



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Carlucio Rocha dos Santos

**Enzimas antioxidantes em sangue de peixes expostos à hipoxia e hiperoxia**

Rio de Janeiro

2013

Carlucio Rocha dos Santos

**Enzimas antioxidantes em sangue de peixes expostos à hipoxia e hiperoxia**



Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor ao Programa de Pós-graduação em Biociências da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S237 Santos, Carlucio Rocha dos.  
Enzimas antioxidantes em sangue de peixes expostos à hipoxia e hiperoxia / Carlucio Rocha dos Santos. – 2013.  
100 f.

Orientador: Jayme da Cunha Bastos Neto.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Pós-Graduação em Biociências.

1. Pacu (Peixe) - Teses. 2. Tilapia (Peixe) - Teses. 3. Enzimas - Teses. 4. Estresse oxidativo - Teses. 5. Antioxidantes - Teses. 6. Glutathione S-Transferase. 7. Espécies de oxigênio reativas. I. Bastos Neto, Jayme da Cunha. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 597.554.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Carlucio Rocha dos Santos

**Enzimas antioxidantes em sangue de peixes expostos à hipoxia e hiperoxia**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 04 de março de 2013.

Orientador:

Prof. Dr. Jayme da Cunha Bastos Neto  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Leila Maria Lopes Bezerra  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof. Dr. Wagner Seixas da Silva  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof. Dr. João Bosco de Salles  
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Rio de Janeiro

2013

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Paulo, minha mãe Ana, meus irmãos Luciano e Melissa e família pelo apoio incondicional.

A minha esposa Patrícia por todo o carinho e paciência, fazendo toda esta luta valer a pena.

Ao meu orientador Jayme e à professora Vera pela oportunidade, ensinamentos e incentivo para a conclusão deste trabalho.

Aos meus eternos mestres: professora Fátima Malizia e professor Moacelio (*in memoriam*) pelo ensinamento, incentivo e apoio em todas as etapas de minha formação. Muito obrigado.

A todos os meus amigos dentro e fora do laboratório: Alfredo, Keyla, Ana Luiza, Bruna, Laís, Aline, Artur, Bárbara, Bruna, Santiago, Daphne, Eduardo (Dudu!), Fred, Laís, Lauro, Lin, Manildo, Renato, Marta, Rafael, Roosevelt e Isabela, Paulo Marques (Paulinho). Obrigado por tornar o fardo do dia-a-dia mais leve.

Ao pessoal da Fiocruz, em especial à professora Rita e ao professor Josino.

À Piscicultura PeixeSul, em especial à Nely e ao Adílson da fazenda Sol nascente pelo imprescindível suporte e pronto fornecimento dos animais.

Aos animais sacrificados para a conclusão deste trabalho

A Capes pelo financiamento deste estudo.

E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente e que porventura não mencionados, saibam que palavras não podem refletir a totalidade de minha gratidão.

Existem homens que lutam um dia e são bons.  
Existem outros que lutam um ano e são melhores.  
Existem aqueles que lutam muitos anos e são muito bons.  
Mas, existem os que lutam toda a vida.  
Estes são os imprescindíveis.

*Berthold Brecht*

(Retirado da tese de Silva Filho, M. V. – professor Moacelio)

## RESUMO

SANTOS, Carlucio Rocha. Enzimas antioxidantes em sangue de peixes expostos à hipoxia e hiperoxia 2013. 100 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O oxigênio é importante não só por sua participação no metabolismo energético, mas também por sua conversão em derivados parcialmente reduzidos, as espécies reativas de oxigênio (ERO). ERO participam de funções importantes em diversas vias do metabolismo, entretanto, em concentrações desequilibradamente elevadas deflagram a peroxidação lipídica, processo deletério que forma aldeídos tóxicos, como o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE). A manutenção de concentrações não deletérias das ERO é realizada por moléculas componentes do sistema antioxidante. Peixes podem ser expostos a grandes variações das concentrações de oxigênio, o que provoca ciclos oxidantes. A maioria dos estudos usa fígado e rim para avaliar estresse oxidante por meio de ensaios das atividades antioxidantes, o que requer o sacrifício dos animais. Contudo, o sangue sofre efeitos das ERO e avaliações no sangue podem permitir o estudo de antioxidantes no mesmo animal, sem a necessidade de sacrifício. Em consequência, foram nossos objetivos estabelecer uma técnica de cateterismo branquial em peixes, a padronização dos ensaios e a avaliação em sangue de componentes do sistema antioxidante de duas espécies de teleosteos em diferentes tensões de oxigênio. Pacus e tilápias foram avaliados em 6,0 mg de  $O_2.L^{-1}$  e em hipoxia a 0,5 mg de  $O_2.L^{-1}$  por 42 horas. Para os ensaios de hiperoxia os animais foram avaliados em 6,0 mg de  $O_2.L^{-1}$ , depois de 6 horas em 9,5 mg de  $O_2.L^{-1}$  e depois de 30 horas de recuperação a 6,0 mg de  $O_2.L^{-1}$ . A utilização de materiais para o cateterismo de humanos permitiu a implantação de um acesso branquial. Infelizmente, houve formação de trombo após 24 horas. Mesmo assim, a observação de fluxo sanguíneo no interior da cânula e a sobrevivência dos animais testados, confirmam a viabilidade da técnica. Verificamos em sangue uma maior atividade da enzima glutathione S-transferase (GST) sobre o 4-HNE em relação ao 1-cloro-2-dinitrobenzeno (CDNB). Isto reflete a importância de avaliações de atividade de enzimas, como a GST, sobre substratos endógenos. As respostas enzimáticas de tilápias mostraram-se mais sensíveis que as dos pacus quando comparadas em diferentes tensões de oxigênio.

Palavras-chave: Estresse oxidante. Enzima antioxidante. Peixe. Pacu. Tilápia. Hipoxia. Hiperoxia. Canulação.

## ABSTRACT

Oxygen is important not only for their role in energy metabolism, but also for its conversion into partially reduced derivatives, the reactive oxygen species (ROS). ROS participate in important roles in several metabolic pathways, however, at concentrations lopsidedly high they trigger lipid peroxidation process to form deleterious toxic aldehydes such as 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE). Maintenance of non deleterious concentrations of ROS molecules is performed by components of the antioxidant system. Fish may be exposed to large variations in the concentrations of oxygen, which causes oxidative cycles. Most studies use liver and kidney to assess oxidative stress through antioxidant activities assay, which requires the sacrifice of animals. However, the blood undergoes effects of ROS and evaluations in blood may allow the study of antioxidants in the same animal, without the need of sacrifice. Consequently, our objectives were to establish a catheterization technique in fish gill, standardization of testing and evaluation of components of blood antioxidant system of two species of teleost in various oxygen tensions. Pacu and tilapias were evaluated at 6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> hypoxia and 0.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> for 42 hours. For assays of hyperoxia animals were evaluated at 6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>, after 6 hours at 9.5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> and after 30 hours recovery at 6.0 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>. The use of materials of human catheterization allowed the implantation of a gill access. Unfortunately, there was thrombus formation after 24 hours. Nevertheless, the observation of blood flow within the cannula and survival of the animals tested, confirm the viability of the technique. We found blood in a higher activity of glutathione S-transferase (GST) on the 4-HNE compared to 1-chloro-2-dinitrobenzene (CDNB). This reflects the importance of assessing the activity of enzymes, such as GST with endogenous substrates. The enzymatic responses of tilapia were more sensitive than those of pacu when compared to different oxygen tensions.

Keywords: Oxidative stress. Antioxidant enzyme. Fish. Pacu. Tilapia. Hypoxia. Hyperoxia. Cannulation

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Reação de Fenton.....	19
Figura 2 –	Complexos da cadeia fosforilativa da mitocôndria.....	20
Figura 3 –	Produção de ERO nos complexos mitocondriais I e III.....	21
Figura 4 –	Etapas da peroxidação lipídica.....	23
Figura 5 –	Sítios eletrofílicos da molécula do 4-HNE.....	24
Figura 6 –	Balanco da relação entre ERO e o sistema antioxidante (SA).....	26
Figura 7 –	Estruturas da glutathiona.....	27
Figura 8 –	Redução da glutathiona pela glutathiona redutase (GR).....	28
Figura 9 –	Reação catalisada pela SOD.....	29
Figura 10 –	Etapas da reação catalisada pela catalase.....	30
Figura 11 –	Mecanismo da reação catalisada pela GPX.....	31
Figura 12 –	Catálise do 4-HNE pela GST.....	33
Figura 13 –	Lagos no pantanal após o pulso de inundação.....	35
Figura 14 –	<i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887).....	38
Figura 15 –	<i>Oreochromis niloticus</i> (Linnaeus, 1758).....	39
Figura 16 –	Cateter comercial marca Jelco™.....	43
Figura 17 –	Anatomia vascular de peixes e região de inserção do cateter.....	43
Figura 18 –	Esquema de ensaio enzimático da GPX.....	48
Figura 19 –	Conexão da rosca “luer-lock” e cateter.....	51
Figura 20 –	Inserção da agulha no cateter através do molde de silicone.....	52
Figura 21 –	Inserção da agulha no cateter através do tubo de silicone.....	53
Figura 22 –	Aparato completo para canulação.....	53
Figura 23 –	Técnica de canulação e inserção do cateter (pacu).....	54
Figura 24 –	Animal canulado em aquário de recuperação.....	55

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Comparação dos procedimentos de hemólise por ensaio da GST-4-HNE.....	56
Gráfico 2 –	Curva de proteínas para o ensaio de atividade sanguínea de GST sobre o substrato 4-HNE.....	57
Gráfico 3 –	Atividade sanguínea de GST na conjugação de 4-HNE à diferentes concentrações de GSH.....	57
Gráfico 4 –	Atividade sanguínea de GST na conjugação de GSH à diferentes concentrações de 4-HNE.....	58
Gráfico 5 –	Curva de proteínas para o ensaio de atividade sanguínea de GST sobre o substrato CDNB.....	59
Gráfico 6 –	Atividade sanguínea de GST sobre o CDNB em diferentes concentrações de GSH.....	59
Gráfico 7 –	Atividade sanguínea de GST na conjugação de GSH à diferentes concentrações de CDNB.....	60
Gráfico 8 –	Atividade sanguínea de GPX sobre o H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> em diferentes concentrações de GSH.....	61
Gráfico 9 –	Concentrações de hemoglobina de tilápia em condições de normoxia e 42 horas sob hipoxia.....	62
Gráfico 10 –	Comparação da atividade de GST sobre o substrato 4-HNE em fígado e sangue de animais submetidos à normoxia e 42 horas de hipoxia.....	62
Gráfico 11 –	Atividade de GST sobre o substrato CDNB em fígado e sangue de animais submetidos à normoxia e 42 horas de hipoxia.....	63
Gráfico 12 –	Atividade de GPX em fígado e sangue de animais submetidos à normoxia e 42 horas de hipoxia.....	64
Gráfico 13 –	Atividade sanguínea de catalase de tilápias submetidas à normoxia e 42 horas de hipoxia.....	64
Gráfico 14 –	Concentrações de hemoglobina em sangue de animais submetidos à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia.....	65
Gráfico 15 –	Atividade de GST sobre o 4-HNE em sangue de animais submetidos à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia.....	66
Gráfico 16 –	Atividade de GST sobre o CDNB em sangue de animais submetidos à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia.....	66

Gráfico 17 –	Atividade de GPX em sangue de animais submetidos à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia.....	67
Gráfico 18 –	Atividade sanguínea de catalase de tilápias submetidas à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia.....	68
Gráfico 19 –	Curva de atividade de GST purificada de sangue de tilápia na conjugação de concentrações finais fixas de GSH à diferentes concentrações finais de 4-HNE.....	70
Gráfico 20 –	Curva de atividade de GST purificada de sangue de tilápia na conjugação de concentrações finais fixas de 4-HNE à diferentes concentrações finais de GSH.....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Resultados obtidos nas diferentes etapas do processo de purificação da enzima GST de sangue de tilápia.....	68
Tabela 2 –	Valores de cinéticos de GST purificada de sangue de tilápia.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado de membrana
CDNB	1-Cloro-2,4-dinitrobenzeno
-CH <sub>2</sub> -	Grupo metileno
CoQ	Ubiquinona
CoQH <sub>2</sub>	Ubiquinol
DTT	Ditiotreitol
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe-S	Proteína ferro-enxofre Rieske
FMN	Flavina mononucleotídeo
FMNH <sub>2</sub>	Flavina mononucleotídeo reduzida
GGT	$\gamma$ -glutamyltransferase
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GST	Glutathione S-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
L•	Radical alquila
LH	Ácido graxo poli-insaturado de membrana
LO•	Radical alcooxila
LOO•	Radical peroxila
LOOH	Hidroperóxido lipídico
LPO	Lipoperoxidação
N <sub>2</sub>	Nitrogênio
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
O <sub>2</sub>	Oxigênio

$O_2^-$	Ânion superóxido
OD	Oxigênio dissolvido
OH-	Hidroxila
ROOH	Peróxido
-SeH	Grupamento selenol
SOD	Superóxido dismutase

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	15
1	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	18
1.1	<b>Espécies reativas de oxigênio (ERO).....</b>	18
1.2	<b>Sistema antioxidante.....</b>	25
1.2.1	<u>Antioxidantes não enzimáticos.....</u>	26
1.2.2	<u>Antioxidantes enzimáticos.....</u>	29
1.3	<b>Sistema antioxidante de peixes submetidos à variação de oxigênio dissolvido.....</b>	34
1.4	<b>Utilização de sangue como tecidos para estudos.....</b>	36
1.5	<b>Espécies.....</b>	37
2	<b>OBJETIVOS.....</b>	40
2.1	<b>Objetivo geral.....</b>	40
2.2	<b>Objetivos específicos.....</b>	40
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	41
3.1	<b>Material.....</b>	41
3.1.1	<u>Animais.....</u>	41
3.1.2	<u>Equipamentos.....</u>	41
3.1.3	<u>Reagentes.....</u>	42
3.2	<b>Métodos.....</b>	42
3.2.1	<u>Procedimento de canulação.....</u>	42
3.2.2	<u>Anestesia e coleta de amostras.....</u>	44
3.2.3	<u>Ensaio em diferentes tensões de oxigênio.....</u>	44
3.2.4	<u>Preparo das amostras de sangue e de fígado.....</u>	45
3.2.5	<u>Hemoglobina.....</u>	46
3.2.6	<u>Dosagem de proteínas.....</u>	46
3.2.7	<u>Ensaio enzimático.....</u>	47
3.2.7.1	Avaliação da atividade da GST sobre o 4-HNE.....	47
3.2.7.2	Avaliação da atividade de GST sobre o CDNB.....	47
3.2.7.3	Ensaio da atividade de glutatona peroxidase (GPX).....	48
3.2.7.4	Avaliação da atividade de catalase.....	49
3.2.8	<u>Purificação da enzima GST de eritrócito de tilápia.....</u>	49
3.2.9	<u>Análise dos dados.....</u>	50

3.2.10	<u>Comitê de ética</u> .....	50
4	<b>RESULTADOS</b> .....	51
4.1	<b>Estabelecimento da técnica de canulação</b> .....	51
4.2	<b>O sangue como matriz</b> .....	55
4.3	<b>Padronização do ensaio de GST sobre o substrato 4-hidroxi-2-nonenal</b> ...	56
4.4	<b>Padronização do ensaio de GST sobre o substrato CDNB</b> .....	58
4.5	<b>Padronização do ensaio de GPX</b> .....	61
4.6	<b>Ensaio em hipoxia</b> .....	61
4.7	<b>Ensaio em hiperoxia</b> .....	65
4.8	<b>Purificação da enzima GST de sangue de tilápia</b> .....	68
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	71
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	88
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	89

## INTRODUÇÃO

O aparecimento do oxigênio na atmosfera afetou o ambiente e a história evolutiva da Terra. O oxigênio como agente oxidante gerou para os seres vivos um alto ganho energético, que pôde ser investido no desenvolvimento de estruturas celulares especializadas, propiciando o surgimento de organismos pluricelulares complexos. Entretanto, variações de grande amplitude nas concentrações de oxigênio são desfavoráveis para a produção de energia e podem gerar átomos reativos denominados espécies reativas de oxigênio (GILLE; SIGLER, 1995; LINDAHL, 2008). Tais espécies, mesmo que de permanência curtíssima no meio celular, participam da homeostase dos organismos em eventos como a sinalização intracelular, a inflamação e a defesa contra micro-organismos invasores (NORDBERG; ARNÉR, 2001; DRÖGE, 2002). No entanto, podem ocasionar diversos efeitos deletérios que dão origem ao chamado estresse oxidante. O excesso de espécies reativas acima de determinadas concentrações, por reações de propagação velozes, pode causar a fragmentação dos fosfolipídios de membrana em uma variedade de compostos reativos. Um deles é o 4-hidroxi-2-nonenal, um aldeído que ao se ligar a grupamentos eletrofílicos de moléculas biológicas pode alterar suas funções (CATALÁ, 2009).

Para que sejam mantidas as concentrações benéficas das espécies reativas de oxigênio existe a atividade de um conjunto de moléculas denominado sistema antioxidante. Estas moléculas, que têm como função doar elétrons para as espécies reativas de oxigênio, inativando-as e controlando seus níveis nos organismos, operam por dois processos, um não enzimático e outro enzimático. Os antioxidantes não enzimáticos representam a primeira linha de defesa contra a peroxidação lipídica, tendo como principal representante o tripeptídeo glutathiona. Além de reduzir diretamente as espécies reativas, a glutathiona pode atuar indiretamente ao servir como substrato doador de elétrons para enzimas antioxidantes. Os antioxidantes enzimáticos, por sua vez, são classificados como uma segunda linha de defesa e têm como principais agentes a glutathiona peroxidase e a glutathiona S-transferase (YANG *et al.*, 2003; VALKO *et al.*, 2007; ROBERTS; SINDHU, 2009).

A produção de espécies reativas e a atividade do sistema antioxidante podem variar com a disponibilidade de oxigênio. Ciclos de hipoxia e hiperoxia causam uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, além de alterarem diversas funções celulares, muitas delas dependentes de atividades enzimáticas. Assim, hipoxia e hiperoxia podem desencadear efeitos adversos (LI; JACKSON, 2002; GUZY; SCHUMACKER, 2006).

Os peixes são animais interessantes para investigar a bioquímica do estresse oxidante em virtude das propriedades do habitat aquático, no qual o oxigênio dissolvido pode ir de níveis baixíssimos à noite até supersaturação durante o dia (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). No Pantanal, por exemplo, devido aos períodos cíclicos de cheia (outubro-março) e de seca (abril-agosto) há a formação de baías, grandes extensões de águas rasas sujeitas a variações de oxigênio dissolvido. Neste ecossistema encontra-se o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), um peixe cuja biologia está ligada intimamente ao ciclo de inundação anual que ocorre no Pantanal. Esta espécie evoluiu com grande tolerância às variações de oxigênio e deve apresentar adaptações especiais que lhe permitem sobreviver em baixas concentrações deste gás. Considerando estes fatos, resolvemos usar o pacu como animal modelo para nossos estudos.

Os relatos existentes de pesquisas sobre o estresse oxidante são, em sua maioria, de efeitos de espécies reativas de oxigênio sobre o fígado (LUSHCHAK *et al.*, 2001; RUDNEVA *et al.*, 2010). É preciso pesquisar mais sobre o estresse oxidante oriundo de ciclos de hipoxia e hiperoxia em células do sangue, dado que este tecido pode ser obtido sem a morte do animal. A utilização do sangue configura uma vantagem, pois evita a perda do espécime e possibilita a avaliação do animal desde o início até o término do experimento — tornando-o controle dele mesmo. Os eritrócitos dos peixes possuem organelas, como mitocôndrias e núcleo, e suas membranas têm ácidos graxos poli-insaturados, que são potenciais alvos para o estresse oxidante (ROCHE; BOGÉ, 1993; NAGASAKA; OKAMOTO e USHIO, 2004).

Nos raros trabalhos onde o sangue é utilizado, a coleta se dá por punção de um vaso, em geral a veia caudal. Entretanto, existem dificuldades para se obter uma série de amostras de sangue de um único peixe que representem estado fisiológico ou patológico. As técnicas convencionais de coleta requerem a apreensão do animal, manuseio, anestesia e punção; procedimentos que podem alterar diversos parâmetros metabólicos por causa do estresse provocado pela liberação de catecolaminas. Também a hemorragia interna e a anemia decorrentes da retirada de sangue são mais prováveis nos animais repetidamente retirados da água e puncionados. Tais problemas são minimizados com a técnica de cateterização de vasos sanguíneos. Ela consiste, após anestesia, na introdução de uma cânula ou cateter flexível de calibre milimétrico em um vaso sanguíneo do animal. Após fixação do cateter, é possível realizar ensaios com amostras repetidas de sangue, fornecendo resultados mais fidedignos, em animais conscientes e pouco estressados (SOIVIO; NYNOLM e WESTMAN, 1975; LO; CHANG e SONG, 2003; HEESWIJK; VIANNEN e THILLART, 2005).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer uma técnica de canulação ou cateterismo e avaliar no tecido sanguíneo a atividade do sistema antioxidante em duas espécies de peixes expostas a regimes de hipoxia e hiperoxia. Escolhemos uma espécie considerada adaptada às mudanças dos teores de oxigênio, o pacu, e outra não adaptada, a tilápia.

# 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 1.1 Espécies reativas de oxigênio (ERO)

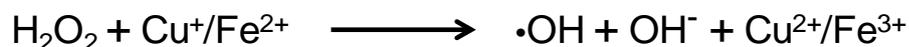
Há bilhões de anos as primeiras formas de vida surgiram na Terra. Entretanto o aparecimento destes organismos deu-se sob uma atmosfera essencialmente anóxica e, assim, para obtenção de energia dependiam integralmente de vias anaeróbias de baixo rendimento energético. A evolução de cianobactérias e o advento da fotossíntese promoveram uma mudança na composição atmosférica, tornando o ambiente cada vez mais oxidante à medida que se elevavam as concentrações de oxigênio. Isto gerou uma intensa pressão seletiva nos organismos existentes, antes adaptados a um ambiente anaeróbio, ocasionando desaparecimento de muitas espécies. Outros seres vivos, entretanto, desenvolveram a capacidade de extrair maiores quantidades de energia a partir da oxidação de moléculas orgânicas pelo oxigênio ( $O_2$ ) e esta adaptação, conhecida como respiração aeróbia, propiciou o aparecimento de seres pluricelulares com estruturas cada vez mais especializadas. Atualmente, para a maioria dos organismos na terra, a vida sem oxigênio é impossível (GILLE; SIGLER, 1995; HALLIWELL; CROSS, 1994; KOCH; BRITTON 2007; LINDAHL, 2008).

Em condições normais os átomos do oxigênio molecular consumido pela respiração aeróbia são reduzidos por um par de elétrons ao final da cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias e, como esta redução é conjugada a dois prótons, uma molécula de oxigênio é, então, transformada em duas de água. Entretanto, em algumas situações este processo é incompleto, o que leva à formação das espécies reativas de oxigênio (ERO) (DOWLING; SIMMONS 2009). O termo ERO é largamente utilizado como sinônimo de radicais livres. Entretanto nem todas as ERO são radicais livres. A melhor definição de ERO engloba dois grupos de oxidantes: os radicais livres e os não radicais. Os radicais livres são definidos como átomos, ou moléculas que contenham átomos, com um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais. Estes radicais são altamente reativos, existindo por nanossegundos antes de desencadear uma cascata de eventos na qual a reatividade é passada adiante, podendo causar efeitos danosos ou dar origem a compostos ainda mais prejudiciais. O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e a hidroxila ( $OH^\cdot$ ) são exemplos de radicais livres. O radical hidroxila possui maior reatividade que o ânion superóxido. Porém o superóxido pode servir de

precursor para a formação de outros tipos de ERO (HALLIWELL; GUTTERIDGE e CROSS, 1992; THANNICKAL; FANBURG, 2000; MONAGHAN; METCALFE e TORRES, 2009).

Os oxidantes não radicais, diferentemente dos radicais livres, não possuem elétrons desemparelhados. Entretanto são quimicamente reativos e podem, ainda, ser convertidos em radicais livres. Esta classe de oxidantes tem como principal característica uma maior meia-vida que pode chegar a minutos em alguns casos. Eles podem reagir diretamente com biomoléculas causando danos ou gerando novos compostos. Exemplos deste grupo são o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) e o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (MONAGHAN; METCALFE e TORRES, 2009; TRACHOOTHAM; ALEXANDRE e HUANG, 2009). O peróxido de hidrogênio é especialmente importante em virtude de possuir a maior meia-vida de todos estes oxidantes e uma grande permeabilidade, o que permite que exerça danos longe do local onde foi gerado. Além disso, através de uma reação conhecida como reação de Fenton (figura 1), o  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode reagir com íons metálicos ( $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^+$ ) e dar origem ao radical livre hidroxila (PROUSEK, 2007).

Figura 1 - Reação de Fenton



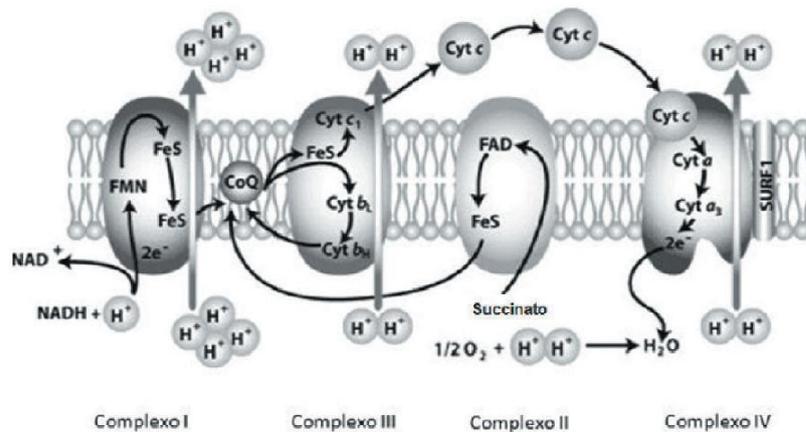
Fonte: O autor, 2013.

Existem diversas vias de produção de ERO. A produção pode ocorrer tanto por vias enzimáticas quanto por vias não enzimáticas. Qualquer proteína de transferência de elétrons ou sistema enzimático pode formar ERO como subprodutos de sua reação de transferência de elétrons. Uma das mais importantes vias de produção nos organismos aeróbios encontra-se na mitocôndria. Nesta organela ocorre o consumo da maior parte do oxigênio absorvido pelas células e o escape de elétrons da cadeia respiratória, localizada na membrana interna da mitocôndria, pode levar à formação de  $\text{O}_2^-$ . A formação deste radical na membrana interna pode, em seguida, gerar  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estima-se que cerca de 0,1% do total de oxigênio consumido seja transformado em ERO (THANNICKAL; FANBURG, 2000; FRIDOVICH, 2004; HERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2010). Ressalte-se que nem todas as ERO produzidas na mitocôndria são derivadas da cadeia transportadora de elétrons. A enzima p66shc, presente nesta organela, é responsável pela produção de até 30% do  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido (GIORGIO *et al.*, 2007).

Durante o metabolismo muitos substratos são oxidados, transferindo elétrons para o transportador  $\text{NAD}^+$  e dando origem ao NADH, como, por exemplo, no ciclo de Krebs. O

NADH repassa os elétrons para os chamados complexos da cadeia transportadora de elétrons (complexos I, III e IV) na membrana interna mitocondrial. Ao serem transferidos de um complexo para o outro se libera energia, que será utilizada no bombeamento de prótons da matriz mitocondrial até o espaço intermembranar. Os elétrons então são finalmente recolhidos pelo complexo IV, da citocromo c oxidase, e depois transferidos para o oxigênio molecular que em seguida é conjugado a dois prótons, formando assim uma molécula de H<sub>2</sub>O (figura 2) (FERREIRA; AGUIAR e VILARINHO, 2008; MOOKERJEE *et al.*, 2010).

Figura 2 - Complexos da cadeia fosforilativa da mitocôndria



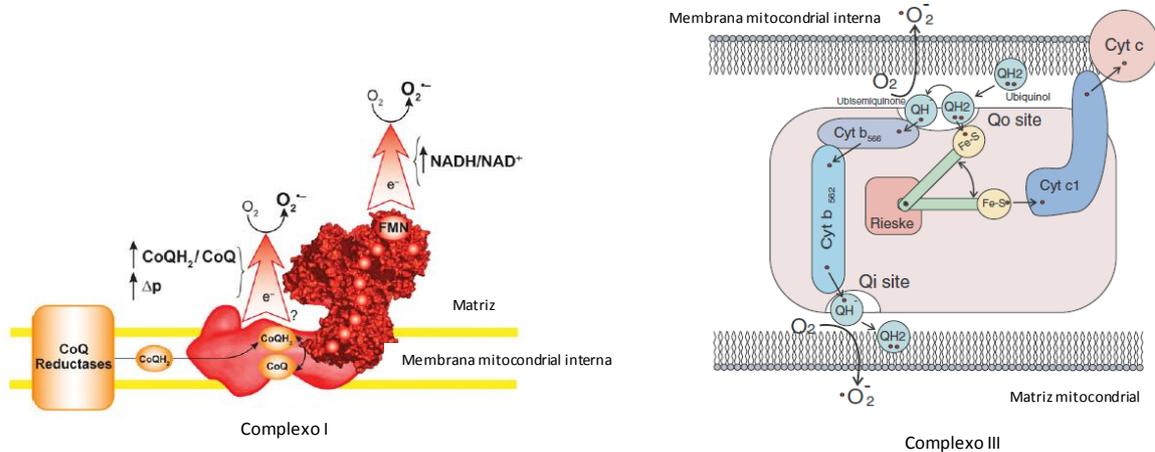
Fonte: Adaptado de FERREIRA; AGUIAR e VILARINHO, 2008.

O gradiente eletroquímico gerado após o bombeamento dos prótons força o seu retorno à matriz mitocondrial através de canais de prótons da ATP sintase (complexo V). Tal processo fornece a energia necessária para formar ATP (FERREIRA; AGUIAR e VILARINHO, 2008; MOOKERJEE, *et al.*2010).

Durante o metabolismo e funcionamento normal da cadeia respiratória ocorre a formação de ERO. Tal produção se concentra principalmente nos complexos I e III, sendo o I o maior sítio de produção (ADAM-VIZI; CHINOPOULOS, 2006). No complexo I a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> ocorre através da reação do O<sub>2</sub> com o transportador flavina mononucleotídeo (FMN). Este transportador, após ser reduzido pelo NADH, transfere os elétrons para uma sequência de centros Fe-S (Proteína ferro-enxofre Rieske) que transportarão os elétrons até a ubiquinona (CoQ ou coenzima Q), reduzindo-a em ubiquinol (CoQH<sub>2</sub>). Um aumento da razão NADH/NAD<sup>+</sup> ou um bloqueio dos centros Fe-S resultará em uma maior quantidade de FMN reduzida (FMNH<sub>2</sub>) aumentando a possibilidade de este transportador reagir com o O<sub>2</sub> e, assim, gerar O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Outro processo que resulta em produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> é o transporte reverso de elétrons. Neste fenômeno há um aumento da razão CoQH<sub>2</sub>/CoQ. Esta menor concentração da

forma oxidada faz com que ocorra um acúmulo de elétrons no sítio de ligação da CoQ, o que pode levar este sítio a reagir com  $O_2$  formando  $O_2^-$  (figura 3) (MURPHY, 2009).

Figura 3 - Produção de ERO nos complexos mitocondriais I e III



Fonte: Adaptado de GUZY; SCHUMACKER, 2006 e MURPHY, 2009.

O complexo III tem a função de transferir os elétrons da CoQ reduzida (CoQH<sub>2</sub>) para o citocromo c. Entretanto esta transferência é feita de forma sequencial em que a CoQH<sub>2</sub> é convertida primeiro em uma molécula monovalente reduzida, a ubisemiquinona (CoQH). Isto acontece quando a CoQH<sub>2</sub> doa seu primeiro elétron para um centro Fe-S (Proteína ferro-enxofre de Rieske), que em seguida o repassa ao citocromo c. A seguir, a CoQH doa o seu segundo elétron para o citocromo b sendo então liberada do sítio em sua forma oxidada (CoQ) e possibilitando a ligação de outra molécula de CoQH<sub>2</sub>. Esta segunda molécula realiza a transferência dos elétrons de forma similar e o citocromo c, agora com dois elétrons, é liberado para o complexo IV. O citocromo b ao receber o segundo elétron os repassará para uma molécula de CoQ oxidada que se ligará em um sítio ativo diferente do utilizado para a transferência dos elétrons de sua forma reduzida, gerando uma molécula de CoQH<sub>2</sub>. No complexo III a formação de ERO ocorre quando o O<sub>2</sub> reage com a CoQH ligada ao sítio ativo (figura 3) (GUZY; SCHUMACKER, 2006; MURPHY, 2009).

A produção das espécies tem íntima relação com a proporção de O<sub>2</sub> consumido pelo organismo. Desta forma mudanças em sua disponibilidade afetarão a concentração de ERO, podendo causar um aumento na produção (SAMPAIO *et al.*, 2008). Existem algumas condições que potencializam a formação destas espécies pela mitocôndria. A produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, por exemplo, pode aumentar se houver uma interrupção do fluxo de elétrons na cadeia respiratória. Isto pode ocorrer quando a concentração de O<sub>2</sub> intracelular é alterada, como

acontece na hipoxia, na hiperoxia e no fenômeno conhecido como isquemia e reperfusão (GUZY; SCHUMACKER, 2006).

Durante a hipoxia há uma diminuição da concentração de  $O_2$  no complexo IV, onde ocorre a redução deste gás para formar  $H_2O$ . Como a velocidade de formação de ERO é proporcional ao consumo de  $O_2$  a expectativa inicial é de que ocorra em hipoxia uma diminuição na gênese de ERO (SAMPAIO *et al.*, 2008). Todavia, diversos estudos demonstram que durante a hipoxia há um aumento na produção das ERO. Desta forma aventou-se a hipótese de que uma lentidão no fluxo de elétrons nos complexos permite um aumento da meia-vida do radical ubisemiquinona o que, conseqüentemente, aumentaria a produção de  $O_2^-$  no complexo III (GUZY; SCHUMACKER, 2006; MURPHY, 2009). Outra fonte de  $O_2^-$  na hipoxia é o transporte reverso de elétrons no complexo I. A ocorrência deste fenômeno aumentará em virtude da maior concentração de ubiquinol (PADDENBERG *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004).

O mecanismo exato pelo qual a hiperoxia aumenta a produção de ERO é desconhecido. Entretanto, é possível sugerir que o aumento da concentração de  $O_2$  nas proximidades dos sítios de produção de ubisemiquinona na mitocôndria possa intensificar o vazamento de elétrons que ocorre naturalmente na normoxia (LI *et al.*, 2004).

Uma maior produção de  $O_2^-$  ocorre quando a célula passa por um período de hipoxia seguido de uma súbita reoxigenação. Nesta situação o  $O_2$  encontra um ambiente reduzido e um atraso no fluxo de elétrons gerados durante hipoxia, o que possivelmente favorece mais vazamentos de elétrons. De fato, a cadeia respiratória parece ser uma das principais fontes de produção de ERO durante o evento de isquemia e reperfusão (GOTTLIEB, 2003).

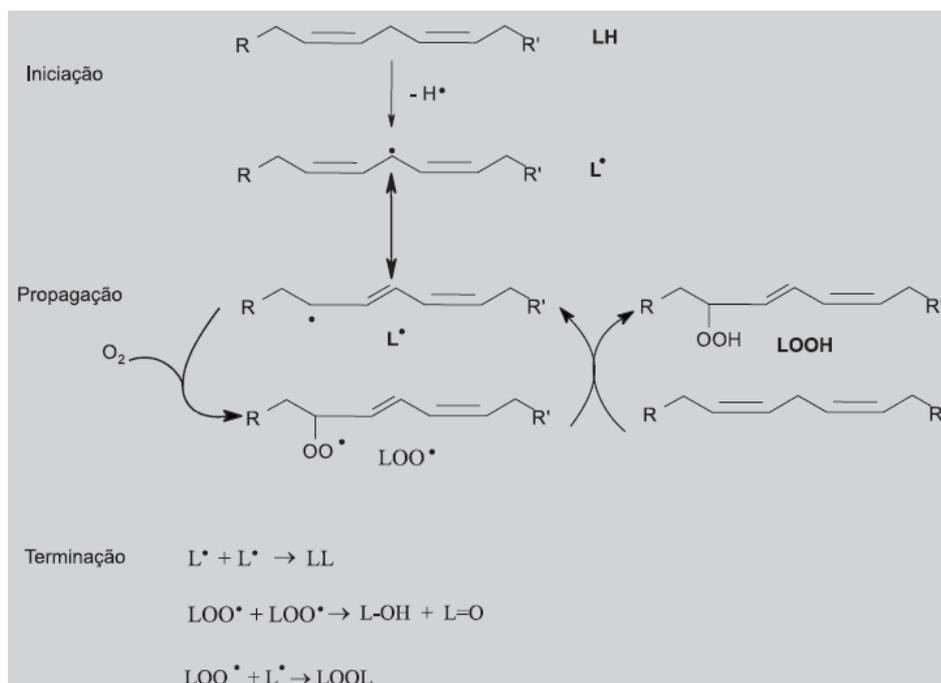
A grande reatividade das ERO leva-as a reagirem com biomoléculas próximas ao sítio onde foram formadas (SINGAL *et al.*, 2000). Em concentrações que excedam a capacidade do sistema antioxidante as espécies reativas tornam-se prejudiciais e levam a uma desregulação celular, estando relacionadas com uma variedade de doenças, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose e envelhecimento. Um dos principais alvos das ERO são os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) de membrana e a reação entre estas moléculas serve como iniciador de um processo chamado peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) (LIMA; ABDALLA, 2001; ROBERTS; SINDHU, 2009).

A LPO pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação de ERO sobre duplas ligações (insaturações) entre carbonos dos lipídios das membranas celulares, gerando principalmente radicais alquila ( $L^\bullet$ ), alcooxila ( $LO^\bullet$ ), e peroxila ( $LOO^\bullet$ ). Tal transformação pode levar a danos nas membranas que conduzem à destruição da estrutura

celular, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, numa condição extrema, à morte celular. A LPO constitui-se talvez no evento citotóxico primário que desencadeia uma sequência de lesões na célula. As alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, alterações do DNA, oxidação da LDL e comprometimento dos componentes da matriz extracelular (LIMA; ABDALLA, 2001).

O processo da LPO pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (figura 4). A fase de iniciação representa o começo da peroxidação, em que os ácidos graxos poli-insaturados de membrana (LH) sofrem ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>-), formando um radical de carbono (L<sup>•</sup>). Este radical é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples. Em meio aeróbio, o radical alquila (L<sup>•</sup>) inicialmente formado se combina com o oxigênio formando o radical peroxila (LOO<sup>•</sup>), o qual pode abstrair um hidrogênio alílico de outro ácido graxo, gerando outro radical de carbono L<sup>•</sup> e promovendo a etapa de propagação. A reação do radical peroxila com o átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico (LOOH) (LIMA; ABDALLA, 2001).

Figura 4 - Etapas da peroxidação lipídica

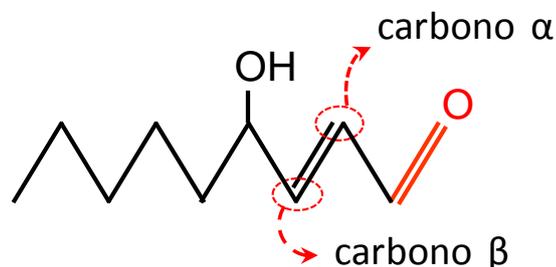


Fonte: Adaptado de LIMA; ABDALLA, 2001.

A terceira e última etapa da reação, a fase de terminação, dá-se pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares, como alcanos, cetonas e aldeídos (LIMA; ABDALLA, 2001; CATALÁ, 2009).

Diversos tipos de aldeídos reativos são produzidos ao final da cascata de peroxidação lipídica. Dentre os mais estudados está o 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), um aldeído derivado da peroxidação de ácidos graxos  $\omega$ -6, principalmente os ácidos araquidônico e o linoleico. Assim como em outros tipos de aldeídos, sua reatividade se deve ao átomo de oxigênio do grupamento carbonila. A alta eletronegatividade deste átomo faz com que ele atraia os elétrons da ligação  $\pi$  para si, deixando o carbono  $\alpha$  ou  $\beta$  com uma carga parcial positiva. Assim, estes carbonos atuam como sítios de ligação para moléculas nucleofílicas (figura 5). Quando tais moléculas são aminoácidos e fazem parte de uma proteína este processo é chamado de carbonilação de proteína. A ligação do aldeído com a proteína muda sua conformação espacial, podendo alterar também a sua função. Interessante é o fato de que, em concentrações fisiológicas, os complexos proteína-aldeído controlam vias de sinalização intracelular envolvidas na resposta inflamatória, na proliferação e viabilidade celular. Em condições oxidantes a concentração de aldeídos reativos pode aumentar significativamente. Por exemplo, a concentração de 4-HNE nas membranas pode variar desde 10  $\mu$ M a 5 mM em alguns modelos de estresse oxidante. Em plasma humano são encontradas concentrações entre 0,1 a 1,4  $\mu$ M, podendo ocorrer um aumento de até dez vezes durante o estresse oxidante. De fato, altos níveis destes complexos são encontrados em doenças associadas com a produção de oxirradicais, como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatórias (ZHANG; COURT e FORMAN, 2007; NEGRE-SALVAYRE *et al.* 2008).

Figura 5 - Sítios eletrofílicos da molécula do 4-HNE



Fonte: O autor, 2013.

Em baixas concentrações as ERO desempenham importantes funções em diversas vias como, por exemplo, na resposta do sistema imune, pois após englobar um patógeno os fagócitos convertem, através do complexo enzimático NADPH oxidase, o  $O_2$  em  $O_2^-$ . Este

radical, através da superóxido dismutase, é convertido em  $H_2O_2$ , que pode em seguida ser convertido pela reação de Fenton em um radical hidroxila bactericida. Alternativamente, o peróxido pode ser transformado, pela ação da enzima mieloperoxidase, em ácido hipocloroso, que, por possuir alto poder oxidante, também serve ao fagócito como bactericida (DRÖGE, 2002; BABIOR, 2004).

As espécies reativas de oxigênio podem, ainda, ter um papel fisiológico importante sobre o ciclo celular, podendo inibir ou induzir a proliferação das células. A inibição ocorre quando regiões do DNA são oxidadas interrompendo o ciclo celular até que o reparo seja efetuado por proteínas específicas, como a p53. De forma diversa as ERO podem oxidar proteínas que regulem a proliferação, promovendo assim a indução do ciclo celular (HERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2010). Grandes concentrações de ERO também são importantes para deflagrar a apoptose. Este processo pode ocorrer através de moléculas sinalizadoras que, ao serem oxidadas pelas ERO, tornam-se ativas e iniciam a cascata apoptótica. Este mecanismo é importante para o desenvolvimento de respostas adaptativas que ocorrem ao longo do ciclo de vida do animal, bem como para reprimir a proliferação de células defeituosas (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Desta forma, vê-se que as ERO são necessárias para o funcionamento normal do organismo. Entretanto, em altas concentrações, podem causar efeitos deletérios. A regulação das concentrações apropriadas de ERO é mantida por um conjunto de moléculas denominado sistema antioxidante (BERGENDI *et al.*, 1999).

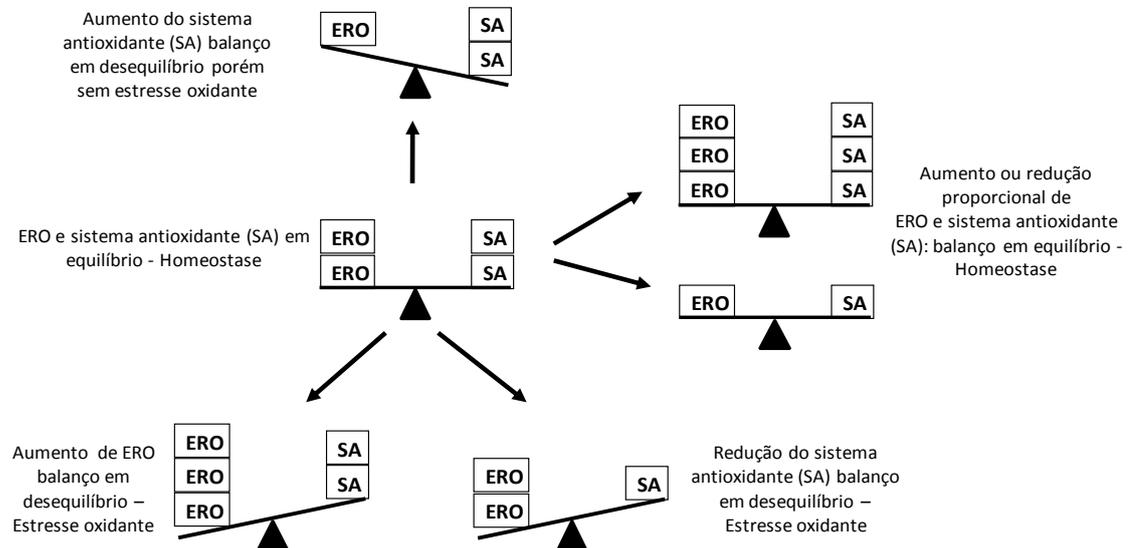
## 1.2 Sistema antioxidante

O sistema antioxidante é um conjunto de moléculas que podem reagir com as ERO, inativando-as e controlando seus níveis nos organismos (ROBERTS; SINDHU, 2009). Desta forma, o papel benéfico ou prejudicial das ERO dependerá do balanço entre a sua concentração e a concentração/atividade do sistema antioxidante (VALKO *et al.*, 2007).

Quando há um desequilíbrio entre as ERO e o sistema antioxidante em favor das ERO ocorre um quadro chamado estresse oxidante, caracterizado por um conjunto de efeitos nocivos em consequência das reações das ERO com biomoléculas. Este quadro se instala quando o sistema antioxidante é incapaz de neutralizar o excesso de ERO formados, quer seja

por aumento na concentração de ERO, depressão do sistema antioxidante ou ambos (figura 6) (VALKO *et al.*, 2007; MONAGHAN; METCALFE e TORRES, 2009).

Figura 6 - Balanço da relação entre ERO e o sistema antioxidante (SA)



Fonte: O autor, 2013.

A natureza química dos antioxidantes fisiológicos é bastante diversa podendo ser classificados em dois grandes grupos: antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Alguns destes antioxidantes são produzidos endogenamente, como enzimas, compostos de baixo peso molecular e cofatores enzimáticos. Outros podem ser obtidos através da dieta como a vitamina C, a vitamina E e os carotenóides (NORDBERG; ARNÉR, 2001; RATNAM *et al.*, 2006).

### 1.2.1 Antioxidantes não enzimáticos

Esta classe de antioxidantes é constituída de moléculas de baixo peso molecular e representa a primeira linha de defesa contra a peroxidação lipídica. Alguns dos principais representantes desta classe são o  $\alpha$ -tocoferol, o ácido ascórbico e a glutathiona (GSH). Este último é particularmente importante porque pode ser utilizado como substrato por enzimas antioxidantes (YANG *et al.*, 2003; RATNAM *et al.*, 2006).

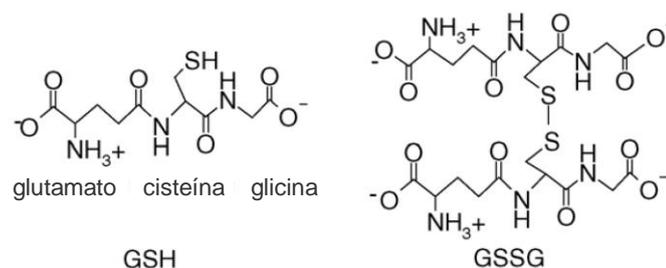
A vitamina C é uma molécula hidrofílica difundida pela maior parte dos fluidos corpóreos, sendo um dos antioxidantes mais eficientes. Sua estrutura permite que seja utilizada como cofator em várias reações enzimáticas ou que atue diretamente sobre as ERO,

impedindo o estresse oxidante. Uma vez oxidada a molécula é relativamente estável em função do fenômeno de ressonância, podendo então ser reduzida novamente a ácido ascórbico pelo NADH ou por uma reação com outra molécula de ácido ascórbico oxidado (FARBSTEIN; KOZAK-BLICKSTEIN e LEVY, 2010). A vitamina C é importante na redução do radical tocoferol da vitamina E, além de proteger a glutatona da oxidação (CROHNS, 2010).

A vitamina E é uma molécula lipossolúvel. O  $\alpha$ -tocoferol é a sua isoforma mais abundante, ativa e biologicamente importante. Além de sua propriedade antioxidante esta molécula também atua em outros processos biológicos como a modulação de funções proteicas e a expressão gênica. Apesar de impedir ou terminar o processo de peroxidação lipídica, altos níveis de  $\alpha$ -tocoferol oxidado podem servir como uma espécie reativa reiniciando o estresse (BRIGELIUS-FLOHÉ; TRABER, 1999; FARBSTEIN; KOZAK-BLICKSTEIN e LEVY, 2010).

A  $\gamma$ -glutamilcisteinilglicina ou glutatona (GSH) é um tripeptídeo formado pelos aminoácidos glicina, cisteína e ácido gama-glutâmico. Diferentemente das ligações peptídicas usuais, a ligação entre o ácido gama-glutâmico e a cisteína se dá através da carboxila associada ao carbono  $\gamma$  e não ao carbono  $\alpha$  (figura 7). Isto confere à GSH uma alta estabilidade intracelular, uma vez que a única enzima capaz de hidrolisar este tipo de ligação é a  $\gamma$ -glutamilttransferase (GGT) (MEISTER; ANDERSON, 1983; LU, 2009). A glutatona existe sobre duas formas: um estado tiol-reduzido (GSH) e outro oxidado (GSSG), sendo o estado reduzido a forma predominante. Uma vez oxidada, duas moléculas de glutatona podem formar uma ponte dissulfeto entre si, sendo este dímero chamado de glutatona oxidada ou dissulfeto de glutatona (GSSG) (LU, 1999).

Figura 7 - Estruturas da glutatona



Fonte: Adaptado de VALKO *et al.*, 2006.

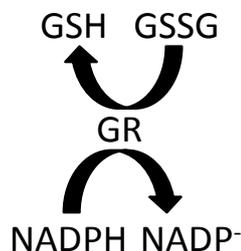
As funções fisiológicas da GSH estão intimamente associadas ao caráter nucleofílico do grupamento tiol presente no resíduo de cisteína quando reduzido. É através deste grupamento que a GSH exerce suas funções, reduzindo ou conjugando moléculas que

apresentam grupamentos eletrofílicos, como o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e o 4-HNE (LU, 2009). A concentração de GSH atinge até concentrações milimolares na maioria das células, variando de 5 a 10 mM nos hepatócitos. Tal valor é cerca de mil vezes maior do que os valores encontrados no plasma. Os principais reservatórios de GSH nas células de eucariotos são o citosol, contendo cerca de 90% do total, e a mitocôndria, que possui aproximadamente os 10% restantes. Há, ainda, um pequeno percentual de GSH presente no retículo endoplasmático (LU, 1999; LU, 2009).

A glutathiona é uma molécula multifuncional sendo utilizada em diversos processos. Uma função deste tripeptídeo é a desintoxicação eletrofílica. Para tanto, compostos eletrofílicos endógenos ou exógenos são conjugados à GSH de forma espontânea ou enzimática, tornando-se mais polares e facilitando sua excreção. É importante ressaltar que embora este processo possa resultar na desintoxicação e eliminação do composto, em alguns casos, metabólitos ainda mais reativos podem ser gerados (LU, 2009).

A glutathiona participa de outras funções como manutenção de grupamentos tióis de proteínas, reserva de cisteína, modulação de processos celulares (como síntese de DNA) e redução das vitaminas C e E. Todavia uma das mais importantes funções associadas a esta molécula é sua capacidade antioxidante, que aliada à sua alta concentração intracelular, faz da GSH o principal tampão oxirredutor celular. Tal função, porém, só é mantida se houver um sistema capaz de reduzir o grupamento tiol após a oxidação, ou seja, reduzir a GSSG em GSH novamente. Esta tarefa é realizada pela enzima glutathiona redutase (GR) que catalisa a transferência de dois elétrons de uma molécula de NADPH para a GSSG (figura 8) (VALKO *et al.*, 2007; LU, 2009).

Figura 8 - Redução da glutathiona pela glutathiona redutase (GR)



Fonte: O autor, 2013.

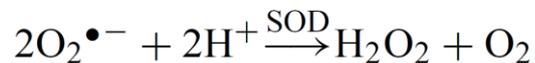
Este sistema é essencial não só para a manutenção do equilíbrio oxirredutor celular em condições fisiológicas, mas principalmente em condições de alta produção de ERO (LU, 2009).

### 1.2.2 Antioxidantes enzimáticos

Esta classe de antioxidantes constitui a segunda linha de defesa e pode ser dividida em enzimas de defesa primárias e secundárias. As enzimas antioxidantes primárias são, essencialmente, enzimas de prevenção que decompõem as ERO antes que ocorra o dano celular e a peroxidação lipídica. Exemplos desta classe de enzimas são superóxido dismutase, catalase e a glutathione peroxidase. As enzimas secundárias têm importância na excisão, reparo ou terminação de danos provocados pela ação de ERO. A atividade de peroxidase da glutathione peroxidase e da glutathione S-transferase são exemplos de ação de enzimas secundárias (YANG *et al.*, 2003; RATNAM *et al.*, 2006). Estima-se que as enzimas antioxidantes são mais eficientes na proteção e tratamento de quadros agudos de estresse oxidante, como em casos de hiperoxia e inflamação (RATNAM *et al.*, 2006).

Em 1969 McCord e Fridovich relataram a descoberta daquela que seria a primeira enzima antioxidante descrita: a superóxido dismutase (SOD). Esta enzima é essencial para as células aeróbias e sua função é catalisar a dismutação de moléculas de  $O_2^-$  em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (figura 9).

Figura 9 - Reação catalisada pela SOD



Fonte: Adaptado de VALKO *et al.*, 2006.

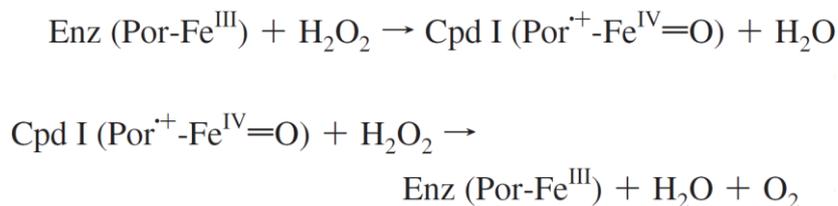
Esta reação pode ocorrer de forma espontânea, porém quando catalisada pela SOD a velocidade de dismutação pode ser até  $10^4$  vezes maior (VALKO *et al.*, 2006; ROBERTS; SINDHU, 2009).

Foram identificados quatro tipos de SOD de acordo com o cofator metálico presente em seu sítio ativo. A SOD que possui manganês como cofator (Mn-SOD) é a mais abundante, correspondendo a 60% do total de enzima. Esta isoforma é encontrada prioritariamente na matriz mitocondrial sendo de vital importância para a proteção desta organela (FISCHER, 1987; MATÉS, 2000). Quando conjugada a cobre e zinco é chamada Cu/Zn-SOD. Esta foi a primeira isoforma descoberta e encontra-se distribuída pelo citosol, nos peroxissomas e no espaço intermembranar da mitocôndria (FISCHER, 1987). Quando submetida a uma isquemia aguda esta isoforma, em eritrócitos humanos, apresenta uma redução de atividade (ÇIMEN, 2008). A EC-SOD é uma superóxido dismutase extracelular que também possui Cu e Zn como cofatores. É encontrada nos espaços intersticiais dos tecidos e fluidos extracelulares

como plasma, linfa e líquido sinovial. Há ainda uma isoforma de SOD que apresenta níquel no sítio ativo, formando a Ni-SOD. Este tipo, entretanto, só é encontrado em bactérias (MATÉS, 2000).

A catalase sintetizada pelos mamíferos é uma proteína homotetramérica que apresenta um grupamento heme no sítio ativo de cada subunidade, responsável por sua atividade catalítica. Este grupamento localiza-se internamente, em uma região hidrofóbica, e só pode ser alcançado através de uma estreita passagem. Por esta razão os substratos utilizados por esta proteína são, geralmente, pequenos (PUTNAM *et al.*, 2000; KIRKMAN; GAETANI, 2007). Esta enzima está presente em todos os organismos aeróbios sendo abundantemente encontrada nos peroxissomos e cumpre importante papel na defesa contra o estresse oxidante ao degradar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$ , evitando assim a formação de  $\text{O}_2^-$  pela reação de Fenton (NORDBERG; ARNÉR, 2001; ALFONSO-PRIETO *et al.*, 2009). A reação catalisada pela catalase ocorre em duas etapas: inicialmente há a oxidação do grupamento heme por uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gerando como produtos uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  e a enzima na sua forma mono-oxigenada. Na segunda etapa o estado reduzido da enzima é restaurado através de outra molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que desta vez é oxidada à  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  (figura 10) (KIRKMAN; GAETANI, 2007).

Figura 10 - Etapas da reação catalisada pela catalase.



Fonte: Adaptado de ALFONSO-PRIETO *et al.*, 2009.

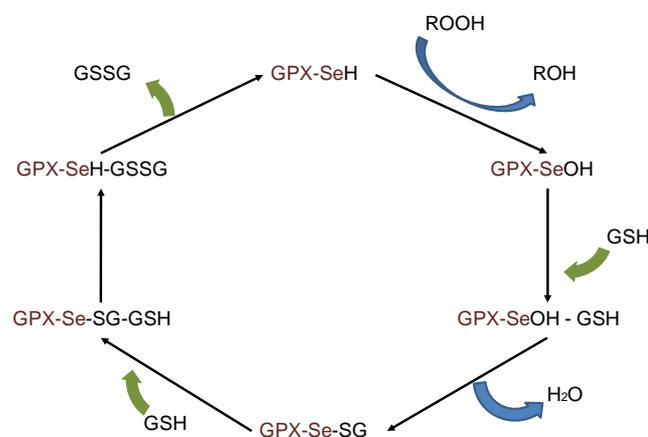
A catalase possui, ainda, uma limitada ação de peroxidase, utilizando outros substratos como álcoois e fenóis. Um exemplo é a formação de acetaldeído a partir de etanol e  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Entretanto, tal atividade é muito baixa, sendo o peróxido seu principal substrato (KIRKMAN; GAETANI, 2007).

A glutathiona peroxidase (GPX) foi inicialmente descoberta por Mills, (1957) como um fator que tinha como função a proteção das hemácias do estresse oxidante. Posteriormente foi descoberto que esta enzima apresentava selênio em sua estrutura, indispensável para a sua função catalítica, sendo esta a primeira descrição de uma proteína contendo este metal como cofator (LEI; CHENG e McCLUNG, 2007; TOPPO *et al.*, 2009). Atualmente o termo glutathiona peroxidase, ou GPX, é utilizado para descrever uma família de mais de setecentas

isoformas, todas relacionadas filogeneticamente e possuidoras de sequências homólogas. Em mamíferos foram isoladas oito isoformas, caracterizadas de GPX-1 à GPX-8, sendo a maior parte selenoproteínas. As GPX-5, GPX-7 e GPX-8 (e em alguns casos a GPX-6) possuem um resíduo de cisteína, mas não apresentam selênio em seu sítio ativo (TOPPO *et al.*, 2009). A distribuição das selenoisoformas nos mamíferos é bastante ampla. A GPX-1 pode ser encontrada nas hemácias, fígado, pulmões e rins, acumulando-se no citosol, núcleo e mitocôndrias. Já a GPX-2 localiza-se principalmente no plasma, enquanto a GPX-3 se concentra em rins, pulmões, epidídimo, coração e músculo. A GPX-4 está presente em diversos tecidos, porém predominantemente nas células epiteliais renais, podendo ser encontrada no núcleo, citosol, mitocôndrias e ligada à membranas. Diferentemente das outras isoformas, esta é a única com estrutura monomérica (MATÉS, 2000; MARGIS *et al.*, 2008).

A principal função das GPX é a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  à custa da oxidação de GSH. Assim, tanto o Se quanto a GSH são fundamentais para a atuação da GPX e os níveis dos dois são capazes de regular sua atividade (NORDBERG; ARNÉR, 2001; MONTEIRO; RANTIN e KALININ, 2007). A redução ocorre através de um mecanismo denominado pingue-pongue (figura 11) em que a enzima reage com um substrato por vez para formar um produto e sofrendo ela própria uma mudança química intermediária. Tal mecanismo possui duas etapas: uma oxidante e outra redutora. A etapa oxidante ocorre quando o grupamento selenol (-SeH) da enzima é oxidado pelo peróxido sendo então convertido em -SeOH. Já na segunda etapa a enzima restaura seu estado reduzido inicial através da oxidação sequencial de duas moléculas de GSH, produzindo, ao fim, uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}$  e uma de GSSG (TOPPO *et al.*, 2009).

Figura 11 - Mecanismo da reação catalisada pela GPX



Fonte: Adaptado de MOES, 2010.

Tanto a GPX quanto a catalase competem pelo peróxido como substrato. A diferença principal entre elas está no  $K_M$ , que é mais elevado para a catalase ( $K_M = 10 \text{ mM}$ ) em relação

à GPX ( $K_M = 1 \mu M$ ). Isto torna a GPX mais eficiente na proteção contra baixos níveis de ERO (VALKO *et al.*, 2006; FURIAN, 2007). A GPX pode, além de reduzir  $H_2O_2$ , reduzir hidroperóxidos orgânicos ou álcoois pelo mesmo ciclo catalítico. A GPX-4, porém, é a única isoforma capaz de reduzir hidroperóxidos de fosfolipídios de membranas, sendo importante na defesa antioxidante (ANDREYEV; KUSHNAREVA e STARKOV, 2005; MARGIS *et al.*, 2008; TOPPO *et al.*, 2009).

A glutathione S-transferase (GST) é uma família de enzimas multifuncionais que possuem diversas funções catalíticas. Identificadas pela primeira vez há 40 anos em milho, as GST foram posteriormente isoladas em outras plantas e organismos superiores, tanto aquáticos quanto terrestres (BLANCHETTE; FENG e SINGH, 2007). Estas enzimas são divididas em quatro grandes subfamílias: as microsossomais, envolvidas na síntese de eicosanóides, leucotrienos e prostaglandinas; as de plasmídeo bacteriano, ainda pouco estudadas; a classe Kappa, presentes na mitocôndria e peroxissomas e as GST citosólicas (ou solúveis). Esta última subfamília é a mais abundante, sendo encontrada em todos os organismos aeróbicos. Composta por enzimas diméricas pode, ainda, ser subdividida, sendo reconhecidas sete classes em mamíferos: Alfa, Mi, Pi, Sigma, Teta, Zeta e Ômega (HAYES; FLANAGAN e JOWSEY, 2005; FROVA, 2006).

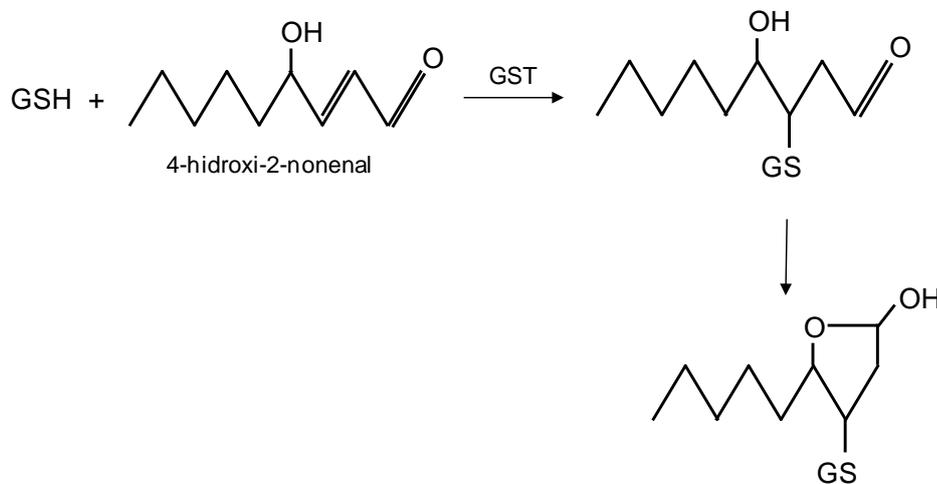
As GST são proteínas de massa molecular relativa de aproximadamente de 50.000 dáltons, formando homodímeros ou heterodímeros (ambas subunidades derivam da mesma classe de isoenzimas). Cada monômero possui sítios de ligação para cada um dos substratos. Há um sítio G para o GSH e um sítio H para o eletrófilo hidrofóbico. O sítio G é extremamente conservado entre todas as classes de GST e possui alta especificidade para GSH. Em contrapartida o sítio H apresenta alta variabilidade, o que determina as diferentes especificidades de substratos hidrofóbicos observadas para as diferentes classes. Todavia a maioria das isoformas de GST é capaz de usar o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato, exibindo, entretanto, diferentes afinidades por este composto (HAYES; FLANAGAN e JOWSEY, 2005; BLANCHETTE; FENG e SINGH, 2007; DOURADO *et al.*, 2008).

As GST têm papel fundamental na desintoxicação celular apresentando importante função antioxidante e citoprotetora. São capazes de metabolizar uma gama de compostos exógenos (provenientes de exposição à xenobióticos) e endógenos (metabólitos de danos oxidativos), participando da fase II do processo de biotransformação. As GST atuam na conjugação de uma molécula de GSH com compostos contendo um centro eletrofílico, formando assim derivados menos tóxicos e mais solúveis, facilitando a sua excreção ou sua

compartimentalização por outras enzimas. Ressalte-se que em raras ocasiões este processo causa ativação de um composto exógeno que resulta em metabólitos ainda mais tóxicos (HAYES; FLANAGAN e JOWSEY, 2005; FROVA, 2006).

Durante o estresse oxidante as GST atuam após o dano, impedindo o progresso e encerrando o fenômeno de peroxidação lipídica. Para tanto, estas enzimas agem sobre diversos metabólitos produzidos, como os aldeídos tóxicos (o 4-HNE) (figura 12) ou os peróxidos orgânicos (MORAES, 2008).

Figura 12 - Catálise do 4-HNE pela GST



Fonte: O autor, 2013.

A conjugação da GSH ao 4-HNE ocorre, de forma espontânea ou enzimática, através de uma reação de adição de Michael, formando, ao final, um hemiacetal. Entretanto na presença da enzima GST a velocidade da reação aumenta centenas de vezes. Já foi observado, entretanto, que o produto, o conjugado GS-HNE, é um potencial inibidor da atividade desta enzima. Contudo a inibição é reduzida em baixas concentrações do conjugado e pode ser desprezível em condições fisiológicas, não prejudicando a capacidade antioxidante desta enzima (HUBATSCH; RIDDERSTRÖM e MANNERVIK, 1998; BOON *et al.*, 1999; ALARY; GUÉRAUD e CRAVEDI, 2003; POLI *et al.*, 2008).

Embora a GST citosólica alfa seja a isoforma com maior atividade sobre o 4-HNE (cerca de 90%), outras isoformas, como a mi e a pi, também são importantes. Existem, ainda, outras enzimas que podem atuar na desintoxicação do 4-HNE, como a aldeído desidrogenase (oxidando-o a ácido 4-hidroxinonenóico), a álcool desidrogenase e a aldose redutase (ambas reduzindo-o à 1,4 dihidroxinoneno). A GST, porém, possui papel determinante na inativação deste metabólito (BOON *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2003; ENGLE *et al.*, 2004).

As GST, além de atuarem na desintoxicação metabólica, podem realizar outras importantes funções como isomerases ou tiol transferases. Possuem, também, funções não catalíticas, como ligação a não substratos (transporte) e modulação da sinalização celular. Assim a visão original das GST somente como enzimas de desintoxicação gradualmente mudou, o que ampliou sua importância em novas funções, tais quais a biossíntese dos leucotrienos e das prostaglandinas (FROVA, 2006; CHIANG *et al.*, 2007).

A atividade ou concentração do sistema antioxidante pode variar em resposta a diferentes fatores, como comportamento, condições do ambiente e sazonalidade. Ciclos de hipoxia e hiperoxia são tipos de estresse ambiental descrito como condições que alteram diversas funções celulares, tais como funções mitocondriais, atividades enzimáticas e o sistema antioxidante (LI; JACKSON, 2002).

### **1.3 Sistema antioxidante de peixes submetidos à variação de oxigênio dissolvido**

É reconhecido que em mamíferos após um quadro de isquemia e reperfusão há um aumento na produção de ERO e, conseqüentemente, a ocorrência de estresse oxidante (LUSCHAK *et al.*, 2001). Espécies de mamíferos são geralmente utilizadas para estudar o estresse oxidante e elucidar os mecanismos envolvidos na resposta a danos celulares. Entretanto, peixes representam uma classe especial em virtude das propriedades do habitat aquático. Um corpo d'água é caracterizado por uma grande heterogeneidade espacial e temporal nas concentrações de oxigênio dissolvido (OD). A temperatura da água, sua salinidade, a correnteza e a eutrofização influem sobre o OD. Assim, os organismos aquáticos são constantemente submetidos a variações de OD de forma sazonal e também circadiana, indo de baixos níveis à noite até à supersaturação durante o dia (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006).

O pantanal é um exemplo de região com tais variações de OD. Neste local ocorre um fenômeno típico chamado pulso de inundação anual, conhecido popularmente como “cheia e vazante”. O pulso de inundação dá origem a grandes áreas alagadas (figura 13), as baías, como são chamadas as lagoas sazonais ou permanentes, onde é frequente a alteração da concentração de oxigênio. Em tais ambientes, dependendo da temperatura e da biomassa de organismos presentes, o OD pode variar de altos níveis durante o dia a baixos níveis à noite (CALHEIROS; SEIDL e FERREIRA, 2000).

Figura 13 - Lagos no pantanal após o pulso de inundação



Fonte: Adaptado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Pantanal>. Acessado em 03/02/2011.

A concentração ideal de oxigênio para os peixes é em torno de 5 a 6 mg por litro de água. Níveis próximos a 3 mg por litro são considerados estressantes para a maioria dos peixes e valores menores que 2 mg por litro geram condições de hipoxia (BOYD; TUCKER, 1992; BALDISSEROTTO, 2002).

Submetidos a hipoxia os peixes podem sofrer diversas alterações para se adaptar a pouca disponibilidade de oxigênio. Tais modificações podem ser fisiológicas, comportamentais ou bioquímicas. As respostas comportamentais geralmente envolvem inatividade e respiração aquática de superfície. Já as fisiológicas incluem aumento da frequência respiratória, número de eritrócitos circulantes e distensão dos lábios (SANTOS 2006; BICKLER; BUCK, 2007; SAMPAIO *et al.*, 2008). Dentre as diversas adaptações bioquímicas, três parecem essenciais para a sobrevivência: diminuição da taxa metabólica, eliminação dos produtos do metabolismo anaeróbio e neutralização do excesso de oxirradicais. As duas primeiras são uma resposta à baixa produção de ATP pela via anaeróbia de oxidação da glicose durante a hipoxia prolongada. Ao diminuir a taxa metabólica o organismo diminui também a demanda energética. A terceira adaptação metabólica necessária à sobrevivência em ambientes com concentrações variáveis de  $O_2$  concerne ao combate do excesso de produção de ERO, principalmente em quadros de hipoxia seguida de reoxigenação. Até mesmo as espécies tolerantes a condições extremas de  $O_2$  apresentam mudanças nos níveis de biomarcadores oxidantes e antioxidantes quando submetidos a tais

condições. Algumas destas espécies induzem seus sistemas antioxidantes quando estão em hipoxia/anoxia, enquanto reprimem grande parte de seus processos anabólicos. Este fenômeno pode ser mais bem compreendido se considerarmos a “teoria de preparação” proposta por Hermes-Lima. De acordo com esta teoria, o aumento da defesa antioxidante durante períodos de escassez de O<sub>2</sub> possibilitaria ao organismo se defender contra os oxirradicais gerados quando o O<sub>2</sub> é reintroduzido no ambiente (HERMES-LIMA; STOREY e STOREY, 2001; BICKLER; BUCK, 2007).

A maioria dos trabalhos com peixes tem como foco os aspectos toxicológicos sob efeitos de xenobióticos ou de metais pesados na atividade do sistema antioxidante e no grau de peroxidação lipídica (LUSHCHAK *et al.*, 2001). São necessários mais estudos que avaliem o estresse oxidante oriundo de ciclos de hipoxia e hiperoxia em peixes, sobretudo em exemplares tropicais, tais como o pacu.

#### 1.4 Utilização de sangue como tecido para estudos

Os trabalhos com espécies tropicais que avaliam os efeitos da variação da concentração de O<sub>2</sub> utilizam em sua grande maioria o fígado como matriz o que, inevitavelmente, exige a morte do animal. A utilização do sangue configura uma vantagem, pois evita a perda do espécime e possibilita a avaliação do animal desde o início até o término do experimento, tornando-o um controle dele mesmo.

A membrana dos eritrócitos de peixes possui ácidos graxos poli-insaturados que são potenciais alvos para o estresse oxidante. Além disto, nestes animais os eritrócitos são nucleados e possuem organelas celulares, como ribossomos, que mantêm a capacidade de síntese proteica mesmo após a maturação da hemácia (ROCHE; BOGÉ, 1993; NAGASAKA; OKAMOTO e USHIO, 2004). Desta forma, possivelmente, ocorre produção de ERO em virtude da utilização e do transporte de oxigênio pela hemoglobina. Além disto, ao serem absorvidos, os xenobióticos são carregados pela corrente sanguínea e entram em contato com as hemácias, o que poderá iniciar ou agravar um quadro de peroxidação de lipídios (RUAS *et al.*, 2008).

Entretanto, existem diversas dificuldades para se obter amostras seguidas de sangue de um único peixe. As tradicionais técnicas de coleta requerem a perseguição do animal, apreensão, manuseio, exposição ao ar e punção, o que pode levar a alteração de diversos

parâmetros metabólicos em virtude da liberação de altos níveis de catecolaminas, além da possibilidade de hemorragia interna e anemia em virtude da retirada de grandes volumes de sangue (SOIVIO; NYNOLM e WESTMAN, 1975; LO; CHANG e SONG, 2003; HEESWIJK; VIANNEN e THILLART, 2005). Estes efeitos são minimizados com a técnica de canulação (ou cateterismo) que consiste, após anestesia, em implantação cirúrgica de uma cânula flexível em uma artéria do animal, permitindo que os ensaios conduzidos com amostras de sangue apresentem resultados mais fidedignos em animais conscientes e não estressados (LO; CHANG e SONG, 2003). A canulação oferece ainda a oportunidade de obtenção de diversas amostras de sangue em um mesmo animal, reduzindo assim o número de peixes utilizado e eliminando variações interindividuais, bem como evitando anemia (LO; CHANG e SONG, 2003; HEESWIJK; VIANNEN e THILLART, 2005).

Mazik, Plakas e Stehly, (1994) relataram alterações significativas em peixes sequencialmente puncionados pela veia caudal, apresentando maiores níveis de glicose e cortisol plasmático quando comparados com peixes canulados cirurgicamente. Já Deng *et al.* (2000) demonstraram que os níveis de cortisol e glicose retornaram aos valores basais entre 48 até 72 horas após a cirurgia para canulação, mantendo-se nestes níveis mesmo quando da retirada de amostras sanguíneas.

## 1.5 Espécies

O “pacu pantaneiro”, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), é uma das espécies de teleósteos adaptada ao ciclo de vida anual do Pantanal (figura 14). O pacu é caracterizado pelo aspecto discoide e coloração cinza escuro a prata nas partes laterais e dorsal do corpo e amarelo-dourado na parte ventral. Sua boca é composta por uma pré-maxila com seis a oito dentes na série externa e dois na interna, enquanto a maxila pode apresentar um ou dois dentes. O pacu apresenta alto valor comercial, sendo bastante usado para o consumo e para a pesca esportiva. Seu ciclo de vida está intimamente ligado ao movimento das águas que ocorre anualmente no Pantanal. Durante o período de cheia o pacu se desloca em direção às regiões de campos alagados onde se reproduz e se alimenta. Após este período, parte dos pacus consegue retornar ao leito dos rios e parte fica presa nas “baías” (LOVSHIN, 1995; CALHEIROS; SEIDL e FERREIRA, 2000; BRITSKI; SILIMON e LOPES, 2007).

Figura 14 - *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)



Fonte: Adaptado de <http://pescadosdovale.blogspot.com.br/>. Acessado em 03/05/2012.

O pacu apresenta adaptações especiais que lhe permitem sobreviver a baixas concentrações de  $O_2$ . As respostas iniciais à hipoxia no pacu são semelhantes às descritas em outros teleósteos, como o aumento da frequência respiratória, a respiração aquática de superfície e a diminuição da sua atividade locomotora, evitando assim gasto energético. Outra adaptação importante é uma distensão dos seus lábios inferiores, o que permite uma maior passagem da água para as brânquias. Esta adaptação se inicia depois de 4 a 5 horas em hipoxia e regride quando o nível de  $O_2$  volta ao normal (SAINT-PAUL; BERNARDINO, 1988; RANTIN *et al.*, 1998).

Com a expansão do cultivo de peixes, visando uma alternativa alimentícia e contenção da pesca predatória, diversas espécies de peixes ganharam importância econômica. A tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) é uma destas espécies (figura 15). Conhecida como a tilápia do Nilo, originária da África, é um peixe cujo cultivo é hoje um dos mais frequentes no mundo, atrás apenas da cultura de carpas e salmonídeos. A espécie *Oreochromis niloticus* é a mais importante espécie de tilápia cultivada, representando mais de 80% da produção total (MOUSA; MOUSA, 1999; AL-SHAMSI; HAMZA e EL-SAYED, 2006).

Figura 15 - *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)



Fonte: Adaptado de <http://fishbase.sinica.edu.tw/photos/thumbnailsummary.php?ID=2>. Acessado em 03/05/2012.

*O. niloticus*, que é primariamente, mas não estritamente, herbívora, teve sua cultura favorecida em virtude de várias características, como rápido crescimento, grande resistência a condições adversas e a doenças e sua adaptabilidade a diversos tipos de meio ambiente (CHARO-KARISA *et al.*, 2006; PONCE-MARBÁN; HERNANDÉZ e GASCA-LEYVA, 2006). Outra característica que torna vantajosa a criação de tilápia é a capacidade de este animal obter um ótimo desenvolvimento em grandes concentrações populacionais, característica que diminui o custo de manutenção *per capita* (PONCE-MARBÁN; HERNANDÉZ e GASCA-LEYVA, 2006).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar atividades de enzimas antioxidantes de peixes em resposta a níveis de oxigênio na água em amostras de sangue.

### 2.2 Objetivos específicos

- 1 - Padronização do método de cateterismo ou canulação de peixes considerados adaptados (pacus) e não adaptados (tilápias) aos regimes de hipoxia.
- 2 - Padronização da determinação de parâmetros sanguíneos relacionados com a respiração nas menores amostras possíveis de sangue.
- 3 - Estudo comparativo do nível de atividades de GPX, GST e catalase nas hemácias das duas espécies de peixes submetidas a diferentes regimes de oxigenação da água.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Animais

Espécimes de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) foram coletados na piscicultura Sol nascente, localizada no município de Laje do Muriaé, Rio de Janeiro. Apresentavam peso aproximado de 500 gramas e comprimento<sup>1</sup> aproximado de 20 cm. Exemplos machos de tilápia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) foram obtidos no abatedouro comercial da Cooperativa dos Aquicultores do Sul Fluminense Peixesul Ltda (Peixesul) localizado no município de Piraí, no estado do Rio de Janeiro. Os animais apresentavam peso aproximado de 600 gramas e comprimento aproximado de 25 cm. Os peixes foram transportados para o laboratório, onde foram mantidos em tanques de 1.000 L equipados com sistema de filtro biológico, aeração por bombas de aspiração e água filtrada em carvão ativado sob ciclo de 12 h no claro e 12 h no escuro. A concentração de O<sub>2</sub> dissolvido na água destes tanques era aproximadamente de 6,0 mg.L<sup>-1</sup>.

##### 3.1.2. Equipamentos

Agitador tipo Vortex Phoenix AP 56; balança de precisão Marte AY 220; espectrofotômetro Shimadzu UV-160 A; espectrofotômetro Beckman DU 530; potenciômetro Analyser pH 300; centrífuga Eppendorf 5415C; ultracentrífuga refrigerada Hitachi Himac CP 70G, equipada com o rotor P50AT4; “freezer” (-70°C) da New Brunswick Scientific; cateter (22 G / 0,9 Ø / 25 L) endovenoso periférico Jelco<sup>TM</sup> (Smiths Medical); Homogeneizador tipo Potter-Elvehjem; Medidor de oxigênio dissolvido Hanna Instruments HI 91410;

---

<sup>1</sup> Foi adotada como comprimento a definição descrita na Instrução normativa do IBAMA n° 53, de 22 de novembro de 2005 para o comprimento furcal, que é a distância medida entre a ponta do focinho e o ponto de bifurcação das duas abas da nadadeira caudal.

### 3.1.3. Reagentes

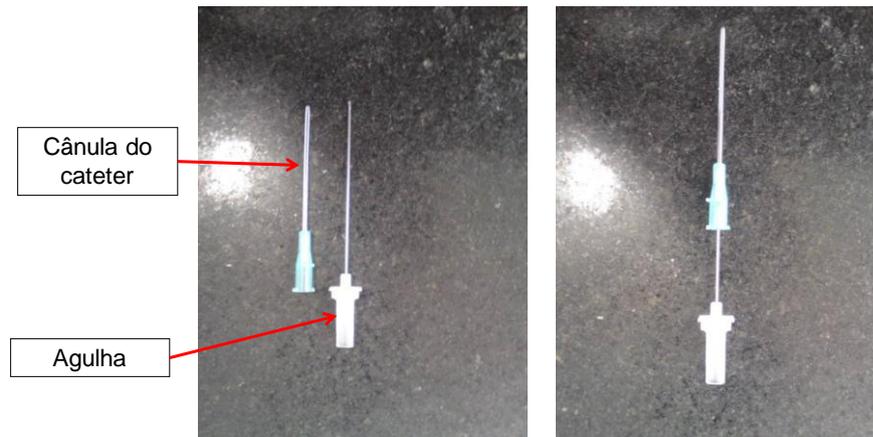
Glutationa reduzida (GSH),  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e glutatona redutase (GR) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Ditioneitol (DTT) foi adquirido da Gibco BRL. O 4-hidroxi-2-nonenal foi comprado da Cayman Chemical Company. A partícula MagneGST<sup>TM</sup> e os demais reagentes usados para purificação da GST foram produzidas pela PROMEGA. Os gases nitrogênio e oxigênio foram obtidos da Air Liquide Brasil Ltda. Todos os outros reagentes usados foram de alto grau de pureza.

## 3.2. **Métodos**

### 3.2.1. Procedimento de canulação

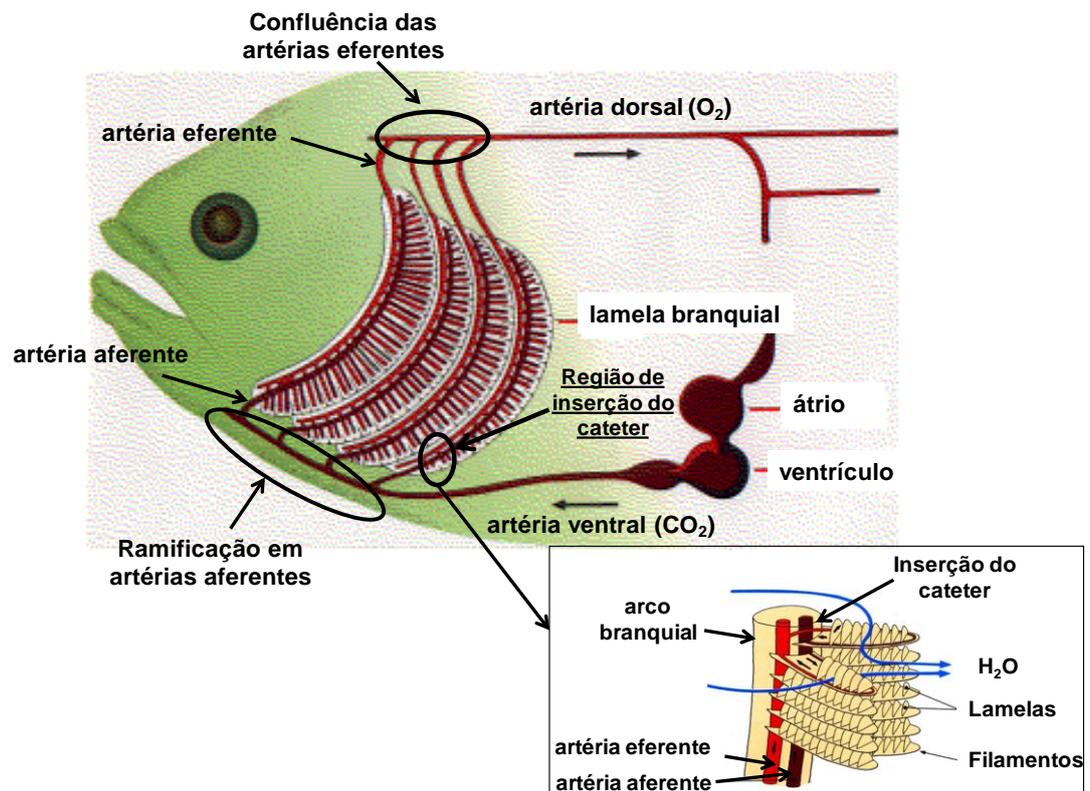
Para este estudo os animais foram anestesiados conforme descrito no tópico anestesia e coleta de amostras. Após a verificação da sedação os animais foram transferidos para uma mesa cirúrgica, contidos com alças de imobilização, e introduziu-se na boca um equipo de macrogotas. Este equipo estava conectado a um recipiente contendo água com anestésico e sua abertura infundiu água nas brânquias do animal possibilitando sua respiração e manutenção da anestesia. A canulação foi feita com um cateter endovenoso periférico comercial, marca Jelco<sup>TM</sup> (figura 16), utilizado na prática de cateterismos em seres humanos.

Figura 16 - Cateter comercial marca Jelco™



A punção foi feita em um vaso aferente, localizado no interior do arco branquial, com o bisel da agulha direcionado para a ramificação das artérias aferentes (figura 17). Após a punção a agulha foi retirada e a cânula do cateter inserida no vaso aferente.

Figura 17 - Anatomia vascular de peixes e região de inserção do cateter.



Fonte: Adaptado de <http://sunburst.usd.edu/~cliff/Courses/General%20Biology/153figs/GenBiopics.html> e <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/AnimalHearts.html>. Acessado em 03/10/2013

Afixamos o conector, por meio de sutura, no dorso do animal. Para extensão do comprimento do cateter foi necessária a sua conexão a uma cânula extensora.

### 3.2.2. Anestesia e coleta de amostras

Para anestesia os animais foram transferidos para um recipiente que continha solução anestésica de eugenol à concentração de 30  $\mu\text{L/L}$  em água potável (WATERSTRAT; PINKHAM, 2005). O volume adequado de eugenol para a solução anestésica foi obtido de uma solução inicial de eugenol a 50% (v/v) em etanol comercial a 95%. Os peixes foram considerados anestesiados quando sua posição na água se tornou desorientada, com prevalência da posição dorsal, sem resposta a estímulos externos. Os animais foram então sacrificados para obtenção de amostras hepáticas ou puncionados na veia caudal, utilizando heparina como anticoagulante, para obtenção de alíquotas de sangue. Em função de vieses durante o procedimento de canulação os ensaios de padronização e em diferentes tensões de oxigênio foram conduzidos com amostras coletadas por punção da veia caudal.

### 3.2.3. Ensaio em diferentes tensões de oxigênio

Os animais foram acondicionados em tanques de 1.000 litros conectados a uma bala de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) e de oxigênio ( $\text{O}_2$ ). Para a hipoxia foram retiradas alíquotas de sangue (normoxia) por punção caudal e após a devolução dos animais para os tanques foi borbulhado  $\text{N}_2$  na água de forma controlada. Assim houve uma redução gradual e lenta da concentração de  $\text{O}_2$  evitando-se um choque para os animais e permitindo sua adaptação. Após 6 horas alcançou-se a concentração de 0,5 mg de  $\text{O}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  e os animais foram então mantidos nesta condição por 42 horas. Ao término das 42 h novas alíquotas de sangue (hipoxia) foram retiradas para análise. Ressalta-se que um plástico foi mantido na superfície da água para evitar a difusão de  $\text{O}_2$  atmosférico na água e impedir que os peixes nadassem junto à superfície para a respiração aérea superficial.

Para a hiperoxia foram retiradas alíquotas de sangue (normoxia) por punção caudal e, seguindo-se a devolução dos animais para os tanques, foi bombeado  $\text{O}_2$  na água elevando-se rapidamente sua concentração para 9,5 mg.L<sup>-1</sup>. Os animais foram mantidos nesta condição por 6 horas e ao término deste período foram retiradas novas alíquotas de sangue (hiperoxia) para os ensaios. Após esta coleta foi restaurada a concentração normal de  $\text{O}_2$  dos tanques (6 mg.L<sup>-1</sup>) mantendo-se os animais nesta tensão de oxigênio por 30 horas quando, então, foi realizada

uma nova coleta ( $6 \text{ mg.L}^{-1}$  30 horas) para avaliação de um efeito tardio da hiperoxia. Um plástico foi mantido na lâmina de água para manter os níveis de  $\text{O}_2$  e evitar o escape do gás para a atmosfera.

Para o fígado os ensaios de hipoxia e hiperoxia foram conduzidos de forma idêntica à descrita para o sangue, porém um grupo de animais foi sacrificado, após anestesia, em cada momento (normoxia, hipoxia, hiperoxia) para a obtenção de amostras hepáticas que foram então homogeneizadas e congeladas até o momento da análise.

Para a construção dos gráficos adotou-se como legenda os níveis de concentração de  $\text{O}_2$  utilizados. Desta forma representou-se a normoxia como  $6 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$ , hipoxia  $0,5 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$ , hiperoxia  $9,5 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$  e normoxia após a hiperoxia  $6 \text{ mg O}_2.\text{L}^{-1}$  30 horas.

#### 3.2.4. Preparo das amostras de sangue e de fígado

Para a lise dos eritrócitos foi comparada a eficácia de três protocolos: suspensão em água destilada ou em dois tampões de lise descritos na literatura.

A lise dos eritrócitos com água foi por acréscimo de três volumes de água para um volume (aproximado) de sangue, conforme protocolo de uso corriqueiro para a lise de eritrócitos humanos. A lise com as soluções tampões foi realizada com dez volumes de cada solução. O protocolo descrito por Brix, Foras e Strand, (1998) usa o choque osmótico em um tampão  $1 \text{ mM}$  de Tris-HCl, pH 8,0, e adição de um volume de NaCl a  $1 \text{ M}$  para melhor sedimentação do estroma celular por centrifugação. Souza, Poy e Rodriguez, (2004) usam para a lise a adição de um tampão  $50 \text{ mM}$  de Tris-HCl, pH 9,0.

O sobrenadante do hemolisado centrifugado foi diluído e avaliou-se a atividade enzimática. Para cada ensaio calculamos o volume de amostra real utilizado. Assim  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de um hemolisado centrifugado diluído 100 vezes continha  $0,1 \text{ }\mu\text{L}$  de amostra.

Deve ser considerada a diluição feita durante a hemólise para diluições futuras. Assim durante a hemólise com água a amostra é diluída 4 vezes. Diluindo-se o hemolisado obtido mais 25 vezes temos ao final uma amostra diluída ( $4 \times 25$ ) 100 vezes.

Para o preparo das frações citosólicas hepáticas os fígados foram lavados em solução salina 0,9%, secos em papel de filtro e pesados individualmente. Os órgãos foram homogeneizados em solução tampão fosfato de potássio  $0,1 \text{ M}$ , pH 7,0, contendo sacarose

0,25 M a 5 °C em homogeneizador tipo Potter-Elvehjem na relação de 1 g de fígado em 4 mL de tampão. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 x g por 30 minutos e o sobrenadante obtido foi ultracentrifugado a 105.000 x g por 90 min. Todas as etapas foram realizadas a 5 °C. O sobrenadante obtido (fração citosólica) foi então armazenado no freezer (-20 °C) até o momento do ensaio.

### 3.2.5. Hemoglobina

Para a quantificação da hemoglobina usou-se um kit de dosagem marca Bioclin. Neste método os compostos de hemoglobina, com exceção da sulfahemoglobina, são rapidamente convertidos a cianometahemoglobina sob ação do cianeto de potássio 0,077 M e do ferricianeto de potássio 0,06 M (solução de Drabkin). Assim 10 µL de amostra de sangue foram adicionadas em 2,5 mL de solução de Drabkin e após 10 minutos foram feitas as leituras espectrofotometricamente a 540 nm, conforme descrito no manual do kit.

### 3.2.6. Dosagem de proteínas

A dosagem de proteínas totais de fígado foi feita em alíquotas das frações citosólicas através do método rápido de Peterson (PETERSON, 1977) que exclui a etapa de precipitação. Este método baseia-se na interação das proteínas com o fenol Folin-Ciocalteu (0,33 N) e tartarato de cobre (0,1%) em condições alcalinas. A redução do reagente de Folin-Ciocalteu pela proteína provoca o deslocamento da cor do fenol para uma coloração azul que absorve fortemente em 750 nm.

Para as amostra purificadas com a partícula MagneGST usamos o método de Bradford (BRADFORD, 1976) que é uma técnica para a determinação de proteínas totais através do uso do corante “Comassie brilliant blue” BG-250 (0,01%). O método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas como a arginina e a lisina. No pH de reação a interação entre a proteína e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante (cor vermelha) para a forma aniônica (cor azul), que absorve fortemente em 595 nm.

### 3.2.7. Ensaio enzimáticos

#### 3.2.7.1. Avaliação da atividade da GST sobre o substrato 4-HNE

Este ensaio de GST consiste na conjugação do 4-HNE à GSH formando o conjugado GS-HNE. O consumo de 4-HNE foi continuamente registrado por decaimento da absorvância no espectrofotômetro ajustado a um comprimento de onda de 224 nm durante 3 minutos de tempo de reação. A atividade de GST foi determinada usando o coeficiente de absorvância milimolar do 4-HNE ( $\epsilon_{224} = 13,75 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

A atividade de GST foi determinada através do método estabelecido por Álin, Danielson e Mannervik, (1985). O meio de ensaio foi uma solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 6,5. O volume de amostra de sangue, concentrações de GSH e 4-HNE foram padronizados para que a enzima trabalhasse na sua velocidade inicial máxima. Ao final dos ensaios concluímos como condições ideais 10  $\mu\text{L}$  de hemolisado diluído 100 vezes (0,1  $\mu\text{L}$  de sangue) e concentrações finais de 2 mM de GSH e 100  $\mu\text{M}$  de 4-HNE. . A concentração ideal de proteína de amostras hepáticas usada em cada ensaio foi estabelecida em trabalhos prévios de nosso grupo que revelou ser de 6  $\mu\text{g}$  de proteínas totais. A reação transcorreu a 30 °C.

#### 3.2.7.2. Avaliação da atividade de GST sobre o substrato CDNB

Este ensaio de GST consiste na conjugação do CDNB à GSH formando o conjugado GS-DNB com a liberação de HCl. O aparecimento do conjugado foi continuamente registrado no espectrofotômetro a 340 nm durante 3 minutos. Determinou-se a atividade de GST usando o coeficiente de absorvância milimolar do CDNB ( $\epsilon_{340} = 9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

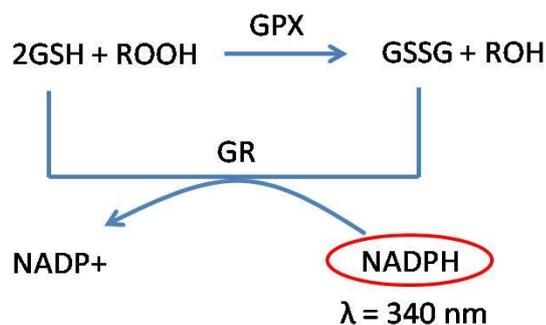
A atividade de GST foi ensaiada através de uma modificação do método estabelecido por Habig, Pabst e Jacoby, (1974). O meio de ensaio foi uma solução tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,0. O volume de amostra de sangue, concentrações de GSH e CDNB foram padronizados para que a enzima trabalhasse na sua velocidade inicial máxima. Ao final concluímos que 10  $\mu\text{L}$  de hemolisado diluído 8 vezes (1,25  $\mu\text{L}$  de sangue) e concentrações

finais de 2 mM de GSH e 3 mM de CDNB são as condições ideais para os ensaios. A concentração ideal de proteína de amostras hepáticas usada em cada ensaio foi estabelecida em trabalhos prévios de nosso grupo que revelou ser de 6 µg de proteínas totais. A reação foi ensaiada em temperatura ambiente<sup>2</sup>.

### 3.2.7.3. Ensaio da atividade de glutathiona peroxidase (GPX)

O método consiste na redução de peróxido (ROOH) pela GSH, em uma reação catalisada pela glutathiona peroxidase (GPX) presente na amostra. O produto desta reação é a GSSG que é reduzida pela glutathiona redutase (GR) com elétrons do NADPH. O consumo de NADPH foi continuamente registrado no espectrofotômetro a 340 nm durante 1 minuto de reação. A atividade de GPX foi determinada usando o coeficiente de absorvidade milimolar do NADPH ( $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). A figura 18 apresenta um esquema da reação acoplada da GPX com a glutathiona redutase e o desaparecimento de NADPH. A atividade de GPX foi expressa em µmol de NADPH consumido por minuto.

Figura 18 - Esquema de ensaio enzimático da GPX



Fonte: Adaptado de DANTAS, 2010.

A atividade de GPX com  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi determinada de acordo com o método descrito em Regoli e Principato, (1995). O meio reacional continha, amostra, e concentrações finais de 1,0 mM de EDTA, 1,0 mM de azida sódica, 1,0 mM de ditioneitol, 0,48 mM de NADPH, 1 U/mL de glutathiona redutase e 350 µM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em solução tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5. A concentração de GSH foi padronizada para que a enzima trabalhasse com sua

<sup>2</sup> Foi adotada como temperatura ambiente a normativa da ANVISA Resolução – RE/ANVISA nº 9, de 16 de janeiro de 2003, que define uma faixa de temperatura entre 23-26 °C em ambientes climatizados.

velocidade inicial máxima que revelou ser de 10 mM. Estabeleceu-se como concentração de proteína ideal um volume de amostra que não levasse à redução de mais de 5% da velocidade inicial durante o período do ensaio. A reação foi ensaiada à temperatura ambiente.

#### 3.2.7.4. Avaliação da atividade de catalase

Este método tem por base a quantificação espectrofotométrica a 240 nm da cinética de decomposição do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) em oxigênio e água ao longo de 1 minuto de reação. Determinou-se a atividade de catalase usando o coeficiente de absorvidade milimolar do  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon_{240} = 0,0436 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

A atividade da enzima catalase foi determinada através de uma modificação do método descrito por Aebi (1984). O meio do ensaio continha amostra e concentrações finais de 0,8 mM de EDTA e 20 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,5. Foram utilizados diferentes volumes de amostra obtendo-se uma linearidade das atividades. Estabeleceu-se como concentração de proteína ideal um volume de amostra que não levasse à redução de mais de 5% da velocidade inicial durante o período do ensaio. A reação foi ensaiada em temperatura ambiente.

#### 3.2.8. Purificação da enzima GST de eritrócito de tilápia

As glutathione S-transferases foram purificadas por afinidade à partícula paramagnética MagneGST<sup>TM</sup>, que é composta por moléculas de glutathione ligadas a uma partícula de óxido de ferro envolta por agarose.

A purificação foi realizada com 600  $\mu\text{L}$  de MagneGST<sup>TM</sup>, que foi lavada e equilibrada por uma de solução de equilíbrio (Binding/Wash buffer) contendo 4,2 mM fosfato de sódio bibásico, 2 mM de fosfato de potássio bibásico, 140 mM de cloreto de sódio e 10 mM de cloreto de potássio (Promega, 2009). Em seguida, 1200  $\mu\text{L}$  de hemolisado foram incubados com as partículas por 1h. A fração não ligada foi coletada e as partículas foram lavadas duas vezes com a mesma solução de equilíbrio e por fim as GST foram eluídas com tampão de eluição, 50 mM Tris/HCl pH 8,1 contendo 50 mM GSH em pH 8.

### 3.2.9. Análise dos dados

A análise dos resultados e construção dos gráficos foram feitas com o uso do programa GraphPad Prism 5 para Windows versão 5.0 da GraphPad Software. Os resultados foram comparados usando-se testes t não pareados. Os ensaios cinéticos foram analisados por regressão não linear utilizando as equações de Michaelis-Menten e Lineweaver-Burk.

### 3.2.10. Comitê de ética

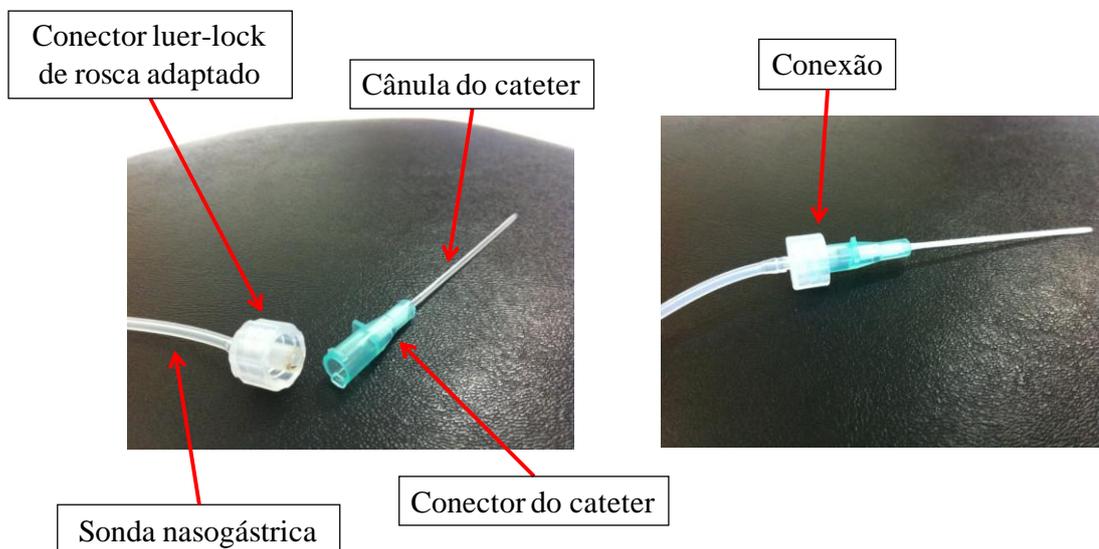
Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com os princípios éticos na experimentação animal elaborado pelo Colégio Brasileiro de experimentação Animal (COBEA) que está de acordo com os requisitos para a submissão de manuscritos a revistas biomédicas

## 4 RESULTADOS

### 4.1. Estabelecimento da técnica de canulação

Foi usada uma sonda nasogástrica para a extensão, o que proporcionou comprimento, flexibilidade e resistência adequados ao dispositivo. Como técnica inicial para realizar a conexão ao cateter foi testado um conector “luer-lock”, tipo rosca, adaptado (figura 19).

Figura 19 - Conexão da rosca “luer-lock” e cateter

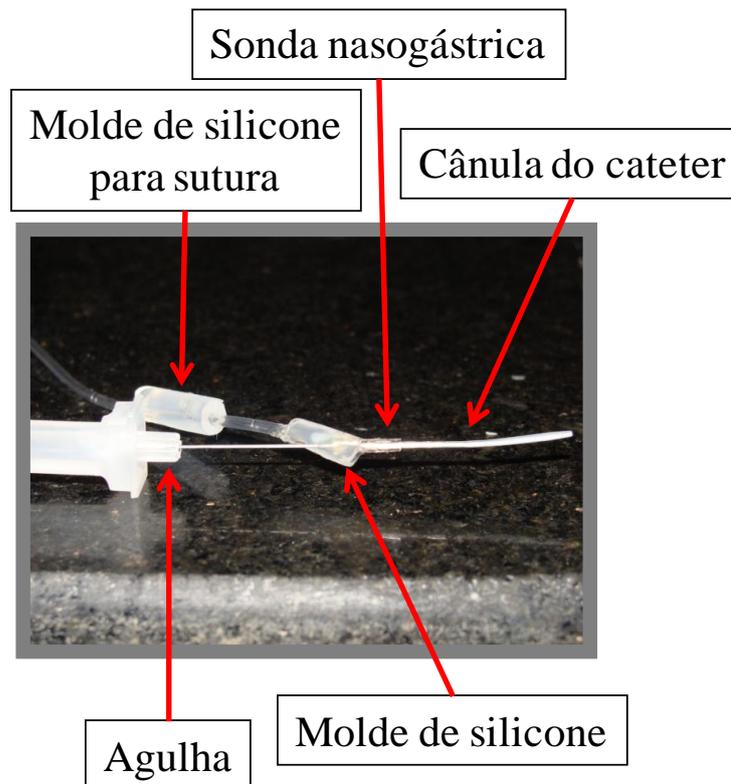


Após as etapas iniciais de anestesia e contenção, já descritas em métodos, o vaso aferente do quarto arco branquial, que tem menor mobilidade, foi puncionado com o cateter. Após a punção, a agulha foi retirada à medida que a cânula do cateter era vagarosamente empurrada para o interior do vaso, ficando de fora apenas o conector. A ligação com a sonda nasogástrica foi feita com o conector “luer-lock”. Após várias tentativas verificou-se que tal conexão adaptada não proporcionava a vedação do aparato, o que impedia a formação de um sistema selado, impossibilitando a geração de vácuo suficiente para a retirada de sangue. Além disto, devido ao curto comprimento do cateter, o conector permanecia dentro da estrutura do opérculo, o que prejudicava a pulsão opercular normal e provocava lesões.

Para a segunda tentativa de conexão foi abandonada a forma ortodoxa de utilização do cateter e todo o aparato foi desenvolvido e ajustado de forma a atender as necessidades da canulação pela via branquial. Desta forma, eliminaram-se os conectores do cateter e a rosca

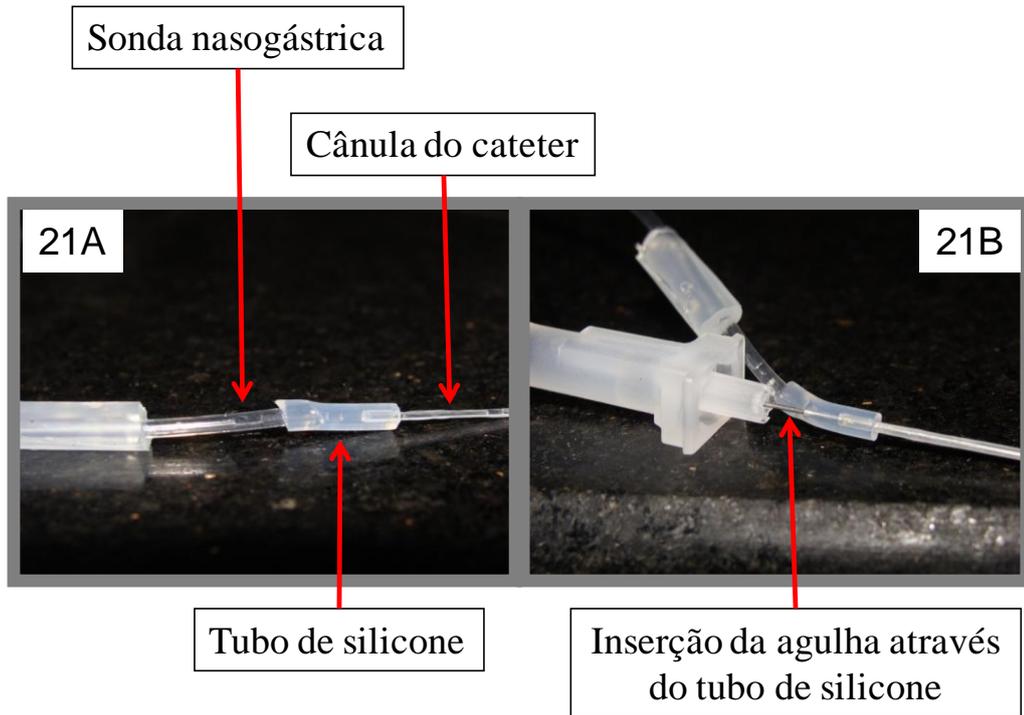
“luer-lock”, acoplando a cânula diretamente à sonda. Para a inserção da agulha, necessária para a punção, foi testada a utilização de silicone, moldado ao redor da sonda, perto do local de inserção da cânula na sonda. A agulha foi então inserida através do molde de silicone até o interior da cânula (figura 20) e a composição e maleabilidade deste material permitiu que após a retirada da agulha o silicone moldasse, ocluindo assim a perfuração e vedando o sistema. Após algumas tentativas verificou-se que a repetida perfuração resultava em um descolamento do molde da sonda o que impedia a vedação da perfuração da agulha.

Figura 20 - Inserção da agulha no cateter através do molde de silicone



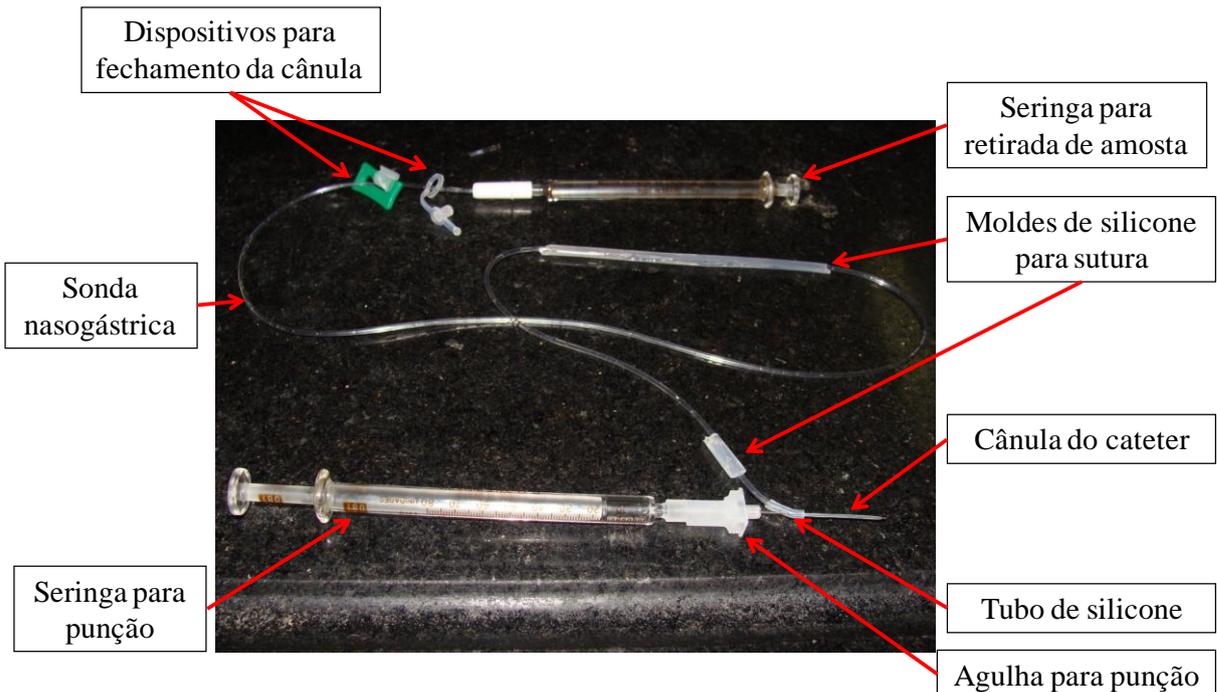
Assim uma terceira forma de conexão foi testada, realizando a ligação da sonda e da cânula através de um pequeno tubo de silicone (figura 21A).

Figura 21 - Inserção da agulha no cateter através do tubo de silicone



Este artifício revelou-se ideal para o propósito da canulação branquial. Para a punção a agulha foi inserida através do tubo de silicone até a cânula (figura 21B) e o conjunto foi então preenchido com salina heparinizada. Duas seringas foram então acopladas: uma na extremidade distal do aparato e outra na extremidade proximal para punção (figura 22).

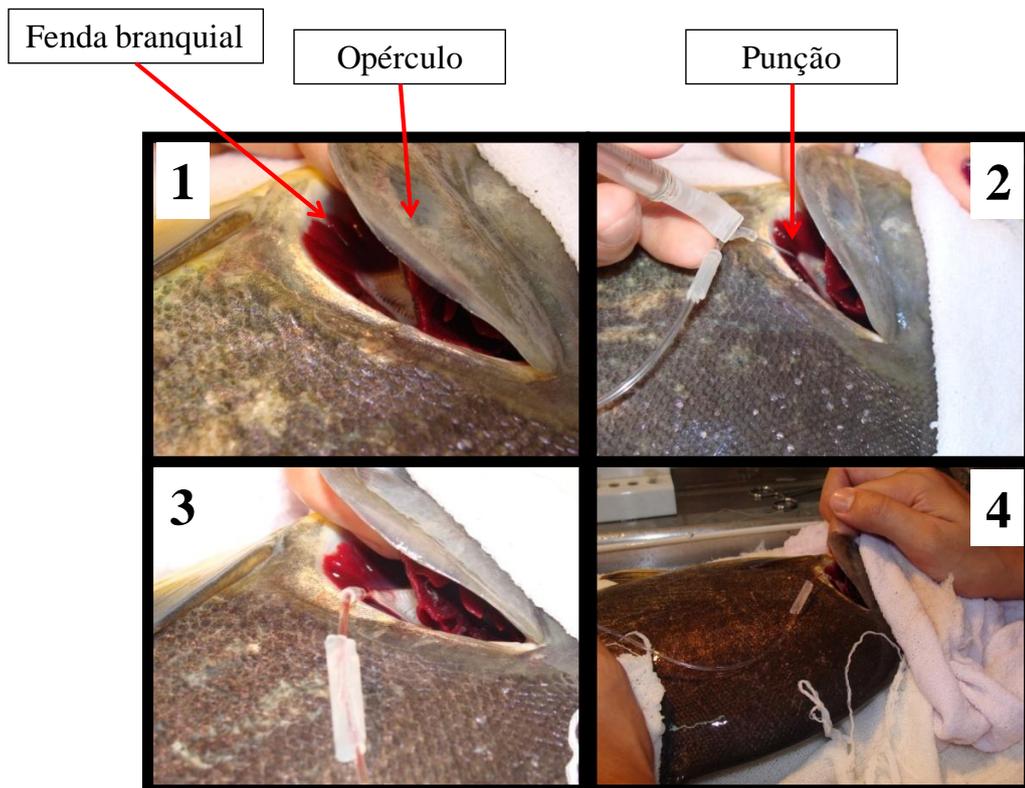
Figura 22 - Aparato completo para canulação.



Nota: A seringa para punção é removida após o procedimento de canulação.

A inserção da cânula foi, então, conduzida e, após a punção, a seringa e agulha utilizadas para a punção foram retiradas e foi verificado o fluxo sanguíneo no interior da cânula (figura 23).

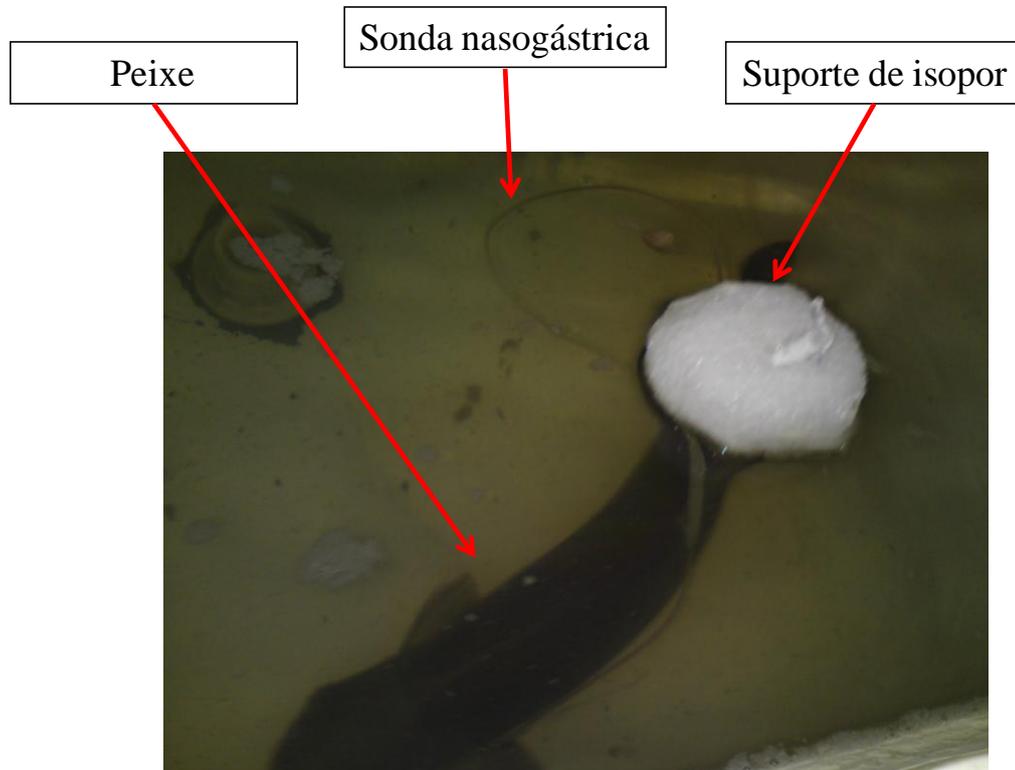
Figura 23 - Técnica de canulação e inserção do cateter (pacu)



Para a fixação do aparato no animal, moldes de silicone foram dispostos ao longo da sonda (figura 22) e a fixação foi realizada passando-se uma agulha e linha de sutura através deste material. Inicialmente a fixação do sistema foi feita ao longo do comprimento do animal. Entretanto, o movimento natatório rompeu a sutura e puxou a cânula do interior do vaso. Optou-se então por uma sutura perto da abertura opercular e outra na nadadeira dorsal.

Após se obter sucesso em todas as etapas do procedimento, o animal foi alocado em um tanque separado e observado a cada hora por sete horas verificando-se fluxo de sangue em todas as observações. A extremidade da cânula foi fechada e presa a um suporte de isopor para permitir liberdade de movimento (figura 24).

Figura 24 - Animal canulado em aquário de recuperação



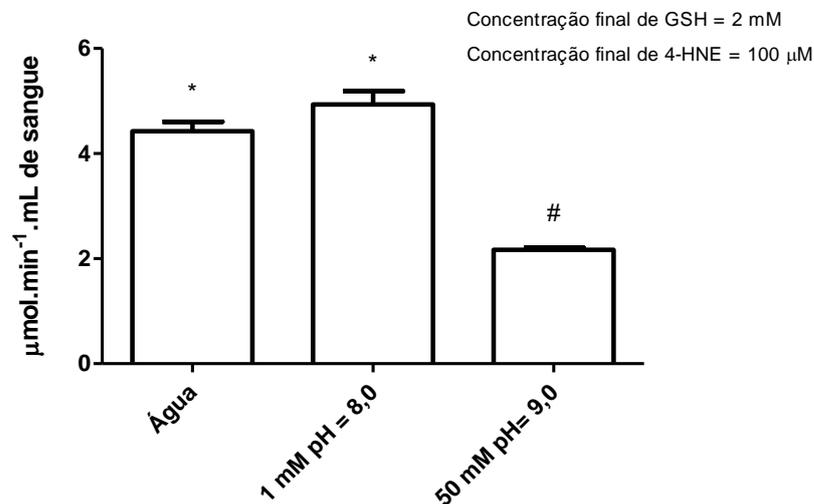
Na última verificação o espécime encontrava-se canulado, havendo fluxo de sangue na cânula após sua abertura. Em nenhuma das observações foi constatado um comportamento anormal que indicasse estresse por parte do animal. Entretanto, vinte e quatro horas depois não se pôde obter fluxo de sangue usando sucção com a seringa; ocorreu trombose no vaso canulado.

#### 4.2. O sangue como matriz

Quando da hemólise, foi verificado que a utilização de água como meio hipotônico ocasionava a formação de um hemolisado gelatinoso. Assim, foram testados outros procedimentos de lise de hemácias descritos na literatura. Ao serem usadas soluções tampões, também ocorreu um hemolisado gelatinoso. Entretanto, transcorrida uma hora depois da lise, como preconizado pelo protocolo, o hemolisado retornou a sua forma fluida. Para este teste avaliamos a atividade da GST sobre o substrato 4-HNE, ensaio considerado mais sensível dentre os avaliados em nosso estudo. A amostra consistia em um “pool” do sangue de quatro

animais, no caso pacus. O gráfico 1 mostra a média e o desvio padrão da média de triplicatas de cada ensaio.

Gráfico 1 - Comparação dos procedimentos de hemólise por ensaio da GST-4-HNE



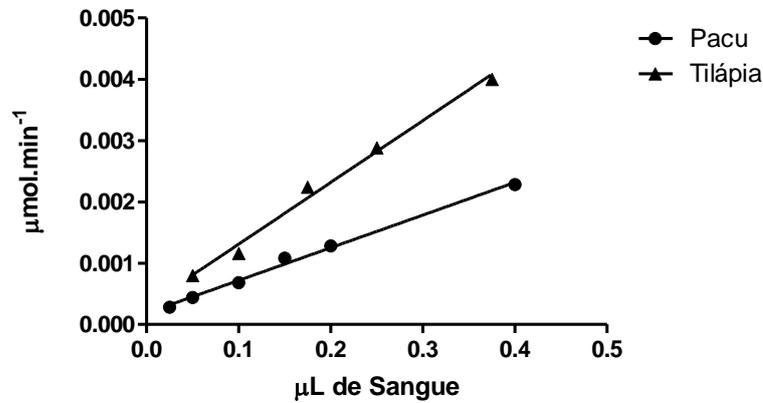
Legenda: Misturou-se o sangue com água destilada pura ou uma das soluções tampões de Tris-HCl, uma a 1 mM, pH 8,0, e outra a 50 mM, pH 9,0. Amostra de “pool” do sangue de quatro peixes (pacu). Símbolos diferentes indicam diferença estatística.

Foram observadas diferenças significativas entre a lise com água e a lise com o tampão 50 mM ( $p = 0,0067$ ) e também entre a lise com o tampão 1 mM e o tampão 50 mM ( $p = 0,0085$ ). Não foi observada diferença entre a lise com água e a lise com o tampão 1 mM, mas em ambos formava-se um lisado gelatinoso. Adotamos então o choque osmótico com água para a hemólise seguida de uma centrifugação a 12.000 x g para separação de fragmentos celulares e produção de um lisado sobrenadante bem fluido.

#### 4.3. Padronização do ensaio de GST sobre o substrato 4-hidroxi-2-nonenal

A curva do efeito de proteínas sobre a atividade de conjugação do 4-HNE à GSH (gráfico 2) catalisada pela GST apresentou um crescimento linear quando a quantidade de proteínas variou para ambas as espécies.

Gráfico 2 - Curva de proteínas para o ensaio de atividade sanguínea de GST sobre o substrato 4-HNE

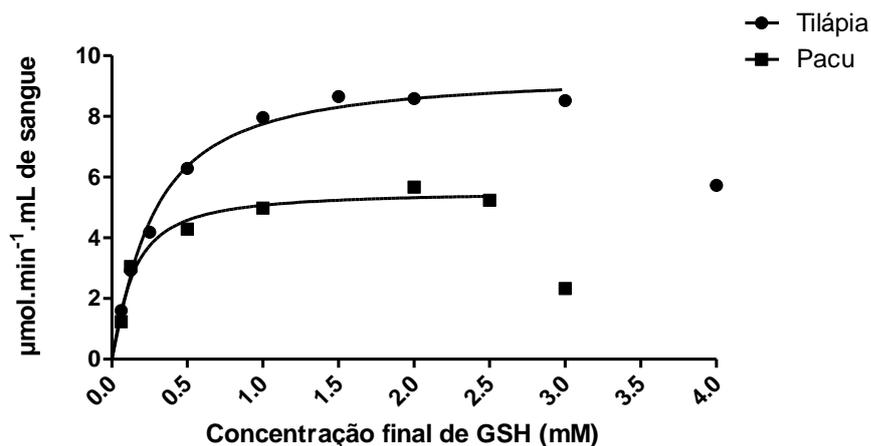


Legenda: Concentrações finais dos substratos: GSH 2 mM; 4-HNE: 100 µM. Cada ponto representa a média de três replicatas.

Desta forma foi adotada a utilização de um volume de 0,1 µL de sobrenadante de sangue hemolisado (10 µL de hemolisado diluído 100 vezes) para condução de todos os ensaios com o substrato 4-HNE para ambas as espécies.

A dependência da atividade da GST para a conjugação de uma concentração final fixa do 4-HNE (100 µM) com crescentes concentrações de GSH é apresentada no gráfico 3.

Gráfico 3 - Atividade sanguínea de GST na conjugação de 4-HNE à diferentes concentrações de GSH



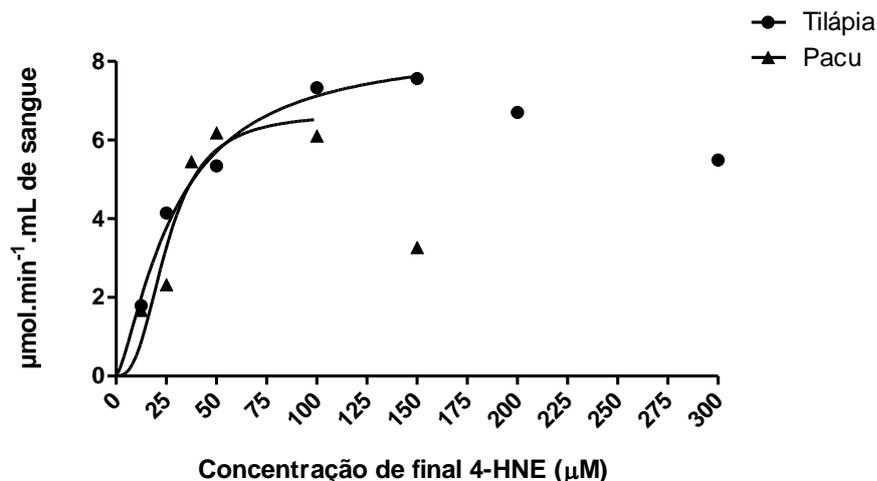
Legenda: Concentração final fixa de 4-HNE igual a 100 µM. Volume de amostra de 10 µL de sangue hemolisado diluído 100 vezes. Cada ponto representa a média de quatro replicatas.

Concentrações de GSH maiores do que 3 mM para sangue de tilápia e 2,5 mM para sangue de pacu resultaram em queda de atividade. A análise dos dados segundo uma cinética hiperbólica de Michaelis-Menten por uso de regressão não linear, desconsiderando-se os

pontos de queda de atividade, apontou para um valor da  $K_M$  aparente de 0,30 mM para a atividade em sangue de tilápia e de 0,15 mM para a de sangue de pacu. Decidimos usar 2 mM de GSH como concentração final ideal para ensaiar a atividade em sangue das duas espécies.

A mudança da atividade da GST para a conjugação de uma concentração final fixa de GSH (2 mM) com crescentes concentrações de 4-HNE é apresentada no gráfico 4.

Gráfico 4 - Atividade sanguínea de GST na conjugação de GSH à diferentes concentrações de 4-HNE



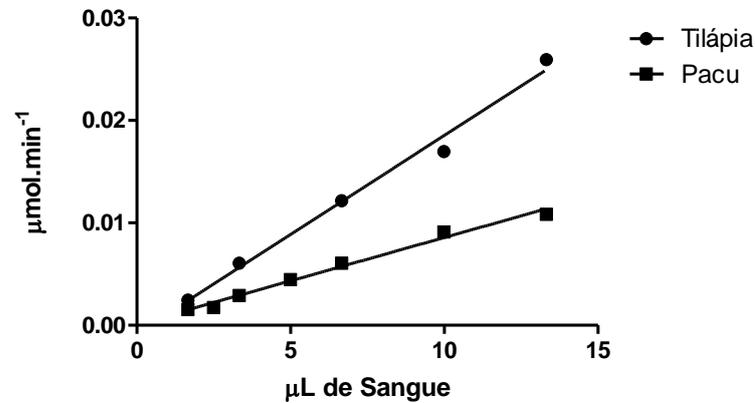
Legenda: Concentração final fixa de GSH igual a 2 mM. Volume de amostra de 10 µL de sangue hemolisado diluído 100 vezes. Cada ponto representa a média de quatro replicatas.

Observa-se no gráfico 4 um aumento de atividade até a concentração de 150 µM para tilápia e 100 µM para pacu, ocorrendo uma queda em concentrações superiores. A análise através da regressão não linear de Michaelis-Menten, desconsiderando-se concentrações com queda de atividade, resultou em uma  $K_M$  aparente de 41,65 µM para a atividade de sangue de tilápia e de 44,21 µM para a de sangue de pacu. Optou-se então pela utilização no ensaio de 100 µM de 4-HNE como concentração final.

#### 4.4. Padronização do ensaio de GST sobre o substrato CDNB

A influência da concentração de proteínas na atividade de conjugação do CDNB à GSH catalisada pela GST é visualizada no gráfico 5. A velocidade de conjugação apresentou um crescimento linear quando a quantidade de proteínas (expressa como µL de sangue) foi variada para ambas as espécies.

Gráfico 5 - Curva de proteínas para o ensaio de atividade sanguínea de GST sobre o substrato CDNB

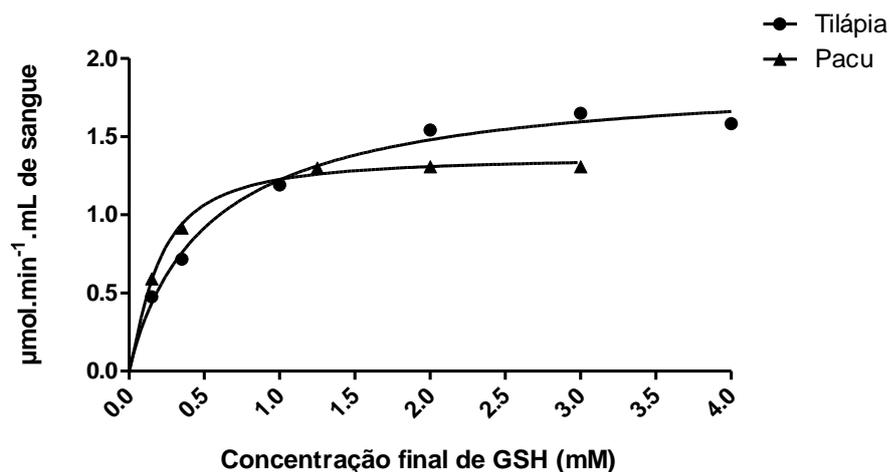


Legenda: Concentrações finais dos substratos: GSH 5 mM; CDNB 2 mM. Cada ponto representa a média de três replicatas.

Em consequência dos resultados do gráfico 5, adotamos 1,25  $\mu\text{L}$  de sangue hemolisado (10  $\mu\text{L}$  de hemolisado diluído 8 vezes) para todos os ensaios de GST com o substrato CDNB.

O gráfico 6 demonstra a variação da atividade da GST para a conjugação de uma concentração final fixa de CDNB (3 mM) com crescentes concentrações de GSH.

Gráfico 6 - Atividade sanguínea de GST sobre o CDNB em diferentes concentrações de GSH



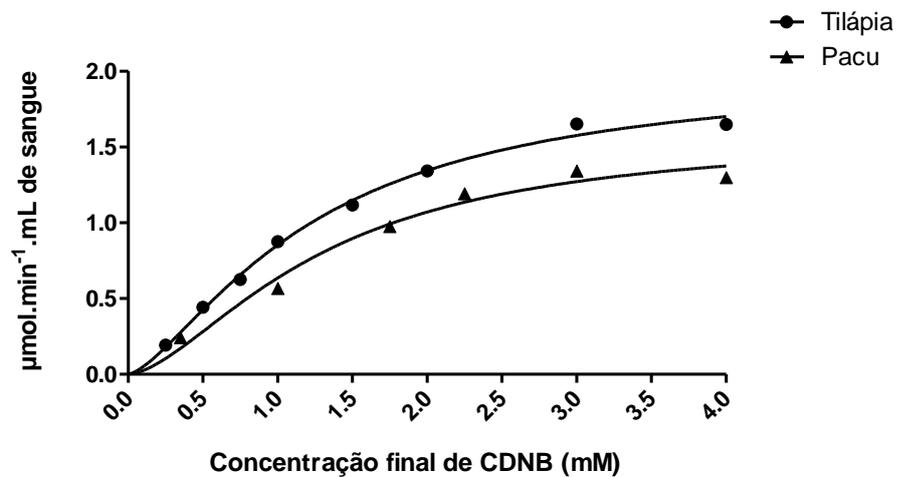
Legenda: Concentração final fixa de CDNB igual a 3 mM. Volume de amostra de 10  $\mu\text{L}$  de sangue hemolisado diluído 8 vezes. Cada ponto representa a média de quatro replicatas.

Houve um aumento da atividade enzimática de GST até a concentração de 2 mM para tilápia e 1 mM para pacu, observando-se então um platô nas demais concentrações. A análise

por Michaelis-Menten obteve um valor para a  $K_M$  de 0,51 mM para atividade em sangue de tilápia e 0,20 mM para a de sangue de pacu. Desta forma, foi escolhida como concentração ideal 2 mM de GSH para a análise da atividade sanguínea de GST de ambas as espécies.

A atividade da GST para a conjugação de uma concentração final fixa de GSH (2 mM) com crescentes concentrações de CDNB é apresentada no gráfico 7.

Gráfico 7 - Atividade sanguínea de GST na conjugação de GSH à diferentes concentrações de CDNB



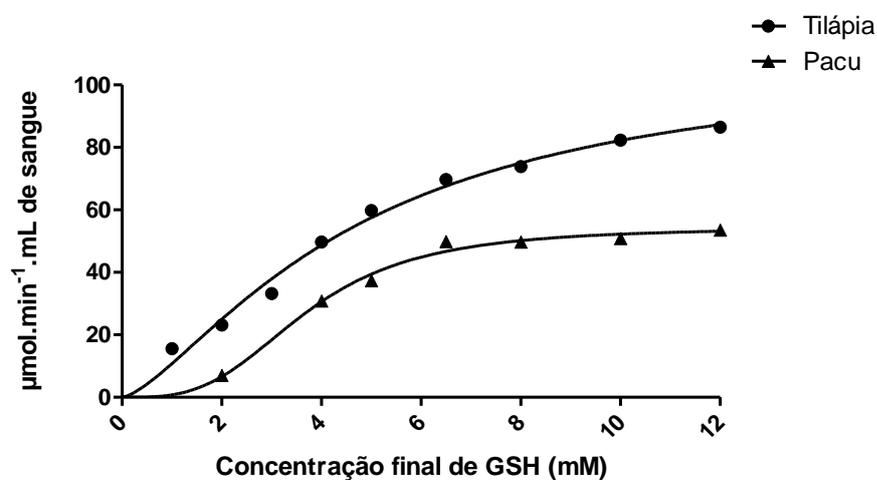
Legenda: Concentração final fixa de GSH igual a 2 mM. Volume de amostra de 10 µL de sangue hemolisado diluído 8 vezes. Cada ponto representa a média de quatro replicatas.

Ocorreu um aumento de atividade até 3 mM de CDNB e a partir desta concentração há um platô. A utilização de concentrações maiores que 3 mM gerou uma turbidez do meio reacional e precipitação do substrato prejudicando a linearidade do ensaio, sendo necessário um maior número de repetições. Concentrações acima de 4 mM impossibilitaram o ensaio. Uma análise por Michaelis-Menten resultou para a atividade em sangue de tilápia em uma  $K_M = 2,29$  mM e para pacu em 4,92 mM. Ressaltamos que esta concentração não foi avaliada, sendo uma extrapolação do cálculo do programa. Desta forma, 3 mM de CDNB foi escolhida como concentração ótima para o ensaio por ser a maior concentração que apresentou linearidade e pouca turbidez.

#### 4.5. Padronização do ensaio de GPX

O efeito de diferentes concentrações de GSH sobre a atividade de GPX com uma concentração final de 350  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pode ser visualizado no gráfico 8. Os dados obtidos neste ensaio resultaram na construção de uma curva sigmoide.

Gráfico 8 - Atividade sanguínea de GPX sobre o  $\text{H}_2\text{O}_2$  em diferentes concentrações de GSH



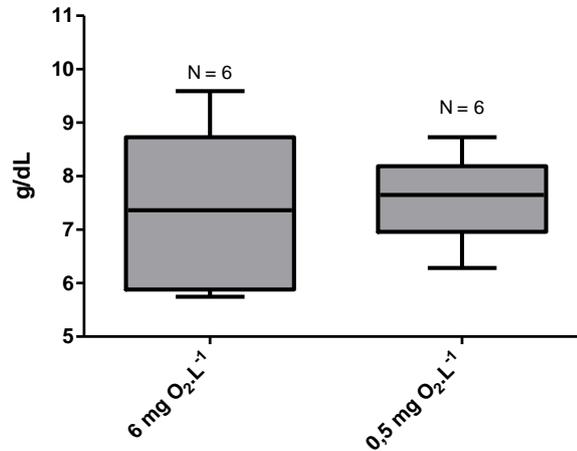
Legenda: Concentração final fixa de  $\text{H}_2\text{O}_2$  igual a 350  $\mu\text{M}$ . Cada ponto representa a média de quatro replicatas.

Verificou-se um padrão de atividade alostérico com obtenção de um platô de velocidade máxima a partir de 12 mM de concentração final de GSH para sangue de tilápia e 6,5 mM para o de pacu. Optamos pelo uso de 10 mM de GSH como concentração ideal para a realização deste ensaio para ambas as espécies.

#### 4.6. Ensaio em hipoxia

Observam-se no gráfico 9 os valores de hemoglobina encontrados em condições de hipoxia para tilápias.

Gráfico 9 - Concentrações de hemoglobina de tilápia em condições de normoxia e 42 horas sob hipoxia

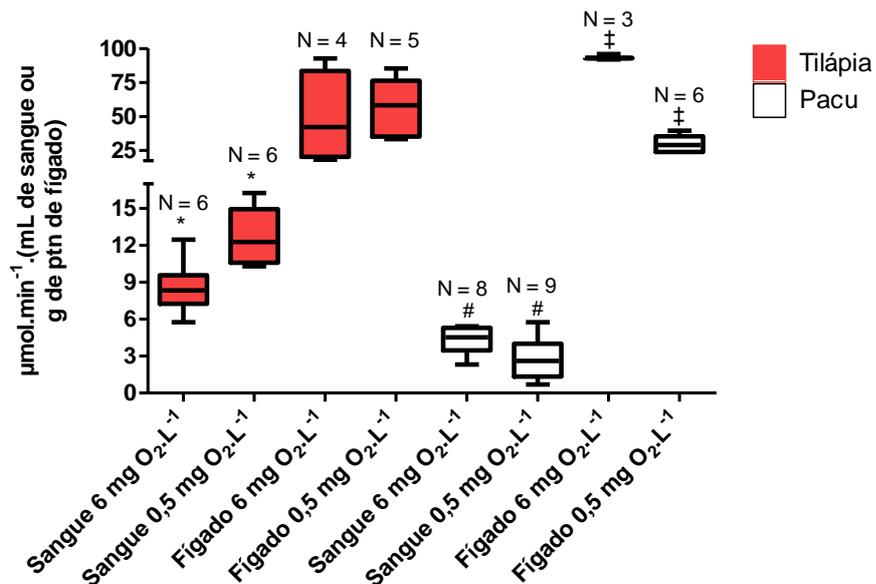


Legenda: Concentrações de O<sub>2</sub> - normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) e 42 horas sob hipoxia (0,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>).

Os resultados encontrados demonstram que a hemoglobina não variou nas condições testadas mantendo-se para tilápias em normoxia com mediana de 7,36 g/dL e de 7,65 g/dL em hipoxia.

O gráfico 10 apresenta a variação da atividade de GST sanguínea sobre o substrato 4-HNE em animais sob normoxia e hipoxia.

Gráfico 10 - Comparação da atividade de GST sobre o substrato 4-HNE em fígado e sangue de animais submetidos à normoxia e 42 horas de hipoxia

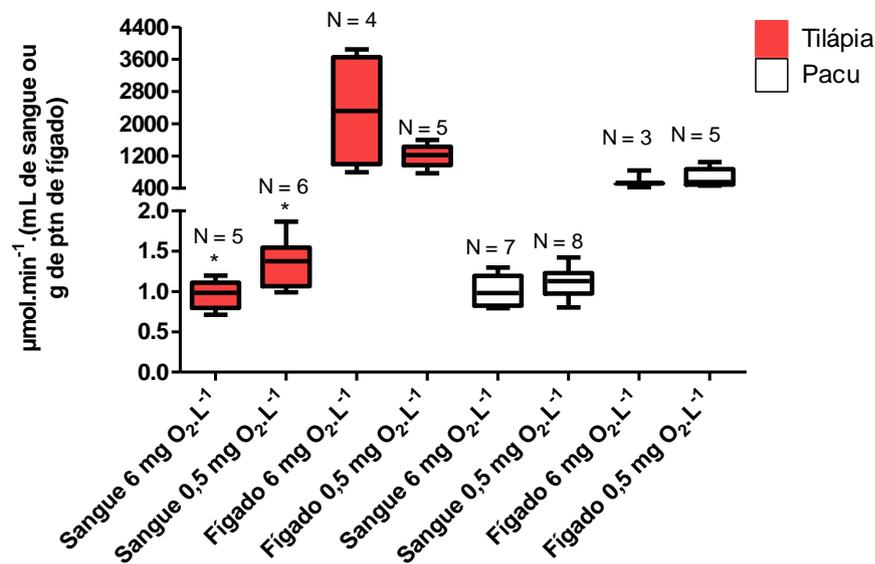


Legenda: Concentrações de O<sub>2</sub> - normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>); hipoxia (0,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>). Símbolos iguais indicam diferença estatística para a mesma espécie em um mesmo tecido.

Houve um aumento estatisticamente significativo ( $p = 0,0106$ ) da atividade da enzima GST do sangue de tilápia sobre o 4-HNE em condições de hipoxia. Não houve diferença de atividade de GST hepática de tilápia ( $p = 0,6911$ ). Para pacu ocorreu um decréscimo significativo tanto da atividade sanguínea de GST ( $p = 0,0387$ ) quanto da atividade hepática ( $p < 0,0001$ ) de animais em hipoxia.

A atividade sanguínea de GST sobre o substrato CDNB de animais submetidos à normoxia e hipoxia é apresentada no gráfico 11.

Gráfico 11 - Atividade de GST sobre o substrato CDNB em fígado e sangue de animais submetidos à normoxia e 42 horas de hipoxia

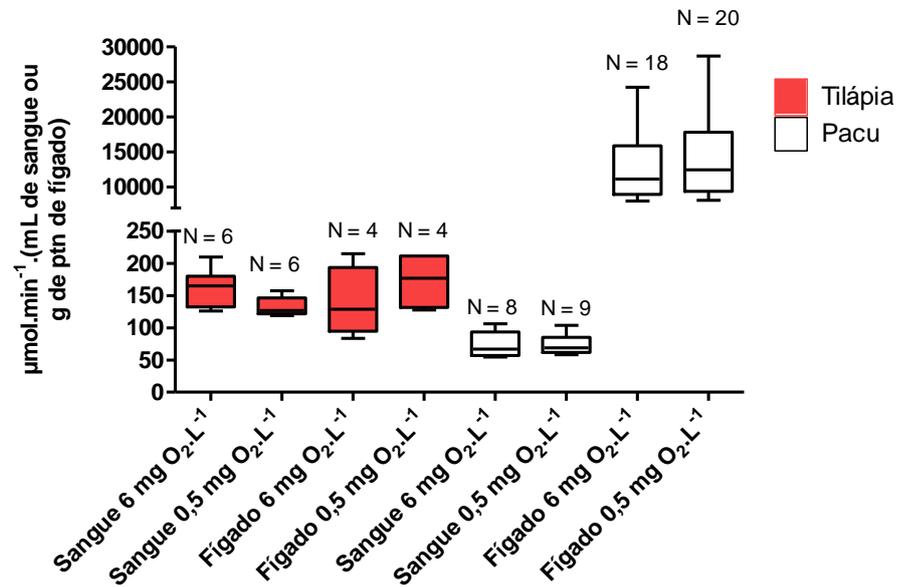


Legenda: Concentrações de O<sub>2</sub> - normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>); hipoxia (0,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>). Símbolos iguais indicam diferença estatística para a mesma espécie em um mesmo tecido.

Foi constatado um aumento significativo de atividade sanguínea de GST de tilápia ( $p = 0,0316$ ) durante o período de hipoxia quando comparado à normoxia. A atividade de GST hepática de tilápia não apresentou diferença ( $p = 0,1167$ ). Não houve diferença significativa tanto da atividade sanguínea de GST ( $p = 0,4012$ ) quanto da atividade hepática ( $p = 0,7177$ ) de pacus em hipoxia.

O gráfico 12 ilustra a atividade de GPX sanguínea de animais submetidos a condições de normoxia e hipoxia.

Gráfico 12 - Atividade de GPX em fígado e sangue de animais submetidos à normoxia e 42 horas de hipoxia

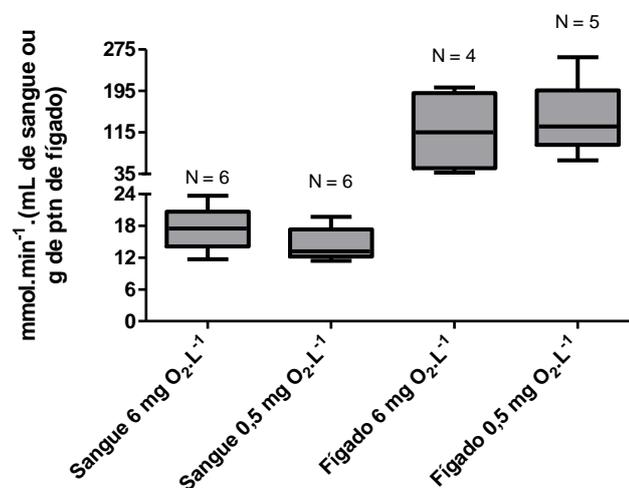


Legenda: Concentrações de  $\text{O}_2$  - (6 mg  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ); hipoxia (0,5 mg  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Nas condições testadas não foram observadas diferenças significativas na atividade de GPX para tilápia, tanto em sangue ( $p = 0,0558$ ), quanto em fígado ( $p = 0,3689$ ). A atividade de pacu também não apresentou diferenças, quer ensaiada no sangue ( $p = 0,9134$ ), quer no fígado ( $p = 0,4524$ ).

O gráfico 13 demonstra a atividade de catalase de tilápias em normoxia e hipoxia.

Gráfico 13 - Atividade sanguínea de catalase de tilápias submetidas à normoxia e 42 horas de hipoxia



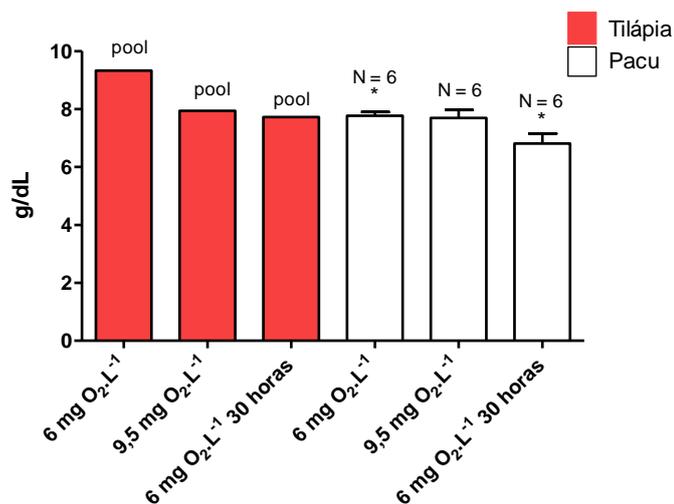
Legenda: Concentrações de  $\text{O}_2$  - normoxia (6 mg  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ); hipoxia (0,5 mg  $\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ ).

Não houve variação significativa da atividade de catalase de tilápias tanto em sangue ( $p = 0,1735$ ) quanto em fígado ( $p = 0,6589$ ) nas condições estudadas. A atividade de catalase do sangue de pacus revelou-se muito baixa ou inexistente, o que impediu seu ensaio.

#### 4.7. Ensaios em hiperoxia

São observadas no gráfico 14 as concentrações de hemoglobina de animais expostos à normoxia e hiperoxia.

Gráfico 14 - Concentração de hemoglobina em sangue de animais submetidos à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia

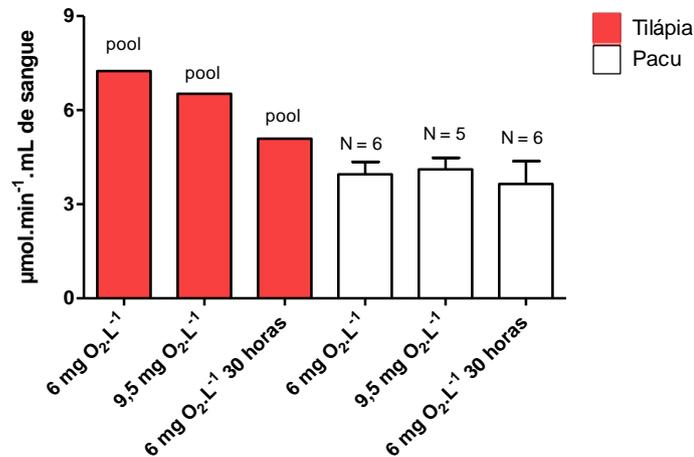


Legenda: Concentrações O<sub>2</sub> - normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), 6 horas de hiperoxia (9,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) e 30 horas de normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> 30 horas) após a hiperoxia. A atividade enzimática de tilápias foi ensaiada em “pool” de 15 animais para avaliação do maior número possível de animais. Símbolos iguais indicam diferença estatística entre os tratamentos.

Verifica-se, neste gráfico, uma redução da concentração de hemoglobina de tilápias de 15% em hiperoxia e 17% em normoxia 30 horas após a hiperoxia quando comparadas com os valores de iniciais de normoxia. Para pacus verificou-se uma queda significativa da concentração de hemoglobina em relação à normoxia nos animais avaliados em normoxia 30 horas após a hiperoxia ( $p = 0,0251$ ).

O gráfico 15 apresenta a variação da atividade de GST sanguínea sobre o substrato 4-HNE em animais sob normoxia e hiperoxia.

Gráfico 15 - Atividade de GST sobre o 4-HNE em sangue de animais submetidos à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia

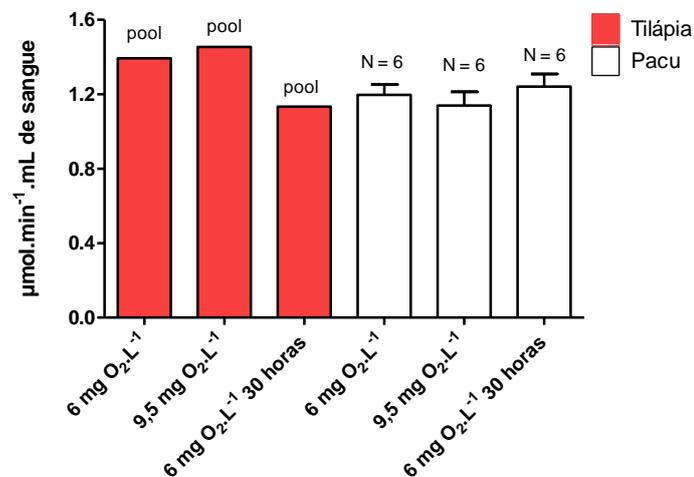


Legenda: Concentração de O<sub>2</sub> - normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), 6 horas de hiperoxia (9,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) e 30 horas de normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> 30 horas) após a hiperoxia. Outras informações conforme legenda do gráfico 14.

Observa-se no gráfico uma redução, em relação aos controles, da atividade sanguínea de GST em tilápias de 10% em hiperoxia e 29,76% em normoxia por 30 horas. Não houve diferença estatística da atividade de GST de pacus nas condições avaliadas.

A atividade sanguínea de GST sobre o substrato CDNB de animais submetidos à normoxia e hiperoxia é apresentada no gráfico 16.

Gráfico 16 - Atividade de GST sobre o CDNB em sangue de animais submetidos à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia

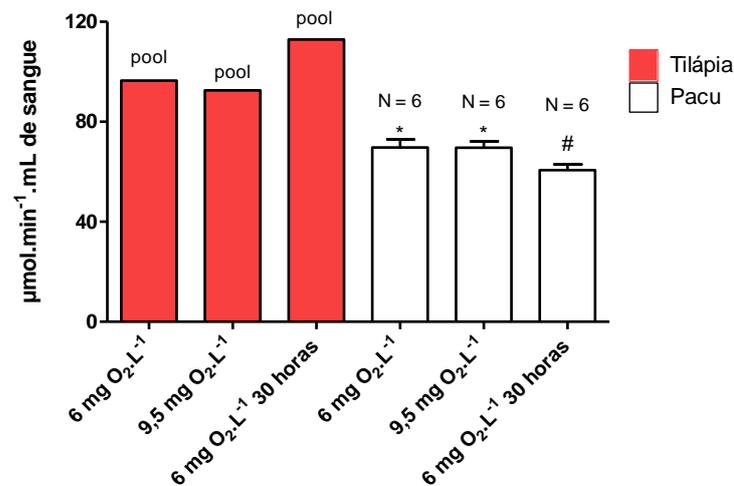


Legenda: Concentração de O<sub>2</sub> - normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), 6 horas de hiperoxia (9,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) e 30 horas de normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> 30 horas) após a hiperoxia. Outras informações conforme legenda do gráfico 14.

Houve uma redução de 18,66% da atividade sanguínea de GST de tilápia do grupo normoxia 30 horas quando comparado com os controles. Não foram observadas diferenças das atividades sanguíneas de pacus.

O gráfico 17 ilustra a atividade de GPX sanguínea de animais submetidos a condições de normoxia e hiperoxia.

Gráfico 17 - Atividade de GPX em sangue de animais submetidos à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia

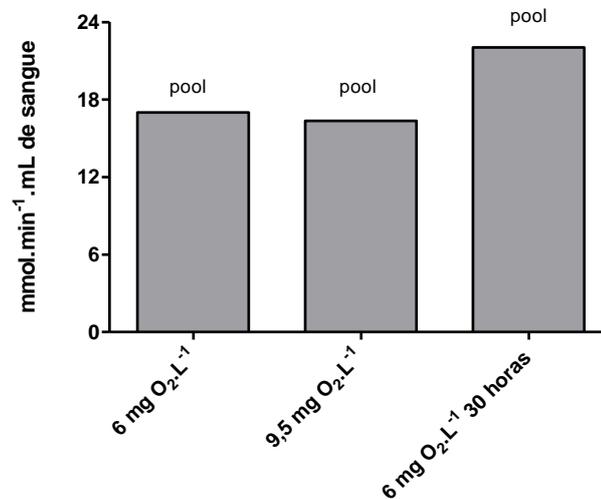


Legenda: Concentrações de O<sub>2</sub> - normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), 6 horas de hiperoxia (9,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) e 30 horas de normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> 30 horas). A atividade enzimática de tilápias foi ensaiada em “pool” de 15 animais para avaliação do maior número possível de animais. Símbolos diferentes indicam diferença estatística em uma mesma espécie.

Foi observado um aumento de 17,11% na atividade de GPX sanguínea de tilápias 30 horas após a exposição à hiperoxia. Em pacus foi constatada uma queda de atividade de GPX significativa 30 horas após a exposição em relação à normoxia ( $p = 0,0457$ ) e a hiperoxia (0,0221).

O gráfico 18 demonstra a atividade de catalase de tilápias em condições de normoxia e hiperoxia.

Gráfico 18 - Atividade sanguínea de catalase de tilápias submetidas à normoxia, 6 horas de hiperoxia e 30 horas de normoxia após a hiperoxia



Legenda: Concentrações de O<sub>2</sub> - normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>), 6 horas de hiperoxia (9,5 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>) e 30 horas de normoxia (6 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup> 30 horas). Outras informações conforme legenda do gráfico 14.

Verificou-se um aumento de 29,7% da atividade de catalase de tilápias em recuperação 30 horas após a exposição à hiperoxia.

#### 4.8 Purificação da enzima GST de sangue de tilápia

A tabela 1 apresenta o rendimento obtido com o método de purificação de GST de sangue.

Tabela 1 - Resultados obtidos nas diferentes etapas do processo de purificação da enzima GST de sangue de tilápia

Fração	Ptn. (mg/ml)	atividade (unid./mg.ptn.)	Unidades totais	Fator	Rendimento (%)
Amostra Total	85,55	0,258	22,06	1	100
Não Ligado	78,82	0,010	0,78	0,04	3,52
Inespecífica 1	6,94	0,046	0,32	0,18	1,45
Inespecífica 2	0,84	0,127	0,11	0,49	0,48
Amostra purificada	0,14	64,636	9,19	250,65	41,67

Legenda: Amostra de “pool” de sangue de tilápia (n = 5). Fração não ligada: Sobrenadante coletado após a incubação da amostra com a partícula MagneGST<sup>TM</sup>. Fração inespecífica: Sobrenadante coletado após a lavagem da partícula com o tampão de lavagem. Foi feito um total de duas lavagens.

Foi obtido um rendimento final de 41,67%, com uma purificação de 250 vezes, o que é considerado satisfatório. A redução da atividade pode ser atribuída à uma inativação da enzima durante o processo de purificação. Para o ensaio foi usada uma quantidade de amostra que não à redução de mais de 5% da velocidade inicial durante o período do ensaio

A tabela 2 apresenta os valores de  $K_M$  e  $V_{max}$  obtidos da enzima GST purificada de sangue de tilápia em diferentes concentrações de substrato.

Tabela 2 - Valores cinéticos de GST purificada de sangue de tilápia

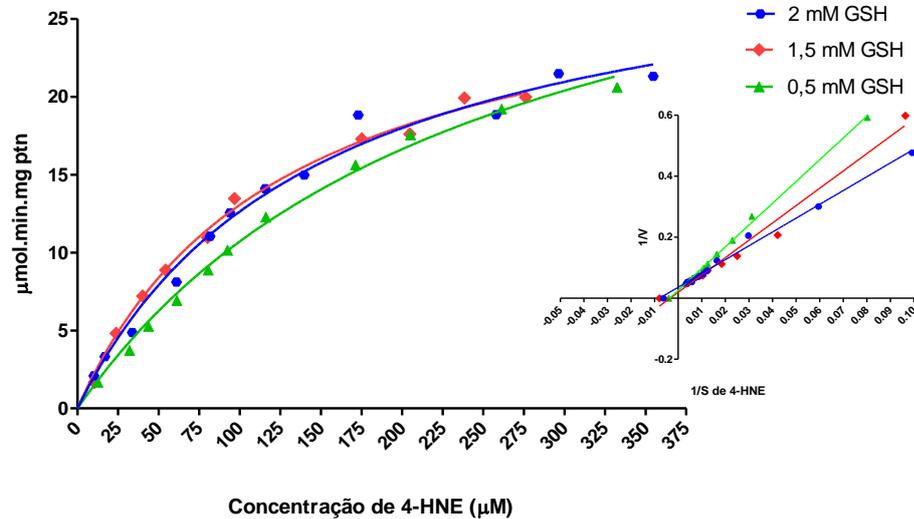
Substrato variado	Concentração fixa de:	$K_M$ (mM)	$V_{max}$ (unid.mg.ptn <sup>-1</sup> )
4-HNE	0,5 mM GSH	0,2471	37,19
	1,5 mM GSH	0,1254	29,44
	2 mM GSH	0,1473	31,24
GSH	20 $\mu$ M 4-HNE	0,5	5,79
	40 $\mu$ M 4-HNE	0,9394	18,69
	100 $\mu$ M 4-HNE	0,4061	19,96

Legenda: Foram variadas as concentrações de um substrato (representado pela sigla correspondente) e fixando-se a concentrações do segundo substrato (representado pelas concentrações fixas). Amostra de “pool” de sangue de tilápia (n = 5).

Observou-se um aumento do valor de  $K_M$  na curva de 4-HNE, em concentração fixa de 0,5 mM de GSH, não sendo verificada variação nas demais concentrações. Para a curva de GSH foi constatado um aumento do valor de  $K_M$  na concentração fixa de 40  $\mu$ M de 4-HNE e uma redução de  $V_{max}$  na concentração fixa de 20  $\mu$ M de 4-HNE.

O gráfico 19 apresenta os resultados encontrados para a curva de concentrações crescentes de 4-HNE em diferentes concentrações fixas de GSH.

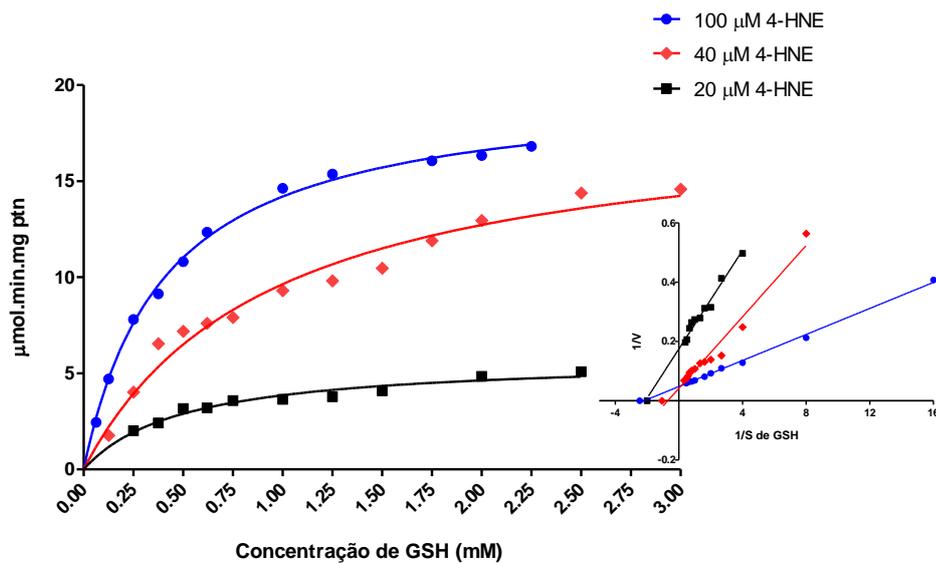
Gráfico 19 - Curva de atividade de GST purificada de sangue de tilápia na conjugação de concentrações finais fixas de GSH à diferentes concentrações finais de 4-HNE



Legenda: Concentrações finais fixas de GSH: 0,5 mM, 1,5 mM e 2 mM.

O gráfico 20 apresenta os resultados encontrados para a curva de concentrações crescentes de GSH em diferentes concentrações fixas de 4-HNE.

Gráfico 20 - Curva de atividade de GST purificada de sangue de tilápia na conjugação de concentrações finais fixas de 4-HNE à diferentes concentrações finais de GSH



Legenda: Concentrações finais fixas de 4-HNE: 20 µM, 40 µM e 100 µM.

Os gráficos de duplo recíproco apresentaram valores de  $V_{max}$  similares, com exceção da curva de 20 µM de 4-HNE, cujo valor de  $V_{max}$  apresentou uma redução.

## 5 DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos que utiliza a canulação para tomada de amostras realiza tal técnica através da inserção de uma cânula na artéria dorsal, que se forma após a confluência dos vasos eferentes das brânquias (figura 17). Tais trabalhos geralmente baseiam-se em modificações do método estabelecido por Soivio, Nynolm e Westman, (1975). A preferência por esta via deve-se ao grande calibre da artéria dorsal, o que evita sua oclusão, e por sua capacidade de suportar a presença da cânula. Além disto, a anatomia dos animais utilizados nesses trabalhos é amplamente estudada e a localização da artéria é bem conhecida e de fácil acesso pela boca, fazendo desta a via preferencial para a canulação. Entretanto, mesmo que tal técnica pudesse ser aplicada em tilápias, é desejável, para comparação dos resultados, que ambas as espécies sejam canuladas pela mesma via. Em nossa experiência o acesso à artéria dorsal do pacu só poderia ser feito em uma região muito interna na boca, o que poderia gerar grande estresse ao animal, além da possibilidade de injúria a tecidos e órgãos vitais. Fizemos tentativas de canulação na artéria dorsal do pacu pela boca, mas elas resultaram em morte dos animais.

Existem outras vias descritas como adequadas para inserção de uma cânula. Alguns trabalhos realizam a técnica de canulação da artéria dorsal através de sua cateterização na região caudal. Allen *et al.* (2009), analisando a possibilidade da convivência em grupo influenciar o nível de estresse do esturjão *Acipenser fulvescens* utilizaram a canulação caudal para a coleta de amostras. Em nosso estudo, entretanto, as brânquias foram utilizadas como via de canulação. Tal escolha deve-se ao fato de esta ser uma estrutura onde há visibilidade dos arcos branquiais, arcabouços cartilagosos em que passam os vasos, além de ser uma abertura natural, dispensando assim a necessidade de procedimentos cirúrgicos. Além disto, embora a forma dos arcos branquiais varie, uma curvatura em meia lua em tilápias e mais fechada em pacus (SEVERI; RANTIN e FERNANDES, 2000), a anatomia interna destas estruturas não se modifica muito entre estas espécies.

Para condução do método iniciou-se a punção pelo vaso aferente (figura 17 e 23) do quarto arco branquial, mais profundo e com menor mobilidade. Ocorrendo uma falha passamos para arcos mais superficiais, evitando uma extensa injúria branquial. Houve a adaptação de diversos materiais utilizados no cateterismo humano (figuras 16, 19 e 22), além de outros, durante o processo de padronização da técnica. Após várias tentativas, modificações de materiais e de métodos, concluímos que a utilização do tubo de silicone para

ligação entre o cateter e a sonda nasogástrica proporcionou os resultados mais satisfatórios dentre os métodos testados (figura 21). Isto tornou possível a inserção da agulha na cânula diversas vezes sem o comprometimento da vedação. Além disto, caso fosse necessário, o trecho do tubo de silicone podia ser facilmente substituído, evitando a perda da cânula ou a necessidade de produção de um novo molde de silicone. A sutura antecipada do aparato também se revelou importante evitando a sua manipulação após a inserção da cânula o que resultou em aumento do sucesso do cateterismo. Outro ponto importante foi quanto à devolução do peixe para o tanque de recuperação. Observamos que uma grande agitação por parte do animal durante este processo resultava na perda do acesso. Assim adaptamos nossa mesa de cirurgia transferindo o animal ainda na mesa para o tanque. A menor manipulação do peixe resultou em uma transferência rápida e calma, minimizando o estresse, o que aumentou o percentual de êxito de animais canulados. O fato de que após sete horas ainda era observado fluxo sanguíneo na cânula em ambas as espécies, mesmo com tais artefatos adaptados, comprova a viabilidade desta técnica. A coagulação ocorrida após vinte e quatro horas pode ser devida ao tipo de cânula utilizada. O diâmetro deste material ocupava a totalidade da luz do vaso aferente gerando desta forma um acesso oclusivo. Aliando este fato ao curto comprimento da cânula, o que provocou o término da inserção em um ponto antes da ramificação da artéria ventral nos vasos eferentes branquiais (figura 17), houve a ocorrência de uma estase sanguínea no vaso aferente, o que pode ter deflagrado o processo de coagulação e conseqüentemente a trombose. Obtivemos uma cânula mais adequada com menor diâmetro e maior comprimento, contudo não encontramos uma agulha com calibre ideal, longa e resistente para o procedimento, o que impediu o teste com esta cânula.

Dificuldades similares foram relatadas por Heeswijk, Vianen e Thillart, (2005) ao comparar a canulação pela via branquial e pela via dorsal. Segundo os autores, embora seja possível a utilização dos vasos branquiais eferentes para canulação, a artéria dorsal é a via com maior percentual de sucesso. Em nossa busca bibliográfica não foi encontrado outro trabalho comparando estas ou outras vias de canulação. Entretanto, a canulação pela via dorsal não parece uma opção viável para o pacu. Deve ser considerado, contudo, que durante o estabelecimento da técnica o material utilizado de que dispúnhamos não havia sido projetado para este fim, o que exigiu repetidas tentativas e adaptações para que a canulação fosse alcançada. É possível que a utilização de materiais mais apropriados tivesse como resultado um maior percentual de sucesso, eliminando os óbices com os quais fomos confrontados.

Ressalta-se, todavia, que apesar das diversas tentativas de canulação branquial, algumas vezes repetidamente no mesmo animal, não foram observadas mortes. Acrescente-se, ainda, que os animais testados alcançavam recuperação em aproximadamente vinte e quatro horas. Tais fatos evidenciam o baixo potencial invasivo da canulação por via branquial.

Tendo em vista a necessidade de obtenção de resultados e o tempo de que dispúnhamos decidimos pela condução de nossas análises através da punção caudal dos animais, deixando a técnica de canulação para posterior refino e conclusão.

Para o ensaio das enzimas presentes no interior dos eritrócitos foi estudada a melhor forma de hemólise. A obtenção da lise dos eritrócitos através do choque osmótico com água deflagrou um processo de gelificação do plasma sanguíneo. Este deve ser um fenômeno importante no processo de coagulação e manutenção da hemostasia de teleósteos, ao impedir, no habitat aquático, a instalação de um quadro hemorrágico, além de aperfeiçoar o processo de coagulação. A gelificação do plasma é descrita em alguns trabalhos analisados na revisão de Tavares-Dias e Oliveira (2009). Nesta revisão são relatados estudos que evidenciam similaridades entre os fatores e processos de coagulação de mamíferos e peixes, mas aponta que tais mecanismos em teleósteos ainda não são totalmente compreendidos. Observamos que após algum tempo o sangue retornou a uma forma fluida e foi possível a sua centrifugação.

Na literatura há a descrição de alguns protocolos de hemólise para peixes. Souza, Poy e Rodriguez (2004) em seu trabalho estabeleceram um protocolo para obtenção da hemólise em amostras sanguíneas do híbrido tambacu, tambaqui (*C. macropomum*) e pacu (*P. mesopotamicus*). Brix, Foras e Strand (1998) avaliando as variações da concentração de hemoglobina de uma espécie de bacalhau também estabeleceram um protocolo para lise de eritrócitos. O uso de ambas as soluções tampões descritas nos trabalhos para obtenção da hemólise também acarretou uma gelificação das amostras. Contudo, após o período de incubação as amostras retornaram à forma fluida e os ensaios puderam então ser realizados.

Os dados apresentados no gráfico 1, avaliando a atividade da GST sanguínea sobre o 4-HNE, demonstram que dentre as formas de lise testadas a água e a solução tampão descrita por Brix, Foras e Strand (1998) são as que obtém os resultados mais satisfatórios, não havendo diferença significativa entre elas. Não obstante a utilização no estudo de Souza, Poy e Rodriguez (2004) de espécies filogeneticamente próximas às utilizadas neste trabalho, os resultados obtidos por esta lise foram significativamente mais baixos em relação às outras duas formas testadas. Assim optamos por realizar a hemólise através da água evitando a exposição do citosol a um pH alcalino. Devemos salientar que em um estudo anterior

verificamos como melhor velocidade de centrifugação do hemolisado uma velocidade de 12.000 x g.

Era preciso garantir que os ensaios enzimáticos fossem conduzidos em velocidade inicial máxima de reação. Assim padronizou-se a concentração de proteínas e substrato que deveriam ser usadas nos ensaios das atividades de forma que mudança na velocidade da reação pudesse ser explicada por uma correspondente alteração da concentração de enzima ativa nas amostras de tecido. Decidimos que o primeiro ensaio enzimático a ser padronizado deveria ser a conjugação da GSH ao 4-HNE catalisada pela GST. Tal escolha deu-se em virtude de este ser um ensaio complicado pela inibição da enzima por sua ligação ao conjugado formado e pela alta atividade de conjugação espontânea, sem a participação da enzima. Destaca-se ainda que a maioria dos trabalhos realiza este tipo de ensaio por cromatografia e que existem poucos estudos que conduzam ensaios cinéticos por espectrofotometria.

É sabido que a atividade da enzima GST sobre o substrato 4-HNE é inibida pelo conjugado GS-HNE formado. Ålin, Danielson e Mannervik (1985) publicaram que 5 µM de conjugado já pode inibir 50% da atividade enzimática de GST. Shireman *et al.* (2010) observaram que o 4-HNE também combina com a GST e atua como um inibidor enzimático de isoenzimas da classe alfa, classe principal para conjugação do 4-HNE. Lesgards *et al.* (2011) ao avaliar o efeito de ERO e metabólitos da lipoperoxidação sobre uma linhagem celular observaram que uma incubação prévia de quatro horas com 100 µM de 4-HNE inibia a atividade em 56% de GST e 50 % de GPX, sendo esta inibição maior em concentrações mais altas de 4-HNE. Assim quanto maior a formação de produto e/ou a concentração de substrato maior a inibição da conjugação do 4-HNE ao GSH pela GST.

No ensaio de GST sobre o substrato 4-HNE grandes concentrações de proteínas nas amostras favoreceram a formação de grandes quantidades de produto que provocaram inibição da enzima. Ainda, uma alta concentração de amostra resultou em maior absorção da luz emitida pelo espectrofotômetro, gerando altos valores de densidade ótica (DO) iniciais, o que diminuiu a sensibilidade da medida do desaparecimento do 4-HNE. Tais fatos são também mencionados no trabalho de Ålin, Danielson e Mannervik (1985) ao afirmarem que na presença de grandes concentrações de amostra as velocidades máximas observadas não são proporcionais aos volumes de amostra utilizados.

Aqui, no gráfico 2, observa-se que as atividades foram proporcionais aos volumes de amostra utilizados. Assim decidimos que o volume ideal de amostra neste ensaio para as duas

espécies é 0,1 µL de sangue hemolisado (10 µL de hemolisado diluído 100 vezes), apresentando resultados lineares e pouca absorção de luz inicial.

O efeito da concentração do substrato GSH sobre a atividade da GST na conjugação do 4-HNE é visualizado no gráfico 3. Os dados apresentados demonstram a obtenção de um platô após o GSH atingir a concentração final de 1,5 mM para tilápia e 1 mM para pacu. Concentrações superiores a 3,0 mM para tilápia e 2,5 mM para pacu causaram uma queda na atividade enzimática. Tal queda pode ser explicada porque maiores concentrações de GSH levam a uma maior formação do conjugado GS-HNE, tanto de forma espontânea como enzimática, o que favorece uma maior inibição da enzima.

Com a exclusão das concentrações correspondentes a queda da atividade observou-se que, para tilápia, a análise através da regressão não linear alostérica apresentou um  $R^2 = 0,9947$  similar a análise através da regressão michaeliana ( $R^2 = 0,9929$ ). Tal resultado também foi encontrado nas análises conduzidas para pacu em que a regressão alostérica obteve  $R^2 = 0,9626$  e regressão michaeliana  $R^2 = 0,9599$ . A estrutura dimérica da maioria das isoformas das GST poderia sugerir um mecanismo alostérico de ligação dos substratos já que cada monômero apresenta dois sítios catalíticos: um para a GSH e outro para o substrato eletrofílico.

Entretanto, alguns trabalhos relatam a inexistência de tal cooperatividade entre as subunidades de GST. Danielson e Mannervik (1985) avaliando a cinética das subunidades de GST citosólica de fígado de ratos concluíram que independentemente do grau de saturação com GSH ou com o segundo substrato eletrofílico, a atividade enzimática das subunidades são cineticamente independentes. Segundo os autores o desvio da curva de substrato do modelo de Michaelis-Menten deve-se a um mecanismo de memória. Em tal mecanismo ocorreria uma demora na mudança da conformação espacial da enzima após a liberação do substrato. Entretanto, Ivanetich, Goold e Sikakana (1990) refutam a hipótese da memória e concluem que tal desvio ocorre em virtude de um mecanismo cinético desordenado Bi-Bi na ausência de produtos. Ressalte-se que tais estudos cinéticos são geralmente conduzidos utilizando-se CDNB como substrato eletrofílico e não o 4-HNE, cujo conjugado, como já explanado anteriormente, leva a inibição da enzima, o que pode comprometer a avaliação cinética.

A análise dos dados através da regressão não linear de Michaelis-Menten, excluindo-se os pontos de queda de atividade, gerou uma  $K_M$  aparente de aproximadamente 0,30 mM para a GSH para tilápia. Para pacu obteve-se um valor de  $K_M$  aparente de 0,15 mM. O uso de uma concentração 10 vezes superior a  $K_M$  para obtenção da velocidade máxima obrigaria a

utilização de uma concentração de 3 mM para a tilápia. Nesta concentração há um alto valor de DO inicial e o seu decaimento nem sempre é linear. Desta forma, foi escolhida 2 mM como concentração ideal de GSH neste ensaio para ambas as espécies em virtude desta concentração localizar-se no platô.

A análise da atividade da GST em diferentes concentrações de 4-HNE é representada no gráfico 4. Pela análise do gráfico verifica-se um crescente aumento da atividade até a concentração de 100  $\mu\text{M}$  para tilápia e 50  $\mu\text{M}$  para pacu, a partir da qual há a formação de um platô. A utilização de concentrações de substrato maiores do que 150  $\mu\text{M}$  para a tilápia e 100  $\mu\text{M}$  para pacu tem como resultado uma discreta inibição da atividade enzimática. Tal inibição possivelmente ocorre, como já explanado, em razão do acúmulo do conjugado. A análise por regressão não linear, com a exclusão dos pontos em que há redução de atividade, apresentou valores da  $K_M$  aparentes para o 4-HNE semelhantes em ambas as espécies (41,65  $\mu\text{M}$  para tilápia e 44,21  $\mu\text{M}$  para pacu). Com base neste achado passamos a ensaiar a atividade da GST com 100  $\mu\text{M}$  de 4-HNE que, mesmo não correspondendo a 10 vezes o valor de  $K_M$ , garante baixa influência de inibição por excesso de produto e utilização de menos que 10% dos substratos durante o tempo de reação de 3 minutos.

Ressaltamos que durante os ensaios de padronização da concentração ótima de 4-HNE nos confrontamos com uma dificuldade que deve ser observada. Este substrato é vendido comercialmente como uma solução em etanol. Entretanto ao longo do tempo há a evaporação do solvente, concentrando o soluto, no caso, o 4-HNE. Desta forma as análises apresentavam-se pouco lineares acarretando em atraso na obtenção dos resultados. Este viés foi contornado através da aplicação da lei de Lambert-Beer no preparo deste reagente no início de cada análise, garantido a concentração correta do 4-HNE nos ensaios.

Observou-se que uma alta concentração de proteína no ensaio da atividade de GST sobre o substrato CDNB resultava em um ensaio pouco linear com elevado valor de DO inicial, diminuindo a sensibilidade do espectrofotômetro. Em nossos estudos observamos uma linearidade do ensaio até volumes de 13  $\mu\text{L}$  de sangue hemolisado (52  $\mu\text{L}$  de hemolisado diluído 4 vezes), como pode ser constatado no gráfico 5. Decidimos pela utilização das menores concentrações de proteína por apresentarem os resultados mais reprodutíveis. Assim optamos por 1,25  $\mu\text{L}$  de sangue hemolisado (10  $\mu\text{L}$  de hemolisado diluídos 8 vezes) para a condução dos ensaios. Isto garantiu linearidade nos ensaios e baixa absorção de luz inicial.

A variação da concentração de GSH para tilápia obteve resultados similares tanto para a análise michaeliana ( $R^2 = 0,9928$ ) quanto para a análise alostérica ( $R^2 = 0,9930$ ). O mesmo

foi encontrado para pacu (michaeliana  $R^2 = 0,9959$  e alostérica  $R^2 = 0,9979$ ). Embora existam explicações, como já foi explanado, sobre o desvio da cinética michaeliana, por avaliação considerando a cinética de Michaelis-Menten (gráfico 6) obtivemos para tilápia um valor de  $K_M$  de 0,51 mM e para o pacu 0,20 mM. Contudo, em tilápia, constata-se a formação de um platô a partir da concentração de 2 mM de GSH. MacManus *et al.* (2011) obtêm em seu trabalho um  $K_M$  de 0,23 mM para o GSH, valor similar ao obtido por Habig, Pabst e Jacoby (1974) para a maioria das isoenzimas de GST estudadas em seu trabalho. Optou-se então pela condução dos ensaios com uma concentração final de 2 mM de GSH obtendo-se assim uma maior linearidade e o menor valor de DO inicial que ainda permitisse detectar seu decréscimo. O menor valor de  $K_M$  da GST de pacu para GSH demonstra uma maior afinidade desta enzima por este substrato quando comparado com a GST de tilápia, o que pode significar uma maior adaptação do pacu para a metabolização e desintoxicação de compostos tóxicos, entre eles o 4-HNE.

A influência da concentração de CDNB sobre a atividade da GST é visualizada no gráfico 7. Esta avaliação parece indicar uma menor afinidade desta enzima pelo substrato CDNB. Entretanto, pode-se ver uma maior influência deste substrato na atividade enzimática com o platô sendo alcançado somente a partir da concentração de 3 mM. Em ambas as espécies a análise alostérica apresentou um  $R^2$  mais elevado (0,9962 tilápia; 0,9986 pacu) que a análise michaeliana ( $R^2 = 0,9879$  tilápia; 0,9921 pacu). O valor de  $K_M$  obtido foi de 2,29 mM para tilápia e de 4,92 mM para pacu. Não foi possível a utilização de concentrações de substrato acima de 4 mM, ocorrendo uma turvação do meio reacional e precipitação do substrato, o que prejudicava a reação e atrapalhava o ensaio. Isto ocorre porque o CDNB é pouco solúvel em soluções aquosas, tendo maior solubilidade em etanol. Mesmo a avaliação da concentração de 4 mM apresentou pouca linearidade, sendo necessárias várias repetições. Habig, Pabst e Jacoby (1974) citam este fato em seu trabalho, em que muitas análises foram conduzidas com concentrações de substratos no valor de  $K_M$  por razões de solubilidade ou de altos valores de DO inicial. Assim foi escolhida a concentração de 3 mM de CDNB a ser utilizada em ambas as espécies por ser a maior concentração com ausência de turbidez e maior linearidade.

A atividade catalítica de GPX sobre uma concentração fixa de peróxido de hidrogênio (350  $\mu$ M) em crescentes concentrações do substrato GSH é visualizada no gráfico 8. Como pode ser observado o padrão da curva obtido é sigmoidal para ambas as espécies (tilápia  $R^2 = 0,9924$ ; pacu  $R^2 = 0,9902$ ), o que sugere uma modulação da GSH na afinidade da enzima pelo  $H_2O_2$ . De fato, à exceção da isoforma GPX-4, as isoenzimas de GPX-1, 2 e 3 são compostas

por quatro subunidades, o que aponta para a possibilidade de uma cooperação entre as subunidades aumentando sua afinidade pelo peróxido em maiores concentrações de GSH. Ressalte-se, entretanto, que esta enzima não apresenta saturação cinética em quaisquer concentrações de GSH ou do segundo substrato. Este fato é observado na revisão levantada por Toppo *et al.* (2009). Segundo estes autores este fenômeno ocorre por causa do mecanismo cinético de catálise da GPX em que nenhuma das etapas de reações é limitante. A saturação obtida neste ensaio também pode ser explicada pelo mecanismo cinético de catálise. O grupamento selenol desta enzima reduz uma molécula de  $H_2O_2$  e este grupamento será restaurado através da oxidação da GSH (figura 11). Uma concentração fixa de  $H_2O_2$  fornecerá uma concentração fixa de grupamentos Se-OH. Assim, é necessária uma concentração ótima de GSH para que todos os grupamentos Se-OH sejam restaurados. Concentrações maiores de glutatona não encontrarão novos grupamentos para restaurar, não tendo efeito, desta forma, na velocidade da reação.

A escolha de uma concentração final de 350  $\mu M$  de  $H_2O_2$  para o início da condução do ensaio ocorreu em virtude desta concentração já ser amplamente superior às encontradas no meio intracelular de hepatócitos, que normalmente variam de 50 a 100  $\mu M$ . Assim a utilização de concentrações maiores de  $H_2O_2$  no meio reacional não refletiria o que, de fato, ocorre *in vivo*, impossibilitando uma extrapolação fisiológica dos resultados encontrados. Além disto, a exposição de ratos à isquemia e reperfusão (Aune *et al.*, 2011) revelou um pico de  $H_2O_2$  máximo de aproximadamente 350  $\mu M$  no plasma, o que mais uma vez confirma a escolha desta concentração como ideal para este tipo de análise.

No gráfico 8 podemos observar a obtenção de um platô da velocidade enzimática a partir de uma concentração final de GSH da ordem de 10 mM para tilápia e 6 mM para pacu. Valores maiores de concentração resultaram em DO inicial alta e ensaios não lineares. Assim, optamos pela adoção da concentração de 10 mM como ideal para condução dos ensaios.

Para condução dos ensaios em diferentes concentrações de oxigênio tentamos realizar a marcação dos animais. Isto tornaria possível a identificação do animal antes e depois do tratamento possibilitando uma análise estatística pareada. Entretanto após diversas tentativas verificamos que as marcações eram removidas pelos próprios animais ou no seu manuseio ao serem retirados do aquário. Assim optamos pela condução dos ensaios avaliando o mesmo grupo de animais antes e depois, analisando os dados através de testes estatísticos não pareados. Isto tornou a avaliação dos nossos dados mais conservadora o que, por vezes, pode ter impedido a detecção de diferenças estatísticas.

Ao observarmos o comportamento dos animais em hipoxia constatamos que houve um aumento inicial da frequência ventilatória das tilápias quando o nível de oxigênio dissolvido aproximou-se de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ . Isto é relatado por Xu *et al.* (2006) em estudo sobre o comportamento de tilápias submetidas à hipoxia. Entretanto, diferente dos resultados obtidos por estes autores, não verificamos uma elevação da posição dos animais em uma tentativa de respiração aquática superficial. Ressaltamos que em nosso trabalho as observações não foram feitas por câmeras e, assim, a presença de um observador poderia levar à imersão do animal em busca de proteção. Os pacus submetidos à hipoxia apresentaram comportamento similar, com um aparente aumento da frequência ventilatória e redução da atividade natatória. Foi observada também uma distensão dos lábios inferiores para uma maior captação de oxigênio e facilitação da respiração aerosuperficial. Todo este conjunto de comportamento já havia sido observado por nosso grupo em trabalhos anteriores com esta espécie, além de serem descritos na literatura. Leite *et al.* (2007) relataram um aumento da frequência respiratória e bradicardia em pacus submetidos à baixa concentração de oxigênio dissolvido.

Em condições de hipoxia esperava-se que a menor oferta de oxigênio resultasse em um aumento da concentração de hemoglobina. Isto é observado por Filho *et al.* (2005) que verificaram aumento significativo da hemoglobina de piapara (*Leporinus elongatus*) em hipoxia. Ressalta-se que os animais foram mantidos em condições de hipoxia pelos autores por um período de até 14 dias, tempo muito superior ao avaliado em nosso trabalho. Observamos, em nossas condições, que as concentrações de hemoglobina de tilápias em hipoxia não variaram (gráfico 9). Estes resultados encontram-se de acordo com o que é encontrado na literatura em condições similares. Sampaio *et al.* (2008), avaliando as respostas bioquímicas de pacu, não encontraram diferenças significativas na concentração de hemoglobina de animais em normoxia quando comparados com animais em hipoxia. Resultado similar também foi encontrado por Choi *et al.* (2007), não sendo observado valores elevados de hemoglobina em tilápias submetidas à hipoxia. Speers-Roesch *et al.* (2010) avaliando o metabolismo cardíaco de tilápias sob hipoxia verificaram um decréscimo gradual da concentração de hemoglobina ao longo de 8 horas sob hipoxia. A partir deste ponto até o final do período (24 horas) ocorre, então, um gradual aumento da concentração igualando-se aos valores encontrados para os animais controles ao final do experimento. Um processo de gelificação do plasma inviabilizou a dosagem de hemoglobina nas amostras de sangue de pacus sob hipoxia.

É reconhecida na literatura a existência em peixes de isoformas de hemoglobina. Opazo *et al.* (2012) avaliando algumas espécies de teleósteos verificaram a diversas isoformas

de hemoglobina. Souza e Bonilla-Rodriguez (2007) em uma extensa revisão, citam como possível explicação para a manutenção dos níveis de hemoglobina de peixes, mesmo quando em hipoxia, a existência de isoformas de hemoglobina menos sensíveis ao efeito Bohr o que possibilitaria a captação de oxigênio mesmo em pH mais ácido garantindo a oxigenação dos tecidos. É possível que a presença de tais isoformas tenha contribuído para a manutenção da concentração de hemoglobina, permitindo uma economia de energia para o animal.

Houve um aumento da atividade de GST no sangue de tilápias em hipoxia para conjugar GSH ao substrato 4-HNE (gráfico 10). Não foi possível encontrar trabalhos na literatura para uma comparação. A atividade hepática de GST de tilápias apresentou comportamento similar com uma tendência de aumento embora não tenha sido detectada diferença estatística. Como pode ser observado, há uma maior dispersão dos valores das atividades hepáticas em relação à atividade sanguínea. Esta dispersão pode dificultar os cálculos estatísticos, impedindo a obtenção de uma diferença significativa e, assim, a observação de um efeito real.

Um aumento na produção de ERO durante a hipoxia é uma explicação para a maior atividade de GST que conjuga a GSH ao 4-HNE. Isto manteria o equilíbrio e as concentrações ótimas de espécies reativas. Hoek *et al.* (1998) avaliando os efeitos da hipoxia em cardiomiócitos de embriões de aves relataram um aumento significativo de ERO durante o período de pré-condicionamento à hipoxia. Duranteau *et al.* (1998) em um trabalho similar com cardiomiócitos de aves, também relataram aumento da produção de ERO de células em hipoxia, com maiores concentrações sendo encontradas em células submetidas às menores taxas de oxigênio. Os autores concluem que as ERO atuam como sinalizadores, diminuindo a contração muscular em virtude de uma redução na produção de ATP. Houve críticas em relação aos métodos aplicados no trabalho de Duranteau *et al.* (1998). Entretanto, Guzy *et al.* (2005), em estudo com algumas linhagens celulares, demonstraram aumento na produção de ERO em células expostas à baixas concentrações de oxigênio. Esta maior concentração de espécies levaria a uma sinalização e ativação do fator de indução de hipoxia (HIF) agindo, desta forma, como um sensor, que poderia indicar aumento de isoenzimas de GST. Maiti *et al.* (2006) avaliando os efeitos de uma hipoxia hipobárica em cérebros de ratos concluíram que animais expostos apresentavam um maior nível de peroxidação lipídica. Entretanto Welker *et al.* (2012) não encontraram aumento da peroxidação lipídica em fígados de tilápias em hipoxia. Ressalta-se que os autores submeteram os animais a um período de três horas de hipoxia, muito inferior ao utilizado neste trabalho e em outros já mencionados. Por sua vez, Mustafa *et al.* (2011) avaliando os efeitos de diferentes tensões de oxigênio em carpas

verificaram um aumento significativo de quebras de DNA em eritrócitos. Os autores sugerem como razão para estas quebras um aumento na produção de ERO ou uma redução da capacidade de reparo do DNA. Outra importante explicação para este aumento da atividade de GST reside no mecanismo ou “teoria de preparação” proposta por Hermes-lima, Storey e Storey (2001) na qual ocorre em algumas espécies um aumento da defesa antioxidante durante períodos de escassez de O<sub>2</sub> capacitando o organismo para a defesa contra ERO que serão produzidas pelo aumento de O<sub>2</sub> durante o período de reperfusão.

A atividade de GST sobre o 4-HNE de pacus em hipoxia diminuiu em relação à normoxia (gráfico 10) sendo este o mesmo efeito encontrado por nosso grupo em fígado. Este resultado é diferente dos obtidos para tilápia e pode ser explicado em virtude de uma inibição da isoenzima de GST por combinação de 4-HNE em excesso com proteínas celulares (UCHIDA 1993; SCHAUR, 2003; SHIREMAN *et al.*, 2010). Sampaio *et al.* (2008), avaliando a resposta de pacus à hipoxia, não relataram diferenças nos níveis de peroxidação lipídica nos animais testados. Entretanto a atividade hepática de SOD ensaiada por estes autores (139 U.mg.ptn<sup>-1</sup>.) equivale a cerca de quatro vezes a atividade que pode ser encontrada na literatura para fígado de tilápia (Nogueira *et al.* 2011). Assim é possível que uma alta atividade de SOD evite que uma maior produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> deflagre um aumento no processo de peroxidação e, conseqüentemente, um aumento da concentração de 4-HNE. Ressalta-se também que o pacu é um animal considerado adaptado à regimes de hipoxia e uma estratégia de adaptação consiste na depressão metabólica e da síntese de proteínas. Marcon e Filho (1999) ressaltaram que a alta atividade sanguínea de SOD de tambaquis, espécie próxima ao pacu, pode ser um mecanismo adaptativo para a prevenção da formação de altas concentrações de ERO.

A atividade de GST sanguínea de tilápias sobre o substrato CDNB apresentou um aumento em animais submetidos à hipoxia (gráfico 11). Este aumento foi similar e proporcional ao aumento observado para a atividade sobre o 4-HNE (gráfico 10), sugerindo uma maior expressão enzimática frente a um estresse oxidante ou como um mecanismo de preparo como já foi explanado. Filho *et al.* (2005) trabalhando com piaparas submetidas à hipoxia não encontraram diferenças na atividade de GST sanguínea em suas condições, porém animais expostos à baixas concentrações de oxigênio revelaram aumento da atividade de GST hepática. Já Welker *et al.* (2012) não observaram variações de atividade de GST hepática de tilápias em hipoxia. Ressalta-se, outra vez, que os autores submeteram os animais à somente 3 horas de hipoxia, tempo muito inferior ao avaliado em nosso estudo. Embora nossos resultados indiquem uma tendência de queda da atividade hepática de GST de tilápias sobre o

CDNB, isto não se traduziu em uma diferença estatística (gráfico 11). Observa-se, novamente, uma grande dispersão dos dados dos animais controles. González *et al.* (2009) avaliando a cinética enzimática hepática de algumas espécies de peixes obtiveram como mediana para a atividade de GST de tilápia  $1508 \pm 70 \text{ U.mg.ptn}^{-1}$  sendo este uma das maiores atividades obtidas pelos autores entre as espécies testadas. Estes valores são menores do que os obtidos para nossos animais controles, sendo similares aos resultados encontrados em animais em hipoxia. Um período curto de aclimatização após o estresse do transporte pode ter acarretado uma maior variabilidade dos resultados.

A atividade sanguínea de GST de pacus sobre o CDB não apresentou alteração em nossas condições (gráfico 11). Este é o mesmo resultado observado por nosso grupo para a atividade de GST hepática. Luschak *et al.* (2001) trabalhando com peixe dourado, um animal reconhecido por sua tolerância à hipoxia, observaram que após oito horas de anoxia não houve variação na atividade de GST hepática. Os autores sugerem que em condições de baixa de  $\text{O}_2$  uma depressão metabólica aliada a uma atividade constitutivamente alta de antioxidantes, entre eles a GST, seja uma estratégia de defesa suficiente para resistir ao aumento das concentrações de ERO durante o período de reoxigenação.

Devemos destacar a maior atividade da enzima GST sobre o 4-HNE em relação ao CDB presentes no sangue dos animais testados. Em pacus a atividade sanguínea sobre o 4-HNE é cerca de três vezes maior e em tilápias pode chegar a um aumento de dez vezes. Tais aumentos não são verificados no fígado, um reconhecido órgão de desintoxicação metabólica. Ressaltamos que o 4-HNE, assim como o malondialdeído e outros, são moléculas endógenas formadas durante o metabolismo normal do organismo e, portanto, faz-se necessário a atuação de um mecanismo de controle de suas concentrações exercido, dentre outras formas, pela GST. Assim essa maior atividade enzimática sobre o 4-HNE indica uma maior importância desta atividade no sangue, o que sugere uma maior taxa de peroxidação lipídica neste compartimento. De fato, Chagas e Val (2006) encontraram níveis mais altos de lipoperoxidação plasmática em tambaquis sob hipoxia.

Era esperado um aumento da atividade da enzima GPX em animais submetidos à hipoxia em razão de um aumento na concentração de ERO ou um mecanismo de preparação. Porém, como pode ser observado no gráfico 12, não foram observadas diferenças de atividade nas matrizes de ambas as espécies testadas em nosso estudo Estes resultados estão de acordo com o que pode ser encontrado na literatura. Cunha Bastos *et al.* (2007) avaliando em pacus a atividade hepática de GPX ressaltam a alta atividade constitutiva desta enzima e isto pode ser observado no gráfico 12 ao compararmos a atividade hepática de GPX de tilápia com a do

pacu que se revelou, em média, 70 vezes maior. Welker *et al.* (2012) em um trabalho com tilápias, não encontraram variações na atividade de hepática de GPX. Entretanto observamos em tilápia uma tendência de queda da atividade sanguínea desta enzima o que pode ser constatado pelo valor de  $p$  próximo da significância ( $p = 0,0558$ ). É possível que um maior número de animais resultasse em diferença estatística. Em um trabalho com carpas, Lushchak *et al.* (2005a) encontraram reduções significativas da atividade de GPX de animais hipóxicos em tecidos como fígado e músculo. Os autores apontam a alta atividade de GPX em carpas e discutem a possibilidade desta redução ocorrer em virtude de uma redução do metabolismo e, conseqüentemente, da síntese de proteínas. Olsvik *et al.* (2006) em um estudo expõem bacalhaus a variações da concentração de oxigênio por até seis semanas verificaram reduções significativas da expressão de GPX em animais sob hipoxia. Os autores teorizam que esta redução ocorre, entre outras explicações, em função de uma redução da transcrição quando em hipoxia. Já Mustafa *et al.* (2011) avaliando o efeito de uma exposição crônica de carpas à hipoxia não encontraram variação nas atividades de GPX hepáticas. Entretanto foram observadas quedas significativas de até 30% nas atividades de GPX sanguíneas. Resultado similar é encontrado por Sarada *et al.* (2002) ao avaliarem ratos submetidos à hipoxia, encontrando decréscimo significativo na atividade sanguínea de GPX em animais sob hipoxia. Estes autores sugerem que uma maior produção de ERO tenha gerado maior inibição enzimática. Esta é uma possível explicação para nossos resultados, pois, como já foi mencionado, produtos da peroxidação lipídica são capazes de inibir enzimas como a GPX.

Não foram observadas diferenças significativas na atividade de catalase de tilápias quando submetidas à hipoxia (gráfico 13). Lushchak *et al.* (2005a), trabalhando com carpas, não encontraram diferenças na atividade de catalase em diversos tecidos avaliados tais como fígado, rim e músculo de animais sob hipoxia. Este é o mesmo resultado obtido por Olsvik *et al.* (2006) em que não foram observadas variação na expressão de catalase em bacalhaus sob hipoxia. Cooper *et al.* (2002) trabalhando com uma espécie de peixe estuarino (*Leiostomus xanthurus*) sob hipoxia não encontraram variações na atividade hepática de catalase. Nossos resultados indicam que a exposição à hipoxia não se traduziu em um esperado efeito de aumento na atividade da catalase de tilápias. Não foi possível o ensaio da atividade de catalase em sangue de pacu. Marcon e Filho (1999), avaliando o mecanismo antioxidante de tambaquis, *Collossoma macropomum* (Cuvier, 1816), relatam a inexistência de atividade de catalase no sangue destes animais. Os autores argumentam a existência de altos níveis de catalase hepática e uma possível excreção de peróxido pelas brânquias como um mecanismo de compensação pela ausência de catalase no sangue. Em nosso trabalho a utilização de

diferentes volumes de amostra de sangue de pacu não resultou em atividades lineares, sendo os resultados obtidos muito baixos, inviabilizando o estudo da catalase para estes animais. É possível que a atividade hepática de catalase e os altos níveis hepáticos de GPX compensem a ausência desta enzima no sangue destes animais.

Nossos resultados demonstram uma maior variabilidade das respostas enzimáticas de tilápias em relação aos pacus quando confrontadas com quadros de hipoxia. Tilápias são reconhecidas por sua tolerância a condições adversas como doenças, altas concentrações populacionais, baixos teores de oxigênio entre outros. Entretanto ressaltamos que os resultados obtidos como a redução na atividade de GST sobre o 4-HNE e a alta atividade hepática de GPX aliada à capacidade de depressão metabólica e projeção do maxilar para maior captação de oxigênio corroboram a indicação do pacu como um animal mais adaptado a regimes de hipoxia.

A análise do sangue de tilápias submetidas à hiperoxia foi conduzida em um pool de amostras. Esta escolha se deveu à grande quantidade inicial de animais que obtivemos e o desejo de avaliarmos a maior quantidade de animais possível. Contudo, era inviável conduzirmos todos os ensaios individualmente, assim, optamos por uma análise em pool do maior número de peixes disponível, no caso 15 animais, para minimizar vieses que esta escolha pudesse acarretar. Isto, entretanto, impediu a condução de testes estatísticos e os resultados foram expressos em percentuais. Ressaltamos que foram conduzidos outros ensaios em pool e os resultados encontrados foram similares aos resultados conduzidos individualmente, demonstrando um grau de confiança nos dados obtidos. Para os propósitos deste trabalho, no entanto, foram expressos apenas os resultados obtidos por análises individuais, mantendo-se esta análise em pool por se tratar do único resultado disponível para tilápias em hiperoxia.

Verificou-se uma queda das concentrações de hemoglobina nos animais submetidos à hiperoxia quando comparados à normoxia (gráfico 14). Em tilápias houve uma queda imediata das concentrações com reduções percentuais de 15% (hiperoxia) e 17,25% (normoxia 30 horas). Para pacu foi observada uma diferença na concentração apenas durante o período de normoxia, 30 horas após a hiperoxia. Este resultado é o mesmo encontrado em trutas por Jewett, Behmer e Johnson (1991). Tais resultados indicam que frente uma supersaturação há uma redução da concentração de hemoglobina, possivelmente para prevenção de uma grande oxigenação dos tecidos, o que poderia ocasionar na maior formação de ERO.

Tivemos dificuldades em encontrar trabalhos que relacionassem a exposição à hiperoxia com a atividade da enzima GST em condições próximas às avaliadas em nosso estudo. Mesmo para correlação com outras enzimas reconhecidamente atuantes em condições de supersaturação de oxigênio não foram encontrados muitos trabalhos em peixes. A maioria dos estudos avaliam parâmetros físicos e fisiológicos, como pressão de O<sub>2</sub>, pH, glicose, cortisol ou, ainda, a coexposição à hiperoxia e algum outro elemento de estudo.

Houve uma redução na atividade sanguínea de GST sobre o 4-HNE de tilápias submetidas à hiperoxia (gráfico 15). Tal redução foi mais proeminente nos animais avaliados trinta horas após o término da hiperoxia. Estas variações não foram observadas em pacus não havendo diferença na atividade sanguínea de GST nas condições testadas. Lushchak *et al.* (2005b) expondo peixes dourados (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758) verificaram reduções na atividade de GST hepática nas primeiras horas de exposição à hiperoxia. Os autores argumentam que um aumento da produção de metabólitos da peroxidação (como malondialdeído e 4-HNE) poderia acarretar tal redução da atividade de GST. De fato os autores observam uma correlação inversa entre a formação destes metabólitos e a atividade de GST. Isto é uma possível explicação para a queda de atividade em tilápia em nosso trabalho o que torna mais plausível como explicação para o aumento da atividade de GST observado em tilápias sob hipoxia (gráficos 11 e 12) a teoria da preparação proposta por Hermes-Lima, Storey e Storey (2001). Mustafa *et al.* (2011) revelaram uma significativa quebra de DNA em eritrócitos de carpas submetidas à hiperoxia. Os autores sugerem que tais quebras são possivelmente oriundas de uma maior produção de ERO devido à hiperoxia.

O padrão de atividade da GST sobre o CDNB (gráfico 16) foi similar à atividade sobre o 4-HNE (gráfico 15), não havendo diferenças na atividade de pacus, porém sendo observada uma queda de 18,66% na atividade de tilápias avaliadas 30 horas após a exposição à hiperoxia. Isto sugere um mecanismo de inibição da expressão ou das enzimas já existentes em sangue de tilápias, similar ao observado sobre as isoenzimas atuantes sobre o 4-HNE.

A atividade de GPX variou em ambas as espécies na avaliação conduzida durante a recuperação 30 horas após a exposição à hiperoxia (gráfico 17). Verificou-se em tilápias um incremento de 17,11% da atividade em relação aos controles. Este resultado pode indicar uma sinalização durante o período de hiperoxia para aumentar a expressão da enzima cuja atividade foi analisada no período de recuperação. Isto é corroborado por publicações prévias. Por exemplo, Lushchak *et al.* (2005b) verificaram aumentos na atividade de GPX de peixes dourados sob hiperoxia somente no período de recuperação. Tais aumentos, segundo os autores, foram de 81% para o fígado e 30% em rins. Já Olsvik *et al.* (2006) encontraram

maiores níveis de expressões de GPX em bacalhaus expostos por 6 semanas à hiperoxia. Em pacus, porém, houve uma queda na atividade de GPX 30 horas após a exposição à hiperoxia. Este resultado é diferente do esperado nessas condições, porém, isto também é encontrado na literatura. Mustafa *et al* (2011) verificaram uma redução de 32% da atividade hepática de GPX de carpas sob hiperoxia em comparação com os animais mantidos em normoxia. Os autores argumentam a possibilidade de uma inativação desta enzima por um excesso de formação de ERO. Devemos observar também, como já foi apontado, a alta atividade hepática de GPX de pacus o que possivelmente garantiria uma proteção destes animais quando expostos à hiperoxia, sem necessidade de que os níveis da enzima sanguínea subissem mais ainda.

A atividade sanguínea de catalase de tilápias ensaiadas no período de recuperação, 30 horas após a hiperoxia, apresentou um aumento de 29,7% (gráfico 18). Isto é esperado nestas condições em que a grande oferta de oxigênio aumente a probabilidade de formação de ERO, especialmente peróxido de hidrogênio, substrato da catalase. Lushchak *et al.* (2005b) verificaram aumento significativos na atividade de catalase em diversos tecidos (cérebro, fígado, rim) de peixe dourado. Tais incrementos foram observados no período de recuperação dos animais após a hiperoxia. Os autores argumentam que tal aumento pode ocorrer em virtude de um mecanismo de preparação para futuras exposições à hiperoxia. Já Ritola *et al.* (2002), expondo trutas à hiperoxia, verificaram aumento na atividade hepática de catalase de animais expostos por 24 horas à alta concentração de oxigênio. Os autores atribuem este aumento à maior formação de peróxido durante a hiperoxia. Desta forma é razoável concluir que tal aumento de atividade observado no sangue das tilápias durante a sua recuperação ocorreu em função de uma maior produção de peróxido de oxigênio durante o período de hiperoxia.

Tomados em conjunto, os resultados obtidos demonstram baixa variação de atividades enzimáticas de pacus quando confrontados com os resultados obtidos para tilápias. A este respeito convém destacar que os níveis de atividade da GPX do fígado de pacus são já aproximadamente 70 vezes maiores que os das tilápias. Ainda, a atividade da SOD do fígado de pacus também é descrita na literatura sendo 4 vezes maior que a das tilápias. Tais resultados podem significar que o pacu é um animal que, de fato, evoluiu para uma melhor tolerância às variações de oxigênio dissolvido, tanto em quadros de hipoxia quanto de hiperoxia.

Purificamos a GST para investigar a influência dos substratos e seu mecanismo de catálise na conjugação da GSH ao 4-HNE. Este resultado faz parte de um trabalho mais amplo

realizado em nosso laboratório avaliando a atividade desta enzima purificada em diversos tecidos. Ressalte-se que esta técnica de purificação não envolve a separação das isoformas e, assim, obtivemos um pool de isoenzimas de GST.

Podemos observar que não há grande variação no valor de  $K_M$  aparente para o 4-HNE em concentrações fixas de 1,5 mM e 2 mM de GSH (gráfico 19 e tabela 2), demonstrando saturação enzimática nestas concentrações de glutathione. Verifica-se, entretanto, um aumento do valor de  $K_M$  aparente do 4-HNE para o ensaio com 0,5 mM de GSH, indicando que esta não é uma concentração saturante de glutathione.

No gráfico 20 observamos que em concentrações fixas de 100 e 40  $\mu$ M de 4-HNE há um aumento no valor de  $K_M$  de GSH (tabela 2) indicando que a concentração de 40  $\mu$ M, com maior valor de  $K_M$ , não é saturante. A concentração de 20  $\mu$ M revelou um  $K_M$  similar ao observado em 100  $\mu$ M, porém com um valor de  $V_{max}$  muito menor (tabela 2) indicando uma limitação na eficiência da enzima. Nestes dados verificamos, ainda, uma maior influência do 4-HNE na atividade de catálise da GST em comparação ao GSH (gráfico 19).

Em uma revisão Blanchette, Feng e Singh (2007) apontam trabalhos relatando a proposição de vários mecanismos de catálise para a conjugação do 4-HNE por isoenzimas de GST, como aleatório, sequencial e pingue-pongue. Ivanetich, Goold e Sikakana (1990) propuseram um mecanismo sequencial para uma isoenzima hepática de GST de rato. Já McManus *et al.* (2011) relataram a possibilidade de um mecanismo cinético pingue-pongue para outra isoenzima hepática de camundongos. Nossos dados indicam um mecanismo cinético Bi-Bi de catálise da GST. Não conseguimos, entretanto, a identificação de um mecanismo desordenado ou ordenado. Assim, análises mais acuradas devem ser feitas sobre a cinética de interação da GSH e do 4-HNE em amostras contendo somente isoenzimas puras de GST.

## 6 CONCLUSÃO

A necessidade de alternativas para a redução do número de espécimes utilizados, com coletas de amostras nas condições mais próximas das condições fisiológicas, será sempre um objetivo a ser perseguido para qualquer estudo usando modelos animais. Também o estudo e avaliação de animais, como peixes, submetidos a um constante estresse oxidante em função de largas variações de oxigênio no habitat é vital para a preservação das espécies. Os resultados obtidos permitiram concluir que:

↳ A falta de materiais especificamente adequados para o cateterismo de peixes prejudicou sua conclusão e impossibilitou seu uso neste trabalho. Contudo, nossos resultados demonstram que a canulação branquial é uma técnica viável e que o seu desenvolvimento com materiais mais apropriados possibilitará seu uso em diversos tipos de estudo feitos com sangue.

↳ Os resultados obtidos demonstram que o sangue é uma alternativa viável à utilização do fígado, com resultados indicando variações similares em ambas as matrizes, além de não exigir a morte do animal.

↳ A variação e o maior nível de atividade de GST para conjugar o 4-HNE no sangue em comparação com conjugação de CDNB, reforçam a importância de análises desta enzima no sangue com substratos endógenos em estudos que avaliem processos oxidantes.

↳ Nossos resultados demonstram que as atividades de enzimas do sangue de tilápia variam mais quando submetidas a diferentes concentrações de oxigênio, o que não é observado em pacu.

## REFERÊNCIAS

- ADAM-VIZI, V.; CHINOPOULOS, C. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 27, n. 12, p. 639-645, out. 2006
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- ALARY, J.; GUÉRAUD, F.; CRAVEDI, J. Fate of 4-hydroxynonenal *in vivo*: disposition and metabolic pathways. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 24, p. 177-187, 2003
- ALFONSO-PRIETO, M.; BIARNÉS, X.; VIDOSSICH, P.; ROVIRA, C. The molecular mechanism of the catalase reaction. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 131, n. 33, p. 11751-11761, 2009
- ÅLIN, P.; DANIELSON, H. U.; MANNERVIK, B. 4-Hydroxyalk-2-enals are substrates for glutathione transferase. **FEBS Letters**, v. 179, n. 2, p. 267-270, jan. 1985
- ALLEN, P. J.; BARTH, C. C.; PEAKE, S. J.; ABRAHAMS, M. V.; ANDERSON, W. G. Cohesive social behaviour shortens the stress response: The effects of conspecifics on the stress response in lake sturgeon *Acipenser fulvescens*. **Journal of Fish Biology**, v. 74, p. 90-104, 2009
- AL-SHAMSI, L.; HAMZA, W.; EL-SAYED, A. Effects of food sources on growth rates and survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. **Aquatic Ecosystem Health & Management**, v. 9, n. 4, p. 447-455, 2006
- ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV, A. A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, n. 2, p. 200-214, 2005 - Translated from **Biokhimiya**, v. 70, n. 2, p. 246-264, 2005
- AUNE, S. E.; YEH, S. T.; ZELINSKI, D. P.; ANGELOS, M. G. Measurement of hydrogen peroxide and oxidant stress in a recirculating whole blood-perfused rat heart mode. **Resuscitation**, v. 82, p. 222-227, 2011
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, p. 42-47, 2004
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Santa Maria: Ed. UFSM, 2002. 212p.
- BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, v. 65, p. 1865-1874, 1999
- BICKLER, P. E.; BUCK, L. T. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes: Life with variable oxygen availability. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 69, p. 145-170, 2007

BLANCHETTE, B.; FENG, X.; SINGH, B. R. Marine glutathione S-transferases. **Marine Biotechnology**, v. 9, p. 513-542, 2007

BOON, P. J. M.; SUSANA MARINHO, H. S.; OOSTING, R.; MULDER, G. J. Glutathione conjugation of 4-Hydroxy-trans-2,3-nonenal in the rat *in vivo*, the isolated perfused liver and erythrocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 159, p. 214-223, 1999

BOYD, C. E.; TUCKER, C. S. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn, Alabama, Auburn University, 1992

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.; TRABER, M. G. Vitamin E: function and metabolism. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1145-1155, jul. 1999

BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal – manual de identificação. 2ª ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; 2007.

BRIX, O.; FORAS, E.; STRAND, I. Genetic variation and functional properties of atlantic cod hemoglobins: Introducing a modified tonometric method for studying fragile hemoglobins. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119A, n. 2, p. 575-583, 1998

CALHEIROS, D. F.; SEIDL, A. F.; FERREIRA, C. J. A. Participatory research methods in environmental science: local and scientific knowledge of a limnological phenomenon in the Pantanal wetland of Brazil. **J. Appl. Ecol.**, v. 37, p. 684-696, 2000

CATALÁ, A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyl-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. **Chem. Phys. Lipids**, v. 157, p. 1-11, 2009

CHAGAS, E. C.; VAL, A. L. Ascorbic acid reduces the effects of hypoxia on the amazon fish tambaqui. **Journal of Fish Biology**, v. 69, p. 608-612, 2006.

CHARO-KARISA, H.; KOMEN, H.; REZK, M. A.; PONZONI, R. W.; VAN ARENDONK, J. A. M.; BOVENHUIS, H. Heritability estimates and response to selection for growth of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in low-input earthen ponds. **Aquaculture**, v. 261, p. 479-486, 2006

CHIANG, W.; HSIEH, Y.; YANG, S.; LU, T.; CHU, S. Differential expression of glutathione-S-transferase isoenzymes in various types of anemia in Taiwan. **Clinica Chimica Acta**, v. 375, p. 110-114, 2007

CHOI, K.; LEHMANN, D. W.; HARMS, C. A.; LAW, J. M. Acute hypoxia-reperfusion triggers immunocompromise in Nile tilapia. **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 19, p. 128-140, 2007

- ÇIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, v. 390, p. 1-11, 2008
- COOPER, R. U.; CLOUGH, L. M.; FARWELL, M. A.; WEST, T. L. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** v. 279, p. 1-20, 2002
- CROHNS, M. Antioxidants, cytokines and markers of oxidative stress in lung cancer: associations with adverse events, response and survival. 2010, 200 f. [Dissertação de Mestrado] Medical School, University of Tampere, Tampere 2010
- CUNHA BASTOS, V. L. F.; SALLES, J. B.; VALENTE, R. H.; LEÓN, I. R.; PERALES, J.; DANTAS, R. F.; ALBANO, R. M.; BASTOS, F. F.; CUNHA BASTOS, J. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. **Biochimie**, v. 89, n. 11, p. 1332-1342, 2007
- DANIELSON, H. U.; MANNERVIK, B. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochem. J.**, v. 231, p. 263-267, 1985
- DANTAS, R. F. Glutathione peroxidase e estresse oxidante em pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). 2010, 103 f. [Tese de doutorado] Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010
- DENG, D. F.; REFSTIE, S.; HEMRE, G.-I.; CROCKER, C. E.; CHEN, H. Y.; CECH JR. J. J.; HUNG, S. S. O. A new technique of feeding, repeated sampling of blood and continuous collection of urine in white sturgeon. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 22, n. 4, p. 191-197, 2000.
- DOURADO, D. F. A. R.; FERNANDES, P. A.; MANNERVIK, B.; RAMOS, M. J. Glutathione transferase: New model for glutathione activation. **Chem. Eur. J.**, v. 14, p. 9591-9598, 2008
- DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proc. R. Soc. B.**, v. 276, p. 1737-1745, fev. 2009
- DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, v. 82, p. 47-95, 2002
- DURANTEAU, J.; CHANDEL, N. S.; KULISZ, A.; SHAO, Z.; SCHUMACKER, P. T. Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes, **The journal of biological chemistry**, v. 273, n. 19, p. 11619-11624, mai. 1998

ENGLE, M. R.; SINGH, S. P.; CZERNIK, P. J.; GADDY, D.; MONTAGUE, D. C.; CECI, J. D.; YANG, Y.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y. C.; ZIMNIAK, P. Physiological role of mGSTA4-4, a glutathione S-transferase metabolizing 4-hydroxynonenal: generation and analysis of mGsta4 null mouse. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 194, p. 296-308, 2004

FARBSTEIN, D.; KOZAK-BLICKSTEIN, A.; LEVY, A. P. Antioxidant vitamins and their use in preventing cardiovascular disease. **Molecules**, v. 15, p. 8098-8110, nov. 2010

FERREIRA, M.; AGUIAR, T.; VILARINHO, L. Cadeia respiratória mitocondrial. Aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao déficit do complexo I. **Arquivos de medicina**, v. 22, n. 2/3, p. 49-56, 2008

FILHO, D. W.; TORRES, M. A.; ZANIBONI-FILHO, E.; PEDROSA, R. C. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, p. 349-357, 2005

FISCHER, A. B. Intracellular production of oxygen-derived free radicals. **Proceedings of a book lodge symposium**, v. 27-29, p. 99-104, Abr. 1987

FRIDOVICH, I. Mitochondria: are they the seat of senescence? **Aging Cell**, v. 3, p. 13-16, 2004

FROVA, C. Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. **Biomolecular Engineering**, v. 23, p. 149-169, 2006

FURIAN, A. F. Efeito do gangliosídeo GM1 sobre a atividade da catalase em estriado, hipocampo e córtex cerebral de ratos. 2007, 101 f., [Dissertação de Mestrado] Instituto de ciências básicas da saúde, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2007

SAMPAIO, F. G.; BOIJINK, C. L.; OBA, E. T.; SANTOS, L. R. B.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 147, p. 43-51, 2008

GILLE, G.; SIGLER, K. Oxidative stress and living cells. **Folia Microbiol.**, v. 40, n. 2, p. 131-152, 1995

GIORGIO, M.; TRINEI, M.; MIGLIACCIO, E.; PELICCI, P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? **Nature**, v. 8, p. 722-728, set. 2007

GONZÁLEZ, J. F.; REIMSCHUESSEL, R.; SHAIKH, B.; KANE, A. S. Kinetics of hepatic phase I and II biotransformation reactions in eight finfish species, **Marine Environmental Research**, v. 67, p. 183-188, 2009

GOTTLIEB, R. A. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 420, p. 262-267, 2003

GUZY, R. D.; HOYOS, B.; ROBIN, E.; CHEN, H.; LIU, L.; MANSFIELD, K. D.; SIMON, M. C.; HAMMERLING, U.; SCHUMACKER, P. T. Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing, **Cell metabolism**, v. 1, p. 401-408, jun. 2005

GUZY, R. D.; SCHUMACKER, P. T. Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. **Exp. Physiol.**, v. 91, n. 5, p. 807-819, 2006

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in the mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620, 1992

HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: Their relation to human disease and environmental stress. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, sup. 10, p. 5-12, 1994

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 51-88, 2005

HEESWIJK, J. C. F. V.; VIANEN, G. J.; THILLART, G. E. E. J. M. V. D. Diel fluctuations in blood metabolites in cannulated african catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). **Animal Biol.**, v. 55, n. 2, p. 191-201, 2005

HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: Storey JM, Storey KB, editores. Cell and Molecular Responses to Stress. Amsterdam: Elsevier Press p. 263-287, 2001

HERNÁNDEZ-GARCÍA, D.; WOOD, C. D.; CASTRO-OBREGÓN, S.; COVARRUBIAS, L. Reactive oxygen species: A radical role in development? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49 p. 130-143, março 2010

HOEK, T. L. V.; BECKER, L. B.; SHAO, Z.; LI, C.; SCHUMACKER, P. T. Reactive oxygen species released from mitochondria during brief hypoxia induce preconditioning in cardiomyocytes, **The journal of biological chemistry**, v. 273, n. 29, Issue 17, p. 18092-18098, 1998

HUBATSCH, I.; RIDDERSTRÖM, M.; MANNERVIK, B. Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. **Biochem. J.**, v. 330, p. 175-179, 1998

- IVANETICH, K. M.; GOOLD, R. D.; SIKAKANA, C. N. T. Explanation of the non-hyperbolic kinetics of the glutathione s-transferases by the simplest steady-state random sequential bi bi mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 39, n. 12, p. 1999-2004, 1990
- JEWETT, M. G., BEHMER, D. J.; JOHNSON, G. H. Effects of hyperoxic rearing water on blood hemoglobin and hematocrit levels of rainbow trout. **J. aquat. Anim. Health**, v. 3, p. 153-160, 1991
- KIRKMAN, H. N.; GAETANI, G. F. Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries. **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 44-50, Jan. 2007
- KOCH, L. G.; BRITTON, S. L. Evolution, atmospheric oxygen, and complex disease. **Physiol. Genomics**, v. 30, p. 205-208, maio 2007
- LEI, X. G.; CHENG, W.; McCLUNG, J. P. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 27, p. 41-61, abr., 2007
- LEITE, C. A. C.; FLORINDO, L. H.; KALININ, A. L.; MILSOM, W. K., RANTIN, F. T. Gill chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu, *Piaractus mesopotamicus*, **J. Comp. Physiol. A.**, v. 193, p. 1001-1011, 2007
- LESGARDS, J.-F.; GAUTHIER, C.; IOVANNA, J.; VIDAL, N.; DOLLA, A.; STOCKER, P. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes **Chemico-Biological Interactions**, v. 190, p. 28-34, 2011
- LI, C.; JACKSON, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 282, p. C227-C241, 2002
- LI, J.; GAO, X.; QIAN, M.; EATON, J. W. Mitochondrial metabolism underlies hyperoxic cell damage. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 36, p. 1460-1470, 2004
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303 set./dez. 2001
- LINDAHL, S. G. E. Oxygen and life on earth. **Anesthesiology**, v. 109, n. 1, p. 7-13, jul. 2008
- LO, W. Y.; CHANG, C. F.; SONG, Y. L. Evaluation of dorsal aorta cannulation for immunological studies of grouper (*Epinephelus malabaricus*). **Fish Shellfish Immunol.**, v. 14, n. 4, p. 289-303, abr., 2003
- LOVSHIN, L. L. The colossomids. In: Nash, C. E.; Novotny, A. J.; editores. World animal science: production of aquatic animals: fishes. Amsterdam: Elsevier Science; p. 153-159, 1995
- LU, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: Current concept and controversies. **FASEB J.**, v. 13, p. 1169-1183, 1999

LU, S. C. Regulation of glutathione synthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 42-59, 2009

LUSHCHAK, V. I.; LUSHCHAK, L. P.; MOTA, A. A.; HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v. 280, p. R100-R107, 2001

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, Issue 6, p. 1319-1330, 2005 (a)

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V.; HUSAK, V. V.; LUZHNA, L. I.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, K. B. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 37, Issue 8, p. 1670-1680, 2005 (b)

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 144, p. 283-289, Jun. 2006

MAITI, P.; SINGH, S. B.; SHARMA, A. K.; MUTHURAJU, S.; BANERJEE, P. K.; ILAVAZHAGAN, G. Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. **Neurochemistry International**, n. 49, p. 709-716, 2006

MARCON, J. L.; FILHO, D. W. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Osteichthyes, Serrasalminae) from the Amazon. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 123(Pt C), p. 257-263, 1999

MARGIS, R.; DUNAND, C.; TEIXEIRA, F. K.; MARGIS-PINHEIRO, M. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. **FEBS Journal**, v. 275, p. 3959-3970, 2008

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000

MAZIK, P. M.; PLAKAS, S. M.; STEHLY, G. R. Effects of dorsal aorta cannulation on the stress response of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 12, n. 5, p. 439-444, 1994

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-6055, 1969

McMANUS, G.; COSTA, M.; CANALS, A.; COLL, M.; MANTLE, T. J. Site-directed mutagenesis of mouse glutathione transferase P1-1 unlocks masked cooperativity, introduces a novel mechanism for 'ping pong' kinetic behaviour, and provides further structural evidence for participation of a water molecule in proton abstraction from glutathione. **FEBS Journal**, v. 278, p. 273-281, 2011

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Ann. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711-760, 1983

MILLS, G. C. Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **J. Biol. Chem.**, v. 229, p. 189-197, 1957

MOES, A. P. C. Atividade de glutathione peroxidase em frações mitocondriais e microsossomais hepáticas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). 2010, 58 f. [Dissertação de mestrado] Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2010

MONAGHAN, P.; METCALFE, N. B.; TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecology Letters**, v. 12, p. 75-92, 2009

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Uso do selênio na dieta de matrinxã, *Brycon cephalus*. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 8, n. 1, p. 32-47, 2007  
 MOOKERJEE, S. A.; DIVAKARUNI, A. S.; JASTROCH, M.; BRAND, M. D. Mitochondrial uncoupling and lifespan. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, p. 463-472, abr., 2010

MORAES, R. Mecanismos associados aos efeitos adaptativos do treinamento físico sobre rim de coelho e as influências da glicose elevada: uma abordagem proteômica. 2008, 178 f., [Tese de Doutorado] Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 2008

MOUSA, M. A.; MOUSA, S. A. Immunocytochemical study on the localization and distribution of the somatolactin cells in the pituitary gland and the brain of *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, p. 197-211, 1999

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **Biochem. J.**, v. 417, p. 1-13, 2009

MUSTAFA, S. A.; AL-SUBIAI, S. N.; DAVIESS, J.; JHA, A. N. Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio* L., **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1455-1466, 2011

NAGASAKA, R.; OKAMOTO, N.; USHIO, H. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 139, p. 259-266, 2004

NEGRE-SALVAYRE, A.; COATRIEUX, C.; INGUENEAU, C.; SALVAYRE, R. Advanced lipid peroxidation end products in oxidative damage to proteins. Potential role in diseases and therapeutic prospects for the inhibitors. **Br. J. Pharmacol.**, v. 153, p. 6-20, 2008

- NOGUEIRA, L.; RODRIGUES, A. C. F.; TRÍDICO, C. P.; FOSSA, C. E.; ALMEIDA, E. A. Oxidative stress in nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and armored catfish (*Pterygoplichthys anisitsi*) exposed to diesel oil. **Environ. Monit. Assess.**, v. 180, p. 243-255, 2011
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001
- OLSVIK, P. A.; KRISTENSEN, T.; WAAGBØ, R.; TOLLEFSEN, K.-E.; ROSSELAND, B. O.; TOFTEN, H. Effects of hypo- and hyperoxia on transcription levels of five stress genes and the glutathione system in liver of Atlantic cod *Gadus morhua*. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2893-2901, 2006
- OPAZO, J. C.; BUTTS, G. T.; NERY, M. F.; STORZ, J. F.; HOFFMANN, F. G. Whole-genome duplication and the functional diversification of teleost fish hemoglobins, **Mol. Biol. Evol.**, v.30(1), p. 140-153, 2012
- PADDENBERG, R.; ISHAQ, B.; GOLDENBERG, A.; FAULHAMMER, P.; ROSE, F.; WEISSMANN, N.; BRAUN-DULLAEUS, R. C.; KUMMER, W. Essential role of complex II of the respiratory chain in hypoxia-induced ROS generation in the pulmonary vasculature. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 284, p. L710-9, 2003
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977
- POLI, G.; SCHAUR, R. J.; SIEMS, W. G.; LEONARDUZZI, G. 4-Hydroxynonenal: A membrane lipid oxidation product of medicinal interest. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 4, p. 569-631, 2008
- PONCE-MARBÁN, D.; HERNÁNDEZ, J. M.; GASCA-LEYVA, E. Simulating the economic viability of nile tilapia and australian redclaw crayfish polyculture in Yucatan, Mexico. **Aquaculture**, v. 261, p. 151-159, 2006
- PROUSEK, J. Fenton chemistry in biology and medicine. **Pure Appl. Chem.**, v. 79, n. 12, p. 2325-2338, 2007
- PUTNAM, C. D.; ARVAI, A. S.; BOURNE, Y.; TAINER, J. A. Active and inhibited human catalase structures: Ligand and NADPH binding and catalytic mechanism. **J. Mol. Biol.**, v. 296, p. 295-309, 2000
- RANTIN, F. T.; GUERRA, C. R.; KALININ, A. L.; GLASS, M. L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory fuction of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119(Pt A), p. 991-997, 1998
- RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189-207, maio 2006

- REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. **Aquat. Toxicol.**, v. 31 p. 143-164, 1995
- RITOLA, O.; LIVINGSTONE, D. R.; PETERS, L. D.; LINDSTRÖM-SEPPÄ, P. Antioxidant process are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water, **Aquaculture**, v. 210, p. 1-19, 2002
- ROBERTS, C. K.; SINDHU, K. K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sciences**, v. 84, p. 705-712, 2009
- ROCHE, H.; BOGÉ, G. Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities *in vitro* of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*. **Toxic. in Vitro**, v. 7, n. 5, p. 623-629, 1993
- RUAS, C. B.; CARVALHO, C. S.; DE ARAÚJO, H. S.; ESPÍNDOLA, E. L.; FERNANDES, M. N. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 71, n. 1, p. 86-93, set. 2008.
- RUDNEVA, I. I.; SKURATOVSKAYA, E. N.; KUZMINOVA, N. S.; KOVYRSHINA, T. B. Age composition and antioxidant enzyme activities in blood of Black Sea teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 151, p. 229-239, 2010
- SAINT-PAUL, U.; BERNARDINO, G. Behavioural and ecomorphological responses of the neotropical pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalminidae) to oxygen-deficient waters. **Exp. Biol.**, v. 48(1), p. 19-26, 1988
- SANTOS, L. R. B. Efeito da dieta suplementada com vitamina E e cobre nas respostas metabólicas e antioxidantes de matrinxã, *Brycon cephalus* (günther, 1869), frente a hipoxia. 2006, 110 f., [Dissertação de Mestrado] Centro de ciências biológicas e da saúde, Universidade de São Carlos, São Carlos, SP, 2006
- SARADA, S. K. S.; DIPTI, P.; ANJU, B.; PAULINE, T.; KAIN, A. K.; SAIRAM, M.; SHARMA, S. K.; ILAVAZHAGAN, G.; KUMAR, D.; SELVAMURTHY, W. Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 149-153, 2002
- SCHAUR, R. J. Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. **Mol. Aspects Med.**, v. 24, p. 149-159, 2003
- SEVERI, W.; RANTIN, F. T.; FERNANDES, M. N. Structural and Morphological Features of *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) Gills. **Rev. Bras. Biol.**, n. 60, v. 3, 2000, p. 493-501.

- SHIREMAN, L. M.; KRIPPS, K. A.; BALOGH, L. M.; CONNER, K. P.; WHITTINGTON, D.; ATKINS, W. M. Glutathione transferase A4-4 resists adduction by 4-hydroxynonenal. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 504, p. 182-189, 2010
- SINGAL, P. K.; LI, T.; KUMAR, D.; DANELISEN, I.; ILISKOVIC, N. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 207, p. 77-85, 2000
- SOIVIO, A.; NYNOLM, K.; WESTMAN, K. A technique for repeated sampling of the blood of individual resting fish. **J. exp. Biol.**, v. 62, n. 1, p. 207-317, ago. 1975
- SOUZA, P. C. de; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Fish hemoglobins. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, p. 769-778, 2007
- SOUZA, P. C.; POY, C. D.; RODRIGUEZ, G. O. B. Comparative analysis of the hemoglobins from tambacu, tambaqui (*C. macropomum*) and pacu (*P. mesopotamicus*). International Congress on the Biology of Fish, 2004, Manaus, Brasil, The Molecular Basis of Environmental Adaptation, 2004, 9 f.
- SPEERS-ROESCH, B.; SANDBLOM, E.; LAU, G. Y.; FARRELL, A. P.; RICHARDS, J. G. Effects of environmental hypoxia on cardiac energy metabolism and performance in tilapia. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 298, p. R104-R119, 2010
- TAVARES-DIAS, M.; OLIVEIRA, S. R. A review of the blood coagulation system of fish. **R. Bras. Bioc.**, v. 7, n. 2, p. 205-224, abr./jun. 2009
- THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 279, p. L1005-L1028, 2000
- TOPPO, S.; FLOHÉ, L.; URSINI, F.; VANIN, S.; MAIORINO, M. Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1790, n. 11, p. 1486-1500, nov. 2009
- TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nature Reviews**, v. 8, p. 579-591, jul. 2009
- UCHIDA, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. **Prog. Lipid Res.**, v. 42, p. 318-343, 2003
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOLA, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZURA, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, ago. 2007
- VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOLA, J.; IZAKOVIC, M.; MAZURA, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, jan., 2006

WATERSTRAT, P. R.; PINKHAM, L. Evaluation of eugenol as an anesthetic for the american lobster *Homerus americanus*. **Journal of The World Aquaculture Society**, v. 36, n. 3, p. 420-424, set., 2005.

WELKER, A. F.; CAMPOS, E. G.; CARDOSO, L. A.; HERMES-LIMA, M. Role of catalase on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant nile tilapia, **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 302, p. R1111–R1118, 2012

XU, J.; LIU, Y.; CUI, S.; MIAO, X. Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. **Aquacultural Engineering**, n. 35, p. 207-217, 2006

YANG, Y.; SHARMA, R.; SHARMA, A.; AWASTHI, S.; AWASTHI, Y. C. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling. **Acta Biochimica Polonica**, v. 50, n. 2, p. 319-336, 2003

ZHANG, H.; COURT, N.; FORMAN, H. J. Submicromolar concentrations of 4-hydroxynonenal induce glutamate cysteine ligase expression in HBE1 cells. **Redox Report**, v. 12, p. 101-106, 2007