

## **METABOLISMO ENERGÉTICO DO TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) EXPOSTO AO ESTRESSE NATATÓRIO E À HIPÓXIA**

Jéssica Clarissa de Lima CARLOS DE OLIVEIRA<sup>1</sup>  
Márcio SOARES-FERREIRA<sup>2</sup>  
Adalberto Luís VAL<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/FAPEAM/INPA; <sup>2</sup>Coorientador FAPEAM/INPA; <sup>3</sup>Orientador CBIO/INPA

### **INTRODUÇÃO**

Em pisciculturas, a mortalidade de peixes como a do tambaqui (*Colossoma macropomum*) tem muitas vezes como causa o estresse, principal problema na criação desta espécie (Gomes *et al.* 2002). O estresse também ocorre no habitat natural, devido muitas vezes às interações presa-predadores e devido a migrações reprodutivas ou tróficas que geram o estresse causado pelo exercício natatório (Villacorta-Correa 1997). O desempenho físico dos animais, inclusive o natatório, é inteiramente relacionado com o transporte de oxigênio e moléculas energéticas aos músculos (Webb, 1998). Tal desempenho se afetado pode interferir nos metabolismos aeróbico e anaeróbico, afetando também a adaptação do animal ao seu habitat. A Ucrit (velocidade crítica de natação (Brett 1964) é uma medida da capacidade aeróbica dos peixes, e pode ser usada para medir o estado de estresse, sendo que o próprio teste pode gerar estresse metabólico. Neste caso, o estresse é adaptável, porque o peixe pode adaptar-se a ele de maneira a resistir melhor na próxima vez que enfrentar este mesmo estresse, diferentemente do estresse mal-adaptável, que pode levá-lo à morte (Wedemeyer *et al.* 1990). O estresse gerado pelo exercício pode ser benéfico à medida que aumenta a resistência dos peixes a outros tipos de estresse, como hipóxia, além de aumentar o ganho de peso e melhorar a conversão alimentar dos animais (Ferreira *et al.* 2013). O uso desta técnica pode ser aplicada à piscicultura de modo a aumentar a produtividade, diminuindo custos com desperdício de ração ou mortalidade de peixes. Um melhor entendimento do comportamento e de parâmetros bioquímicos dos peixes em várias condições de exercício natatório é primordial para o desenvolvimento de novas técnicas de cultivo. O objetivo deste trabalho foi avaliar como a hipóxia, em diferentes níveis e períodos de exposição, e a natação forçada afetam as atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo energético do tambaqui.

### **MATERIAL E MÉTODOS**

#### Experimento 1 – Hipóxia com acesso à superfície da água

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

#### Experimento 2 – Hipóxia sem acesso à superfície da água

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

#### Experimento 3 – Fadiga

Este experimento foi baseado no teste de fadiga elaborado por Brett (1964), no qual os peixes são transferidos para o túnel de natação, dotado de bombas controladas por computadores, que é capaz de aumentar a velocidade da água em 10 cm/s a cada 30 minutos, até a fadiga dos peixes. Os peixes foram considerados fadigados quando permaneceram

apoiados na grade posterior do túnel por mais de cinco segundos. Embora 12 peixes tenham sido transferidos para o túnel, após o período de duas horas de aclimação, seis deles foram retirados e tiveram os tecidos coletados para análises conforme já mencionado (referidos como controle), e somente os seis restantes foram submetidos ao incremento de velocidade até a fadiga, para então terem os tecidos coletados.

#### Técnicas Analíticas

Músculo vermelho, coletado ao longo da coluna vertebral, da cabeça até a parte caudal, e o tecido muscular branco coletado da parte anterior dorsal pouco acima das vértebras foram os tecidos coletados e analisados. Depois do armazenamento em  $-80^{\circ}\text{C}$  por até 60 dias, foram homogeneizados em tampões específicos e centrifugados para coleta do sobrenadante. As medidas realizadas nos músculos vermelho e branco incluíram: as atividades das enzimas HOAD (3-hidroxiacil Coa desidrogenase); CS (citrato sintase), os níveis de lactato, por meio da oxidação do NADH e posterior leitura em espectrofotômetro ajustado a 340 nm; e os níveis de nitrito e nitrato (NOx), por meio de kit Cayman Chemical® e leitura em espectrofotômetro. A análise estatística foi feita por intermédio do programa Sigma Plot, aplicando-se testes t.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A figura 1 mostra que houve aumento do NOx no músculo vermelho de peixes submetidos à fadiga. Acredita-se que durante a circulação sanguínea intensa, como no caso de peixes exercitados, o atrito do sangue no epitélio dos vasos cause a produção de óxido nítrico por essas células. Esse óxido nítrico possuiria um efeito vasodilatador, melhorando a circulação sanguínea e o desempenho metabólico, e parte dele é rapidamente oxidado, transformando-se em nitritos e nitratos, também conhecidos como NOx. Esse mesmo efeito não pode ser visto no músculo branco, indicando que qualquer efeito benéfico do óxido nítrico sobre o retardo da fadiga estaria relacionado apenas à capacidade aeróbica do animal. Esta tese é corroborada pelos dados obtidos de animais submetidos à hipóxia sem acesso à superfície da água por 1 hora ou hipóxia com acesso à superfície da água por 6, 12 e 24 horas (tabela II), uma vez que nenhum destes níveis de exposição à falta de oxigênio foi capaz de alterar os níveis de NOx do músculo vermelho ou branco. A concentração de NOx mostrou-se sempre mais alta no músculo vermelho do que no músculo branco, indicando uma atividade basal maior das sintases do óxido nítrico nestes músculos. O oxigênio é essencial para que esta enzima transforme o aminoácido arginina na molécula de óxido nítrico, conforme descrito na literatura (Fleming 2011). A atividade da hidroxiacil Co-A desidrogenase (HOAD) não se alterou em animais submetidos à fadiga (tabela 1), em nenhum tipo de músculo, nem em animais expostos à hipóxia de qualquer nível, também em nenhum tipo de músculo (tabela II). Isso indica que, em tambaqui, a capacidade de oxidar gorduras não está relacionada com a capacidade natatória do animal aferida pelo teste de Ucrit. Conforme verificado em outros trabalhos, um melhor desempenho no teste de Ucrit parece estar relacionado à maior capacidade do animal em suportar níveis altos de lactato, além de maiores reservas de glicogênio. Segundo Driedzic e Almeida-Val (1996), espécies amazônicas possuem, em comum, uma baixa dependência do metabolismo aeróbico dos ácidos graxos como fonte de produção de ATP e uma dependência relativamente alta do metabolismo glicolítico. Os autores sugerem que esta organização do metabolismo possa estar relacionada às adaptações aos ambientes hipóxicos da Amazônia. A tabela I mostra que a atividade da citrato sintase não se altera devido ao teste de Ucrit e nem devido à exposição à hipóxia sem acesso à superfície por 1 hora (tabela 2). Trabalhos mostram que esta enzima aumenta sua atividade devido ao treinamento prolongado (Perry *et al.* 2007), o que pode indicar que o tempo decorrido no teste de Ucrit, que dura aproximadamente 3 horas, não é suficiente para um ajuste desta enzima no tecido muscular. O tempo de exposição curto à hipóxia, de apenas 1 hora, também não alterou a atividade da citrato sintase nos músculos branco e vermelho (tabela II), também indicando que o tempo de exposição pode ter sido curto ou que esta enzima realmente não é sensível a este tipo de estresse em tambaqui.

Tabela 1. Atividade das enzimas hidroxiaxil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), Lactato Desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de tambaqui. (C) grupos controle ou (F) fadigados pelo teste de Ucrit.

		MB	MV
HOAD	C	0,152±0,02	1,35±0,15
	F	0,129±0,01	1,40±0,13
CS	C	0,68±0,07	11,16±0,75
	F	0,59±0,04	10,24±2,71
LDH	C	31,33±3,70	21,02±1,93
	F	30,31±3,81	18,88±1,71
LAC	C	153,41±17,97 <sup>a</sup>	177,16±16,14
	F	245,67±30,56 <sup>b</sup>	161,16±18,07

HOAD ( $\mu\text{moles de Acetoacetyl Co A.minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$ ), CS ( $\mu\text{moles de \u00c1cido Oxalac\u00e9tico.minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$ ), LDH ( $\mu\text{moles de piruvato.minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$ ), lactato (mg de lactato.100 gramas de tecido fresco<sup>-1</sup>). Valores expressos como m\u00e9dia e erro padr\u00e3o da m\u00e9dia, n=6. Letras diferentes indicam diferen\u00e7a ( $p<0,05$ ) entre controle e tratamento para um mesmo tipo de m\u00fasculo, usando teste t.

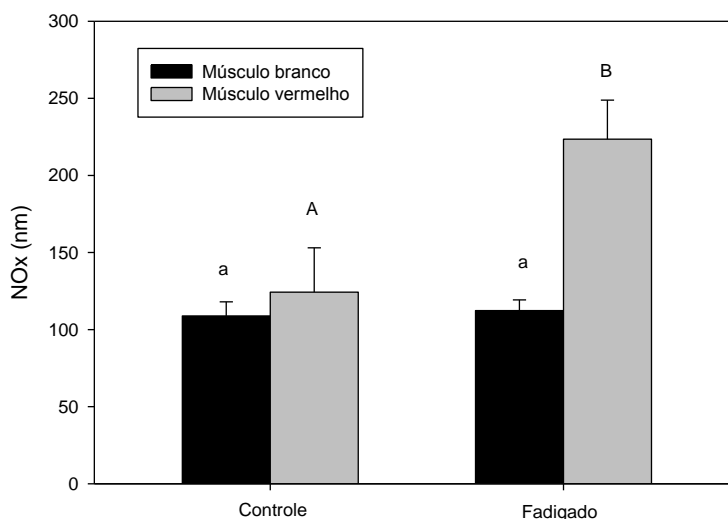


Figura 1. Nitritos e nitratos (NOx) de tambaqui submetido \u00e0 nata\u00e7\u00e3o for\u00e7ada at\u00e9 a fadiga, por meio do protocolo de Ucrit (Brett, 1964) e de animais mantidos em repouso dentro do t\u00fanel de nata\u00e7\u00e3o. Letras mai\u00fasculas ou min\u00fasculas diferentes indicam diferen\u00e7a estat\u00edstica ( $p<0,05$ ) entre os tratamentos para o mesmo tipo de m\u00fasculo. Dados apresentados como m\u00e9dia e erro padr\u00e3o da m\u00e9dia (n=6). Teste t aplicado separadamente para cada tipo de m\u00fasculo.

Tabela 2. Concentra\u00e7\u00e3o de nitritos e nitratos (NOx) e atividade das enzimas hidroxiaxil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), Lactato Desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos m\u00fasculos branco (MB) e vermelho (MV) de tambaqui. (T) grupos tratados ou (C) controles referindo-se a 6, 12 ou 24 horas de exposi\u00e7\u00e3o \u00e0 hip\u00f3xia ( $\pm 0,5$  mg/L) com acesso \u00e0 superf\u00edcie da \u00e1gua (HCAS) e 1 hora de hip\u00f3xia sem acesso \u00e0 superf\u00edcie da

água (HSAS).

		6h HCAS		12h HCAS		24h HCAS		1h HSAS	
		MB	MV	MB	MV	MB	MV	MB	MV
NOX	C	164,9 ±16,4	208,8 ±15,8	99,3 ±9,9	147,2 ±11,0	139,5 ±15,7	246,8 ±39,8	82,23 ±7,44	96,73 ±8,58
	T	153,9 ±15,0	175,2 ±17,7	122,3 ±25,1	170,3 ±30,1	158,4 ±12,5	293,4 ±47,3	84,12 ±8,52	93,18 ±5,88
HOAD	C	0,25 ±0,05	1,37 ±0,09	0,25 ±0,02	1,20 ±0,10	0,20 ±0,03	1,18 ±0,13	0,19 ±0,03	1,89 ±0,14
	T	0,17 ±0,04	1,20 ±0,13	0,21 ±0,01	1,48 ±0,15	0,18 ±0,03	1,33 ±0,16	0,14 ±0,02	1,77 ±0,22
CS	C	0,68 ±0,06	9,82 ±1,00	0,56 ±0,09	7,82 ±1,45	0,76± 0,05	10,32 ±1,39	0,84 ±0,08	14,76 ±1,94
	T	0,86 ±0,04	11,73 ±0,82	0,65 ±0,06	8,88 ±1,88	0,82 ±0,07	12,28 ±0,89	0,66 ±0,10	14,87 ±1,52
LDH	C	21,65 ±2,31	22,46 ±2,48	20,55 ±1,81	22,16 ±3,07	28,32 ±2,32	26,29 ±5,42	27,74 ±2,03 <sup>A</sup>	25,71 ±2,37 <sup>A</sup>
	T	27,52 ±2,95	19,99 ±1,80	22,66 ±1,72	22,09 ±2,37	25,28 ±1,59	28,94 ±5,32	37,34 ±2,48 <sup>B</sup>	15,94 ±0,52 <sup>B</sup>
LAC	C	257,71 ±14,79	138,51 ±13,11	263,11 ±37,39	173,95 ±19,99	222,51 ±29,54	152,08 ±36,70	275,40 ±41,74 <sup>A</sup>	166,27 ±20,69
	T	229,95 ±13,99	154,53 ±15,45	224,92 ±17,08	179,65 ±15,42	230,68 ±34,06	150,77 ±22,53	407,18 ±25,13 <sup>B</sup>	182,70 ±24,78

NOx (nm), HOAD ( $\mu$ moles de Acetoacetil Co A.minuto<sup>-1</sup>.grama<sup>-1</sup>), CS ( $\mu$ moles de Ac. Oxalacético.minuto<sup>-1</sup>.grama<sup>-1</sup>), LDH ( $\mu$ moles de piruvato.minuto<sup>-1</sup>.grama<sup>-1</sup>), lactato (mg de lactato.100 gramas de tecido fresco<sup>-1</sup>). Valores expressos como média e erro padrão da média, n=6. Letras diferentes indicam diferença ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento para um mesmo tipo de músculo, usando teste t.

## CONCLUSÕES

Podemos concluir que: 1) em condições de hipóxia o tambaqui pode obter a quantidade de oxigênio suficiente na superfície da água de maneira a não sobrecarregar o metabolismo anaeróbico; 2) a LDH está fortemente relacionada à manutenção orgânica em condições de hipóxia em tambaqui, mas não aumenta sua atividade durante a natação forçada aplicada pelo teste de Ucrit; 3) enzimas oxidativas produtoras de energia não aumentam ou diminuem sua atividade em até 24 horas de hipóxia, 1 hora de hipóxia intensa, 3 horas de exercício intenso ou 12 horas de exercício moderado; e 5) durante exercício intenso são produzidas grandes quantidades de óxido nítrico no músculo vermelho para melhorar o desempenho metabólico.

## REFERÊNCIAS

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

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