na bacia amazônica, Orinoco e alguns rios da Guiana (Carolsfeld *et al.* 2003). O objeto desta pesquisa foi o *Semaprochilodus taeniurus* (Vallenciennes, 1817), popularmente conhecido na região amazônica brasileira como “jaraqui” ou “jaraqui de escama fina”. *Semaprochilodus taeniurus* e *S. insignis* (jaraqui de escama grossa) são consideradas as espécies mais exploradas pela pesca comercial e formam parte das principais dietas alimentares das populações de baixa renda da Amazônia Central (Vazzoler *et al.* 1989, 1990; Santos *et al.* 2006).

O *Semaprochilodus taeniurus* migra rio abaixo, com fins reprodutivos e tróficos, dentro da Bacia Amazônica, desde o rio Negro, e outros tributários de águas pretas e águas claras, para as águas brancas do rio Solimões, realizando três tipos de migrações: a reprodutiva, trófica e de dispersão (Ribeiro 1983). A migração reprodutiva tem início no começo da enchente, quando *Semaprochilodus taeniurus* desce até o encontro das águas para desovar. Em seguida, acontece a migração trófica, que corresponde à fase em que os indivíduos de jaraqui, logo após a desova, entram nas áreas alagáveis de água preta, denominadas “igapós”, onde permanecem por aproximadamente três ou quatro meses se alimentando, esperando o sinal da vazante, para então migrar ao canal principal do rio. Ademais, durante este período, também acontece a migração de dispersão, que corresponde ao movimento de saída dos jovens jaraquis das várzeas e migração para o canal principal do rio Negro (Ribeiro 1983).

A migração impõe diferentes desafios fisiológicos para os animais, devido à alta demanda de energia. Para tanto, alterações e adaptações no organismo, são condições necessárias durante o processo migratório, principalmente para manter a homeostase celular (Costantini *et al.* 2007; Weber 2009; Wilson *et al.* 2014). Por outro lado, a reprodução é considerada umas das fases mais importantes ao longo da história de vida dos organismos, sendo estudada dentro da teoria conhecida como “The life history trade-offs”, “The life history” ou “Life-history Theory” (Speakman 2007; Monaghan e Metcalfe 2009; Speakman e Garratt 2013; Cram *et al.* 2015; Alonso-Alvarez *et al.* 2017; Elmer *et al.* 2017).

Entende-se por *trade-off* a “alocação de um recurso em uma característica, que o torna pouco disponível para ser investido em outra característica” (Ołdakowski *et al.* 2015). Em outras palavras, os organismos não podem ser bons em todas as atividades (por exemplo:

explorar recursos, fugir de predadores, reproduzir, sobreviver). Isto explicaria porque um bom desempenho em relação a uma função implica em prejuízo em relação a outra função (Monaghan *et al.* 2009; Metcalfe e Monaghan 2013). Portanto, durante a reprodução os organismos podem investir tempo e energia na alocação de recursos, tendo por outro lado o custo fisiológico, como o estresse oxidativo, que compromete a sobrevivência, longevidade e mesmo o sucesso da próxima reprodução (Speakman 2007; Selman *et al.* 2012).

O estresse oxidativo é a base da “Hipótese do custo oxidativo da reprodução” (Costantini *et al.* 2007, 2008; Costantini e Verhulst 2009; Stier *et al.* 2012; Olsson *et al.* 2012; Costantini *et al.* 2014, 2015; Ołdakowski *et al.* 2015; Blount *et al.* 2016; Costantini 2016; Alonso-Alvarez *et al.* 2017; Elmer *et al.* 2017). O estresse oxidativo é formado por causa do desequilíbrio entre a produção de radicais livres de oxigênio (ROS), também conhecidos como espécies reativas de oxigênio, e o sistema antioxidante (Alonso-Alvarez *et al.* 2004; Lushchak 2014; Watson *et al.* 2018).

A descoberta dos radicais livres começou com a teoria da toxicidade do oxigênio, que foi proposta pela pesquisadora argentina Rebeca Gershman em 1954, motivada pelos seus experimentos com oxigênio hiperbárico (Gershman *et al.* 1954). Na época, a teoria não foi aceita devido a argumentações de que os radicais livres eram muito tóxicos para estarem presentes nos sistemas biológicos em condições fisiológicas (Boveris 2005). A teoria só foi aceita com a descoberta da enzima superóxido dismutase, em 1969, por Joe McCord e Irwing Fridovich, comprovando a existência de um radical livre, o “superóxido”, nas células aeróbicas (McCord e Fridovich 1969 Boveris 2005). As três substâncias principais intermediárias, chamadas de radicais livres de oxigênio, são os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxil (OH^-). (Ahmad *et al.* 2000). Estes são considerados os mais abundantes nos sistemas biológicos.

Para combater o estresse oxidativo, a célula possui mecanismos de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. (Alonso-Alvarez *et al.* 2006; Speakman e Selman, 2011). Dentre as enzimas que fazem parte do sistema enzimático de defesa dos organismos aeróbicos contra os ataques dos radicais livres de oxigênio, três se destacam como principais: i) a glutatona peroxidase (GPx), que utiliza a glutatona reduzida (GSH) para impedir a formação do radical hidroxil, e encontra-se presente nas mitocôndrias e no citosol; ii) a catalase, que catalisa dois tipos de reação que transformam o peróxido de hidrogênio em água; e iii) a superóxido dismutase que é uma enzima cuja função é dismutar o radical superóxido (Barja 2005). Quando o sistema enzimático descrito acima não realiza a eliminação completa das espécies ativas de oxigênio no sistema, estas causam danos no nível celular, nas proteínas, no DNA, e nos lipídios,

causando, neste último caso, a lipoperoxidação lipídica (LPO) (Ahmad *et al.* 2000). Esses danos oxidativos poderiam ser mais susceptíveis durante a migração reprodutiva (Wilson *et al.* 2014).

Assim, estudos em *Semaprochilodus taeniurus* realizados por Vazzoler *et al.* (1989) durante a migração reprodutiva, mostraram que o desenvolvimento gonadal implica no aumento do desgaste fisiológico e metabólico, exigindo maior quantidade de energia no processo. O metabolismo elevado devido ao alto custo energético durante a reprodução é tido como uma das causas principais na produção dos ROS (Amérand *et al.* 2010). Porém, estudos recentes têm demonstrado resultados contrários, mostrando que, na realidade, uma alta taxa metabólica reduz a produção das espécies reativas de oxigênio, que levaram Speakman e Garratt (2013) a propor a “hipótese sobre a taxa metabólica”. Ademais, outras hipóteses foram propostas recentemente para explicar porque a maioria dos trabalhos descobre menos estresse oxidativo em animais na fase reprodutiva. São as hipóteses de “alocação de recursos” e “da blindagem oxidativa”, ambas revisadas por Alonso-Alvarez *et al.* (2017).

A primeira hipótese propõe que não existe um *trade-off* entre o estresse oxidativo e a reprodução. Em outras palavras, o animal possui recursos suficientes para investir tanto na reprodução quanto nos antioxidantes e reparo das moléculas. Desta forma, não sofrem prejuízo com o custo oxidativo decorrente da reprodução (Metcalf e Monaghan 2013; Speakman e Garratt 2013). A segunda hipótese, proposta por Blount *et al.* (2016), trata especificamente dos resultados observados em vários estudos com fêmeas reprodutoras, demonstrando que o estresse oxidativo é mais baixo nelas do que nas não reprodutoras. Considera esta hipótese que este fenômeno seja uma resposta adaptativa para fazer frente ao custo oxidativo da reprodução. As fêmeas possuem, assim, um sistema de defesa para se proteger dos danos oxidativos e, ao mesmo tempo, proteger os gametas e os seus descendentes, uma vez que esses danos oxidativos podem passar para a prole ou afetar o êxito reprodutivo.

Por outro lado, os resultados do estresse oxidativo durante a reprodução estão relacionados ao aumento ou à diminuição das atividades antioxidantes, e ao tecido onde se encontram como foi proposto por Costantini e Verhulst (2009). Ou ainda, podem estar relacionados a outros fatores que influenciam as respostas fisiológicas dos organismos durante esta fase, como os hormônios, moléculas de reservas energéticas (glicose e lipídeos), metabolismo, níveis de antioxidantes nas dietas, comportamento, entre outros (Monaghan *et al.* 2009).

Conclui-se, assim, que os resultados da “Hipótese do custo oxidativo da reprodução” são, até o momento, contraditórios, considerando que atualmente o mecanismo fisiológico no qual se baseia o custo da reprodução é desconhecido. Ressalta-se, portanto, a importância da

realização de estudos acurados, que apresentem uma homogeneidade no delineamento experimental, metodologia e análises, de acordo com o comportamento, a biologia, e os grupos de animais a serem estudados, e com ênfase nos mecanismos atuantes durante a reprodução. Dessa forma, este estudo busca entender se a migração reprodutiva demandaria um custo oxidativo maior nas fêmeas ou nos machos de *Semaprochilodus taeniurus* na bacia Amazônica.

1.1 Objetivo

Comparar o custo oxidativo da reprodução em machos e fêmeas de *Semaprochilodus taeniurus*.

2 Materiais e Métodos

2.1 Coleta dos *Semaprochilodus taeniurus*

As coletas foram realizadas no mês de janeiro de 2018, na estação de cheia. O esforço de coleta se deu por meio de observação dos cardumes com ajuda dos pescadores da pesca comercial. As observações consistiram em 7 dias de espera na margem direita do Rio Negro no período de 4:00h até as 17:00h. O cardume foi avistado por volta das 15h, descendo rio abaixo em direção ao encontro das águas, nesta situação foram rodeados com rede de cerco com aproximadamente 100 metros de comprimento por 20 metros de altura. Em seguida os pescadores cercaram o cardume e arrastaram até a superfície da água. Neste momento o característico “ronco” dos jaraquis machos foi alto e intenso. A coleta se deu próximo ao (Lago Catalão, 3°10'04" S e 59°54'45" W) . Este lago de inundação recebe anualmente variações nos níveis das suas águas em sincronia com os períodos de enchente/cheia, vazante/seca na confluência do Rio Negro com o Rio Solimões, localizada próxima à cidade de Manaus, no estado do Amazonas, Brasil.

Com ajuda do puçá, os indivíduos foram colocados em duas caixas de isopor com capacidade de 1000 litros contendo três bombas de aeração em cada caixa. Deste modo foi garantido que os peixes chegaram em bom estado até o flutuante de pesquisa do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) no Catalão. No flutuante, foram acondicionados em caixas para mantê-los em condições ideais e iniciar a coleta. Durante o transporte não se observou mortalidade de nenhum indivíduo. Se obtiveram medidas dos parâmetros físicos e químicos da água por meio de um termo-oxímetro YSI modelo 85 FT. Foram amostrados exemplares de *Semaprochilodus taeniurus* adultos machos (n= 10; peso $235 \pm 32,1$ g e comprimento padrão $21,8 \pm 1,2$ cm) e fêmeas (n=10; peso $376,5 \pm 61,5$ g e comprimento $24,7 \pm 1,4$ cm).

2.2 Coleta do Material Biológico

2.2.1 Coleta de sangue

Para a coleta dos materiais biológicos foi realizada primeiramente a extração do sangue por meio da punção da veia caudal com seringas previamente heparinizadas. Extraíu-se aproximadamente 3 ml do tecido sanguíneo de cada indivíduo macho e fêmea. Uma pequena alíquota foi transferida para os tubos de microhematócrito, centrifugada a 12.000 rpm durante 10 minutos utilizando uma centrífuga FANEM Modelo 207N própria para análises de hematócrito (Ht). A leitura do percentual (%) de sedimentação dos glóbulos vermelhos foi realizada com o auxílio de uma escala padronizada, segundo o método de Goldenfarb et al. (1971).

Para a determinação da concentração de hemoglobina ([Hb]) 5µl de sangue foram diluídos em microtubos contendo 1 ml do reagente Drabkin. Para a contagem de eritrócitos (RBC), igualmente outros 5µl de sangue foram diluídos em 1 ml do reagente formol citrato. Ambos reagentes foram utilizados para manter as células conservadas até o momento das análises hematológicas. Enquanto para o ensaio cometa foi necessária uma quantidade de 5µl de sangue diluído em 300µl de RPMI, *Roswell Park Memorial Institute* meio de cultura que contem vitaminas, aminoácidos e outros compostos (glicose, glutatone, vermelho de fenol) usado para manter a integridade celular. Tal mistura foi armazenada a -20°C e transportada até o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/INPA) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) para posteriores análises.

O restante do sangue foi centrifugado a 3000rpm durante 10 minutos, o plasma foi removido e armazenados a -20°C até o momento das análises dos parâmetros bioquímicos (lactato e glicose).

2.2.2 Coleta dos tecidos

Após a coleta de sangue, os indivíduos foram eutanasiados para as extrações de brânquias, fígados, rins, corações e os músculos vermelho e branco. Os tecidos foram acondicionados em microtubos e colocados em nitrogênio líquido, até o transporte para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/INPA) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). No laboratório as amostras foram armazenadas a -80°C.

2.3 Análises Hematológicas

2.3.1 Concentração de Hemoglobina ([Hb])

As amostras de sangue (5µl + 1ml do reagente Drabkin) foram transferidas para cubetas de plástico com capacidade de 2ml. Após agitação, as mesmas foram lidas, segundo o método descrito por Kampen e Zijlstra (1961), em espectrofotômetro (Spectronic Genesis-2) com comprimento de onda de 540 nm. Os valores em (g/dL) da concentração de hemoglobina foram obtidos por meio da fórmula:

$$\text{Hb} = \text{Abs } 540 \times 0,146 \times 201$$

Onde: Abs 540 = absorvância em 540nm; 0,146 = fator de correção; 201 = diluição da amostra.

2.3.2 Contagem de Eritrócitos (RBC)

A contagem dos eritrócitos foi efetuada na câmara de Neubauer, em microscópio óptico Leica DM500 com ampliação de 40x, na proporção 1:200. O número total dos eritrócitos está expresso em milhões de eritrócitos por milímetro cúbico de sangue (número de eritrócitos x 10⁶/mm³). Para o cálculo do número de eritrócitos foi utilizada a fórmula descrita a seguir.

$$\text{RBC} = \text{número de eritrócitos} \times A \times D$$

Onde: A = correção para a área analisada na câmara de Neubauer = 50; D = fator de diluição 200

2.3.3 Determinação das Constantes corpusculares

As constantes corpusculares Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) foram calculadas por meio dos valores de eritrócitos circulantes (RBC), hematócrito (Ht) e concentração de hemoglobina (Hb), de acordo com as fórmulas estabelecidas por Brown (1976), como segue.

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

$$\text{HCM } (\text{pg}): [\text{Hb}] * 10/\text{RBC}$$

$$\text{CHCM } (\%): [\text{Hb}] * 100/\text{Ht}$$

2.4 Análises dos parâmetros bioquímicos

2.4.1 Determinação da Glicose plasmática

Esta análise foi determinada por meio de kit comercial In Vitro® (In VitroDiagnóstica, Minas Gerais, Brasil). Para tal foram utilizados 10 µL de plasma e foram adicionados 990 µL do reagente enzimático incubados a 37°C por 10 minutos. Após este tempo as amostras foram lidas em leitor de microplaca SpectraMax® (Molecular Devices) a 500nm e os valores expressos em mg/dL, foram calculados segundo a fórmula:

$$\text{Glicose} = 100 \times (\bar{X} \text{ Abs amostra} / (\bar{X} \text{ Abs padrão}))$$

Onde: (\bar{X} Abs) = média da absorbância da amostra e (\bar{X} Abs padrão) = média da absorbância do padrão

2.4.2 Determinação do Lactato plasmático

Para a determinação da concentração de lactato no plasma, foi utilizado o procedimento técnico da Sigma Chemical Co. (“kit” n°. 826 UV). O princípio do método consistiu em medir a conversão do lactato em piruvato por meio da redução da coenzima NAD⁺ em NADH⁺. Para tal, foram utilizados 100 µL de plasma, adicionados 100 µl de ácido perclórico (PCA) e, a seguir, neutralizado com KOH. O extrato neutralizado do plasma foi adicionado a uma solução contendo uma mistura da enzima lactato desidrogenase (LDH, 100U/ml) com a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), hidrazina e tampão glicina (0,6 mol/L, pH 9,2). Após 30 minutos de espera a 37°C, a leitura foi realizada em microplaca, no espectrofotômetro SpectraMax® (Molecular Devices) no comprimento de onda de 340nm. Os valores estão expressos em mg/dL.

2.5 Análises Enzimáticas

2.5.1 Preparação dos Tecidos

Os tecidos fígado e coração foram pesados e homogeneizados com auxílio de um triturador automático em tampão (Tris 20 mM (pH 7,6), EDTA 1 mM, ditioneitol 1 mM, 500 mM sacarose e KCl 150 mM), tanto para as análises de lipoperoxidação, quanto para as análises das enzimas SOD, CAT, GPx, e GST. Para tal, as amostras dos tecidos foram mantidas no gelo e diluídas de acordo com os protocolos para as análises: para lipoperoxidação foram diluídas

duas vezes, para CAT quatro vezes e para SOD, GPx e GST, 10 vezes. Após a diluição, foram centrifugadas a 4°C durante 30 minutos a 9000rpm.

2.5.2 Superóxido dismutase (SOD)

Esta enzima dismuta o radical superóxido $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e O_2 . A atividade da SOD é expressa em U SOD por mg de proteína, assumindo-se uma U de SOD como a quantidade de enzima que promove a inibição de 50% da taxa de redução do citocromo C, segundo a metodologia de McCord e Fridovich (1969). Para tal foram utilizados os seguintes reagentes: tampão fosfato de Na^+/K^+ 50 mM ou tampão AB, é uma mistura de um tampão A (fosfato dibásico de potássio 50 mM PM= 174,18) + tampão B (fosfato monobásico de sódio 50mM PM=137,99) sendo que foram utilizados 440ml do tampão A + 50 ml do tampão B com EDTA 0,1mM pH7,8; solução de xantina 1mM (Sigma x-0626); solução de xantina oxidase 0,2 U/ml (Sigma x-1875-25UN); solução de hidróxido de sódio 0,001 M e Citocromo-c. Para o ensaio foram pipetados 1000µl da mistura reativa, 5µl da amostra diluídas 10X e 20 µl da solução de xantina oxidase em cubetas de plástico. A leitura foi realizada no comprimento de onda de 550nm no espectrofotômetro SpectraMax® (Molecular Devices). O valor da absorbância foi utilizado para calcular a atividade da enzima, expressa em U SOD.min⁻¹.mg proteína⁻¹, por meio da fórmula:

$$U\ SOD = ((\bar{X}\ Abs\ amostra - \bar{X}\ Abs\ referencia))/((\bar{X}\ Abs\ referencia)) \times (100)/(0,1 \times\ prote\acute{a}na)$$

Onde: (\bar{X} Abs)= média da absorbância

2.5.3 Catalase (CAT)

Para a análise da atividade da enzima catalase, o método consistiu na quantificação da velocidade de degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), segundo a metodologia descrita por Beutler (1975). Para o ensaio, foi utilizado o tampão da catalase (Tris 0,001mM com EDTA 5mM) e meio de reação H_2O_2 (30%). Foram pipetados 996 µl do meio de reação e 4 µL da amostra diluída 4X em cubetas de quartzo. Para tal a taxa de inibição da decomposição do (H_2O_2) foi medida em comprimento de onda de 240nm no espectrofotômetro SpectraMax® (Molecular Devices). O valor da absorbância foi utilizado para calcular a atividade da enzima, expressa em nanomol de H_2O_2 .min⁻¹.mg proteína⁻¹, por meio da fórmula:

$$CAT = (\bar{X}\ Abs\ amostra)/(prote\acute{a}na) \times 0,071 \times 0,01$$

Onde: (\bar{X} Abs)= média da absorbância

2.5.4 Glutationa peroxidase (GPx)

A enzima Glutationa Peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante que catalisa a redução do H₂O₂ e de hidroperóxidos de ácidos graxos (LOOH), dando como resultado produtos como a água e outros álcoois não tóxicos, por oxidação da glutatona reduzida (GSH) a glutatona oxidada (GSSG). O método utilizado foi o descrito por Thomas *et al.*(1990), utilizando o NADPH como cofator. Assim, o ensaio consistiu em registrar a diminuição de NADPH. A leitura foi realizada em cubetas de plástico, a 340nm no espectrofotômetro SpectraMax® (Molecular Devices). O valor da absorbância foi utilizado para calcular a atividade da enzima, expressa em nanomol de NADPH. min⁻¹. mg proteína⁻¹, por meio da fórmula:

$$GPx = (\bar{X}Abs amostra - \bar{X}Abs referencia)/(10x) \times 6,22$$

Onde: (\bar{X} Abs)= média da absorbância; 10x= diluição; 6,22= coeficiente de extinção molar

2.5.5 Glutationa-S-Transferase (GST)

Esta enzima é considerada como uma enzima detox e atua principalmente sobre compostos eletrofílicos e hidrofóbicos. A atividade da enzima foi medida segundo o método descrito por Keen *et al.* (1976), utilizando-se 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) como substrato. Para realizar o ensaio, foram utilizados os seguintes reagentes: tampão fosfato de potássio 0,1 M - pH7 considerado como o meio de reação, 1-cloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) 100mM, e a Glutationa reduzida (GSH) 100mM. Foram pipetados 15µl da amostra diluída 10X, 235 µl de (CDNB + meio de reação) e 10 µl da GSH. A leitura foi realizada em microplaca a 340nm no espectrofotômetro SpectraMax® (Molecular Devices). O valor da absorbância foi utilizado para calcular a atividade da enzima, expressa em micromol de CNDB.min⁻¹.mg proteína⁻¹, por meio da fórmula:

$$GST = \{(\bar{X}Abs amostra)/(minuto) \times (10x) \times (0,26 \div 1000)\} \times (1.000.000 \div prote\acute{a}na) \times 0,015 \times \epsilon$$

Onde: (\bar{X} Abs)= média da absorbância; 10x= diluição; volume da alíquota= 0,015; €= coeficiente de extinção (9,6Mm⁻¹ cm⁻¹)

2.6 Lipoperoxidação (LPO)

Para a análise da LPO foi seguido o método de FOX (Ferrous Oxidation/Xylenol Orange) descrito por Jiang *et al.* (1991). O método consistiu na rápida oxidação do Fe²⁺ por

hidroperóxidos em condições ácidas e, posteriormente, formação do complexo Fe^{3+} laranja de xilenol, na presença do estabilizador butilato hidroxitolueno (BHT). As amostras foram diluídas 2X, tratadas com ácido tricloroacético TCA ($C_2HCl_3O_2$) e centrifugadas a $4^\circ C$ durante 10 minutos a 5000rpm. Em seguida foi pipetado na microplaca 30 μ l do sobrenadante e 270 μ l do meio de reação (0,1mM de xilenol laranja, 4mM de butilato hidroxitolueno (BHT), 25mM de ácido sulfúrico (H_2SO_4), 0,25mM de $FeSO_4$ e metanol 90%). A solução foi incubada, a seguir, por 30 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 560nm em leitor de microplaca SpectraMax® (Molecular Devices). O valor da absorbância foi utilizado para calcular a atividade da enzima, expressa em micromol de CHP . mg proteína⁻¹, por meio da fórmula:

$$LPO = (\bar{X}Abs amostra)/2,38 \times (2x) \times prote\acute{i}na \times 1000$$

Onde: (\bar{X} Abs)= média da absorbância; 2x= diluição

2.7 Ensaio cometa

Este ensaio foi realizado de acordo com o protocolo modificado por Silva *et al.* (2000). A técnica consistiu em uma medida semi-quantitativa dos danos da molécula de DNA das células sanguíneas. Para tal, foram seguidos os seguintes passos: lâminas foram cobertas previamente com agarose 1,5% em seguida, o sangue, que se encontrava em solução no meio de cultura RPMI, foi colocado sobre as lâminas com a ajuda de uma pipeta, que foram em seguida cobertas com lamínulas. Após este procedimento, esperou-se aproximadamente 15 minutos para a secagem das amostras, e então as lamínulas foram retiradas. Em seguida, as lâminas foram cuidadosamente submersas nas cubetas verticais contendo uma solução de lise, para o rompimento das membranas celulares.

Após este tratamento foram aplicados 25V, 300 mA por 15 minutos, para eletroforese. Foi considerado como a parte final do processo, a realização de várias lavagens com água destilada, solução neutralizadora, fixadora, de parada e coloração com nitrato de prata. As lâminas foram secadas a temperatura ambiente, e para a observação dos níveis dos danos do DNA, se utilizou um microscópio (Leica DM500) de luz com a objetiva de 40x (aumento de 400). Foram, assim, analisadas cem células por lâmina e divididas em scores de acordo com o tamanho da cauda do DNA. A porcentagem de danos em relação ao número total de células analisadas está expresso como segue: zero: >5%; 1: 5-20%, baixo índice de danos; 2: 20-40%, índice de danos intermediário; 3: 40-75%, alto índice de danos e 4: >75%, danos extremos.

2.8 Concentração da proteína

Foi realizada a medida da concentração de proteína total pelo método de Bradford (1976), utilizando padrões de albumina e alíquota das amostras em espectrofotômetro SpectraMax® (Molecular Devices) no comprimento de onda de 595nm. O valor da absorbância foi utilizado para calcular a concentração da proteína, expressa em mg/ml, por meio da fórmula:

$$Proteína = (\bar{X}Abs amostra \times diluição)/1000$$

Onde: (\bar{X} Abs)= média da absorbância; diluição= segue os valores citados anteriormente.

2.9 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste “t-Student” para grupos que apresentaram distribuição normal ou pelo teste de “Mann Whitney Rank Sum” quando não, ambos considerando como significativos os valores de $p < 0,05$. Tanto para as análises quanto para a confecção de gráficos foi utilizado o programa SigmaPlot 11.0. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média.

3 Resultados

3.1 Parâmetros Hematológicos

A contagem dos eritrócitos (RBC) das fêmeas foi maior em relação à dos machos ($p=0,02$). A hemoglobina corpuscular média (HCM) também diferiu entre machos e fêmeas, tendo sido menor nestas em comparação com o valor obtido para os machos de *S.taeniurus* ($p=0,021$). Os valores de hematócrito (Ht), concentração de hemoglobina ([Hb]) e constantes corpusculares (VCM e CHCM) foram semelhantes entre fêmeas e machos (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de *Semaprochilodus taeniurus*. Dados apresentados como média \pm SEM (erro padrão da média, $p \leq 0,05$; Teste t). Os asteriscos significam diferenças entre fêmeas e machos.

	Ht (%)	Hb (g/dL)	RBC ($\times 10^6 \mu\text{L}^{-1}$)	VCM (μm^3)	HCM (pg)	CHCM (%)
Fêmeas	37,2 \pm 1,04	12,08 \pm 0,75	2,73\pm0,130*	138,47 \pm 7,48	44,23 \pm 2,00	32,53 \pm 1,79
Machos	39,5 \pm 2,6	12,87 \pm 0,78	2,35 \pm 0,078	185,72 \pm 20,16	66,01\pm6,63*	36,09 \pm 1,95

3.2 Parâmetros bioquímicos

Os níveis de glicose (mg/ dL) (Figura 1) maior nos machos ($p= 0,003$) do que nas fêmeas, enquanto os níveis de lactato (mg/dL) (Figura 2) não apresentaram diferenças entre fêmeas e machos com valor de ($p= 0,850$).

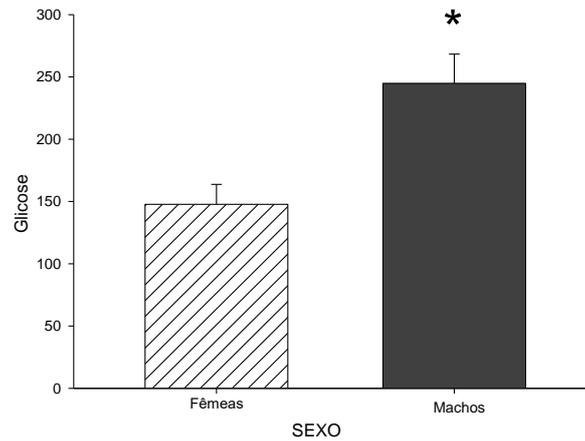


Fig. 1. Níveis de glicose plasmática (mg/dL) em fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus*. O asterisco representa diferença estatística ($p<0.05$).

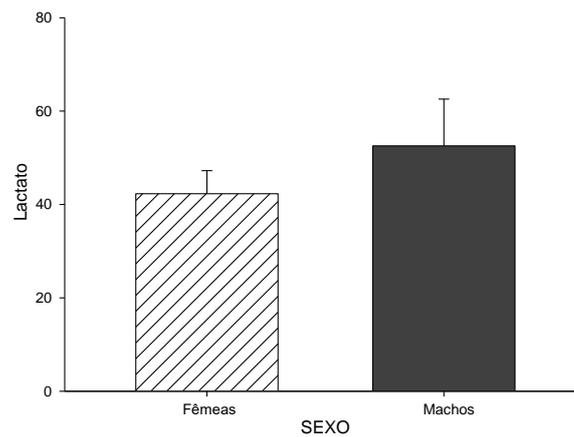


Fig. 2. Níveis de lactato plasmático (mg/dL) de *Semaprochilodus taeniurus* em fêmeas e machos. Não se observa diferenças entre sexos.

3.3 Análises Enzimáticas

3.3.1. Superóxido dismutase (SOD)

A atividade enzimática da SOD foi expressa $\text{U SOD} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$, sendo maior consideravelmente ($p < 0,001$) tanto no tecido cardíaco quanto no tecido hepático (Figura 3) dos machos de *S. taeniurus*, em relação aos valores mínimos encontrados nas fêmeas.

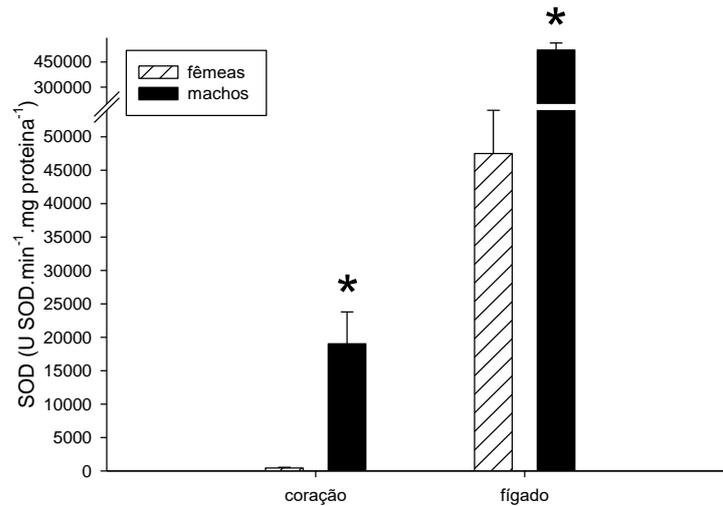


Fig. 3. Atividade enzimática da SOD no coração e fígado de fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus*. Asterisco (*) indica diferença estatística entre fêmeas e machos ($p < 0,05$)

3.3.2 Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi expressa em nanomol de $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ no coração de *S.taeniurus* não apresentou diferença entre fêmeas e machos ($p = 0,487$). O mesmo resultado observou-se no fígado (Figura 4), sem diferença entre os sexos ($p = 0,128$).

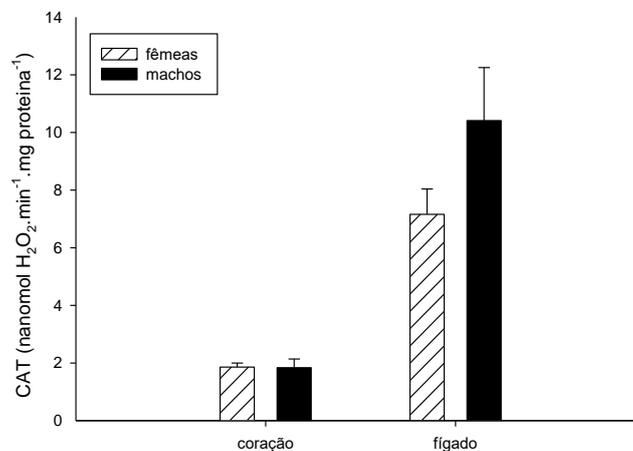


Fig. 4. Atividade enzimática da CAT no coração e fígado de fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus*.

3.3.3. Glutationa peroxidase (GPx)

Os níveis da enzima GPx (nanomol de NADPH. $\text{min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) no coração e no fígado (Figura 5) de *S.taeniurus* não apresentaram diferenças entre fêmeas e machos.

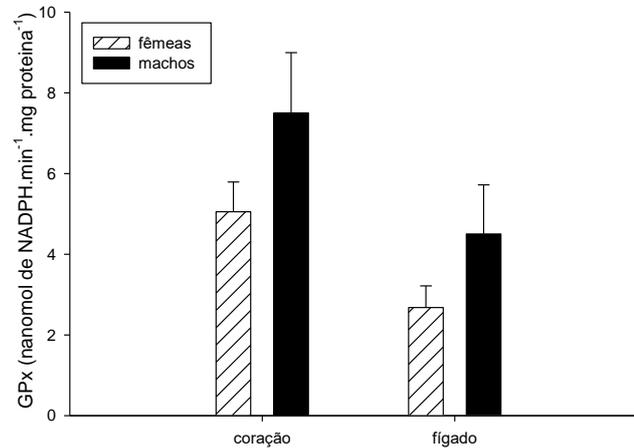


Fig. 5. Atividade enzimática da GPx no coração e fígado de fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus*.

3.4.4. Glutationa S transferase (GST)

A atividade da GST (micromol de CDNB. $\text{min}^{-1}.\text{mg proteína}^{-1}$) de *S.taeniurus* no coração apresentou-se maior nos machos ($p < 0,001$). Já no fígado (Figura 6), a GST não apresentou diferença entre os sexos com valor de $p = 0,394$.

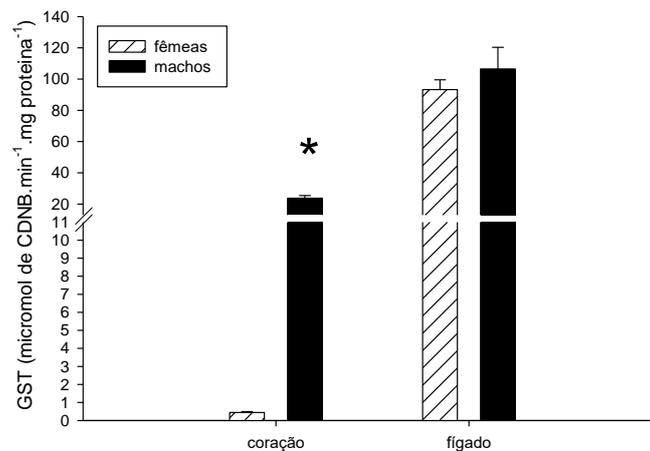


Fig. 6. Atividade enzimática da GST no coração e fígado de fêmeas e machos *Semaprochilodus taeniurus*. Asterisco (*) indica diferença estatística entre fêmeas e machos ($p < 0,05$).

3.4.5. Lipoperoxidação (LPO)

A lipoperoxidação (micromol de CHP .mg proteína⁻¹) no coração de *S. taeniurus* se apresentou maior nos machos ($p < 0,001$) do que nas fêmeas. Com relação ao fígado (Figura 7), não se observou diferença ($p = 0,104$)

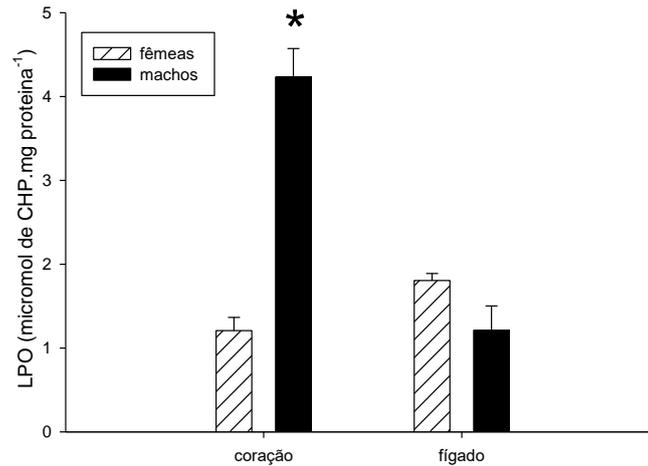


Fig. 7. Lipoperoxidação no coração e fígado de fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus*. Asterisco (*) indica diferença estatística entre fêmeas e machos ($p < 0,05$).

3.4.6 Ensaio Cometa

Os machos sofreram mais danos totais (Figura 8) no DNA eritrocitário que as fêmeas ($p = 0,015$). Além disso, os machos também apresentaram maior porcentagem de danos por classe dos tipos 2, 3 e 4 (danos mais intensos), em comparação às fêmeas, com índice de danos por classe dos tipos 0 e 1 como mais expressivos (Figura 9).

Nos gráficos a seguir são representados o índice de danos totais (Figura 8, com valor de $p = 0,015$), e danos por classe (Figura 9) no DNA das células sanguíneas. É interessante destacar que em ambos casos os machos sofreram maiores danos.

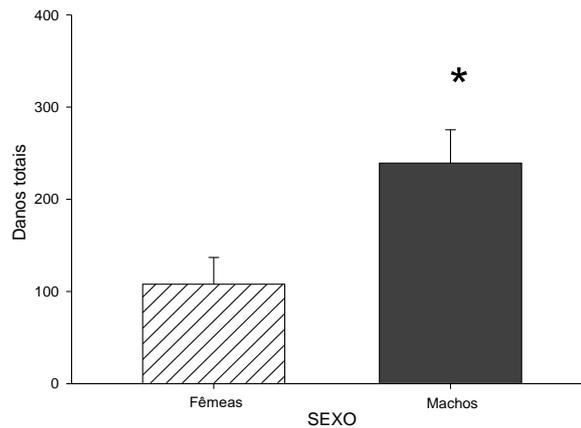


Fig. 8. Danos totais em sangue de fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus*. Asterisco (*) indica diferença estatística entre fêmeas e machos ($p < 0.05$).

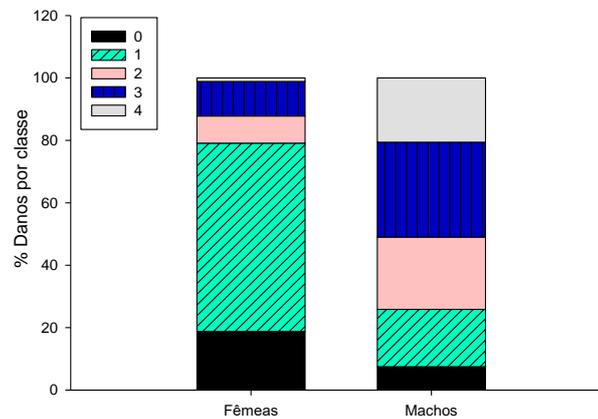


Fig. 9. Danos por classe (%) em fêmeas e machos de *Semaprochilodus taeniurus*. Observe danos maiores dos tipos 2, 3 e 4 nos machos.

4 Discussão

Segundo Ribeiro (1983), é uma característica bem conhecida dos jaraquis o pulo constante na superfície da água, durante a descida do cardume ao encontro das águas, para desovar. Com base em aproximadamente 1600 horas de observação em campo, durante a migração reprodutiva dos jaraquis, o autor descreve quatro tipos de comportamentos conhecidos pelos seguintes termos regionais: rebojar, boiar, lapear, e andar de lera. Os movimentos observados pelos pescadores no momento da descida do cardume são rebojar e boiar. A primeira significa que os indivíduos se aproximam para a superfície da água, realizando movimentos de aspecto circular com suas nadadeiras peitorais e, às vezes, mostrando as suas nadadeiras dorsais. A segunda corresponde ao movimento dos indivíduos, que pulam para a superfície da água, mostrando o dorso. Esses dois comportamentos são típicos desses animais

quando o cardume se encontra viajando pelo meio do rio e, junto com outros comportamentos citados anteriormente, facilitam a visualização do cardume para os pescadores experientes (Ribeiro 1983). Segundo Val, A.L (comunicação pessoal), provavelmente os jaraquis machos são os responsáveis por essas ações, provocando assim a oxigenação da água por onde o cardume passa e, conseqüentemente, beneficiando a respiração aeróbica dos indivíduos do cardume. Esse comportamento dos machos exige deles um esforço natatório ainda maior para a realização da migração reprodutiva, contribuindo para que ocorram mudanças em sua fisiologia para a adaptação dos animais a um estado metabólico elevado. Essas mudanças fisiológicas durante migrações longas foram observadas em peixes e aves (Amerand *et al.* 2010; Costantini *et al.* 2007). Tais mudanças fisiológicas são diagnosticadas por meio dos parâmetros hematológicos (Da Silva *et al.* 2012), entre outros. Assim, neste estudo, o aumento do RBC observado no sangue das fêmeas sugere a liberação de novas células por meio da contração esplênica, possivelmente como uma tentativa de melhorar a captação e o transporte de O₂ aos tecidos, como foi relatado por Ferreira *et al.* (2010) em matrinxã (*Brycon amazonicus*). Isso é apoiado pela diminuição da hemoglobina corpuscular média (HCM), uma vez que células jovens apresentam menos hemoglobina (Hb), o que pode explicar o menor valor do HCM nas fêmeas (Val e Almeida Val 1995). Entretanto, não foram encontradas diferenças no Volume corpuscular médio (VCM) e nos outros parâmetros hematológicos estudados (Tabela 1). Por outro lado, os resultados dos parâmetros bioquímicos mostraram um aumento de glicose plasmática nos machos (Figura 1), o que reflete a necessidade de uma fonte de energia para uma maior mobilização de substratos energéticos para fazer frente ao estresse (Roriz *et al.* 2015). Em contraste, o lactato (Figura 2), outro metabólito de estresse, e indicativo de uso do metabolismo anaeróbico (Chippari-Gomes *et al.* 2005), não mostrou diferenças entre os sexos. Isso pode ser devido ao metabolismo adaptado ao hábito migratório do peixe, assim como Ferreira *et al.* (2010) relatou em *Brycon amazonicus* (matrinxã). Esses resultados podem ser os primeiros indícios de que as fêmeas de *S. taeniurus* enfrentam a migração reprodutiva de uma forma mais eficiente do que os machos.

Desta forma, durante a migração reprodutiva, apesar de ser fundamental para o desenvolvimento da respiração aeróbica, o oxigênio pode gerar custos fisiológicos durante o processo (Elmer *et al.* 2017), ao dar origem às espécies reativas de oxigênio (ROS) (Boveris 2005). Os ROS são regulados nas células pelas defesas antioxidantes, das quais a SOD faz parte e é considerada como a primeira enzima a ser ativada. A SOD dismuta o ânion superóxido (O₂⁻) em H₂O₂ + O₂ (Speakman e Selman 2011; Cram *et al.* 2015). Neste estudo, encontramos uma atividade mais alta de SOD em coração e fígado dos machos de *S. taeniurus* do que nos das

fêmeas (Figura 3). Isso sugere que a atividade de O_2^- também seria mais elevada nos tecidos dos machos e, por consequência, os níveis de H_2O_2 também, o qual estaria sendo formado em maior quantidade pela ação da SOD. Em contrapartida, a CAT, que é ativada para neutralizar o H_2O_2 quando este ocorre em grande quantidade na célula, não apresentou diferença de concentração significativa entre os tecidos dos machos e das fêmeas. Essa contradição, assim como observado por Marcon (1996) em estudos com *Colossoma macropomum*, pode ser explicada pela ação de O_2^- nas células que pode inibir a ativação da CAT. Nesse caso, os níveis de O_2^- nas células seriam tão altos que, apesar da alta atividade da SOD, esta não seria o suficiente para compensar o aporte de O_2^- na célula e acabaria por inibir a CAT, resultando também em uma alta concentração de H_2O_2 .

Por outro lado, a glutatona peroxidase (GPx) que também atuaria sobre o peróxido de hidrogênio, não mostrou diferenças em coração e fígado (Figura 5) de ambos os sexos. 7

Em não ocorrendo a ativação da CAT e da GPx nos indivíduos estudados, a SOD não estaria sendo suficiente para neutralizar todas as espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando desta forma o estresse oxidativo como um custo fisiológico da reprodução (Alonso-Alvarez *et al.* 2004, 2017; Costantini 2008; Monaghan *et al.* 2009; Speakman e Selman 2011; Selman *et al.* 2012; Blount *et al.* 2016) atingindo a molécula de DNA e os lipídeos da membrana, considerados marcadores diretos do estresse oxidativo (Hoogenboom *et al.* 2012; Watson *et al.* 2018).

O nível de estresse oxidativo foi mensurado neste estudo por meio das análises de cometa no tecido sanguíneo, quantificando assim o dano celular provocado pelas ROS. Os resultados mostraram que os danos totais (Figura 8) e por classe (Figura 9) no DNA dos machos foi maior do que no das fêmeas. Wilson *et al.* (2014), estudando o nível de estresse oxidativo no salmão do Oceano Pacífico (*Oncorhynchus spp*) antes e no final da migração reprodutiva encontraram, durante a fase final da migração, maiores níveis de estresse oxidativo, e maiores danos no DNA, no coração, mas sem diferenças nas capacidades antioxidantes. Os autores propõem que o aumento da frequência cardíaca resultaria em um aumento na produção de ROS e, por consequência, um aumento dos danos no DNA. De maneira semelhante, na mesma fase final da migração, nossos resultados revelam um aumento dos danos na molécula de DNA no tecido sanguíneo dos machos. Além dos danos no DNA, outra evidência encontrada dos ataques dos ROS maior nos machos do que nas fêmeas é a alta taxa de lipoperoxidação (LPO) no coração dos machos de *Semaprochilodus taeniurus* (Figura 7). Este resultado pode ser devido a quantidades maiores de ácidos graxos poli-insaturados sofrendo danos nas membranas (Costantini 2008), pois a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados na

célula define a susceptibilidade da membrana aos ataques dos ROS (Hulbert *et al.* 2007). Em concordância, os trabalhos de Buttemer *et al.* (2008) e Costantini (2008) mostraram que altas quantidades de monoinsaturados estão associadas com uma taxa menor de peroxidação lipídica (LPO) no coração de aves marinhas, em comparação com as taxas encontradas em aves de criação. A GST, uma enzima de desintoxicação, foi encontrada em maior concentração no coração dos machos de *S. taeniurus* (Figura 6). Provavelmente, esta enzima está sendo ativada para desintoxicar a membrana lipídica por consequência da alta taxa de lipoperoxidação (LPO). No entanto, no fígado, as atividades da LPO (Figura 7) e da GST (Figura 6) não mostraram diferenças significativas entre fêmeas e machos. De maneira similar, Wilson *et al.* (2014) não encontraram diferenças de estresse oxidativo e de antioxidantes no fígado do salmão (*Oncorhynchus spp*) durante a fase final da migração reprodutiva.

Em um estudo realizado por Olsson *et al.* (2012), na Austrália, com lagartos fêmeas e machos (*Ctenophorus pictus*), são mostrados maiores danos no DNA das fêmeas. Os autores atribuem o dano menor no DNA dos machos à elevação na produção de enzimas antioxidantes para defesa das células, marcada por níveis maiores de SOD. Inesperadamente, em nossos resultados, foram encontrados maiores níveis de SOD e de GST nos machos, mostrando maiores danos oxidativos do que nas fêmeas, o que também é evidenciado pela alta taxa de lipoperoxidação no coração, como mostrado anteriormente. De acordo com a ideia proposta por Wilson *et al.* (2014), é provável que o esforço no coração seja maior do que no fígado durante o processo migratório, pois o primeiro mostra mais estresse oxidativo do que o segundo.

Assim, na tabela 2 mostramos um resumo de nossos achados em relação às atividades enzimáticas, danos e estresse oxidativo em fêmeas e machos de *S. taeniurus*.

	Enzima				Marcadores de Danos Oxidativos				Estresse Oxidativo
	SOD		GST		LPO		Danos totais no DNA Sangue	Danos por classe no DNA Sangue	
Tecido	Coração	Fígado	Coração	Fígado	Coração	Fígado			
Fêmeas	<i>Menor</i>	<i>Menor</i>	<i>Menor</i>	<i>Igual</i>	<i>Menor</i>	<i>Igual</i>	<i>Menor</i>	<i>Menor</i>	<i>Menor</i>
Machos	<i>Maior</i>	<i>Maior</i>	<i>Maior</i>	<i>Igual</i>	<i>Maior</i>	<i>Igual</i>	<i>Maior</i>	<i>Maior</i>	<i>Maior</i>

Portanto, segundo Speakman e Garratt (2013), nem sempre altos níveis de antioxidantes garantem uma defesa eficiente contra os ataques dos ROS, o que poderia explicar os maiores danos no DNA e maiores taxas de lipoperoxidação e, portanto, maiores níveis de estresse oxidativo nos machos do que nas fêmeas de *S. taeniurus*, apesar dos níveis mais elevados de antioxidantes encontrados neste grupo. Por outro lado, em trabalho com fêmeas e machos de zebra finches (*Taeniopygia guttata*) Alonso-Alvarez *et al.* (2004) revelaram que durante o

esforço reprodutivo desta ave, os machos apresentaram uma resistência maior ao estresse oxidativo, mostrando assim, pela primeira vez, que as defesas antioxidantes aumentam nos machos e diminuem nas fêmeas durante a reprodução, gerando assim, um custo reprodutivo maior para as fêmeas. Por outro lado, o estudo recente de Elmer *et al.* (2017), analisando o cuidado parental em peixe de zona temperada (*Micropterus dolomieu*), revelou em machos mais velhos, e mais experientes no cuidado da prole, defesas antioxidantes mais altas e estresse oxidativo mais baixo, quando comparado com os machos mais jovens.

Nos machos de *S. taeniurus* encontramos uma correlação positiva entre o aumento dos antioxidantes (Figura 3, 6) e o aumento do estresse oxidativo, quantificado por meio dos marcadores de danos oxidativos (Figura 7, 8, 9). Desse modo, nossos resultados coincidem com o proposto no trabalho de Speakman e Garratt (2013), que descreveu vários possíveis cenários de formação de estresse oxidativo relacionado aos níveis de antioxidantes presentes na célula. Do mesmo modo, Blount *et al.* (2016) explicam que o aumento ou a diminuição das atividades antioxidantes e a variação dessas atividades de acordo com o tecido, influenciam diretamente na geração de estresse oxidativo, considerado uma consequência dos níveis das defesas antioxidantes (Selman *et al.* 2012).

Assim, nas fêmeas de *S. taeniurus*, durante a migração reprodutiva, nós observamos níveis baixos de antioxidantes e não observamos a formação do estresse oxidativo, resultados contrários ao que esperávamos. Um trabalho pioneiro sobre o custo fisiológico da reprodução foi realizado em fêmeas de *D. melanogaster* (mosca) mostrando que as fêmeas que produziram ovos foram mais susceptíveis ao estresse oxidativo. No entanto, quando expostas ao acasalamento com os machos, e ao mesmo tempo comparadas com as fêmeas controle (que não acasalaram), não sofreram estresse oxidativo, concluindo assim, que o esforço na produção dos ovos é considerado um custo da reprodução nas fêmeas (Salmon *et al.* 2001).

Diversos estudos foram desenvolvidos na última década (Costantini *et al.* 2007; Speakman e Selman 2011; Metcalfe e Monaghan 2013) com o objetivo de verificar a formação do estresse oxidativo durante a reprodução. Para tal, os estudos utilizaram fêmeas na fase reprodutiva e não reprodutiva (Alonso-Alvarez *et al.* 2017). Além disso, avaliaram o custo da reprodução em diferentes táxons, medindo o esforço reprodutivo, como o cuidado parental, tamanho dos ovos, esforço na produção dos ovos, tamanho da prole e outras características dependendo do organismo que foi estudado (Alonso-Alvarez *et al.* 2004; Costantini, 2007, 2008; Blount *et al.* 2016). Assim, de modo geral, os resultados mostram mais estresse oxidativo nos animais com maior esforço reprodutivo, e menos estresse oxidativo nos animais em reprodução (Dowling e Simmons 2009; Metcalfe e Monaghan 2013), especialmente quando se

trata das fêmeas (Blount *et al.* 2016). De maneira semelhante, os nossos resultados mostram que os machos de *S. taeniurus* sofreram maior estresse oxidativo; por essa razão, sugerimos que os mesmos realizam um esforço reprodutivo maior, quando comparados com as fêmeas que mostraram menor estresse oxidativo. Portanto, este resultado nas fêmeas poderia ser explicado desde o ponto de vista mencionado na literatura; isto é, por meio da “Hipóteses da blindagem oxidativa” (Blount *et al.* 2016) uma hipótese recente que sugere que “o estado reprodutivo gera mecanismos de proteção contra os ataques dos ROS, que inevitavelmente serão formados durante a fase reprodutiva nas fêmeas”.

Os estudos da “Hipóteses do custo da reprodução” na natureza (Cram *et al.* 2015) são escassos na atualidade e uma das razões é a dificuldade de trabalho com animais em campo e a obtenção de respostas acuradas (Costantini 2016). Portanto, consideramos os trabalhos citados anteriormente como os mais relevantes para contrastarmos com a nossa pesquisa. E, mesmo não conhecendo todas as respostas para explicar as diferenças que encontramos entre as fêmeas e machos de *S. taeniurus*, durante a migração reprodutiva, sugerimos que é preciso fazer mais análises bioquímicas, genéticas e fisiológicas, para complementar a hipótese da existência de mecanismos, até a data desconhecidos, que previnem as fêmeas do estresse oxidativo. Como esses mecanismos são diferentes nos machos, estes são mais susceptíveis ao estresse oxidativo durante a migração reprodutiva.

Desse modo, concluímos que as fêmeas de jaraqui de escama fina (*S. taeniurus*) possuem mecanismo de defesa contra os danos oxidativos durante a migração reprodutiva. Estes mecanismos de proteção no nível celular, até aqui desconhecidos, são aderentes à hipótese da blindagem oxidativa; por outro lado, os machos dessa espécie apresentaram, ao chegarem ao sítio de reprodução, na confluência do Rio Negro com o Rio Solimões, maiores níveis de Hemoglobina Corpuscular Média, de glicose plasmática, de defesas antioxidantes como Superóxido dismutase e Glutathione S-transferase, e maiores danos no DNA e na lipoperoxidação. Dessa forma, podemos concluir que a migração reprodutiva causa maior estresse oxidativo nos machos do que nas fêmeas.

5 Referências Bibliográficas

- Ahmad, I.; Hamid, T.; Fatima, M.; Chand, H.S.; Jain, S.K.; Athar, M.; Raisuddin, S. 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochimica et Biophysica*, 1523: 37–48.

- Alonso-Alvarez, C.; Bertrand, S.; Devevey, G.; Prost, J.; Faivre, B.; Sorci, G. 2004. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters*, 7: 363–368.
- Alonso-Alvarez, A.C.; Bertrand, S.; Devevey, G.; Prost, J.; Faivre, B.; Chastel, O.; Sorci, G.; Hastel, O.L.C.; Orci, G.A.S. 2006. An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance to oxidative stress. *Evolution*, 60: 1913–1924.
- Amerand, A.; Vettier, A.; Moisan, C.; Belhomme, M.; Sebert, P. 2010. Sex-related differences in aerobic capacities and reactive oxygen species metabolism in the silver eel. *Fish Physiology Biochemical*, 36: 741–747.
- Alonso-Alvarez, C.; Canelo, T.; Romero-Haro, A.Á. 2017. The Oxidative Cost of Reproduction: Theoretical Questions and Alternative Mechanisms. *BioScience*, 67: 258–270.
- Beutler, E. 1975. Red cell metabolism: a manual of biochemical methods. Grune & Stratton. New York, 8-18.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254.
- Brown B.A. 1976. Hematology principles and procedures. 2 ed. Lea & Febiger, Philadelphia.
- Barja, G. 2005. Radicales libres de origen mitocondrial y longevidad. *Real Academia Nacional de Farmacia*, 71: 783–798.
- Boveris, A. 2005. La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Academia Iberoamericana de Farmacia*, 46: 85–95.
- Buttemer, W.A.; Battam, H.; Hulbert, A.J. 2008. Fowl play and the price of petrel: long-living Procellariiformes have peroxidation-resistant membrane composition compared with short-living Galliformes. *The Royal Society*, 4: 351–354.
- Blount, J.D.; Vitikainen, E.I.K.; Stott, I.; Cant, M.A. 2016. Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biological Reviews*, 91: 483–497.
- Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. 2003. *Migratory fishes of South America*. World Fisheries Trust, Canada, 372p.
- Costantini, D.; Cardinale, M.; Carere, C. 2007. Oxidative damage and anti-oxidant capacity in two migratory bird species at a stop-over site. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 144: 363–371.
- Costantini, D. 2008. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology Letters*, 11: 1238–1251.
- Costantini, D.; Verhulst, S. 2009. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology*, 23: 506–509.
- Costantini, D.; Casasole, G.; Eens, M. 2014. Does reproduction protect against oxidative stress? *The Journal of Experimental Biology*, 217: 4237–4243.
- Costantini, D.; Casasole, G.; Abdelgawad, H.; Asard, H.; Eens, M. 2015. Experimental evidence that oxidative stress influences reproductive decisions. *Functional Ecology*, 1: 1–6.

- Chippari-Gomes, A.R.; Gomes, L.C.; Lopes, N.P.; Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. 2005. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B*, 141: 347–355.
- Cram, D.L.; Blount, J.D.; Young, A.J. 2015. The oxidative costs of reproduction are group-size dependent in a wild cooperative breeder. *The Royal Society*, 282: 1–9.
- Costantini, D. 2016. Commentary: Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *Frontiers in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00010>
- Dowling, D.K.; Simmons, L.W. 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *The Royal Society*, 1–9.
- Da Silva, A.S.E.; De Lima, J.T.A.X.; Blanco, B. 2012. Hematologia em peixes. *Revista Centauro*, 3: 24–32.
- Der Sleen, P.V.; Albert, J.S. 2018. *Field Guide to the Fishes of the Amazon Orinoco & Guianas*. 1ed. Princeton University Press, New Jersey, 460p.
- Elmer, L.K.; Connor, C.M.O.; Philipp, D.P.; Kraak, G.V.D.; Gilmour, K.M.; Willmore, W.G.; Barthel, B.L.; Cooke, S.J. 2017. Oxidative ecology of paternal care in wild smallmouth bass, *Micropterus dolomieu*. *Journal Experimental of Biology*, 220: 1905–1914.
- Ferreira, M.S.; De Oliveira, A.M.; Val, A.L. 2010. Velocidade crítica de natação (Ucrit) de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exposição à hipoxia. *Acta Amazonica*, 40: 699–704.
- Goldenfarb, P.B.; Bowyer, F.P.; Hall, E. 1971. Reproducibility in the Hematology Laboratory: *American Journal of Clinical Pathology*, 56: 35–39.
- Hulbert, A.J.; Pamplona, R.; Buffenstein, R.; Buttemer, W.A. 2007. Life and Death: Metabolic Rate, Membrane Composition, and Life Span of Animals. *American Physiological Society*, 87: 1175–1213.
- Hoogenboom, M.O.; Metcalfe, N.B.; Groothuis, T.; de Vries, B.; Costantini, D. 2012. Relationship between oxidative stress and circulating testosterone and cortisol in pre-spawning female brown trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 163: 379–387.
- Jiang, Z.Y.; Woollard, A.C.S.; Wolff, S. 1991. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe²⁺ in the Presence of Xylenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. *Analytical Biochemistry*, 26: 853–856.
- Kampen, E.J.; Zijlstra, W. 1961. Standardization of hemoglobinometry II. The hemiglobincyanide method. *Clinica chimica acta*, 6: 538–544.
- Keen, J.H.; Habig, W.H.; Jakoby, W. 1976. Mechanism for the Several Activities of the Glutathione S-Transferases. *The Journal of Biological Chemistry*, 251: 6183–6188.
- Lushchak, V.I. 2014. Classification of oxidative stress based on its intensity. *Experimental and Clinical Sciences International Journal*, 13: 922–937
- McCord, J.E.; Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 6049–6055.
- Monaghan, Pat.; Metcalfe, N.B.; Torres, R. 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letter*, 12: 75–92.
- Metcalfe, N.B.; Monaghan, P. 2013. Does reproduction cause oxidative stress? An open question. *Trends in Ecology & Evolution*, 28: 347–350.

- Marcon, J.L. 1996. *Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, Astronotus ocellatus e Colossoma macropomum, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa*. Tese de Doutorado, Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (Inpa)- Universidade Federal do Amazonas (Ufam). 132p.
- Olsson, M.; Healey, M.; Perrin, C.; Wilson, M.; Tobler, M. 2012. Sex-specific SOD levels and DNA damage in painted dragon lizards (*Ctenophorus pictus*). *Oecologia*, 170: 917–924.
- Ribeiro, M.C.L.B. 1983. *As migrações dos jaraquis (Pisces: Prochilodontidae) no Rio Negro, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 192p.
- Roriz, B.C.; Mariano, S.W.; Takako, A.K.; Castro, J.F.; Garcia, R. 2015. Efeitos do estresse de exposição ao ar sobre parâmetros sanguíneos de juvenis de caranha, *Piaractus brachypomus*. *Enciclopedia Biosfera*, 11: 2231–2242.
- Silva J.; Freitas T.R.O.; Marinho J.R.; Speit G.; Erdtmann B. 2000. Alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay for environmental in vivo biomonitoring with native rodents. *Genetic Molecular Biology*, 23:241-245
- Salmon, A.B.; Marx, D.B.; Harshman, L.G. 2001. A cost of reproduction in *Drosophila melanogaster*: stress susceptibility. *Evolution*, 55: 1600–1608.
- Scandalios, J.G. 2005. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38: 995–1014.
- Santos, G.; Ferreira, E.; Zuanon, J. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Provarzea, Ibama, Manaus 144p.
- Speakman, J.R. 2007. The physiological costs of reproduction in small mammals. *The Royal Society*, 363: 375–398.
- Speakman, J.R.; Selman, C. 2011. The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *Bioessays*, 33: 255–259.
- Selman, C.; Blount, J.D.; Nussey, D.H.; Speakman, J.R. 2012. Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now?. *Trends in Ecology & Evolution*, 27: 570–577.
- Stier, A.; Reichert, S.; Massemin, S.; Bize, P.; Criscuolo, F. 2012. Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Frontiers in Ecology*, 9: 2–11.
- Speakman, J.R.; Garratt, M. 2013. Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *Bioessays*, 36: 93–106.
- Thomas, J.P.; Maiorino, M.; Ursini, F.; Girotti, A. 1990. Protective Action of Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase against Membrane-damaging Lipid Peroxidation. *The journal of biological chemistry*, 265: 454–461.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Schwantes, A.R.; Schwantes, M.L. 1984. Biological Aspects of Amazonian Fishes I. Red blood cell phosphates of schooling fishes (Genus *Semaprochilodus*: Prochilodontidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78: 215–217.
- Vazzoler, A.E.A.M.; Amadio, S.A.; Caraciolo-Malta, M.C. 1989. Aspectos biológicos de peixes amazônicos. XI. Reprodução das espécies do genero *Semaprochilodus*, (Characiformes, Prochilodontidae), no baixo rio negro, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira Biologica*, 49: 165-173.

- Vazzoler, A.E.A.M & Amadio, S.A. 1990. Aspectos biológicos de peixes amazônicos XIII. Estrutura e comportamento de cardumes multiespecíficos de *Semaprochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae), no baixo rio negro, Amazonas, Brasil. *Revista Brasileira Biologica*, 50: 537-546.
- Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their Environment. Physiological and Biochemical Aspects*. Springer, Heidelberg. 224p.
- Weber, J. 2009. The physiology of long-distance migration: extending the limits of endurance metabolism. *Journal Experimental of Biology*, 212: 593–597.
- Wilson, S.M.; Taylor, J.J.; Mackie, T.A.; Patterson, D.A.; Cooke, S.J.; Willmore, W.G. 2014. Oxidative Stress in Pacific Salmon (*Oncorhynchus* spp.) during Spawning Migration. *Physiological and Biochemical Zoology*, 87: 346–352.
- Watson, H.; Salmón, P.; Isaksson, C. 2018. Maternally derived yolk antioxidants buffer the developing avian embryo against oxidative stress induced by hyperoxia. *Journal Experimental of Biology*, 1: 2-29.