

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

**Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio:
uma abordagem comparativa**

Jaydione Luiz Marcon

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais (PPG-BTRN) do convênio INPA-UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus - Amazonas

1996

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM

**Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio:
uma abordagem comparativa**

Jaydione Luiz Marcon

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais (PPG-BTRN) do convênio INPA-UFAM, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas. Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Orientador: Dr. Adalberto Luís Val

Financiamento: CNPq e INPA

Manaus - Amazonas

1996

IN MEMORIAN

Ao meu pai *Jayme Marcon* e ao amigo *Gilson Kassner*, profissionais educadores e amantes do conhecimento, que cedo foram deixando uma carreira brilhante e, principalmente, saudades. Suas vidas permanecem entre nós.

DEDICO ESTA DISSERTAÇÃO

À minha "mama bela", *Aneta Gödert Marcon*, meu amparo e minha luz. Seu incentivo e constante apoio espiritual foram importantes em meus dias em Manaus. Aos meus irmãos, *Jaymor* e *Jaydimar Marcon*, pelo companherismo de uma verdadeira família.

FICHA BIBLIOGRÁFICA

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. PPG-BTRN/INPA-UFAM, Manaus-AM. xv + 132p.

Palavras-Chave: *Colossoma macropomum*, *Astronotus ocellatus*, fígado, eritrócito, estresse oxidativo, antioxidantes, hipóxia, normóxia, hiperóxia, dano celular, adaptação.

SINOPSE: Foram analisados o sistema de proteções antioxidantes, os parâmetros hematológicos (hematócrito, concentração de hemoglobina e conteúdo de metahemoglobina), o consumo de oxigênio do fígado e os níveis de produtos celulares oxidados em exemplares de *C. macropomum* e *A. ocellatus* aclimatados a normóxia, hipóxia e hiperóxia. Comparativamente, as duas espécies apresentaram respostas distintas em relação aos diferentes níveis de oxigênio aplicados. A espécie *A. ocellatus* aparenta ter uma maior tolerância às variações na disponibilidade do oxigênio que *C. macropomum*. A manifestação de respostas fisiológicas e bioquímicas distintas entre as duas espécies parece coadunar-se com os suas respectivas características ecológicas.

AGRADECIMENTOS

Eu não poderia deixar de expressar minha gratidão a muitas pessoas que, de uma forma ou de outra, contribuíram para minha formação profissional e espiritual durante minha estada aqui na Amazônia. A todos deixo registrado meu muito obrigado, em especial:

Ao Dr. Adalberto Luís Val, orientador, pela oportunidade profissional de viver a Amazônia em todo o seu dinamismo, pela confiança depositada em meu trabalho e, sobretudo, por apostar em minha iniciativa e capacidade de iniciar uma nova linha de pesquisa em seu laboratório.

Ao Dr. Danilo Wilhelm Filho (UFSC), colega e amigo, pelo estímulo, paciência durante meu treinamento e pelas importantes sugestões em diversos momentos deste trabalho.

À Dra. Eliana Feldberg (INPA-CPBA) pela confiança em meu trabalho, como orientadora substituta durante o primeiro ano de pós-graduação, momento fundamental para a viabilização deste projeto.

À Dra. Vera Maria F. de Almeida-Val, pelo incentivo e sugestões ao longo do trabalho.

Ao Dr. Keneth Storey (Carleton University, Canadá) pela discussão recente dos resultados do presente trabalho. Suas idéias foram importantes e bastante enriquecedoras.

À MSc. Elizabeth Gusmão Affonso, pelo companherismo de uma verdadeira amiga. Seu apoio logístico e, principalmente espiritual, foram muito importantes durante minha

estada no laboratório. É sempre um prazer conviver com pessoas alegres, otimistas e desprovidas de caprichos.

À Maria de Narazé Paula da Silva, pessoa que, com sua bondade, não mede esforços para proporcionar ao laboratório as condições dignas de trabalho, pela nossa amizade brindada entre tapas e beijos.

À Maria do Carmo Arruda, pela amizade fraterna. Não tenho palavras para expressar a gratidão e o carinho compartilhado durante todos estes anos.

Ao amigo Hernando Ramirez Gil (INPA-Colômbia), com quem aprendi que da vida tudo se aproveita e, melhor, se vivida com alegria, confiança e perseverança.

Aos amigos Afonso C. D. Bairy (UFSC) e Alcir L. Dafré (UFSC), pelo apoio técnico em meus momentos de aflição durante a execução dos experimentos.

Ao Dr. Michael McClain (University of Washington, USA) pelo apoio fundamental na aquisição dos reagentes analíticos necessários à continuidade da etapa experimental de meu trabalho. Sua boa vontade e eficiência foram cruciais para a conclusão deste projeto.

Ao Sr. Luis Felback (Biguaçu-SC), pelo apoio e incentivo à minha decisão de vir à Amazônia, enfatizando sempre que só vencem aqueles que tem coragem de enfrentar os desafios da vida.

Ao corpo de funcionários da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (INPA-CPAQ), em especial aos Srs. Atílio Storti Filho, Marcos Makyama e ao MSc. Alexandre Honczaryk, pela viabilização e manutenção dos peixes utilizados no presente trabalho.

A todos os pescadores da Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática (CPBA), em especial aqueles que me acompanharam durante as inúmeras excursões, pelo apoio logístico e pelos seus ensinamentos próprios, tão importantes quanto aqueles que aprendemos nos livros. Quem melhor conhece o peixe é o pescador!

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, pelos ensinamentos e discussões relativos aos problemas da Amazônia. Só quem vive aqui pode entender, de fato, o que a Amazônia significa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, com a qual foi possível sobreviver em Manaus.

A todos os colegas do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM, CPAQ-INPA) pelo convívio e, em muitas vezes, pela paciência em meus diversos momentos de explosão. Meu carinho a todos.

À Marcela Rosa Santos da Silva, meu grande amor. Sua presença em minha vida deu-me brilho, estímulo e forças para permanecer firme em meu propósito de vencer aqui na Amazônia. Beijos, beijos e beijos, minha caboclinha linda!

Aos meus parentes (Famílias Marcon e Göedert) pela força e apoio financeiro, quando da minha partida para Manaus.

E, por fim, à minha querida família, pelo constante apoio e incentivo e, também, pelo suporte financeiro durante o último ano da realização do presente trabalho.

Estresse oxidativo em duas espécies de teleósteos amazônicos, *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum*, expostos a diferentes tensões de oxigênio: uma abordagem comparativa

RESUMO

O presente trabalho objetivou identificar as respostas fisiológicas e bioquímicas manifestadas pelo sistema de proteções antioxidantes de *Astronotus ocellatus* (acará-açu) e *Colossoma macropomum* (tambaqui), frente às variações na disponibilidade de oxigênio. Exemplares de ambas as espécies foram aclimatados, por 15 dias consecutivos, a três diferentes condições experimentais: hipóxia, normóxia e hiperóxia. Os parâmetros analisados incluíram as proteções antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase), do fígado e do sangue, os parâmetros hematólogicos, os níveis de glutathione sanguínea, o consumo de oxigênio do fígado e os níveis endógenos de produtos celulares oxidados de ambos os tecidos. Procurou-se também investigar se situações extremas, como hipóxia e hiperóxia, levam ao estabelecimento de uma situação de estresse oxidativo. Distintas características, como a ausência de catalase no sangue do tambaqui e, principalmente, diferenças quantitativas nas defesas antioxidantes foram observadas entre as duas espécies na condição normóxica. Na exposição à hipóxia, as respostas manifestadas pelas mesmas foram distintas em sua maioria. *Colossoma macropomum* demonstrou uma maior susceptibilidade, revelando níveis elevados de metahemoglobina e de produtos celulares oxidados no sangue, em contraste com *A. ocellatus*, onde estas modificações não foram constatadas. Na aclimação à hiperóxia, a mesma tendência foi observada. Em *C. macropomum*, as alterações observadas nos diversos parâmetros analisados, como o aumento no conteúdo da superóxido dismutase em ambos os tecidos, a drástica diminuição dos níveis de glutathione reduzida e, provavelmente, uma inibição da catalase no fígado, foram acompanhadas por um aumento significativo no processo de dano celular. Por outro lado, em *A. ocellatus* apenas alguns parâmetros foram modificados, e nenhuma evidência de

dano celular foi demonstrada por esta espécie. Isso indica que *C. macropomum* encontrou na condição hiperóxica, uma situação de elevado estresse oxidativo, enquanto *A. ocellatus* demonstrou ser tolerante não somente à hipóxia, mas também à hiperóxia. As distintas estratégias adotadas em relação às proteções antioxidantes pelas duas espécies estudadas coadunam-se com suas respectivas características ecológicas.

Oxidative stress in two species of amazonian teleosts, *Astronotus ocellatus* and *Collossoma macropomum*, exposed to different oxygen tensions: a comparative approach

ABSTRACT

This study describes the antioxidant defenses of acará-açu (*Astronotus ocellatus*) and tambaqui (*Collossoma macropomum*) exposed to long term hypoxia, normoxia and hyperoxia. Superoxide dismutase, catalase and the oxidized cell products (measured as TBARS) were measured in liver and blood of *A. ocellatus* and *C. macropomum*. Methemoglobin and glutathione contents were evaluated only in the blood and glutathione peroxidase only in the liver. These species exhibit different responses for the analysed parameters. Acclimation to hypoxia resulted in increased methemoglobin and liver superoxide dismutase levels in *C. macropomum*. Glutathione peroxidase also increased in both species, whereas reduced glutathione decreased in hypoxia exposed animals. *Collossoma macropomum* exhibited acatalasemia in normoxia and hypoxia, while catalase decreased in *A. ocellatus* exposed to hypoxia. Under hyperoxia, most of the analyzed parameters were changed significantly in both liver (increased TBARS, superoxide dismutase and glutathione peroxidase levels, and a possible inhibition of catalase) and blood (increased methemoglobin, TBARS and superoxide dismutase levels) of *C. macropomum*. In addition, a high production of intraerythrocytic oxidized glutathione was also observed in *C. macropomum*. *Astronotus ocellatus* exhibited slight changes in antioxidant defenses and no cellular damage in both liver and blood. This cichlid species is hypoxia tolerant and is also able to survive many hours under anoxia, whereas *C. macropomum* relies preferentially on aerobic metabolism, and is able to improve many adaptive solutions to maintain an adequate oxygen supply to the tissues. We suggest that the responses observed for these fish species to hypoxia and hyperoxia are in agreement to their oxygen needs, where *C. macropomum* is more susceptible to oxidative stress, specially under hyperoxia.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	1
1. Evolução do oxigênio na atmosfera terrestre.....	1
2. Características químicas dos intermediários reativos do oxigênio.....	2
2.1. Antioxidantes enzimáticos	7
2.2. Antioxidantes não-enzimáticos	9
3. A obtenção do oxigênio nos organismos aquáticos	11
4. A geração de espécies ativas do oxigênio em situações de hipóxia e hiperóxia....	14
5. As proteções antioxidantes em peixes	16
6. Considerações gerais sobre as espécies estudadas	17
7. Objetivo e Hipóteses.....	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
1. Animais experimentais.....	23
2. Protocolo experimental	23
2.1. Série I: Normóxia	23
2.2. Série II: Hiperóxia	24
2.3. Série III: Hipóxia.....	25
3. Métodos analíticos.....	25
3.1. Preparação das amostras	26
3.1.1. Preparação dos hemolisados	26
3.1.2. Preparação dos homogeneizados de fígado	26
3.2. Parâmetros Hematológicos	27
3.2.1. Hematócrito (Ht)	27
3.2.2. Concentração de hemoglobina sanguínea (Hb)	37
3.2.3. Determinação do conteúdo de metahemoglobina (meta-Hb).....	28
4. Consumo tecidual de oxigênio (VO ₂).....	28

5. Análises enzimáticas	29
5.1. Superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)	29
5.2. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6)	33
5.3. Glutathiona Peroxidase (GPx; EC 1.11.1.9)	34
6. Concentração de glutathiona sanguínea total (GT) e reduzida (GSH).....	34
7. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS).....	35
8. Reagentes utilizados.....	36
9. Análise estatística.....	36
RESULTADOS	38
1. Condições experimentais	38
2. Parâmetros hematológicos	38
3. Consumo tecidual de oxigênio.....	44
4. Enzimas antioxidantes.....	44
4.1. Superóxido dismutase	44
4.2. Catalase.....	50
4.3. Glutathiona peroxidase.....	50
5. Glutathiona sanguínea total e eduzida.....	53
6. Peroxidação lipídica	58
DISCUSSÃO	63
1. Parâmetros hematológicos	63
1.1. Hematócrito e concentração de hemoglobina.....	63
1.2. Metahemoglobina.....	68
2. Consumo tecidual de oxigênio.....	71
3. Proteções Antioxidantes.....	73
3.1. Superóxido dismutase	73
3.2. Catalase.....	80

3.3. Glutationa peroxidase	85
4. Glutationa	88
5. Dano celular	94
6. Considerações finais.....	97
CONCLUSÕES	101
PERSPECTIVAS FUTURAS	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDAS

- Abs	Absorbância
- ATP	Adenosina 5' - trifosfato
- BHT	Butilhidroxitolueno
- t - BOOH	Peróxido de ter-butila
- CAT	Catalase
- CO ₂	Dióxido de carbono
- Cu,Zn-SOD	Cobre-zinco Superóxido dismutase
- °C	Graus Celsius
- DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis (2-dinitrobenzóico)
- EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
- g	Gramas
- g/dl	Gramas por decilitro
- GPx	Glutationa peroxidase
- GR	Glutationa redutase
- GSH	Glutationa reduzida
- GSSG	Glutationa oxidada
- GT	Glutationa total
- GTP	Guanosina trifosfato
- H ⁺	Íon hidrogênio
- H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
- Hb	Hemoglobina
- HbO ₂	Hemoglobina oxigenada
- HCl	Ácido clorídrico
- HO [·]	Radical hidroxil

- Ht	Hematócrito
- $K_3[Fe(CN)_6]$	Ferricianeto de potássio
- KCN	Cianeto de potássio
- KH_2PO_4	Fosfato de potássio monobásico
- l	Litro
- M	Molar
- meta-Hb	Metahemoglobina
- mg/dl	Miligramas por decilitro
- mg/l	Miligramas por litro
- min	Minuto
- ml	Mililitro
- mm	Milímetro
- mM	Milimolar
- mmHg	Milímetro de mercúrio
- MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
- NaCl	Cloreto de sódio
- NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
- nm	Nanômetro
- nmol	Nanomol
- O_2	Oxigênio molecular
- $O_2^{\cdot-}$	Radical ânion superóxido
- pmol	Picomol
- pO_2	Pressão parcial de oxigênio
- rpm	Rotações por minuto
- SEM	Erro padrão da média
- SOD	Superóxido dismutase
- TBA	Ácido tiobarbitúrico

- TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ("Thiobarbituric acid reactive substances")
- Tris	Trihidroxi-metilaminometano
- UI	Unidade Internacional
- UB	Unidades Bergmeyer
- μl	Microlitros
- μM	Micromolar
- VO_2	Taxa de consumo de oxigênio

INTRODUÇÃO

1.1. Evolução do oxigênio na atmosfera terrestre

Na primitiva atmosfera terrestre, composta basicamente de hidrogênio, metano, dióxido de carbono e amônia, a vida era limitada à utilização da via anaeróbica e somente possível em locais livres da influência dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta. A introdução gradativa do oxigênio na atmosfera, há mais de 2×10^9 anos, pelos primeiros organismos fotossintetizantes - as primitivas cianobactérias (Fridovich, 1974; 1978; Prosser, 1991), propiciou o desenvolvimento da camada de ozônio e a possibilidade de expansão dos organismos pelos ambientes terrestres, até então impróprios à vida. Estima-se que a pressão parcial de oxigênio tenha atingido seus níveis atuais (~150 mmHg) somente a partir do início da Era Paleozóica, há aproximadamente 550 milhões de anos, período que coincide com o aparecimento dos invertebrados cambrianos e com a posterior e fantástica irradiação biológica, que culminou com o surgimento dos vertebrados terrestres (revisto por Gilbert, 1995).

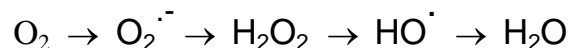
Com o estabelecimento de uma atmosfera predominantemente oxidativa, a biosfera passou a conviver com a dualidade funcional do oxigênio molecular. Se, por um lado, este gás confere aos organismos aeróbicos um alto rendimento energético, possibilitando o aparecimento de estruturas corpóreas complexas e de maiores dimensões, por outro lado, os organismos tiveram de se adaptar a uma situação de contínua nocividade, causada pela participação das espécies ativas do oxigênio (Gerschman *et al.*, 1954) em diversas reações químicas intracelulares, principalmente aquelas envolvidas na respiração (Boveris *et al.*, 1973; Cadenas, 1989).

Apesar da toxicidade do oxigênio sobre os organismos aeróbicos já ter sido sugerida no século XVIII, com os trabalhos clássicos de Lavoisier e Priestley, o reconhecimento das propriedades tóxicas do oxigênio ocorreu somente a partir da década de 50, quando Rebeka

Gerschman assinalou a semelhança entre os efeitos deletérios produzidos pela radiação X e a exposição ao oxigênio hiperbárico. Gerschman postulou, pela primeira vez, a participação dos intermediários reativos do oxigênio em ambos os processos (Gerschman *et al.*, 1954). Com a descoberta da superóxido dismutase (McCord & Fridovich, 1969), uma enzima especialmente desenhada para decompor o radical superóxido, um composto reativo, ficou estabelecida de forma definitiva a vinculação dos processos relacionados à saúde dos organismos aeróbicos com os efeitos nocivos decorrentes da utilização do oxigênio. A existência destes organismos ficou vinculada à aquisição de mecanismos de proteção tão eficientes e diversos quanto os efeitos causados pela utilização do oxigênio, nos diferentes níveis da organização biológica (Gilbert, 1995).

1.2. Características químicas dos intermediários reativos do oxigênio

As espécies ativas ou intermediários reativos do oxigênio são genericamente conhecidas como *radicais livres do oxigênio*. Segundo Halliwell & Gutteridge (1989), um radical livre é uma espécie (átomo ou molécula) capaz de existência independente que contém um ou mais elétrons não pareados em seus orbitais externos. Estes elétrons tendem a formar pares estáveis, conferindo às moléculas portadoras uma elevada reatividade química (Pryor, 1986; Cadenas, 1989; González-Flecha, 1990). A formação destes intermediários reativos se deve às características estruturais da molécula do oxigênio, que favorecem sua redução em etapas sequenciais (monoeletrônica), como segue:



Os intermediários reativos do oxigênio mais importantes em sistemas biológicos incluem o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical

hidroxil (HO^\cdot), e a forma fotoquimicamente excitada do oxigênio molecular, o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (Cadenas, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1989; Scandalios, 1993).

Outro composto derivado do oxigênio, o óxido nítrico (NO), tem sido apontado em mamíferos como um importante mediador de diversos processos fisiológicos, incluindo ventilação e perfusão, neurotransmissão e respostas imunológicas linfocitárias (Moncada *et al.*, 1991; Snyder, 1992). Contudo, esta molécula possui também efeitos citotóxicos decorrentes de sua habilidade em combinar-se com o oxigênio molecular e com o radical superóxido, produzindo o óxido nítrico (NO_2) e o peroxi-nitrito (ONOO^\cdot), formas tão reativas quanto o radical hidroxil (Halliwell & Gutteridge, 1989; revisado por Gonzalez-Zulietta, 1997). Em peixes, a síntese de NO foi constatada no sistema nervoso central do salmão do Atlântico (Ostholm *et al.*, 1994) e na bexiga natatória do jêjê (*Hoplerythrinus unitaeniatus*), um peixe de respiração aérea da Amazônia. Nesta última espécie, a presença do NO parece estar relacionada com o controle da ventilação e/ou perfusão da bexiga natatória durante o processo de transferência de gases (Staples, *et al.*, 1995).

Processos endógenos e exógenos são conhecidos como promotores de espécies ativas do oxigênio. Vários agentes como poluentes (biotransformação de xenobióticos), drogas terapêuticas, etanol, radiação ionizante e ozônio podem estimular a produção de radicais livres através de reações de oxi-redução (Cadenas, 1985; 1989). A respiração celular consiste na principal fonte endógena de produção destes intermediários; cerca de 2-5% do oxigênio total consumido não é reduzido tetravalentemente pela citocromo c oxidase, resultando na produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 em reações que envolvem o ganho de um ou dois elétrons, respectivamente (Boveris, 1977; Chance *et al.*, 1979; Boveris & Cadenas, 1982). Nesse sentido, as mitocôndrias constituem-se na principal fonte de produção das espécies ativas do oxigênio, seguidas pelo retículo endoplasmático em menores proporções.

Além disso, outros componentes celulares contribuem para a formação de espécies ativas do oxigênio, destacando-se as hemoproteínas (hemoglobina e mioglobina; Wallace *et al.*, 1982; Levy *et al.*, 1988), as flavinas, as hidroquinonas, as catecolaminas (Misra & Fridovich,

1972; Singhal *et al.*, 1983), os granulócitos polimorfonucleados (Babior, 1984), bem como diversas enzimas citosólicas e outras ligadas à membrana, como a xantina oxidase e as NADH oxidases (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A convivência aparentemente harmoniosa dos organismos aeróbicos com os efeitos deletérios do oxigênio deve-se, primordialmente, ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidantes altamente especializados. De fato, numerosos mecanismos antioxidantes têm sido descritos como agentes efetivos na proteção da integridade celular contra a toxicidade do oxigênio (Tabela 1).

Segundo Halliwell & Gutteridge (1989), um antioxidante é "qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, comparativamente àquelas de um substrato oxidável, retarda ou inibe consideravelmente a oxidação deste substrato". Os diversos mecanismos antioxidantes incluem constituintes enzimáticos primários, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPx), enzimas de ação secundária, como a glutatona redutase (GR), a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e as glutatona S-transferases (GST), e constituintes não enzimáticos, como a glutatona (GSH), o α -tocoferol, o β -caroteno, o ácido ascórbico, a cisteína, as hidroquinonas e o ácido úrico, entre outros (Tabela 1) (Fridovich, 1974; Halliwell & Gutteridge, 1989; Scandalios, 1993; Sies, 1993). Os mecanismos de defesa antioxidantes e seus princípios de ação revelam muitas semelhanças entre os diversos organismos aeróbicos, incluindo as bactérias e o próprio homem (Fridovich, 1978; Scandalios, 1993).

Entretanto, a despeito da diversidade existente, as proteções antioxidantes não são totalmente eficazes em sua função. Prova disto é a contínua exposição das células aos efeitos deletérios do oxigênio, que se refletem em uma série de patologias e manifestações clínicas. A participação dos radicais livres do oxigênio tem sido extensivamente investigada clinicamente em diversas anomalias relacionadas principalmente aos sistemas respiratório, cárdio-vascular, nervoso e imunológico, além de processos carcinogênicos, inflamatórios e do próprio envelhecimento (para uma visão mais aprofundada veja Harman, 1982; Freeman & Crapo, 1982; Ames, 1983; Halliwell & Gutteridge, 1989; Davies, 1991; Frank, 1992;

Alessio, 1993; Demple & Harrison 1994; Shah, 1995 e os volumes especiais de *Ciência e Cultura*, 47/1995 e 48/1996). Como mencionado por Gilbert (1995), "o preço para a sobrevivência na presença do oxigênio é a morte".

Tabela 1. Principais mecanismos de proteções antioxidantes presentes em sistemas biológicos (segundo Sies, 1993).

Sistemas	Funções principais
<i>Não Enzimáticos</i>	
α -tocoferol (vitamina E)	intercepta reações de lipoperoxidação
β -caroteno	“quencher” do oxigênio singlete
Licopeno	“quencher” do oxigênio singlete
Ubiquinol ₁₀	“varredor” de radicais
Ácido ascórbico (vitamina C)	diversas funções antioxidantes
Glutathione (GSH)	diversas funções antioxidantes
Ácido úrico (urato)	“varredor” de radicais
Bilirrubina	antioxidante plasmático
Flavonóides	antioxidantes em plantas (rutina, etc.)
Proteínas plasmáticas	ligantes de metais (ceruloplasmina, etc.)
Químicos	aditivos alimentares, drogas, etc.
<i>Enzimáticos (diretos)</i>	
Superóxido dismutase	Cu,Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD
Catalase	hemoproteínas, peroxissomas
Glutathione (GSH) peroxidases	GPx, compostos selênio-orgânicos
<i>Enzimáticos (auxiliares)</i>	
Enzimas de conjugação	glutathione S-transferases (GST) UDP-glucuronosil transferases
NADPH-quinona oxidoreductase	reduções de dois elétrons
Glutathione (GSSG) reductase	GR, mantém os níveis de GSH
Suprimento de NADPH	NADPH para a atividade da GSSG reductase e da catalase
Sistemas de transporte	liberação de GSSG e conjugados tioéter
Sistemas de reparo	sistemas de reparo no DNA “turnover” de proteínas oxidadas “turnover” de fosfolípídeos oxidados

1.2.1. Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos são considerados o mecanismo primário de proteções antioxidantes, destacando-se as enzimas superóxido dismutase, catalase e glutationala peroxidase.

A superóxido dismutase tem um papel fundamental no sistema de proteções antioxidantes. Sua ação catalítica sobre o radical ânion superóxido (McCord & Fridovich, 1969), constitui o primeiro passo do processo de detoxificação das espécies ativas do oxigênio produzidas durante o metabolismo celular:

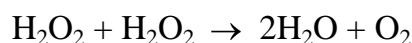


O radical superóxido, além de sua própria ação tóxica (Fridovich, 1974; 1983), é também responsável pela geração de espécies ativas detentoras de uma maior reatividade química, como o radical hidroxil (HO^{\cdot}). A SOD encontra-se presente em todos os organismos aeróbicos em diferentes isoformas. A Fe-SOD, bem como a Mn-SOD é encontrada nos procariontes (Halliwell & Gutteridge, 1989). Esta última isozima está também presente em organismos eucariontes, mas distribuída em organelas subcelulares, como a matriz mitocondrial (Fridovich, 1978). A Cu,Zn-SOD é encontrada apenas nos seres eucariontes, e parece ter evoluído independentemente das formas presentes nos procariontes, notadamente a Mn-SOD (Fridovich, 1974; 1978). A distribuição da Cu,Zn-SOD é predominantemente citosólica. Em animais superiores, é responsável por cerca de 90% da atividade total da SOD presente nas células. No entanto, foi constatado recentemente que a Mn-SOD tem uma importância relevante na detoxificação do radical superóxido formado nas densas mitocôndrias da musculatura peitoral de beija-flores ativos, contribuindo com mais de 50% da atividade total da SOD neste tecido (Bicudo, 1994).

Evidências acumuladas a partir de diferentes modelos experimentais (e.g. drogas terapêuticas, xenobióticos, hiperóxia, etc.) têm demonstrado que a síntese da SOD é induzível em organismos procariontes e eucariontes por agentes que aumentam a velocidade de formação do radical superóxido (Block, 1977; Chance *et al.*, 1979; Babior, 1984; Fridovich, 1986; Di Giulio *et al.*, 1989; Winston, 1991; Bainy *et al.*, 1996).

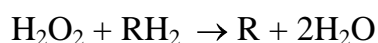
Entre as diversas espécies de peixes já estudadas, esta enzima demonstrou uma elevada similaridade em suas propriedades funcionais e estruturais, inclusive em peixes antárticos com sangue destituído de hemoglobinas (Bannister *et al.*, 1977; Víg *et al.*, 1989; Natoli *et al.*, 1990).

A CAT é responsável pela decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água e oxigênio:



Esta enzima é encontrada em quase todos os organismos aeróbicos, com exceção de algumas bactérias, das cianobactérias (algas azuis-esverdeadas) e de alguns parasitas helmintos (Halliwell & Gutteridge, 1989). A CAT está distribuída em praticamente todos os tipos celulares, principalmente no fígado e no sangue de animais superiores. Entretanto, a atividade desta enzima não tem sido constatada nos eritrócitos de diversas espécies de peixes (Rabie *et al.*, 1972; Smith, 1976; Wilhelm Filho *et al.*, 1993; Wilhelm Filho & Marcon, 1996) e de alguns mamíferos, incluindo humanos (Halliwell & Gutteridge, 1989).

As peroxidases utilizam uma variedade de agentes redutores (cofatores) que podem atuar como um segundo substrato para estas enzimas, doando elétrons para a redução do H₂O₂ até água. Além da catálise do H₂O₂, a GPx também atua sobre outros peróxidos orgânicos formados durante o processo de oxidação dos lipídeos:



A GPx é específica quanto ao seu substrato, a GSH, e inespecífica em relação aos cofatores que utiliza. Por este motivo, é importante que os níveis de GSH existentes intracelularmente estejam sempre elevados ($GSH/GSSG > 90\%$) para manter o funcionamento normal da GPx (Kosower & Kosower, 1978). As enzimas secundárias que participam do ciclo dos tióis têm um papel importante neste contexto; a glutathiona redutase (GR) utiliza elétrons do NADPH para a redução da glutathiona oxidada (GSSG), restabelecendo os níveis internos de GSH. Por outro lado, a glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e a 6-fosfoglicolactona desidrogenase, enzimas participantes da via das pentoses-monofosfato, bem como a isocitrato desidrogenase, fornecem os equivalentes redutores (NADPH) indispensáveis para a manutenção da atividade da GR (Meister & Anderson, 1983).

1.2.2. Antioxidantes não enzimáticos

Como ilustrado na Tabela 1, existem vários compostos de pequeno peso molecular que podem atuar como antioxidantes intracelulares. A vitamina E (sendo o α -tocoferol o mais importante) é um antioxidante lipossolúvel ligado às membranas biológicas, mas também encontrada em lipoproteínas do sangue e nas glândulas adrenais (Halliwell & Gutteridge, 1989). A vitamina E tem um papel importante na proteção contra os processos de peroxidação lipídica (González-Flecha *et al.*, 1991), eliminando tanto o oxigênio singlete, como o radical hidroxil (Burton & Ingold, 1981). Nessas reações, a vitamina E é convertida para uma forma reativa (α -tocoferil), que é sinergeticamente reduzida pela ação da vitamina C (Burton & Ingold, 1989). Este último composto pode auxiliar na detoxificação de vários radicais orgânicos, tendo também a capacidade de reagir rapidamente com o radical superóxido e com o radical hidroxil (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A glutathiona é, juntamente com a vitamina E, um dos mais importantes antioxidantes não enzimáticos. Este tripeptídeo é encontrado em praticamente todos os tipos celulares em concentrações que variam de 0,5 a 10 mM entre os mamíferos (Kosower &

Kosower, 1978; Meister & Anderson, 1983). A glutationa oxidada (GSSG) é tóxica para as células, pois tem a capacidade de inativar e inibir diversas enzimas, tais como a adenilato ciclase e a fosfofrutoquinase. Esta é, talvez, uma das razões pelas quais as células mantêm a razão GSH/GSSG elevada em condições normais e, determinados órgãos, como o fígado e o coração, liberam GSSG para o meio extracelular em situações de estresse oxidativo (Nishiki *et al.*, 1976; Oshino & Chance, 1977; Halliwell & Gutteridge, 1989). Além de sua associação com a enzima GPx, a glutationa reduzida também pode atuar como "varredor" do radical hidroxil e do oxigênio singlete. Sua relação com esta última espécie reativa do oxigênio pode ser explicada pela presença de elevadas concentrações de GSH (7-10 mM) nos cristalinos de rato (Halliwell & Gutteridge, 1989). Nos eritrócitos de peixes, por exemplo, são observados níveis elevados de GSH em concentrações semelhantes e até superiores aos revelados pelos eritrócitos anucleados de mamíferos (Härdig & Höglund, 1983; Dafré & Reischl, 1990; Wilhelm Filho & Marcon, 1996).

A ação conjunta de diversos antioxidantes não enzimáticos, como o α -tocoferol, a vitamina C e a GSH, sobre o radical hidroxil (HO^\bullet) demonstra a potencialidade destrutiva que este intermediário reativo do oxigênio possui. O radical hidroxil possui um período de vida-média extremamente curto (10^{-9} s), o que torna impossível uma ação detoxificadora por via enzimática. A estratégia celular principal de detoxificação do HO^\bullet consiste na manutenção de baixas concentrações basais de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , já que podem reagir entre si, na presença de ferro, para formar o HO^\bullet (reação de Haber-Weiss), mantendo a concentração deste radical em aproximadamente 10^{-18} M em fígado de rato (Chance *et al.*, 1979). Neste mesmo tecido, os valores das concentrações basais do $\text{O}_2^{\cdot-}$ e do H_2O_2 foram estimados em 10^{-10} a 10^{-11} M, para o radical ânion superóxido e de 10^{-7} a 10^{-9} M, para o peróxido de hidrogênio, respectivamente (Oshino *et al.*, 1973; Tyler, 1975).

A intensidade dos danos oxidativos promovidos pelas espécies ativas do oxigênio depende tanto da natureza como da quantidade das mesmas a que as células estão expostas, bem como de suas proteções antioxidantes. É importante mencionar que a geração das espécies ativas do oxigênio ocorre mesmo em condições fisiológicas normais e, nesse sentido, a participação das proteções antioxidantes é fundamental. Qualquer distúrbio na relação entre as concentrações basais das espécies ativas do oxigênio e os níveis das proteções antioxidantes pode resultar em uma situação de estresse oxidativo.

Segundo Sies (1991), uma situação de estresse oxidativo é estabelecida quando existe um distúrbio no balanço pró/antioxidante em favor do primeiro, levando a uma condição de dano potencial. Este distúrbio pode ocorrer por um aumento na geração de espécies oxidantes sem o aumento correspondente dos antioxidantes, por uma diminuição das proteções antioxidantes sem um concomitante aumento dos oxidantes (e.g. envelhecimento), ou numa situação mais drástica, por uma elevação do potencial oxidativo, acompanhada de uma diminuição das proteções antioxidantes. Neste último caso, as consequências danosas podem ser irreversíveis e resultar na morte celular (Scandalios, 1993). Tal definição incorpora os produtos celulares oxidados (lipídeos, proteínas, bases nitrogenadas, GSH, etc.) como parâmetros indicadores de estresse oxidativo (Sies, 1991).

1.3. A obtenção do oxigênio nos organismos aquáticos

A dependência do oxigênio para a manutenção das funções vitais nos organismos aeróbicos propiciou o desenvolvimento de sistemas especializados para a captação, o transporte e o fornecimento adequado deste gás ao nível tissular. A vinculação dos aparelhos circulatório e respiratório, associados à presença de pigmentos transportadores foi um passo importante, senão decisivo, para a obtenção de elevadas taxas metabólicas e da estratégia da endotermia, não exclusiva dos vertebrados superiores (Benett, 1978; White, 1978). Apesar deste progresso evolutivo, os organismos não conseguiram eliminar o atrelamento de suas

características ecológicas e fisiológicas às oscilações na disponibilidade do oxigênio ambiental.

Este aspecto tem uma conotação especial na adaptação dos organismos à vida nos ambientes aquáticos. Características físico-químicas *per se* determinam uma menor disponibilidade (cerca de 30 vezes) do oxigênio nos ambientes aquáticos relativamente ao ambiente terrestre (Dejours, 1988), tornando o oxigênio um dos fatores limitantes mais determinantes na distribuição e atividade dos organismos aquáticos (Kramer, 1987). Além disso, a menor capacidade de difusão, associada a uma maior densidade e viscosidade da água em relação ao ar (Dejours, 1988), determinaram uma série de adaptações nos organismos aquáticos no sentido de maximizar a obtenção do oxigênio em seu meio, como a presença de um fluxo unidirecional da água no aparelho branquial e mecanismos contra-corrente, que permitem uma maior extração do oxigênio da água com um menor gasto energético associado à ventilação branquial (Johansen, 1971; White, 1978; Layton, 1987). Enquanto nos peixes o custo energético envolvido na ventilação branquial varia de 3 a 50% do consumo total de energia, dependendo da espécie e de suas características ecofisiológicas, em humanos este valor não ultrapassa 1% numa condição de repouso (White, 1978; Rantin *et al.*, 1992).

Ao contrário das regiões temperadas, onde as flutuações na disponibilidade de oxigênio são marcadamente sazonais, as águas da região amazônica são exemplos de variações extremas do oxigênio que ocorrem ao longo de um único dia. A variação é tão ampla nestes locais que o oxigênio pode tornar-se inexistente durante a noite e atingir valores de supersaturação no período do dia de maior incidência luminosa (Kramer *et al.*, 1978; Fink & Fink, 1979; Melack & Fisher, 1983; Junk *et al.*, 1983). Estas oscilações extremas exigem dos organismos aquáticos, notadamente dos peixes, uma série de respostas adaptativas que envolvem desde manifestações comportamentais, como migrações laterais e o acionamento da respiração na superfície aquática, até o desencadeamento de ajustes fisiológicos e bioquímicos, como o aumento do hematócrito e da concentração de hemoglobina, alterações enzimáticas e processos de regulação gênica, entre outros (Braum

& Junk, 1982; Saint-Paul, 1984b; Val, 1986; 1993; Val *et al.*, 1987; Val & Almeida-Val, 1988; Almeida-Val *et al.*, 1993; 1995). Além das oscilações diárias da oferta de oxigênio, o ciclo hidrológico, caracteristicamente pulsante da Amazônia (Junk *et al.*, 1989), tem implicações profundas na dinâmica da biota aquática e certamente contribuiu para o desenvolvimento de uma diversidade de formas ícticas, que puderam explorar os inúmeros nichos disponíveis em um ambiente aparentemente limitante. O resultado de tal sucesso adaptativo pode ser verificado na enorme diversidade de espécies de peixes, muitas das quais endêmicas, que no início da década de 80 representavam mais de 2.500 espécies (Böhlke *et al.*, 1978) e hoje podem ser estimadas em torno de 4 mil espécies (Val & Almeida-Val, 1995; J.A.S. Zuanon, comunicação pessoal).

As adaptações destes organismos envolvendo os processos de tomada e liberação do oxigênio nos diversos tecidos em situações de hipóxia são conhecidas e têm sido investigadas nos peixes amazônicos (veja Val & Almeida-Val, 1995). Contudo, até o momento, não existem registros de estudos envolvendo a adaptação de espécies amazônicas à situação de hiperóxia. Estudos sobre hiperóxia são também restritos a algumas espécies intertidais que enfrentam, a exemplo dos peixes amazônicos, situações de ampla variação na pO_2 ambiental. Nestes locais, a pO_2 varia durante o dia de 16 a 450 mmHg (Bridges, 1993) e os peixes respondem às situações de hiperóxia reduzindo a ventilação branquial e desenvolvendo uma acidose respiratória, que é compensada por ajustes em alguns parâmetros sanguíneos (Bridges *et al.*, 1984). Reduções semelhantes na taxa de ventilação branquial foram também observadas em outras espécies marinhas (Dejours *et al.*, 1977; Berschik *et al.*, 1987), bem como o estabelecimento de acidose respiratória em algumas espécies de peixes de água doce (Wood & Jakson, 1980; Wilkes *et al.*, 1981; Wood, 1991). Como o sistema de proteções antioxidantes está intimamente ligado aos processos bioquímicos (reações de oxi-redução) em que o oxigênio participa, a manifestação de respostas compensatórias destes mecanismos, frente às oscilações naturais da oferta de oxigênio no ambiente, deve ter um papel importante na adaptação dos peixes.

1.4. A geração de espécies ativas do oxigênio em situações de hipóxia e hiperóxia

A produção dos intermediários reativos do oxigênio tem uma íntima relação com a proporção de oxigênio consumido pelo organismo. Essa idéia é suportada por diversos experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, onde ficou demonstrado que a geração de espécies ativas do oxigênio é dependente da concentração de oxigênio no meio em uma função praticamente linear (Boveris & Chance, 1973; Chance *et al.*, 1979; Dryer *et al.*, 1980; Jones, 1985; Jamieson *et al.*, 1986; DeGroot & Littauer, 1989; Wilhelm Filho *et al.*, 1993). Nesse sentido, mudanças drásticas na disponibilidade do O₂ podem resultar no estabelecimento de uma situação de estresse oxidativo. Freeman & Crapo (1982) mencionaram que células em determinadas situações metabólicas, tais como hiperóxia e isquemia podem favorecer a produção de radicais livres em concentrações acima do nível basal.

A hiperóxia é um modelo bastante utilizado na investigação dos processos ligados à geração dos radicais livres do oxigênio. Sua utilização clínica em câmaras hiperbáricas levantou uma crescente preocupação a respeito dos aspectos negativos resultantes desse tratamento, principalmente em neonatos (Frank, 1992). Distúrbios neurológicos, danos no epitélio pulmonar e cegueira são algumas das implicações clínicas oriundas da utilização da hiperóxia hiperbárica (Deneke & Fanburg, 1980; Freeman & Crapo, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1989). Anomalias oculares foram também observadas em exemplares de truta (*Salvelinus namaycuch*) cultivadas em águas supersaturadas (Krise and Smith, 1993), sugerindo que a aclimação à hiperóxia desencadeia respostas patológicas similares em ambos os grupos.

A avaliação do potencial de geração de espécies ativas do oxigênio em situações de hiperóxia sugere que concentrações excessivas de oxigênio no nível tissular aumentam consideravelmente a velocidade de formação dos intermediários reativos nestas células (Johnson *et al.*, 1972; Dryer *et al.*, 1980; Freeman & Crapo, 1981; Turrens *et al.*, 1982ab). Estes estudos demonstram claramente que, em diferentes tecidos e células, a exposição à hiperóxia tem como resultado primário o aumento das concentrações basais das espécies

ativas do oxigênio. Geralmente os aumentos destes intermediários reativos são acompanhados compensatoriamente por respostas dos sistemas de proteções antioxidantes enzimáticos. A atividade da SOD, por exemplo, mostrou ser linearmente influenciada pelo potencial fotossintético de produção do oxigênio em anêmonas marinhas que exibem um relacionamento simbiótico com algas fotossintetizantes (Dikens & Shick, 1984).

Como a velocidade de formação das espécies ativas do oxigênio é proporcional ao consumo de oxigênio e à quantidade de mitocôndrias presentes no tecido, a expectativa inicial é de que situações de hipóxia resultem em uma diminuição da velocidade de geração das espécies ativas do oxigênio. Entretanto, sob determinadas condições, a geração de espécies ativas do oxigênio pode ser aumentada também durante a hipóxia (DeGroot & Littauer, 1989). No caso de um modelo isquêmico ou mesmo hipóxico, onde o oxigênio está presente em concentrações que limitam sua redução para a H₂O pela citocromo c oxidase (1 a 3 mmHg), um aumento da capacidade de redução da cadeia respiratória, aliada a um acúmulo de cofatores reduzidos (potencial redutor) nas células poderia aumentar a produção de O₂^{·-} pelos componentes da cadeia transportadora de elétrons (Freeman & Crapo, 1982). Mecanismos semelhantes relacionados à geração de radicais livres foram sugeridos por Kramer & Pearlstein (1983). Estes autores demonstraram que baixas tensões de oxigênio podem provocar um desacoplamento reversível da síntese de ATP na fosforilação oxidativa. Em situações de isquemia, a produção destes intermediários é relacionada principalmente à etapa de reoxigenação, onde o elevado potencial redutor existente no meio intracelular, quando em contato com o oxigênio, desencadeia uma produção massiva de radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 1989). A formação de radicais livres do oxigênio em eritrócitos submetidos à hipóxia constitui outro exemplo no qual a velocidade de formação destas espécies reativas é incrementada (Levy *et al.*, 1988; Rifkind *et al.*, 1991; 1993).

1.5. As proteções antioxidantes em peixes

Estudos sobre os mecanismos de defesas antioxidantes em peixes são relativamente recentes e, algumas análises comparativas têm sido feitas relacionando-se os níveis de atividade das enzimas antioxidantes em diversos tecidos (Matkovics *et al.*, 1977; Smith & Shrift, 1979; Aksnes & Njaa, 1981; Morris & Albright, 1984; Witas *et al.*, 1984; Cassini *et al.*, 1993; Wilhelm Filho & Boveris, 1993; Wilhelm Filho *et al.*, 1993). Outros estudos foram realizados somente em eritrócitos de espécies de regiões temperadas (Rabie *et al.*, 1972; Wdzieczak *et al.*, 1981, Gabryelak *et al.*, 1983).

A avaliação das proteções antioxidantes em espécies de peixes tropicais e subtropicais foi também realizada, revelando diferenças qualitativas e quantitativas em relação aos peixes de zonas temperadas (Fitzgerald, 1992; Wilhelm Filho & Boveris, 1993; Wilhelm Filho *et al.*, 1993) e, igualmente, em relação aos representantes amazônicos examinados por nós recentemente (Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Aspectos envolvendo a sazonalidade das enzimas antioxidantes e de antioxidantes não enzimáticos, como a glutathione, foram analisados em algumas espécies de peixes (Härdig & Höglund, 1983; Gabryelak *et al.*, 1983). Um número crescente de informações tem sido obtido em relação aos efeitos de certos agentes químicos e contaminantes ambientais sobre as proteções antioxidantes e da utilização de peixes como bioindicadores de ambientes alterados (Thomas & Wofford, 1984; Mather-Mihaich & DiGiulio, 1986; Matkovics *et al.*, 1987; Malins *et al.*, 1988; Vig & Nemcsok, 1989; DiGiulio *et al.*, 1989; Winston, 1991; Bainy *et al.*, 1996, entre outros).

Comparativamente a outros grupos de vertebrados, as proteções antioxidantes de peixes revelam características funcionais e qualitativas muito similares, principalmente em relação à superóxido dismutase (Matkovics *et al.*, 1977; Vig *et al.*, 1989; Natoli *et al.*, 1990). Contudo, em termos quantitativos, os peixes apresentam atividades enzimáticas inferiores relativamente às observadas nos mamíferos (Matkovics *et al.*, 1977; Izokun-Etiobio *et al.*, 1990; Pérez-Campo *et al.*, 1993; Wilhelm Filho, 1994) e, a princípio, compatíveis com seus

respectivos níveis de atividade. Por outro lado, as concentrações de glutathiona sanguínea são similares e até mesmo superiores às observadas nos mamíferos (Härdig & Höglund, 1983; Nikinmaa, 1990; Dafré & Reischl, 1990; Wilhelm Filho & Marcon, 1996).

1.6. Considerações gerais sobre as espécies estudadas

a) A espécie *Astronotus ocellatus* (Cuvier, 1829)

O acará-açu ou apaiari, como é conhecida na Amazônia a espécie *Astronotus ocellatus*, é um perciforme pertencente à família Cichlidae e amplamente distribuído na bacia amazônica, ocorrendo desde a Ilha de Marajó até alguns tributários do Peru e da Venezuela. São animais territoriais e, conseqüentemente, de baixa vagilidade, que habitam os lagos de várzea e igapó existentes ao longo da bacia amazônica. *Astronotus ocellatus* tem sido bastante difundido em todo o mundo como espécie ornamental pela coloração característica que apresenta. Quando mantidos em aquário, estes animais reduzem seu crescimento, não ultrapassando 12 centímetros de comprimento (Silva, 1978). Contudo, em condições favoráveis naturais ou de cultivo, os mesmos apresentam um rápido desenvolvimento, atingindo a maturidade sexual em apenas um ano e até 1 kg de peso neste mesmo período (Saint-Paul, 1986), sendo, por isso, considerados um dos maiores representantes dos acarás brasileiros.

Astronotus ocellatus apresenta um comportamento alimentar bastante diversificado no ambiente natural. Alguns autores consideram a espécie omnívora (Albuquerque, 1980), embora outros mencionem que o acará-açu seja um animal carnívoro com tendência a omnívoro (Ferreira, 1981; Soares *et al.*, 1986), por terem observado uma predominância significativa de alimentos de origem animal na dieta destes peixes.

Sawaya (1946) realizou os primeiros estudos relacionados à fisiologia da respiração do acará-açu, através da avaliação da taxa de consumo do oxigênio organismal, juntamente com duas espécies de tucunarés (gênero *Cichla*). Neste estudo, os exemplares de acará-açu

mostraram elevada resistência à hipóxia, aspecto corroborado posteriormente por Bastos (1956) e Soares (1993). Pitombeira (1972) descreveu o quadro hematológico completo (série branca e vermelha) de *A. ocellatus*. A autora encontrou valores médios de hematócrito e concentração de hemoglobina de 24,0 % e 6,7 g/dl, respectivamente, para animais mantidos em cativeiro em condições normais de O₂. Baseada nestes valores, a autora sugeriu que esta espécie exibe uma atividade metabólica intermediária.

Astronotus ocellatus é um respirador aquático obrigatório, que pode utilizar-se da respiração na superfície aquática para otimizar a obtenção de oxigênio durante situações de hipóxia ambiental (Sawaya, 1946; Soares, 1993). Contudo, esta espécie não parece procurar a superfície aquática como primeira alternativa. À medida que a disponibilidade do oxigênio diminui, *A. ocellatus* reage à hipóxia aumentando ligeiramente a frequência dos batimentos operculares, que têm seu máximo em torno de 1 mgO₂/l (Soares, 1993). Abaixo deste valor, a frequência opercular é diminuída e os animais permanecem inativos no fundo do aquário por longos períodos. *Astronotus ocellatus* parece iniciar a respiração na superfície aquática somente em condições anóxicas (PO₂<0,3 mgO₂/l; Soares, 1993). Por outro lado, observações realizadas em animais mantidos em cativeiro sugerem que este mecanismo comportamental pode ser utilizado com maior frequência, inclusive em condições mais elevadas de oxigenação (observações pessoais). *Astronotus ocellatus* não parece utilizar-se do mecanismo de hiperventilação em situações de hipóxia ambiental (Soares, 1993; observações pessoais).

A manifestação de adaptações comportamentais relacionadas aos processos de obtenção de oxigênio, aliada à ausência de adaptações morfológicas e anatômicas nesta espécie, parece ser um forte indicativo de que mecanismos finos de ajuste no nível fisiológico-bioquímico são responsáveis pela elevada resistência que *A. ocellatus* apresenta em relação à hipóxia. Estudos bioquímicos realizados em diversas espécies de ciclídeos da Amazônia sobre o sistema enzimático da lactato desidrogenase (LDH), revelaram uma forte tendência de restrição da isozima B₄ (aeróbica) em seus tecidos e, por outro lado, a predominância da isozima A₄ (anaeróbica) em todos os tecidos, inclusive no músculo

cardíaco (Almeida-Val & Val, 1993). Esta condição poderia favorecer a razão entre o metabolismo anaeróbico e o aeróbico, uma estratégia comumente utilizada contra a hipóxia por animais que apresentam elevada capacidade anaeróbica.

b) A espécie *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

Uma das mais importantes espécies de peixes da região amazônica, o tambaqui como é denominado *Colossoma macropomum* no Brasil, é um caraciforme da família Serrasalminidae com ampla distribuição em toda a bacia amazônica e bacia do Orinoco, na Venezuela. É um peixe de grande interesse comercial, contribuindo significativamente na produção do pescado desembarcado em Manaus, um dos maiores entrepostos pesqueiros do norte do país. Atualmente é uma das espécies que já enfrenta super exploração de seus estoques naturais (Bittencourt, 1991). *Colossoma macropomum* é uma espécie de grande longevidade, que pode alcançar um comprimento máximo de 1 metro e um peso superior a 30 Kg, atingindo a maturidade sexual entre o quarto e o quinto ano de vida, com relatos de até 3 anos em animais de cativeiro (Graef, 1993).

O comportamento alimentar do tambaqui varia com o desenvolvimento do animal. Nos indivíduos jovens de até 4 kg, a dieta alimentar baseia-se principalmente de zooplâncton (cladóceras e copépodos) e, secundariamente, de frutos e sementes. Já os animais adultos são exclusivamente frugívoros, mostrando ainda preferência por frutos da euforbiácea *Hevea brasiliensis* e pelo arroz selvagem, *Oryza perennis* (Honda, 1974; Goulding & Carvalho, 1982; Saint-Paul, 1984a; Soares *et al.*, 1986). Segundo Goulding & Carvalho (1982) a especialização alimentar do adulto só é possível devido à capacidade que o tambaqui possui de produzir grandes reservas de gordura cavitária e intramuscular, que são utilizadas como fonte energética durante os movimentos migratórios destinados à reprodução.

O tambaqui é uma, dentre as várias espécies de caraciformes, que realiza a "piracema", subindo os rios de águas brancas em grandes cardumes para se reproduzir

(Goulding, 1980). Estas migrações, assim como aquelas destinadas ao forrageamento, implicam no deslocamento destes animais por ambientes completamente distintos em relação às propriedades físico-químicas, tais como pH, temperatura, condutividade e teor de oxigênio dissolvido. Contudo, a variação natural existente entre os diversos tipos de água - brancas, pretas e claras, não oferece obstáculo à fisiologia desta espécie. *Colossoma macropomum* demonstra uma elevada tolerância às variações do pH, não manifestando nenhum tipo de distúrbio ácido-base e/ou ionorregulatório quando aclimatado em intervalos de pH entre 4 e 8 (Costa, 1995).

Apesar de seu hábito migratório, o tambaqui parece ser um peixe de atividade moderada durante a maior parte do ano (4 a 7 meses), quando se encontra habitando a floresta inundada dos lagos de várzea e igapó, desfrutando da grande oferta de alimentos e buscando abrigo entre as raízes das macrófitas aquáticas (Goulding & Carvalho, 1982; Soares *et al.*, 1986). Aumentos importantes da atividade metabólica desta espécie parecem ser adotados apenas durante os movimentos migratórios (Soares, 1993).

A resistência de *C. macropomum* às baixas tensões de oxigênio já vem sendo reconhecida por diversos autores. O tambaqui apresenta mecanismos de ajustes contra a hipóxia em praticamente todos os níveis hierárquicos da organização biológica. Este animal tem a capacidade de realizar a respiração na superfície aquática, quando a concentração de oxigênio diminui para o nível de 0,5 mgO₂/l (Saint-Paul, 1984b), uma característica comportamental comum a outros peixes amazônicos. Concomitantemente ao início da respiração na superfície aquática, o tambaqui se utiliza de uma adaptação morfo-anatômica, desenvolvendo uma expansão dermal na mandíbula inferior, que tem a função de direcionar o fluxo da água superficial mais oxigenada para a região das brânquias (Braun & Junk, 1982; Saint-Paul, 1984b; Val, 1986). Os mecanismos fisiológicos e bioquímicos envolvidos no desenvolvimento dos lábios não são conhecidos. Acredita-se, contudo, que exista um controle hormonal neste processo, onde os baixos teores de oxigênio agiriam como um sinal externo (Almeida-Val *et al.*, 1993). A concentração crítica, na qual a respiração do tambaqui passa a ser dependente da concentração de O₂ dissolvido, é 2 mg O₂/l (30°C). Abaixo deste

nível, flutuações rápidas da concentração de O₂ podem ser compensadas por modificações na taxa de ventilação branquial (hiperventilação; Saint-Paul, 1984b). *Colossoma macropomum* apresenta uma grande área de superfície branquial, uma das maiores entre os teleósteos dulceaquícolas e compatível com algumas espécies migradoras marinhas (Saint-Paul, 1984b), uma característica que permite à espécie uma maior capacidade de extração do oxigênio em situações de elevada demanda energética. Ajustes no quadro hematológico também foram observados nesta espécie frente aos diferentes períodos do ciclo hidrológico, com elevações da concentração de hemoglobina e do número de eritrócitos nas fases de menor disponibilidade de O₂ (Saint-Paul, 1984b; Val, 1986). Moura *et al.* (1994) relataram alterações hematológicas na série branca em função da temperatura, na qual foi observado um decréscimo significativo do número de linfócitos circulantes, quando a espécie foi aclimatada a temperaturas elevadas (35 e 40°C).

Diversos estudos realizados em nosso laboratório vêm demonstrando que o tambaqui é uma espécie eminentemente oxidativa. Mesmo em situações de hipóxia ambiental crônica, esta espécie prefere manter seus requerimentos energéticos basais através da supressão de sua atividade metabólica normal, aproveitando-se ainda das vantagens adaptativas que possui para maximizar a obtenção do oxigênio ambiental (Val, 1986, Almeida-Val *et al.*, 1992; Almeida-Val & Val, 1993; este estudo).

1.7. Objetivo e Hipóteses

O presente trabalho objetivou avaliar comparativamente o comportamento do sistema de proteções antioxidantes em exemplares de *Colossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus* aclimatados experimentalmente a diferentes tensões de oxigênio. Considerando este objetivo e as premissas apresentadas nas seções anteriores, formulamos as seguintes hipóteses de trabalho:

Hipótese 1: as variações na disponibilidade de oxigênio alteram o sistema de proteções antioxidantes nas duas espécies estudadas.

Variações na oferta de oxigênio ambiental podem refletir-se no metabolismo celular, alterando o funcionamento da cadeia transportadora de elétrons e favorecendo a formação das espécies ativas do oxigênio.

Hipótese 2: as respostas apresentadas pelo sistema de proteções antioxidantes diferem nas situações de hipóxia e hiperóxia nas duas espécies estudadas.

Situações de hipóxia podem promover um desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial, em função da baixa P_{O_2} intracelular. Contrariamente, condições hiperóxicas resultam em elevações na P_{O_2} arterial e na ativação de diversas enzimas geradoras de espécies ativas do oxigênio.

Hipótese 3: as distintas características ecofisiológicas apresentadas pelas duas espécies determinam respostas diferenciadas no mecanismo de proteções antioxidantes.

A utilização do oxigênio está intimamente vinculada ao hábito manifestado pela espécie e, conseqüentemente, as proteções antioxidantes devem responder paralelamente à demanda deste gás que, aparentemente, é diferenciada entre as duas espécies.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais experimentais

Os exemplares de acará-açu (*Astronotus ocellatus*) foram coletados nos Lagos Camaleão (Ilha da Marchantaria, rio Solimões) e Catalão (confluência dos rios Negro e Solimões), próximos à cidade de Manaus, enquanto que os exemplares de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram obtidos na Estação de Piscicultura do INPA (CPAQ). No laboratório, os peixes foram aclimatados por um período mínimo de 2 semanas antes do início dos experimentos, para propiciar o restabelecimento do metabolismo basal, alterado em decorrência do estresse causado pela captura, transporte e manipulação.

2. Protocolo experimental

Três séries experimentais foram elaboradas e conduzidas no presente trabalho, com o objetivo de submeter as duas espécies a situações normais e adversas de exposição ao oxigênio, durante o período de aclimação. Os detalhes de cada um destes experimentos são apresentados a seguir:

2.1. Série I: Normóxia

Exemplares de *C. macropomum* (n=10) foram aclimatados em um tanque de fibra de vidro com 500 litros de capacidade e dotado de filtro biológico, durante 15 dias consecutivos. Neste período, os animais foram mantidos em tensões normais de oxigênio ($128 \pm 2,15$ mmHg), que foram monitoradas regularmente através de um oxigenômetro YSI

modelo 53. Outros parâmetros físico-químicos, tais como pH, temperatura ambiental e do aquário e pressão barométrica também foram monitorados. Os peixes foram alimentados em dias alternados com ração comercial e expostos a um fotoperíodo regular de 12 horas de claro/escuro. Ao final do período experimental, os animais foram coletados do aquário e uma amostra de sangue (1-2 ml) foi obtida através de punção caudal, com o auxílio de seringas heparinizadas, sendo então imediatamente sacrificados com uma pancada na cabeça para a excisão do fígado. Não foi utilizado qualquer tipo de anestésico durante a coleta dos animais do aquário para obtenção do sangue e fígado, pelo fato destas drogas causarem alterações na atividade das enzimas antioxidantes, especialmente a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (Wdzieczak *et al.*, 1982).

As mesmas condições descritas acima foram empregadas para a aclimação de *A. ocellatus* (n=9). Neste caso, a pressão parcial de O₂ foi mantida em 118,35±1,11 mmHg durante todo o período experimental. Esta série experimental foi considerada a condição controle em relação aos demais tratamentos.

2.2. Série II: Hiperóxia

Nesta fase, exemplares de *A. ocellatus* (n=6) e *C. macropomum* (n=10) foram aclimatados, em separado, em um aquário de 250 litros de capacidade, acoplado a um filtro externo, onde a água do sistema era continuamente filtrada. Neste aquário, a saturação de oxigênio foi mantida em condições normóxicas nas primeiras 24 horas, sendo depois gradativamente aumentada e mantida em valores supersaturantes durante o período experimental de 15 dias, através da injeção regular do gás puro na água do sistema. O fluxo de entrada de O₂ no sistema foi ajustado com o auxílio de um manômetro White Martins. Nos experimentos conduzidos com a espécie *C. macropomum*, a pressão parcial de O₂ aplicada foi de 348,00±12,07 mmHg. Para *A. ocellatus*, a pressão parcial de O₂ foi de

373,97±10,55 mmHg. Os demais procedimentos executados durante a condução desta série experimental obedeceram aos mesmos requisitos adotados na etapa anterior.

2.3. Série III: Hipóxia

Para a realização desta série experimental, foi utilizado o mesmo sistema de aclimação empregado nos experimentos relativos à hiperóxia. Os exemplares pertencentes a espécie *C. macropomum* (n=10) foram mantidos em condições normóxicas durante as primeiras 24 horas. Após esse período, o sistema de aeração foi desligado e a saturação de O₂ foi gradativamente reduzida a partir da própria respiração dos animais, até atingir uma pressão parcial média de 46,53±1,64 mmHg, que foi mantida durante todo o período de experimentação (15 dias). Optou-se pela manutenção de uma situação de hipóxia moderada (Corrêa & Rantin, 1994) durante a aclimação do tambaqui, para evitar a formação dos lábios por estes animais, que poderiam dificultar a interpretação dos resultados. Para os indivíduos de *A. ocellatus* (n=10), a pressão parcial de oxigênio também foi gradativamente reduzida de uma condição normóxica para uma tensão média de 29,03±0,33 mmHg. Nesta espécie, utilizou-se uma situação de hipóxia profunda, em função da elevada resistência que a mesma apresenta em relação à hipóxia (Sawaya, 1946; Soares, 1993). Os demais procedimentos empregados posteriormente à fase de aclimação foram conduzidos essencialmente de acordo com as especificações descritas na Série I.

3. Métodos Analíticos

Os métodos descritos a seguir foram utilizados nas análises referentes à determinação dos parâmetros hematológicos (hematócrito, concentração de hemoglobina e dos níveis de metahemoglobina), do sistema de proteções antioxidantes enzimático

(superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e não enzimático (glutathione sanguínea total e reduzida), além dos níveis endógenos de peroxidação lipídica e do consumo de oxigênio do fígado.

3.1 Preparação das amostras

3.1.1. Preparação dos hemolisados

Após a remoção do plasma por centrifugação, os eritrócitos foram lavados três vezes com solução fisiológica (NaCl 0,9 %) e os hemolisados foram obtidos a partir da adição de três volumes de tampão Tris-HCl 5mM pH 8,0, os quais foram congelados (-20°C) e descongelados três vezes e finalmente centrifugados sob refrigeração (4°C), em uma centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B a 15460 g (13000 rpm) durante 10 minutos. Utilizou-se apenas o sobrenadante (solução de hemoglobina) para a determinação das atividades enzimáticas e da avaliação dos níveis endógenos de peroxidação lipídica.

3.1.2. Preparação dos homogeneizados de fígado

Imediatamente após a excisão do fígado, parte do tecido foi lavada com solução fisiológica gelada (NaCl 0,9%) para a remoção do excesso de sangue, secada superficialmente com papel filtro e rapidamente pesada. Os extratos foram obtidos a partir da homogeneização em tampão fosfato 20 mM pH 7,4, contendo 1 % do detergente Triton X-100 (proporção de 1 g tecido: 9 ml tampão) em um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem e, em seguida, centrifugados sob refrigeração (4°C) a 11890 g (10000 rpm) durante 10 minutos, em uma centrífuga Sorvall RC-5B. Os sobrenadantes foram retirados com o auxílio de uma pipeta Pasteur, imediatamente separados em alíquotas e congelados a -20°C até a realização das análises de cada tipo enzimático e do conteúdo de TBARS.

Com o propósito de interromper as reações de oxidação dos lipídeos nas alíquotas destinadas à determinação deste último parâmetro (avaliação dos níveis endógenos), 10 µl do antioxidante butilhidroxitolueno (BHT) foram adicionados às amostras antes do congelamento das mesmas.

3.2. Parâmetros Hematológicos

3.2.1. Hematócrito (Ht)

O hematócrito foi determinado de acordo com o método usualmente empregado, utilizando-se amostras de sangue, em duplicatas, contidas em tubos capilares de microhematócrito (75 mm x 1mm) heparinizados e centrifugados a 14270 g (12000 rpm) durante 10 minutos, com o auxílio de uma centrífuga de microhematócrito Fanen modelo 207N. A leitura correspondente, dada em porcentagem, foi realizada em cartão com escala padronizada.

3.2.2. Concentração de hemoglobina sanguínea (Hb)

Foi determinada através da conversão da hemoglobina para a forma de cianometahemoglobina, de acordo com Kampen & Zijlstra (1964). Num tubo de ensaio contendo 3 ml de reagente de Drabkin (KCN 0,5 g; KH₂PO₄ 1,4 g; K₃[Fe (CN)₆] 2,0 g em 1litro de água destilada), foram adicionados 15 µl de sangue total. A solução foi então misturada, agitada vigorosamente e centrifugada a 3570 g (3000 rpm) durante 5 minutos em uma centrífuga de mesa Fanen modelo Excelsa 2. A leitura espectrofotométrica de duplicatas foi realizada em 540 nm e a concentração de hemoglobina, expressa em g/dl, foi obtida através da seguinte fórmula:

$$[\text{Hb}] \text{ (g/dl)} = A_{540} \times 0,146 \times 200$$

onde:

A_{540} corresponde a absorvância média obtida em 540 nm;

0,146 equivale a um fator de correção e;

200 refere-se à diluição empregada durante a preparação da amostra.

3.2.3. Determinação do conteúdo de metahemoglobina (meta-Hb)

O conteúdo de meta-Hb foi determinado segundo método descrito por Benesch *et al.* (1973), que se baseia na avaliação espectrofotométrica das formas da hemoglobina (oxi, deoxi e metahemoglobina) em diferentes comprimentos de onda. Num tubo de ensaio contendo 3 ml de tampão fosfato 35 mM pH 7,3, foram diluídos 50 μ l de sangue total. A mistura foi vigorosamente agitada, centrifugada a 3570 g (3000 rpm) durante 5 minutos em uma centrífuga de mesa Fanen modelo Excelsa 2 e posteriormente lida em 560, 576 e 630 nm, com o auxílio de um espectrofotômetro Shimadzu UV-240. Os valores obtidos em cada comprimento de onda foram inseridos em fórmulas matemáticas, previamente estabelecidas pelos autores para o pH 7,3 e, as concentrações (em mM) de cada forma da hemoglobina foram então calculadas e convertidas em porcentagem. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

4. Consumo tecidual de oxigênio (VO₂)

Na avaliação do consumo de oxigênio do fígado, amostras do tecido ("slices"), pesando entre 30 e 50 mg (dependendo da espécie), foram colocadas em uma câmara

(Câmara de Gilson) de 1,54 ml de volume, contendo tampão Ringer para peixes teleósteos (pH 7,4 contendo glicose 5mM) e mantidas sob agitação lenta e temperatura controlada (30°C, nestas condições) (Cadenas & Sies, 1982). A velocidade de consumo do oxigênio foi obtida a partir do uso de um oxigenômetro (Vanderkooi *et al.*, 1991) YSI modelo 53, acoplado à Câmara de Gilson através de um eletrodo Clark. Após a calibração do aparelho em 100 % de saturação, o consumo de O₂ foi registrado, durante um intervalo de 8 a 15 minutos, com o auxílio de um registrador Pharmacia, dependendo da espécie e da condição em que os indivíduos estavam submetidos. Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e os valores, expressos em μmoles O₂/min/g tecido, foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$VO_2 (\mu\text{moles O}_2/\text{min/g}) = \frac{\% \text{ saturação} \times 5,28 \times 0,00154 \times 44,17643}{\text{tempo (min)} \times \text{peso (g)}}$$

onde:

5,28 corresponde à solubilidade do oxigênio na temperatura de 30°C;

0,00154 equivale ao volume da câmara, expresso em litros;

44,17643 trata-se da constante de conversão do consumo de oxigênio, de ml O₂/min/g tecido para μmoles O₂/min/g tecido.

5. Análises Enzimáticas

5.1. Superóxido dismutase (SOD; EC 1.15.1.1)

Nas amostras de fígado, a atividade da superóxido dismutase foi determinada de acordo com o método descrito por Misra & Fridovich (1972) e modificado Boveris *et al.* (1983), que se baseia na formação do adrenocromo (cromóforo rosa) durante a oxidação da adrenalina promovida pelo ânion superóxido em pH alcalino. O início da reação se deu a

partir da adição 50 µl de solução de adrenalina 60 mM pH 2,0 em 2,95 ml de tampão glicina 50 mM pH 10,2. A velocidade de formação do adrenocromo foi acompanhada durante cerca de 1 minuto, em intervalos de 15 segundos. Diferentes alíquotas do homogeneizado (10 a 50 µl) foram adicionadas para avaliar o grau de inibição promovido pela enzima na formação do adrenocromo em 480 nm.

Não foi possível determinar os níveis da SOD nas amostras de sangue utilizando-se o método do adrenocromo (Misra & Fridovich, 1972), devido às interferências observadas na taxa de oxidação da adrenalina. A adição das amostras resultou em aumentos da taxa de oxidação da adrenalina que foram proporcionais à quantidade de amostra adicionada. Em função disto, a atividade da superóxido dismutase sanguínea foi determinada em 535 nm, de acordo com o método descrito por Flohé & Ötting (1984), que consiste na diminuição da redução do citocromo c promovida pela ação do ânion superóxido, gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase. Neste ensaio, cerca de 35 µl (0,4 U) de xantina oxidase foram adicionados em 1,90 ml de uma solução contendo tampão fosfato 50 mM pH 7,8, EDTA 0,1 mM, citocromo c 20 µM e xantina 50 µM. Esta alíquota foi suficiente para obter-se um decréscimo na absorbância em torno de 0,025 unidades/min. Após cerca de 1 minuto, alíquotas da amostra foram adicionadas e o decréscimo na absorbância foi acompanhado por mais 2-3 minutos, em intervalos de 15 segundos.

Curvas com 3 a 5 pontos foram obtidas para cada amostra e as atividades enzimáticas da SOD foram então determinadas indiretamente. Nestas condições, uma unidade de SOD equivale a 50% de inibição que a enzima promove na velocidade espontânea de formação do adrenocromo e/ou redução do citocromo c, sendo que 1 U de SOD corresponde a 11 pmoles de Cu,Zn-SOD ou, de outra forma, 1 pmol é igual a 90 U de SOD (Puntarulo *et al.*, 1988; Wilhelm Filho *et al.*, 1993). Os valores de SOD foram expressos em nmoles SOD/g tecido e nmoles SOD/ml sangue, i.e., em valores de concentração de enzima pura, conforme sugerido por Chance *et al.* (1979), em função do comportamento não-michaeliano apresentado pela superóxido dismutase (e igualmente pela

catalase) e, também, com o propósito de permitir comparações entre os sistemas enzimáticos e não enzimáticos, inclusive, e com as informações já existentes na literatura. Além disso, em função do tempo de exposição (15 dias) empregado no presente estudo, os valores observados para as diversas enzimas examinadas, são relativos às variações na síntese das mesmas e não somente devido às diferenças de atividade, reforçando o emprego das unidades expressas em termos de concentração.

Uma comparação realizada entre os dois métodos acima citados, utilizando-se SOD bovina purificada (Sigma, USA), revelou uma excelente reprodutibilidade. Em ambos os métodos, foi necessária praticamente a mesma quantidade da enzima para obter-se uma inibição de 50% (1 U de SOD) na velocidade de formação do adrenocromo e da redução do citocromo c reduzido, respectivamente (Figura 1).

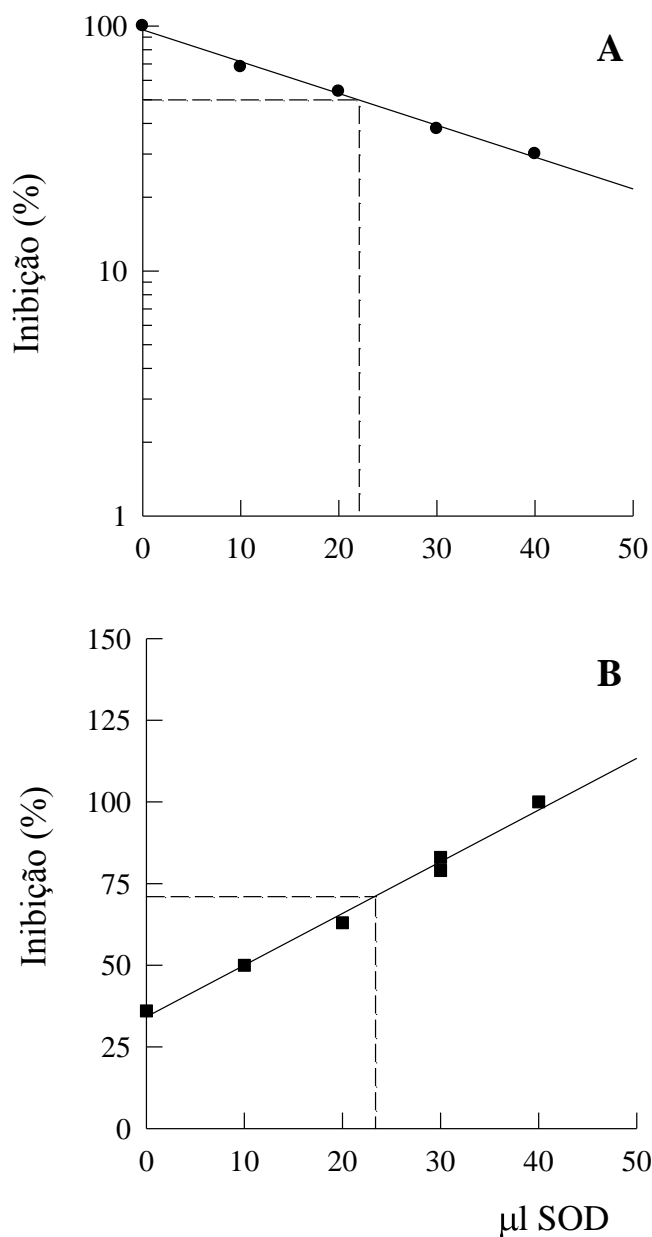


Figura 1. Ensaio comparativo dos métodos utilizados na avaliação da enzima superóxido dismutase (SOD): métodos da autoxidação da adrenalina (A) e da redução do citocromo c (B). Utilizou-se praticamente a mesma quantidade (~24 µl) de SOD bovina purificada (SIGMA; 5 mg em 20 ml de água destilada; 390 U SOD) para obter-se 50 % de inibição (1U SOD) na taxa de formação do radical ânion superóxido em ambos os ensaios.

5.2. Catalase (CAT; EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi obtida através da avaliação contínua do decréscimo da concentração do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em 240 nm (Beers & Sizer, 1952; Aebi, 1984). Após a adição da amostra (10 a 20 μl , dependendo da espécie), diminuições na absorvância foram registradas em intervalos de 5 segundos, durante o primeiro minuto, em uma cubeta contendo 2,0 ml de uma solução recém-preparada de peróxido de hidrogênio 10 mM, em tampão fosfato 50 mM pH 7,0. Como a concentração de H_2O_2 é fundamental para a precisão das análises, pelo fato da reação da catalase ser de *pseudo primeira-ordem* em relação ao peróxido de hidrogênio (a velocidade da reação depende da concentração do H_2O_2 utilizada no ensaio), a solução original foi titulada e o coeficiente de extinção molar ($E_{240} = 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) previamente estabelecido por Aebi (1984) foi utilizado para checar a concentração do peróxido de hidrogênio. Somente após este procedimento, a solução de ensaio (10 mM) foi então preparada. Na avaliação da atividade da catalase sanguínea, os hemolisados foram diluídos 500 a 600 vezes em tampão fosfato 50 mM pH 7,0 (Aebi, 1984). Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

Em função das razões expostas no ítem anterior, também os valores da catalase foram expressos em termos de concentração de enzima pura, i.e., em pmoles CAT/g tecido e em pmoles CAT/ml sangue.

Para efeito de comparação com os dados existentes na literatura, que em sua maioria estão expressos em Unidades Bergmeyer (UB), nas condições experimentais empregadas no presente estudo, 1 nmol de catalase equivale a 33 UB (Wilhelm Filho *et al.*, 1993). Este valor é decorrente da definição de 1 UB, que corresponde à quantidade de catalase que libera a metade do oxigênio de uma solução de peróxido de hidrogênio de qualquer concentração no intervalo de tempo de 100 segundos a 20°C. Bergmeyer, 1965).

5.3. Glutathione Peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9)

A avaliação da atividade enzimática da glutathione peroxidase foi realizada apenas no fígado, através do monitoramento contínuo da taxa de consumo do NADPH em 340 nm (Paglia & Valentine, 1967). Em uma cubeta de 3 ml, um volume de 50 µl de GSH 10 mM, preparada em tampão fosfato 10 mM pH 7,0, foi adicionado em uma solução contendo o mesmo tampão, NADPH 1 mM, glutathione reductase 12 U/ml e ter-butil hidroperóxido 10 mM. Um decréscimo lento da absorbância foi monitorado durante cerca de 2-3 minutos sendo adicionados, em seguida, 100 µl da amostra. Uma redução mais acentuada da absorbância em 340 nm foi novamente monitorada por cerca de 5-8 minutos e a diferença entre a declividade das duas retas foi então utilizada na determinação da atividade enzimática. O conteúdo de GPx foi igualmente expresso em pmoles GPx/g tecido e pmoles GPx/ml sangue, onde 1 pmol de GPx equivale a uma atividade de 6,0 mU ou µmoles de NADPH/min (Wilhelm Filho *et al.*, 1993). Todas as análises enzimáticas foram realizadas em triplicatas.

6. Concentração de glutathione sanguínea total e reduzida

O conteúdo total da glutathione foi determinado enzimaticamente, de acordo com Tietze (1969). Num tubo Eppendorf contendo 200 µl de ácido perclórico 2 M, uma amostra de sangue total de igual volume foi adicionada para a obtenção do extrato ácido. Após aguardar cerca de 10 minutos, o extrato ácido foi centrifugado a 3570 g (3000 rpm) durante 5 minutos (centrífuga de mesa Fanen). Do sobrenadante obtido, uma alíquota (200 µl) foi então neutralizada com a adição de 130-150 µl de MOPS/KOH (0,2 M / 3 M). As amostras foram congeladas a -20°C e lidas espectrofotometricamente em 412 nm, em triplicatas, no dia seguinte à preparação dos extratos ácidos. Na leitura, 50 µl da amostra foram adicionados a

uma cubeta contendo uma mistura de tampão fosfato 0,1 M pH 7,4, EDTA 1mM, NADPH 1,5 mM, DTNB 2,5 mM e glutathiona redutase 2 U/ml (vol. final de 2,0 ml) e a velocidade de formação do ânion tiolato (TNB⁻) foi registrada para se obter o intervalo de A₄₁₂/min em um espectrofotômetro Shimadzu UV-240. As concentrações, expressas em mM, foram obtidas a partir de uma curva padrão de glutathiona oxidada (GSSG; Sigma Co.), solução original 1,0 mM ([GSSG]=Abs₄₁₂/min-0,0176/0,081; r=0,955).

A concentração da glutathiona reduzida (GSH) foi igualmente determinada em 412 nm, segundo Beutler *et al.* (1963). Neste ensaio, o hemolisado foi obtido a partir da adição de 200 µl de sangue total em 1,80 ml de água destilada. Depois de aproximadamente 5 minutos, o hemolisado foi misturado em 3,0 ml de ácido metafosfórico 1,67%, 0,2% EDTA, 5% NaCl e agitado vigorosamente para a obtenção do extrato ácido. Aguardados mais 5 minutos, o extrato foi centrifugado a 3570 g (3000 rpm) durante 5 minutos (centrífuga de mesa Fanen) e o sobrenadante foi armazenado sob refrigeração até o momento da leitura espectrofotométrica em 412 nm. Na leitura, 400 µl do extrato foram adicionados a uma cubeta contendo 1,6 ml de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0 e o início da reação se deu a partir da adição de 200 µl de DTNB 2,5 mM. A velocidade de formação do ânion TNB⁻ foi registrada durante cerca de 5 minutos, tempo necessário para que a reação se estabilizasse. Os valores foram igualmente expressos em mM e todas as amostras foram avaliadas em triplicatas.

7. Análise dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS)

Os níveis endógenos de peroxidação lipídica foram determinados empregando-se o método baseado na reação dos produtos derivados da oxidação dos lipídeos com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A avaliação espectrofotométrica foi realizada segundo Ohkawa (1979) e Bird & Draper (1984) em 535 nm. Amostras de homogeneizado de fígado e hemolisados

(100 µl) foram adicionadas a um tubo de ensaio contendo uma mistura de 1,0 ml de ácido tricloroacético 30 %, 1,0 ml de TBA 0,73%, 0,89 ml de tampão Tris-HCl 60 mM pH 7,4, EDTA 0,1 mM e 10 µl de butilhidroxitolueno (BHT) 0,2 mM (4% em metanol), agitadas e mantidas em banho-maria (100°C) durante 60 minutos. As amostras foram então resfriadas a 10°C por mais 30 minutos, centrifugadas por 5 minutos a 3000 rpm e imediatamente lidas em 535 nm. Turrens (1991) e Wilhelm Filho (1994) verificaram que tempos inferiores a uma hora não permitiam o completo desenvolvimento do cromóforo rosa, formado pela reação dos produtos celulares oxidados com o TBA, fato este que poderia subestimar o grau de peroxidação lipídica em tempos inferiores ao acima mencionado. As concentrações foram expressas em nmoles de substâncias reativas ao TBA (TBARS)/g tecido e nmoles TBARS/ml de sangue, utilizando o coeficiente de extinção molar $E_{535}=153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Bird & Draper, 1984).

8. Reagentes Utilizados

Os reagentes utilizados nas análises foram obtidos da Sigma Chemical Co. (EUA), com exceção dos reagentes utilizados para a preparação dos tampões fosfato e dos ácidos empregados na preparação dos extratos, os quais foram obtidos da Merck (Alemanha).

9. Análise estatística

Para testar a significância das diferenças obtidas entre as médias nos diferentes tratamentos, utilizou-se a análise de variância simples (ANOVA), seguida do emprego do "teste t de Bonferroni" para estabelecer as diferenças dos tratamentos em relação ao controle (normóxia), assumindo-se intervalo de confiança igual ou menor de 5% ($P<0,05$). Correlações entre as diversas variáveis analisadas foram obtidas através do uso da análise de

regressão linear, cuja significância foi considerada (Zar, 1984). Utilizou-se o teste “t de Student” para testar as diferenças entre os diversos parâmetros analisados nas duas espécies aclimatadas apenas à condição controle, assumindo-se o mesmo intervalo de confiança empregado na ANOVA. Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM).

RESULTADOS

1. Condições experimentais

Os parâmetros físico-químicos avaliados durante a execução das três séries experimentais são apresentados na Tabela 2. As tensões de oxigênio foram mantidas em níveis significativamente diferentes ($P < 0,001$) nas situações de hipóxia e hiperóxia, quando comparadas com a situação controle (normóxia). Os demais parâmetros analisados, com exceção do pH da água, foram mantidos em valores próximos aos observados em normóxia. As diferenças observadas nos valores de pH, apesar de terem sido significativas ($P < 0,05$), não são relevantes quando consideradas em relação ao ambiente.

2. Parâmetros hematológicos

Os valores correspondentes à concentração de hemoglobina sanguínea e ao hematócrito de exemplares de *C. macropomum* e *A. ocellatus* expostos às situações de hipóxia, normóxia e hiperóxia são apresentados na Tabela 3. *Colossoma macropomum* e *A. ocellatus* revelaram valores de hematócrito e concentração de hemoglobina semelhantes entre si quando aclimatados à normóxia. Na aclimação à hiperóxia, não foram constatadas alterações importantes do hematócrito nos exemplares de *A. ocellatus*, enquanto que em *C. macropomum* este parâmetro mostrou um aumento, considerado por nós significativo em relação ao controle ($P = 0,052$). A concentração de hemoglobina, por outro lado, sofreu variações significativas ($P < 0,05$) no sangue de ambas as espécies analisadas.

Tabela 2. Temperatura ambiental, temperatura da água, pH e pressão parcial de oxigênio aplicados aos exemplares de *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum* aclimatados à hipóxia, normóxia e hiperóxia durante 15 dias consecutivos. Valores expressos como média \pm SEM. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) em relação à normóxia.

Espécie/Condição (número de observações)	Temperatura ambiente (°C)	Temperatur a da água (°C)	pH da água	pO₂ da água (mmHg)
<i>Astronotus ocellatus</i>				
Hipóxia (95)	28.0 \pm 0.10	27.6 \pm 0.05	6.13 \pm 0.02 *	29.0 \pm 0.97 *
Normóxia (40)	28.9 \pm 0.17	28.2 \pm 0.09	5.32 \pm 0.07	118.4 \pm 1.11
Hiperóxia (45)	29.8 \pm 0.16	29.1 \pm 0.08	6.25 \pm 0.02 *	374.0 \pm 10.55 *
<i>Colossoma macropomum</i>				
Hipóxia (38)	28.4 \pm 0.22	27.7 \pm 0.15	5.23 \pm 0.07 *	46.5 \pm 1.64 *
Normóxia (78)	28.3 \pm 0.17	27.9 \pm 0.11	5.71 \pm 0.08	127.7 \pm 2.15
Hiperóxia (56)	28.5 \pm 0.10	28.0 \pm 0.07	5.94 \pm 0.05 *	348.0 \pm 12.07 *

Em *C. macropomum* a concentração de hemoglobina elevou-se significativamente em relação à normóxia, enquanto que em *A. ocellatus* observou-se um decréscimo deste parâmetro (Tabela 3). Na exposição à hipóxia, os valores correspondentes ao hematócrito e à concentração de hemoglobina permaneceram inalterados em relação ao controle nas duas espécies estudadas (Tabela 3).

Tabela 3. Peso, hematócrito e concentração de hemoglobina sanguínea dos exemplares de *Astronotus ocellatus* e *Collossoma macropomum* aclimatados à hipóxia, normóxia e hiperóxia. Parênteses indicam o número de indivíduos analisados. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à normóxia; (#) $P = 0,052$. Valores expressos como média \pm SEM.

Espécie/Condição (n)	Peso (g)	Ht (%)	Hb (g.dl⁻¹)
<i>Astronotus ocellatus</i>			
Hipóxia (10)	175,7 \pm 15,54	20,2 \pm 1,41	5,77 \pm 0,49
Normóxia (9)	200,7 \pm 16,31	18,7 \pm 0,94	6,29 \pm 0,40
Hiperóxia (6)	181,8 \pm 8,07	19,0 \pm 0,97	4,02 \pm 0,43 *
<i>Collossoma macropomum</i>			
Hipóxia (10)	203,5 \pm 3,67	18,2 \pm 0,71	5,84 \pm 0,37
Normóxia (10)	122,0 \pm 10,03	18,6 \pm 1,83	4,99 \pm 0,56
Hiperóxia (10)	132,1 \pm 7,70	22,6 \pm 1,22 #	7,28 \pm 0,44 *

Aumentos significativos dos níveis de metahemoglobina (meta-Hb) foram observados no sangue dos exemplares de *C. macropomum* aclimatados nas situações de hipóxia e hiperóxia e nos indivíduos de *A. ocellatus* aclimatados apenas à hiperóxia. Em *A. ocellatus*, a exposição à hiperóxia resultou em aumento dos níveis de meta-Hb da ordem de cinco vezes em relação ao controle, enquanto que nos exemplares de *C. macropomum* o conteúdo de meta-Hb foi cerca de 2 vezes maior (Figura 2).

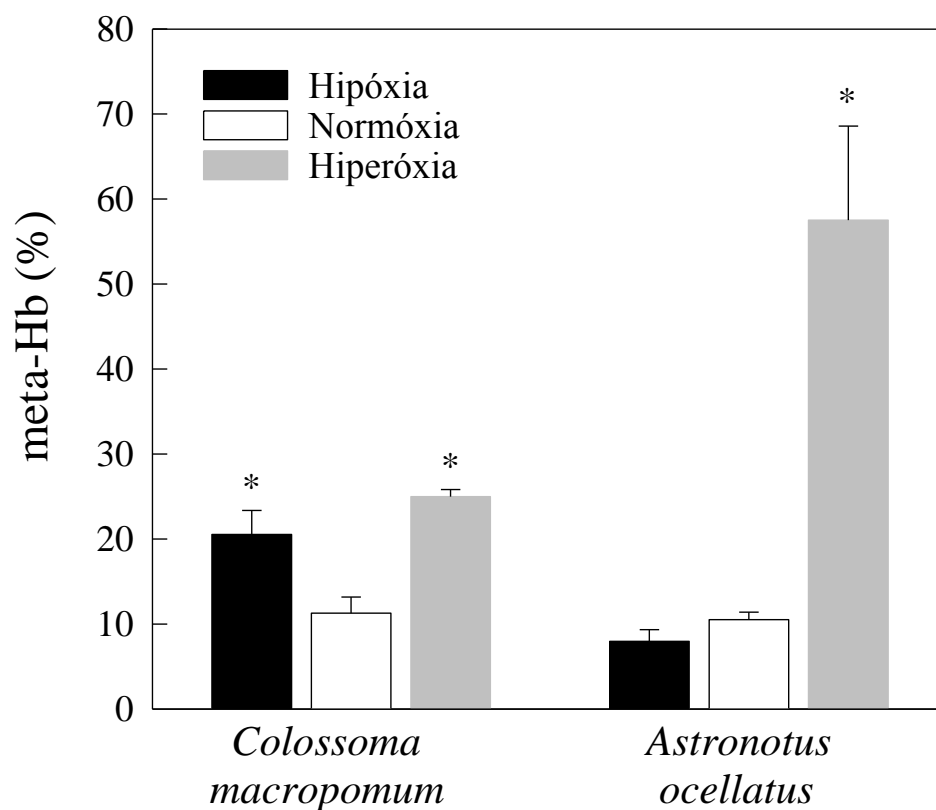


Figura 2. Conteúdo de metahemoglobina (meta-Hb) presente no sangue de *Colossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus* aclimatados à normóxia, hipóxia e hiperóxia. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à normóxia.

Um aspecto interessante observado principalmente durante a aclimação à normóxia consistiu na existência de uma correlação positiva entre a concentração de hemoglobina e os níveis endógenos de peroxidação lipídica (TBARS) presentes nos eritrócitos das duas espécies em estudo. Em *A. ocellatus*, esta correlação foi significativa nas situações de normóxia ($r=0,80$; $P=0,03$) (Figura 3A) e hipóxia ($r=0,80$; $P=0,006$). Em *C. macropomum* esta correlação foi observada nas mesmas condições, i.e., em normóxia ($r=0,95$; $P<0,001$) (Figura 3B) e em hipóxia ($r=0,65$; $P=0,04$). Nesta última espécie, quando aclimatada à normóxia, foi também evidenciada uma correlação entre a concentração de hemoglobina e a atividade da enzima superóxido dismutase no sangue ($r=0,68$; $P=0,04$), sugerindo uma interdependência funcional entre os parâmetros mencionados acima, aspecto anteriormente documentado na literatura (Wilhelm Filho *et al.*, 1993).

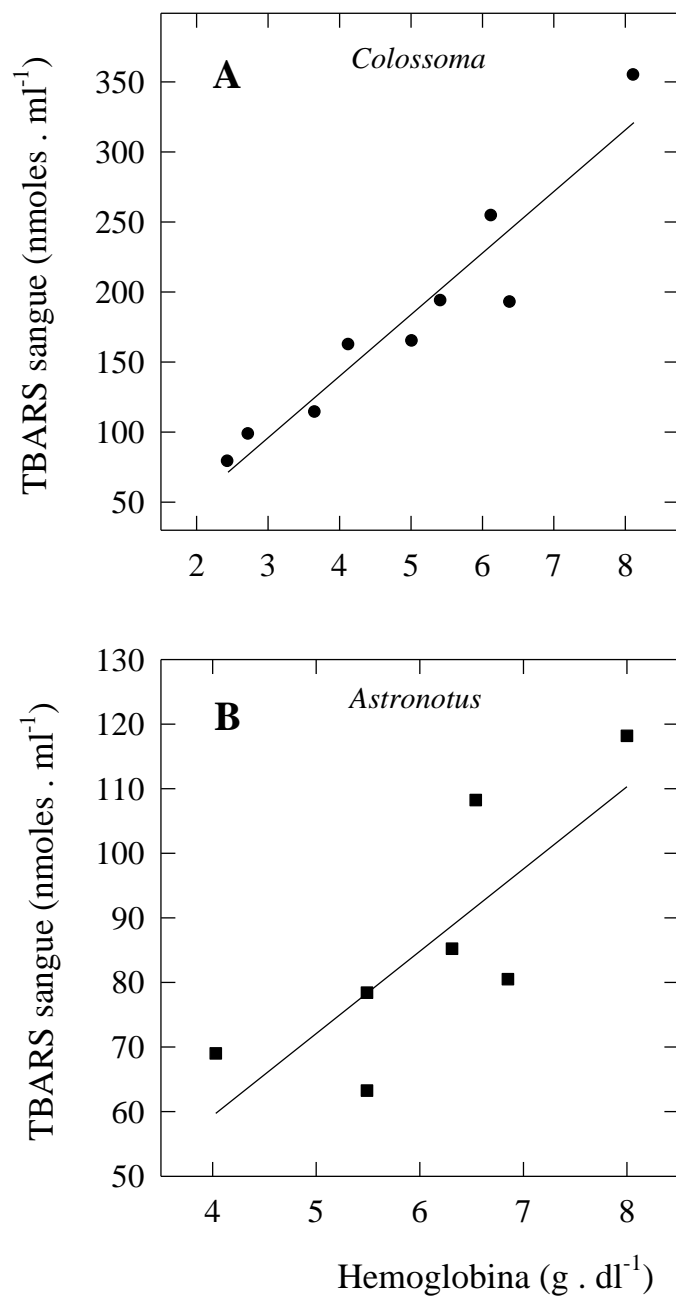


Figura 3. Correlações observadas entre a concentração de hemoglobina e os níveis endógenos de peroxidação lipídica (TBARS) presentes no sangue de *Colossoma macropomum* (A, $r=0,95$) e de *Astronotus ocellatus* (B, $r=0,80$) aclimatados à normóxia.

3. Consumo tecidual de oxigênio

Os valores de consumo de oxigênio tecidual verificados nas duas espécies analisadas foram semelhantes entre si na condição de normóxia. A aclimação de exemplares de *C. macropomum* e *A. ocellatus* à hipóxia e à hiperóxia resultou em diminuições significativas do consumo de oxigênio no fígado (Figura 4). Em *C. macropomum*, o consumo de oxigênio hepático diminuiu cerca de 22% nos animais submetidos a hiperóxia, e 47% nos indivíduos aclimatados à hipóxia. Em *A. ocellatus*, o decréscimo no consumo de O₂ foi de 32% para os animais expostos à hiperóxia e de 23% para aqueles submetidos à hipóxia. Este parâmetro revelou correlações importantes com as concentrações da SOD presentes no fígado (veja ítem 4.1). A catalase também revelou uma correlação positiva e significativa ($r=0,69$; $P=0,03$) com o consumo de oxigênio do fígado do tambaqui na condição de normóxia (dados não mostrados). Esta correlação, no entanto, não foi constatada em *A. ocellatus*.

4. Enzimas antioxidantes

4.1. Superóxido dismutase

A avaliação tecidual da SOD revelou uma atividade ligeiramente superior desta enzima no fígado relativamente ao sangue, em ambas espécies analisadas, independentemente da condição em que os animais foram aclimatados (Figuras 5A e 5B). Contudo, estas diferenças não foram significativas. Em condições normais, o conteúdo da SOD avaliado no fígado e no sangue de *A. ocellatus* mostrou ser superior ($P<0,05$) aos conteúdos observados nos mesmos tecidos analisados em *C. macropomum* (Figura 5A).

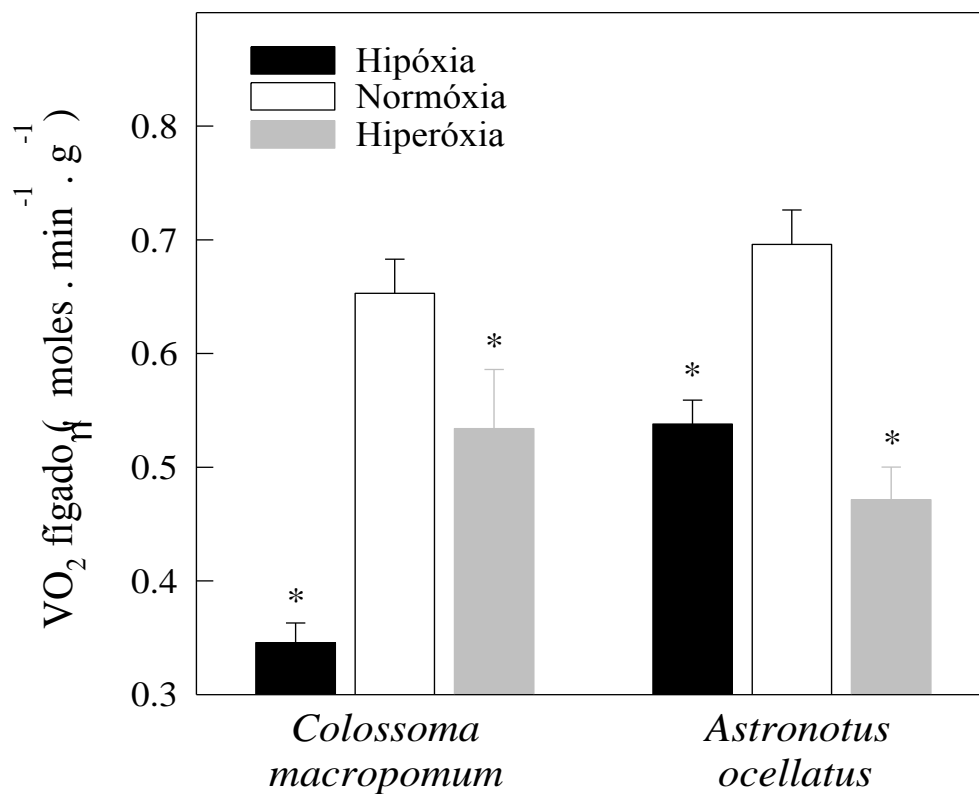


Figura 4. Consumo de oxigênio (VO_2) no fígado de exemplares de *Colossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus* aclimatados à hipóxia, normóxia e hiperóxia. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à normóxia.

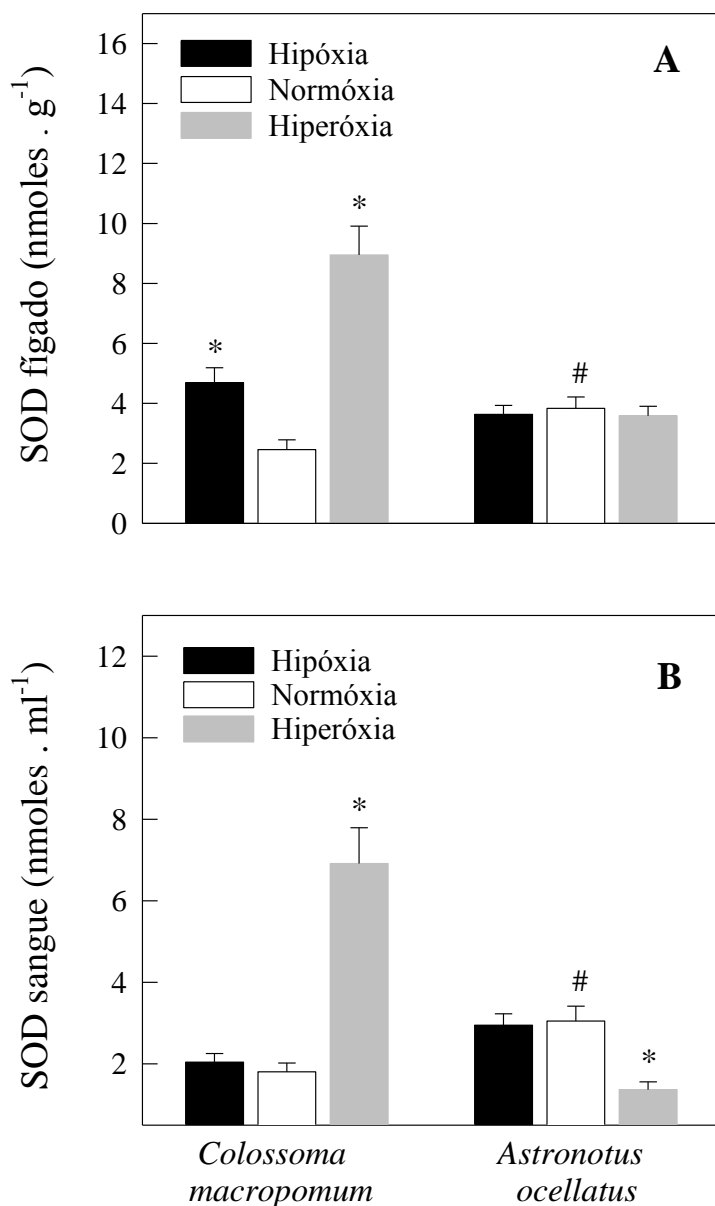


Figura 5. Concentração da enzima superóxido dismutase (SOD) avaliada no fígado (A) e no sangue (B) de *Colossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus* aclimatados à hipóxia, normóxia e hiperóxia. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à normóxia. (#) diferença estatisticamente significativa entre as duas espécies aclimatadas à normóxia.

Em hiperóxia, as concentrações hepáticas da SOD em *C. macropomum* aumentaram cerca de 3 vezes ($8,95 \pm 0,96$ nmoles/g) quando comparadas com a normóxia ($2,46 \pm 0,33$ nmoles/g) (Figura 5A). Alterações significativas foram também observadas nos animais aclimatados à hipóxia ($4,69 \pm 0,50$ nmoles/g). No sangue, o conteúdo da SOD elevou-se significativamente na hiperóxia ($6,92 \pm 0,96$ nmoles/ml) cerca de 3,5 vezes em relação ao controle ($1,81 \pm 0,22$ nmoles/ml), permanecendo inalterado na situação hipóxica (Figura 5B).

Não foi constatada nenhuma variação nas concentrações da SOD no fígado dos espécimens de *A. ocellatus* aclimatados à hiperóxia ($3,59 \pm 0,32$ nmoles/g) e igualmente à hipóxia ($3,63 \pm 0,30$ nmoles/g), quando comparados com aqueles animais expostos à normóxia ($3,83 \pm 0,38$ nmoles/g, Figura 5A). Contrariamente, no sangue, foi observado um decréscimo significativo na atividade desta enzima nos animais aclimatados à hiperóxia ($1,37 \pm 0,19$ nmoles/ml), evidenciando um comportamento diferenciado da SOD nas duas espécies estudadas (Figura 5B).

Analisando conjuntamente o comportamento da SOD, da catalase e da glutationala peroxidase, é possível observar que existe uma interdependência funcional entre os três sistemas enzimáticos. No fígado dos exemplares de tambaqui aclimatados à hiperóxia, os aumentos da SOD foram acompanhados por uma diminuição na concentração da catalase, que por sua vez, foi compensada por uma elevação da atividade da glutationala peroxidase. Nesta condição, observou-se uma correlação positiva entre a SOD e a CAT ($r=0,95$; $P<0,001$) (Figura 6A). Em *A. ocellatus* a relação entre as duas enzimas foi observada somente no sangue dos animais aclimatados à hipóxia ($r=0,81$; $P=0,008$) (Figura 6B).

A relação entre o consumo tecidual de oxigênio (VO_2) e a atividade da SOD no fígado mostrou ser significativa ($r=0,86$; $P=0,003$) apenas nos exemplares de *C. macropomum* aclimatados à hiperóxia (Figura 7A). Em *A. ocellatus* este nível de relação ($r=0,83$; $P=0,01$) foi constatado em animais expostos à normóxia (Figura 7B), ocorrendo também em indivíduos de *A. crassipinis* aclimatados à hiperóxia ($r=0,94$; $P=0,006$) (J.L. Marcon, dados não mostrados).

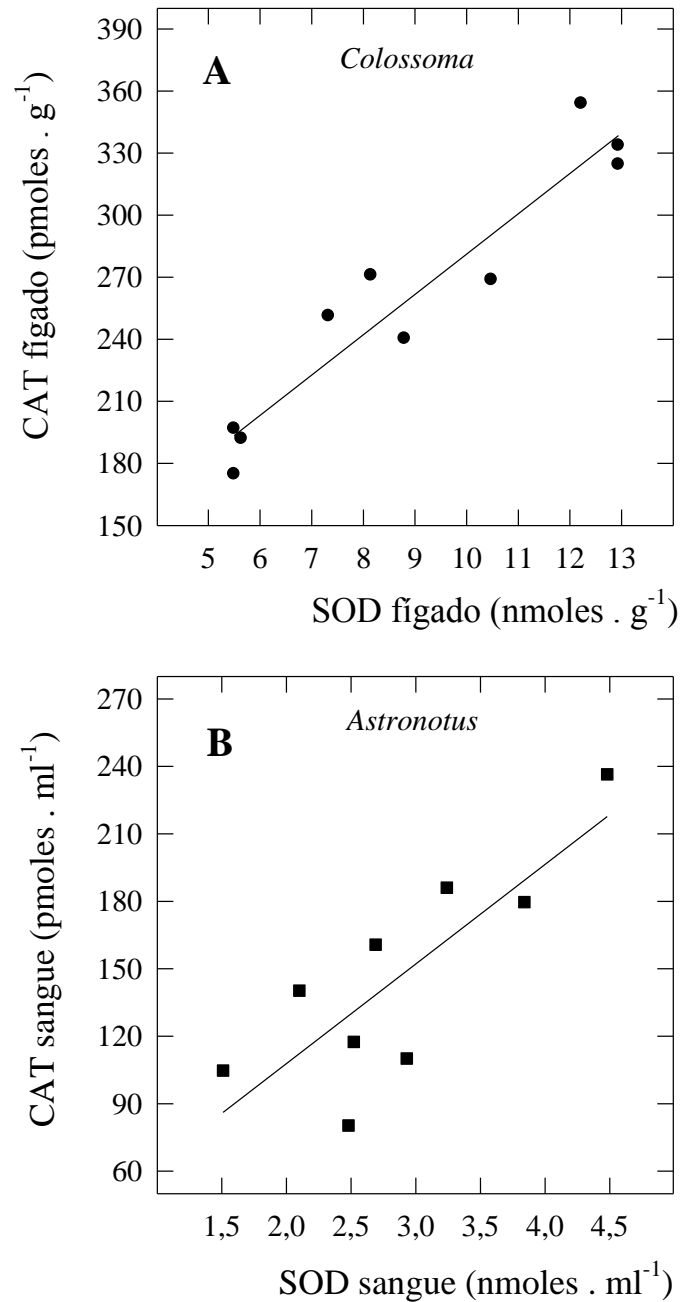


Figura 6. Correlações observadas entre as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) presentes no fígado (A) de *Colossoma macropomum* aclimatado à hiperóxia ($r=0,94$) e no sangue (B) de *Astronotus ocellatus* aclimatado à hipóxia ($r=0,81$).

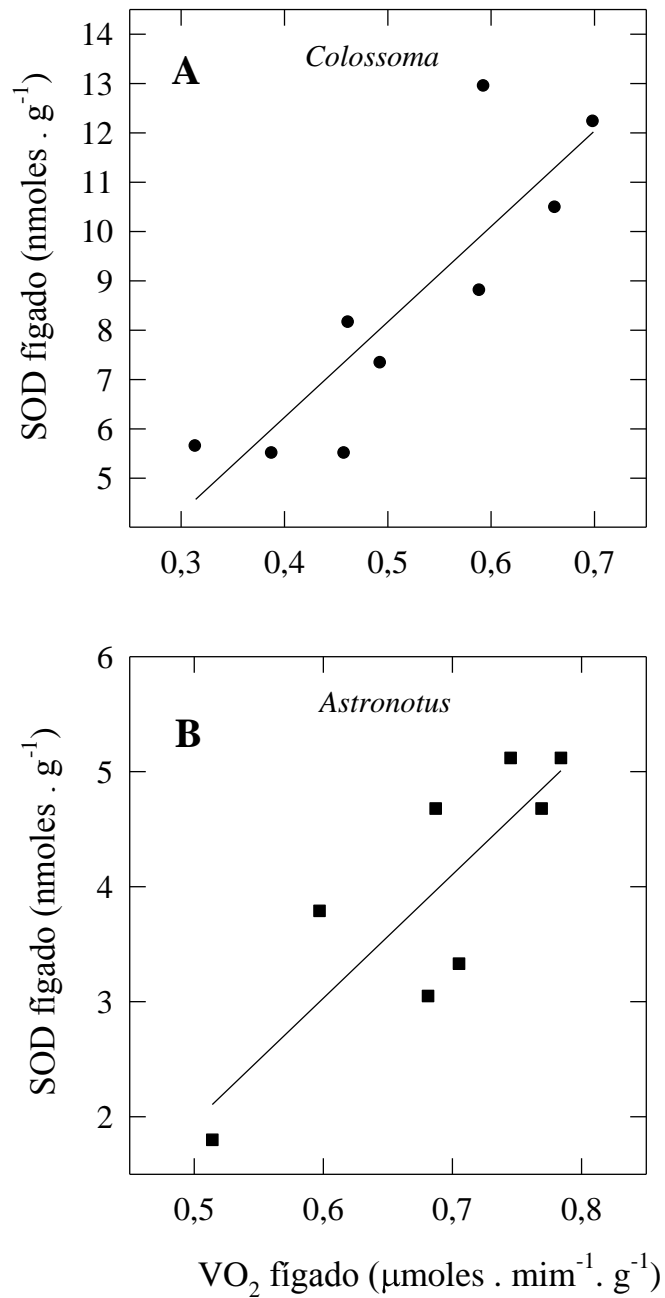


Figura 7. Correlações observadas entre a enzima superóxido dismutase (SOD) e o consumo de oxigênio (VO₂) avaliados no fígado de *Colossoma macropomum* (A) aclimatado à normóxia (r=0,86) e *Astronotus ocellatus* (B) exposto à hiperóxia (r=0,83).

4.2. Catalase

Em condições normóxicas, os conteúdos de CAT observados no fígado foram ligeiramente superiores (não significativo) nos exemplares de *A. ocellatus* (Figura 8A). No sangue, esta espécie manifestou a presença de CAT, enquanto que em *C. macropomum* esta enzima não foi detectada (Figura 8B). Nesta condição, a razão observada entre as concentrações da SOD e da CAT presentes no fígado ficou em torno de 3 e 4 vezes para *C. macropomum* e *A. ocellatus*, respectivamente. Nesta última espécie, a razão SOD/CAT sanguínea ficou em torno de 14 vezes.

A concentração da catalase diminuiu significativamente no fígado do tambaqui ($P < 0,05$), tanto nos exemplares expostos à hiperóxia como naqueles aclimatados à hipóxia (Figura 8A). Assim como em normóxia, a presença de CAT não foi detectada no sangue do tambaqui, quando exposto à condição de hipóxia. Uma pequena concentração ($3,71 \pm 0,97$ pmoles/ml) foi observada no sangue dos animais aclimatados à hiperóxia (Figura 8B). Nos indivíduos de *A. ocellatus* aclimatados à hiperóxia, não foram observadas variações significativas da catalase em nenhum dos tecidos examinados (Figura 8A). Contudo, na exposição à hipóxia, a catalase sofreu um decréscimo significativo de suas concentrações em ambos os tecidos analisados (Figuras 8A e 8B).

4.3. Glutathiona peroxidase

A glutathiona peroxidase foi analisada somente no fígado. Na aclimação à normóxia, os valores obtidos foram semelhantes nas duas espécies, porém ligeiramente superiores em *A. ocellatus* (Figura 9).

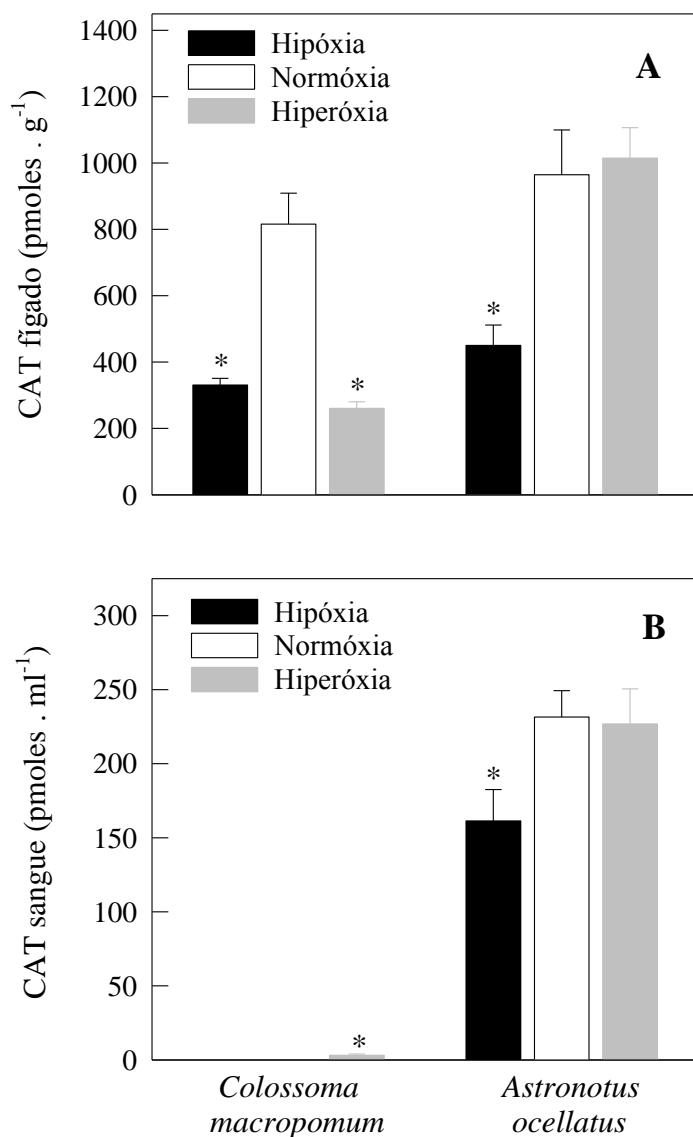


Figura 8. Concentração da catalase (CAT) avaliada no fígado (A) e no sangue (B) de *Astronotus ocellatus* e *Collossoma macropomum* aclimatados à hipóxia, normóxia e hiperóxia. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à normóxia. Os exemplares de *C. macropomum* apresentaram acatalasemia quando expostos à normóxia e à hipóxia.

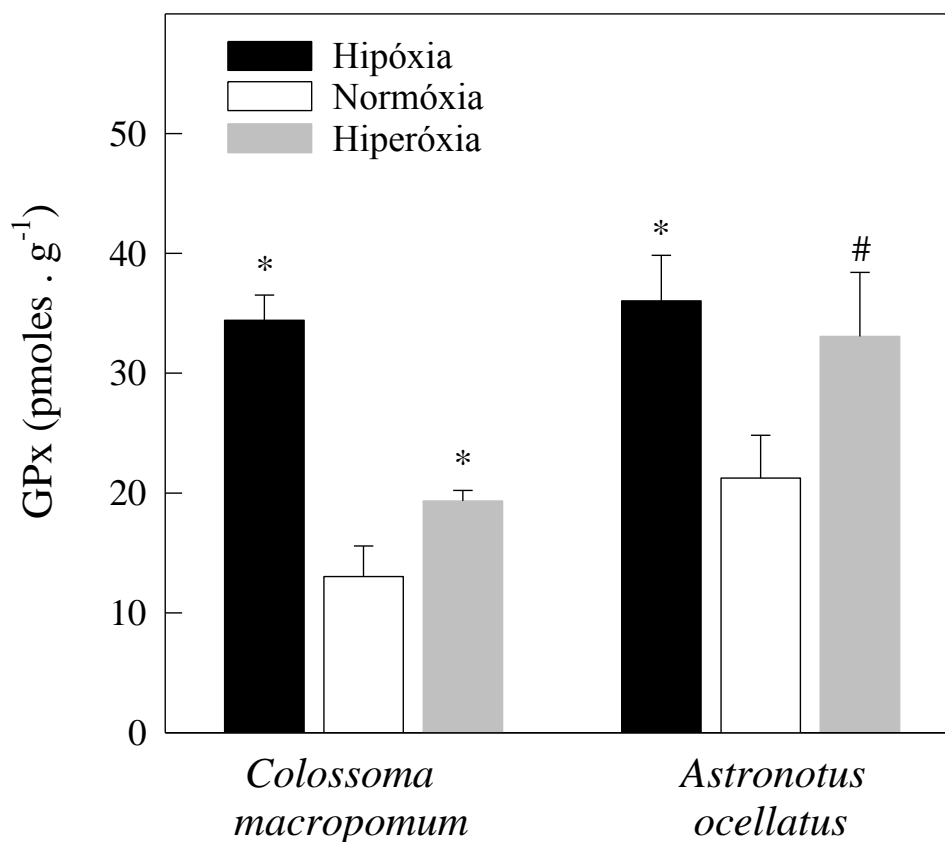


Figura 9. Concentração da enzima glutathiona peroxidase (GPx) avaliada no fígado de *Collossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus* aclimatados à hipóxia, normóxia e hiperóxia. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à normóxia; (#) $P < 0,08$.

A concentração da GPx aumentou significativamente nas duas situações experimentais, tanto no fígado de *C. macropomum*, como naquele de *A. ocellatus* (Figura 9). Na situação hiperóxica, a elevação da GPx foi mais acentuada no acará-açu do que no tambaqui, enquanto que em hipóxia os aumentos da enzima foram semelhantes entre as duas espécies.

Os exemplares de *C. macropomum* expostos à normóxia mostraram uma correlação inversa ($r=-0,76$; $P=0,021$) entre a concentração da GPx e o nível de dano celular presente no tecido hepático, e uma correlação positiva ($r=0,73$; $P=0,041$) entre as concentrações da GPx e da catalase. Em *A. ocellatus* não foi constatada nenhuma relação entre os níveis de TBARS e a enzima glutathiona peroxidase em todas as condições experimentais empregadas.

5. Glutathiona sanguínea total e reduzida

Em condições normóxicas, *A. ocellatus* e *C. macropomum* revelaram concentrações intraeritrocitárias de GSH de $0,20\pm 0,02$ mM e $1,32\pm 0,13$ mM, respectivamente, tendo a última espécie uma concentração cerca de 6 vezes superior à verificada no sangue do acará-açu (Figura 10).

Nas situações de hipóxia e hiperóxica, entretanto, os conteúdos de GSH sofreram um decréscimo significativo ($P<0,001$) em ambas as espécies estudadas, sendo ainda mais acentuado nos animais submetidos à hiperóxica (Figura 10). No tambaqui, o conteúdo da GSH foi diminuído em cerca de 8 vezes na aclimatação à hiperóxica e de 2 vezes durante a exposição à hipóxia. A razão molar observada entre as concentrações intraeritrocitárias da GSH e da hemoglobina (GSH/Hb) sofreu um decréscimo de cerca de uma ordem de magnitude nos animais expostos à hiperóxica (0,03) e de 2 vezes naqueles submetidos à hipóxia (0,15), quando comparados com a situação controle (Tabela 4). Nos exemplares de acará-açu, a depleção da GSH foi menos acentuada, sendo diminuída em cerca de 3,0 e 1,5 vezes nas situações de hiperóxica e hipóxia, respectivamente. Nesta espécie, a razão molar

GSH/Hb foi consideravelmente baixa, porém, com uma maior constância dos valores entre as três condições experimentais, quando comparada com os valores do tambaqui.

As concentrações de GSH foram inversamente proporcionais aos níveis de meta-Hb formados nos exemplares expostos à hipóxia e hiperóxia, quando comparados a seus respectivos controles. Isto se torna claro quando os valores de meta-Hb e GSH são plotados em relação à pressão parcial de O₂ aplicada nas 3 condições experimentais (Figura 11). Esta tendência foi mais evidente no tambaqui, onde a formação da meta-Hb aumentou em ambas as situações de hipóxia e hiperóxia.

Nos eritrócitos de *A. ocellatus*, aclimatado em normóxia, foi constatada a existência de correlações inversas entre o conteúdo de metahemoglobina ($r=-0,76$; $P=0,029$) e a enzima superóxido dismutase, entre os níveis de GSH ($r=-0,93$; $P=0,002$), e a enzima superóxido dismutase e, de uma correlação positiva ($r=0,86$; $P=0,003$) entre os conteúdos de GSH e metahemoglobina. Isso sugere uma participação conjunta da GSH e da SOD na manutenção dos níveis baixos de meta-Hb produzida no interior dos eritrócitos.

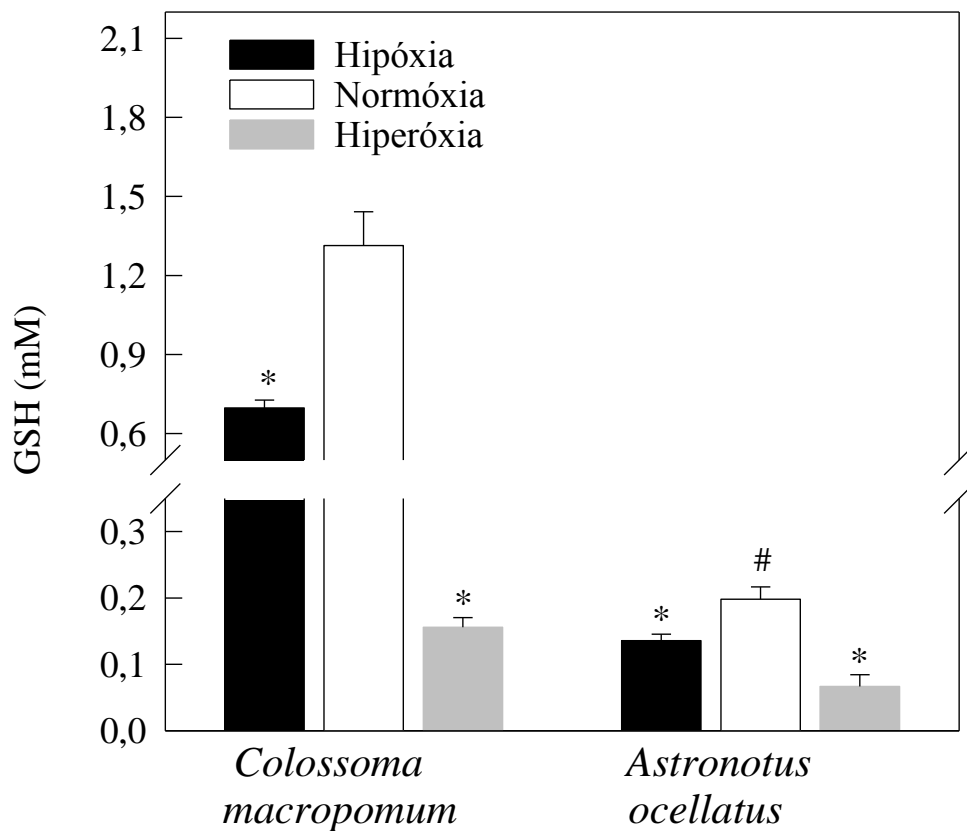


Figura 10. Conteúdo de glutatona reduzida (GSH) presente no sangue dos indivíduos de *Collossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus* aclimatados nas situações de hipóxia, normóxia e hiperóxia. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) em relação à normóxia. (#) diferença estatisticamente significativa entre as duas espécies aclimatadas à normóxia.

Tabela 4. Concentração de glutathiona reduzida (GSH) e total (GT), proporção de glutathiona oxidada (GSSG), concentração de hemoglobina sanguínea e razão molar entre a glutathiona reduzida intraeritrocitária e a hemoglobina (GSH/Hb) no sangue de *Colossoma macropomum* aclimatado à hipóxia, normóxia e hiperóxia. Valores expressos como média \pm SEM. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$) em relação à normóxia.

Condição (n)	GSH (mM)	GT (mM)	GSSG (%)	Hb (mM)	GSH/Hb ----
Hipóxia (10)	0,70 \pm 0,03*	0,85 \pm 0,10*	18,40	0,87 \pm 0,06	0,15
Normóxia (6)	1,32 \pm 0,13	1,55 \pm 0,20	14,60	0,75 \pm 0,08	0,34
Hiperóxia (10)	0,16 \pm 0,02*	0,64 \pm 0,10*	75,70	1,09 \pm 0,07*	0,03

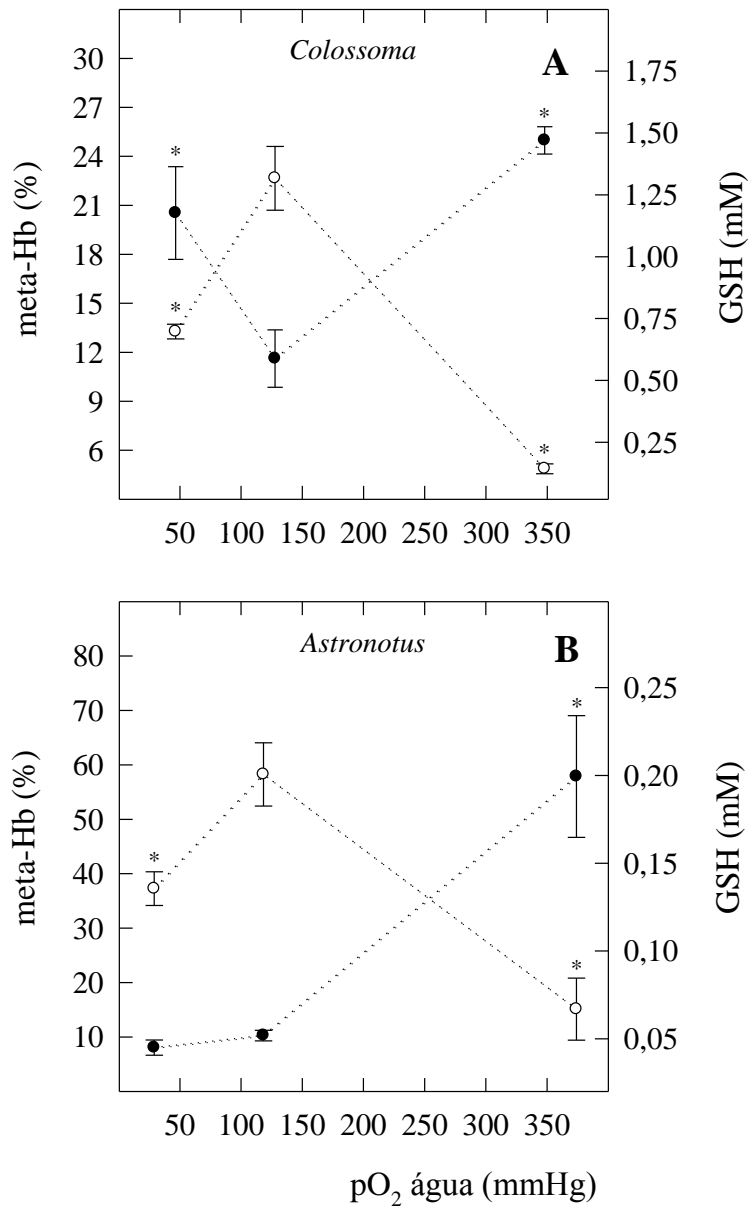


Figura 11. Relação entre os níveis de metahemoglobina (meta-Hb, ●---●) e glutathiona reduzida (GSH, ○---○) observados no sangue de *Colossoma macropomum* (A) e *Astronotus ocellatus* (B) aclimatados nas diferentes tensões de O₂ aplicadas. (*) indica diferença estatisticamente significativa (P<0,001) em relação à normóxia.

A concentração da glutatona total foi avaliada somente nos experimentos realizados com *C. macropomum*. Uma diminuição significativa ($P<0,001$) das concentrações da glutatona total foi observada nas duas condições estressantes, quando comparadas à situação controle. Calculando-se a proporção de glutatona oxidada (GSSG), a partir dos conteúdos de glutatona total e GSH, verificou-se uma drástica elevação dos níveis de GSSG nos animais aclimatados à hiperóxia. A proporção de GSSG aumentou de 15% em normóxia, para 76% em hiperóxia (Tabela 4). Por outro lado, em hipóxia, apesar da diminuição significativa da concentração total da glutatona, a proporção da GSSG manteve-se em valores próximos (18%) aos verificados na condição normóxia (Tabela 4).

A avaliação paralela dos níveis dos fosfatos orgânicos intraeritrocitários, particularmente do ATP, presentes no sangue dos mesmos animais experimentais empregados no presente estudo (Marcon & Val, 1996), revelou associações com as concentrações da GSH sanguínea (Figura 12). Nos exemplares de *C. macropomum*, os níveis de ATP foram progressivamente diminuídos na aclimação dos mesmos às condições de hipóxia e hiperóxia, revelando uma correlação positiva ($r=0,91$; $P<0,001$) com as concentrações de GSH (Figura 12A). Correlação semelhante ($r=0,88$; $P=0,017$) foi também observada nos representantes de *A. ocellatus* aclimatados apenas em hiperóxia (Figura 12B), indicando a mesma tendência mostrada pela espécie anterior.

6. Peroxidação lipídica (TBARS)

Os níveis endógenos de TBARS avaliados no fígado e no sangue das duas espécies analisadas estão mostrados na Figura 13. No fígado de *C. macropomum* houve um aumento significativo ($P<0,05$) no processo de peroxidação lipídica apenas nos animais aclimatados à hiperóxia, mantendo-se inalterado nos animais expostos à hipóxia. No sangue, os aumentos foram significativos em ambas as situações ($P<0,05$). Na espécie *A. ocellatus* não foi

constatada qualquer modificação nos níveis de peroxidação lipídica em nenhuma das situações experimentais, tanto em fígado como em sangue (Figuras 13A e 13B).

Um aspecto interessante observado nas duas espécies analisadas foi a relação existente entre os níveis endógenos de peroxidação lipídica e o conteúdo de SOD presentes no sangue. Nos exemplares de *C. macropomum* a correlação entre estes parâmetros foi significativa ($r=0,81$; $P=0,005$) apenas nos espécimens expostos à normóxia (Figura 14A). Em *A. ocellatus*, apesar desta correlação não ser evidente na situação controle, ela foi observada na situação de hipóxia ($r=0,86$; $P=0,003$) (Figura 14B).

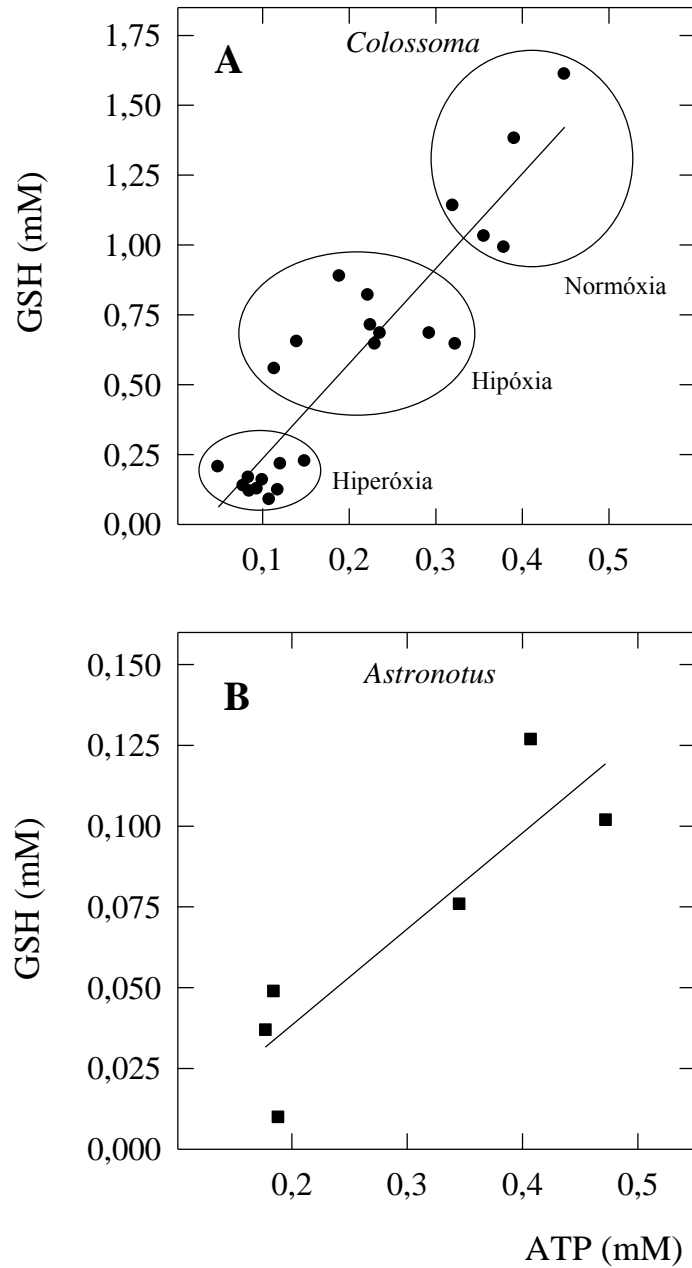


Figura 12. Correlações observadas entre as concentrações de adenosina 5^ª- trifosfato (ATP) e os conteúdos de glutationa reduzida (GSH) presentes nos eritrócitos de *Colossoma macropomum* (A) aclimatado às condições de normóxia, hipóxia e hiperóxia ($r=0,91$) e de *Astronotus ocellatus* (B) aclimatado apenas à hiperóxia ($r=0,88$).

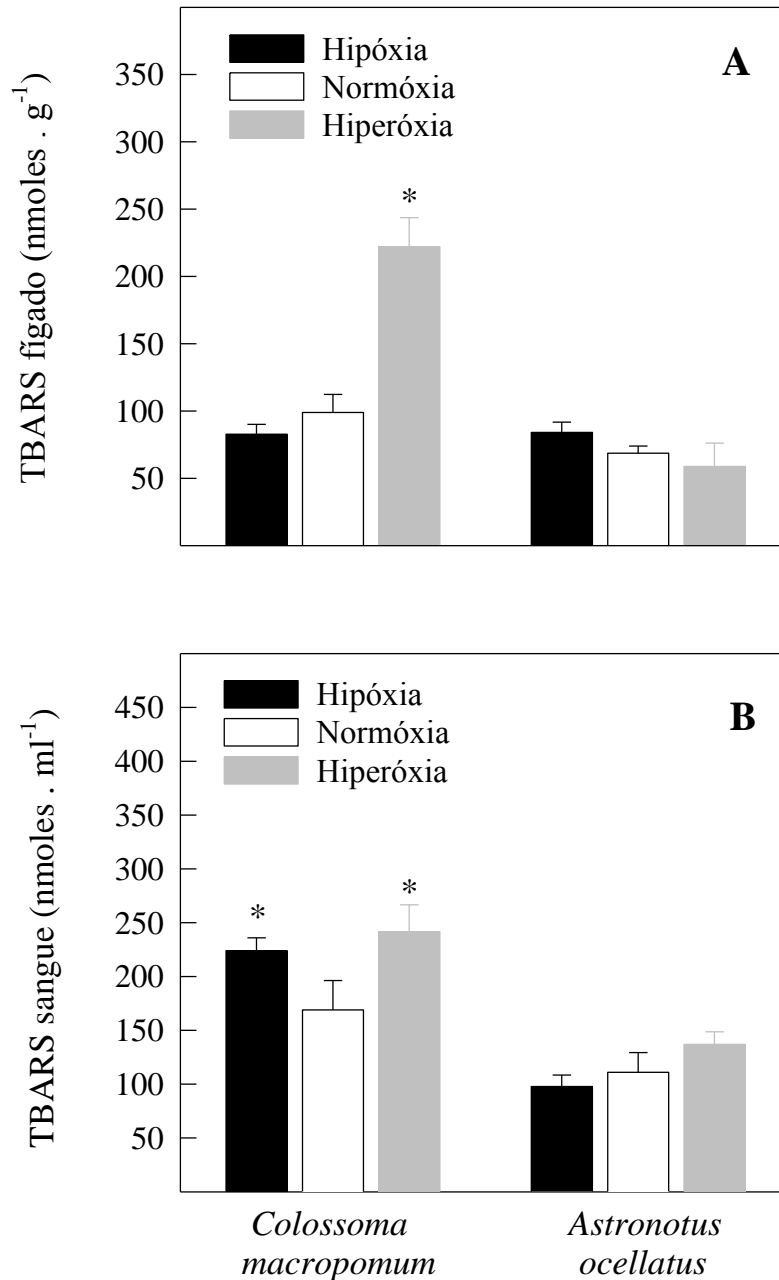


Figura 13. Níveis endógenos de peroxidação lipídica (TBARS) avaliados no fígado (A) e no sangue (B) de *Collossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus* aclimatados à hipóxia, normóxia e hiperóxia. (*) indica diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação à normóxia.

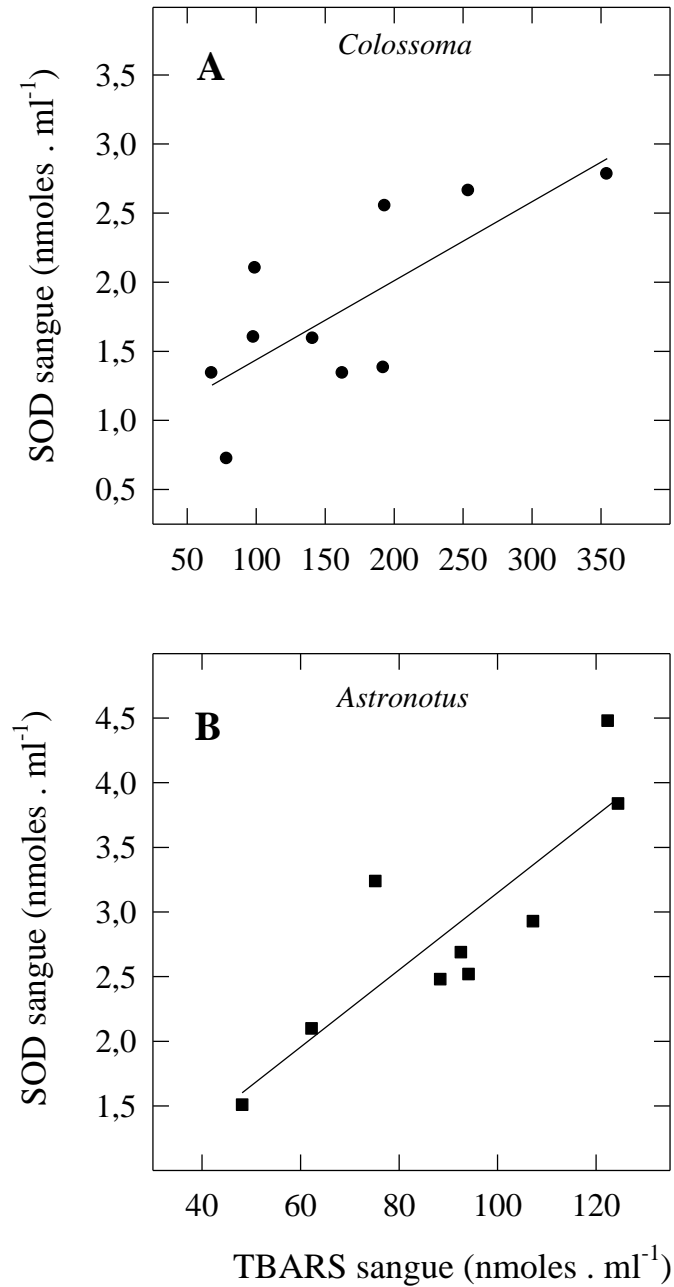


Figura 14. Correlações entre os níveis endógenos de peroxidação lipídica (TBARS) e a concentração da enzima superóxido dismutase (SOD) observada no sangue de *Colossoma macropomum* aclimatado à normóxia ($r=0,81$, A) e de *Astronotus ocellatus* exposto à hipóxia ($r=0,86$, B).

DISCUSSÃO

1. Parâmetros hematológicos

1.1. Hematócrito e concentração de hemoglobina

O tecido sanguíneo tem se mostrado um excelente modelo para estudos relacionados com a avaliação do estado de saúde de animais sujeitos a diversas situações estressantes, como temperatura (Murad *et al.*, 1990; Moura *et al.*, 1994), ação de poluentes e agentes tóxicos (Nikinmaa, 1992; Bainy *et al.*, 1996) e variações na disponibilidade de oxigênio ambiental (Weber & Lykkeboe, 1978; Scott & Rogers, 1981; Val, 1995; Val & Almeida-Val, 1995). Para os organismos aquáticos, a variação na pO_2 ambiental é um fator determinante na alteração das propriedades do sangue, entre elas o hematócrito e a concentração de hemoglobina (Saint-Paul, 1984b; Monteiro *et al.*, 1987; Murad *et al.*, 1990; Nikinmaa, 1990; Val *et al.*, 1985; 1990; 1992).

Os valores do hematócrito e da concentração de hemoglobina obtidos em normóxia para as duas espécies estiveram dentro do intervalo descrito para peixes em geral (Perez *et al.*, 1986; Salvo-Souza, 1990; Wilhelm Filho *et al.*, 1992a; Folmar, 1993). Para os exemplares de tambaqui, estes valores ficaram próximos aos avaliados anteriormente por Moura (1994) e Costa (1995) em animais cultivados da mesma espécie. Em *A. ocellatus*, os valores observados para estes parâmetros não diferiram daqueles registrados por Pitombeira (1972) para animais saudáveis e mantidos em cativeiro. Nas duas espécies estudadas os valores de hematócrito e da concentração de hemoglobina obtidos remetem as mesmas a uma categoria de peixes de baixa atividade metabólica (Perez *et al.*, 1986; Wilhelm Filho *et al.*, 1992a) que, de fato, reflete as características ecofisiológicas das duas espécies .

Alterações hematológicas em peixes submetidos à hiperóxia são pouco conhecidas. Jewett *et al.* (1991) observaram diminuições significativas do hematócrito e da concentração

de hemoglobina em exemplares de *Oncorhynchus mykiss* mantidos em condições hiperóxicas durante 9 semanas. Os autores atribuíram esta variação aos processos hematopoéticos envolvendo o sequestro e armazenamento de parte das células vermelhas circulantes no baço destes animais, em função do excesso de oxigênio existente no meio. A diminuição do conteúdo de hemoglobina observada em *A. ocellatus* coincide com aqueles resultados, pois eritrócitos que apresentam alterações em suas propriedades da membrana e níveis elevados de hemoglobina oxidada são mais facilmente sequestrados pela microcirculação do respectivo órgão hematopoético (Kellog & Fridovich, 1977; Weiss, 1980). Nesta condição, *A. ocellatus* apresentou altos níveis de metahemoglobina em seu sangue, com alguns exemplares revelando valores acima de 80%. É provável que parte dos eritrócitos providos de elevadas proporções de metahemoglobina tenha sido sequestrada pelo órgão hematopoético, sendo substituída por células jovens, cuja síntese de hemoglobina estaria sendo diminuída em função da demasiada oferta de oxigênio na água, resultando, dessa forma, em um decréscimo no conteúdo total da hemoglobina sanguínea, sem uma diminuição paralela do hematócrito.

Para *C. macropomum* aclimatado em hiperóxia, a elevação do conteúdo de hemoglobina, bem como do hematócrito, poderia ser uma forma de compensar as deficiências no processo de trocas gasosas (desacoplamento entre a tomada de O₂ e a eliminação do CO₂) no epitélio branquial, ocasionadas por uma provável situação de acidose respiratória. Apesar deste aspecto não ter sido avaliado no presente estudo, é conhecido em diversas espécies de peixes que a exposição à hiperóxia resulta em uma situação de acidose respiratória (Wood & Jackson, 1980; Wilker *et al.*, 1981; Wood, 1991), cuja causa primária parece consistir na diminuição progressiva da frequência ventilatória (Dejours, *et al.*, 1977; Bridges *et al.*, 1984; Berschick *et al.*, 1987; Bridges, 1993), em função do excesso de oxigênio existente no meio. No ambiente amazônico, situações de hiperóxia são também frequentes. Especialmente durante os ciclos diários (nos intervalos de maior incidência luminosa) os organismos aquáticos, incluindo diversas espécies de peixes e, entre estas, o tambaqui e o acará-açu, podem estar sujeitos a situações de supersaturação de O₂ nos lagos

de várzea e igapós. Situações de supersaturação de O₂ já foram evidenciadas na região em diversas épocas do ano (Schmidt, 1973; Collart-Odinetz & Moreira, 1987; Hamilton & Lewis, 1987; Rodrigues, 1994; Darwich & Robertson, dados não publicados), onde a saturação de O₂ atingiu níveis de até 250%, como resultado da atividade fotossintética fitoplanctônica.

Além disso, os peixes possuem outros mecanismos adaptativos importantes na manutenção da homeostase nos processos de tomada e de liberação do oxigênio para os tecidos (Wilhelm Filho *et al.*, 1992a; Val, 1993; Val & Almeida-Val, 1995; Val *et al.*, 1984; 1994; 1995; Weber, 1996). No caso de *C. macropomum* submetido à hiperóxia, uma avaliação paralela da concentração dos fosfatos orgânicos intraeritrocitrários presentes no sangue destes animais revelou uma diminuição significativa da quantidade dos nucleotídeos trifosfatados (ATP e GTP), bem como da relação destes compostos com a concentração de hemoglobina circulante (razão NTP/Hb) (Marcon & Val, 1996). Como moduladores alostéricos negativos, diminuições na concentração destes compostos no interior do eritrócito podem favorecer o aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Perutz, 1970), reforçando a idéia da necessidade de um aumento da capacidade de transporte de oxigênio do sangue nesta condição.

Por outro lado, o aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio na região dos tecidos poderia limitar a liberação do oxigênio nestes locais, constituindo-se num mecanismo secundário de proteção das células contra a formação de espécies ativas do oxigênio durante o estabelecimento de uma situação hiperóxica. Contudo, estudos complementares envolvendo o efeito temporal poderão esclarecer se a redução dos fosfatos intraeritrocitrários em situações de hiperóxia ambiental constitui-se numa resposta fisiológica adaptativa, ou se a mesma é decorrente de uma redução na síntese dos mesmos em função do tempo de aclimatação aqui empregado.

As inferências mencionadas acima parecem adequar-se à espécie *C. macropomum* e contrastam com os resultados observados em *A. ocellatus*. As distintas respostas fisiológicas manifestadas por ambas as espécies vem coadunar-se aos diferentes estilos de vida que estas

espécies apresentam para enfrentarem situações adversas com relação à disponibilidade de oxigênio em seus respectivos habitats.

No caso de espécies de peixes expostas à hipóxia, normalmente se observa um aumento do hematócrito e da concentração de hemoglobina, no sentido de manter a capacidade de transporte do sangue em função do déficit de oxigênio existente no meio (Soivio *et al.*, 1980; Val *et al.*, 1986; 1990; Val, 1993; Jensen *et al.*, 1993). Estudos realizados em diversas espécies de peixes amazônicos têm demonstrado que o hematócrito e a concentração de hemoglobina tendem a se elevar à medida que a disponibilidade do oxigênio diminui em seu ambiente natural, mesmo em espécies dotadas de respiração aérea facultativa (Saint-Paul, 1984b; Monteiro *et al.*, 1987; Val & Almeida-Val, 1995).

No presente estudo nenhuma alteração significativa desses parâmetros foi constatada nas duas espécies aclimatadas à hipóxia, quando comparadas com seus respectivos grupos controles. Como o sangue apresenta respostas imediatas relativamente às oscilações da oferta de oxigênio (Murad *et al.*, 1990; Val *et al.*, 1992), uma das causas da ausência de variação poderia residir no tempo relativamente longo de exposição (15 dias) em que estes animais estiveram submetidos à hipóxia. É provável que estes parâmetros tenham sido alterados nas primeiras horas e dias do período experimental e, posteriormente, retornado compensatoriamente aos valores normais. Esse tipo de resposta foi também observado em *Carassius auratus* exposto à hipóxia, onde as alterações no hematócrito e na concentração de hemoglobina foram evidentes apenas nas primeiras horas do período experimental (8 dias), retornando posteriormente aos valores iniciais (Murad *et al.*, 1990). A exposição à hipóxia por períodos relativamente longos também pode resultar em uma ativação do processo de formação de células jovens em peixes (Härdig *et al.*, 1978). Contudo, esta estratégia não foi observada em nenhuma das espécies estudadas como forma de incrementar a capacidade de transporte de oxigênio no sangue, já que os parâmetros hematológicos permaneceram inalterados nesta condição.

Além disso, o transporte de oxigênio poderia estar sendo ajustado ao nível dos eritrócitos. A intensidade moderada de hipóxia na qual os exemplares de *C. macropomum*

foram aclimatados (Corrêa & Rantin, 1994) poderia ser compensada através da modulação da afinidade das hemoglobinas pelo oxigênio. A presença de menores concentrações de fosfatos orgânicos intraeritrocitários e do decréscimo na razão NTP/Hb nos animais aclimatados à hipóxia, quando comparados com aqueles do grupo controle (Marcon & Val, 1996), sugere um incremento na capacidade de captação do oxigênio na região do epitélio branquial que poderia resultar em um aumento da capacidade de transporte deste gás no sangue, de maneira análoga ao observado nos exemplares de *C. macropomum* expostos à hiperóxia. Estes resultados vem confirmar uma tendência comum em diversas espécies de peixes, onde os níveis dos fosfatos orgânicos intraeritrocitários são diminuídos adaptativamente em situações de baixa disponibilidade de oxigênio no ambiente (Weber & Lykkeboe, 1978; revisto por Weber & Jensen, 1988 e Jensen *et al.*, 1993; Val *et al.*, 1995). Ademais, os fosfatos orgânicos intraeritrocitários tem revelado uma vinculação com as variações sazonais (Andersen *et al.*, 1985; Wilhelm Filho *et al.*, em preparação) e diárias (Val *et al.*, 1992) da disponibilidade do oxigênio no ambiente aquático.

Outro aspecto importante a ser considerado consiste na diminuição do metabolismo energético destes animais quando aclimatados em condições hipóxicas. A redução de 47% verificada no consumo de oxigênio do fígado de *C. macropomum* poderia refletir uma diminuição geral do metabolismo, atenuando, desta forma, os requerimentos de oxigênio para a manutenção das funções vitais, sem a necessidade de um aumento nos parâmetros hematológicos. Em determinadas situações, o aumento destes parâmetros (hematócrito e/ou concentração de hemoglobina) não seria uma estratégia eficiente no sentido de compensar o déficit de oxigênio do meio, em função do aumento da viscosidade do sangue, que resultaria no aumento do trabalho cardíaco e, conseqüentemente, num elevado custo energético. Este aspecto torna-se relevante no caso dos peixes amazônicos, os quais habitam águas tipicamente hipóxicas e com elevadas temperaturas (25-42°C).

No caso de *A. ocellatus*, nem mesmo a utilização de uma situação de hipóxia mais profunda (29 mmHg) resultou em respostas compensatórias do hematócrito e da concentração de hemoglobina. Ao contrário do tambaqui, o acará-açu não revelou diferenças

no conteúdo de ATP e GTP e na razão NTP/Hb, mas diminuiu seu metabolismo em cerca de 23%, demonstrando, nesse último aspecto, um comportamento semelhante ao observado em *C. macropomum*. As respostas compensatórias adotadas por *A. ocellatus* provavelmente incluem outras que não os ajustes do hematócrito e da concentração de hemoglobina e a regulação intraeritrocitária da afinidade das hemoglobinas com o oxigênio pela ação dos fosfatos orgânicos. Os resultados obtidos para as duas espécies analisadas contrastam com aqueles registrados por Soivio *et al.* (1980), que demonstraram um aumento da concentração de hemoglobina em exemplares de *O. mykiss* expostos à hipóxia por 12 dias consecutivos. A regulação da concentração de hemoglobina em resposta à hipóxia é variada entre as diversas espécies de peixes, sendo importante em espécies ativas como a truta e a enguia e praticamente insignificante em espécies pouco ativas, como a carpa e o linguado (Weber & Jensen, 1988). Provavelmente a estratégia de espécies de baixa atividade, como as aqui estudadas e a carpa, seja oposta àquela utilizada por espécies ativas, como a truta.

1.2. Metahemoglobina

Os níveis de metahemoglobina observados nas duas espécies analisadas estão dentro do intervalo registrado na literatura para outras espécies de peixes. De modo geral, estes níveis são consideravelmente elevados, quando comparados com os mamíferos. Enquanto neste último grupo os valores de meta-Hb raramente excedem 1-2% (Board *et al.*, 1977; Halliwell & Gutteridge, 1989), nos peixes têm se observado uma ampla variação interespecífica (Graham & Fletcher, 1986; Wilhelm Filho & Marcon, 1996) com conteúdos de meta-Hb variando de 3 a 27%, tanto em espécies marinhas como naquelas de água doce (Cameron, 1971; Graham & Fletcher, 1986; Bartlett *et al.*, 1987; Brauner *et al.*, 1993; Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Níveis igualmente elevados foram também documentados nos eritrócitos nucleados de alguns representantes reptilianos (Board *et al.*, 1977).

A dependência dos níveis de oxigênio no processo de autooxidação espontânea da hemoglobina e da mioglobina são bastante conhecidos. Durante a autooxidação destas hemoproteínas ocorre a conversão da forma fisiologicamente funcional para a forma oxidada (meta-Hb e metamioglobina) e a concomitante formação do radical superóxido. Esse fenômeno pode ocorrer em condições fisiológicas normais (Sato & Shikama, 1981; Levy *et al.*, 1988; Halliwell & Gutteridge, 1989), podendo ser intensificado em situações de hipóxia (Wallace, *et al.*, 1982; Rifkind *et al.*, 1991; 1993), bem como de hiperóxia (Jones, 1985; este estudo). A constatação de uma correlação positiva entre o conteúdo de hemoglobina e os níveis endógenos de TBARS pode ser um indicativo de que a oxidação destas hemoproteínas tem uma importante contribuição na produção de espécies ativas do oxigênio no eritrócito. Giulivi *et al.* (1993) calcularam a produção de H_2O_2 ($3,9 \pm 0,6$ nmoles/h/gHb), bem como a taxa de formação de meta-Hb ($3,45 \mu M/h$) em eritrócitos intactos de boi e constataram que a principal fonte de H_2O_2 provém da autooxidação da Hb e da consequente formação e dismutação do radical superóxido. Para peixes submetidos à hiperóxia, a taxa de oxidação da hemoglobina poderia ser também aumentada pela elevação da pO_2 arterial e venosa (Bridges *et al.*, 1984). Cerca de 3% da hemoglobina presente em eritrócitos humanos são espontaneamente oxidados todos os dias, fazendo com que estas células fiquem expostas a um fluxo contínuo de O_2^- (Halliwell & Gutteridge, 1989). As elevadas concentrações de meta-Hb verificadas nos peixes, quando comparadas com os vertebrados superiores, poderiam ser decorrentes das grandes flutuações ambientais que estes organismos enfrentam em relação à oferta de oxigênio. A grande variedade de hemoglobinas múltiplas e com distintas propriedades funcionais encontrada entre os peixes tem sido interpretada, a despeito da polêmica que envolve o tema, como um mecanismo adaptativo destas hemoproteínas em relação aos distintos e variados ambientes habitados por estes organismos (Val *et al.*, 1987; Di Prisco & Tamburrini, 1992). Um aspecto importante, provavelmente ligado aos argumentos levantados acima, é o fato de que as hemoglobinas de peixes são mais susceptíveis aos processos de oxidação do que as hemoglobinas de mamíferos (Wilson & Knowles, 1987; Alayash *et al.*, 1993), provavelmente, em função da presença de uma baixa cooperatividade e, conseqüentemente, mais instáveis. Além disso, a taxa de oxidação

demonstrou ser sensível à temperatura em espécies de peixes ecologicamente distintas (Wilson & Knowles, 1987) e mais intensa em hemoglobinas com baixa afinidade pelo oxigênio (Alayash *et al.*, 1993). Estes aspectos poderiam contribuir para a elevação do conteúdo de meta-Hb observada nas duas espécies aclimatadas à hiperóxia e em *C. macropomum* submetido à hipóxia.

Por outro lado, as diferenças observadas no conteúdo de meta-Hb nas duas espécies aclimatadas à hiperóxia poderiam ser resultantes de distintas propriedades estruturais das moléculas de hemoglobina destes animais, ou ainda, de uma eficiência diferenciada do sistema enzimático responsável pela redução da meta-Hb para a forma funcional no interior dos eritrócitos, realizada através da metahemoglobina redutase (Agar & Harley, 1972; Board *et al.*, 1977; Bethlenfalvay *et al.*, 1982; Huey & Beitinger, 1982; Freeman *et al.*, 1983).

A dependência quase linear da formação do radical superóxido em relação à disponibilidade do oxigênio no meio (Boveris *et al.*, 1977; Chance *et al.*, 1979) levou muitos autores a inferir que a produção deste e outros intermediários da redução do oxigênio fosse diminuída em situações de hipóxia. Entretanto, evidências obtidas em diversos tecidos expostos à hipóxia parecem indicar que a geração de espécies ativas do oxigênio pode ser facilitada nesta condição, seja através de um aumento da capacidade redutora da célula, intensificada por diversas reações envolvidas no ciclo redox (Jones, 1985), seja pela estimulação da produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Yoshikawa *et al.*, 1982). Um aumento na formação de O_2^- durante a hipóxia foi também sugerido pelos estudos de Kramer & Pearlstein (1983), que observaram um desacoplamento entre a produção de ATP e o consumo do oxigênio mitocondrial, provavelmente resultante de um incremento do fluxo de elétrons do sistema citocrômico bc_1 diretamente para o oxigênio molecular. Além disso, a molécula de hemoglobina tem seu processo de autooxidação acelerado em situações de baixa tensão de oxigênio, resultando na formação de meta-Hb e na liberação do radical superóxido (Wallace *et al.*, 1982; Rifkind *et al.*, 1991; 1993). Esse fenômeno poderia explicar o aumento significativo no conteúdo de meta-Hb observado nos eritrócitos de *C. macropomum* aclimatado à hipóxia. O estabelecimento de uma situação de

estresse hipóxico nos eritrócitos de algumas espécies de peixes amazônicos poderia ocorrer em função da baixa disponibilidade do oxigênio ambiental, comumente observada nas águas da região (Kramer *et al.*, 1978; Fink & Fink, 1979; Val & Almeida-Val, 1995).

Por outro lado, a não-formação de meta-Hb observada no sangue dos exemplares de *A. ocellatus* submetidos à baixas tensões de O₂, poderia ser atribuída às características ecofisiológicas distintas desta espécie, a qual apresenta uma elevada resistência à hipóxia (Sawaya, 1946; Soares, 1993), e até à anóxia (Soares, 1993). Os ciclídeos, como grupo, destacam-se pela elevada resistência à hipóxia (Verheyen *et al.*, 1994). Entre os diversos exemplos podem ser mencionadas as hemoglobinas intrinsecamente dotadas de uma alta afinidade pelo oxigênio (Wilhelm Filho & Weber, 1983), os ajustes bioquímicos finos na regulação gênica para enfrentar períodos prolongados de hipóxia de *Cichlasoma amazonarum* (Almeida-Val *et al.*, 1995), e o sangue totalmente destituído de hemoglobina de uma espécie da América Central (*Cichlasoma cyanogutatum*; Lowe-McCownell, 1975). Estudos recentes realizados em nosso laboratório estariam confirmando a elevada capacidade anaeróbica de *A. ocellatus* (dados não mostrados).

2. Consumo tecidual de oxigênio

Os níveis de consumo de oxigênio verificados no fígado das duas espécies analisadas foram muito próximos ao intervalo registrado em diferentes tecidos de algumas espécies de peixes marinhos (0,1-0,4 μmoles/min/g tecido; Wilhelm Filho, 1994), bem como no fígado de uma espécie de teleósteo de água doce (Vijayalakshmi, 1980). Valores semelhantes foram também encontrados no fígado de *Astronotus crassipinis* aclimatados às condições de normóxia e hiperóxia (J.L. Marcon, dados não mostrados). Comparativamente à *A. ocellatus*, a última espécie revelou um comportamento distinto, apresentando uma taxa de consumo superior em normóxia e, apesar de não significativa, uma tendência de aumento do consumo no fígado dos animais aclimatados à hiperóxia. As diferenças observadas entre as

duas espécies, somado ao fato de que espécies ecologicamente distintas, como *C. macropomum* e *A. ocellatus*, compartilham a mesma tendência de redução do metabolismo de oxigênio do fígado nas situações de hipóxia e hiperóxia, sugerem que as respostas fisiológicas manifestadas por estas espécies envolvam características espécie-específicas.

O consumo de oxigênio tecidual observado nas espécies de peixes aqui estudadas foi cerca de 5 a 10 vezes mais baixos que os encontrados em mamíferos e compatíveis com as diferenças básicas conhecidas entre as taxas metabólicas de espécies endotermas e pecilotermas (Benett, 1978).

A constatação de uma diminuição na atividade metabólica tecidual do fígado durante a aclimatação à hipóxia e, especialmente à hiperóxia, foi um aspecto interessante, pois demonstrou que, tanto o tambaqui como o acará-açu, utilizaram-se de mecanismos fisiológicos semelhantes para responderem às distintas situações de oxigenação que envolvem as duas condições experimentais. Na condição hipóxica, a diminuição na taxa de consumo do oxigênio pode ser uma resposta fisiológica vantajosa, pois atenua a relação demanda/oferta do oxigênio nos tecidos, sendo uma característica comumente adotada por diversas espécies de peixes (Bennett, 1978). Esta resposta, por outro lado, pode ser igualmente vantajosa em hiperóxia. A diminuição na tomada de oxigênio nesta condição poderia consistir em um importante fator para a manutenção da homeostase interna, permitindo que o animal ajuste a demanda de oxigênio em níveis similares aos verificados em uma condição normóxica, mesmo quando a quantidade de oxigênio no meio encontra-se em concentrações acima dos níveis de saturação. Este aspecto poderia explicar, em parte, o fato do consumo de oxigênio organismal não ser alterado substancialmente em algumas espécies de peixes marinhos, quando aclimatados experimentalmente à hiperóxia (Dejours, *et al.*, 1977; Berschick *et al.*, 1987) e em peixes intertidais investigados em seu ambiente natural (revisto por Bridges, 1993).

O fato de que não se registraram aumentos do hematócrito e da concentração de hemoglobina durante a aclimatação à hipóxia nas duas espécies estudadas vem confirmar os

resultados relativos ao consumo tecidual de oxigênio, adequando aparentemente ambas as respostas frente às variações da pO_2 ambiental.

3. Proteções Antioxidantes

3.1. Superóxido dismutase

Na aclimação à normóxia, o tambaqui e o acará-açu revelaram concentrações da SOD no sangue ($1,81 \pm 0,22$ e $3,05 \pm 0,37$ nmoles/ml, respectivamente) e no fígado ($2,46 \pm 0,33$ e $3,83 \pm 0,38$ nmoles/g, respectivamente) semelhantes às verificadas em outras espécies de peixes amazônicos recentemente analisados (Wilhelm Filho & Marcon, 1996), mas cerca de 4 vezes inferiores ao observado em peixes marinhos (Wilhelm Filho *et al.*, 1993) e de 2 vezes em relação a alguns representantes de peixes cartilagosos (Wilhelm Filho & Boveris, 1993). Estas diferenças encontradas entre os peixes amazônicos e os teleósteos marinhos refletem uma íntima relação com as características físico-químicas dos distintos ecossistemas (Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Nas águas interiores, notadamente as águas ácidas da bacia Amazônica (Furch *et al.*, 1982; Sioli, 1984), a formação do H_2O_2 pode ser facilitada em função dos baixos pH, que oscilam em torno do pKa (4,8) da reação de segunda ordem responsável pela formação do H_2O_2 (Allen & Bielski, 1982) e, ainda, por processos fotoquímicos, onde os níveis de H_2O_2 podem atingir concentrações de μM (Cooper & Zika, 1983). No ambiente marinho, por outro lado, a produção do radical superóxido é favorecida em função da alcalinidade das águas oceânicas, resultando no estabelecimento de concentrações mais elevadas deste radical em relação ao H_2O_2 (Petasne & Zika, 1987; Zafiriou, 1987).

A espécie *A. ocellatus*, por suas características ecológicas peculiares, apresenta uma atividade metabólica relativamente menor do que *C. macropomum*. Entretanto, durante a aclimação à normóxia, as concentrações da SOD verificadas nos dois tecidos examinados

do acará-açu foram superiores aos níveis desta enzima observados nos mesmos tecidos de *C. macropomum*. Esse aspecto reforça a idéia de que, pelo menos para o caso das espécies amazônicas, a atividade metabólica aparentemente não é o principal fator determinante no estabelecimento das concentrações da SOD nos seus respectivos tecidos (Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Como mencionado acima, neste último grupo, a avaliação das concentrações da SOD em espécies ecologicamente distintas parece indicar que os níveis enzimáticos da SOD estão mais relacionados às características físico-químicas do ambiente que os peixes ocupam, do que aos seus respectivos níveis de atividade (Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Esta hipótese parece adequar-se também às duas espécies estudadas no presente trabalho, bem como a alguns representantes de anfíbios experimentalmente submetidos à hiperóxia, onde as respostas manifestadas pela SOD não se correlacionaram com os níveis de atividade das duas espécies estudadas (Barja de Quiroga & Gutierrez, 1984).

Por outro lado, em organismos filogeneticamente distintos, observou-se um paralelismo entre as concentrações da SOD e a atividade metabólica (Barthelemy *et al.*, 1981; Cutler, 1984; Shick & Dykens, 1985), onde animais detentores de maiores taxas metabólicas parecem ser mais susceptíveis à toxicidade do oxigênio, exibindo, concomitantemente, concentrações mais elevadas da enzima. Esta mesma tendência foi também observada em diversas espécies de peixes teleósteos marinhos (Wilhelm Filho *et al.*, 1993) e elasmobrânquios (Wilhelm Filho & Boveris, 1993).

Estes resultados servem para mostrar a necessária cautela quanto a generalizações em termos de inferências realizadas neste sentido, pois as respostas de organismos de diferentes hábitos e habitats, como as comparações entre organismos endotermos e pecilotermos, podem ser muito distintas quanto à sua natureza.

Os acentuados acréscimos observados nas concentrações da SOD no fígado e no sangue dos exemplares de *C. macropomum* submetidos à hiperóxia, vem confirmar uma tendência generalizada desta enzima em aumentar suas concentrações nesta situação particular de estresse oxidativo. A indução da enzima promovida em hiperóxia pode ser interpretada como uma resposta adaptativa da SOD, no sentido de compensar o aumento da

produção do radical superóxido nos seus sítios de formação. Resultados semelhantes foram obtidos por Radi *et al.* (1988), na qual também foram observados aumentos significativos na atividade da SOD no fígado de *Cyprinus carpio* submetido à hiperóxia por 17 horas consecutivas, os quais foram acompanhados por alterações na composição lipídica das membranas e elevações no processo de peroxidação lipídica (aumento dos níveis de TBARS). Nesse sentido, a SOD poderia ter um papel compensatório na proteção das células deste tecido durante a aclimação à hiperóxia. Esta resposta adaptativa foi também verificada em duas espécies de anfíbios (Barja de Quiroga & Gutierrez, 1984), e igualmente em diversos organismos invertebrados marinhos relacionados simbioticamente com algas, onde a atividade da SOD foi linearmente influenciada pelo potencial fotossintético de produção do oxigênio (Dykens & Shick, 1984; Shick & Dykens, 1985).

Dessa forma, a avaliação da capacidade de produção de espécies ativas do oxigênio em situações de hiperóxia sugere que concentrações excessivas de oxigênio no nível tissular aumentam consideravelmente a velocidade de formação destes intermediários reativos no ambiente celular. Aumentos na produção de espécies ativas do oxigênio, particularmente do H_2O_2 e do O_2^- , em situações de hiperóxia foram observados *in vivo* em eritrócitos de ratos deficientes em vitamina E (Johnson *et al.*, 1972) e igualmente em diversos experimentos realizados *in vitro* com mitocôndrias isoladas e tecidos de diferentes órgãos de rato e de porco (Dryer *et al.*, 1980; Freeman & Crapo, 1981; Turrens *et al.*, 1982ab). Estes estudos demonstraram claramente que a exposição à hiperóxia em diferentes tecidos e células resulta em um aumento das concentrações basais das espécies ativas do oxigênio, estando de acordo com os resultados obtidos no tabaqui. A idéia da ocorrência de uma potencialização na produção dos intermediários reativos do oxigênio em animais aclimatados à hiperóxia pode ser confirmada através da razão entre os três componentes principais do sistema antioxidante enzimático. No fígado do tabaqui submetido à hiperóxia, a razão entre os conteúdos da SOD, que utiliza o O_2^- em suas reações, e da CAT mais os da GPx, que metabolizam o peróxido de hidrogênio ($SOD/CAT+GPx \cong 20$), foi elevada em cerca de 7 vezes relativamente à normóxia ($SOD/CAT+GPx \cong 3$), indicando que uma quantidade substancial

de H₂O₂ tenha sido formado no fígado desta espécie a partir da ação catalítica da SOD durante a aclimação à hiperóxia.

Por outro lado, os resultados obtidos para este tecido no acará-açu contrastaram com os observados no tambaqui. Ainda que este ciclídeo tenha sido submetido a uma situação mais severa de hiperóxia, nenhuma resposta compensatória foi manifestada por esta enzima, quando comparada com os animais controles. Além disso, a razão entre a produção de H₂O₂ e a metabolização deste composto, determinada no fígado dos animais hiperóxicos (SOD/CAT+GPx \cong 3,5), não variou em relação ao grupo controle (SOD/CAT+GPx \cong 3,4), em oposição ao verificado no tambaqui. Uma possibilidade seria a diminuição do metabolismo oxidativo tecidual observado nos animais aclimatados à hiperóxia. O decréscimo de 32% na atividade metabólica do fígado do acará-açu poderia atenuar o processo de formação das espécies ativas do oxigênio, sem a necessidade de um incremento na concentração da SOD. Além disso, a presença de uma concentração de SOD cerca de 1,5 vezes maior no acará-açu, do que a verificada em *C. macropomum* na condição normóxica, poderia conferir, *a priori*, uma maior proteção para o ciclídeo. O emprego da via anaeróbica, dispositivo comum em peixes (Livingstone, 1983; 1991) e especialmente em espécies tolerantes à hipóxia (Verheyen *et al.*, 1994), deve ter uma participação importante neste sentido. Desta forma, juntamente com a diminuição do metabolismo oxidativo e o aumento do nível enzimático, o organismo estaria abolindo consideravelmente a utilização do oxigênio, evitando a formação acentuada das espécies ativas do oxigênio. A manutenção dos parâmetros hematológicos de *A. ocellatus* em hiperóxia relativamente à normóxica, é outro indicativo de uma diminuição do consumo de oxigênio nestas condições. Observações comportamentais realizadas nestes animais ao longo da aclimação sugerem esta possibilidade, pois os peixes permaneciam inativos por longos períodos no fundo do tanque experimental. Comportamento semelhante foi também verificado em exemplares de *A. crassipinis* previamente aclimatados em hiperóxia, onde também não foi observada nenhuma alteração na concentração da SOD (J.L. Marcon, dados não mostrados). Apesar de alguns autores demonstrarem que a exposição à hiperóxia não altera o consumo de oxigênio

em algumas espécies de peixes marinhos, incluindo alguns habitantes de regiões intertidais (Dejours *et al.*, 1977; Wilkes *et al.*, 1981; Berschick *et al.*, 1987), nos peixes amazônicos parece ocorrer diminuições na atividade metabólica. As espécies de peixes amazônicos provavelmente não estão adaptadas a situações tão intensas de hiperóxia, como ocorre com as espécies marinhas intertidais, as quais enfrentam regularmente oscilações marcantes da pO_2 , desde níveis hipóxicos até situações de elevada hiperóxia durante um mesmo dia (revisto por Bridges, 1993).

A resposta de incremento (382%) da SOD verificada no sangue do tambaqui poderia ser análoga à verificada no fígado desta mesma espécie. Jones (1985) mencionou que diversas enzimas geradoras de O_2^- e H_2O_2 têm suas atividades aumentadas *in vivo* em condições hiperóxicas, e que, no caso do sangue, o processo de autoxidação da hemoglobina é intensamente aumentado, potencializando ainda mais a formação das espécies ativas do oxigênio neste tecido. A produção de meta-Hb foi elevada significativamente no sangue do tambaqui e do acará-açu submetidos à hiperóxia. Nesse caso a SOD estaria respondendo ao aumento da taxa de formação do radical superóxido originado durante a autoxidação da hemoglobina, bem como de outras reações oxidativas intracelulares, principalmente a respiração celular, favorecidas pelas elevadas pO_2 existentes nos vasos sanguíneos e exacerbadas em situações de hiperóxia. Novamente para *A. ocellatus* a resposta apresentada pela SOD foi oposta à observada em *C. macropomum*. A constatação de uma diminuição (55%) do conteúdo da SOD no sangue, independentemente do elevado grau de formação de meta-Hb verificado nesta condição, vem reforçar a idéia de uma diminuição geral do metabolismo oxidativo eventualmente associada a uma ativação anaeróbica, uma característica também observada em outro ciclídeo, *A. crassipinis* (J.L. Marcon, dados não mostrados). A contribuição da meta-Hb na formação do ânion superóxido poderia estar sendo atenuada pelos níveis mais elevados da SOD (1,7 vezes) apresentados por *A. ocellatus* em relação ao tambaqui. É interessante observar que as respostas enzimáticas da SOD e da CAT à hiperóxia obtidas para o fígado do tambaqui, diferiram das encontradas nos dois ciclídeos, sugerindo diferenças bioquímicas entre estes dois grupos.

A exposição à hipóxia resultou no estabelecimento de respostas diferenciadas nas duas espécies analisadas. O aumento da concentração da SOD observado no fígado do tambaqui durante a exposição à hipóxia poderia ser interpretado de duas maneiras: i) a SOD poderia ter sua síntese aumentada durante a aclimação à hipóxia, como forma de preparação a uma posterior reoxigenação, quando a concentração normal de oxigênio fosse novamente restituída. Este tipo de resposta foi encontrada principalmente em animais que possuem hábitos de estivação (Hermes-Lima & Storey, 1995), hibernação (Buzádzic *et al.*, 1990) e tolerância ao congelamento (Hermes-Lima & Storey, 1993), bem como em morcegos em estado de torpor (D. Wilhelm Filho, comunicação pessoal); ii) por outro lado, de forma semelhante ao observado em hiperóxia, a SOD poderia estar respondendo a um aumento na formação das espécies ativas do oxigênio. Determinadas situações de hipóxia podem promover um aumento nas concentrações das espécies ativas do oxigênio (Wallace *et al.*, 1982; Rifkind *et al.*, 1991;1993). A redução de 47% na atividade metabólica tecidual observada no fígado do tambaqui, associada à diminuição da pO_2 ambiental poderia resultar em um decréscimo da oferta de oxigênio para os tecidos. A diminuição na pO_2 tissular favorece o processo de redução univalente de espécies reativas, tanto na cadeia transportadora de elétrons, como em diversas reações redox catalizadas por enzimas (Jones, 1985; DeGroot & Littauer, 1989). Os resultados obtidos para o conteúdo da SOD no fígado de *C. macropomum* corroboraram os aumentos observados na atividade da SOD no mesmo tecido de exemplares de *Cyprinus carpio* submetidos à hipóxia (Vig & Nemcsok, 1989). Nesse sentido, a elevação da concentração da SOD no fígado do tambaqui parece estar mais relacionada a um incremento da produção do radical superóxido neste tecido. A razão entre os conteúdos da SOD e os das enzimas detoxificadoras do peróxido de hidrogênio ($SOD/CAT+GPx \cong 7$) revelou um valor cerca de 2,6 vezes superior ao observado na condição controle, indicando que o aumento da taxa de produção do $O_2^{\cdot-}$ pode ter sido suficiente para promover a indução na síntese da SOD, aumentando, desta forma, o conteúdo da enzima no fígado.

No caso do sangue, a intensidade apenas moderada de hipóxia aplicada aos exemplares de tambaqui (Corrêa & Rantin, 1994), somada à presença de concentrações relativamente elevadas de GSH, poderia ser responsável pela manutenção das concentrações da SOD próximo à condição de normóxia. Para *A. ocellatus*, a não alteração do conteúdo da SOD nos dois tecidos analisados em hipóxia seria, novamente, o reflexo das características ecológicas desta espécie, através de uma notável tolerância à hipóxia. A elevada tolerância à hipóxia apresentada por *A. ocellatus* é compartilhada pelo seu relativo *A. crassipinis*, e condizente com as similaridades observadas em relação às características dos respectivos hábitos e habitats em que estas espécies são encontradas no ambiente natural.

Apesar de existirem outras fontes subcelulares específicas de produção do H_2O_2 (Chance *et al.*, 1979; Freeman & Crapo, 1982), o aumento da concentração deste intermediário reativo nos animais aqui estudados deveu-se primordialmente ao papel catalítico da SOD. Esta explicação pode ser sustentada pela forte correlação observada entre a SOD e a CAT no fígado dos indivíduos de *C. macropomum* aclimatados à hiperóxia, no sangue dos exemplares de *A. ocellatus* expostos à hipóxia e à hiperóxia, bem como em *A. crassipinis* aclimatado à hiperóxia (dados não mostrados). O fato desta correlação ter sido observada em diferentes tecidos expostos a distintas tensões de oxigênio, viria confirmar a existência de uma interdependência funcional entre os dois sistemas enzimáticos, uma característica já verificada em mamíferos (Halliwell & Gutteridge, 1989; Cutler, 1984; Godin & Garnett, 1992ab) e em alguns representantes de peixes teleósteos ($r=0,67$; Wilhelm Filho *et al.*, 1993) e elasmobrânquios marinhos ($r=0,97$; Wilhelm Filho & Boveris, 1993). Este aspecto decorre da ação complementar que a CAT realiza no processo de detoxificação do H_2O_2 , originado principalmente a partir da dismutação do O_2^- (McCord & Fridovich, 1969). A associação funcional entre estes dois sistemas enzimáticos demonstra o potencial deletério que as espécies ativas do oxigênio representam para o ambiente celular e a importância do sistema de defesas antioxidantes nesse processo.

As correlações verificadas entre os conteúdos da SOD e o consumo tecidual de oxigênio no fígado de *C. macropomum* aclimatado à normóxia e no fígado de *A. ocellatus*

exposto à hiperóxia, sugerem ser esta enzima o componente do sistema de defesas antioxidantes que melhor reflete a dependência do oxigênio na formação do radical superóxido (Boveris *et al.*, 1977; Maral *et al.*, 1977; Witas *et al.*, 1984; Wilhelm Filho *et al.*, 1993) e, conseqüentemente, no estabelecimento de estresse oxidativo em função da oscilação na disponibilidade do oxigênio ambiental. Esta relação foi encontrada também em outras espécies de peixes marinhos (Wilhelm Filho, 1994) e de água doce, como verificado nos exemplares de *A. crassipinis* submetidos à hiperóxia ($r=0,94$; J.L. Marcon, dados não publicados).

.3.2. Catalase

As concentrações da catalase avaliadas no fígado de *C. macropomum* aclimatado à normóxia estão condizentes com o intervalo verificado para diversas espécies amazônicas e cerca de 1,5 a 2,0 vezes superiores ao observado recentemente em indivíduos da mesma espécie coletados no ambiente natural (Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Para *A. ocellatus*, os conteúdos desta enzima estão bem próximos aos registrados em um exemplar de *A. crassipinis* analisado recentemente (Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Os conteúdos da catalase obtidos nos peixes amazônicos foram cerca de 4 vezes superiores aos verificados para teleósteos marinhos e elasmobrânquios (Wilhelm Filho *et al.*, 1993; Wilhelm Filho & Boveris, 1993) demonstrando, de maneira análoga ao mencionado em relação à SOD, uma relação desta enzima com as características físico-químicas dos distintos ambientes que estes grupos de peixes habitam (Wilhelm Filho & Marcon, 1996).

A diminuição significativa (68%) da CAT verificada no fígado dos exemplares de *C. macropomum* submetidos à hiperóxia contrastou com as elevações de sua atividade evidenciadas em mamíferos e bactérias (Jones, 1985; Halliwell & Gutteridge, 1989). Este decréscimo poderia ser resultado de uma inibição causada pela ação do O_2^- presente em elevadas concentrações neste tecido. Explicação semelhante foi sugerida por Bainy *et al.*

(1996), que analisando o estresse oxidativo em tilápias (*Oreochromis niloticus*) expostas a xenobióticos, mostraram uma diminuição acentuada da atividade da CAT, acompanhada, tanto por uma aceleração da velocidade de formação do O_2^- , como por um aumento paralelo da atividade da SOD. No entanto, Kono & Fridovich (1982) demonstraram em experimentos *in vitro* que a CAT purificada de mamíferos só é inativada pelo O_2^- em concentrações acima dos níveis fisiológicos (em torno de 10^{-6} M). Entretanto, a eficiência do O_2^- na inativação das formas isozímicas da CAT encontrada nos peixes poderia ser maior do que a verificada nos mamíferos, inibindo a atividade da enzima em concentrações inferiores e dentro do intervalo fisiológico. A diminuição observada na concentração da CAT do fígado do tambaqui poderia ser também atribuída a um decréscimo na quantidade de NADPH disponível na célula. Esta enzima contém, em cada uma de suas subunidades, uma molécula de NADPH ligada, a qual auxilia na estabilidade e na manutenção de sua atividade catalítica (Kirkman *et al.*, 1987; Halliwell & Gutteridge, 1989; Scott *et al.*, 1991). A perda substancial do potencial redutor (ATP e, conseqüentemente, NADPH e NADH) observada no sangue de *C. macropomum* exposto à hiperóxia (J.L. Marcon, dados não publicados; veja itens 3.3 e 4), se extrapolada em relação ao fígado, poderia influenciar a síntese enzimática durante o período de aclimação, resultando em uma diminuição da concentração da catalase, mesmo quando a condição hiperóxica induzisse, *a priori*, um aumento dos níveis da mesma (Jones, 1985; Halliwell & Gutteridge, 1989). A depleção dos níveis de NADPH e NADH, também associada com o aumento de GSSG liberado para o meio extracelular (Oshino & Chance, 1977; Freeman & Crapo, 1982), já foi constatada em mitocôndrias isoladas e diversos tecidos (incluindo o fígado) examinados *in situ* de ratos expostos à hiperóxia hiperbárica (Chance *et al.*, 1965; Nishiki *et al.*, 1976), suportando, em parte, as afirmações mencionadas acima.

A diminuição na capacidade de eliminação do H_2O_2 pela CAT no fígado do tambaqui poderia ser compensada a partir da elevação da concentração da enzima GPx, onde o aumento de 48% no conteúdo desta enzima, observado no fígado dos animais aclimatados em hiperóxia, contrabalancearia, em parte, a eliminação do H_2O_2 formado neste tecido. A

GPx é encontrada em duas formas, uma citosólica e outra ligada à membrana; nesta última, o papel central parece residir na proteção desta estrutura (Flohé, 1982), através da eliminação de peróxidos orgânicos formados durante o processo de oxidação de lipídeos e proteínas e não sobre a eliminação do H₂O₂. Aumentos consideráveis (224%) dos níveis endógenos de peroxidação lipídica foram também observados nesta condição, sugerindo que a indução da glutatona peroxidase verificada no fígado do tabaqui poderia ser consequência de uma interação entre os dois processos, i.e., aumento na velocidade de formação de H₂O₂ e elevação nos níveis de peróxidos orgânicos.

Existe uma polêmica muito forte em relação ao papel da CAT e da GPx no processo de detoxificação do H₂O₂. Se consideradas em relação às características cinéticas, o H₂O₂ poderia ser metabolizado preferencialmente pela GPx, em função de seu baixo K_m para o H₂O₂ relativamente à CAT. Esta última enzima, por sua vez, seria mais importante na detoxificação do H₂O₂ quando este composto estivesse presente em altas concentrações (Chance *et al.*, 1979), como por exemplo, em uma condição hiperóxica. Contudo, a afirmação da maior participação de uma enzima em relação à outra baseada apenas nestas características, podem levar a erros na interpretação do papel fisiológico de cada tipo enzimático (Barga de Quiroga *et al.*, 1989). Alguns autores mencionam que a CAT é primariamente importante na detoxificação do H₂O₂ em níveis fisiológicos (Oshino & Chance, 1977; Scott *et al.*, 1991); outros, porém, sugerem que a GPx tem uma maior importância na proteção das células (e.g., fibroblastos humanos, eritrócitos), principalmente em situações que favoreçam o estabelecimento de estresse oxidativo, como as altas tensões de oxigênio (Raes *et al.*, 1987) e hemólise (Falcioni *et al.*, 1989). No eritrócito, particularmente, a polêmica é ainda mais intensa, devido à constatação de que em diversos animais a CAT está ausente nos eritrócitos. Giulivi *et al.* (1993), avaliando a produção de H₂O₂ em eritrócitos bovinos normais, ressaltaram que a GPx é a principal enzima responsável pela eliminação do H₂O₂ nestas células, contrastando com os estudos de Gaetani *et al.* (1989), onde as duas enzimas estariam igualmente envolvidas na detoxificação deste composto. Outros autores mencionam, ainda, que as duas enzimas são mutuamente

importantes na proteção contra os efeitos tóxicos do H_2O_2 , tanto em eritrócitos de truta (*Salmo irideus*) induzidos à hemólise (Falcioni *et al.*, 1987), como em fígado e rim de exemplares de rãs (*Rana perezi*) aclimatados à normóxia e hiperóxia (Barga de Quiroga *et al.*, 1989). Os resultados obtidos no presente estudo suportam a idéia de que estas enzimas são igualmente importantes na manutenção dos níveis basais de H_2O_2 , apresentando ainda uma interdependência funcional, bem evidente no fígado dos exemplares de *C. macropomum* expostos às duas condições estressantes. A interdependência funcional destas enzimas é evidente a despeito da compartimentalização subcelular diferenciada da CAT nos peroxissomas e da GPx no citosol e mitocôndrias e, de suas distintas propriedades cinéticas (Flohé, 1982).

O aumento dos níveis da SOD combinado com a diminuição dos níveis da CAT no fígado e sangue de *C. macropomum* submetido à hiperóxia deveria resultar num aumento da produção de H_2O_2 (Scott *et al.*, 1989), convertendo-se numa situação de elevado estresse oxidativo. As drásticas diminuições na concentração de GSH intraeritrocitária, somadas à elevação do conteúdo de meta-Hb, estariam ilustrando este insulto oxidativo no tambaqui. Uma possível via de detoxificação consistiria na eliminação branquial do excesso de H_2O_2 , de forma semelhante à excreção da amônia (Heisler, 1993), um mecanismo aparentemente comum nos peixes (Wilhelm Filho *et al.*, 1994).

Por outro lado, *A. ocellatus* não revelou nenhuma alteração na concentração da CAT em ambos os tecidos, sangue e fígado, quando aclimatado nesta condição, de modo idêntico à SOD no fígado. Respostas semelhantes foram observadas em *Rana perezi* aclimatada à hiperóxia por 14 dias (Barga de Quiroga *et al.*, 1989) e em *Cyprinus carpio* (Radi *et al.*, 1988), enquanto que *A. crassipinis* revelou uma diminuição significativa da concentração desta enzima, a exemplo do tambaqui (J.L. Marcon, dados não publicados). Estes resultados indicam que as estratégias contrastantes de regulação das enzimas antioxidantes adotadas pelas duas espécies de acarás, bem como do tambaqui, devem-se a características espécie-específicas (Godin & Garnett, 1992ab) e ressaltam a necessidade de cautela na comparação

dos resultados obtidos em diferentes grupos animais e, principalmente, quanto a generalizações relacionadas aos mesmos.

Na situação de hipóxia, as diminuições na concentração da catalase, verificadas tanto no fígado de *C. macropomum* como de *A. ocellatus*, corroboram os resultados obtidos por Radi *et al.* (1988) e poderiam ser resultantes de uma menor atividade do metabolismo oxidativo tecidual observado nas duas espécies. A diminuição do metabolismo aeróbico destes animais poderia induzir uma diminuição na síntese da catalase ao longo do período experimental. Essa mesma tendência foi também observada no conteúdo da CAT nos eritrócitos de *A. ocellatus*. Além disso, como mencionado anteriormente, os níveis de NADPH poderiam estar interferindo no processo de síntese ou mesmo na eficiência catalítica desta enzima (Kirkman *et al.*, 1987).

Por outro lado, a ausência da catalase verificada no sangue dos exemplares de *C. macropomum* aclimatados à normóxia e hipóxia, e os níveis consideravelmente baixos na condição hiperóxica, confirmaram uma característica já observada em várias espécies de peixes amazônicos (Wilhelm Filho & Marcon, 1996), incluindo o próprio tambaqui. Isso indica que a ausência da CAT parece ser uma característica espécie-específica, sem nenhum relacionamento filogenético, como proposto por Rabie *et al.* (1972), pois, a despeito da presença de elevadas concentrações de CAT em *A. ocellatus*, a ausência de atividade desta enzima foi também registrada em um outro ciclídeo amazônico (*Satanoperca jurupari*). Outro trabalho realizado com *C. macropomum* mostrou que apenas 1 indivíduo em 10 apresentou uma pequena concentração desta enzima, sendo o restante destituído da mesma (Marcon & Wilhelm Filho, dados não publicados). A acatalessemia é aparentemente um fenômeno comum entre os peixes, tendo sido descrita anteriormente para outras espécies dulceaquícolas e marinhas (Smith, 1976; Rabie *et al.*, 1977; Wilhelm Filho *et al.*, 1993; Wilhelm Filho & Marcon, 1996).

Espécies destituídas de catalase e/ou apresentando baixas concentrações de CAT e GPx, poderiam estar eliminando o H₂O₂ para o meio aquático passivamente através do aparelho branquial. Recentemente Wilhelm Filho *et al.* (1994) demonstraram a capacidade

de excreção do H_2O_2 pelas brânquias em uma espécie de peixe de água doce. Este composto pode difundir-se livremente através das membranas das células (Freeman & Crapo, 1982) e, além disso, possui estabilidade e tempo de vida média (Cadenas, 1985; Pryor, 1986) suficientes para percorrer as distâncias existentes entre os sítios de sua formação nos diferentes tecidos até a região branquial, por onde seria excretado. Apesar deste mecanismo não ser conhecido entre os peixes amazônicos, é possível que o H_2O_2 excedente, não metabolizado pela CAT e pela GPx, possa ser eliminado desta maneira. É tentador especular que a capacidade de excreção do H_2O_2 pelas brânquias tenha maior eficiência em *C. macropomum*, em função da ausência de catalase e de seus níveis inferiores da glutathiona peroxidase, quando comparados ao acará-açu, além de possuir uma elevada superfície branquial.

3.3. Glutathiona peroxidase

Os conteúdos de GPx encontrados no fígado das duas espécies aclimatadas em normóxia foram relativamente próximos entre si e condizentes com o intervalo observado em outras espécies de peixes (Smith & Shrift, 1979; Aksnes & Njaa, 1981; Tappel *et al.*, 1982; Wilhelm Filho *et al.*, 1993). Estes valores são discrepantes quando comparados com estudos anteriormente realizados em eritrócitos de algumas espécies de peixes de clima temperado (Matkovics *et al.*, 1977; Mazeud *et al.*, 1979; Aknes Njaa, 1981; Wdiedzac *et al.*, 1982; Gabryelak *et al.*, 1983). Os níveis atipicamente elevados de GPx encontrados nestes estudos poderiam ser resultantes de interferências causadas pelos altos níveis de meta-Hb normalmente presentes nos eritrócitos de peixes (Härdig & Höglund, 1983; Graham *et al.*, 1986; Bartlett *et al.*, 1987; Wilhelm Filho & Marcon, 1996). A presença de meta-Hb interfere na taxa de oxidação do NADPH, o que determinaria uma superavaliação da atividade da GPx nestes ensaios (Flohé & Gunzler, 1984; Wilhelm Filho *et al.*, 1993), sendo que em nenhum destes trabalhos foi mencionado o uso de KCN nos procedimentos

analíticos; a reação com o KCN converte toda a hemoglobina presente na amostra para a forma de cianometahemoglobina, evitando que este composto interfira nos resultados finais da análise. Além disso, os valores de GPx observados na literatura variam consideravelmente entre as diferentes espécies analisadas e a utilização de métodos diferenciados, bem como o emprego de distintas unidades, dificultam uma abordagem comparativa dentro do grupo como um todo. Comparativamente a outros grupos de vertebrados, os valores observados nas duas espécies estão próximos aos verificados em alguns répteis e anfíbios e inferiores aos registrados em alguns mamíferos de laboratório (Tappel *et al.*, 1982).

A GPx possui uma função complementar à da CAT sendo, contudo, mais importante nas reações de detoxificação dos peróxidos orgânicos produzidos durante o estabelecimento do estresse oxidativo (Flohé, 1982; Halliwell & Gutteridge, 1989). Esta característica ficou evidente no tabaqui aclimatado em normóxia, através de uma correlação inversa ($r=-0,76$) entre a concentração da GPx e os níveis endógenos de TBARS, e também por uma relação positiva ($r=0,73$) entre os conteúdos desta enzima e os da CAT, demonstrando a dualidade funcional da GPx nos processos ligados tanto à proteção da integridade estrutural das membranas, como à detoxificação do H_2O_2 presente na fração citosólica das células. Esta peculiaridade funcional da GPx deve-se ao fato desta enzima ser específica quanto ao seu doador de H, a GSH, e inespecífica em relação aos substratos (Chance *et al.*, 1979; Flohé, 1982). Dessa forma a GPx pode, além de dividir a metabolização do H_2O_2 com a CAT, reagir diretamente com hidroperóxidos orgânicos formados, principalmente, a partir das membranas. Também em fígado de rato a distribuição subcelular da GPx é complementar à da CAT, isto é, cerca de 75% da enzima encontram-se no citosol e os 25% restantes situam-se na matriz mitocondrial, enquanto a localização da CAT é predominantemente peroxissomal (revisto por Flohé, 1982). O compartilhamento funcional entre a GPx e a CAT na detoxificação do H_2O_2 tem sua base na distribuição destas enzimas no interior da célula (Chance *et al.*, 1979).

Na situação de hiperóxia, a GPx mostrou uma relação direta com o aumento da concentração de oxigênio no meio, para as duas espécies em estudo. Nesta condição os

acréscimos mais intensos ($\cong 80\%$) foram revelados por *A. ocellatus*. A constatação de uma interdependência funcional entre a CAT e a GPx observada nesta espécie, indica a importância da atuação conjunta destas enzimas na eliminação dos peróxidos (H_2O_2 e peróxidos orgânicos) formados no fígado durante a exposição a elevadas tensões de oxigênio. Essa característica foi também observada no fígado do tambaqui, pois a diminuição dos níveis da CAT foi nitidamente acompanhada por um aumento na concentração da GPx. Por outro lado, a menor indução da GPx verificada no tambaqui em relação ao acará-açu, poderia ser resultante da ocorrência de danos oxidativos e de alterações nas enzimas responsáveis pela síntese de ATP envolvendo os agentes redutores (como o NADPH), importantes na manutenção do sistema da glutatona (K.B. Storey, comunicação pessoal). Um aumento notório (76%) na proporção de GSSG, acompanhado de uma drástica diminuição da quantidade de ATP (e, possivelmente, de NADPH), foram observados nos eritrócitos dos indivíduos desta espécie aclimatados em hiperóxia, em contraste com *A. ocellatus*, onde estas alterações foram menores em relação à GSSG, e ausentes quanto ao nível de ATP disponível (Marcon & Val, 1996). Estes eventos poderiam estar ocorrendo nas células do fígado, explicando em parte, a menor indução da GPx no tambaqui do que em *A. ocellatus*. A depleção dos níveis de NADPH e aumentos substanciais do conteúdo de GSSG foram demonstrados anteriormente em mitocôndrias de fígado de ratos expostos ao oxigênio hiperbárico (Nishiki *et al.*, 1976). Aumentos semelhantes no conteúdo de GPx foram também observados no fígado de *A. crassipinis* (J.L. Marcon, dados não mostrados) e de um anfíbio, *Rana perizi*, aclimatados às mesmas condições (Barga de Quiroga *et al.*, 1989), enquanto que uma diminuição foi observada em exemplares de *C. carpio* aclimatados à hiperóxia por 17 horas (Radi *et al.*, 1988). *Astronotus ocellatus* revelou, ainda, uma associação entre os conteúdos de GPx e da SOD ($r=0,88$; $P<0,05$) no fígado dos animais hiperóxicos, sugerindo a existência de um sinergismo funcional entre as três enzimas, os quais representam, no seu conjunto, o mecanismo primário de proteções antioxidantes (Chance *et al.*, 1979; Halliwell & Gutteridge, 1989; Scandalios, 1993).

De modo semelhante ao observado na condição anterior, o aumento da concentração da GPx em peixes submetidos à hipóxia poderia estar sendo adotado no sentido de compensar o decréscimo da concentração da catalase verificado nesta mesma condição. Alternativamente, o aumento na síntese da GPx poderia ser uma resposta adaptativa cuja finalidade consistiria na preparação do organismo para um estresse oxidativo subsequente ao estabelecimento de uma condição normóxica e também observado em organismos que apresentam comportamentos de estivação, hibernação e tolerância de certos tecidos ao congelamento (Buzádzic *et al.*, 1990; Hermes-Lima & Storey, 1993; 1995; Storey, 1996). Estes resultados contrastam com as diminuições na atividade da GPx observadas em fígado de *C. carpio* expostos à hipóxia (Radi *et al.*, 1988), bem como em ratos aclimatados à hipóxia hipobárica crônica (Costa *et al.*, 1993) e em coração perfundido de rato, exposto à hipóxia e posterior reoxigenação (Dhaliwal *et al.*, 1991). Entretanto, diferentes respostas foram registradas nestes mesmos animais em distintas situações de hipóxia, indicando, em consonância com as idéias de Costa *et al.* (1993), que as respostas observadas, notadamente em relação às enzimas antioxidantes, são altamente dependentes da condição experimental empregada.

4. Glutathione

Os conteúdos intraeritrocitários de GSH observados em *C. macropomum* e *A. ocellatus* estão dentro do intervalo citado para eritrócitos e hemácias de vertebrados (Nikinmaa, 1990). Entretanto, tem-se constatado que este intervalo é consideravelmente maior nos peixes, onde as concentrações variaram de 0,34 mM em algumas espécies amazônicas (Wilhelm Filho & Marcon, 1996), até um valor médio de $8,5 \pm 1,3$ mM em alguns representantes de peixes cartilagosos (raias e tubarões; Wilhelm Filho & Boveris, 1993), estando em níveis semelhantes ou mesmo superiores aos conteúdos observados no

fígado de alguns mamíferos, tecido onde são encontradas as maiores concentrações deste tripeptídeo (Meister & Anderson, 1983; Lopez-Torres *et al.*, 1993).

Comparativamente, as concentrações intraeritrocitárias de GSH nas duas espécies aclimatadas à normóxia variaram consideravelmente entre si e podem refletir características ecofisiológicas distintas entre as mesmas. Os baixos valores apresentados por *A. ocellatus* são condizentes com os observados em três outras espécies de ciclídeos amazônicos (Wilhelm Filho & Marcon, 1996), incluindo *A. crassipinis*, e igualmente em exemplares de tilápia (*Oreochromis niloticus*) analisados por Bainy *et al.* (1996). Tais resultados sugerem que esta característica possa ser comum aos representantes da família, pelo menos entre aqueles de hábitos semelhantes, isto é, territoriais, pouco ativos e habitantes de águas lânticas. Esse nível de relação parece ser válido também para *C. macropomum*, o qual revelou valores semelhantes aos observados em outros cinco representantes da família Serrasalminidae recentemente analisados (Wilhelm Filho & Marcon, 1996).

O comportamento diferenciado nas duas espécies em relação à GSH foi também evidente quando aclimatadas à hiperóxia. O decréscimo acentuado do conteúdo de GSH observado em *C. macropomum* aclimatado à hiperóxia (8 vezes em relação ao controle), somado à elevada proporção de glutathiona oxidada (76%), sugere que esta espécie encontrou nesta condição experimental, uma situação de elevado estresse oxidativo, necessitando alocar grandes quantidades de GSH para atenuar os efeitos deletérios das espécies ativas do oxigênio que eventualmente não foram metabolizadas pelo sistema enzimático de defesas antioxidantes. É importante ressaltar que os níveis de GSSG encontrados nos mamíferos normalmente não ultrapassam os 1-2 % do conteúdo total da glutathiona existente nas células em condições normais (Kosower & Kosower, 1978; Meister & Anderson, 1983), constituindo-se em mais um indicativo da intensidade do estresse oxidativo enfrentado pelo tambaqui na condição de hiperóxia.

Contrariamente, em *A. ocellatus*, a diminuição do conteúdo de glutathiona foi menos acentuada (3 vezes) do que no tambaqui e, apesar dos níveis de glutathiona total não terem sido medidos nesta espécie, é possível supor que uma menor proporção de GSH tenha sido

convertida para sua forma oxidada nos animais aclimatados à hiperóxia. Também a análise da razão entre a proporção de GSH intraeritrocitária em relação à concentração de hemoglobina, demonstrou que as diferenças obtidas nesta razão foram menos intensas no acará-açu do que no tambaqui, quando comparados com seus respectivos grupos controles. Enquanto que no acará-açu o decréscimo na razão GSH/Hb foi de apenas 2 vezes, no tambaqui esse valor foi de 10 vezes. Mesmo com o elevado grau de formação de meta-Hb observado nos eritrócitos do acará-açu, nenhum acréscimo nos níveis de peroxidação lipídica foi registrado no sangue, bem como no fígado destes animais, ao contrário do tambaqui, onde o conteúdo de TBARS foi significativamente mais elevado em relação à situação controle nos dois tecidos examinados. Para o acará-açu, os ajustes propostos entre os metabolismos aeróbico e anaeróbico podem ter sido mais importantes na manutenção dos níveis de TBARS próximos aos observados em normóxia. É provável também que a tolerância diferenciada verificada nos eritrócitos das duas espécies analisadas, envolvam a participação de outros antioxidantes importantes em peixes, como as vitaminas E, C e o β -caroteno, não avaliados no presente estudo.

Um dos fatores que poderia ter limitado a síntese de GSH nos eritrócitos das duas espécies aclimatadas em hiperóxia, seria a diminuição significativa da concentração de ATP presente nos eritrócitos. A dependência da GSH dos níveis de ATP foi anteriormente descrita para eritrócitos anucleados de mamíferos (Srivastava, 1971; Suzuki & Kurata, 1992), aspecto também constatado neste estudo, mostrando uma relação direta e significativa entre os conteúdos de GSH e ATP. No tambaqui isto foi ainda mais evidente do que no acará-açu, pois a concentração de GSH revelou uma dependência do ATP em todas as condições experimentais.

Em condições normais, o aumento da proporção de GSSG é interpretado como resultante de um aumento na velocidade de reação da GPx (Chance *et al.*, 1979). No entanto, em função do elevado estresse oxidativo experimentado pelos exemplares de tambaqui aclimatados à hiperóxia, os altos níveis de GSSG observados no sangue destes animais poderiam ser resultantes de perturbações nos processos ligados à regeneração da GSH, isto

é, a depleção do ATP intracelular resultaria em uma diminuição na quantidade de NADPH disponível, levando, conseqüentemente, a uma ineficiência da glutathiona redutase, responsável pelo "turnover" da GSH no interior do eritrócito. De acordo com K.B. Storey (comunicação pessoal) esta cascata de desordens funcionais que estariam ocorrendo no interior dos eritrócitos dos animais hiperóxicos, particularmente em relação à GSH, poderia ser consequência de danos envolvendo proteínas e outros compostos relacionados à manutenção do potencial redutor da célula, que estariam se refletindo em um aumento dos níveis de peroxidação lipídica avaliados através das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Novamente, estes eventos não foram observados com clareza nos exemplares hiperóxicos de *A. ocellatus*. É possível também que as diferenças observadas no status da GSH entre as duas espécies possam ser devidas a uma capacidade diferenciada da glutathiona redutase presente nos eritrócitos das mesmas. A importância da GSH como antioxidante foi também demonstrada em ratos expostos à hiperóxia hiperbárica e tratados com um agente depressor da GSH (dietil maleato), onde a administração exógena de GSH diminuiu consideravelmente a susceptibilidade dos animais em relação aos efeitos tóxicos do oxigênio (Weber *et al.*, 1990).

Na situação de hipóxia, os decréscimos da concentração de GSH intraeritrocitária poderiam ser consequência de diminuições na síntese de ATP, notadamente no tambaqui. Além disso, não foram constatadas diferenças na proporção da GSSG em comparação com o grupo controle indicando, provavelmente, que a intensidade moderada de hipóxia utilizada experimentalmente não representaria uma condição tão estressante como a situação de hiperóxia para estas espécies.

Outro aspecto que poderia ter favorecido o decréscimo na concentração da GSH seria a diminuição do metabolismo oxidativo nas duas espécies, avaliada através do consumo tecidual de oxigênio no fígado. Em termos proporcionais, a diminuição da GSH foi maior no tambaqui que, paralelamente, apresentou um maior decréscimo do consumo do oxigênio tecidual em comparação com o acará-açu.

As diminuições observadas no conteúdo da GSH em animais submetidos à hipóxia podem ter comprometido a integridade das hemoglobinas de *C. macropomum*, pois foram constatados aumentos na concentração de meta-Hb em relação à *A. ocellatus*. Esse fato pode sugerir que a GSH também seria responsável pela proteção das hemoglobinas nestas espécies, de maneira análoga ao observado nos eritrócitos de uma espécie de salmão (Härdig & Höglund, 1983). A importância da GSH na proteção das hemoglobinas contra a formação de meta-Hb foi também demonstrada por Buckley (1981; 1982) em eritrócitos de truta (*O. mykiss*) tratados com NH_2Cl , um agente formador de meta-Hb, bem como em eritrócitos de mamíferos (Srivastava, 1971; Scott *et al.*, 1989; Giulivi *et al.*, 1993). Giulivi *et al.* (1993) verificaram que a redução *in vitro* dos níveis endógenos de GSH em eritrócitos bovinos resultou em um aumento significativo da proporção de meta-Hb presente nestas células. O favorecimento da formação da meta-Hb em situações de hipóxia e hiperóxia poderia, nesse sentido, ser atenuado pela presença de concentrações relativamente elevadas de GSH nos eritrócitos dos peixes (Härdig & Höglund, 1983; Nikinmaa, 1990; Wilhelm Filho & Marcon, 1996; este estudo), em níveis até superiores aos esperados em relação às suas baixas taxas metabólicas.

Um outro aspecto, provavelmente relevante na atuação da GSH é sua participação na forma de dissulfetos mistos. Os dissulfetos mistos consistem na ligação de proteínas com a glutatona, notadamente em sua forma reduzida e seu envolvimento em processos regulatórios e de defesa celular tem sido considerado por diversos autores (Kosower & Kosower, 1978; Brigelius, 1985; Reischl, 1989). Em condições normais, a quantidade de dissulfetos mistos é baixa nas células, mas pode ser aumentada em situações de estresse oxidativo. Brigelius (1985) mencionou que, sob situações de estresse oxidativo moderado e de curta duração, a formação reversível dos dissulfetos mistos com proteínas pode ser um importante mecanismo de proteção da estrutura celular. Coan *et al.* (1992) relataram que os grupos -SH de proteínas são protegidos contra a oxidação irreversível pela formação de dissulfetos mistos.

A presença de grupos -SH nas moléculas de hemoglobina tem sido documentada e hemoglobinas ricas em grupos -SH (Reischl, 1986) têm sido encontradas em diversos organismos (Kosower & Kosower, 1978; Brigelius, 1985; Reischl & Dafré, 1992). Reischl (1989) sugeriu que a presença dos dissulfetos mistos com hemoglobinas pode ter um significado fisiológico importante, como um mecanismo auxiliar na proteção destas moléculas contra a geração de espécies ativas do oxigênio, através do fornecimento de equivalentes redutores ou de sua ação direta sobre estes intermediários. Este aspecto seria importante, principalmente, para organismos que enfrentam em seus ambientes naturais situações de ampla variação na disponibilidade de oxigênio, notadamente em animais tolerantes à hipóxia, como répteis (e.g., tartarugas; Reischl, 1986). A presença de um elevado conteúdo de dissulfetos mistos ligado às hemoglobinas em hemolisados de tubarões estressados, bem como em hemolisados de pacientes epiléticos sob tratamento de longa duração, parecem corroborar a idéia do papel protetor destes compostos no interior dos eritrócitos (Dafré & Reischl, 1990; Niketic *et al.*, 1992). É provável que a formação de dissulfetos mistos com as hemoglobinas possa constituir-se num mecanismo de proteção importante para os peixes amazônicos, em função dos ambientes frequentemente hipóxicos por eles habitados.

Os resultados obtidos nas três condições examinadas permitem sugerir que a glutathiona pode constituir-se num bom indicador metabólico de estresse oxidativo em peixes, assim como nos mamíferos (Buzádzic *et al.*, 1992; Németh & Boda, 1994; Wilhelm Filho, comunicação pessoal) e alguns invertebrados (Hermes-Lima & Storey, 1995). Tal premissa deve-se, principalmente, ao fato de que este antioxidante pode ser encontrado em concentrações elevadas em praticamente todos os tipos celulares, ser rapidamente regenerado pelo ciclo dos tióis e ter uma pronta atuação em situações de aumentos na geração de espécies ativas do oxigênio. Esta afirmação vem ao encontro das idéias mencionadas por Storey (1995; comunicação pessoal) e outros investigadores (Goto *et al.*, 1993) e contrasta com os postulados de Eaton *et al.* (1989) e Scott *et al.* (1991a) que

questionam a importância da GSH na proteção do eritrócito em algumas situações clínicas hereditárias, em que o estabelecimento de estresse oxidativo pode ser favorecido.

5. Dano celular

Os níveis endógenos de TBARS observados no fígado e no sangue das duas espécies analisadas em normóxia foram semelhantes aos observados em outras espécies de peixes, incluindo diversos representantes amazônicos (Wilhelm Filho & Marcon, 1996). De modo geral, nos peixes, os conteúdos de TBARS avaliados em diversos tecidos são consideravelmente variados, i.e., entre 20 e 400 nmoles/g tecido (Wdzieczak *et al.*, 1982; Radi *et al.*, 1985, 1988; Mather-Mihaich & Di Giulio, 1986; Lopez-Torres *et al.*, 1993; Wilhelm Filho & Marcon, 1996). Contudo, este intervalo de variação é também observado entre algumas espécies pertencentes aos demais grupos de vertebrados (Barga de Quiroga *et al.*, 1989; Lopez-Torres *et al.*, 1993). No tabaqui, os valores foram muito próximos aos registrados recentemente em animais coletados na natureza (Marcon & Wilhelm Filho, dados não publicados). Estes valores foram, contudo, inferiores aos observados em alguns teleósteos marinhos e elasmobrânquios, que revelaram valores consideravelmente elevados, em concentrações na ordem de μM (Wilhelm Filho *et al.*, 1993; Wilhelm Filho & Boveris, 1993).

Comparando-se as duas espécies analisadas nesta condição, os conteúdos de TBARS observados no acará-açu foram inferiores aos registrados no tabaqui, tanto no fígado como no sangue, sugerindo que a primeira espécie dispõe de uma maior capacidade antioxidante, ou que esta diferença pode ser resultante do hábito diferenciado que o acará-açu apresenta em relação ao tabaqui, como o emprego da via anaeróbica e uma menor atividade metabólica já mencionadas anteriormente.

Considerando que a hiperóxia representa uma condição estressante, onde a homeostase dos organismos é geralmente comprometida, seja por distúrbios em diversos

processos regulatórios (iônico, enzimático, trocas gasosas, etc.), ou pelos efeitos diretos do próprio oxigênio em altas pressões (Jones, 1985; Jamieson *et al.*, 1986; Halliwell & Gutteridge, 1989), os aumentos no processo de peroxidação lipídica exibidos pelo fígado e sangue dos exemplares de *C. macropomum* não foram surpreendentes. O aumento da velocidade de formação das espécies ativas do oxigênio é um fenômeno bem caracterizado em diferentes organismos e em diversos tecidos analisados *in vitro* ou *in situ* (Jonhson *et al.*, 1972; Boveris & Chance, 1973; Nishiki *et al.*, 1976; Freeman & Crapo, 1981; Turrens *et al.* 1982ab, entre outros). O incremento na taxa de formação dos intermediários reativos do oxigênio, em especial o O_2^- e o H_2O_2 , no fígado do tambaqui pode ser verificado indiretamente através dos aumentos nas concentrações da SOD e da GPx. Numa reação de consequências danosas, aquelas espécies ativas do oxigênio reagem entre si para dar origem ao radical hidroxil, principal responsável pela oxidação dos lipídeos insaturados das membranas (Kappus, 1985; Halliwell & Gutteridge, 1989).

O peróxido de hidrogênio no sangue parece ter participação na estimulação da produção de TBARS, e sua ação pode ser decorrente das altas concentrações de H_2O_2 favorecidas pela atividade catalítica da SOD. Como já mencionado anteriormente, alguns autores postulam a idéia de que a SOD pode atuar como um agente potencializador do processo de estresse oxidativo em situações onde há um aumento substancial dos níveis de H_2O_2 (Scott *et al.*, 1989; revisto por Kurata *et al.*, 1993). Nesse sentido, a elevação acentuada da SOD (e da produção do H_2O_2), somada a uma certa ineficiência do sistema enzimático responsável pela detoxificação do H_2O_2 , incluindo a participação direta e indireta (via GPx) da GSH, poderia explicar o considerável aumento dos níveis endógenos de peroxidação lipídica observados em ambos os tecidos de *C. macropomum*.

Os resultados obtidos em *A. ocellatus* contrastaram com os de *C. macropomum*, parecendo refletir, uma vez mais, respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas distintamente adotadas por estes animais, no sentido de minimizar os efeitos deletérios da exposição à hiperóxia pela diminuição do uso da via aeróbica. Isso parece consistente, em função das respostas observadas nas enzimas antioxidantes (ausência de indução da SOD em

ambos os tecidos, manutenção da atividade da CAT e elevação da GPx), bem como da menor proporção de GSH destinada aos processos de detoxificação, em contraste com o tambaqui, no qual seria alocada a maior parte da GSH disponível para tais processos.

Na situação de hipóxia, a manutenção dos valores próximos aos verificados em normóxia poderia ser explicada pela redução metabólica observada no fígado de ambas as espécies. São bastante conhecidas as respostas ventilatórias e cardiovasculares de peixes submetidos à hipóxia (Johansen, 1971; White, 1978; Rantin *et al.*, 1992) que levariam a uma diminuição do consumo de oxigênio nesta situação. Contudo, o aumento de TBARS obtido no sangue de *C. macropomum* poderia ser decorrente do nível relativamente baixo de hipóxia utilizado no protocolo experimental. Situações de hipóxia moderada parecem favorecer a produção dos intermediários reativos do oxigênio (Wallace *et al.*, 1982; Shikama, 1984). Rifkind *et al.* (1991; 1993) demonstraram que hemoglobinas parcialmente oxigenadas são mais susceptíveis à oxidação espontânea do que a deoxi-Hb ou a Hb-O₂. A elevação da taxa de oxidação da hemoglobina parece estar relacionada a processos interativos entre a membrana eritrocitária e as hemoglobinas parcialmente oxigenadas, através da porção interna da Banda 3 (Low, 1986; Rifkind *et al.*, 1993). Neste processo, o ânion radical superóxido, formado a partir da hemoglobina, não é acessível à ação neutralizadora da SOD, podendo, assim, atuar como iniciador de reações oxidativas nos lipídeos insaturados da membrana, além de causar danos aos canais iônicos, por onde o O₂⁻ poderia ser liberado para o meio extracelular. Estas propriedades verificadas *in vitro* nos eritrócitos humanos poderiam ocorrer *in vivo* nos eritrócitos dos peixes, particularmente de *C. macropomum*, explicando, dessa forma, o aumento do dano celular observado nos eritrócitos desta espécie.

A análise conjunta do sistema de proteções antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, somada à estimativa de dano celular e do consumo de oxigênio tecidual verificado nas duas espécies, indicam que o acará-açu é um animal capaz de suportar tanto situações de hipóxia e até anóxia por algumas horas (Soares, 1993), como também situações de hiperóxia ambiental, através de ajustes refinados que, provavelmente, incluem a ativação

do metabolismo anaeróbico. Por outro lado, o tambaqui, como um animal preferencialmente oxidativo, não parece dispor dos mesmos recursos fisiológicos e bioquímicos apresentados pela espécie anterior sendo, por isso, mais susceptível aos efeitos da variação na disponibilidade de oxigênio ambiental em períodos de tempo relativamente longos, como o empregado no presente estudo.

6. Considerações finais

Os resultados obtidos no presente estudo constituem-se na base de um novo entendimento a respeito dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos adotados pelos peixes em relação aos efeitos adversos da variação na disponibilidade do oxigênio ambiental. Na região amazônica, este panorama é determinante na distribuição e ecologia das diversas espécies de peixes que habitam suas águas, pois situações de hipóxia e até mesmo hiperóxia são frequentemente encontradas nos mais variados ambientes durante o intervalo de um único dia. Essas oscilações rápidas das características físico-químicas das águas são, talvez, mais importantes na adaptação dos organismos aquáticos do que a periodicidade dos pulsos de cheia e vazante que envolvem o ambiente amazônico (revisto por Val & Almeida-Val, 1995).

A avaliação do mecanismo de proteções antioxidantes em *Astronotus ocellatus* e *Colossoma macropomum* abre um novo horizonte na compreensão dos processos envolvidos na regulação contínua e extremamente refinada destes organismos frente aos efeitos do estresse ambiental. As respostas diferenciadas observadas entre as duas espécies é algo fascinante, pois demonstra a íntima vinculação de uma série de processos metabólicos relacionados à manutenção de níveis ótimos de obtenção de energia com os respectivos hábitos adotados pelas duas espécies. *Astronotus ocellatus* e *C. macropomum* são espécies muito distintas ecologicamente e, apesar de ocuparem praticamente os mesmos ambientes, suas estratégias ligadas à obtenção de oxigênio e manutenção do metabolismo normal são

diferentes. Quando a oferta de oxigênio se encontra reduzida, *C. macropomum* diminui seu metabolismo tecidual (e, provavelmente, o organismal), aumenta a capacidade de transporte de oxigênio do sangue, através de ajustes no hematócrito e da concentração de hemoglobina e, além disso, reduz a quantidade dos fosfatos orgânicos intraeritrocitários presentes no interior de seus eritrócitos com o propósito de intensificar ainda mais a tomada de O₂ na região branquial. Estas respostas são características de suas preferências em relação ao metabolismo oxidativo e, talvez, sejam também comuns à outras espécies ecologicamente semelhantes, como a espécie filogeneticamente próxima, *Piaractus brachypomum* e outros peixes migradores, como o matrinhã (*Brycon cephalus*), o curimatã (*Prochilodus nigricans*) e as espécies de jaraqui (gênero *Semaprochilodus*).

Em relação ao controle das proteções antioxidantes, o tambaqui responde à hipóxia, aumentando alguns componentes enzimáticos (e.g., SOD e GPx) e alocando outros não enzimáticos, como a GSH, na proteção de suas células. Entretanto, quando as condições são muito adversas estas estratégias não garantem uma completa eficácia na proteção contra os efeitos tóxicos do oxigênio. Além destas respostas, também encontradas entre os mamíferos (organismos igualmente predominantemente oxidativos), o tambaqui ajusta suas defesas em função de sua demanda metabólica, ilustrando que a homeostase do organismo é mantida pela interação de todos os processos funcionais que este dispõe, i.e., bioquímicos, fisiológicos e ecológicos. Com o acará-açu o resultado final de suas diversas adaptações frente a uma situação hipóxica não é diferente, mas distintas são as formas pelas quais a espécie prefere manter sua própria homeostase. Ao contrário do tambaqui, *A. ocellatus* mantém a normalidade de suas funções, não pela indução enzimática ou pelo direcionamento de quantidades expressivas dos antioxidantes não enzimáticos, mas principalmente pela regulação altamente refinada do balanço aeróbico/aneróbico. Seu metabolismo oxidativo é reduzido e ajustado de tal forma que as defesas antioxidantes, bem como os parâmetros hematológicos e os fosfatos intraeritrocitários, praticamente não são acionados nestas condições e, mais importante, nenhuma manifestação de dano é observada. Possivelmente estas respostas sejam também adotadas por espécies com hábitos

semelhantes, como por exemplo, *A. crassipinis* entre outros ciclídeos, o tamoatá (*Hoplosternum littorale*), bem como em espécies que apresentam hábitos de estivação e manifestam uma profunda depressão metabólica, como o muçum (*Synbranchus marmoratus*) e a pirambóia (*Lepidosiren paradoxa*) (Val & Almeida-Val, 1995).

A aclimação à hiperóxia foi um contraste experimental muito oportuno, pois demonstrou que situações adversas completamente opostas como esta condição e a de hipóxia, podem ser enfrentadas pelo desencadeamento de respostas semelhantes, pelo menos em relação às duas espécies estudadas. Novamente, nesta condição, os contrastes ecológicos observados entre *C. macropomum* e *A. ocellatus* foram refletidos em suas estratégias bioquímicas e fisiológicas e servem, mais uma vez, para ressaltar a cautela quanto a generalizações entre as diversas espécies de peixes, em especial, aos representantes amazônicos, e extrapolações em relação às estratégias adotadas por organismos distintos, como aves e mamíferos.

Por fim, é possível concluir que os peixes amazônicos desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, estratégias de defesa para se haverem com permanente coexistência com os produtos intermediários gerados pelo metabolismo do oxigênio. Estas estratégias são tão diversas como as outras formas de adaptação já documentadas neste grupo.

Tabela 5. Quadro sinóptico das respostas observadas nos diversos parâmetros analisados em *Colossoma macropomum* e *Astronotus ocellatus* aclimatados à hipóxia e à hiperóxia, quando comparados à condição normóxica.

Parâmetros	Tecido analisado	<i>Colossoma macropomum</i>		<i>Astronotus ocellatus</i>		Observações
		Hipóxia	Hiperóxia	Hipóxia	Hiperóxia	
<i>Parâmetros hematológicos</i>						
Hematócrito (%)	Sangue	não variou	aumentou	não variou	não variou	As respostas hematológicas à hiperóxia foram diferentes entre as duas espécies. O tambaqui, mais dependente do metabolismo oxidativo, aumentou a capacidade de transporte de O ₂ durante a hiperóxia.
Hemoglobina (g/dl)	Sangue	não variou	aumentou	não variou	diminuiu	
Metahemoglobina (%)	Sangue	aumentou	aumentou	não variou	aumentou	
<i>Defesas antioxidantes</i>						
Superóxido dismutase (nM)	Fígado	aumentou	aumentou	não variou	não variou	O acará-açu mostra maior independência das variações na oferta de O ₂ em relação ao tambaqui, que responde prontamente às duas ondições.
	Sangue	não variou	aumentou	não variou	diminuiu	
Catalase (pM)	Fígado	diminuiu	diminuiu	diminuiu	não variou	Esta enzima tem características espécie-específicas, mas desempenha funções igualmente importantes nas duas espécies.
	Sangue	ausente	negligenciável	diminuiu	não variou	
Glutaciona Peroxidase (pM)	Fígado	aumentou	aumentou	aumentou	aumentou	Importante na eliminação dos peróxidos orgânicos e funcionalmente interdependente em relação à CAT.
Glutaciona reduzida (mM)	Sangue	diminuiu	diminuiu mais	diminuiu	diminuiu mais	O tambaqui apresenta estresse oxidativo claramente indicado pelos altos níveis de GSSG, que não pode ser medido nos exemplares de acará-açu.
Glutaciona oxidada (%)	Sangue	não variou	aumentou	----	----	
Consumo de oxigênio (μmoles/min/g)	Fígado	diminuiu mais	diminuiu	diminuiu	diminuiu mais	As duas espécies deprimem o metabolismo oxidativo quando aclimatados à hipóxia e à hiperóxia. O acará mostra ser mais sensível à hiperóxia
Dano celular (TBARS; nM)	Fígado	não variou	aumentou	não variou	não variou	O acará-açu possui mecanismos mais efetivos no controle do estresse oxidativo, não apresentando dano celular, enquanto que o tambaqui mostra dano celular tanto em hipóxia quanto em hiperóxia.
	Sangue	aumentou	aumentou	não variou	não variou	

CONCLUSÕES

1. Os parâmetros hematológicos de ambas as espécies praticamente não foram influenciados pelas diferentes tensões de oxigênio utilizadas no presente estudo. Na situação de hiperóxia, a concentração de hemoglobina comportou-se distintamente nas duas espécies, aumentando significativamente em *C. macropomum* e diminuindo significativamente em *A. ocellatus*.

2. Os conteúdos de meta-Hb observados nas duas espécies analisadas foram semelhantes entre si na situação de normóxia e dentro do intervalo verificado para outras espécies de peixes. A exposição à hiperóxia resultou em aumentos no conteúdo de meta-Hb em ambas as espécies. Na situação de hipóxia, apenas *C. macropomum* apresentou uma elevação do conteúdo de meta-Hb.

3. A avaliação do consumo de oxigênio do fígado foi um forte indicativo de que ambas as espécies deprimem o metabolismo aeróbico em situações de baixa disponibilidade de oxigênio. As variações da concentração de oxigênio ambiental foram acompanhadas por ajustes paralelos da atividade metabólica do fígado, sendo mais evidente no tambaqui, que apresentou uma resposta típica de animais preferencialmente oxidativos. Na exposição à hiperóxia, as duas espécies se utilizaram de uma resposta semelhante à empregada em condições hipóxicas para compensar o excesso de oxigênio e manter o consumo deste gás em condições próximas às verificadas em uma situação normal. Esse aspecto foi notório no acará-açu, onde a depressão do metabolismo aeróbico foi mais acentuada, sugerindo uma utilização importante da via glicolítica.

4. O aumento da SOD verificado em ambos os tecidos estudados no tambaqui aclimatado à hiperóxia reflete uma resposta já evidenciada em outros grupos de animais, vertebrados e invertebrados, onde a indução da SOD representaria uma resposta primária do sistema de

proteções antioxidantes no sentido de diminuir a formação do radical superóxido, que representa o primeiro passo no processo de formação do estresse oxidativo observado nesta condição. A elevação da SOD observada no fígado dos exemplares de tambaqui expostos à hipóxia consiste em uma resposta semelhante à observada na situação de hiperóxia. No sangue, contudo, a intensidade moderada em que foi aplicada a hipóxia, provavelmente não permitiu uma resposta compensatória da enzima neste tecido.

5. A diferença observada nos níveis da SOD no fígado e no sangue do acará-açu, em relação ao tambaqui, na condição de hiperóxia, indica que a primeira espécie apresenta uma grande tolerância à esta condição, possivelmente sem desencadear a indução da SOD, como observado no tambaqui. O mesmo fato foi constatado na situação de hipóxia, onde a concentração da SOD não diferiu daquela obtida na condição de normóxia. Reforçando a idéia de que o acará-açu é uma espécie que recorre ao metabolismo anaeróbico. As correlações obtidas entre os níveis da SOD e o consumo de oxigênio do fígado vem corroborar o fato de que esta enzima se constitui num indicativo de que a formação do radical superóxido depende dos níveis de oxigênio (e.g., situações de hipóxia e hiperóxia ambiental).

6. Nos exemplares de tambaqui aclimatados à hiperóxia, a combinação de fatores como o aumento dos níveis da SOD e a diminuição da CAT em ambos os tecidos poderiam levar a um aumento substancial na produção de H_2O_2 , resultando numa situação de elevado estresse oxidativo. Além disso, as drásticas diminuições da concentração de GSH, somadas ao aumento da proporção de meta-Hb, poderiam estar caracterizando o estabelecimento de estresse oxidativo no tambaqui. Estes eventos não foram, contudo, observados nos exemplares de *A. ocellatus* aclimatados às mesmas condições. Para ambas as espécies, o excesso de H_2O_2 poderia ser possivelmente detoxificado através de sua eliminação passiva pelo epitélio branquial, um mecanismo recentemente descrito e aparentemente comum aos peixes.

7. Foi observado um paralelismo entre as concentrações da SOD e da CAT nas duas espécies em estudo, sugerindo uma interdependência funcional entre os dois sistemas enzimáticos, em diferentes tecidos expostos a diferentes tensões de oxigênio. Este relacionamento funcional é decorrente da ação complementar que a CAT realiza na detoxificação do produto final da ação catalítica da SOD.

8. A razão entre as concentrações hepáticas da SOD e da CAT observada na situação de normóxia foi de 3 a 4 vezes para as duas espécies estudadas. Estes valores são compatíveis com aqueles obtidos para outras espécies amazônicas, mas consideravelmente inferiores àqueles observados em peixes marinhos e mamíferos.

9. Em normóxia, o fígado dos exemplares de *A. ocellatus* apresentou uma concentração de catalase superior à verificada no mesmo tecido dos indivíduos de *C. macropomum*. Esta última espécie apresentou acatalasemia em praticamente todas as situações experimentais, confirmando uma característica comum ao sangue dos peixes, incluindo diversas espécies amazônicas e marinhas.

10. A exposição à hiperóxia não parece influenciar o comportamento da CAT em *A. ocellatus*, enquanto que em *C. macropomum*, as elevadas concentrações de oxigênio empregadas parecem ter induzido uma redução da concentração desta enzima. Na aclimação à hipóxia, a diminuição nos conteúdos da CAT observados no fígado das duas espécies analisadas, e também no sangue de *A. ocellatus*, poderia ser consequência de uma redução da atividade metabólica destes animais, resultando em uma diminuição da síntese desta enzima.

11. A GPx no fígado de tambaqui em normóxia mostrou ser inversamente proporcional ao dano celular (TBARS). No fígado de ambas as espécies aclimatadas à hiperóxia a enzima

GPx demonstrou ter uma função complementar ao papel da CAT na detoxificação do H_2O_2 . Esta resposta foi mais evidente na espécie *C. macropomum*, em que a concentração da catalase foi diminuída naquela condição. Na situação de hipóxia, a elevação da GPx manifestou um comportamento análogo ao observado em animais que desenvolvem o processo de hibernação e estivação, em que o aumento das enzimas é interpretado como uma forma de preparação para o estabelecimento de uma condição de estresse oxidativo no momento da retomada dos níveis metabólicos normais.

12. As concentrações de glutathiona reduzida observadas nas duas espécies diferiram entre si na condição normóxica e refletem características ecológicas distintas entre as mesmas. No caso de *A. ocellatus*, os conteúdos de GSH indicam um aspecto comum a outras espécies de ciclídeos amazônicos de hábitos semelhantes e concentrações igualmente baixas; de forma análoga, em *C. macropomum*, os níveis foram elevados e também próximos aos verificados em outros serrasalmídeos.

13. A avaliação dos níveis de glutathiona nas 3 condições experimentais demonstra claramente que o acará-açu, quando comparado ao tambaqui, apresenta uma maior tolerância às variações da pO_2 , necessitando uma menor quantidade de GSH e direcionando uma menor proporção deste composto no processo de detoxificação das espécies ativas do oxigênio. Em ambas as espécies, os níveis intraeritrocitários de GSH e GSSG parecem constituir-se em bons indicadores metabólicos na avaliação de estresse oxidativo.

14. A glutathiona sanguínea tem um papel importante na proteção das moléculas de hemoglobina contra os processos de oxidação em ambas as espécies, seja em condições normais ou ainda em situações de hipóxia e hiperóxia.

15. O decréscimo na concentração da GSH em *C. macropomum* está fortemente associado a uma diminuição na quantidade de ATP intraeritrocitário, que diminuiu progressivamente nas

situações de hipóxia e hiperóxia. Em *A.ocellatus* essa associação foi evidente apenas na condição de hiperóxia, reforçando as inferências em relação à sua elevada tolerância à hipóxia.

16. Os níveis elevados de peroxidação lipídica observados tanto no fígado como no sangue dos exemplares de tambaqui aclimatados à hiperóxia indicam que esta espécie, apesar de apresentar uma indução da SOD, e grandes quantidades de GSH alocadas na proteção do eritrócito durante o período de aclimação, não possui um sistema de defesas antioxidantes suficientemente eficaz para evitar o estabelecimento de danos celulares promovidos pela ação das espécies ativas do oxigênio. *Astronotus ocellatus*, por outro lado, mostrou ser mais tolerante a esta situação, não apresentando alterações nos níveis endógenos de TBARS e, igualmente, nos conteúdos da SOD e da CAT, tanto no fígado como no sangue.

17. Os resultados obtidos indicam que o acará-açu é um animal capaz de suportar amplas variações na disponibilidade do oxigênio ambiental, através de ajustes finos que, provavelmente, incluem a ativação do metabolismo anaeróbico. Por outro lado, o tambaqui, como um animal preferencialmente oxidativo, não manifestou a presença dos mesmos recursos apresentados pela espécie anterior, sendo mais susceptível aos efeitos da variação na disponibilidade do oxigênio ambiental em períodos de tempo relativamente longos, como os empregados no presente estudo.

PERSPECTIVAS FUTURAS

As informações básicas relativas às proteções antioxidantes obtidas no presente trabalho, indicam a necessidade de realização de novas investigações que poderão ajudar na elucidação dos diversos pontos levantados ao longo da discussão. Entre tais investigações destacamos:

1) avaliar o efeito temporal da aclimatação à hiperóxia, bem como à hipóxia, e de distintos níveis de saturação sobre o mecanismo de proteções antioxidantes em peixes aclimatados experimentalmente à estas condições;

2) verificar a importância do metabolismo anaeróbico das espécies em pauta, no sentido de corroborar as inferências especificadas em relação ao acará-açu.

3) avaliar a enzima glutathione peroxidase no sangue de peixes aclimatados a condições normais e adversas de exposição ao oxigênio e determinar o papel desta em relação à proteção da estrutura do eritrócito e à eliminação do peróxido de hidrogênio nestas células;

4) investigar o papel de outros antioxidantes não enzimáticos, como a vitamina E, a vitamina C e o ubiquinol₁₀, também importantes na proteção celular, e comumente encontrados em outras espécies de peixes, notadamente naquelas de hábito frugívoro;

5) avaliar se a eliminação branquial do peróxido de hidrogênio, observada em outras espécies de água doce, também constitui-se num mecanismo de detoxificação deste composto nos peixes amazônicos;

6) determinar se a eliminação do peróxido de hidrogênio é mais intensa em peixes acatalassêmicos do que naqueles nos quais a enzima foi constatada, investigando este

aspecto tanto em condições normais, como em condições que favoreçam a produção deste intermediário reativo do oxigênio;

7) avaliar o comportamento da glutathiona reduzida e oxidada em outros tecidos, como o fígado e o rim, em resposta a uma dada condição estressante, e comparar com os resultados obtidos em relação ao sangue;

8) determinar a presença de dissulfetos mistos com a hemoglobina em peixes amazônicos habitantes de águas hipóxicas, e avaliar se estes compostos consistem realmente em mecanismos acessórios importantes do sistema de proteções antioxidantes nos eritrócitos destas espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Meth. Enzymol.* 105: 121-126.
- Agar, N.S. and Harley, J.D. (1972) Erythrocytic metahemoglobin reductases in various animal species. *Experientia* 28: 1248.
- Aksnes, A. and Njaa, L.R. (1981) Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B: 893-896.
- Alayash, A.I.; Ryan, B.A.B. and Fratantoni, J.C. (1993) Oxidation reactions of human, opossum (*Didelphis Virginiana*) and spot (*Leiostomus xanthurus*) hemoglobins: a search for a correlation with some structural-functional properties. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 427-432.
- Albuquerque, G.C. (1980) *Piscicultura Continental*. 2ª edição. Editora Rabelo Ltda. Belo Horizonte. 139p.
- Alessio, H.M. (1993) Exercise-induced oxidative stress. *Med. Sci. Sports Exerc.* 25: 218-224.
- Allen, A.O. and Bielski, B.H.J. (1982) Formation and disappearance of superoxide radicals in aqueous solutions. In: *Superoxide Dismutase* Vol. I (Oberley, L.W., ed.) pp. 126-141. CRC Press, Boca Raton.
- Almeida-Val, V.M.F. and Val, A.L. (1990) Adaptação bioquímica em peixes da Amazônia. *Ciência Hoje* 11: 62-67.
- Almeida-Val, V.M.F. and Val, A.L. (1993) Evolutionary trends of LDH in fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B: 21-28.
- Almeida-Val, V.M.F.; Farias, I.P.; Silva, M.N.P.; Duncan, W.P. and Val, A.L. (1995) Biochemical adjustments to hypoxia by amazon cichlids. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 1257-1263
- Almeida-Val, V.M.F.; Schwantes, A.R. and Val, A.L. (1990) LDH isozymes in Amazon fishes. I. Electrophoretic studies on two species from Serrasalminidae family: *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B: 77-84.

- Almeida-Val, V.M.F.; Silva, M.N.P.; Caraciolo, M.C.M.; Mesquita, L.S.B.; Farias, I.P. and Val, A.L. (1992) LDH isozymes in Amazon fish - III. Distribution patterns and functional properties in Serrasalminae (Teleostei: Ostariophysi). *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 119-125.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L. and Hochachka, P.W. (1993) Hypoxia tolerance in Amazonian fishes: status of an under-explored biological "goldmine". In: *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation* (Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M. & van den Thillar, G., eds.). pp. 435-445. CRC Press, Boca Raton.
- Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221: 1256-1264.
- Andersen, N.A.; Laursen, J.S. and Lykkeboe, G. (1985) Seasonal variations in hematocrit, red cell hemoglobin and nucleoside triphosphate concentrations in the european eel *Anguilla anguilla*. *Comp. Biochem. Physiol.* 81A: 87-92.
- Axelrod, H.R. (1994) Should the importation of aquarium fishes be controlled? *Trop. Fish Hobbyist* 43: 195-206.
- Babior, B.M. (1984) Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64: 959-966.
- Bainy, A.C.D.; Saito, E.; Carvalho, P.S.M. and Junqueira, V.B.C. (1996) Oxidative stress in gill, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. *Aquat. Toxicol.* 34: 151-162.
- Bannister, J.V.; Anastasi, A. and Bannister, W.H. (1977) Cytosol superoxide dismutase from swordfish (*Xiphias gladius* L.) liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 56B: 235-238.
- Barga de Quiroga, G. and Gutierrez, P. (1984) Superoxide dismutase during the development of two amphibian species and its role in hyperoxia tolerance. *Mol. Physiol.* 6: 221-232.
- Barga de Quiroga, G.; López-Torres, M. and Pérez-Campo, R. (1989) Catalase is needed to avoid tissue peroxidation in *Rana perezi* in normoxia. *Comp. Biochem. Physiol.* 94C: 391-398.
- Barthelemy, L.; Belaud, A. and Chastel, C. (1981) A comparative study of oxygen toxicity in vertebrates. *Resp. Physiol.* 44: 261-268.

- Bartlett, G.R., Schwantes, A.R. and Val, A.L. (1987) Studies on the influence of nitrite on methemoglobin formation in amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol* 86C: 449-456.
- Bastos, J.A.M. (1956) Consumo e taxa mínima de oxigênio do apaiari, *Astronotus ocellatus* (Spix); cangati, *Trachycorystes* sp. e corvina, *Plagioscium squamosissimus* (Heckel). *Rev. Bras. Biol.* 16: 103-114.
- Bean, J.W. (1945) Effects of oxygen at increased pressure. *Physiol. Rev.* 25: 1-147.
- Beers, R.F. and Sizer, I.W. (1952) A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. biol. Chem.* 195: 133-140.
- Benesch, R.E.; Benesch, R. and Yung, S. (1973) Equations for the spectrophotometric analysis of hemoglobin mixtures. *Anal. Biochem.* 55: 215-218.
- Bennett, A.F. (1978) Activity metabolism of the lower vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 40: 447-469.
- Bergmeyer, H.U. (ed.) (1965) *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, New York
- Berschick, P; Bridges, C.R. and Grieshaber, M.K. (1987) The influence of hyperoxia, hypoxia and temperature on the respiratory physiology of the intertidal rockpool fish *Gobius cobitis pallas*. *J. exp. Biol.* 130: 369-387.
- Bethlenfalvay, N.C. Watrman, M.R.; Lima, J.E. and Waldrup, T. (1982) Cytosolic and membrane-bound methemoglobin reductase in erythrocytes of the opossum *Didelphis virginiana*. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 591-594.
- Beutler, E.; Duron, O. and Kelly, B.M. (1963) Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61: 882-890.
- Bicudo, J.E.P.W. (1994) Oxidative stress and aerobic performance in hummingbirds. Abstracts of International Symposium *Regulatory Mechanism of Cardiovascular and Respiratory Function in Vertebrates*. September, 8 to 13. São Carlos, Brasil. p. 8.
- Bird, R.P. and Draper, A.H. (1984) Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Meth. Enzymol.* 90: 105-110.
- Bittencourt, M. (1991) Exploração dos recursos pesqueiros na Amazônia Central: situação do conhecimento atual. In: *Bases Científicas para Estratégia de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. Vol. I. (Val, A.L.; Figliuolo, R. e Feldberg, E., eds.) pp. 321-336. INPA, Manaus.

- Block, E.R. (1977) Effects of superoxide dismutase and succinate on the development of hyperbaric oxygen toxicity. *Aviat. Space Environ. Med.*48: 645-648.
- Board, P.G. and Agar, N.S. (1983) Glutathione metabolism in erythrocytes. In: *Red Blood Cells of Domestic Mammals* (Agar, N.S. and Board, P.G., eds.) pp. 253-270. Elsevier, Frankfurt.
- Board, P.G.; Agar, N.S. Gruca, M. and Shine, R. (1977) Methaemoglobin and its reduction in nucleated erythrocytes from reptiles and birds. *Comp. Biochem. Physiol.* 57B: 265-267
- Böhlke, J.E., Weitzman, S.H. and Menezes, N.A. (1978) Estado atual da situação da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazonica* 8: 657-677.
- Boveris, A. (1977) Mitochondrial production of superoxide radical and hydrogen peroxide. *Adv. Exp. Med. Biol.* 78: 67-82.
- Boveris, A. and Cadenas, E. (1982) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: *Superoxide Dismutase* Vol. II (Oberley, L.W., ed.) pp. 159-168. CRC Press, Boca Raton.
- Boveris, A. and Chance, B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 34: 707-717.
- Boveris, A.; Fraga, C.G.; Varsavsky, A.I. and Hoch, O.R. (1983) Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 227: 534-541.
- Braum, E. and Junk, W.J. (1982) Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.* 67: 869-886.
- Brauner, C.J.; Val, A.L. and Randall, D.J. (1993) The effects of graded methaemoglobin levels on the swimming performance of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. exp. Biol.* 185: 121-135.
- Bridges, C.R. (1993) Ecophysiology of intertidal fish. In: *Fish Ecophysiology*. (Rankin, J.C. and Jensen, F.B., eds) pp. 374-400. Chapman and Hall. London.

- Bridges, C.R.; Taylor, A.C.; Morris, S.J. and Grieshaber, M.K. (1984) Ecophysiological adaptations in *Blennius pholis* (L.) blood to intertidal rockpool environments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 77: 151-167.
- Brigelius, R. (1985) Mixed disulfides: biological functions and increase in oxidative stress. In: *Oxidative Stress* (Sies, H., ed.) pp. 243-272. Academic Press. London.
- Buckley, J.A. (1981) Intoxication of trout erythrocytes from monochloramine in vitro: oxidative alteration and recovery of hemoglobin and glutathione. *Comp. Biochem. Physiol.* 69C: 337-344.
- Buckley, J.A. (1982) Hemoglobin-glutathione relationships in trout erythrocytes treated with monochloramine. *Bull. Environm. Contam.* 29: 637-644.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. (1981) Autooxidant of biological molecules. I - The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Amer. Chem. Soc.* 103: 6472-6477.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. (1989) Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann. New York Acad. Sci.* 570:7-22.
- Buzádzic, B.; Spasic, M.; Saicic, Z.S.; Radojicic, R.; Petrovic, V.M. and Halliwell, B. (1990) Antioxidant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus*. 2. The effect of hibernation. *Free Rad. Biol. Med.* 9: 401-406.
- Buzádzic, B.; Spasic, M.; Saicic, Z.S.; Radojicic, R. and Petrovic, V.M. (1992) Seasonal dependence of the activity of antioxidant defenses in the ground squirrel (*Citellus citellus*): the effect of cold. *Comp. Biochem Physiol.* 101B: 547-551.
- Cadenas, E. (1985) Oxidative stress and formation of excited species. In: *Oxidative Stress* (H. Sies, ed.), pp. 85-113. Academic Press, London.
- Cadenas, E. (1989) Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- Cadenas, E. and Sies, H. (1982) Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by ter-butyl hydroperoxide. *Eur. J. Biochem.* 124: 349-356.
- Cameron, J.N. (1971) Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 40A: 743-749.

- Cassini, A.; Favero, M. and Albergoni, V. (1993) Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded Antarctic teleost fish, *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C: 333-336.
- Chance, B.; Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59: 527-602.
- Chance, B.; Jamieson, D. and Coles, H. (1965) Energy-linked pyridine nucleotide reduction: inhibitory effects of hyperbaric oxygen *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 206: 257-263.
- Coan, C.; Ji, J.; Hideg, K. and Mehlhorn, R.J. (1992) Protein sulfhydryls are protected from irreversible oxidation by conversion to mixed disulfides. *Arch. Biochem. Biophys.* 295: 369-378.
- Collart-Odinetz, O. and Moreira, L.C (1989): Quelques caracteristiques physico-chemies d'um lac da varzea en Amazonie centrale (Lago do Rei, ile de Careiro). *Rev. Hydrobiol. trop.* 22: 191-199.
- Cooper, W.J. and Zika, R.G. (1983) Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science* 220: 711-712.
- Corrêa, C.F. and Rantin, F.T. (1994) The effects of graded environmental hypoxia on the cardio-respiratory function of the neotropical fish tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier,1818). Abstracts of International Symposium *Regulatory Mechanism of Cardiovascular and Respiratory Function in Vertebrates*. September, 8 to 13. São Carlos, Brasil. p. 22.
- Costa, L.E.; Llesuy, S. and Boveris, A. (1993) Active oxygen species in the liver of rats submitted to chronic hypobaric hypoxia. *Am. J. Physiol.* 264: C1395-C1400.
- Costa, O.T.F. (1995): *Efeito do pH da água sobre os parametros hematológicos, eletrolitos e equilíbrio ácido-base do sangue arterial de C. macropomum (Characiformes, Serrasalminidae)*. Dissertação de Mestrado. INPA/FUA, Manaus. 108p.
- Cutler, R.G. (1984) Antioxidants, aging and longevity. In: *Free Radicals in Biology* Vol. VI (W.A. Pryor, ed.) pp. 371-428. Academic Press, Orlando.
- Dafre, A.L. and Reischl, E. (1990) High hemoglobin mixed disulfide content in hemolysates from stressed sharks. *Comp. Biochem. Physiol.* 96B: 215-219.

- Davies, K.J.A. (ed.) (1991) *Oxidative Damage & Repair: Chemical, Biological and Medical Aspects*. 910 pp. Pergamon Press, Oxford.
- DeGroot, H. and Littauer, A. (1989) Hypoxia, reactive oxygen, and cell injury. *Free Rad. Biol. Med.* 6: 541-551.
- Dejours, P. (1988) *Respiration in Water and Air*. Elsevier, New York.
- Dejours, P.; Toulmond, A. and Truchot, J. P. (1977): The effect of hyperoxia on the breathing of marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 58A: 409-411
- Demple, B. and Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63: 915-48.
- Deneke, S.M. and Fanburg, B.L. (1980) Normobaric oxygen toxicity of the lung. *New Engl. J. Med.* 303: 76-86.
- Dhaliwal, H.; Kirshenbaum, L. A.; Randhawa, A.K. and Singal, P.K. (1991) Correlation between antioxidant changes during hypoxia and recovery on reoxygenation. *Am. J. Physiol.* 261: H632-H638.
- Di Giulio, R.T.; Washburn, P.C. and Wenning, R.J. (1989) Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress. *Envir. Toxicol. Chem.* 8: 1103-1123.
- Di Prisco, G.; Tamburrini, M. (1992) The hemoglobins of marine and freshwater fish: the search for correlations with physiological adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 661-671.
- Dryer, S.E.; Dryer, R.L. and Autor, A.P. (1980) Enhancement of mitochondrial, cyanide-resistant superoxide dismutase in the livers of rats treated with 2,4-dinitrophenol. *J. Biol. Chem.* 255: 1054-1057.
- Dykens, J.A. and Shick, J.M. (1984) Photobiology of symbiotic sea anemone, *Anthopleura elegantissima*: defences against photodynamic effects and seasonal photoacclimatization. *Biol. Bull.* 167: 683-697.
- Eaton, J.W.; Hallaway, P.E. and Agar, N.S. (1989) Erythrocyte glutathione: a dispensable oxidant defense? *Prog. Clin. Biol. Res.* 319: 23-38.

- Falcioni, G.; Cincola, G. and Brunori, M. (1987) Glutathione peroxidase and oxidative hemolysis in trout red blood cells. *Febs Letters* 221: 355-358.
- Falcioni, G.; Grelloni, F.; De Sanctis, G.; Bonfigli, A.R.; Pierani, P.; Felici, L. and Coppa, G.V. (1989) Oxidative hemolysis in erythrocytes with unstable hemoglobins. *Clin. Chim. Acta.*185: 115-116.
- Ferreira, E.J.G. (1981) *Alimentação dos adultos de doze espécies de ciclídeos (Perciformes, Cichlidae) do Rio Negro, Brasil*. Dissertação de Mestrado. PPG INPA/FUA. Manaus. 254p.
- Fink, W.L. and Fink, S.V. (1979) Central Amazonia and its fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 62A: 13-35.
- Fitzgerald, J.P. (1992) Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 101B: 111-114.
- Flohé, L. (1982) Glutathione peroxidase brought into focus. In: *Free Radicals in Biology* Vol. V (Pryor, W.A., ed.) pp. 223-255. Academic Press, Orlando.
- Flohé, L. and Gunzler, W.A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol.* 105: 114-121.
- Flohé, L. and Ötting, F. (1984) Superoxide dismutase assays. *Meth. Enzymol* 105: 93-104.
- Folmar, L.C. (1993) Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish: a bibliography and synopsis of selected effects. *Env. Toxicol. Chem.* 12: 337-375.
- Frank, L. (1992) Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Rad. Biol. Med.* 11: 463-494.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1981) Hyperoxia increases oxygen radical production in rat lung and lung mitochondria. *J. Biol. Chem.* 256: 10986-10992.
- Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412-426.
- Freeman, L.; Beitinger, T.L. and Huey, D.W. (1983) Methemoglobin reductase activity in phylogenetically diverse piscine species. *Comp. Biochem. Physiol.* 75B: 27-30.
- Fridovich, I. (1974) Superoxide and evolution. *Horizons. Biochem. Biophys.* 1:1-37.

- Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
- Fridovich, I. (1986) Superoxide dismutases. *Adv. Enzymol.* 58: 62-97.
- Furch, K.; Junk, W.J. and Klinge, H. (1982) Unusual chemistry of natural waters from the Amazon region. *Acta Cient. Venezuela* 33: 269-273.
- Gabryelak, T.; Piatkowska, M.; Leyko, W. and Pérès, G. (1983) Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 75C: 383-385.
- Gaetani, G.F.; Canepa, L.; Galiano, S.; Ferraris, A.M. and Kirkman, H.N. (1989) Catalase and glutathione peroxidase are equally active in the detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 73: 334-339.
- Galtieri, A.; Natoli, G.; Lania, A. and Calabrese, L. (1986) Isolation and characterization of Cu, Zn-superoxide dismutase of the shark *Prionace glauca*. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 555-559.
- Gerschman, R.; Gilbert, D.L.; Nye, S.W.; Dwyer, P. and Fenn, W.O. (1954) Oxygen poisoning and X-irradiation: a mechanism in common. *Science* 119: 623-626.
- Gilbert, D.L. (1995) Evolutionary aspects of atmospheric oxygen and organisms. In: *American Physiological Society's Handbook of Physiology* (Blatteis, C.M. and Fregly, M.J., eds.) Oxford University Press (in press).
- Giulivi, C.; Hochstein, P. and Davies, K.J.A. (1993) Hydrogen peroxide production by red blood cells. *Free Rad. Biol. Med.* 16: 123-129.
- Godin, D.V. and Garnett, M.E. (1992a) Species-related variations in tissue antioxidant status - I. Differences in antioxidant enzyme profiles. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 737-742.
- Godin, D.V. and Garnett, M.E. (1992b) Species-related variations in tissue antioxidant status - II. Differences in susceptibility to oxidative challenge. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 743-748.
- Goldberg, B. and Stern, A. (1977) The role of superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. *Arch. Biochem. Biophys.* 178: 218-225.

- González-Flecha, B.S. (1990) Estrés oxidativo en patología humana: métodos de estudio de aplicación clínica. *Acta Bioq. Clin. Latinoamer.* 24: 67-74.
- González-Flecha, B.S.; Repetto, M.; Evelson, P. and Boveris, A. (1991) Inhibition of microsomal lipid peroxidation by α -tocopherol acetate. *Xenobiotica* 21: 1013-1022.
- González-Zulieta, M. (1997) Role of nitric oxide in cell death. *B.I.F. Futura* 12: 1-10.
- Goto, I.; Agar, N.S. and Maede, Y.(1993) Relation between reduced glutathione content and heinz body formation in sleep erythrocytes. *Am. J. Res.* 54: 622-626.
- Gotoh, T. and Shikama, K. (1976) Generation of the superoxide radical during autoxidation of oximyoglobin. *J. Biochem. (Tokyo)* 80: 397-399.
- Goulding, M. (1980) Amazon fishes and their foods. In: *The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history*. Univ. California Press, Los Angeles.
- Goulding, M. and Carvalho, M.L. (1982) Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Rev. Bras. Zool.* 1: 107-133.
- Graef, E.W. (1993): Considerações sobre a prática da piscicultura no Amazonas. In: *Bases Científicas para Estratégia de Preservação e Desenvolvimento da Amazônia*. Vol. II. (Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M. e Oliveira, L.A., eds.). pp. 345-360. INPA, Manaus.
- Graham, M.S. and Fletcher, G.L. (1986) High concentrations of methemoglobin in five species of temperate marine teleosts. *J. Exp. Zool.* 239: 139-142.
- Granger, D.N. and Korthuis, R.J. (1995) Physiologic mechanism of postischemic tissue injury. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 311-32.
- Guarnieri, C., Flamigni, F. and Caldarera, C.M. (1980) Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 12: 797-808.
- Guarnieri, C., Flamigni, F. and Rossoni-Caldarera, C. (1979) Glutathione peroxidase activity and release of glutathione from oxygen deficient perfused rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 89: 678-684.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine* (2nd edition). Claredon, Oxford.

- Hamilton, S.K. and Lewis, M. Jr. (1987) Causes of seasonality in the chemistry of a lake on the Orinoco River floodplain, Venezuela. *Limnol. Oceanogr.* 32: 1277-1290.
- Harman, D. (1982) The free-radical theory of aging. In: *Free Radicals in Biology* Vol. V (W.A. Pryor, ed.), pp. 255-275. Academic Press, Orlando.
- Härdig, J. and Höglund, L.B. (1983) Seasonal and ontogenetic effects on methaemoglobin and reduced glutathione content in the blood of reared baltic salmon. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A: 27-34.
- Härdig, J.; Olsson L.A. and Höglund, L.B. (1978) Autoradiography on erythrokinesis and multihemoglobins in juvenile *Salmo salar* L. at various respiratory gas regimes. *Acta Physiol. Scand.* 103: 240-251.
- Heisler, N. (1993) Mode of transmembrane and transepithelial ammonia transfer. In: *The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptations to Environment and Mode of Life* (Bicudo, J.E.P.W., ed.) pp.1-11. CRC Press, Boca Raton.
- Hermes-Lima, M. and Storey, K.B. (1993) Antioxidant defenses in the tolerance of freezing and anoxia by garter snakes. *Am. J. Physiol.* 265: R646-R652.
- Hermes-Lima, M. and Storey, K.B. (1995) Antioxidant defenses and metabolic depression in a pulmonate land snail. *Am J. Physiol.* 268: R1386-R1393.
- Honda, E.M.S. (1974) Contribuição ao conhecimento da biologia de peixes do Amazonas. II. Alimentação de tambaqui, *Colossoma bidens* (Spix). *Acta Amazonica* 4: 47-53.
- Huey, D.W. and Beitinger, T.L. (1982) Methemoglobin levels in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to nitrite and tricaine methanesulfonate. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39: 643-645.
- Isokun-Etiobhio, B.O.; Oraedu, A.C.I. and Ugochukwu, E.N. (1990) A comparative study of superoxide dismutase in various animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 521-523.
- Jamieson, D.; Chance, B.; Cadenas, H. and Boveris, A. (1986) The relation of free radical production to hyperoxia. *Annu. Rev. Physiol.* 48: 703-719.
- Jensen, F.B.; Nikinmaa, N. and Weber, R.E. (1993) Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In: *Fish*

- Ecophysiology* (Rankin, J.C. and Jensen, F.B., eds.) pp. 162-179. Chapman and Hall, London.
- Jewett, M.G.; Behemer, D.J. and Johnson, G.H. (1991) Effects of hyperoxic rearing water on blood hemoglobin and hematocrit levels of rainbow trout. *J. Aquat. Anim. Health* 3: 153-160.
- Johansen, K. (1971) Comparative physiology: gas exchange and circulation in fishes. *Ann. Rev. Physiol.* 33: 569-612.
- Jones, D.P. (1985) The role of oxygen concentration in oxidative stress: hypoxic and hyperoxic models. In: *Oxidative Stress* (Sies, H., ed.) pp. 151-195. Academic Press, London.
- Johnson, W.P.; Jefferson, D. and Mengel, C.E. (1972) In vivo formation of H₂O₂ in red cells during exposure to hyperoxia. *J. Clin. Invest.* 51: 2211-2213.
- Junk, W.J. Soares, G.M. and Carvalho F.M. (1983) Distribution of fish species in a lake of the Amazon river floodplain near Manaus (Lago Camaleão), with special reference to extreme oxygen conditions. *Amazoniana* 12: 397-431.
- Junk, W.J.; Bayley, P.B. and Sparks, R. E. (1989) The flood pulse concept in river-floodplain systems. *Can. Spec. Fish. Aquat. Sci.* 106: 110-127.
- Kampen, E.J. and Zijlstra, W.G. (1964) Standardization of haemoglobinometry In: *Erythrocytometric methods and their standardization*. (Boroviczeny, Ch.G., ed.).
- Kappus, H. (1985) Lipid peroxidation: mechanisms, analysis, enzymology and biological relevance. In: *Oxidative Stress* (Sies, H., ed.) pp. 273-310. Academic Press, London.
- Kellogg, E.W. and Fridovich, I. (1977) Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 252: 6721-6728.
- Kirkman, H.N.; Galiano, S. and Gaetani, G.F. (1987) The function of catalase-bound NADPH. *J. Biol. Chem.* 262: 660
- Kono, Y. and Fridovich, I. (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J. Biol. Chem.* 257: 5751-5754.

- Kosower, N.S. and Kosower, E.M. (1978) The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* 54: 109-160.
- Kramer, D.L. (1987) Dissolved oxygen and fish behaviour. *Env. Biol. Fish.* 18: 81-92.
- Kramer, D.L.; Linsey, C.C.; Moodie, G.E.E. and Stevens, E.D. (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, R.S. and Pearlstein, R.D. (1983) Reversible uncoupling of oxidative phosphorylation at low oxygen tension. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 5807-4811.
- Krise, W.F. and Smith, R.A. (1993) Eye abnormalities of lake trout exposed to gas supersaturation. *Prog. Fish-Cultur.* 55: 177-179.
- Kurata, M.; Suzuki, M. and Agar, N.S. (1993) Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp. Biochem. Physiol.* 106B: 477-487.
- Layton, H.E. (1987) Energy advantage of counter-current oxygen transfer in fish gills. *J. theor. Biol.* 125: 307-316.
- Levy, A.; Zhang, L. and Rifkind, J.M. (1988) Hemoglobin: a source of superoxide radical under hypoxic conditions. In: *Oxi-Radicals in Molecular Biology and Pathology*. (Cerutti, P.A., Fridovich, I. and McCord, J.M., eds.) pp. 11-25. Alan Liss, New York.
- Livingstone, D.R. (1983) Invertebrate and vertebrate pathways of anaerobic metabolism: evolutionary considerations. *J. geol. Soc. London* 140: 27-37.
- Livingstone, D.R. (1991) Origins and evolution of pathways of anaerobic metabolism on the animal kingdom. *Amer. Zool.* 31: 522-534.
- López-Torres, M.; Pérez-Campo, R.; Cadenas, S.; Rojas, C. and Barja, G. (1993) A comparative study of free radicals in vertebrates-II. Non-enzymatic antioxidants and oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B: 757-763.
- Low, P.S. (1986) Structure and function of the cytoplasmic domain of band 3: center of erythrocyte membrane-peripheral protein interactions. *Bioch. Biophys. Acta* 864: 145-167.
- Lowe-McConnell, R.H. (1975) *Fish Communities in Tropical Freshwaters*. Longman, London. 337p.

- Malins, D.C.; McCain, B.B.; Lindhal, J.T.; Meyers, M.S.; Krahn, M.M.; Brown, D.W.; Chan S.-L. and Roubal, W.T. (1988) Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. *Aquat. Toxicol.* 11: 43-67.
- Maral, J.; Puget, K. and Michelson, A.M. (1977) Comparative study of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 77: 1525-1535.
- Marcon, J.L. and Val, A.L. (1996) Intraerythrocytic phosphates in *Colossoma macropomum* and *Astronotus ocellatus* (Pisces) of the Amazon. In: *Proceedings of International Symposium on the Biology of Fishes*. San Francisco State University, CA. July, 14-18. pp. 101-107.
- Mather-Mihaich, E. and Di Giulio, R.T. (1986) Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde, glutathione and methemoglobin concentrations in channel catfish exposed to DEF and n-butyl mercaptan. *Comp. Biochem. Physiol.* 85C: 427-432.
- Matkovics, B.; Novak, R.; Hanh, H.D.; Szabó, L.; Varga, Sz.I. and Zalesna, G. (1977) A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 56B: 31-34.
- Matkovics, B.; Witas, H.; Gabryelak, T. and Szabó, L. (1987) Paraquat as an agent affecting antioxidant enzymes of common carp erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 87C: 217-219.
- Mazeaud, F.; Maral, J. and Michelson, A.M. (1979) Distribution of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in carp: erythrocytic manganese SOD. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 84: 1161-1168.
- McCord, J.M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055.
- Meister, A. and Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52: 711-760.
- Melack, B.J. and Fisher, T.P. (1983) Diel oxygen variations and their ecological implications in Amazon floodplain lakes. *Arch. Hydrobiol.* 98: 422-442.
- Misra, H.P. and Fridovich, I. (1972) The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a single assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247: 3170-3174.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.J. and Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142.

- Monteiro, P.J.C.; Val, A.L. and Almeida-Val, V.M.F. (1987) Biological aspects of Amazonian fishes: hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates, and whole blood Bohr effect of *Mylossoma duriventris*. *Can. J. Zool.* 65: 1805-1811.
- Morris, S.M. and Albright, J.T. (1984) Catalase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase in the rete mirabile and gas gland epithelium of six species of marine fishes. *J. exp. Zool.* 232: 29-39.
- Moura, M.A.F. (1994) *Efeito da anemia, do exercício físico e da adrenalina sobre o baço e eritrócitos de Colossoma macropomum (Pisces)*. Dissertação de Mestrado. INPA/FUA, Manaus. 84p.
- Moura, M.A.F.; Farias, I.P. and Val, A.L. (1994) Effects of temperature on leucocytes of *C. macropomum* and *H. littorale* (Pisces). *Bras. J. Med. Biol. Res.* 27: 1589-1598.
- Murad, A.; Houston, A.H. and Samson, L. (1990) Haematological response to reduced oxygen-carrying capacity, increased temperature and hypoxia in goldfish *Carassius auratus* L. *J. Fish Biol.* 36: 289-305.
- Natoli, G.; Calabrese, L.; Capo, C.; O'Neill, P. and Di Prisco, G. (1990) Icefish (*Chaenocephalus aceratus*) Cu,Zn superoxide dismutase. Conservation of the enzyme properties in extreme adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* 95B: 29-33.
- Németh, I. and Boda, D. (1994) Blood glutathione redox ratio as a parameter of oxidative stress in premature infants with irs. *Free Rad. Biol. Med.* 16: 347-353.
- Niketic, V.; Beslo, D.; Raicevic, S.; Sredic, S. and Stojkovic, M. (1992) Glutathione adduct of hemoglobin (Hb ASSG) in hemolysates of patients on long-term antiepileptic therapy. *Int. J. Biochem.* 24: 503-507.
- Nikinmaa, M. (1990) *Vertebrate Red Blood Cells: Adaptation of Function to Respiratory Requirements*. Springer, Berlin. 261p.
- Nikinmaa, M. (1992) How does environmental pollution affect red cell function in fish? *Aquatic Toxicol.* 22: 227-238
- Nishiki, K.; Jamieson, D.; Oshino, N. and Chance, B. (1976) Oxygen toxicity in the perfused rat liver lung and under hyperbaric. *Biochem. J.* 160: 343-355.
- Ohkawa, H. (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358.

- Oshino, N. and Chance, B. (1977) Properties of glutathione release observed during reduction of organic hydroperoxide, demethylation of aminopyrine and oxidation of some substances in perfused rat liver and their implications for the physiological function of catalase. *Biochem. J.* 162: 509-525.
- Oshino, N.; Chance, B.; Sies, H. and Bucher, T. (1973) The role of hydrogen peroxide generation in perfused rat liver and the reaction of catalase compound I and hydrogen donors. *Arch. Biochem. Biophys.* 157: 117-131.
- Ostholm, T.; Homqvist, B.; Alm, P. and Ekstrom, P. (1994) Nitric oxide synthetase in the CNS of the atlantic salmon. *Neurosci. Lett.* 168: 233-237.
- Paglia, D.E. and Valentine, W.N. (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70: 158-169.
- Perez, J.E.; Ojeda, G. and Kylander, M.K. (1986) Blood parameters in fishes - V. Activity level and type of respiration in some marine, stuarine and freshwater fish of Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela Univ. Oriente.* 25:163-173.
- Pérez-Campo, R.; López-Torres, M.; Rojas, C.; Cadenas, S. and Barja, G. (1993) A comparative study of free radicals in vertebrates - I. Antioxidant enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 105B: 749-755.
- Perutz, M. (1970) Stereochemistry of cooperative effects in hemoglobin. *Nature* 228: 726-739.
- Petasne, R.G. and Zika, R.G. (1987) Fate of superoxide dismutase in coastal sea water. *Nature* 325: 516-518.
- Pitombeira, M.S. (1972) *Hematologia do apaiari, Astronotus ocellatus (Cuvier, 1829) - peixe, teleósteo - aspectos morfológicos e fisiológicos*. Tese de Doutorado. USP. São Paulo. 133 pp.
- Prosser, C.L. (ed.) (1991) *Environmental and Metabolic Animal Physiology-Comparative Animal Physiology*. Wiley-Liss, New York. 578p.
- Pryor, W.A. (1986) Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu. Rev. Physiol.* 48: 657-667.

- Puntarulo, S.; Sanchez, R.A. and Boveris, A. (1988) Hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes at the onset of germination. *Plant Physiol.* 86: 626-630.
- Rabie, F.; Magid, A.M.A.; Guma'a, K.A. and Karrar, O. (1972) Evolution of catalase in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 43A: 1053-1055.
- Radi, A.A.A.; Hai, D.Q. and Matkovics, B. (1986) Comparative antioxidant enzyme study in freshwater fish with different types of feeding behaviour. *Comp. Biochem. Physiol.* 81C: 395-399.
- Radi, A.A.A.; Matkovics, B. and Csengeri, I. (1988) Effects of various oxygen concentrations on antioxidant enzymes and the quantity of tissue phospholipid fatty acids in the carp. *Acta Biol. Hung.* 39: 109-119.
- Raes, M.; Michiels, C. and Remacle, J. (1987) Comparative study of the enzymatic defense systems against oxygen-derived free radicals: the key role of glutathione peroxidase. *Free Rad. Biol. Med.* 3: 3-7.
- Rantin, F.T.; Kalinin, A.L.; Glass, M.L. and Fernandes, M.N. (1992) Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) *J. Fish Biol.* 41: 805-812.
- Reischl, E. (1986) High sulphhydryl content in turtle erythrocytes: is there a relation with resistance to hypoxia? *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 723-726.
- Reischl, E. (1989) High sulphidryl rich hemoglobins in reptiles: defense against reactive oxygen species? In: *Nonmammalian Animals, Modell for Biological Research* (Woodhead, A.D., ed.) pp 309-318. CRC Press, Boca Raton.
- Reischl, E. and Dafré, A.L. (1992) Glutathione mixed disulfides and heterogeneity of chicken hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 849-853.
- Rifkind, J.M.; Abugo, O.; Levy, A.; Monticone, R. and Heim, J. (1993) Formation of free radicals under hypoxia. In: *Surviving Hypoxia: Mechanism of Control and Adaptation* (Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M. & van den Thillar, G., eds.) pp. 509-525. CRC Press, Boca Raton.
- Rifkind, J.M.; Zhang, L.; Levy, A. and Manoharan, P.T. (1991) The hypoxic stress on erythrocyte associated with superoxide formation. *Free Rad. Res. Comm.* 12-13: 645-652.

- Rodrigues, M.S. (1994) *Biomassa e produção fitoplanctônica do Lago Camaleão (Ilha da Marcahntaria, Amazonas)*. Tese de Doutorado. INPA/FUA, Manaus-AM. 194p.
- Saint-Paul, U. (1984a) Ecological and physiological investigations of *Colossoma macropomum*, a new species for fish culture in Amazonia. *Mems. Soc. Latinoam. Acuicult.* 5: 501-518.
- Saint-Paul, U. (1984b) Physiological adaptation to hypoxia of a neotropical characoid fish *Colossoma macropomun*, Serrasalminidae. *Env. Biol. Fish.* 11: 53-62.
- Saint-Paul, U. (1986) Potential for aquaculture of south american freshwater fishes: a review. *Aquaculture.* 54: 205-240.
- Saint-Paul, U. and Bernardinho, G. (1988) Behavioral and ecomorphological responses of the neotropical pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalminidae) to oxygen-deficient waters. *Exp. Biol.* 48: 19-26.
- Saint-Paul, U. and Soares, G. M. (1987) Diurnal distribution and behavioral responses of fishes to extreme hypoxia in an floodplain lake. *Env. Biol. Fish.* 20: 91-104.
- Salvo-Souza, R.H. (1990) *Parâmetros hematológicos (série vermelha) de Arapaima gigas (Osteoglossiformes) durante o primeiro ano de vida em cativeiro*. Dissertação de Mestrado. INPA, Manaus. 99p.
- Satoh, Y. and Shikama, K. (1981) Autoxidation of oxymyoglobin: a nucleophilic displacement mechanism. *J. Biol. Chem.* 256: 10272-10275.
- Sawaya, P. (1946) Sobre o consumo de oxigênio por alguns peixes fluviais neotrópicos (Cichlidae - gen. *Cichla* e *Astronotus*). *Bol. Fac. Fil. Cien. Letr. Univ. São Paulo* 11: 335-355.
- Scandalios, J.G. (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- Schmidt, G.W. (1973) Primary production of phytoplankton in three types of amazonian waters. II. The limnology of a tropical floodplain lake in central Amazonia (Lago do Castanho). *Amazoniana* 4: 139-203.
- Scott, A.L. and Rogers, W.A. (1981) Haematological effects of prolonged sublethal hypoxia on channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *J. Fish Biol.* 18: 591-601.

- Scott, E.M. and Harrington, J.P. (1985) Methemoglobin reductase activity in fish erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 82B: 511-513.
- Scott, M.D.; Zuo, L. and Lubin, B.H. (1991a) NADPH, not glutathione, status modulates oxidant sensitivity in normal and glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient erythrocytes. *Blood* 77: 2059-2064.
- Scott, M.D.; Lubin, B.H.; Zuo, L. and Chiu, D.T-Y. (1991b) Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J. Lab. Clin. Med.* 118: 7-16.
- Scott, M.D.; Eaton, J.W.; Kuypers, F.A.; Chiu, D.T-Y. and Lubin, B.H. (1989) Enhancement of erythrocyte superoxide dismutase activity: effects on cellular oxidant defense. *Blood* 74: 2542-2549.
- Shah, S.V. (1995) The role of reactive oxygen metabolites in glomerular disease. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 245-262.
- Shick, J.M. and Dykens, J. A. (1985) Oxygen detoxification in algal-invertebrate symbioses from the great barrier reef. *Oecologia* 66: 33-41.
- Sies, H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks. In: *Oxidative Stress* (H. Sies, ed.), pp.1-8. Academic Press, London.
- Sies, H. (1991) Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am. J. Med.* 91: S31-S38.
- Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215: 213-219.
- Silva, A.F. (1978) *Considerações sobre a criação extensiva do apaiari, Astronotus ocellatus (Cuvier, 1829), em açudes públicos do nordeste brasileiro.* Dissertação de Mestrado. UFCe, Fortaleza. 78p.
- Singhal, P.K.; Beamish, R.E. and Dhalla, N.S. (1983) Potential oxidative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart diseases. *Adv. Exp. Med. Biol.* 161: 391-401.
- Smith, A.C. (1976) Catalase in fish red blood cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 54B: 331-332.
- Smith, J. and Shrift, A. (1979) Phylogenetic distribution of glutathione peroxidase. *Comp. Biochem. Physiol.* 63B: 39-44.

- Snyder, S.H. (1992) Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. *Science* 257: 494-496.
- Soares, M.G.M. (1993) *Estratégias respiratórias em peixes do lago Camaleão*. Tese de Doutorado, INPA/FUA, Manaus. 146p.
- Soares, M.G.M.; Almeida, R.G. and Junk, W.J. (1986) The trophic status of the fish fauna in Lago Camaleão, a macrophyte dominated floodplain lake in the middle Amazon. *Amazoniana* 9: 511-526.
- Soivio, A.; Nikimaa, N. and Wetsman, K. (1980) The blood oxygen binding of hypoxic *Salmo gaidneri*. *J. Comp. Physiol.* 136: 83-87.
- Srivastava, S.K. (1971) Metabolism of red cell glutathione. *Exp. Eye Res.* 11: 294-305.
- Staples, J.F.; Zapol, W.M.; Bloch, K.D.; Nawai, N.; V.M.F. Almeida-Val and Hochachka, P.W. (1995) Nitric oxide responses of air-breathing and water-breathing fish. *Am. J. Physiol.* 37: 816-819.
- Storey, K.B. (1996) Oxidative stress: animal adaptation in nature. *Bras. J. Med. Biol. Res.* (in press).
- Sugiyama, Y.; Yamada, T. and Kaplowitz, N. (1981) Glutathione S-transferases in elasmobranch liver. Molecular heterogeneity, catalytic and binding properties, and purification. *Biochem. J.* 199: 749-756.
- Suzuki, M. and Kurata, M. (1992) Effects of ATP levels on glutathione regeneration in rabbit and guinea-pig erythrocytes. *Comp. Biochem. Physiol.* 103B: 859-862.
- Tappel, M.E.; Chaudiere, J. and Tappel, A.L. (1982) Glutathione peroxidase activities of animal tissues. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 945-949.
- Thomas, P. and Wofford, H.N. (1984) Effects of metals and organic compounds on hepatic glutathione, cysteine, and acid-soluble thiol levels in mullet (*Mugil cephalus* L.). *Toxicol. appl. Pharmacol.* 76: 172-182.
- Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* 27: 502-522.
- Turrens, J. (1991) The potential of antioxidant enzymes as pharmacological agents in vivo. *Xenobiotica.* 21: 1033-1040.

- Turrens, J.; Freeman, B.A.; Levitt, J.G. and Crapo, J.D. (1982a) The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 401-410.
- Turrens, J.; Freeman, B.A. and Crapo, J.D. (1982b) Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 217: 411-421
- Tyler, D.D. (1975) Polarographic assay and intracellular distribution of superoxide dismutase in rat liver. *Biochem. J.* 147: 493-501.
- Val, A.L. (1986) *Hemoglobinas de Colossoma macropomum Cuvier, 1818 (Charcoidei, Pisces): Aspectos adaptativos (Ilha da Marchantaria, Manaus, AM)*. Tese de Doutorado. INPA/FUA, Manaus. 112p
- Val, A.L. (1993) Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh waters. In: *The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptations to Environment and Mode of Life*. (Bicudo, J.E.W., ed.) pp. 43-53. CRC Press, Boca Raton.
- Val, A.L. (1995) Oxygen transfer in fishes: Morphological and molecular adjustments. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 28: 1119-1127.
- Val, A.L. & Almeida-Val, V.M. (1988) Adaptative features of Amazon fishes. Hemoglobins of *Brycon cf cephalus* and *Brycon cf erythropterum* (Pisces). *Braz. J. Gen.* 11: 27-39.
- Val, A.L. and Almeida-Val, V.M.F. (1995) *Fishes of the Amazon and their Environment. Physiological and Biochemical Aspects*. Springer, Heidelberg. 224p.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Schwantes, A.R. and Schwantes, M.L. (1984) Biological Aspects of Amazonian fishes. I. Red blood cell phosphates of schooling fishes (genus *Semaprochilodus*, Prochilodontidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 78B: 215-217.
- Val, A.L.; Schwantes, A.R.; Almeida-Val, V.M.F. and Schwantes, M.L. (1985) Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect from lotic and lentic *Hypostomus regani* populations (São Paulo-Brasil). *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 737-741.
- Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F. and Monteiro, P.J.C. (1987) Aspectos biológicos de peixes amazônicos. IV. Padrões eletroforéticos de 22 espécies coletadas na Ilha da Marchantaria. *Acta Amazônica* 16/17: 125-134.

- Val, A.L.; Schwantes, A.R. and Almeida-Val, V.M.F. (1986) Biological Aspects of Amazonian fishes. VI. Hemoglobins and whole blood properties of *Semaprochilodus* species (Prochilodontidae) at two phases of migration. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B: 659-667.
- Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. and Affonso, E.G. (1990) Adaptative features of Amazon fishes. Hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). *Comp. Biochem. Physiol.* 97B: 435-440.
- Val, A.L., Affonso, E.G. and Almeida-Val, V.M.F. (1992) Adaptative features of Amazon fishes. Blood characteristics of Curimatã (*Prochilodus nigricans*, Osteichthyes). *Physiol. Zool* 65: 832-843.
- Val, A.L.; Lessard, J. and Randall, D.J. (1995) Effects of hypoxia on rainbow trout (*Onchorychus mikiss*): Intraerythrocytic phosphates. *J. exp. Biol.* 198: 305-310.
- Val, A.L.; Mazur, C.F.; Salvo-Souza, R.H. and Iwama, G.K. (1994) Effects of experimental anaemia on intraerythrocytic phosphate levels in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J. Fish Biol.* 45: 269-277.
- Vanderkooi, J.M.; Erecinska, M. and Silver, I.A. (1991) Oxygen in mammalian tissue: methods of measurement and affinities of various reactions. *Am. J. Physiol.* 260: C1131-C1150.
- Verheyen, E.; Blust, R. and Declair, W. (1994) Metabolic rate, hypoxia tolerance and aquatic surface respiration of some lacustrine and riverine African cichlid fishes (Pisces: Cichlidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 107A: 403-411.
- Víg, E. and Nemcsók, J. (1989) The effects of hypoxia and paraquat on the superoxide dismutase activity in different organs of carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish Biol.* 35: 23-25.
- Víg, E.; Gabryelak, T.; Leiko, W.; Nemcsók, J. and Matkovics, B. (1989) Purification and characterization of Cu,Zn superoxide dismutase from common carp liver. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B: 395-397.
- Vijayalakshmi, S. (1980) In vivo effects of Sumithion on tissue respiration and enzyme activity in the fish, *Etrophus maculatus*. *Experientia* 36: 1280-1281.

- Wallace, W.J.; Houtchens, R.A.; Maxwell, J.C. and Caughey, W.S. (1982) Mechanism of autooxidation for hemoglobins and myoglobins. *J. Biol. Chem.* 256: 4966-4977.
- Wdzieczak, J.; Zalésna, G.; Bartkowiak, A.; Witas, H. and Leyko, W. (1981) Comparative studies on superoxide dismutase, catalase, and peroxide levels in erythrocytes of different fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 68B: 357-358.
- Wdzieczak, J.; Zalésna, G.; Wujec, E. and Pérès, G. (1982) Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B: 361-365.
- Weber, C.A.; Duncan, C.A.; Lyons, M.J. and Jenkinson, S.G. (1990) Depletion of tissue glutathione with diethyl maleate enhances hyperbaric oxygen toxicity. *Am. J. Physiol.* 258: L308-L312.
- Weber, R.E. (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* (Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. and Randall, D.J., eds.) pp. 75-90. INPA, Manaus
- Weber, R.E. and Jensen, F.B. (1988) Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 161-79
- Weber, R.E. and 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.
- Weiss, S.J. (1980) The role of superoxide in the destruction of erythrocyte target by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 255: 9912-9917.
- White, F.N. (1978) Comparative aspects of vertebrate cardiorespiratory physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 40: 471-499.
- Wilhelm Filho, D. (1994) *Análise comparativa das defesas antioxidantes em peixes*. Tese de Doutorado. UFRGS, Porto Alegre. 120p.
- Wilhelm Filho, D. and Boveris, A. (1993) Antioxidant defences in marine fish. II-Elasmobranchs. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C: 415-418.

- Wilhelm Filho, D. and Marcon, J.L. (1996) Antioxidant defenses in fish of the Amazon. In: *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon* (Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. and Randall, D.J., eds.) pp. 299-312. INPA, Manaus.
- Wilhelm Filho, D. and Weber, R.E. (1983) Functional characterization of hemoglobins from south Brazilian freshwater teleosts - II. Three cichlids (*Crenicichla lepidota*, *Aequidens portalegreiensis* and *Geophagus brasiliensis*). *Comp. Biochem. Physiol.* 75A: 475-482.
- Wilhelm Filho, D.; Giulivi, C. and Boveris, A. (1993) Antioxidant defences in marine fish. I - Teleosts. *Comp. Biochem. Physiol.* 106C: 409-413.
- Wilhelm Filho, D.; Eble, G.J.; Kassner, G.; Caprario, F.X.; Dafré, A.L. and Ohira, M. (1992a) Comparative hematology in marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A: 311-321.
- Wilhelm Filho, D.; González-Flecha, B. and Boveris, A. (1994) Gill diffusion as a physiological strategy for hydrogen peroxide elimination in fish. *Bras. J. Med. Biol. Res.* 27: 2879-2882.
- Wilhelm Filho, D.; Marcon, J.L.; Caprario, F.X. and Nollis, A. (1992b) Intraerythrocytic nucleoside triphosphates in marine fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 102A: 323-331.
- Wilkes, P.R.H.; Walker, R.L.; McDonald, C.G. and Wood, C.M. (1981) Respiratory, ventilatory, acid-base and ionoregulatory physiology of the white sucker *Catostomus commersoni*: the influence of hyperoxia. *J. exp. Biol.* 91: 239-254.
- Wilson Jr, R.R. and Knowles, F.C. (1987) Temperature adaptation of fish hemoglobins reflected in rates of autoxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 255: 210-213
- Winston, G.W. (1991) Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 100C: 173-176.
- Witas, H.T.; Gabryelak, T. and Matkovics, B. (1984) Comparative studies on superoxide dismutase and catalase activities in livers of fish and other Antarctic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 77C: 409-411.
- Wood, C.M. (1991) Branchial ion and acid-base transfer in freshwater teleost fish: environmental hyperoxia as a probe. *Physiol. Zool.* 64: 68-102.
- Wood, C.M. and Jackson, E.B. (1980) Blood acid-base regulation during environmental hyperoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Resp. Physiol.* 42: 351-372.

Yoshikawa, T.; Furukawa, Y.; Wakamatsu, Y.; Takemura, S.; Tanaka, H. and Kondo, M.
(1982) Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats. *Biochem. Med.* 27: 207-213.

Zafiriou, O.C. (1987) Is the sea water a radical solution? *Nature* 325: 481-482.

Zar, J.H. (1984) Biostatistical analysis (2nd edition). Prentice-Hall, New Jersey. 718p.