INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA - GCBEv

O efeito da hipóxia sobre o metabolismo e a expressão dos genes HIF-1α e VEGF do ciclídeo amazônico *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)

RAMON BARROS BAPTISTA

MANAUS/ AM

Fevereiro, 2011

RAMON BARROS BAPTISTA

O efeito da hipóxia sobre o metabolismo e a expressão dos genes HIF-1α e VEGF do ciclídeo amazônico *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)

Orientador: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida-Val

Co-orientador: Dr. Sérgio Ricardo Nozawa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

MANAUS/ AM

Fevereiro, 2011

A Jacqueline Meneguelli Barros, mãe, companheira e amiga.

Agradecimentos

À Dra. Vera Val pela orientação repleta de anseios, confiança e incentivos que permitiram a realização deste trabalho.

Ao Dr. Adalberto Val pelo doutrinamento e pelo exemplo irrestrito como empreendedor e membro relevante da comunidade científica.

À minha mãe, Jacqueline Meneguelli Barros, pelo eterno amor e incentivo determinante na minha vinda para Manaus e no meu crescimento profissional.

Ao meu pai, Ricardo José Baptista, por fazer minha vida, estando longe da família, muito mais próxima e feliz.

À minha irmã, Winnie Barros Baptista, pelo exemplo de beleza entre as mulheres e mães.

À Nazaré Paula (“Naza”) por todo o apoio logístico dispensado diariamente, determinante para o adequado desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Nozawa por todo o conhecimento transmitido durante o meu ingresso e crescimento neste universo da biologia molecular.

À Nayara Castro por todas as conversas, aulas de forró, ajuda nos sequenciamentos, nas análises de bioinformática e pelo exemplo de companheirismo e profissionalismo dentro de um laboratório de biologia molecular.

À Ana Helena por me permitir ter tantas boas lembranças das minhas viagens amazônicas, com todas suas histórias e personagens.

À Dr. Katherine Lòpez Vazquez, por todas as críticas, conversas, aulas de espanhol e ajuda nas análises de qPCR.

Aos colegas do LEEM, pelos enriquecedores debates, pela ajuda nos processos de organização e realização dos experimentos, e pelos inúmeros momentos de descontração.

À todos os amigos que fiz na turma do GCBEv/ 2009 e pelo prazer de tê-los acompanhados em festas, cursos, viagens e experiências inesquecíveis.

À Alessandra e Thamara por toda ajuda, atenção e respeito para com os alunos do curso de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

A todos os amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

À Natália de Castro, por todo amor, companheirismo e apoio na reta final.

“ O segredo do sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o ânimo” (Winston Churchill)

The effect of hypoxia on metabolism and expression of HIF-1α and VEGF genes of the amazon cichlid *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)

Abstract

Amazonian fishes exhibit a variety of strategies related to oxygen uptake in response to shortages of gas into water, related to their lifestyle and evolution. The *Astronotus ocellatus* is a species of extreme tolerance to hypoxia and some of their physiological, biochemical and molecular techniques could be evaluated in this study. Under conditions of severe hypoxia (0.5 mgO2 / L) the hematological parameters are primary responses and were adjusted to increase and make more efficient the carrying of oxygen to tissues, observed by the increase of hematocrit, the number of circulating erythrocytes and hemoglobin concentration. Furthermore, increased glucose demonstrated its importance in the supply of carbohydrate metabolism, especially in anaerobic glycolysis, in times of shortage of oxygen. Another strategy, and perhaps most important in increasing tolerance to hypoxia of the species was widespread suppression of metabolism evidenced by the reduction in activity of enzymes MDH and CS in tissues such as liver, heart and brain, as well as reducing glycolytic enzyme LDH in the brain. Increased expression of HIF-1α and VEGF genes in conditions of severe hypoxia revealed the importance of these, respectively, in the transcription of specific target genes related to hypoxia and increased vascularity of tissues, facilitating the transport of oxygen through the blood. As the oscar experiencing situations of daily fluctuation in oxygen levels in their natural habitat, an important strategy in the face of these periodic events is rapid and adequate recovery after hypoxic stress, observed in this work through the reorganization of hematological parameters, the enzymatic machinery and transcription of essential genes for the resumption of oxygen.

O efeito da hipóxia sobre o metabolismo e a expressão dos genes HIF-1α e VEGF do ciclídeo amazônico *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831)

Resumo

Os peixes amazônicos apresentam inúmeras estratégias ligadas à captação de oxigênio em resposta aos períodos de escassez deste gás no meio aquático, as quais estão relacionadas à sua evolução e estilo de vida. O *Astronotus ocellatus* é uma espécie de extrema tolerância à hipóxia e algumas de suas respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares puderam ser avaliadas neste trabalho. Em condições de hipóxia severa (0,5 mgO_2/L) os parâmetros hematológicos são respostas primárias que se ajustaram para aumentar e tornar mais eficiente o carreamento de oxigênio aos tecidos, observado através do aumento do hematócrito, do número de eritrócitos circulantes e da concentração de hemoglobina. Além disso, o aumento da glicose demonstrou sua importância no abastecimento do metabolismo de carboidratos, principalmente da glicólise anaeróbica, em períodos de escassez de oxigênio. Outra estratégia, e talvez a mais importante no aumento da tolerância desta espécie à hipóxia, é a supressão generalizada do metabolismo, evidenciada por meio da redução na atividade das enzimas MDH e CS em tecidos como fígado, coração e cérebro, além da redução da enzima glicolítica LDH no cérebro. O aumento da expressão dos genes HIF-1α e VEGF em condições de hipóxia severa revelou a importância destes genes, respectivamente, na transcrição de genes alvo específicos relacionados à hipóxia e no aumento da vascularização dos tecidos, facilitando o transporte de oxigênio através do sangue. Como o acará-açu vivencia situações de flutuação diária nos níveis de oxigênio em seu habitat natural, uma importante estratégia diante destes eventos periódicos é sua recuperação rápida e adequada após o estresse hipóxico, observada neste trabalho através da reorganização dos parâmetros hematológicos, da maquinaria enzimática e da transcrição de genes essenciais durante a retomada de oxigênio.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....vii
LISTA DE TABELAS.....ix
1. Introdução 1
1.1. Os ambientes hipóxicos da Amazônia.....1
1.2. Adaptabilidade da ictiofauna à hipóxia.....3
1.3. A expressão de genes ligados à hipóxia.....7
1.4. Astronotus ocellatus.....9

2. Justificativa.....12

3. Objetivos.....12
3.1. Objetivo Geral.....12
3.2. Objetivos Específicos.....12

4. Material & Métodos.....13
4.1. Animais Experimentais.....13
4.2. Experimentos 13
4.3. Variáveis Físicas e Químicas da Água 14
4.4. Análises Hematológicas 15
4.5. Análises Enzimáticas.....16
4.6. Expressão dos Genes HIF-1α e VEGF.....17
4.7. Análises Estatísticas.....23

5. Resultados 24
5.1. Mortalidade 24
5.2. Parâmetros Físicos e Químicos da Água.....24
5.3. Parâmetros Hematológicos 24
5.4. Análises Enzimáticas.....28
5.5. Expressão dos Genes HIF-1α e VEGF.....33

6. Discussão.....37
6.1. Parâmetros Hematológicos.....37
6.2. Análises Enzimáticas.....40
6.3. Expressão dos Genes HIF-1α e VEGF.....42

7. Conclusões.....45

6. Referências Bibliográficas.....46
.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas da regulação da expressão gênica por meio da HIF-α em condições de normóxia e hipóxia. Modificado de Bracken et al., 2003. 8

Figura 2. Vista lateral de um exemplar de Astronotus ocellatus evidenciando sua forma, coloração e seus ocelos no pedúnculo caudal e nadadeira dorsal. Foto: U.S Geological Survey/ Leo Nico 10

Figura 3. Valores de hematócrito de exemplares de *A.ocellatus* expostos a normóxia, hipóxia e recuperação à hipóxia. Os valores estão apresentados como média + erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05). 25

Figura 4. Concentração de hemoglobina em exemplares de *A.ocellatus* expostos a normóxia, hipóxia e recuperação à hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05). 25

Figura 5. Número de eritrócitos circulantes em exemplares de *A.ocellatus* expostos a normóxia, hipóxia e recuperação à hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05). 26

Figura 6. Valores de Volume Corpuscular Médio (A), Hemoglobina Corpuscular Média (B) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (C) em exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05). 27

Figura 7. Níveis de glicose sanguínea em exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05). 28

Figura 8. Atividade da MDH no fígado de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05). 29

Figura 9. Atividade da MDH no coração de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a, b e c] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).. 29

Figura 10. Atividade da MDH no músculo de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a] indica ausência de diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05). 30

Figura 11. Atividade da MDH no cérebro de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a] indica ausência de diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).. 30

Figura 12. Atividade da CS no fígado de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).. 31

Figura 13. Atividade da CS no cérebro de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).. 31

Figura 14. Atividade da CS no músculo de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a] indica ausência de diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).. 32

Figura 15. Atividade da LDH no cérebro de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a e b] indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentosentresi(p>0,05).....32

Figura16. Eletroforese em géis de agarose 1% contendo o RNA total (A) e o cDNA (B) de amostras de fígado de *Astronotus ocellatus* nas condições de normóxia, (N), hipóxia (H) e recuperação (R) 33

Figura 17. Eletroforese em géis de agarose 1% contendo o produto das amplificações dos oligonucleotídeos específicos dos genes 18S, HIF-1α e VEGF em diferentes temperaturas. M 1kb= marcador de peso molecular de 1 kilobases.....33

Figura 18. Curva de desnaturação para os genes 18S (A), HIF-1α (B) e VEGF (C). No eixo Y está representada a fluorescência emitida durante o aumento da temperatura e no eixo X a variação de temperatura. Cada linha da curva representa uma amostra submetida a qRT-PCR.....34

Figura19. Curva padrão e de diluição, respectivamente, para 18S (A e B), HIF-1α (C e D) e VEGF (E e F).....35

Figura 20. Razão de expressão do HIF-1α no fígado de *Astronotus ocellatus* em condições de hipóxia, normóxia e recuperação, normalizado por um gene endógeno (18S). Os valores estão apresentados como média ± erro padrão.....36

Figura 21. Razão de expressão do VEGF no fígado de *Astronotus ocellatus* em condições de hipóxia, normóxia e recuperação, normalizado por um gene endógeno (18S). Os valores estão apresentados como média ± erro padrão.....36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos inespecíficos utilizados na reação de PCR.....18

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR.....22

Tabela 3. Parâmetros físicos e químicos da água nas condições experimentais.....24

Tabela 4. Valores obtidos a partir da análise de regressão linear, para cálculo da eficiência de amplificação (E). S: Coeficiente angular da reta; R^2: coeficiente de correlação de Pearson $r > 0,95$.....35

1. Introdução

1.1. Os ambientes hipóxicos da Amazônia

A bacia amazônica é o maior sistema fluvial do planeta e está coberta pela maior floresta tropical existente. Sua malha hídrica drena uma área maior que sete milhões de Km² e distribui-se em inúmeras sub-bacias cujas vazantes são fortemente influenciadas pelos regimes pluviométricos sazonais (Sioli, 1990). A elevada pluviosidade e sua distribuição heterogênea ao longo do ano influenciam diretamente as oscilações do nível dos rios da bacia, conhecidas como pulsos de inundação, divididos em quatro fases: enchente, cheia, vazante e seca (Junk et al., 1989). No período das cheias, com o leito dos rios amazônicos transbordando e avançando sobre as florestas adjacentes, pode haver um aumento de até 300 mil Km² de áreas alagadas na bacia (Junk & Furch, 1993).

Segundo Sioli (1990), a atual região amazônica é o resultado de seu clima e de sua história geológica, que, por sua vez, apresenta três eventos geotectônicos principais: a formação dos escudos cristalinos das Guianas e do Brasil, que delimitou, respectivamente, os limites norte e sul da bacia; o soerguimento do Andes, que promoveu um amplo represamento de toda a planície amazônica e uma paisagem de inundação com amplos rios e lagos, contribuindo para o delineamento do sistema atual de escoamento para o Atlântico; e, por último, a consequente formação da planície sedimentar da bacia a partir dos sedimentos carreados pelos dois eventos anteriores, originando uma planície de rios meândricos e vales de solos macios com densas e contínuas coberturas florestais. Estes três eventos foram determinantes para a estruturação hidrológica da bacia Amazônica, bem como, seus diferentes tipos de água (branca, preta e clara) (Sioli, 1990), suas diferenças físico-químicas (Kuchler et al. 2000) e considerável diversidade de ecossistemas, determinantes para a organização biológica da bacia (Lundberg, 1998).

Os variados ecossistemas aquáticos que compõem a bacia amazônica são periodicamente ampliados em função dos pulsos de inundação, promovendo modificações ecológicas marcantes e o surgimento de sistemas hidrológicos complexos como rios, lagos, paranás, igarapés e igapós (Junk, 1984; Sioli, 1984), gerando uma interminável diversidade de nichos e ambientes habitáveis pelos organismos aquáticos (Goulding, 1980). Tamanha variedade de habitats resultou numa ictiofauna extremamente diversificada, de modo que a abundância, distribuição e composição destes organismos estão intimamente relacionadas às suas adaptações às condições limnológicas destes múltiplos ambientes (Val & Almeida-Val, 1995).

Diversos fatores ambientais são determinantes para a estruturação das comunidades de peixes nos ambientes amazônicos citados, dentre eles, as altas temperaturas enfrentadas, baixos valores de pH, variações no volume dos corpos d'água, a incidência de raios ultravioletas, oferta de alimentos e a presença de compostos tóxicos de origem natural e antrópica (Goulding, 1980; Alabaster & Lloyd, 1982; Val et al., 2004). Além destes, um dos principais fatores que afetam a constituição destas comunidades é a disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, já que os peixes dependem de um fornecimento adequado deste gás para a oxigenação de seus tecidos (Baldisseroto, 2009), e suas alterações interferem diretamente nos processos biológicos (Junk et al., 1983) e bioquímicos destas áreas (Hochachka & Somero, 2002).

Segundo Junk (1997), a concentração do oxigênio nos ambientes aquáticos é determinada por fatores como a temperatura da água, pressão atmosférica, quantidade de substâncias dissolvidas, taxas de respiração de animais e plantas, difusão de luz, a decomposição de matéria orgânica e oxidação de íons metálicos. Somados a isso, a forma, profundidade e tamanho dos corpos d'água, intensidade dos ventos, presença de comunidades vegetais e comunicação com o rio principal podem também se tornar determinantes para as concentrações de oxigênio (Junk et al., 1983; Val, 1993; Crampton, 1996).

Em decorrência da oscilação do nível dos rios amazônicos, as concentrações de oxigênio dissolvido na água se tornam fatores críticos, principalmente nos ambientes recém alagados de várzea e igapó, quando os rios atingem seus níveis máximos (Junk et al., 1989). Nestas áreas recém alagadas, a baixa profundidade da coluna d'água favorece o aumento da temperatura e, consequentemente, o aceleramento das reações metabólicas dos organismos presentes (Junk, 1997). Além disto, durante as cheias, estes corpos d'água apresentam altas taxas de decomposição do material presente no solo e do material alóctone fornecido pela floresta (Goulding, 1980). Baixas taxas de fotossíntese do fitoplâncton e forte presença de macrófitas, fornecendo grandes quantidades de biomassa, também são detectadas (Junk et al., 1983). Todos estes fatores interferem significativamente nas concentrações de oxigênio dissolvido na água, de modo que variações marcantes podem ser detectadas ao longo de um único dia, ocorrendo uma supersaturação de oxigênio ao redor do meio-dia, por efeito relevante da fotossíntese, e valores chegando à zero ao longo da noite (Almeida-Val et al., 2000). Sendo assim, muitos corpos d'água da Amazônia são conhecidos como ambientes hipóxicos, pois fornecem quantidades limitantes de oxigênio (Gessner, 1961; Schimidt, 1973; Kramer et al., 1987).

1.2. Adaptabilidade da ictiofauna à hipóxia

Os peixes surgiram no início do período Cambriano (cerca de 500 milhões de anos atrás) e constituíram a base para a evolução dos vertebrados (Shu et al., 1999). Sucessivos eventos de duplicação do genoma, origem de genes adicionais e radiações adaptativas fizeram parte da história evolutiva destes organismos, tornando-os o grupo mais diverso e de maior diversidade genética dentre os vertebrados (Ohno, 1970). Esta diversidade é a matéria prima responsável por todas as adaptações evolutivas apresentadas por este grupo, incluindo aquelas relacionadas às mudanças de disponibilidade de oxigênio no ambiente (Leggatt & Iwama, 2003).

As variações limnológicas dos ambientes hipóxicos favoreceram o desenvolvimento de mecanismos adaptativos eficientes que permitem que os peixes habitem condições ambientais extremas (Almeida-Val & Hochachka, 1995). O espectro de respostas apresentadas, principalmente pelas espécies tropicais, sugere que a eficiência dos mecanismos de tolerância à hipóxia seja uma característica comum aos peixes da Amazônia (Val, 1993; Almeida-Val et al., 1995). Estas estratégias se manifestam em diversos níveis de organização biológica, como modificações comportamentais, morfológicas, fisiológicas e moleculares (Van den Thillart, 1982, Almeida-Val & Val, 1990; Val et al., 1998). O resultado de tais processos se apresenta por meio da ocupação de ambientes preferenciais, variados estilos de vida e intrigantes tipos de respiração. As diferenças marcantes na tolerância e nas adaptações de diferentes espécies às condições de hipoxia sugerem que as variações nos níveis de oxigênio atuaram como um importante agente seletivo durante a história evolutiva dos peixes amazônicos, atribuindo-lhes uma plasticidade fenotípica sem precedentes (Almeida-Val et al., 1995).

Uma importante adaptação em resposta à hipoxia é a respiração na superfície aquática (RSA), em que os peixes exploram as camadas superiores da coluna d'água, acessando uma fina camada de água bem oxigenada oriunda da difusão do oxigênio atmosférico (Kramer & McClure, 1982; Verheyen et al., 1994). Esta é uma adaptação comportamental apresentada por muitas espécies de peixes amazônicos de diversas ordens como Characiformes, Siluriformes, Perciformes, Cyprinodontiformes e Osteoglossiformes (revisto por Val & Almeida-Val, 1995). Além disso, espécies como o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o matrinxã (*Brycon amazonicus*) apresentam a capacidade morfológica de expandir o lábio inferior para melhorar a captação da água bem oxigenada da superfície (Braum & Junk, 1982). Apesar de ser um método eficiente no consumo de oxigênio, a RSA necessita que os peixes permaneçam ou realizem incursões periódicas à superfície da

água, podendo aumentar drasticamente à suscetibilidade a predação por peixes de respiração aérea ou predadores terrestres e aéreos (Kramer et al., 1983).

Além da respiração na superfície, muito importante aos organismos de respiração estritamente aquática, algumas espécies de peixes amazônicos desenvolveram a capacidade de respirar o ar atmosférico, possibilitando a exploração de um maior número de ambientes (Almeida-Val & Hochachka, 1995). Dentre os peixes que possuem a respiração aérea obrigatória, podemos citar a pirambóia (*Lepidosiren paradoxa*), único peixe da América do Sul a apresentar um pulmão verdadeiro, o pirarucu (*Arapaima gigas*), que possui uma bexiga natatória modificada para realizar trocas gasosas e o poraquê (*Electrophorus eletricus*), cuja região buco-faringeana é altamente vascularizada, promovendo a troca gasosa. Quanto aos peixes de respiração aérea facultativa, muitos siluriformes das famílias Loricaridae e Callichthydae utilizam o estômago e o intestino como órgãos acessórios às trocas gasosas (revisto por Val & Almeida-Val, 1995).

Em condições de hipóxia, os peixes apresentam uma série de respostas respiratórias que atuam paralelamente aos ajustes fisiológicos (Evans, 1998). Segundo Hughes (1984), uma das primeiras respostas apresentadas em condições limitantes de oxigênio é o aumento dos movimentos operculares, o que leva a uma maior ventilação e perfusão da água pelas brânquias, aumentando a capacidade de oxigenação do sangue nas lamelas branquiais. Em seguida, ocorre uma redução na freqüência do batimento cardíaco (bradicardia) e o aumento da força de contração do coração, fazendo com que este gaste menos energia, aumente sua oxigenação, por maior permanência do sangue no ventrículo, e regule a distribuição do fluxo sanguíneo. Finalmente, estes eventos se associam a uma série de ajustes bioquímicos e metabólicos que proporcionam melhor captação de oxigênio, sua distribuição aos tecidos e manutenção das rotas metabólicas mais vantajosas para sua utilização (Hochachka & Somero, 2002).

As principais estratégias metabólicas utilizadas pelos peixes de respiração estritamente aquática em condições de hipoxia são a supressão do metabolismo oxidativo e a ativação do metabolismo glicolítico anaeróbico (Almeida-Val & Hochachka, 1995). Estes processos objetivam o melhor aproveitamento energético, diminuindo a produção e o consumo de ATP, a demanda de oxigênio e ativando formas anaeróbicas de produção de ATP (Chippari-Gomes et al., 2005). Além disso, ajustes metabólicos destinados à captação de oxigênio podem se associar simultaneamente a outros, fazendo com que diferentes tecidos apresentem diferentes arranjos metabólicos na função de conferir maior resistência à hipóxia (Hochachka & Lutz, 2001). Em muitos casos, os peixes amazônicos de respiração estritamente aquática apresentam adaptações metabólicas mais eficientes às condições

hipóxicas que os peixes de respiração aérea, ou aqueles com adaptações anatômicas, sendo os ciclídeos um ótimo exemplo disto (Muusze et al., 1998; Chippari-Gomes, 2002).

A adaptação dos peixes aos ambientes hipóxicos envolve, também, ajustes nos parâmetros hematológicos, níveis de fosfatos intraeritrocitários e frações hemoglobínicas (Val et al., 1985). Geralmente, ocorre o aumento da porcentagem de eritrócitos (hematócrito) e da concentração de hemoglobinas, aumentando a eficiência da captação e do transporte de oxigênio aos tecidos. Por outro lado, são compostos fosfatados intraeritrocitários, como ATP e GTP (mais freqüente em espécies dulcícolas tropicais), que regulam a afinidade da hemoglobina pelas moléculas de oxigênio disponíveis no meio. Com a diminuição destes compostos ocorre uma maior afinidade hemoglobina-oxigênio, aumentando a captação do oxigênio do meio, porém dificultando sua liberação aos tecidos, fazendo com que muitas espécies adaptadas ao ambiente hipóxico sejam pouco ativas (Val et al., 1985).

A hipóxia pode ainda estimular a liberação de catecolaminas por impulsos nervosos, que, além de dilatarem as arteríolas aferentes (que levam sangue ao coração) e contraírem as arteríolas eferentes (que levam sangue aos tecidos), aumentam a afinidade da hemoglobina pelo oxigênio (Val, 1993). Com isso, o balanço metabólico na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio pode variar significativamente de acordo com a tolerância e a adaptabilidade das espécies aos ambientes hipóxicos.

Em condições de hipóxia, os peixes apresentam variações marcantes nas concentrações de glicogênio nos tecidos e de metabólitos plasmáticos como a glicose, o lactato e ácidos graxos (Van den Thillart & Van Waarde, 1985, Chippari-Gomes, 2002). A principal reserva energética dos peixes é o glicogênio, sendo produzido e estocado em períodos de baixa exigência energética através da glicogênese e, em situações hipóxicas, é rapidamente degradado (glicogenólise) para a mobilização da glicose que abastecerá o metabolismo anaeróbico (reduzindo a concentração de glicogênio nos tecidos) (Chippari-Gomes et al., 2005). Por isso, a sobrevivência de algumas espécies a longos períodos de hipoxia ou anóxia (ausência total de oxigênio) pode estar ligada às reservas de glicogênio, principalmente, no músculo vermelho, coração e fígado (Driedzic & Hochachka, 1978; Hochachka & Somero, 2002). A glicose e o lactato também estão ligados diretamente ao funcionamento da glicólise anaeróbica em condições de hipóxia. Neste processo, a glicose (principal combustível do metabolismo dos carboidratos) é convertida em lactato (produto final) na ausência de oxigênio, gerando duas moléculas de ATP por molécula de glicose. Deste modo, a concentração destes metabólitos encontra-se geralmente aumentada nos tecidos e no sangue, sendo rapidamente oxidados com a volta da disponibilidade do oxigênio (Lopes, 2003). Neste sentido, os níveis circulantes de glicose e a disponibilidade de

oxigênio são inversamente proporcionais (efeito Pasteur), pois em condições limitantes de oxigênio, há um aumento drástico da demanda de glicose para a manutenção da produção de ATP. Por fim, as taxas de ácidos graxos em peixes sob condições hipóxicas tendem a decair, porém menos acentuadamente em tecidos como o coração e o cérebro. Estes tecidos, mesmo ativando significativamente o metabolismo anaeróbico durante a hipóxia, são altamente dependentes do metabolismo oxidativo, mantendo uma taxa de oxidação da glicose e de ácidos graxos. Neste processo, as moléculas de hidrogênio liberadas geram energia ao serem transportadas na cadeia respiratória, produzindo ATP (Chippari-Gomes, 2002; Lopes, 2003; Champe, 2006).

Várias etapas do processo de ativação do metabolismo anaeróbico e supressão do metabolismo oxidativo envolvem a participação de enzimas chaves, ajustando suas atividades de modo específico aos diferentes tecidos nas diferentes espécies. Uma das enzimas mais estudadas é a Lactato-desidrogenase (LDH) que promove a conversão reversível de piruvato a lactato, no fim da glicólise anaeróbica, indicando a capacidade anaeróbica dos tecidos mediante maior atividade da enzima (Almeida-Val & Val, 1993). Muitas espécies de peixe podem ainda reduzir o metabolismo anaeróbico nestes tecidos como resultado da supressão geral do seu metabolismo, como no caso do acará-disco (*Symphysodon aequefasciatus*) (Chippari-Gomes, 2002), do acará comum (*Cichlasoma amazonarum*) (Almeida-Val et al., 1995) e do *Killlifish* (*Fundulus sp.*) (Greaney et al., 1980).

Além da LDH, outras enzimas têm sido estudadas no monitoramento fisiológico dos peixes amazônicos em condição de hipoxia, dentre elas, as enzimas glicolíticas Piruvato Kinase (PK), Hexoquinase (HK) e Fosfofrutoquinase (PFK), que catalisam reações irreversíveis de alta energia. Além destas, as enzimas Malato Desidrogenase (MDH) e Citrato Sintase (CS), do metabolismo oxidativo, e a 3- Hidroxiacil CoA Desidrogenase (HOAD), do metabolismo lipídico, são enzimas utilizadas como indicadoras do balanço dos metabolismos aeróbico e anaeróbico nos peixes (Almeida-Val & Farias, 1996; Driedzic & Almeida-Val, 1996; West et al., 1999; Chippari-Gomes et al., 2003; Lopes, 2003).

Segundo Markert (1975), os eventos de duplicação do genoma e seus subseqüentes processos mutacionais, possibilitaram a origem de diferentes formas moleculares das enzimas, as isozimas, fato ocorrido com a maioria dos sistemas isozímicos. As isozimas atuam diferentemente em cada tecido, refletindo a expressão dos genes necessários às necessidades metabólicas sob características ambientais específicas (Almeida-Val et al., 1995), e, por isso, são, também, excelentes ferramentas para a detecção e análise de ajustes nos níveis evolutivo, comportamental, morfológico, fisiológico, genético, bioquímico e molecular (Nevo, 1990).

1.3. A expressão de genes ligados à hipóxia

As adaptações apresentadas pelas células, tecidos e organismo como um todo, em condições de hipóxia, dependem diretamente da regulação da expressão de genes importantes às especificidades fisiológicas. Os mecanismos pelos quais as células respondem à diminuição da pressão parcial de oxigênio são ainda obscuros, mas certamente resultam de alterações na expressão gênica através de alterações nas taxas de transcrição e/ou da estabilidade do RNA. Os genes envolvidos nestes processos têm ganhado notoriedade devido ao crescente interesse biológico, no nível molecular, sobre o papel do oxigênio no desenvolvimento, fisiologia e patologia dos organismos. Essencialmente, estes estudos gênicos estão voltados para os processos de eritropoiese, síntese de hemoglobina, angiogênese, transporte da glicose, metabolismo de carboidratos, metabolismo de catecolaminas, supressão do crescimento, entre outros (revisto por Nikinmma & Rees, 2005).

Ao longo da última década, tem-se notado que o desencadeamento da expressão dos inúmeros genes regulados pela hipóxia ocorre por meio do recrutamento de fatores de transcrição específicos a estas condições, de modo que seus produtos protéicos ajudam, entre outras funções, na manutenção da homeostase dos organismos (Nikinma & Rees, 2005). Dentre os fatores de transcrição mais estudados estão o *nuclear factor Kappa* (NF-kB), *cyclic AMP-response element-binding protein* (CREB), *activating protein-1* (AP-1), p53, *early growth response-1* (Egr-1) *nuclear factor for interleukin* 6 (NF-IL6) e, principalmente, o *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) (Nanduri et al., 2008). A partir de estudos em mamíferos, foi notado que o *hypoxia-inducible factor-1* (HIF-1) é o principal responsável pela transcrição de genes em condições hipóxicas. O produto deste gene não induz apenas a expressão de genes envolvidos na glicólise, eritropoiese, metabolismo de catecolaminas e angiogênese durante condições de hipóxia, mas também de transposons, genes do metabolismo do ferro (como a transferrina e receptores de transferrina), genes supressores do crescimento e inúmeros outros genes não diretamente ligados à ausência de oxigênio (revisto por Bracken et al., 2003).

O HIF-1 é um heterodímero, descoberto durante estudos da regulação do gene eritropoietina (EPO), e é constituído por duas subunidades protéicas, conhecidas como HIF-α e HIF-β. A subunidade HIF-α possui três isoformas, HIF-1α, HIF-2α e HIF-3α, e é única para respostas ligadas à hipoxia, enquanto a subunidade HIF-β é considerada um translocador nuclear aril hidrocarbono (ARNT) que se dimeriza ao associar-se a outros fatores de transcrição, entre eles o receptor aril hidrocarbono (AhR) em condições de exposição a xenobióticos, revelando uma extensa aplicação dos translocadores ARNT na

regulação gênica de diversas vias metabólicas (Nikinmaa & Rees, 2005; Bracken et al., 2003).

A sensibilidade da regulação da transcrição de genes mediada pelo HIF durante variações de oxigênio é decorrente, principalmente, da quantidade da proteína HIF-α presente nas células. Esta proteína é produzida continuamente nos organismos, porém é rapidamente degradada em condições de normoxia. A degradação do HIF-α é mediada por um domínio de degradação dependente de oxigênio (ODD), onde resíduos conservados de prolina e asparaginina específicos do HIF- α são covalentemente modificados pela ação de enzimas hidroxilases e então reconhecidas pela proteína von-Hippel-Lindau (pVHL), ubiquitinizadas e degradadas pela via proteossômica. Por outro lado, em condições de hipóxia a hidroxilação enzimática dos resíduos de prolina e asparaginina não ocorre, levando ao acumulo e estabilização do HIF-α, que segue para o núcleo celular, onde se dimeriza com o ARNT e se liga nas regiões promotoras dos genes de interesse. Muitos genes apresentam, na região promotora, uma região regulatória conhecida como elemento de resposta à hipoxia (HRE), que viabiliza o correto posicionamento do HIF-1. Assim, associado ao fator geral de transcrição CBP/p300, e outros possíveis fatores acessórios, o HIF-1 desencadeia a transcrição dos genes de interesse (Bracken et al., 2003; Nikinmaa & Rees, 2005) (Figura 1).

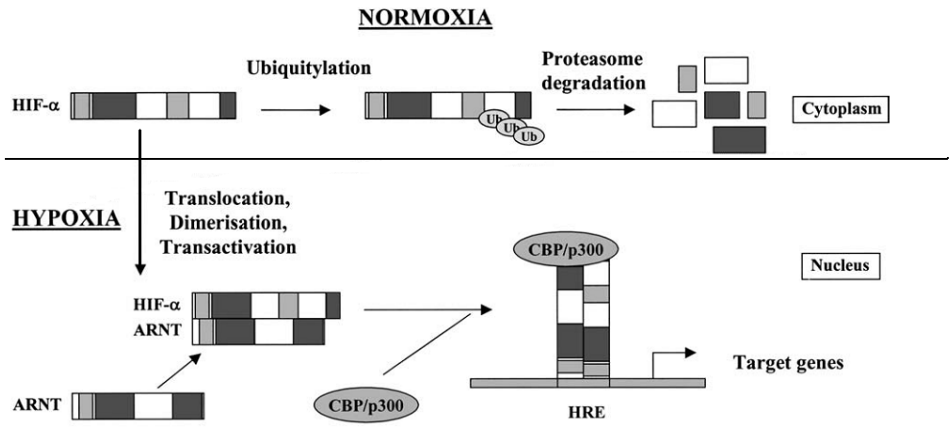

Figura 1: Etapas da regulação da expressão gênica por meio da HIF-α em condições de normóxia e hipóxia. Modificado de Bracken et al., 2003.

Em peixes, há, inicialmente, uma maior eficiência na utilização do oxigênio em condições limitantes, regulando-se a circulação sanguínea e aumentando a área da superfície branquial (Baldisseroto, 2009), o que torna a hipóxia um potencial indutor da angiogênese (formação de vasos sanguíneos) e de mecanismos reguladores da

vascularização (Neufeld et al., 1999). Atualmente o HIF é considerado o principal fator de transcrição envolvido no processamento de genes ligados a estes processos (Chapman et al., 2000; Saroglia et al., 2002; Bracken et al., 2003). Dentre estes genes, o fator de crescimento endotelial vascular (em inglês - *vascular endothelial growth factor* - VEGF) tem sido o regulador da angiogênese mais estudado (Connolly et al., 1989; Connolly, 1991).

Resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo* têm evidenciado que baixas concentrações de oxigênio induzem fortemente a expressão do VEGF, que por sua vez estimula a proliferação de células endoteliais vasculares e a formação de novas veias (Conn et al., 1990; Plate et al., 1992; Shweiki et al., 1992). Acreditava-se anteriormente que as células endoteliais, apesar de alvo da VEGF, não eram capazes de expressar este gene, porém alguns trabalhos envolvendo humanos já demonstram o aumento das taxas de transcrição em células endoteliais ligadas a tecidos respiratórios, como pulmões (Liu et al., 1995). Além disso, este gene tem sido veiculado aos processos de angiogênese que acompanham a formação de órgãos durante o desenvolvimento e a evolução de células em processos cancerígenos (Benjamim et al., 1998; Ferrara et al., 1998, Folkman, 1998). Segundo Graven et al. (1994), as células endoteliais são as primeiras células vasculares expostas ao decréscimo da concentração de oxigênio no sangue e, apesar de alguns estudos revelarem que este e diversos outros tecidos sejam moderadamente tolerantes a hipóxia, estudos envolvendo os peixes e os mecanismos gênicos pelos quais suas células preservam sua integridade e adaptam suas funções metabólicas foram pouco estudados.

1.4. *Astronotus ocellatus*

A espécie *Astronotus ocellatus* (Agassiz, 1831) é conhecida popularmente no Brasil como acará-açu ou apaiari, mas também chamada de acará-grande, corró-baiano, bola-de-ouro, dorminhoco, entre outros. É conhecido ainda em outros idiomas como oscar (inglês), acarahuazú (espanhol), astronotus ou cichlidé oeil de paon (francês), pielegnica pawiooka (polonês) e pfauenaugenbuntbarsch (alemão) (Museu de História Natural da Flórida, 2009). Esta espécie pertence à família Cichlidae, família mais diversificada da ictiofauna mundial e que, por sua vez, está inserida na ordem Perciformes e superordem Acanthopterygii. Os ciclídeos possuem cerca de 110 gêneros e mais de 1.300 espécies catalogadas (Kullander, 1998) que se distribuem naturalmente na África, América do Sul, México, sul da Índia, Irã, Sri Lanka e Madagascar (Lowe-McConell, 1987). A maior diversidade de espécies desta família se encontra distribuída nos grandes lagos africanos, com mais de 1000 espécies, seguidos da América do Sul, com cerca de 300 espécies (6-10% da fauna de água doce). A bacia Amazônica detém cerca de 150 espécies de ciclídeos, constituindo o terceiro maior grupo da ictiofauna, atrás apenas das ordens Caraciformes e Siluriformes. Por estes e

outros motivos, este grupo é muito importante economicamente, como fonte de alimento e ornamentação (Chellapa et al., 1999), e cientificamente, pois são extremamente variados quanto sua coloração, forma, alimentação, reprodução e adaptações a condições extremas (Chippari-Gomes, 2002).

A espécie *Astronotus ocellatus* está distribuída naturalmente na bacia dos rios Ucayali (Peru), Orinoco (Colômbia), Oiapoqui (Guiana Francesa), Içá, Solimões e Amazonas (Brasil), podendo ocorrer em outras bacias brasileiras (Loiselle, 1985). Assim como os demais ciclídeos, o acará-açu é uma espécie territorialista e que compete pelas fêmeas na formação dos casais, apresentando um amplo espectro de comportamentos típicos do período reprodutivo. É uma espécie normalmente monogâmica, sexualmente monomórfica, realiza desovas parciais ao longo do ano, desovando cerca de 1000-2000 ovos adesivos ao substrato e ambos os sexos dispensam cuidados à prole desde a fertilização até a independência dos filhotes (Paiva & Nepomuceno, 1989). Foi observada na outra espécie do gênero, *A. crassispinis*, a proteção da prole no interior da boca quando em situações de perigo (Nelson, 1994).

A maturação sexual do acará-açu ocorre a partir dos dez meses de idade e se prolonga até o fim da vida adulta, com cerca de dez anos (Fontenele, 1951). Esta espécie pode atingir 45cm de comprimento e pesar até 1,6Kg (IGFA, 2001). Estes peixes apresentam uma coloração escura, que vai de verde-oliva e cinza ao marrom. Possuem um ocelo preto no ramo superior da base do pedúnculo caudal e machas oceladas sobre a base dos raios moles da nadadeira dorsal, todos circundados por um anel alaranjado (figura 2). Durante a formação dos casais no período reprodutivo, os machos são geralmente maiores que as fêmeas e apresentarem colorações mais fortes que incluem fortes bandas pretas e manchas amarelas, laranjas ou vermelhas nas laterais do corpo (Beeching, 1995).

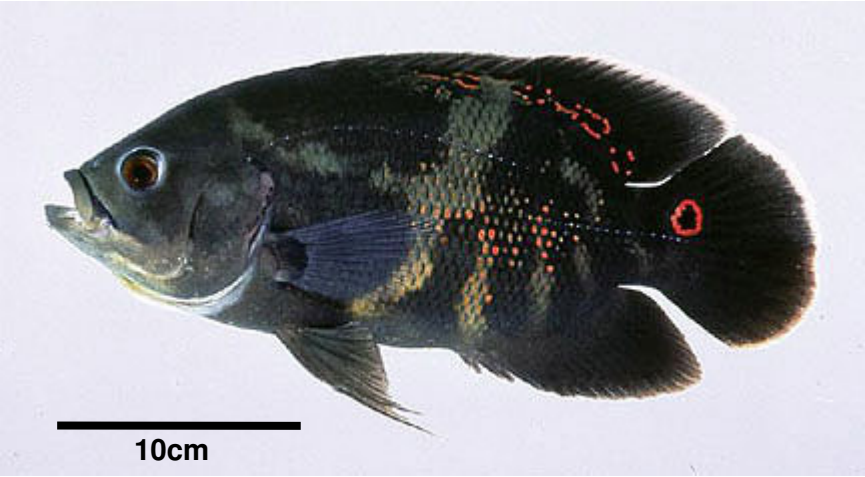

Fig. 2: Vista lateral de um exemplar de Astronotus ocellatus evidenciando sua forma, coloração e seus ocelos no pedúnculo caudal e nadadeira dorsal. Foto: U.S Geological Survey/ Leo Nico

O acará-açu é uma espécie bentopelágica pouco ativa e que não realiza grandes migrações. Possui o hábito alimentar onívoro, com forte tendência carnívora e é encontrada nas águas lênticas dos diferentes tipos de lagos e áreas alagadas que habita (Fontenele, 1951). Esta espécie é normalmente encontrada em condições de hipoxia em seu ambiente natural; os espécimes adentram a várzea para fins reprodutivos e alimentares, e são considerados indivíduos extremamente tolerantes à hipóxia. Indivíduos adultos podem suportar níveis de 5-20% de saturação de oxigênio por 20-50 horas e até 6 horas de total anóxia a 28°C (Muusze et al., 1998). Além disso, Almeida-Val et al. (1999) observaram que a espécie *A. ocellatus* pode sobreviver indefinidamente, em concentrações de até 1,5 mg/L de oxigênio dissolvido, quando esta tiver acesso à superfície. Portanto, esta espécie é singular quando comparada com outros vertebrados considerados tolerantes à hipoxia como a carpa (Nilsson and Renshaw, 2004), sapos (Boutilier, 2001b) e tartarugas (Lutz & Milton, 2004; Warren & Jackson, 2008), já que estes experimentam condições hipóxicas com temperaturas bastante inferiores (Almeida-Val & Hochachka, 1993; Scott et al., 2008).

As habilidades apresentadas por esta espécie são resultantes de uma série de ajustes metabólicos visando uma redução na demanda de oxigênio por meio de uma regulação coordenada entre as células e o controle fisiológico do organismo como um todo. Sabe-se que em condições de hipoxia o acará-açu reduz os batimentos cardíacos e suprime ao máximo seu metabolismo aeróbico, de modo a obter ATP por vias anaeróbicas, como a glicólise (Muusze et al., 1998; Almeida-Val et al., 1999). Além disto, diminui os gastos de ATP reduzindo em torno de 30-60% a síntese protéica no cérebro, fígado, coração e brânquias (Lewis et al, 2007) e regula o fluxo iônico por diminuição significativa da atividade da ATPase nas brânquias e rins (Richards et al., 2007). Segundo Scott et al. (2008), o acará-açu é capaz de reduzir a absorção de oxigênio pelas brânquias durante a hipóxia severa, de modo que a diminuição da perfusão lamelar branquial reduz as perdas iônicas, suprimindo o metabolismo branquial e a demanda por oxigênio. Esta redução é significativamente mais acentuada no acará-açu em comparação com outras espécies de teleósteos menos tolerantes.

Finalmente, muitos aspectos como adaptações comportamentais, padrões enzimáticos específicos e respostas transcricionais, são relevantes no esclarecimento das propriedades intrínsecas desta espécie em condições hipóxicas. Com isso, o acará-açu vem se tornando um interessante modelo biológico para os estudos sobre os processos de resposta, adaptação e evolução dos vertebrados em condições de hipoxia, no nível molecular.

2. Justificativa

O papel do oxigênio sobre o desenvolvimento e a fisiologia dos vertebrados é uma área de amplo interesse biológico. Os mecanismos moleculares que conduzem a variação do nível de oxigênio às respostas celulares e metabólicas têm recebido notável atenção. Atualmente a maior parte dos estudos desta área está voltada para a saúde humana, especializando-se em mamíferos e um restrito número de organismos modelo, não se levando em consideração o ambiente natural do organismo na interpretação dos resultados. Sendo assim, a reconhecida diversidade de organismos que habita ambientes aquáticos, influenciados por variações nas concentrações de oxigênio, precisa ser notada, bem como suas adaptações fisiológicas e seus mecanismos de regulação da expressão de genes ligados à hipoxia.

Embora inúmeros processos fisiológicos sejam alterados pela exposição dos peixes à hipoxia, sua relação com fatores de transcrição específicos às oscilações de oxigênio e seus genes alvo é muito pouco conhecida. Tem-se observado que os peixes possuem forte homologia gênica com inúmeras outras classes de vertebrados e, até mesmo, invertebrados. A maneira como estes organismos combinam entre sí os mecanismos regulatórios, muitas vezes coordenando genes amplamente dispersos, origina características que os relacionam intra e interespecificamente. Estas características corroboram diretamente os estudos taxonômicos e filogenéticos, sendo utilizadas como modelos para a reconstrução dos padrões históricos da origem e diversificação dos caracteres, bem como a investigação do papel do oxigênio na evolução e biologia das espécies.

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

Avaliar as respostas metabólicas e moleculares do *Astronotus ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos da hipóxia sobre os parâmetros hematológicos do acará-açu.

- Avaliar os efeitos da hipóxia sobre o metabolismo do acará-açu por meio da medida da atividade das enzimas LDH, CS e MDH em diferentes tecidos.

- Obter seqüências específicas dos genes 18S, HIF-1α e VEGF para a espécie *A. ocellatus*.

- Analisar a expressão dos genes HIF-1α e VEGF no fígado de indivíduos adultos de *A. ocellatus* nas condições de normoxia hipóxia e após a recuperação da hipóxia.

- Avaliar o balanço dos metabolismos anaeróbico e aeróbico do acará-açu comparando-se as respostas moleculares, enzimáticas e hematológicas.

4. Material & Métodos

4.1. Animais Experimentais

Os exemplares adultos de *Astronotus ocellatus* foram capturados no complexo Catalão, um sistema de lagos próximo à cidade de Manaus, e conduzidos ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram aclimatados por 30 dias em tanques de polietileno, com capacidade de 500L, com sistema de aeração constante (concentração de O_2 de 5,0-7,0mg/L) e temperatura controlada por termostato a 28,0±2,0,°C. Os peixes foram alimentados com ração comercial (36% de proteína bruta) uma vez por dia.

4.2. Experimentos

No desenho experimental foram utilizados 18 indivíduos da espécie *A. ocellatus*, distribuídos em 6 câmaras plásticas individuais com capacidade de 22,6L, sendo 3 peixes em cada câmara. Cada câmara foi acoplada a um sistema de injeção de gases nitrogênio e oxigênio comprimido, por meio de mangueiras de silicone, permitindo a liberação dos mesmos no interior do sistema e, assim, efetuando o controle homogêneo das concentrações de oxigênio desejadas no período experimental. A alimentação dos animais foi suspensa durante o ensaio experimental.

Grupo Normóxia

Após o período de 48 horas de aclimatação, com as concentrações de oxigênio mantidas em 6,57±0,23 mgO_2/L, foram removidos 6 indivíduos, um de cada tanque, pesados, medidos, sacrificados por excisão da espinha dorsal e os tecidos coletados (sangue, músculo branco, fígado, coração e cérebro), congelados em nitrogênio líquido e estocados em -80°C para posteriores análises.

Grupo Hipóxia

Imediatamente após a amostragem do grupo normóxia, os organismos que permaneceram nas câmaras foram induzidos à hipóxia por meio do decréscimo gradual dos

níveis de oxigênio dissolvido. As concentrações de oxigênio na água decresceram, a partir da normóxia, para 5,0mg/L, 4,0mg/L, 2,0mg/L, 1,0mg/L e 0,5mg/L, onde cada concentração foi mantida por 1 hora e alterada num intervalo de 10 minutos. Ao final de 3h à concentração de 0,5mg/L, foram removidos 6 indivíduos, um de cada tanque, pesados, medidos, sacrificados por excisão da espinha dorsal e os tecidos coletados (sangue, músculo branco, fígado, coração e cérebro), congelados em nitrogênio líquido e estocados em -80°C para posteriores análises.

Grupo Recuperação da Hipóxia

Após a amostragem do grupo hipóxia, a concentração de oxigênio nas câmaras experimentais foi aumentada, num intervalo de 45 minutos, até a condição de normóxia (7,41±0,15 mgO_2/L). Ao final de 3h a concentrações normóxicas, foram removidos 6 indivíduos, um de cada tanque, pesados, medidos, sacrificados por excisão da espinha dorsal e os tecidos coletados (sangue, músculo branco, fígado, coração e cérebro), congelados em nitrogênio líquido e estocados em -80°C para posteriores análises.

Os peixes utilizados nos 3 grupos experimentais apresentaram, em média, um comprimento total de 15,3±1,2 cm e pesaram 66,7±15,9 g.

4.3. Variáveis Físico-Químicas da Água

A temperatura e o oxigênio dissolvido na água foram medidos a cada 10 minutos ao longo de todo o experimento por meio de um termo-oxímetro YSI modelo 85 FT. Além disso, a cada amostragem (normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia) foram monitorados os valores de pH, medidos por meio de um pHmetro Micronal B374, bem como os níveis de amônia por meio de colorimetria. Foi realizada a renovação total da água após 12 horas de aclimatação.

4.3.1. Amônia

Os níveis de amônia foram determinados por ensaio colorimétrico segundo Verdouw *et al.* (1978). O método consistiu na reação da amônia com salicilato de sódio e hipoclorito de sódio, utilizando como catalisador o nitroprussiato de sódio. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 650nm em leitor de microplaca SpectraMax® (Molecular Devices). As concentrações de amônia foram expressas em mg/L.

4.4. Análises Hematológicas

4.4.1. Coleta de sangue e plasma

As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia caudal utilizando-se seringas previamente heparinizadas.

4.4.2. Hematócrito

O hematócrito foi determinado pelo método do microhematócrito, descrito por Goldenfarb et al., (1971). Para tal, amostras de sangue foram transferidas para tubos de microhematócrito e centrifugadas a 12000 x g durante 10 minutos em centrífuga para microhematócrito FANEM Modelo 207N. A leitura do porcentual (%) de sedimentação foi feita com o auxílio de uma escala padronizada.

4.4.3. Concentração de Hemoglobina ([Hb])

A concentração de hemoglobina ([Hb]) foi determinada segundo o método descrito por Kampen & Zijlstra (1964). Para tanto, 15µL de sangue foram diluídos em 3mL de reagente Drabkin (KCN 0,5g; KH_2PO_4 1,4g; $K_3[Fe(CN)_6]$ 2,0g; água destilada q.s.p. 1L). Após agitação, a absorbância das amostras foi determinada em um comprimento de onda de 540nm em um espectrofotômetro modelo Spectronic Genesis-2. Os valores da concentração de hemoglobina foram expressos em g/dL e obtidos a partir da fórmula:

$$\mathbf{[Hb] = A_{540} \times 0{,}146 \times 201}$$

onde:

A_{540} = valor da leitura na absorbância de 540nm

0, 146 = fator de correção

201 = fator de diluição das amostras

4.4.4. Contagem do número de eritrócitos (RBC)

Os valores eritrocitários foram determinados por meio da diluição das amostras de sangue em solução de formol citrato (3,8g de citrato de sódio; 2,0mL de formol 40% e água destilada q.s.p. 100mL), na proporção 1:200, e contados em câmara de Neubauer através de um microscópio óptico Motic Profissional, sob lente de ampliação de 40x. O número total de eritrócitos foi expresso em milhões de células por milímetro cúbico de sangue ($x10^6/mm^3$), calculado por meio da seguinte equação:

RBC= nº de células x A x D

Onde: A = correção para a área analisada da câmara de Neubauer = 50;

D = fator de diluição

4.4.5. Determinação das constantes corpusculares

As constantes corpusculares, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinadas a partir dos valores correspondentes ao número de eritrócitos circulantes, hematócrito e concentração de hemoglobina, de acordo com as seguintes fórmulas estabelecidas por Brow (1976):

- **VCM (μm^3) = Ht x 10/RBC**
- **HCM (pg) = [Hb] x 10/RBC**
- **CHCM (%)= [Hb]/Ht x 100**

4.4.6. Glicose

As concentrações de glicose foram determinadas através de um medidor eletrônico de glicose sanguínea, Accu-Chek Advantage II. Para isso, aproximadamente 10µL de sangue total foram colocados nas fitas de leitura do aparelho que, por meio de uma análise eletroquímica da amostra, apresenta a concentração de glicose em g/dL.

4.5. Análises Enzimáticas

4.5.1. Preparo dos tecidos

Para a análise das atividades enzimáticas, as amostras de músculo branco, coração, fígado e cérebro foram homogeneizadas em solução tampão e posterior adição do respectivo substrato enzimático para o início da reação e detecção da atividade.

Os tecidos foram homogeneizados em triturador automático (*Tissue Tearos*, mod. 985370) em gelo e centrifugados durante 15 minutos a 13000 x g/4°C em centrífuga Sorvall RC5B para a remoção do material particulado. Os ensaios foram realizados utilizando-se a porção sobrenadante (extrato) a 25°C. As diluições foram ajustadas a cada tecido.

4.5.2. Quantificação das amostras

A determinação das atividades enzimáticas foi feita em um espectrofotômetro Spectronic Genesys 2, utilizando as técnicas revistas por Driedzic & Almeida-Val (1996). As reações foram realizadas em cubetas de quartzo de 1000 µL, sendo 890 µL de solução

tampão (descritos a seguir), 10 µL do extrato e 100 µL de substrato (descritos a seguir). Os protocolos das reações enzimáticas são os seguintes:

- **LDH (E.C 1.1.1.27)** - Solução tampão: 0,15mM de NADH, 1mM de KCN e 50mM de imidazol, pH 7,4 a 25°C. Substrato: 1mM de piruvato foi adicionado para o inicio da reação. Leitura: comprimento de onda de 340nm.
- **MDH (E.C. 1.1.1.37)** – Solução tampão: 0,15mM de NADH, 50mM de imidazol, pH 7,4 a 25°C. Substrato 0,5mM de ácido oxalacético. Leitura: 340nm.
- **CS (E.C. 4.1.3.7)** – Solução tampão: 0,4mM de Acetil CoA, 0,25mM de DTNB (ácido dithio-bis-2-nitrobenzóico) e 75mM de TRIS (tris hidroximetil aminometano), pH 8,0 a 25°C. Substrato: 0,5mM de ácido oxalacético. Leitura: 412nm

O cálculo para a determinação da atividade das enzimas nos tecidos foi realizado de acordo com a seguinte equação:

$$\textbf{µmoles de substrato.g}^{-1}\textbf{ tecido. min}^{-1} = \frac{\textbf{fd (amostra) x fd (cubeta) x }\Delta\textbf{OD/min}}{\varepsilon}$$

Onde:

fd = fator de diluição

ΔOD/min = variação na densidade ótica por minuto

ε = coeficiente de extinção molar (6,22 para MDH e LDH e 13,6 para CS)

4.6. Expressão dos Genes HIF-1α e VEGF

4.6.1. Confecção dos Oligonucleotídeos Inespecíficos

Foi realizada inicialmente uma busca de sequências nucleotídicas de cDNA, dos genes HIF-1α, VEGF e 18S, dentre as espécies peixes da ordem Perciformes depositadas no banco de dados on-line do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), por meio da ferramenta *Nucleotide*. Após o alinhamento das sequências no programa ClustalW, disponível no Software BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.3. (Hall, 2001), os oligonucleotídeos foram desenhados utilizando-se o Software Oligo Explorer 1.2. (Tabela 1).

Tabela 1. Seqüência dos oligonucleotídeos inespecíficos utilizados na reação de PCR.

Gene	Seqüência dos oligonucleotídeos forward e reverse (5'- 3')	Tamanho do produto (pb)[1]
HIF-1α	(F) TCAYGCTCWGGACTCAGACC (R) KATCAGGGCWGCTYAAGTCC	548
VEGF	(F) GTGGAGCACATCTTYATCCC (R) TGCAGGTCCMRTCGTTGAGC[4]	364
18S	(F) GGAATGAGTACACTTTAAATCC (R) GGGGCGCCGAGAGGCAGGGGC	200

[1] pares de bases. Y= T ou C; W= T ou A; K= T ou G; M= A ou C; R= A ou G.

4.6.2. Extração de RNA total

O RNA total de fígado dos exemplares dos três grupos experimentais foi extraído com o uso do *TRIzol® Reagent* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Para a homogeneização dos tecidos, cerca de 50-100 mg de tecido foram macerados manualmente em microtubos de 1,5mL contendo 1 mL de *TRIzol® Reagent* e, então, incubados a 15-30°C por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µL de clorofórmio a cada amostra e estas misturadas vigorosamente manualmente por 15 segundos, incubadas por 3 minutos a 15-30°C e, depois, centrifugadas por 12000 x g durante quinze minutos a 2-8°C para a separação das fases. A fase sobrenadante transparente resultante foi transferida para um novo microtubo, onde foi adicionado 500 µL de álcool isopropílico e as amostras incubadas por dez minutos a 15-30°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por dez minutos a 12000 x g e a 2-8°C para a precipitação do RNA. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o pellet de RNA resultante lavado adicionando-se 1 mL de etanol 75%, agitando-se os tubos manualmente e centrifugado-os a 7500 x g por cinco minutos a 2-8°C. Ao final deste processo, foi removido todo o excesso de etanol e o RNA ressuspendido em 50 µL de água tratada com Dietil-pirocarbonato (DEPC 0,1% [v/v]) para completa eliminação das RNAses e estocado em -80°C.

A integridade do RNA foi verificada por meio de corrida eletroforética em gel de agarose MOPS/EDTA 1% (m/v) desnaturante, durante 40 minutos/ 80V, em tampão MOPS/EDTA 1X, com as amostras desnaturadas por aquecimento à 60°C durante 15

minutos e marcadas com brometo de etídio. A vizualização do gel foi feita em transiluminador de luz ultravioleta (UV). A concentração e a pureza das amostras de RNA total foram verificadas por espectrofotometria por meio do *NanoDrop® Espectrophotometer* 2000 (*Thermo Scientific*).

4.6.3. Tratamento com DNAse

Visando eliminar contaminações das amostras de RNA com DNA genômico, as mesmas foram tratadas com *Turbo™ DNAse*. Para tanto, utilizamos 8 µL do RNA extraído, 1 µL do tampão da DNAse do kit, 1 µL de DNAse I (1U/µL) e incubamos a mistura por 37°C durante 15 minutos e posteriormente 75°C durante 10 minutos. Posteriormente as amostras foram quantificadas como descrito acima e estocadas em freezer -80°C.

4.6.4. Síntese de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi realizada por tratamento enzimático com transcriptase reversa (MMLV Reverse Transcriptase) (200 U/µL, USB). Para tanto, foram misturados em um microtubo de 1,5 mL aproximadamente 25 µg de RNA, 1,0 µL de oligonucleotídeo dT(18) (1 µg), 1,0 µL de dNTP mix (10 mM), tampão 5X MMLV e água deionizada (q.s.p.) para um volume final de 50 mL. Posteriormente o tubo foi incubado a 37°C por 1 hora para a conversão e 70°C por 10 minutos para inativação da enzima. A confirmação da síntese de cDNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), com tampão TAE 1X, marcado com brometo de etídio e visualizado em transluminador de luz UV. A quantificação das amostras foi realizada por meio do *NanoDrop® Espectrophotometer* 2000c (*Thermo Scientific*).

4.6.5. Amplificação por Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação das sequências dos genes HIF-1α, VEGF e 18S das amostras de cDNA de fígado, foram utilizados 50ng de cDNA numa solução contendo 12,5µL de *PCR Master Mix®* (2x) (Fermentas), primer forward (10 pmol/µL), 1µL primer reverse (10 pmol/µL), adicionando água para um volume final de 25µL.

Com o auxílio de um termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), as amostras foram submetidas às temperaturas de 94°C por 30 segundos, 30 ciclos de 94°C por 20 segundos, 45 segundos à temperatura de anelamento específica de cada par de *primer*, 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos. A confirmação dos produtos da amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% (m/v), em tampão TAE 1X, marcado com brometo de etídio e visualizado em

transluminador de luz UV. Para a confirmação dos tamanhos dos fragmentos amplificados, foi adicionado ao gel um marcador de peso molecular conhecido.

4.6.6. Purificação dos produtos da PCR

Visando remover possíveis compostos que pudessem atrapalhar na reação de sequenciamento, oriundos da reação de PCR ou mesmo do gel de visualização da amplificação, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se o kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega). No caso do gel, após a eletroforese as bandas amplificadas foram recortadas e colocadas em microtubos de 1,5 mL, adicionados 10 µL de *Membrane Binding Solution* por mg de gel, agitados vigorosamente e incubados à 65°C até que a solução se dissolvesse completamente. No caso do produto de PCR, adicionou-se igual volume de *Membrane Binding Solution* à solução resultante da PCR. Posteriormente, a solução foi transferida a uma minicoluna e esta colocada em um tubo coletor e centrifugados a 16000 g por 1 minuto. O material agora ligado à membrana da minicoluna foi lavado com 700 µL de *Membrane Wash Solution* e os tubos centrifugados a 16000 x g por 1 minuto. A solução presente no tubo coletor foi então descartada. Uma nova lavagem foi realizada com 500 µL de *Membrane Wash Solution* e os tubos coletores centrifugados a 16000 x g por 5 minutos. Finalmente, o material ligado a membrana foi eluído transferindo-se a minicoluna para um microtubo de 1,5 mL, adicionados 30 µL de água livre de nuclease e centrifugados a 16000 x g por 1 minuto. O material resultante da purificação foi estocado em freezer -20°C até futuras análises.

4.6.7. Reação de Sequenciamento

A reação de sequenciamento foi realizada usando-se os procedimentos descritos no protocolo do Kit *ABI PRISM® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). Para tal, a reação contou com a adição de 1 µL de *Big Dye* V3.1, 1,5 µL de tampão *big dye* 2X, 3 µL de DNA (aproximadamente 100 ng) e 1 µL do primer forward ou reverso (10 pmol/µL) respectivo ao gene de interesse, em placa de 96 poços, com as seguintes temperaturas: 96°C por 2 minutos e 39 ciclos de 96°C por 30 segundos, 50°C por 20 segundos e 60°C por 4 minutos. Em seguida, foi realizada a precipitação adicionando-se 40 µL de isopropanol 65% (v/v) à temperatura ambiente, deixando 15 minutos ao abrigo da luz. Centrifugou-se a solução durante 30 minutos a 3000 x g à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Em cada poço foram adicionados 200 µL de etanol 60% (v/v) à temperatura ambiente, seguido de 5 minutos de centrifugação a 3000 x g. O sobrenadante foi descartado e as amostras secas por 30 minutos a 37°C, protegidas da luz. As amostras foram ressuspendidas em 10 µL de formamida HiDi (Applied Biosystems), aquecidas a 95°C

por 5 minutos e levadas ao gelo por mais 2 minutos. As amostras de DNA foram sequenciadas com auxílio do sequenciador automático de quatro capilares *ABI 3130 Sequence Analizer* (Applied Biosystems) localizado no Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

4.6.8. Análise das Sequências

As sequências obtidas foram analisadas quanto aos parâmetros de qualidade dos eletroferogramas através do software *ABI 3130 Sequence Analizer* (Applied Biosystems). Os contigs gerados foram validados por meio da ferramenta BLASTn, para detecção de homologia nucleotídica com o genoma das demais espécies depositadas do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), e BLASTp, para detecção de homologia com sequências de aminoácidos e auxilio na caracterização de sua função protéica. A partir da validação, as sequências puderam ser utilizadas para a confecção dos *primers* específicos necessários às análises por qRT-PCR.

4.6.9. Confecção dos oligonucleotídeos específicos para qRT-PCR

Para a montagem dos oligonucleotídeos dos genes HIF-1α, VEGF e 18S específicos para a espécie *A. ocellatus* utilizados na técnica de RT-PCR Quantitativo (qRT-PCR), foram utilizadas as sequências obtidas no processo de sequenciamento. Para tal, as sequências foram alinhadas no programa ClustalW, disponível no Software BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.0.5.3 e os oligonucleotídeos desenhados através do Software Oligo Explorer 1.2. As sequências dos oligonucleotídeos destinados às análises de qRT-PCR são mostradas na tabela 2.

Tabela 2. Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados na reação de qRT-PCR.

Gene	**Seqüência dos oligonucleotídeos forward e reverse (5'- 3')**	**Tamanho do produto (pb)**
HIF-1α	(F) CTCTGGACACCAAGACCTTTCTC (R) TCGTCACAATACGTGAACTTCATG	110
VEGF	(F) GCTCTGAGAGGAGAAAGCGTTT (R) GTATTCGTCCGTGTGTTTGCA	76
18S	(F) AACGATGCCAACTAGCGATC (R) CGGAACCCAAAGACTTTGGT	82

4.6.10. *Real Time* RT-PCR (Transcrição Reversa seguida por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

As reações de *q*RT-PCR foram realizadas no aparelho ABI Prism 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems). As reações foram desenvolvidas utilizando-se 5 µL de *SYBR® Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,5 µL do primer forward (1pmol/µL) e 0,5 µL do primer reverse (1 pmol/µL) e 100 ng de cDNA. As condições de reação foram: um passo inicial de 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. As reações foram realizadas em triplicata para a detecção de possíveis erros. Controles negativos também foram realizados para a detecção de possíveis contaminações. O gene 18S foi utilizado como o controle endógeno das análises, utilizados para a normalização das reações.

4.6.11. Eficiência de amplificação

A eficiência de amplificação de cada gene foi calculada por meio de uma curva de diluição em série dos produtos da PCR obtidos a partir de amostras de fígado dos exemplares experimentais. A partir dos dados obtidos foi produzido um gráfico do ciclo de início da detecção do produto amplificado (Ct) *versus* o $\log_{10}$ do número relativo de cópias da diluição em série. Foi realizada uma regressão linear para determinação do coeficiente angular da reta (S), o qual foi utilizado para determinar a eficiência de amplificação usando a fórmula desenvolvida por Pfaffl (2001):

Eficiência (E) = $10^{(-1/S)}$.

4.6.12. Quantificação relativa da expressão gênica

Para a detecção da diferença nos níveis de expressão dos genes HIF e VEGF entre as diferentes condições experimentais (normóxia, hipóxia e recuperação), optou-se pelo método de quantificação relativa (Pfaffl, 2001). Este método é uma modificação do método Ct comparativo ($\Delta\Delta$Ct) baseado na quantificação do gene de interesse em relação a um gene constitutivo denominado gene de referência (18S) e a eficiência na transcrição reversa.

A razão de expressão relativa é baseada na eficiência de amplificação e na variação do Ct do grupo controle ou calibrador e os outros grupos de interesse em relação ao gene constitutivo denominado gene de referência. A equação abaixo ilustra o método de quantificação relativa:

$$Razão = \frac{(E_{gene\ alvo})^{\Delta Ct\ gene\ alvo\ (calibrador\ -\ amostra}}{(E_{gene\ referência})^{\Delta Ct\ gene\ referência\ (calibrador\ -\ amostra)}}$$

Onde:

$E_{gene\ alvo}$ = Eficiência de amplificação do gene alvo

$E_{gene\ referência}$ = Eficiência de amplificação do gene de referência

Ct= Ciclo de inicio da detecção do produto amplificado

4.7. Análises estatísticas

Todos os resultados foram analisados e apresentados sob a forma de média ± erro-padrão da média (SEM). A significância das diferenças foi analisada estatisticamente por meio da Análise de Variância – critério único (ANOVA one way), seguidos do teste de comparação múltipla de Tukey. O nível de significância foi mantido a 0,05 em todos os testes (Zar, 1984).

5. Resultados

5.1. Mortalidade

Ao longo do período experimental (aclimatação, normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia) não houve mortalidade em nenhuma das réplicas experimentais.

5.2. Parâmetros Físico-Químicos da Água

A tabela 3 abaixo apresenta os parâmetros físicos-químicos da água observados nos diferentes tratamentos. Os valores encontrados demonstram o controle eficiente das concentrações de oxigênio nos tanques experimentais, bem como valores satisfatórios dos demais parâmetros de modo a não provocarem alterações biológicas significativas nos indivíduos dos diferentes tratamentos.

Tabela 3. Parâmetros físicos e químicos da água nas condições experimentais.

Tratamentos	Oxigênio (mg/L)	Temperatura (°C)	Amônia (mg/L)	pH
Normóxia	6,71+0,060	26,30+0,02	0,78+0,02	6,84+0,01
Hipóxia	0,50+0,003	27,20+0,10	0,86+0,03	6,92+0,03
Recuperação	7,28+0,030	27,26+0,04	1,00+0,07	7,38+0,04

5.3. Parâmetros Hematológicos

Os valores de hematócrito (Ht) representados na figura 3 demonstram um aumento significativo deste parâmetro após o período de exposição à hipóxia, seguido de uma redução parcial após 3 horas de recuperação.

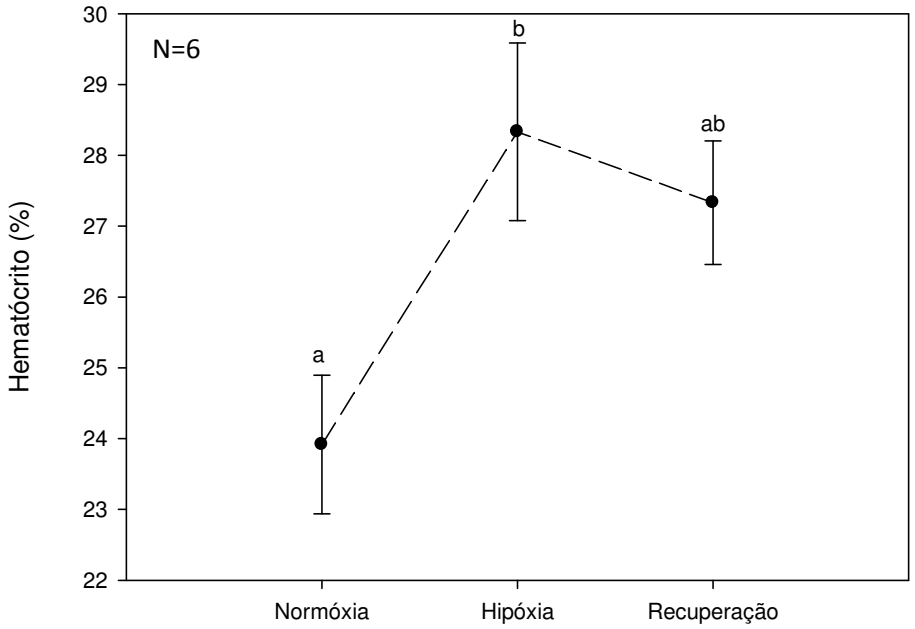

Figura 3. Valores de hematócrito de exemplares de *A.ocellatus* expostos a normóxia, hipóxia e recuperação à hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a* e *b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

Por sua vez, a concentração de hemoglobina [Hb] e o número de eritrócitos circulantes aumentaram significativamente durante a hipóxia e retornaram a seus valores normais após o período de recuperação (Figuras 4 e 5, respectivamente).

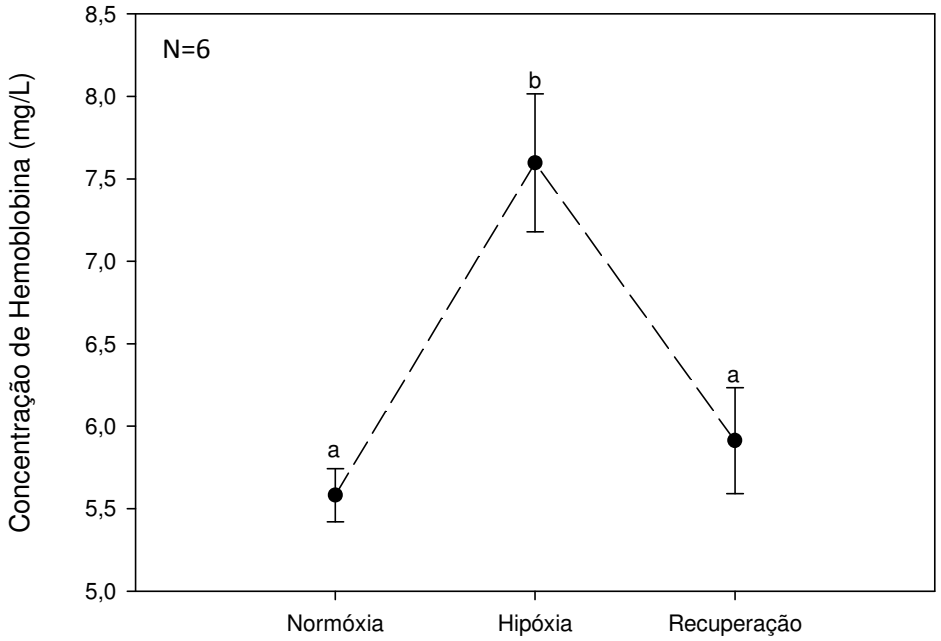

Figura 4. Concentração de hemoglobina em exemplares de *A.ocellatus* expostos a normóxia, hipóxia e recuperação à hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a* e *b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

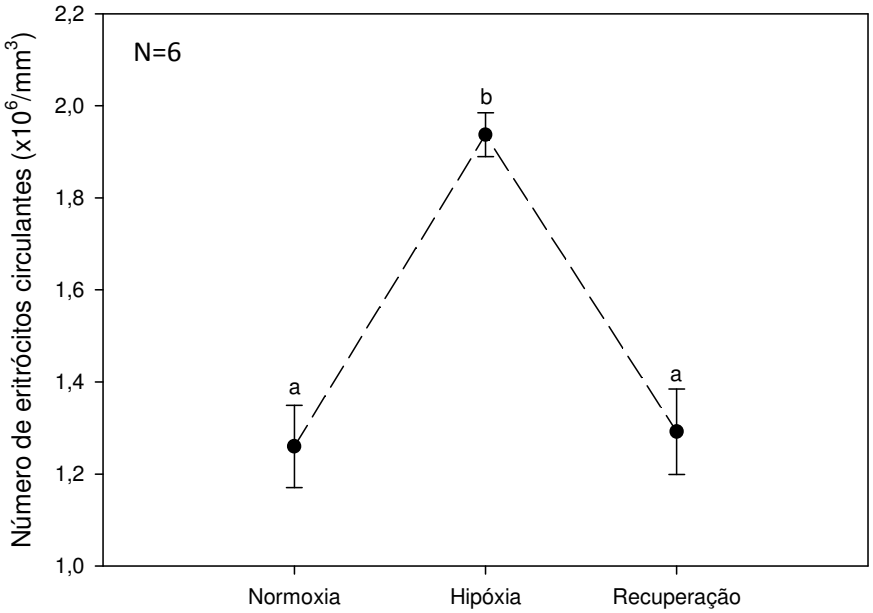

Figura 5**.** Número de eritrócitos circulantes em exemplares de *A.ocellatus* expostos a normóxia, hipóxia e recuperação à hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a e b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

As constantes corpusculares, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), estão apresentados na figura 6, respectivamente. Apesar dos valores de HCM não terem variado nos diferentes tratamentos, os valores de VCM e CHCM apresentaram uma variação significativa em condições hipóxicas quando comparados com as condições de normóxia e a recuperação da hipóxia.

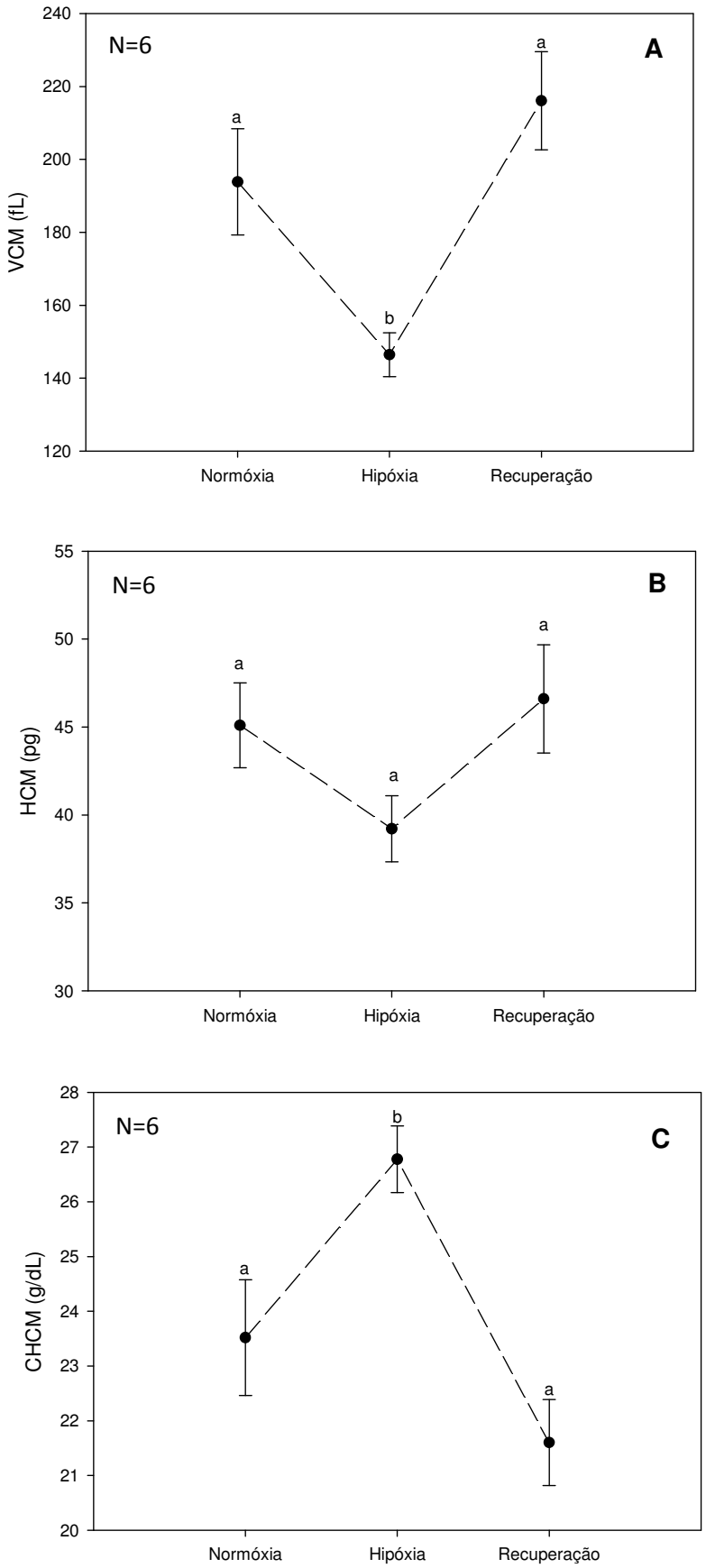

Figura 6. Valores de Volume Corpuscular Médio (A), Hemoglobina Corpuscular Média (B) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (C) em exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a* e *b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

Os valores de concentração de glicose sanguínea (figura 7) revelam um aumento significativo da concentração deste metabólito nos indivíduos expostos à hipóxia, seguido de uma redução durante a recuperação em direção aos valores de normóxia.

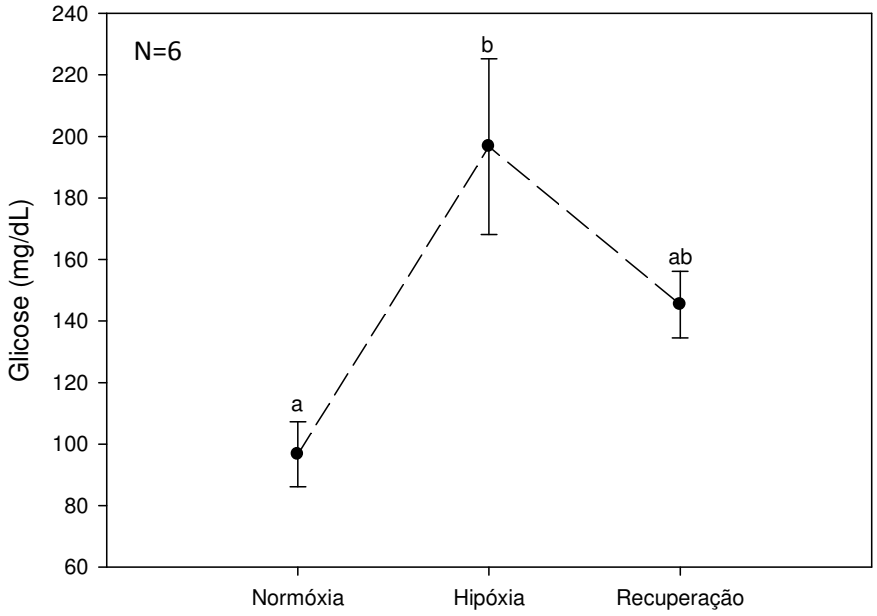

Figura 7. Níveis de glicose sanguínea em exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a* e *b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

5.4. Análises enzimáticas

5.4.1. Atividade da malato desidrogenase (MDH)

A hipóxia provocou uma redução significativa na atividade da MDH no fígado, seguida de um aumento após o período de recuperação (figura 8).

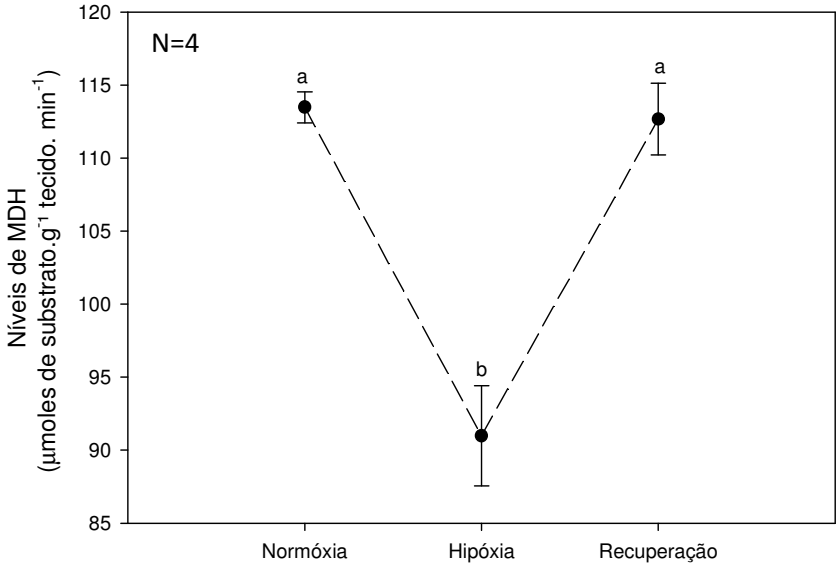

Figura 8. Atividade da MDH no fígado de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a e b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

Similarmente, no coração a hipóxia provocou uma redução significativa na atividade da MDH, porém apenas um aumento parcial após o período de recuperação (Figura 9), não retornando completamente aos valores apresentados no período de normóxia.

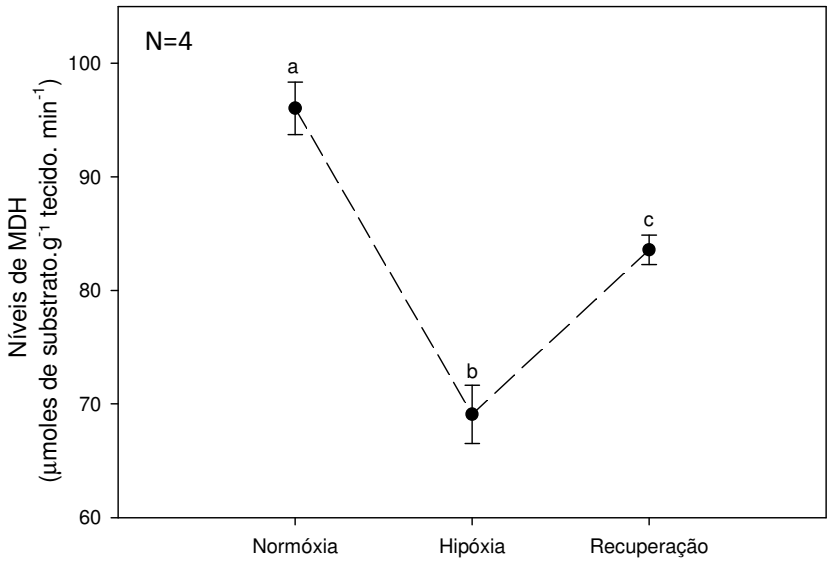

Figura 9. Atividade da MDH no coração de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a, b e c* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

No músculo e no cérebro, por sua vez, a hipóxia não provocou alterações significativas na atividade da MDH, que se manteve estável também no período de recuperação (figura 10 e 11, respectivamente).

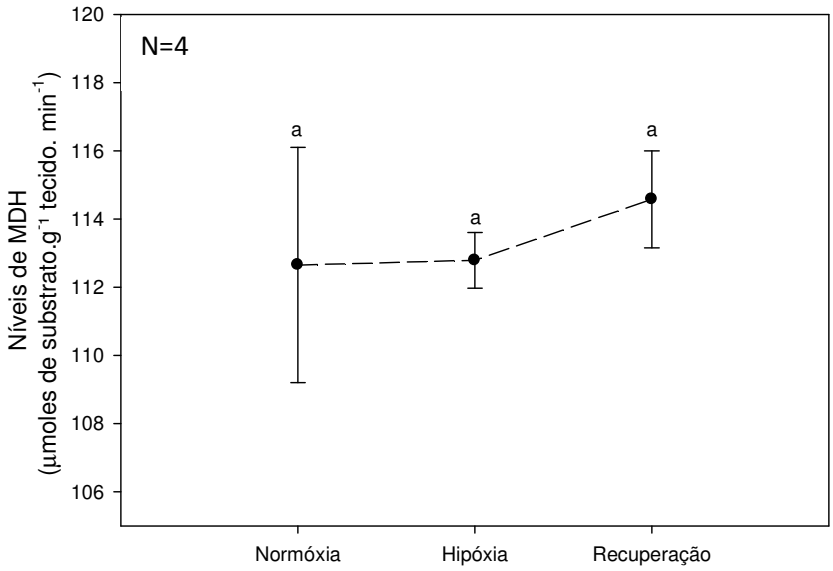

Figura 10. Atividade da MDH no músculo de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a] indica ausência de diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

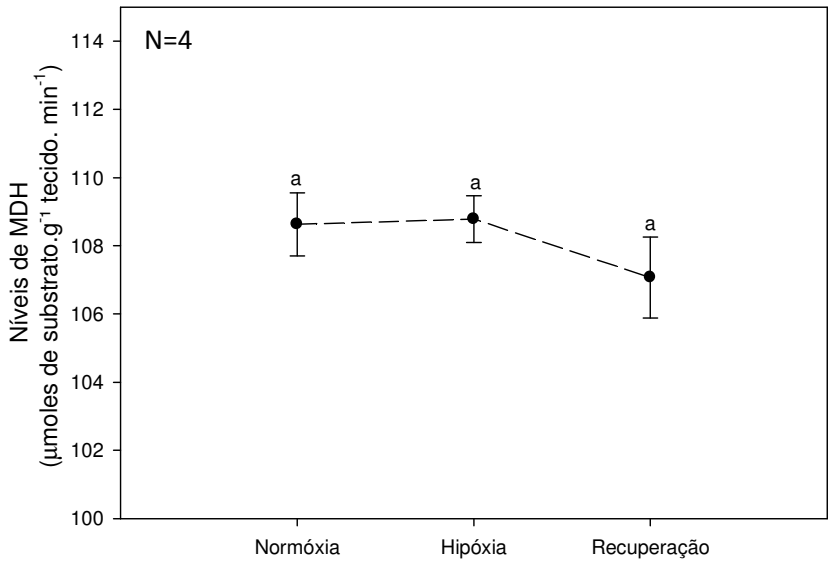

Figura 11. Atividade da MDH no cérebro de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. [a] indica ausência de diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

5.4.2. Atividade da cintrato sintase (CS)

Assim como no caso da MDH, a hipóxia provocou uma redução significativa na atividade da enzima oxidativa CS no fígado, seguida de um retorno aos valores basais da normóxia (Figura 12) após a recuperação. O mesmo perfil pôde ser observado no cérebro (Figura 13).

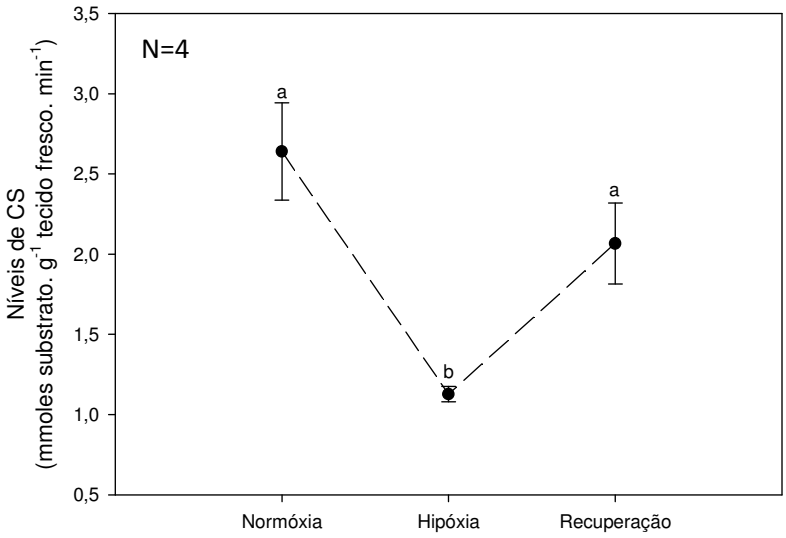

Figura 12. Atividade da CS no fígado de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a* e *b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

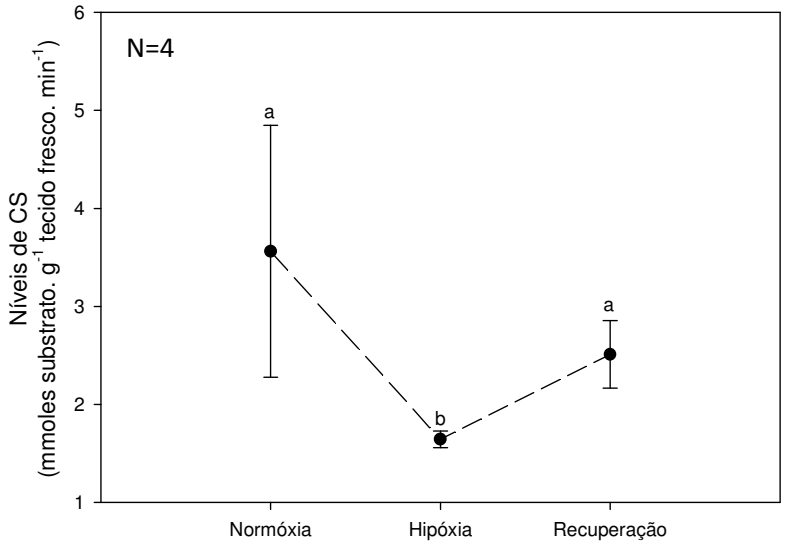

Figura 13. Atividade da CS no cérebro de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a* e *b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

Por outro lado, a hipóxia não afetou significativamente a atividade da CS no músculo, se mantendo também estável após a recuperação (Figura 14).

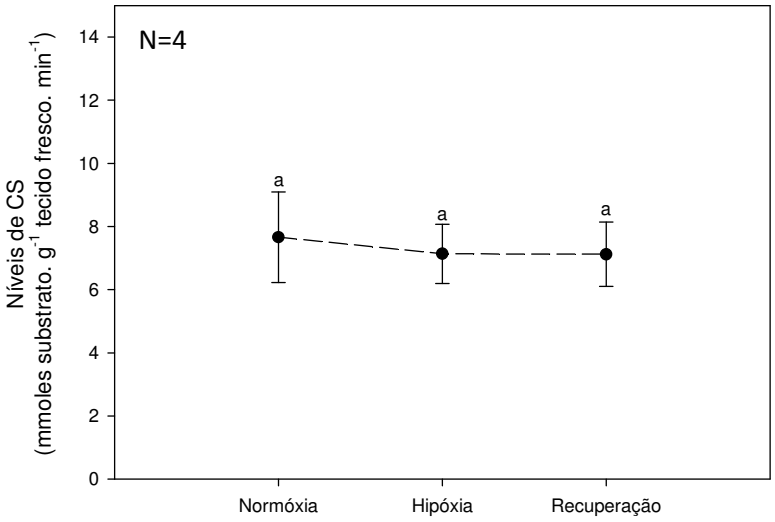

Figura 14. Atividade da CS no músculo de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a* indica ausência de diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

5.4.3. Atividade da lactato desidrogenase (LDH)

A hipóxia causou uma redução significativa na atividade da LDH no cérebro, permanecendo reduzida após o período de recuperação (Figura 15).

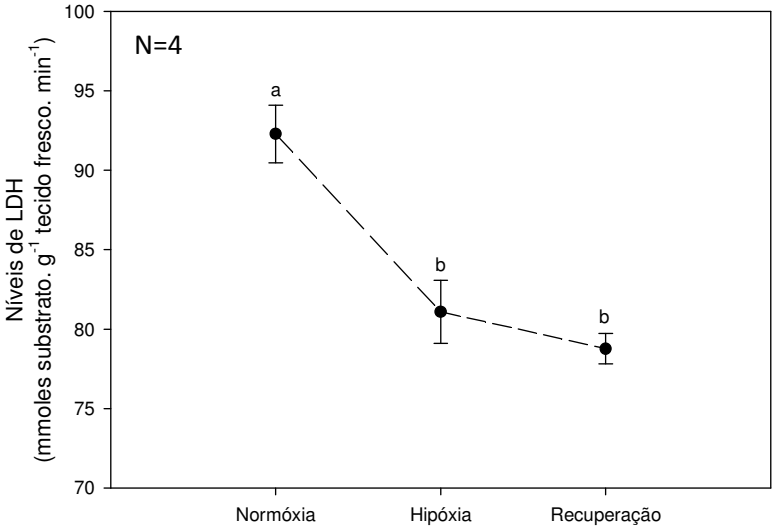

Figura 15. Atividade da LDH no cérebro de exemplares de *A. ocellatus* em condições de normóxia, hipóxia e recuperação da hipóxia. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média. *a* e *b* indicam diferença estatística significativa dos diferentes tratamentos entre si (p> 0,05).

5.5. Expressão dos genes HIF-1α e VEGF

5.5.1. Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total extraído das amostras de fígado dos indivíduos das condições de normóxia, hipóxia e recuperação estão ilustrados na figura 16A. A eletroforese em gel de agarose 1% permitiu verificar a integridade do RNA total, avaliada pelas bandas estruturais do RNA ribossômico (28S, 18S e 5,8S). A pureza do RNA foi verificada no Nano Drop® com índices entre 1,8-1,9. A integridade do cDNA utilizado na reação de PCR em Tempo Real pode ser observada na figura 16B.

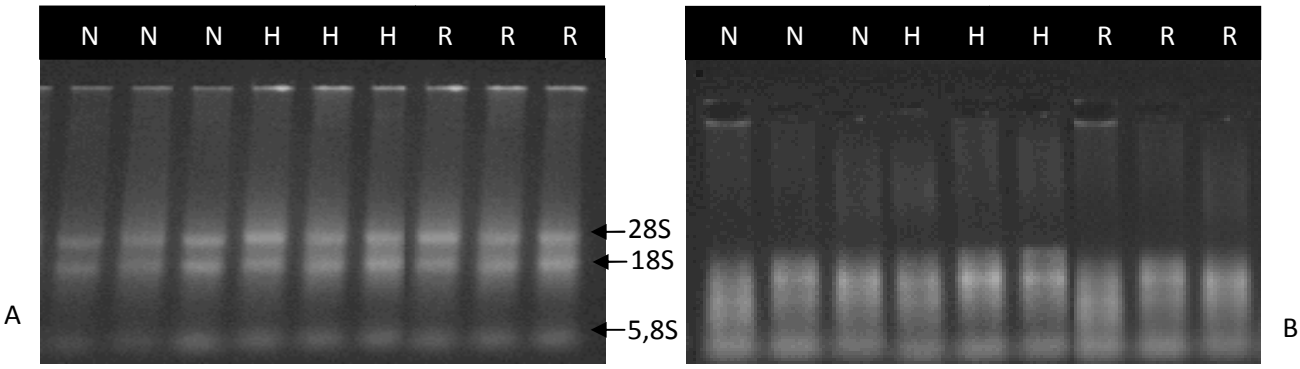

Figura 16. Eletroforese em géis de agarose 1% contendo o RNA total (A) e o cDNA (B) de amostras de fígado de *Astronotus ocellatus* nas condições de normóxia, (N), hipóxia (H) e recuperação (R).

5.5.2. Amplificação e temperatura de anelamento dos oligonucleotídeos

A confirmação da amplificação dos produtos desejados pelos diferentes pares de primers (18S, HIF-1α e VEGF), bem como a determinação de uma temperatura adequada a ser utilizada na PCR em Tempo Real, foi realizada por PCR convencional e visualizada em gel de agarose 1% (Figura 17). A temperatura escolhida foi a de 60°C para todos os primers.

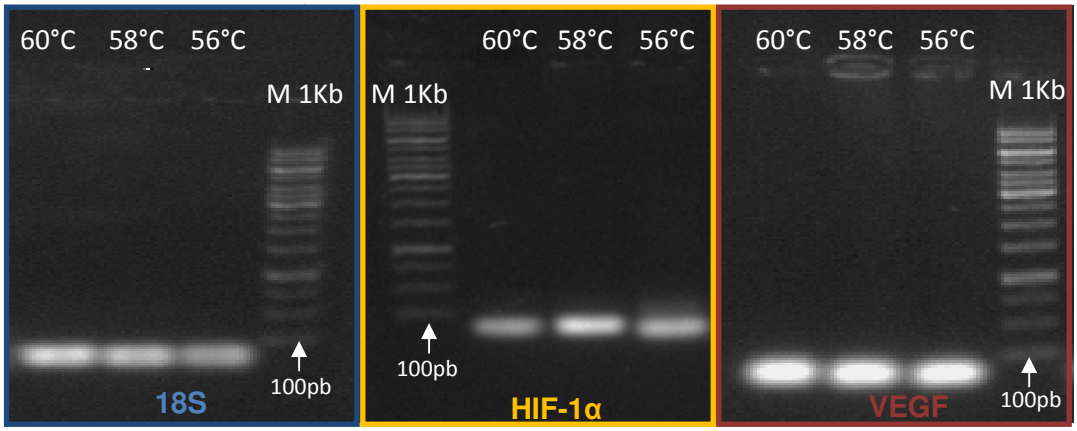

Figura 17. Eletroforeses em gel de agarose 1% contendo o produto das amplificações dos oligonucleotídeos específicos dos genes 18S, HIF-1α e VEGF em diferentes temperaturas. M 1kb= marcador de peso molecular de 1 kilobases.

5.5.3. Especificidade dos Oligonucleotídeos

A especificidade de amplificação para cada amplicom foi confirmada pela realização da curva de desnaturação "*Melting Curve*" para cada amplificação realizada por qRT-PCR (Figura 17). Desse modo, para que a amplificação seja específica, um pico deve ser observado no gráfico gerado pela curva de desnaturação, como observado na Figura 17. O programa de análise do termociclador converte o sinal emitido para valores positivos, permitindo a melhor visualização dos dados na forma de gráfico.

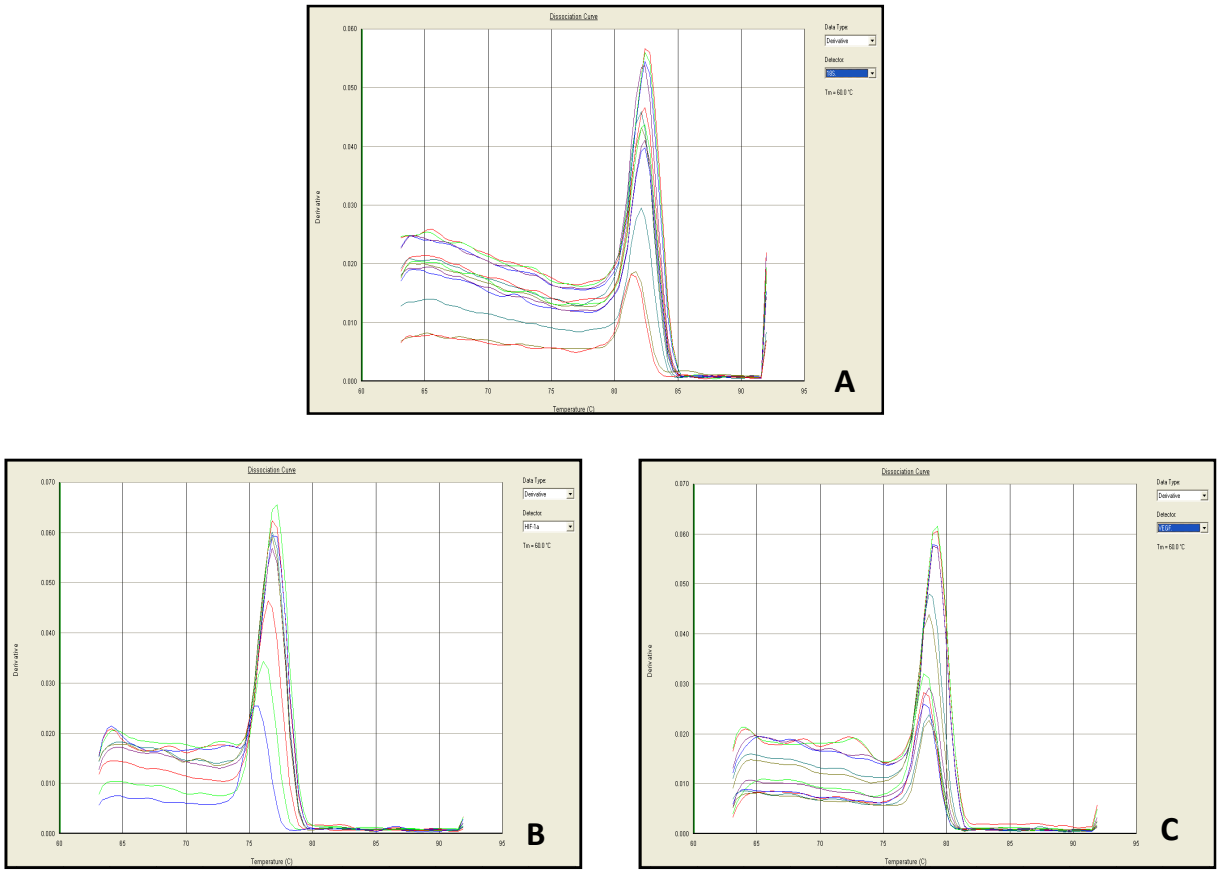

Figura 18. Curva de desnaturação para os genes 18S (A), HIF-1α (B) e VEGF (C). No eixo Y está representada a fluorescência emitida durante o aumento da temperatura e no eixo X a variação de temperatura. Cada linha da curva representa uma amostra submetida a qRT-PCR.

5.5.4. Eficiência da Amplificação

Os valores de (E) obtidos para cada gene foram utilizados para o cálculo da expressão relativa e podem ser visualizados na tabela 4. As análises de regressão da curva padrão, obtida a partir de uma diluição seriada das amostras, revelaram valores acima de 0,95 para R^2 demonstrando a existência de uma relação linear entre a quantidade de amostra utilizada e os valores de Ct (Figura 19).

Tabela 4. Valores obtidos a partir da análise de regressão linear, para cálculo da eficiência de amplificação (E). S: Coeficiente angular da reta; R^2: coeficiente de correlação de Pearson $r > 0,95$.

Gene	S	R^2	E
18s	-3,28	0,99	2,00
HIF-1α	-2,85	0,95	2,24
VEGF	-2,99	0,98	2,15

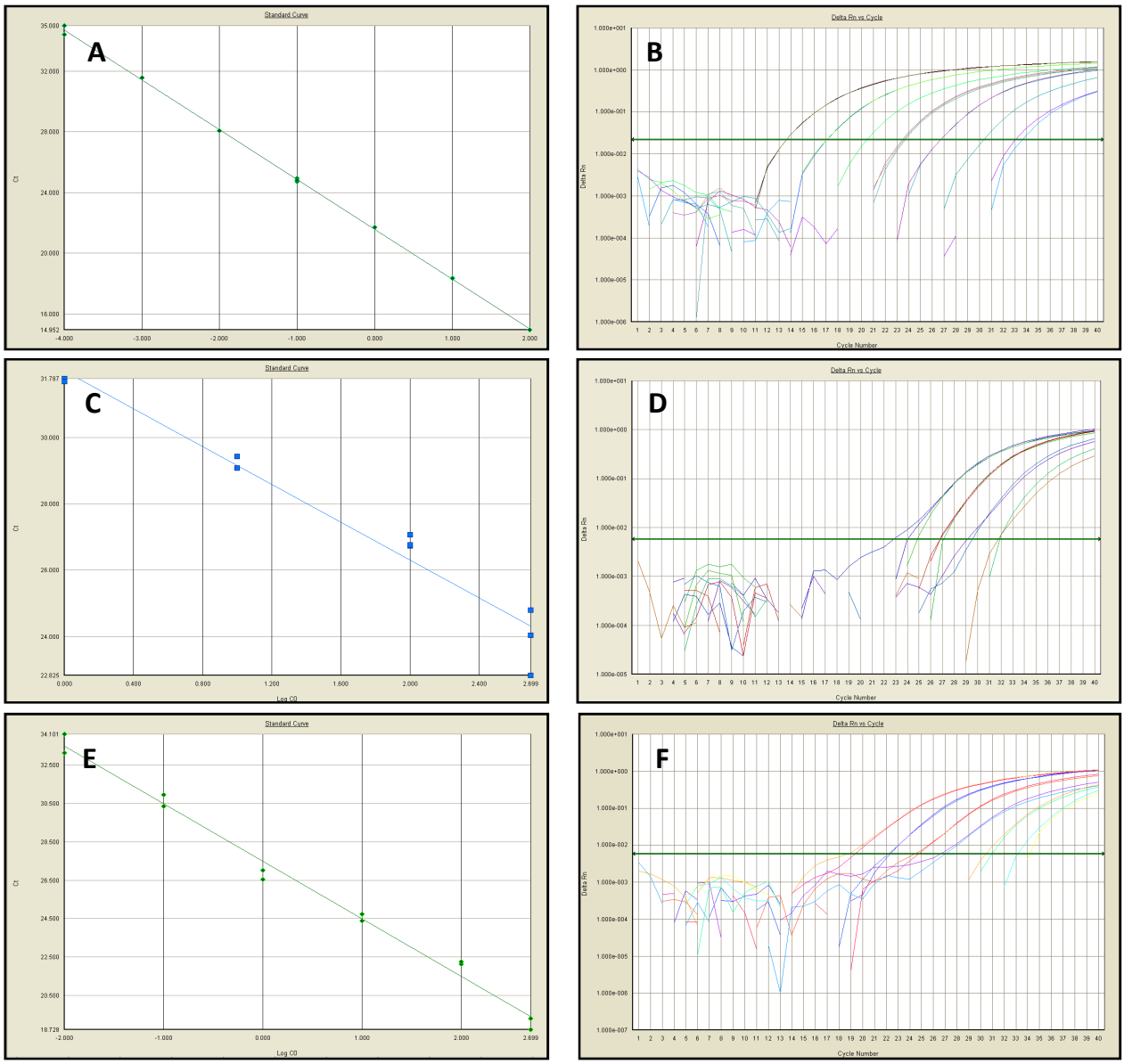

Figura 19. Curva padrão e de diluição, respectivamente, para 18S (A e B), HIF-1α (Ce D) e VEGF (E e F).

5.5.5. Quantificação Relativa da Expressão Gênica

Os dados de CTs obtidos a partir dos ensaios da PCR em Tempo Real para quantificação dos genes precursores do HIF-1α e VEGF foram utilizados para o cálculo da expressão relativa (Pfaffl, 2001).

Como pode ser observado nas figuras 20 e 21, a hipóxia induziu ao aumento significativo nas taxas de transcrição do HIF-1α e do VEGF no fígado, em relação à normóxia. No período de recuperação houve uma normalização no número de transcritos de HIF-1α, porém as taxas de transcrição do VEGF permaneceram aumentadas.

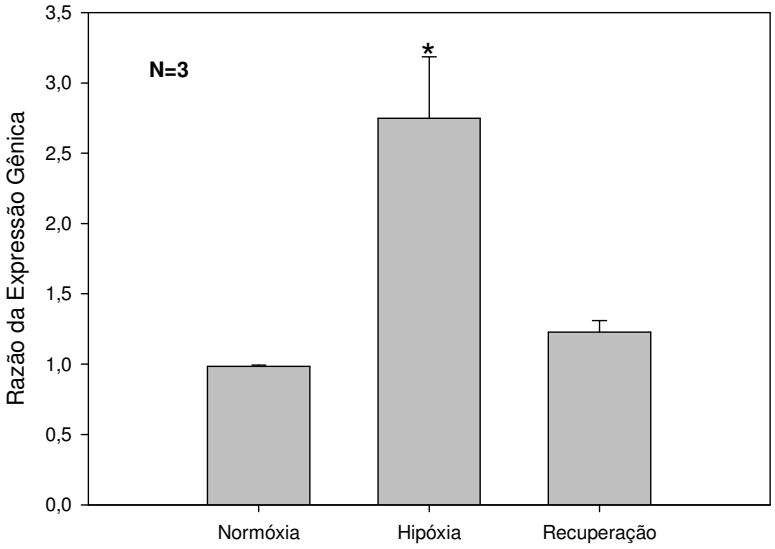

Figura 20**:** Razão de expressão do HIF-1α no fígado de *Astronotus ocellatus* em condições de hipóxia, normóxia e recuperação, normalizado por um gene endógeno (18S). Os valores estão apresentados como média ± erro padrão.

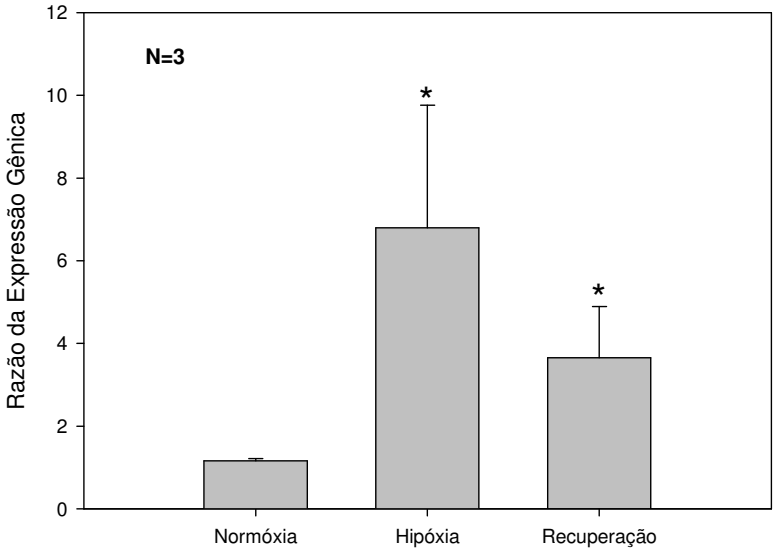

Figura 21**:** Razão de expressão do VEGF no fígado de *Astronotus ocellatus* em condições de hipóxia, normóxia e recuperação, normalizado por um gene endógeno (18S). Os valores estão apresentados como média ± erro padrão.

6. Discussão

A adaptação dos organismos às mudanças ambientais de curto ou longo prazo é uma das premissas básicas no conceito de evolução das espécies (Hochachka & Somero, 2002). Estas adaptações envolvem modificações genéticas que resultarão em ajustes metabólicos ou fisiológicos a mudanças de curto prazo, ou mudanças nos níveis de espécies e populações (Almeida-Val & Val, 1999). Segundo Val (2000), a baixa disponibilidade de oxigênio na água é um dos fatores ambientais mais estressantes aos peixes, requerendo ajustes em todos os níveis da organização biológica. No presente trabalho foi possível observar algumas das estratégias adotadas pela espécie *Astronotus ocellatus* que possibilitaram sua adaptação à hipóxia.

6.1. Parâmetros Hematológicos

Os peixes apresentam inúmeras estratégias de captação do oxigênio do ambiente para lidar com problemas relacionados à suas oscilações (Chapman & Mackenzie, 2009). Muitos compostos sanguíneos participam desta primeira etapa do processo respiratório, que consiste na tomada de oxigênio do meio e seu transporte aos tecidos (Val et al., 1985). Por isso, muitos destes parâmetros têm sido utilizados em estudos relacionados a estresses ambientais, como a hipóxia (Chippari-Gomes et al., 2005; Baldisseroto et al., 2006).

Neste trabalho, o aumento significativo do hematócrito (Ht) e da concentração de hemoglobina ([Hb]) no sangue dos organismos em hipóxia (Figuras 3 e 4, respectivamente), demonstra favorecimento do transporte de oxigênio aos tecidos. Esta resposta é possivelmente uma pré-adaptação do animal a um possível período prolongado de hipóxia (Val et al., 2000). Consequentemente, após o período de recuperação, quando a oferta de oxigênio foi retomada, os valores reduziram aos valores de normóxia, mesmo que não completamente, como foi o caso do hematócrito. Valores similares de hematócrito foram observados por Muusze et al. (1998) ao submeterem indivíduos adultos de *A. ocellatus*, oriundos de cativeiro, por 4h a 2% de saturação de oxigênio. Além disso, a concentração de hemoglobina e a porcentagem do hematócrito em normóxia, neste trabalho, são semelhantes às observadas por Muusze et al. (1998) para a mesma espécie. O mesmo perfil destas medidas já foi observado para outras espécies de peixes amazônicos que vivem em ambientes hipóxicos (Val, 2000), como *Metynnis hypsauchen* e *Serrasalmus eigenmanni* (Baldisseroto et al., 2008), podendo-se constatar uma correlação negativa entre estes dois parâmetros e os níveis de oxigênio para muitas espécies amazônicas (Val & Almeida-Val, 1995).

O aumento do número de eritrócitos na circulação sanguínea nos indivíduos em hipóxia neste trabalho (Figura 5) resulta possivelmente da contração esplênica causada pela liberação de catecolaminas, induzindo, assim, o aumento no hematócrito. Segundo Fernandes et al. (1999), a liberação de eritrócitos do reservatório esplênico, bem como ajustes nas concentrações iônicas e de fosfatos orgânicos no eritrócitos, são respostas primárias à hipóxia. Apesar disto, segundo Val (2000) e Chapman et al. (2002), tais alterações eritrocitárias, somadas ao aumento da frequência ventilatória comum à espécie *A. ocellatus* (Chippari-Gomes et al., 2005), são respostas adaptativas ou compensatórias aos baixos níveis de oxigênio dissolvido, permitindo aos peixes transportar a maior quantidade de oxigênio possível. O aumento do número de eritrócitos em condições hipóxicas foi semelhantemente observado em *A. ocellatus* por Muusze et al. (1998). Além disso, o aumento concomitante do número de eritrócitos, do hematócrito e da concentração de hemoglobina já foi também observado em adultos de tuvira *Gymnotus carapo* (Moraes et al., 2002) e de bodó *Hypostomus regani* (Val et al., 1985) em condições hipóxicas, bem como em peixes vivendo em condições hipóxicas na região pantanosa do Lago Vitória, na África Ocidental (Chapman et al., 2002).

As constantes corpusculares estão diretamente relacionadas aos parâmetros hematológicos apresentados acima. Neste trabalho, o aumento no número de eritrócitos circulantes visando um maior carreamento de oxigênio aos tecidos em condições hipóxicas causou uma redução no tamanho médio dos eritrócitos, o que pôde ser observado com a redução significativa do volume corpuscular médio (VCM) no grupo em hipóxia (Figura 6A), facilitando assim o fluxo celular na corrente sanguínea. Por outro lado, o peso da hemoglobina nos eritrócitos, medido pelo índice de hemoglobina corpuscular média (HCM), não foi alterado (Figura 6B), fazendo com que a concentração média de hemoglobinas contidas nos eritrócitos (CHCM) aumentasse proporcionalmente, como foi observado entre os indivíduos em hipóxia (Figura 6C).

Os resultados acima corroboram a importância da hemoglobina em se associar com os demais mecanismos celulares no processo de transporte de gases em condições limitantes de oxigênio. Respostas similares foram apresentadas pelo tambaqui *Colossoma macropomum* (Affonso, 1999) e pelo bodó *Lipossarcus pardalis* (Val et al., 1990) em condições de hipóxia experimental. Apesar disso, outras espécies amazônicas costumam aumentar a dimensão dos eritrócitos (VCM) no processo de ajuste a condições hipóxicas, como o pacu *Metynnis hypsauchen* e a piranha *Serrasalmus eingenmanni* (Baldisseroto et al., 2008), ambos da família Characidae.

Os indivíduos expostos à hipóxia no presente trabalho apresentaram também um aumento significativo da glicose sanguínea (Figura 7), revelando a importância deste metabólito no suprimento energético em condições hipóxicas. Este aumento sugere a ativação do metabolismo anaeróbico, já que a glicose é o principal combustível da glicólise, uma das principais vias energéticas na ausência de oxigênio. Almeida-Val et al. (1995), sugerem que a maioria das espécies de peixes da Amazônia apresenta alteração nos níveis de glicose plasmática quando submetida a algum nível de depleção de oxigênio. Esta resposta já foi previamente observada em adultos de *Astronotus ocellatus* em condições hipóxicas por Chippari-Gomes et al. (2005), que detectaram também uma redução nos níveis de glicogênio no fígado destes organismos (glicogenólise) e o aumento de lactato, reforçando a hipótese de utilização da glicólise anaeróbica. A mobilização de glicose pode ocorrer também em peixes amazônicos de respiração aérea facultativa quando expostos à hipóxia, como no bodó *Pterygoplichthys gibbiceps* (Lopes, 2003).

Os valores de glicose apresentados no período de recuperação sugerem uma moderada hiperglicemia em função da equivalência com os valores apresentados em hipóxia. Esta hiperglicemia sugere uma gliconeogênese remanescente após as primeiras horas de retomada de oxigênio (recuperação). Esta resposta da glicose foi observada por Van Raaij et al. (1996) nas primeiras horas de recuperação à hipóxia pela carpa comum *Cyprinus carpio*, considerada também uma espécie bastante tolerante à hipóxia. Isso possivelmente se deve ao fato de que, no período inicial de recuperação à hipóxia, o consumo de oxigênio é elevado radicalmente e seguido por um período de “repouso” antes que os níveis de glicose retornem ao normal (Heath & Pritchard, 1965). Este fenômeno foi também observado em adultos de *A. ocellatus* por Lewis et al. (2007). Estes detectaram um aumento de 270% no consumo de oxigênio na primeira hora de recuperação e após três horas, mesmo com o consumo de oxigênio normalizado, os níveis dos metabólitos sanguíneos, como o lactato, continuavam aumentados.

Com isso, podemos concluir que o período de 3 horas de hipóxia severa foi substancial para que a espécie acumulasse um débito de oxigênio, demonstrando uma eficiente recuperação dos parâmetros hematológicos no tempo fornecido de recuperação, porém exigindo maior tempo na normalização de metabólitos como a glicose e, segundo Lewis et al. (2007), o lactato. Por fim, pudemos corroborar a importância da glicose extracelular como combustível metabólico em condições limitantes de oxigênio, ocorrendo paralelamente a outras estratégias (utilização dos estoques de glicogênio) e sendo dependente de respostas respiratórias e da herança filogenética das espécies (Almeida-Val et al., 2006).

6.2. Análises Enzimáticas

Como visto acima, muitos parâmetros hematológicos, como a glicose e os eritrócitos, participam diretamente na primeira etapa do processo de trocas gasosas. Por outro lado, metabólitos como a glicose, participam da segunda etapa, relacionada ao desempenho metabólico na obtenção de energia pelos tecidos (metabolismo aeróbico ou anaeróbico), de acordo com a disponibilidade de oxigênio (Baldisseroto, 2009). Esta etapa exige também a participação de muitas enzimas que, atuando como catalisadores das reações, aceleram os processos envolvidos e sinalizam as rotas metabólicas utilizadas pelos diferentes tecidos, principalmente no sentido da supressão metabólica e/ou a ativação da glicólise anaeróbica (Almeida-Val & Hochachka, 1995).

A MDH é uma enzima anfibólica que atua no balanço oxidoredutor da célula durante o metabolismo aeróbico, enquanto a CS faz parte do grupo das enzimas oxidativas, ambas atuando no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Ciclo de Krebs). A MDH atua como catalisadora da reação reversível de transformação do malato a oxaloacetato, enquanto que a CS atua como uma transferase controladora da primeira reação do Ciclo de Krebs. No presente estudo, a hipóxia induziu a redução significativa destas duas enzimas no fígado (Figuras 8 e 12, respectivamente), indicando a capacidade de supressão metabólica deste órgão no sentido de diminuir a demanda por oxigênio e otimizar sua utilização em outros tecidos. A redução da atividade da MDH no fígado pode indicar ainda uma diminuição na síntese de glicogênio, uma vez que esta enzima atua também na gliconeogênese e este é um importante órgão gliconeogênico. Além disso, há uma tendência em priorizar a glicólise anaeróbica neste período de maior exigência energética, como pôde ser observado com o aumento da glicose neste tecido no presente trabalho (Hochachka & Somero, 2002; Panepucci et al., 2000). A mesma lógica se aplica à redução da MDH no coração dos organismos em hipóxia (Figura 9), órgão prioritário no recebimento de glicose nesta condição.

Lewis et al. (2007), observaram que três horas de hipóxia severa reduzem drasticamente o consumo de oxigênio e a síntese protéica (até 60%) no fígado e no coração do *Astronotus ocellatus*, reforçando a idéia de supressão metabólica. Observaram ainda que os principais órgãos de síntese protéica, fígado e brânquias, retomam o consumo de oxigênio e a síntese protéica aos valores de normóxia após três horas de recuperação, demonstrando eficiência destes órgãos nesta etapa. No presente trabalho, o retorno da MDH no fígado aos valores normais nas mesmas 3 horas de recuperação indica a importância deste órgão na remontagem dos estoques de glicogênio (glicogênese) e retomada da produção protéica após o estresse hipóxico. Em seu habitat natural, o

Astronotus ocellatus vivencia flutuações diárias nos níveis de oxigênio dissolvido, de modo que uma estratégia contra a depleção periódica deste gás seja, possivelmente, uma eficiente estocagem de glicogênio e reorganização da maquinaria protéica. Por outro lado, estes autores observaram que o consumo de oxigênio e as taxas de síntese protéica não haviam retornado completamente aos valores iniciais no coração após 3 horas de recuperação. Este resultado parece ter relação com a atividade da MDH cardíaca entre os indivíduos em recuperação no presente trabalho, visto que estes permaneceram apenas moderadamente recuperados, indicando maior dependência destes órgãos nesta etapa. Resultados similares foram encontrados por Wood et al. (2009), observando que adultos de *A. ocellatus,* após três horas de hipóxia severa, apresentaram uma bradicardia (redução dos batimentos cardíacos e aumento da força de contração), mantida durante as primeiras horas de recuperação. Com isso, pode-se concluir que o coração, como órgão prioritário no recebimento e distribuição de oxigênio, possui uma função sistêmica que resulta numa recuperação mais lenta, em relação ao fígado, após as três primeiras horas de retomada do oxigênio. Segundo Lewis et al (2007), o restabelecimento das taxas metabólicas do *Astronotus ocellatus* em órgãos como coração e cérebro, nas primeiras horas de retomada de oxigênio, pode ser atribuído a processos celulares associados ao aumento no consumo de oxigênio nestes tecidos, anteriormente à assimilação protéica.

No presente estudo, o cérebro apresentou uma surpreendente redução de 54% e 12% na atividade das enzimas CS e LDH, respectivamente, durante a hipóxia (Figuras 13 e 15, respectivamente). Estas respostas indicam uma preferência pela supressão metabólica em relação à ativação do metabolismo anaeróbico (atividade da LDH) em condições hipóxicas. Além disso, o retorno aos níveis de normóxia apresentado pela CS durante a recuperação revela a dependência do metabolismo oxidativo deste tecido nas primeiras horas de reoxigenação, evitando o metabolismo anaeróbico (reduzida atividade da LDH neste período). A redução na atividade da LDH cerebral em condições hipóxicas já foi observada na espécie amazônica *Cichlasoma amazonarum* sob exposição crônica (Almeida-Val et al., 1995).

As condições de hipóxia impostas neste trabalho não levaram a uma variação significativa na atividade das enzimas oxidativas CS e MDH no músculo branco desta espécie (Figuras 14 e 10, respectivamente). Apesar disto, a redução na atividade de enzimas oxidativas musculares já foi observada em adultos de *Astronotus ocellatus* durante períodos de hipóxia severa (Chippari-Gomes et al., 2005). Segundo Almeida-Val et al. (1999), o músculo esquelético é um tecido essencialmente anaeróbico que tende a suprimir seu metabolismo oxidativo em condições hipóxicas e manter a demanda energética através

do metabolismo anaeróbico, mesmo quando a via anaeróbica apresenta uma certa redução. Este fenômeno já foi detectado em espécies amazônicas como *Astronotus ocellatus* (Chippari-Gomes et al., 2005), *Cichlassoma amazonarum* (Almeida-Val et al., 1995) e *Serrasalmus rhombeus* (Ameida-Val et al., 1998), onde a atividade da LDH permaneceu constante durante a hipóxia, e em *Symphysodon aequifasciatus* (Chippari-Gomes et al., 2005), com uma redução na atividade da enzima.

A plasticidade fenotípica da ictiofauna amazônica já foi reverenciada por meio de seus complexos sistemas isozímicos, que respondem variadamente em função dos hábitos e das características naturais dos ambientes que estas espécies ocupam (Almeida-Val & Farias, 1996; Almeida-Val et al, 1999). Além disso, muitas destas características são estacionárias podendo ser utilizadas como marcadores filogenéticos (Whitt, 1987). A espécie *Astronotus ocellatus* habita preferencialmente lagos e margens de rios amazônicos com características lênticas, onde se alimentam e reproduzem, lidando com situações hipóxicas mesmo durante o nascimento e crescimento da prole. A supressão metabólica generalizada em indivíduos adultos neste trabalho, por meio da redução de enzimas oxidativas em diferentes tecidos e mesmo da LDH no cérebro, está associada a uma redução na atividade natatória (Sloman et al., 2006), também detectada no presente trabalho pela permanência dos indivíduos no fundo dos aquários durante a exposição à hipóxia. Esta estratégia soma-se à ativação do metabolismo anaeróbico (Almeida-Val et al., 2000; Chippari-Gomes et al,. 2005) e redução na produção de compostos nitrogenados (excreção) e fluxo iônico (Wood et al,. 2007). Por outro lado, juvenis desta espécie apresentam menor tolerância à hipóxia, apresentando menor participação do metabolismo anaeróbico e maior atividade natatória na busca por esconderijos e ambientes melhor oxigenados (Sloman et al., 2007).

6.3. Expressão dos Genes HIF-1α e VEGF

A capacidade dos organismos em sobreviver a mudanças ambientais depende diretamente da magnitude da mudança, do espaço de tempo no qual a mudança ocorre e da constituição genética do mesmo, que será alterada ao longo das gerações por seleção das variações que melhor se adéquam às novas condições ambientais. Consequentemente, estressores ambientais têm sido um dos principais modificadores da organização biológica durante a evolução dos organismos. No entanto, independente do suporte genético, sempre haverá um ajuste imediato, resultante de algum grau de plasticidade nesta organização biológica, e que resultará na homeostase dos organismos (Almeida-Val et al., 1999).

Segundo Lendahl et al. (2009), a manutenção dos níveis de oxigênio e seu equilíbrio homeostático são cruciais para as células. Neste sentido, a regulação da expressão de genes sensíveis à hipóxia fornece informações sobre a quantidade de oxigênio a ser convertido em respostas celulares apropriadas. Portanto, embora haja vias principais de transcrição, a cascata de sinalização pode ser modificada para permitir tanto a plasticidade como a especificidade no desempenho deste processo, dependentes do contexto celular e do grau de intensidade e duração da hipóxia.

Muitos processos envolvidos na homeostase da célula são mediados pelo fator de transcrição HIF (*hypoxia-inducible factor*), atuando na transcrição de centenas de genes alvo (revisto por Nikinma & Rees, 2005). Embora esta seja uma das vias principais de transcrição mais estudadas, ainda estamos distante de compreender sua atuação no genoma como um todo, sobretudo em relação a organismos aquáticos, levando em consideração seus habitats naturais. No presente trabalho, o aumento da expressão do HIF-1α nos organismos expostos à hipóxia revela a relação desta subunidade protéica com respostas a este tipo de estresse, já que é constantemente produzida e degradada em condições normóxicas, mas comprovadamente ativa em situações hipóxicas, corroborando os poucos trabalhos realizados com peixes em tais condições (Soitamo et al., 2001; Nikinmaa et al., 2004).

O aumento de aproximadamente três vezes na taxa de transcrição deste gene (Figura 20), associado às demais respostas metabólicas apresentadas neste estudo, sugere que o balanço homeostático da espécie *Astronotus ocellatus*, em situações de hipóxia severa e aguda, depende diretamente da atuação deste fator de transcrição na expressão de genes alvo no fígado. Este importante órgão hematopoiético e do metabolismo do glicogênio, parece ter combinado a supressão do metabolismo oxidativo com a utilização da energia de vias remanescentes (possivelmente o metabolismo anaeróbico) para a ativação de expressão de genes relacionados à recomposição celular de compostos sanguíneos (presente trabalho) e reestruturação de sua maquinaria protéica (Lewis et al., 2007). Apesar da escassez de trabalhos neste sentido, Nikinma & Rees (2005) sugerem que uma ampla gama de tecidos expresse HIF-1α em diferentes condições. Em truta-arco-íris *Oncorhynchus mykiss*, o aumento da temperatura levou ao aumento na expressão deste gene no fígado e gônadas (Soitamo et al., 2001), enquanto no salmão *Salmo salar* este aumento ocorreu em células embrionárias durante seu desenvolvimento (Vuori et al., 2004). Além disso, em mamíferos, o aumento da expressão do HIF-1α e seus genes alvo durante a hipóxia demonstra seu papel no nível sistêmico, na produção de células sanguíneas, na apoptose, na produção de catecolaminas, no metabolismo de carboidratos e no aumento da vascularização (Wenger, 2000; Semenza, 2004).

Umas das estratégias adotadas pela espécie *Astronotus ocellatus* para suportar a hipóxia no presente estudo foi a regulação da angiogênese (crescimento de novos vasos a partir dos já existentes) no fígado. Esta estratégia ficou evidenciada pelo aumento expressivo das taxas de transcrição do gene VEGF (*vascular endothelial growth factor*) neste trabalho; aproximadamente sete vezes maior que os níveis de normóxia (Figura 21). Esta vascularização está associada a um aumento na área das superfícies respiratórias (aumentando a densidade vascular) e uma circulação mais efetiva (diminuição na distância de difusão dos gases), facilitando o consumo de oxigênio no órgão. Estudos elucidando a expressão do VEGF em peixes são extremamente raros e estão voltados à caracterização deste gene num contexto filogenético (Lee et al., 2002; Gong et al., 2004), de modo que a maioria dos trabalhos relacionando este gene a situações de hipóxia estão concentrados na área de saúde humana. Neste sentido, muitos estudos têm mostrado que o VEGF é rápido e reversivelmente induzido por baixas concentrações de oxigênio em diferentes tecidos (Minchenko et a., 1994; Brogi et al., 1994). Os níveis de RNAm de VEGF são extremamente altos em células tumorais justapostas a áreas de necrose, regiões onde há grande ocorrência de hipóxia e apoptose celular. Além disso, estudos mostram que o acúmulo de adenosinas, provenientes de situações hipóxicas, está envolvido no processo de indução da transcrição do gene VEGF em condições limitantes de oxigênio (Takagi et al., 1996).

As altas taxas de consumo de oxigênio e a normalização da síntese protéica observada no fígado de *Astronotus ocellatus* (Lewis et al., 2007) nas primeiras horas de recuperação, podem estar associados com os altos níveis de transcrição do VEGF encontrados no fígado dos indivíduos em recuperação no presente estudo. Isso sugere que uma importante estratégia para a recuperação da atividade deste órgão seja um enriquecimento vascular, assim como acontece em células cancerosas no processo de propagação do câncer.

O mecanismo de transcrição do VEGF induzido por eventos de hipóxia parece ser mediado, ao menos em parte, pelo posicionamento do HIF no sítio de ligação específico localizado na região promotora do VEGF, como anteriormente demonstrado em trabalhos envolvendo a regulação da transcrição destes genes (revisto por Neufeld et al., 1999). O aumento concomitante nas taxas de transcrição do HIF-1α e do VEGF no presente trabalho não nos permite afirmar sobre a relação destes genes no processo transcricional durante a hipóxia, porém nos fornece uma informação importante no sentido da dependência de ambos no auxílio a eventos de hipóxia em ciclídeos que vivenciam situações de hipóxia na região amazônica.

7. Conclusões

❖ A supressão metabólica generalizada está entre as principais estratégias adotadas por adultos da espécie *Astronotus ocellatus* na tolerância à hipóxia severa, se associando ao metabolismo anaeróbico na manutenção energética de vias prioritárias remanescentes e retornando a depender do metabolismo oxidativo nas primeiras horas de recuperação.

❖ Os diferentes tecidos do *Astronotus ocellatus* apresentam estratégias integradas durante a hipóxia e a recuperação, sendo a rápida retomada dos tecidos sanguíneo, hepático e cerebral de fundamental importância nos períodos de recuperação.

❖ A tolerância do *Astronotus ocellatus* a situações de hipóxia está relacionada ao aumento da expressão do gene HIF e seu papel na regulação da expressão de seus genes alvo, como o VEGF.

❖ O aumento da vascularização de tecidos como o fígado, verificado pelo aumento da transcrição do VEGF, favorece a difusão de oxigênio aos tecidos, conferindo maior tolerância à espécie em condições de hipóxia e auxiliando na recuperação mais rápida.

❖ A integração das respostas nos diferentes níveis da organização biológica (comportamental, fisiológico, bioquímico e molecular) do *A. ocellatus* favorece sua tolerância à hipóxia e uma recuperação mais eficiente.

8. Referências Bibliográficas

Affonso, E.G. 1999. O gás sulfídrico e a respiração de duas espécies de peixes teleósteos, *Hoplosternum littorale* e *Colossoma macropomum*: distribuição, tolerância e adaptação. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 107p. [Tese de Doutorado].

Alabaster, J.S. & Lloyd, R. 1982. *Water quality criteria for freshwater fish*. 2° ed. Cambridge: FAO, 361p.

Almeida-Val, V.M.F. & Val, A.L. 1990. Adaptação Bioquímica em Peixes da Amazônia. Ciência Hoje. 11 (64):62-67.

Almeida-Val, V.M.F; Val, A.L; Hochachka, P.W. *Hypoxia tolerance in Amazon fishes: status of an under-explored biological "goldmine*". 1993. *In:* Hochachka, P.W; Lutz, P.L; Sick, T; Rosenthalm, M; Van den Thillart, G. (Eds.) Surviving hypoxia: mechanisms of control versus adaptation. Boca Raton: CRC Press.

Almeida-Val, V.M.F; Farias, I.P; Silva-M.N.P; Duncan, W.P. 1995. *Bioquemical adjustmens to hypoxia in Amazon Cichlids*. Braz. J. Med. Bioquem. Res., 28:1257-1263.

Almeida-Val, V. M. F. & Hochachka, P. W. 1995. *Air-breathing fishes: metabolic biochemistry of the first diving vertebrates*. In *Environmental and Ecological Biochemistry* (ed. P. W. Hochachka and T. Mommsen), Amsterdam: Elsevier Science., 45- 55.

Almeida-Val, V. M. F. & Farias, I. P. 1996. *Respiration in fish of the Amazon: metabolic adjustments to chronic hypoxia*. In *Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon* (ed. A. L. Val, V. M. F. Almeida- Val and D. J. Randall), pp. 257-271. Manaus: INPA.

Almeida-Val, V.M.F; Paula-Silva, M.N; Duncan, W.P; Lopes, N.P; Val, A.L; Land, S. 1999. *Increase of anaerobic potential during growth of an Amazonian cichlid, Astronotus ocellatus. Survivorship and LDH regulation after hypoxia exposure*. In: Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), Biology of tropical fishes. INPA, Manaus, 437-448.

Almeida-Val, V. M. F; Val, A. L; Duncan, W. P; Souza, F. C. A; Paula-Silva, M. N; Land, S. 2000. *Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish Astronotus ocellatus (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels*. *Comp. Biochem. Physiol.* 125B, 219-226p.

Almeida-Val, V.M.F; Chppari-Gomes, A.R; Lopes, N.P. 2006. 443-491.*Metabolic and Physiological Adjustments to Low Oxygen and High Temperature in Fishes of the Amazon*. In Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F; Randall, D.J. The Physiology of Tropical Fishes. Academic Press.

Baldisseroto, B; Chippari-Gomes, A.R; Lopes, N.P; Bicudo, J.E.P.W; Paula-Silva, M.N; Almeida-Val, V.M.F; Val, A.L. 2008. *Ion fluxes and hematological parameters of two teleosts from the Rio Negro, Amazon, exposed to hypoxia.*Braz. J. Biol. 68(3): 571-575.

Baldisseroto, B. 2009. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura/ Bernardo Baldisseroto. 2° Ed. Santa Maria: UFSM, 352p.

Beeching, S.C. 1995. *Collour pattern and inhibition of aggression in the cichlid fish Astronotus ocellatus*. J. Fish Biol. 47: 50-58.

Benjamin, L. E; Hemo, I; Keshet, E. 1998. *A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the pre-formed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF*. Development 125: 1591–1598.

Boutilier, R.G. 2001b. *Mechanisms of metabolic defense against hypoxia in hibernating frogs*. Respir. Physiol. 128: 365–377.

Bracken, C.P; Whitelaw, M.L; Peet, D.J. 2003. *The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses*. *Cell Mol Life Sci* 60: 1376–1393.

Braum, E & Junk, W.J. 1982. *Morphological adaptation of two Amazonian Characoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters*. Int. Revue. Ges. Hydrobiol., 67, 869.

Brogi, E; Wu, T; Namiki, A; Isner, J.M. 1994. *Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only*. Circulation 90:649–652.

Champe, P.C. 2006. Bioquímica Ilustrada. ARTMED EDITORA, Porto Aelgre, Brasil, 544p.

Chapman, L.J; Galis, F; Shinn, J. 2000. *Phenotypic plasticity and the possible role of genetic assimilation: hypoxia-induced trade-offs in the morphological traits of an African cichlid*. *Ecol Lett* 3: 387–393.

Chapman, L.J. & McKenzie, D.J. 2009. *Behavioral responses and ecological consequences*. In Farrel, A.P. &. Brauner, C.B. (Eds.) *Hypoxya*. Acad. Press. Londres. 27: 25-77.

Chellapa, S; Yamamoto, M.E; Cacho, M.S.R.F. 1999. *Reproductive behavior and ecology of two species of Cichlid fishes.* In. Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F. (Eds.), Biology of tropical fishes. INPA, Manaus, 113-126.

Chippari-Gomes, A.R. 2002. Adaptações metabólicas dos ciclídeos aos ambientes hipóxicos da Amazônia. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Biologia de Água Doce e Pesca Interior, 151p.[Tese de Doutorado]

Chippari-Gomes, A.R; Leitão, M.A.B; Paula-Silva, M.N; Mesquita-Saad, L.S.B; Almeida-Val, V.M.F. 2003. *Metabolic adjustments of Satanoperca aff. jurupari* (Perciformes; Cichlidae). Genetics and Molecular Biology. 26,1,27-32.

Chippari-Gomes, A.R; Gomes, L.C; Lopes, N.P; Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F. 2005. *Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia.* Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 141, 347–355.

Conn, G; Soderman, D.D; Schaeffer, M.T; Wile, M; Hatcher, V.B; Thomas, K.A. 1990. *Purification of a glycoprotein vascular endothelial cell mitogen from a rat glioma-derived cell line*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1323-1327.

Connolly, D.T; Olander, J.V; Heuvelman, D; Nelson, R; Monsell, R; Siegel, N; Haymore, B.L; Leimgruber, R; Feder, J. 1989. *Human vascular permeability factor: isolation from U937 cells. J Biol Chem.* 264:20017-20024.

Connolly, D.T. 1991. *Vascular permeability factor: a unique regulator of blood vessel function*. *J Cell Biochem*.47:219-223.

Crampton, W.G.R. 1996. *The electric fish of the upper Amazon: ecology and signal diversity.* Ph Tesis. University of Oxford, England, 223p.

Driedzic, W.R. & Almeida-Val, V.M.F. 1996. *Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and the fresh-water stingray* (*Potamotrygon hystrix*) J. Exp. Zool. 274:327-333.

Driedzic, W.R. & Hochachka, P.W. 1978. *Metabolism in fish during exercise.* In Hoar, W.S. & Randall, D.J. (Eds.), Fish Physiology. Vol. VII. Academic Press, New York, 503-543.

Evans, D.H. 1998. *The physiology of fishes*. Ed. CRC Press. 519p.

Fernandes, M.N; Sanches, J.R; Matsuzaki, M; Panepucci, L; Rantin, F.T. 1999. Aquatic respiration in facultative air-breathing: effects of temperature and hypoxia, p. 341-352.

In Val, A.L. & Almeida-Val, V.M.F. (Eds.) Biology of tropical fishes. Manaus, INPA, 460p.

Ferrara, N; Chen, H; Davis-Smyth, T; Gerber, H. P; Nguyen, T. N; Peers, D; Chisholm, V; Hillan, K. J; Schwall, R. H. 1998. *Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis*. Nat. Med. 4, 336–340

Folkman, J. 1998. Is tissue mass regulated by vascular endothelial cells? Prostate as the first evidence. Endocrinology 139, 441–442.

Fontenele, O. 1951. Contribuição para o conhecimento da biologia do apaiari, *Astronotus ocellatus* (SPIX) (Pisces, Cichlidae), em cativeiro. Aparelho de reprodução. Hábitos de desova e prolificidade. Ver. Bras. Biol. 11(4): 467-484.

Gessner, F. 1961. *Der Sauerstofvhaushalt des Amazonas*. Int. Ver. Ges. Hydrobiol., 46: 542-561p.

Goldenfarb, P.B; Bowyer, F.P; Hall, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. American Journal of Clinical Pathology, 56(1):35-39.

Gong, B.W; Liang, D; Chew, T.G; Ge, R.W. 2004. *Characterization of the zebrafish vascular endothelial growth factor A gene: comparison with VEGF-A genes in mammals and Fugu. Biochim Biophys Acta-Gene Struct Expr* 1676: 33–40.

Goulding, M. 1980. *The fishes and the forest. Explorations in Amazonian Natural History.* University of California Press. Berkeley, USA. 280p.

Graven, K.K; Troxler, R.F; Kornfeld, H; Panchenko, M.V; Farber, H.W. 1994. *Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia*. *Journal of Biological Chemistry,* 269: 24446-24453.

Greaney, G.S; Place, A.R; Cashoon, R.E; Smith, G; Powers, D.A. 1980. *Time course of changes in enzymes activities and blood respiratory properties of Killifish during long term acclimatation to hypoxia.* Physiol. Zool., 53:136-144.

Hall, T. 2001. BioEdit version 5.0.6. Website www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioDoc.pdf. Acessado em: 23 set de 2010.

Heath, G.A & Pritchard, A.W. 1965.*Effects of severe hypoxia on carbohydrate energy stores and metabolism of two species of fresh-water fish*. Physiol. Zoology. 18(4): 325-333.

Hochachka, P.W. 1986. *Defence strategies against hypoxia and hypothermia*. *Science,* 231: 234–241.

Hochachka P.W. & Somero, G.N. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York, 466p.

Hochachka, P.W. & Lutz, P.L. 2001. *Mechanism, origin and evolution of anoxia tolerance in animals.* Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol., 130: 435-459.

Hughes, G. M. (1984). *Measurement of gill area in fishes: Practices and problems.* J. Mar. Biol. Assn. U.K. 64, 637–655.

International Game Fish Association. 2001. *Database of IGFA angling records until 2001*. IGFA, Fort Lauderdale, USA. Disponível em: http://www.igfa.org/ Acessado em: 15 de setembro 2009.

Junk, W.J. 1984. *Ecology, fisheries and fish culture in Amazonia*. In Sioli, H. (Ed.), *The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 443-476.

Junk, W.J; Soares, G.M; 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*, 7(4): 397-431.

Junk, W.J; Bailey, P.B; Sparks, R.E. 1989. The flood-pulse concept in river-floodplain systems. In: Dodge, D. (Ed.), Proc. Int. Larger River Symp. Can. Spec. Publ. Fish Aquat. Sci., 106-127.

Junk, W.J; Furch, K. 1993. *A general review of tropical South American floodplains*. *Wetlands Ecology and Management,* 4: 231-238.

Junk, W.J. 1997. The Central Amazon Floodplain: Ecology of a Pulsing System. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.536p.

Kampen, E.J.; Zijlstra, W.G. 1964. *Standardization of hemoglobinometry: II. The hemoglobincyanide method*. *Clin. Chim. Acta*, 6: 538-544.

Kramer, D.L. & McClure, M. 1982. *Aquatic surface respiration, a widespread adaptation to hypoxia in tropical freshwater fishes*. *Environ. Biol. Fish.* 7: 47-55.

Kramer, D.L. 1987. *Dissolved oxygen and fish behavior. Environ. Biol. Fish.* In Sioli, H. 1990. *Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais.* Editora Vozes, Petrópolis, Brasil. 81-92.

Kramer, D.L., Mnaley, D; Bourgeois, R. 1983. *The effect of respiratory mode and oxygen concentration on the risk of aerial predation in fishes. Can. J. Zool.* 61(3): 653-665.

Kuchler, I.L; Miekeley, N; Forsberg, B.R. 2000. *A Contribution to the Chemical Characterization of Rivers in the Rio Negro Basin, Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society*. 11(3): 286-292.

Kullander, S.O. 1998. *Teleocichla, a new genus and South American rheophilic cichlid fishes with six new species (Teleostei:Cichlidae)*. Copeia, 1:196-230.

Lee, P; Goishi, K; Davidson, A.J; Mannix, R; Zon, L; Klagsbrun, M. 2002. *Neuropilin-1 is required for vascular development and is a mediator of VEGF-dependent angiogenesis in zebrafish. Proc Natl Acad Sci USA* 99: 10470–10475.

Leggatt, R.A. & Iwama, G.K. 2003. *Occurrence of polyploidy in the fishes. Rev Fish Biol Fisheries* 13: 237–246.

Lendahl, U; Lee, K.L; Yang, H; Poellinger, L. 2009. *Generating specificity and diversity in the transcriptional response to hypoxia.* Nature Reviews, Genetics.10:821-832.

Lewis,J.M; Costa, I; Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F; Gamperl, A.K; Driedzic, W.R. 2007 *Responses to hypoxia and recovery: repayment of oxygen debt is not associated with compensatory protein synthesis in the Amazonian cichlid, Astronotus ocellatus.* J. Exp. Biol. v. 210, 1935-1943.

Liu, Y; Cox, S.R; Morita, T; Kourembanas, S. 1995. *Hypoxia Regulates Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Endothelial Cells*. Circulation Research. 77:638-643.

Loiselle, P.V. 1985. *The Cichlid Aquarium*. Tetra Press, Melle Federal Republico f Germany.

Lopes, N.P. 2003. Ajustes metabólicos em sete espécies de Siluriformes sob condições hipóxicas: aspectos adaptativos. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Biologia de Água Doce e Pesca Interior, 168p. [Tese de Doutorado]

Lowe-McConnell, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press, Cambridge, 382p.

Lundberg, J.G. 1998. *The temporal context for the diversification of neotropical fishes*. In: Malabarba, L.R; Reis, R.E; Vari, R.P; Lucena, C.A. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, 49-68.

Lutz, P.L. & Milton, S.L. 2004. *Negotiating brain anoxia survival in the turtle*. J. Exp. Biol. 207: 3141–3147.

Markert, C.L. 1975. *Biology of isozymes*. Bioscience. 25:365-368.

Minchenko, A; Bauer, T; Salceda, S; Caro, J. 1994. *Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in vivo and in vitro*. Lab Invest. 71:374-379.

Moraes, G; Avilez, I. M; Altran, A. E; Barbosa, C. C. 2002. Biochemical and hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus carapo* exposed to environmental hypoxia. Braz. J. Biol. 62(4): 633-640.

Museu de História Natural da Flórida. 2009. Disponível em: http://www.flmnh.ufl.edu/. Acessado em: 23 set de 2010.

Muusze, B., Marcon, J., van denThillart, G. and Almeida-Val. V.M.F. (1998). Hypoxia tolerance of Amazon fisf. Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. Comp. Biochem. Physiol. 120A: 151-156.

Nanduri, J; Yuan, G; Kumar, G.K; Semenza, G.L; Prabhakar, N.R. 2008. Transcriptional responses to intermittent hypoxia Respiratory Physiology & Neurobiology, 164:277–281.

Nelson, J.S. 1994. Fishes of the World. John Willwy & Sons Inc. USA. 600p.

Neufeld, G; Cohen, T; Gengrinovitch, S; Poltorak, Z. 1999. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. The FASEB journal.13:9-22.

Nevo, E. 1990. *Molecular Evolutionary Genetics of Isozymes: Pattern, Theory and Application*. Biol.Med., 701-742.

Nikinmaa M, Rees BB. 2005. *Oxygen-dependent gene expression in fishes*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 288:R1079–90.

Nikinmaa M, Pursiheimo S; Soitamo A. 2004. *Redox state regulates HIF-1α protein level, its DNA binding and phosphorylation in salmonid cells*. *J Cell Sci* 117: 3201–3206.

Nilsson, G.E. & Renshaw, G.M. 2004. *Hypoxic survival strategies in two fishes: extreme anoxia tolerance in the North European crucian carp and natural hypoxic preconditioning in a coral-reef shark*. J. Exp. Biol. 207: 3131–3139.

Ohno, S. 1970. Evolution by gene duplication. Springer-Verlag, New York. 160pp.

O'Rourke, J. F; Pugh, C. W; Bartlett ,S. M; Ratcliffe, P. J. 1996. *Identification of hypoxically inducible mRNAs in HeLa cells using differential-display PCR. Role of hypoxia inducible factor-1.* Eur. J. Biochem. 241: 403–410.

Paiva, M.P. & Nepomuceno, F.H. 1989. *On the reproduction in captivity of the Oscar, Astronotus ocellatus (CUVIER), according to the mating methods (Pisces- Cichlidae)*. Amazoniana, 4: 361-377.

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 29(900):2002-2007.

Panepucci, L; Ferandes, M.N; Sanches, J.R; Rantin, F.T. 2000. *Changes in LDH and MDH activities during hypoxia and after temperature acclimation in the armored fish, Rhinelepis strigosa (Siluriformes, Loricariidae). Rev. Brasil. Biol., 60*(2): 353-360.

Plate, K. H; Breier, G; Weich, H.A; Risau, W. 1992. *Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo*. Nature (London) 359:845–848.

Richards, J.G.; Wang, Y.S; Brauner, C.J; Gonzalez, R.J; Patrick, M.L;Schulte, P.M; Chippari-Gomes, A.R; Almeida-Val, V.M.F; Val, A.L. 2007. *Metabolic and ionoregulatory responses of the Amazonian cichlid, Astronotus ocellatus, to severe hypoxia*. J. Comp. Physiol. (B) 177, 361–374.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989).

Saroglia, M; Terova, G; De Stradis, A; Caputo, A. 2002. *Morphometri adaptations of sea bass gills to different dissolved oxygen partial pressures*. *J Fish Biol* 60: 1423–1430.

Schimidt, G.W. 1973. *Primary production of phytoplankton in the three types of Amazonian Waters II. The limnology of a tropical floodplain lake in central Amazonia* (Lago do Castanho). Amazoniana, 4(2):139-203.

Scott, G.R; Wood, C.M; Sloman, K.A; Iftikar, F.I; Boeck, G.D, Almeida-Val, V.M.F; Val, A.L. 2008. *Respiratory responses to progressive hypoxia in the Amazonian oscar, Astronotus ocellatus.* Respiratory Physiology & Neurobiology 162:109–116.

Semenza, G.L. 2000. *HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. J Appl Physiol* 88: 1474–1480.

Semenza, G.L. 2004. *Oxigen-regulated gene expression: transcriptional control of cardiorespiratory physiology by* HIF-1. *J Appl Physiol* 96: 1173–1177.

Shu, D.G; Luo, H.L; Morris, S.C; Zhang, X.L; Hu, S.X; Chen, L; Han, J; Zhu, M; Li, Y; Chen, L.Z. 1999. *Lower Cambrian vertebrates from South China*, Nature, 402: 42-46.

Shweiki, D; Itin, A; Soffer, D; Keshet, E. 1992. *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature (London) 359, 843–845.

Sioli, H. 1984. The Amazon and its affluent: hydrographic, morphology of the rivers courses and river types. In: Sioli, H. (Ed.), The Amazon Lymnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, 127-165.

Sioli, H. 1990. *Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais.* Editora Vozes, Petrópolis, Brasil. 73 pp.

Sloman, K.A; Wood, C.M; Scott, G.R; Wood, S; Kajimura, M; Johannsson, O.E; Almeida-Val, V.M.F; Val, A.L. 2006. *Tribute to R. G. Boutilier: The effect of size on the physiological and behavioural responses of oscar, Astronotus ocellatus, to hypoxia.* J. Exp. Biol. 209:1197-1205.

Soitamo, A.J; Rabergh, C.M.I; Gassmann, M; Sistonen, L; Nikinmaa, M. 2001. *Characterization of a hypoxia-inducible factor (HIF-1) from rainbow trout. Accumulation of protein occurs at normal venous oxygen tension*. *J Biol Chem* 276: 19699–19705.

Takagi, H; King, G.L; Robinson, G.S; Ferrara, N; Aiello, L.P. 1996. *Hypoxic induction of VEGF is mediated by adenosine through A2 receptors and elevation of cAMP in retinal pericytes and endothelial cells.* Invest Opthalmol Vis Sci 37:2165–2176.

Val, A.L. 1993. *Adaptations of fishes to extreme conditions in fresh water*. In: Bicudo, J.E.P.W. (Ed.), The vertebrate gas transport cascade. Adaptations to environment and mode of life. CRC Press, Boca Raton, 43-53p.

Val, A.L. 1996. *Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon*. In: Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F; Randall, D.J. (Eds.), *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*, INPA, Manaus, Brazil, 59-73p.

Val, A. L. (2000). *Organic phosphates in the red blood cells of fish*. Comp. Biochem. Physiol. 125A, 417–435.

Val, A.L & Almeida-Val, V.M.F. 1995. *Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and biochemical features.* Springer Verlag, Heidelberg, 224p.

Val, A.L; Schwantes, A.R; Almeida-Val, V.M.F; Schwantes, M.L.B. 1985. *Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect from lotic and lentic Hypostomus regani populations* (São Paulo-Brasil). Comp. Biochem. Physiol. 80(4): 737-741.

Val, A.L; Paula-Silva, M.N; Almeida-Val, V.M.F. 1998. *Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never ending task*. S. Afr. J. Zool. 33(2):107-114.

Val, A.L; Castro-Pérez, C.A; Almeida-Val, V.M.F. 2004. UV: *An environmental challenge for fish of the amazon. International Congress on the Biology of Fish.* Tropical Hotel Resort, Manaus Brazil, August 1–5.

Val, A.L; Schwantes, A.R; Almeida-Val, V.M.F; Schwantes, M.L.B. 1985. *Hemoglobin, hematology, intraeritrocytic phosphates and whole blood Bhor effect from lotic and lentic Hypostamus regain populations* (São Paulo-Brazil). Comparative Bioquemistry Physiology, 80:737-741.

Val, A.L; Almeida-Val, V.M.F; Affonso, E.G. 1990. *Adaptive features of Amazon fishes: hemoglobin, hematology, intraerythocytic of Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). Comp. Biochem. Physiol; 97B(3): 435-440.

Van den Thillart, G. 1982. *Adaptations of fish energy metabolism to hypoxia and anoxia.* Molec. Physiol. 2: 49-61.

Van den Thillart, G & van Waarde, A. 1985. *Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. Mol Physiol* 8: 393–407.

Van Raaij, M. T. M; Van den Thillart, G. E. E. J. M; Vianen, G. J; Pit, D. S. S; Balm P. H. M; Steffens, A. B. 1996. *Substrate mobilization and hormonal changes in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, L.) and common carp (Cyprinus carpio, L.) during deep*

hypoxia and subsequent recovery. J. Comp. Physiol. B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology. 166(7): 443-452.

Verdouw, H.; Van Echted, C.J.A.; Dekkers, E.M.J. 1978. *Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate*. *Wat. Resea.*, 12: 397-402.

Verheyen, E; Blust, R; Decleir, 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.

Virani, N.A. & Rees, B.B. 2000. *Oxygen consumption, blood lactate and inter-individual variation in the gulf killifish, Fundulus grandis, during hypoxia and recovery*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 126: 397–405.

Vuori, K.A.M; Soitamo, A; Vuorinen, P.J; Nikinmaa, M. 2004. *Baltic salmon (Salmo salar) yolk-sac fry mortality is associated with disturbances in the function of hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1α) and consecutive gene expression*. *Aquat Toxicol* 68: 301–313.

Warren, D.E; Jackson, D.C. 2008. *Lactate metabolism in anoxic turtles: an integrative review*. J. Comp. Physiol. (B) 178, 133–148.

Wenger, R.H. 2000 *Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. J Exp Biol.* 203: 1253–1263.

West, L.J; Bailey, J.R; Almeida-Val, V.M.F; Val, A.L; Sidel, B.D; Driedzic, W.R. 1999. Activity levels of enzymes of energy metabolism in heart and red muscle are higher in north-temperate-zone than in Amazonian teleosts. Can. J. Zool., 77:690-696.

Whitt, G.S. 1987. Species differences in isozyme tissue patterns: their utility for systematic and evolutionary analyses. Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research. Rattazzi, M.C; Scandalios, J.G; Whitt, G.S. (Eds.) 15:1-20. Alan R. Liss, New York.

Wood, C. M., Kajimura, M., Sloman, K. A., Scott, G. R., Walsh, P. J., Almeida-Val, V. M. F. and Val, A. L. (2007). *Rapid regulation of Na+ fluxes and ammonia excretion in response to acute environmental hypoxia in the Amazonian oscar, Astronotus ocellatus*. Am. J. Physiol. 292: 2048-2058.

Wood, C.M; Iftikar, F.I; Scott, G.R; de Boeck, G; Sloman, K.A; Matey, V; Valdez-Domingos, F.X; Duarte, R.M; Almeida-Val, V.M.F; Val, A.L. 2009. *Regulation of gill transcellular*

permeability and renal function during acute hypoxia in the Amazonian oscar (Astronotus ocellatus): new angles to the osmorespiratory compromise. The Journal of Experimental Biology, 212: 1949-1964.

Zar, J.K. 1984. *Biostatistical analysis*. 2ed. Pretice-Hall, New Jersey. 718p.