

# UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA

**ESTUDOS COMPARATIVOS DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL DO**  
*Lophosilurus alexandri*

SARAH KELLY MELO CAVALCANTE

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

**SARAH KELLY MELO CAVALCANTE**

**ESTUDOS COMPARATIVOS DA BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL  
DO *Lophiosilurus alexandri***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial da obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Ana Catarina Rezende Leite

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup> Edma Carvalho de Miranda

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

C167e Cavalcante, Sarah Kelly Melo.  
Estudos comparativos da bioenergética mitocondrial do *Lophiosilurus alexandri* / Sarah Kelly Melo Cavalcante. – 2016.  
78 f. : il., grafs., tabs.

Orientadora: Ana Catarina Rezende Leite.  
Coorientador: Edma Carvalho de Miranda.  
Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.

Bibliografia: f. 66-78.

1. Bioenergética mitocondrial. 2. Espécies reativas de Oxigênio.  
3. *Lophiosilurus alexandri*. I. Título.

CDU:577.1:576.311.3



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E  
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões  
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins  
57072-970, Maceió-AL, Brasil  
Fone/Fax: (82) 3214-1144  
email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da comissão julgadora da defesa de dissertação de mestrado de **Sarah Kelly Melo Cavalcante**, intitulada: “**Estudos comparativos da bioenergética mitocondrial do *Lophiosilurus alexandri***”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, em 25 de fevereiro de 2016, às 14h, na Sala de Aulas da Pós-Graduação do PPGQB/IQB/UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Profa. Dra. Ana Catarina Rezende Leite  
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Profa. Dra. Edma Carvalho de Miranda  
Coorientador (IQB/UFAL)

Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos  
(PPGQB/IQB/UFAL)

Prof. Dr. Daniel de Magalhães Araújo  
(IFAL – Campus Satuba)

*Aos meus pais Martha e Abelardo Cavalcante por todo amor, carinho, dedicação, investimento e incentivo à minha educação, pelas orações e compreensão da ausência em muitos momentos exigidos para a realização deste trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, o autor e consumidor da minha fé, pela força e sabedoria concedidas nos períodos mais difíceis. Sem Ele não seria o que o sou e sem Ele não chegaria onde estou. Toda honra e glória sejam dadas ao Senhor.

À minha mãe; Martha Lidia, por sempre orar por mim, me ouvir, dar sábios conselhos, por compartilhar momentos de alegria e tristeza e sempre me apoiar, e meu pai Abelardo Cavalcante, por acreditar em meu potencial, ter orgulho de minhas realizações e ser parceiro de viagens na busca pelos meus sonhos.

Ao meu irmão Brunno Davisson e minha cunhada Juciana Pinheiro por me incentivarem e por todo apoio, torcida e ajuda durante a realização desse trabalho.

Ao meu grande amor, meu noivo Walbert Moura, por todo carinho, compreensão, paciência nos momentos de estresse, por me encorajar, por estar sempre ao meu lado, por compartilhar sonhos, por fazer altos planos... não passei por tudo isso só por mim, fiz por nós! Amo muito você!

À professora Orientadora Ana Catarina Rezende Leite por me receber em seu laboratório e grupo de pesquisa, e por todo apoio, compreensão e suporte para a realização deste trabalho. Obrigada por toda ajuda Profa!

À professora Co-orientadora Edma Carvalho de Miranda que com seu grande coração sempre esteve disposta a conversar comigo e me aconselhar, por acreditar em meu potencial, por conseguir os animais e ajudar no que fosse possível.

Ao amigo Claudio Wilian, por ouvir meus conselhos e me aconselhar quando preciso, por sempre ajudar a qualquer hora, compartilhar momentos de alegria junto à sua família, pelas alegrias e tristezas compartilhadas da graduação até hoje.

Aos colegas e parceiros de laboratório: João Arthur (parceiro de todas as horas), Suzanna, Nicolas, Eric, Abner, Ricardo, Elizabeth, Humberto, Fabiana, Tayanna, Cledson, Martha, Monique, Vanessa e Roberto. Aos demais colegas, Woodland, Elysson e Thalita, Rafael e Reginaldo (UFPE), em especial, à amiga Marina Magalhães, pelas conversas, conselhos, emprestar seus ouvidos quando preciso, dividir lágrimas e sorrisos, e ajudar sem medir esforços.

Aos professores do PPGQB pelos ensinamentos durante o curso. Ao Anderson, secretário do PPGQB, por sua atenção e sempre se mostrar solícito. E Nilda, por ser como uma mãezona sempre pronta a ajudar.

À CODEVASF de Alagoas e Pernambuco por ceder os animais.

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

## RESUMO

As mitocôndrias são organelas responsáveis pela síntese de ATP, sendo os complexos da cadeia respiratória e a enzima ATP sintase os responsáveis por esse processo. A mitocôndria também é uma das fontes de geração de espécies reativas de oxigênio, contudo possui um eficiente sistema antioxidante. *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) é um peixe nativo do rio São Francisco e tem um grande potencial econômico para a região. No entanto, parâmetros do metabolismo bioenergético de tal espécie nunca foram avaliados. Neste estudo, buscou-se investigar em mitocôndrias isoladas, a atividade da cadeia transportadora de elétrons avaliando cada um dos seus complexos, assim como foi avaliada a produção mitocondrial de  $H_2O_2$  e a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx), no fígado de pacamã e tilápia. Os experimentos *in vitro* mostraram no pacamã a velocidade de fosforilação ( $V_3$ ), usando substrato para o complexo I foi maior que do complexo II, o mesmo não se repetiu para a velocidade de repouso ( $V_4$ ) e velocidade de desacoplamento ( $V_{FCCP}$ ), que foram maiores quando usado substrato para o complexo II. Por outro lado, ao analisar o Controle Respiratório (CR), que é uma razão entre  $V_3$  e  $V_4$ , do pacamã e da tilápia, observou-se na espécie de interesse um resultado inferior em ambos os complexos: 20% menor para o substrato do complexo I e 28% menor para o substrato do complexo II. Contudo, também foi verificado um aumento médio de 19% na produção de  $H_2O_2$  mitocondrial de pacamã quando comparado à tilápia. Em relação à atividade das enzimas antioxidantes do fígado, a SOD teve uma atividade reduzida na tilápia em relação ao pacamã, onde apresentou uma diminuição de 27,2%. Porém em se tratando das enzimas CAT e GPx, tais enzimas na tilápia mostraram ter uma maior atividade do que no pacamã. Os resultados indicam que as mitocôndrias hepáticas do pacamã possuem os quatro complexos da cadeia respiratória de elétrons funcionais e há produção de  $H_2O_2$ , adicionalmente no fígado do pacamã a atividade da SOD é reduzida.

**Palavras-chave:** Bioenergética mitocondrial. espécies reativas de oxigênio. *Lophiosilurus alexandri*.

## ABSTRACT

Mitochondria are organelles responsible for the synthesis of ATP, and the complex of the respiratory chain and the enzyme ATP synthase those responsible for this process. Mitochondria are also one of the sources of generation of reactive oxygen species, yet has an efficient antioxidant system. *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) is a native fish from the São Francisco river and has a great economic potential for the region. However, energy metabolism parameters from this fish has never been assessed. In this study, we sought to investigate the transport chain activity of electrons evaluating each of its complexes, as well as evaluated the mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) from liver pacamã and tilapia. *In vitro* experiments showed that phosphorylation velocity (V<sub>3</sub>), using a substrate for the complex I, was higher than complex II, this result was not found for the resting velocity (V<sub>4</sub>) and uncoupling velocity (V<sub>FCCP</sub>), which were higher when used for substrate complex II. Furthermore, the respiratory control (RC), which is a ration between V<sub>3</sub> and V<sub>4</sub>, in pacamã shown a lower result than in tilapia, in both complexes 20% lower for substrate to complex I and 28% lower using substrate to complex II. It was also observed an average of 19% increase in mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production from pacamã compared to tilapia. In relation to the antioxidant activity of liver enzymes, SOD had a reduced activity when comparing tilapia to pacamã, which showed a decrease of 27.2%. But in the case of CAT and GPx enzymes, such enzymes from tilapia shown to have greater activity than those from pacamã. The results indicate that, liver mitochondria from pacamã was the four functional complexes of the respiratory chain and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> there is mitochondria H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, additionally pacamã liver SOD activity is reduced.

**Keywords:** Mitochondrial bioenergetic. reactive oxygen species. *Lophiosilurus alexandri*.



## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Movimentação dos elétrons através dos complexos da cadeia respiratória.....  | 17 |
| <b>Figura 2:</b> Sistema antioxidante enzimático mitocondrial.....  | 29 |
| <b>Figura 3:</b> Pacamã ( <i>Lophiosilurus alexandri</i> , Steindachner, 1874).....   | 35 |
| <b>Figura 4:</b> Controle respiratório na presença de substratos para os complexos I e complexo II em mitocôndrias de fígado de <i>Lophiosilurus alexandri</i> .....                                | 46 |
| <b>Figura 5:</b> Controle respiratório de mitocôndrias hepáticas isoladas do <i>Lophiosilurus alexandri</i> (pacamã) e <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia).....                                  | 47 |
| <b>Figura 6:</b> Efeito de AA, TMPD/Asc e KCN sobre consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado do <i>Lophiosilurus alexandri</i> (pacamã) e <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia)..... | 48 |
| <b>Figura 7:</b> Medida da geração de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias do fígado do <i>Lophiosilurus alexandri</i> (pacamã) e de <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia).....                  | 49 |
| <b>Figura 8:</b> Medida da geração de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias do fígado do <i>Lophiosilurus alexandri</i> (pacamã).....  | 50 |
| <b>Figura 9:</b> Atividade da enzima superóxido dismutase no fígado do <i>Lophiosilurus alexandri</i> (pacamã) e <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia).....  | 51 |
| <b>Figura 10:</b> Atividade da enzima catalase no fígado do <i>Lophiosilurus alexandri</i> (pacamã) e <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia).....   | 52 |
| <b>Figura 11:</b> Atividade da enzima glutationala proxidase no fígado do <i>Lophiosilurus alexandri</i> (pacamã) e <i>Oreochromis niloticus</i> (tilápia).....                                     | 52 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1:</b> Composição percentual e nutricional da dieta padrão.....  | 39 |
| <b>Tabela 2:</b> Consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas do <i>Lophiosilurus alexandri</i> utilizando substratos ligados ao NADH para o complexo I e succinato para o complexo II..... | 45 |

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                           |   |
|---------------------------|---|
| <b>AA</b>                 | Antimicina A  |
| <b>ADP</b>                | Adenosina difosfato   |
| <b>ANT</b>                | Translocador ADP/ATP  |
| <b>Asc</b>                | Ascorbato   |
| <b>ATP</b>                | Adenosina trifosfato  |
| <b>BSA</b>                | Bovin S rum Albumin   |
| <b>CAT</b>                | Catalase  |
| <b>CODEVASF</b>           | Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba |
| <b>CR</b>                 | Controle Respirat rio   |
| <b>CuZn-SOD</b>           | Super xido dismutase dependente de cobre e zinco                      |
| <b>DNA</b>                |  cido desoxirribonucleico   |
| <b>EDTA</b>               |  cido etilenodiaminotetrac tico                                       |
| <b>EGTA</b>               |  cido etilenoglicoltetrac tico  |
| <b>EROs</b>               | Espécies reativas de oxigênio   |
| <b>FAD</b>                | Flavina-adenina dinucleótido  |
| <b>FADH<sub>2</sub></b>   | Flavina-adenina dinucleótido reduzida                                 |
| <b>FCCP</b>               | Carbonilcianeto- <i>p</i> -trifluormetoxifenilidrazona                |
| <b>F<sub>0</sub></b>      | Subunidade da enzima ATP sintase sensível   oligomicina               |
| <b>F<sub>1</sub></b>      | Subunidade da enzima ATP sintase                                      |
| <b>g</b>                  | Acelera o da gravidade  |
| <b>GPx</b>                | Glutaciona peroxidase   |
| <b>GR</b>                 | Glutaciona redutase   |
| <b>GSH</b>                | Glutaciona reduzida   |
| <b>GSSG</b>               | Glutaciona oxidada  |
| <b>HEPES</b>              |  cido N-[2-hidroxietil]piperazina-N'-2-etanossulf nico                |
| <b>HRP</b>                | Peroxidase  |
| <b>k</b>                  | Constante de velocidade   |
| <b>MFP</b>                | Mitoc ndria de fígado de pacamã                                       |
| <b>MnSOD</b>              | Super xido dismutase dependente de mangan s                           |
| <b>NADH</b>               | Nicotinamida-adenina dinucleótido reduzida                            |
| <b>NAD(P)<sup>+</sup></b> | Nicotinamida-adenina dinucleótido (fosfato)                           |

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| <b>NADPH</b>                      | Nicotinamida-adenina dinucleótido (fosfato) reduzida |
| <b>O<sub>2</sub></b>              | Oxigênio molecular                                   |
| <b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b> | Ânion radical superóxido                             |
| <b>OH<sup>·</sup></b>             | Radical hidroxil                                     |
| <b>pH</b>                         | Potencial hidrogeniônico                             |
| <b>P<sub>i</sub></b>              | Fosfato inorgânico                                   |
| <b>PTP</b>                        | Poros de Transição de Permeabilidade                 |
| <b>SDS</b>                        | Docecil-sulfato de sódio                             |
| <b>SOD</b>                        | Superóxido dismutase                                 |
| <b>TMPD</b>                       | Tetrametil- <i>p</i> -fenileno diamina               |
| <b>TPM</b>                        | Transição de Permeabilidade Mitocondrial             |
| <b>UCP</b>                        | Uncoupling proteins (proteína desacopladora)         |
| <b>UQ</b>                         | Ubiquinona   |
| <b>UQH<sub>2</sub></b>            | Ubiquinol  |
| <b>UV</b>                         | Ultravioleta   |
| <b>VDAC</b>                       | Canal aniônico voltagem dependente                   |
| <b>V<sub>FCCP</sub></b>           | Velocidade de desacoplamento                         |
| <b>V<sub>3</sub></b>              | Velocidade do estado três                            |
| <b>V<sub>4</sub></b>              | Velocidade do estado quatro                          |

## SUMÁRIO

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| <b>1</b>   | <b>INTRODUÇÃO</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>1.1</b> | <b>Mitocôndrias: Estrutura, Função e Bioenergética</b> .....                                     | <b>13</b> |
| <b>1.2</b> | <b>Transição de Permeabilidade Mitocondrial, Estresse Oxidativo e Sistema Antioxidante</b> ..... | <b>18</b> |
| <b>1.3</b> | <b>Bioenergética Mitocondrial e Espécies Reativas de Oxigênio em Peixes</b> .....                | <b>30</b> |
| 1.3.1      | <i>Lophiosilurus alexandri</i> (Pacamã).....   | 34        |
| <b>2</b>   | <b>OBJETIVOS</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>2.1</b> | <b>Objetivo Geral</b> .....  | <b>37</b> |
| <b>2.2</b> | <b>Objetivos Específicos</b> .....   | <b>37</b> |
| <b>3</b>   | <b>METODOLOGIA</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Materiais e Reagentes</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>3.2</b> | <b>Animais e Tratamentos</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Isolamento de Mitocôndrias Hepáticas</b> .....  | <b>40</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Dosagem de Proteína</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>3.5</b> | <b>Meio de Reação Padrão</b> .....   | <b>41</b> |
| <b>3.6</b> | <b>Consumo de Oxigênio Mitocondrial</b> .....  | <b>41</b> |
| <b>3.7</b> | <b>Estimativa da Produção de EROs</b> .....  | <b>42</b> |
| <b>3.8</b> | <b>Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes</b> .....                                 | <b>42</b> |
| 3.8.1      | <i>Determinação de superóxido dismutase (SOD)</i> .....  | 42        |
| 3.8.2      | <i>Ensaio da catalase (CAT)</i> .....  | 43        |
| 3.8.3      | <i>Atividade da glutathione peroxidase (GPx)</i> .....   | 43        |
| <b>3.9</b> | <b>Análise Estatística</b> .....   | <b>43</b> |
| <b>4</b>   | <b>RESULTADOS</b> .....  | <b>45</b> |
| <b>4.1</b> | <b>Consumo de Oxigênio de Mitocôndrias Hepáticas</b> .....                                       | <b>45</b> |
| <b>4.2</b> | <b>Produção de EROs em Mitocôndrias Hepáticas</b> .....  | <b>48</b> |
| <b>4.3</b> | <b>Atividade das Enzimas Antioxidantes</b> .....   | <b>50</b> |
| <b>5</b>   | <b>DISCUSSÃO</b> .....   | <b>54</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Consumo de Oxigênio de Mitocôndrias Hepáticas</b> .....                                       | <b>54</b> |
| <b>5.2</b> | <b>Produção de EROs em Mitocôndrias Hepáticas</b> .....  | <b>59</b> |
| <b>5.3</b> | <b>Atividade das Enzimas Antioxidantes</b> .....   | <b>62</b> |
| <b>6</b>   | <b>CONCLUSÃO</b> .....   | <b>65</b> |
|            | <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | <b>66</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Mitocôndrias: Estrutura, Função e Bioenergética

A mitocôndria é uma organela que desempenha um papel central na vida e morte das células. Possui diâmetro em torno de 0,2 a 1,0  $\mu\text{m}$  e sua forma e dimensão diferem conforme o tipo de tecido em que se encontra (NELSON; COX, 2014). É constituída por duas membranas, uma externa e uma interna, que separam o espaço intermembranas e a matriz (MELO; PASSOS, 2015).

A membrana externa é formada por cerca de 50% de lipídios e 50% de proteínas, ela é porosa e permeável a íons e pequenas moléculas não carregadas, que a atravessam livremente por meio de canais transmembranares, isto é, por meio de proteínas de membrana de formação de poros (porinas), tais como o canal aniônico voltagem dependente – VDAC (KÜHLBRANDT, 2015).

Já a membrana interna, constitui-se de 20% de lipídios e 80% de proteínas, é uma barreira de difusão para todos os íons e moléculas. Estes só podem entrar transversalmente com a ajuda de proteínas transportadoras de membrana específicas, cada uma seletiva para um íon ou molécula particular (KÜHLBRANDT, 2015). Apresenta múltiplas invaginações, chamadas de cristas mitocondriais, essas por sua vez são importantes pelo fato de aumentarem a área superficial, visto que é impermeável à maioria das moléculas e íons. Nela também estão localizadas proteínas, que formam os quatro complexos da cadeia respiratória e a enzima ATP sintase (MELO; PASSOS, 2015).

Na matriz mitocondrial é onde se encontram as enzimas do ciclo do ácido cítrico, enzimas da  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos, enzimas de oxidação de aminoácidos, complexo da piruvato desidrogenase, além de outras enzimas, ribossomos e DNA mitocondrial (NELSON COX, 2014).

Desses componentes presentes na matriz, o DNA mitocondrial (mtDNA) possui grande importância. A maioria dos organismos apresenta um DNA mitocondrial circular que varia em tamanho e no número de quilobases (kb), como exemplo, tem-se que as plantas possuem por volta de centenas de quilobases (kb), enquanto os seres humanos apresentam apenas 16,5 kb. Ele está organizado em um complexo núcleo, conhecido como nucleóide mitocondrial, o qual está covalentemente associado com a membrana mitocondrial interna. O proteoma

mitocondrial está estimado em cerca de 800 a 1200 proteínas diferentes, porém apenas 5% das proteínas da mitocôndria são codificadas pelo mtDNA. Análises proteômicas realizadas em leveduras e mamíferos revelaram que o nucleoide é composto por proteínas de ligação do DNA, proteínas envolvidas na manutenção do mtDNA e por proteínas envolvidas no metabolismo energético. Uma vez sendo lesionado, o mtDNA pode afetar facilmente a expressão gênica contribuindo para uma disfunção mitocondrial e celular, tendo como consequência o aparecimento de doenças, como câncer e as doenças neurodegenerativas (MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO; 2014).

Ao abordar a cerca das funções mitocondriais, tem-se que essa organela é essencial na homeostase celular, pois através do seu papel na apoptose e necrose quando é submetida a condições de estresse, controla o destino da célula (KOWALTOWSKI et al., 2009).

Além disso, a mitocôndria tem como uma das mais conhecidas funções a capacidade de prover energia para a célula, ao converter energia da transferência de elétrons em energia química na forma de adenosina trifosfato (ATP). Esse processo é denominado de fosforilação oxidativa e envolve uma série de complexos transportadores de elétrons e a enzima ATP sintase localizados na membrana mitocondrial interna (NELSON, COX, 2014).

Os quatro complexos da cadeia respiratória encontram-se sequenciados em virtude do potencial redox. Esse potencial é o responsável por determinar o movimento dos elétrons até que eles alcancem o oxigênio (MITCHELL, 1961). Assim, a energia necessária para a fosforilação oxidativa provém do potencial eletroquímico de prótons gerado pela cadeia de transporte de elétrons que reduz o oxigênio molecular à água. Desta forma, a cadeia respiratória converte a energia de coenzimas reduzidas proveniente do catabolismo de nutrientes em potencial de membrana mitocondrial, o qual gera a força motriz para a fosforilação oxidativa. Um evento primordial que ocorre anteriormente à fosforilação oxidativa é a produção de novas substâncias, as quais são necessárias durante a fosforilação. Esses produtos são obtidos a partir do ciclo de Krebs, também conhecido como ciclo do ácido cítrico.

Durante o ciclo do ácido cítrico, coenzimas reduzidas são sintetizadas (NADH e FADH<sub>2</sub>). Isso ocorre em virtude da oxidação de substratos e a energia liberada por essas oxidações é conservada pela redução de três NAD<sup>+</sup> e um FAD, mediante reações catalisadas pelas enzimas isocitrato-desidrogenase, pela descarboxilação

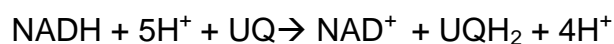
oxidativa do citrato à  $\alpha$ -cetogluturato;  $\alpha$ -cetoglutarase-desidrogenase, em virtude da oxidação de  $\alpha$ -cetogluturato em succinil-CoA e succinato-desidrogenase a partir da oxidação do succinato a fumarato. Sendo essa última enzima também integrante da cadeia respiratória no complexo II (NELSON, COX, 2014).

A coenzima NADH gerada no citosol da célula pode penetrar no interior da mitocôndria através de sistemas de lançadeiras. A lançadeira de NADH mais conhecida que funciona em mitocôndrias de fígado, rim e coração é a lançadeira do malato-aspartato. Os equivalentes redutores do NADH citosólico são transferidos ao  $\text{NAD}^+$  presente no interior da mitocôndria pela ação da malato-desidrogenase da matriz, formando NADH. Esse NADH pode passar elétrons diretamente para a cadeia respiratória (NELSON, COX, 2014).

Os elétrons provenientes das coenzimas reduzidas, NADH e  $\text{FADH}_2$ , mediante a degradação de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos, são transferidos aos quatro complexos transportadores de elétrons que compõem a cadeia respiratória.

O complexo I, também conhecido como NADH desidrogenase ou NADH-ubiquinona redutase é composto por 42 cadeias diferentes de polipetídeos, incluindo flavoproteína (FMN) e seis centros de ferro-enzofre (Fe-S).

Este complexo catalisa a transferência de um íon hidreto do NADH para a forma oxidada da coenzima Q (ubiquinona - UQ) gerando a forma reduzida desta coenzima (Ubiquinol –  $\text{UQH}_2$ ) que se difunde na bicamada lipídica. Além disso, o complexo I também realiza a transferência de quatro prótons da matriz para o espaço intermembrana (NELSON, COX, 2014). A reação que representa essa transferência de elétrons, na forma de hidreto e o bombeamento de prótons é a seguinte:



O complexo II, também conhecido como succinato desidrogenase, tem duas subunidades transmembranar, C e D e contém as subunidades A e B que se estendem para a matriz. A subunidade A contém a coenzima FAD, em que logo atrás encontra-se o sítio de ligação dos elétrons originados de um intermediário do ciclo do ácido cítrico, o succinato. A subunidade B tem três conjuntos de centro de Fe-S e a ubiquinona ligada. Os elétrons se movem do succinato para a coenzima

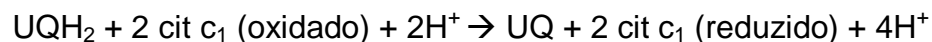


FAD, a qual é reduzida à FADH<sub>2</sub>. Em seguida, tais elétrons passam através dos três centros de Fe-S, onde finalmente eles são transferidos para a forma oxidada da coenzima Q (UQ), reduzindo-a em UQH<sub>2</sub> (NELSON, COX, 2014). Diferentemente do complexo I, a energia liberada da oxidação do succinato para fumarato não é suficientemente alta para promover o bombeamento de prótons através deste complexo (SALVADOR, 2013).

Também conhecido como ubiquinona:citocromo c oxidoreductase, o complexo III acopla a transferência de elétrons do ubiquinol (UQH<sub>2</sub>) para o citocromo c com o transporte vetorial de prótons da matriz para o espaço intermembrana.

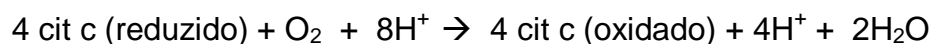
As reações redox que ocorrem no complexo III foram propostas por meio de um modelo, o ciclo Q. Através da passagem de elétrons e de prótons, o ciclo Q acomoda a troca entre o carregador de elétrons (ubiquinona) e os carregadores de um elétron (citocromos *b*<sub>562</sub>, *b*<sub>566</sub> e *c*<sub>1</sub>) (NELSON, COX, 2014).

Embora o caminho dos elétrons através deste segmento da cadeia respiratória seja complicado, o efeito global da transferência é simples: UQH<sub>2</sub> é oxidado a UQ e duas moléculas de citocromo c são reduzidas, conforme equação abaixo:



No passo final da cadeia respiratória, o complexo IV, também chamado citocromo c oxidase, ocorre o transporte de quatro elétrons do citocromo c para o oxigênio molecular, reduzindo-o a H<sub>2</sub>O.

Para cada quatro elétrons que passam por meio deste complexo, a enzima consome quatro substratos H<sup>+</sup> da matriz para na conversão de O<sub>2</sub> a 2H<sub>2</sub>O, conforme reação abaixo (NELSON, COX, 2014).



Além das coenzimas NADH e FADH<sub>2</sub>, outros substratos transferem elétrons para a cadeia respiratória diretamente no nível da ubiquinona. Dentre eles tem-se o acil-CoA graxo e o glicerol 3-fosfato.

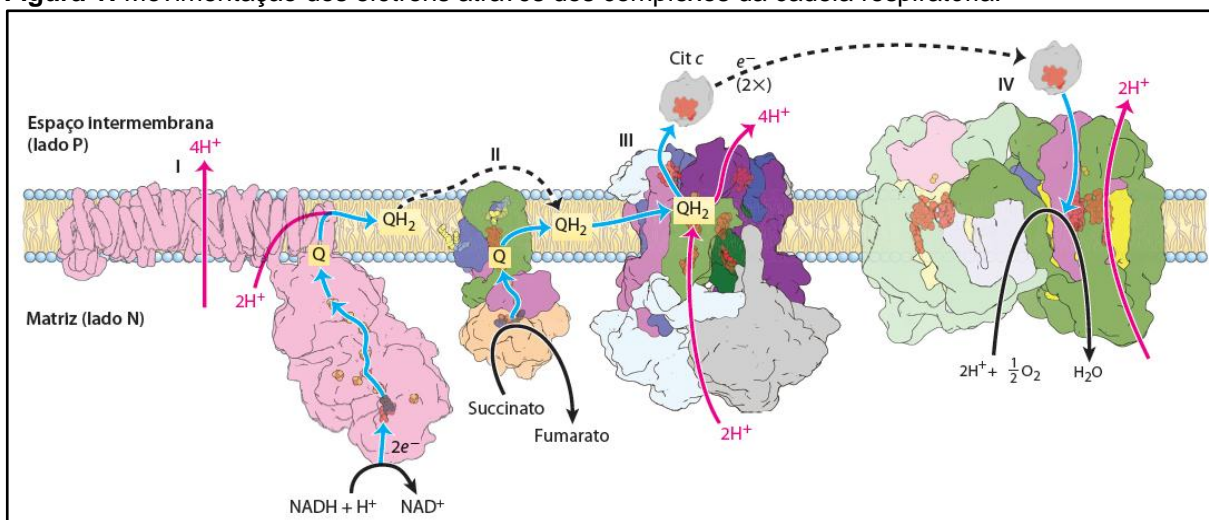
O primeiro passo para a oxidação do acil-CoA graxo, é catalisado pela flavoproteína acil-CoA desidrogenase, e envolve a transferência de elétrons do substrato para a FAD desidrogenase, e em seguida para a flavoproteína transferidora de elétrons (ETF), e finalmente para ETF ubiquinona oxidoreductase.

Essa enzima transfere elétrons para dentro da cadeia respiratória pela ubiquinona reduzida (NELSON; COX, 014).

No músculo esquelético e no cérebro, o glicerol 3-fosfato formado a partir do glicerol liberado de triacilglicerol ou da diidroxicetona fosfato, é oxidado pela glicerol fosfato desidrogenase. Essa enzima é localizada na face externa da membrana mitocondrial interna, sendo mais um canal de elétrons para a cadeia respiratória por reduzir a ubiquinona (NICHOLLS, FERGUSTON; 2014).

A movimentação dos elétrons através dos quatro complexos da cadeia respiratória pode ser representada conforme mostra a **Figura 1**.

**Figura 1:** Movimentação dos elétrons através dos complexos da cadeia respiratória.



Fonte: Lehninger, 2014.

De acordo com a teoria Quimiosmótica de Mitchell, o gradiente essencial para síntese de ATP é o bombeamento de prótons através da matriz mitocôndria para o espaço intermembranar (MITCHELL, 1961). Devido à passagem de prótons através dos complexos transmembranares (complexos I, III e IV), e da transferência de elétrons, há a formação de um gradiente químico e elétrico (NELSON; COX, 2014).

A formação deste potencial eletroquímico transmembrânico é o elemento inicial do acoplamento entre a oxidação de substratos e a geração de energia química. O componente elétrico ( $\Delta\Psi$ ) deste potencial atinge valores de aproximadamente  $-180\text{ mV}$  no estado de repouso, enquanto o componente químico ( $\Delta\text{pH}$ ) oscila em até 1 unidade de pH (NICHOLLS, FERGUSTON; 2002).

O retorno dos prótons para a matriz mitocondrial, a favor do gradiente, ocorre em virtude de outro complexo enzimático, chamado ATP sintase. Esse complexo é formado por duas subunidades, chamadas de  $F_0$  e  $F_1$ .

Segundo Nicholls e Ferguson (2002) a porção  $F_1$  tem cinco tipos de polipeptídeos, geralmente conhecidos como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , e  $\epsilon$  ao passo que mais três polipeptídeos, a, b, e c, foram identificados em  $F_0$ . As massas moleculares estimadas para  $F_0$  e  $F_1$  foram em 370 e 160 kDa, respectivamente. Os cinco polipeptídeos de  $F_1$  são consistentes com uma estrutura globular hidrofílica, enquanto que cada um dos polipeptídeos de  $F_0$  tem regiões hidrofóbicas consistentes com  $\alpha$ -hélices transmembranares.

Quando o fluxo de prótons passa através da subunidade  $F_0$  fornece a força para a rotação de  $F_1$ , que atua como motorrotatório para conduzir à síntese de ATP (MITCHELL, 1961).

A geração do gradiente eletroquímico transmembrânico de prótons é um elemento central no aproveitamento de energia em sistemas biológicos. Evolutivamente, este mecanismo é fundamental, sendo usado tanto na fosforilação oxidativa em mitocôndrias quanto na fotossíntese em cloroplastos.

Além disso, este gradiente pode ser usado diretamente para processos endergônicos sem a participação de ATP. São exemplos desse mecanismo de acoplamento direto as trocas eletroforéticas de  $ATP^{4-}$  por  $ADP^{3-}$ , a redução de  $NAD(P)^+$  pela transidrogenase específica e a captação eletroforética de  $Ca^{2+}$  (transportando duas cargas positivas para o interior da mitocôndria) (NICHOLLS, FERGUSON, 2014).

## **1.2 Transição de Permeabilidade Mitocondrial, Estresse Oxidativo e Sistema Antioxidante**

Além de controlar o destino de vida e morte da célula e de sua capacidade de produzir energia na forma de ATP, as mitocôndrias participam na sinalização celular e na resposta imune (MUFTUOGLU; MORI; SOUZA-PINTO, 2014), participam dos processos de inflamação e no controle de níveis de cálcio (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999, BURG; BOES, 2015) e como um dos principais locais geradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células (KOWALTOWSKI, CASTILHO,

VERCESI, 2001) as quais estão envolvidas no processo de envelhecimento, dentre várias outras funções (MELO;PASSOS, 2015).

A homeostase de cálcio celular, em particular, mitocondrial está relacionada com a integridade da mitocôndria. Uma sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  na mitocôndria é responsável por afetar o estado redox de tal organela e promover a oxidação de grupos tióis das proteínas da membrana interna mitocondrial. A oxidação desses grupos resulta em mudanças conformacionais e agregação/polimerização de proteínas formando poros não seletivos (FIGUEIRA et al., 2013).

Além disso, a mitocôndria está envolvida no processo de morte celular, em virtude da liberação de moléculas sinalizadoras de apoptose para o citosol da célula, como por exemplo, o citocromo c, o fator de apoptose indutor de protease (Apaf-1), o fator indutor de apoptose (AIF), e o Smac/DIABLO. Isso se deve às condições fisiológicas alteradas da célula, o que leva a um processo chamado de Transição de Permeabilidade Mitocondrial (TPM) (SKULACHEV, 1998; KOWALTOWSKI, CASTILHO, VERCESI, 2001; BAZIL, BUZZARD; RUNDELL, 2010).

A TPM é uma condição de permeabilização não-seletiva da membrana mitocondrial interna induzida pela elevação da concentração de cálcio, presença de espécies reativas de oxigênio e aumento na concentração de fosfato inorgânico (RONCHI; VERCESI; CASTILHO, 2011), o que prejudica a funcionalidade da mitocôndria, causando inchamento da organela, perda de potencial de membrana e perda da capacidade de transportar cálcio, o que leva conseqüentemente a uma disfunção mitocondrial e a morte celular por necrose e/ou apoptose (FIGUEIRA et al., 2013).

Atualmente não está estabelecida a natureza química da abertura do Poro de Transição de Permeabilidade (PTP), contudo, já foi reportado na literatura que a abertura pode ser associada à proteína ciclofilina D (CROMPTON; ELLINGER; COSTI, 1988) ainda, agregados de proteínas de membrana mediado pela oxidação de seus grupamentos tiólicos (FAGIAN et al., 1990), modificação de componentes da membrana interna, e possivelmente da externa, que incluem a proteína VDAC (BRDICZKA et al., 1998) e o translocador ADP/ATP (ANT) (GIORGIO et al., 2013) entretanto, a hipótese mais recente sugere a participação da subunidade c da ATP sintase como mais um componente do poro de TPM (AGUILAR; BAINES, 2015).

A abertura do poro de TPM pode ser desencadeada por uma combinação sinérgica de níveis elevados de  $\text{Ca}^{2+}$  na matriz mitocondrial e desequilíbrio oxidativo

(FIGUEIRA et al., 2013). As primeiras indicações de que a TPM estava relacionada ao estado redox das mitocôndrias e que podia ser desencadeada por acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) mostraram que a perda da capacidade da mitocôndria em reter cálcio captado pelo meio externo era estimulado pela oxidação dos nucleotídeos de piridina das mitocôndrias e inibido ou revertido pela redução do  $\text{NADP}^+$ , além disso, a oxidação do NADPH mostrou estar mais relacionada à TPM do que à oxidação do NADH, posteriormente foi comprovado que o estado reduzido do NADP modulado pelo uso de oxidantes e redutores regulava o início da TPM (LEHNINGER et al., 1978; VERCESI, 1987; KOWALTOWSKI et al, 2001).

Uma vez que o NADPH representa a principal fonte de poder redutor para defesa da mitocôndria contra o estresse oxidativo, ele é usado para reconstituir os substratos glutaciona (GSH) e tioredoxina (TSH), que mantém a funcionalidade das principais enzimas removedoras de EROs na mitocôndria, a glutaciona peroxidase (GPx) e a tioredoxina peroxidase (TPx) mitocondrial, respectivamente.

A forma oxidada da glutaciona pode ser recuperada pelo NADPH através da glutaciona redutase. Com respeito à  $\text{NAD(P)}^+$  transidrogenase dependente de energia presente na membrana mitocondrial interna, esta tem um papel essencial no mecanismo de defesa contra estresse oxidativo. Esta enzima pode funcionar como uma bomba de prótons, utilizando o gradiente eletroquímico de  $\text{H}^+$  gerado pela respiração para produção de NADPH, garantindo uma fonte de equivalentes de redução para regenerar glutaciona reduzida. Portanto, a falta de energia gerada pelo desacoplamento ou pela queda de potencial de membrana diminui a atividade dessa transidrogenase dependente de energia. Deste modo, a enzima não é capaz de manter o NADPH na forma reduzida resultando em uma condição de estresse oxidativo (KOWALTOWSKI et al, 2009).

Com isso, fica claro que a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial está intimamente associada com o estado redox dos grupos tiois das mitocôndrias, visto que o NADPH está relacionado ao estado redox da glutaciona e de grupos tiois da mitocôndria.

A origem das espécies reativas de oxigênio que levam à TPM pode ser a própria cadeia respiratória, desde que a redução do oxigênio molecular à água seja incompleta. Espécies reativas de oxigênio (EROs) é um termo coletivo que inclui não só os radicais de oxigênio, mas também alguns derivados não-radicais do  $\text{O}_2$ , como  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o ácido hipocloroso (HClO) e ozônio ( $\text{O}_3$ ). Logo, todos os radicais de oxigênio

são EROs, mas nem todas as EROs são radicais de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

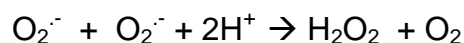
Quando as espécies reativas de oxigênio são produzidas dentro dos limites de 2 a 5%, possuem funções fisiológicas como: degradação oxidativa de aminoácidos, biossíntese de ácidos graxos insaturados, produção de neuromediadores (neurotransmissores e neuromoduladores), destruição de antígenos em células fagocitárias (AUGUSTO, 2006). Contudo, por serem muito reativas, as EROs adquirem caráter prejudicial quando o balanço entre sua produção e degradação encontra-se alterada, favorecendo sua produção (KOWALTOWSKI et al, 2009).

Dentre essas espécies, é possível destacar radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxil ( $OH^{\cdot}$ ), como sendo umas das mais importantes e significativas nos processos mitocondriais.

O ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) pode ser gerado dentro da cadeia respiratória via ubiquinona (UQ) em locais de ligação nos complexos I e III e mediante o grupo prostético flavina no complexo I. É possível haver outras fontes e locais para a geração deste radical, porém na literatura ainda são encontradas controvérsias (BRAND, 2010; CARDOSO et al., 2012; FIGUEIRA et al., 2013). Essa radical pode se comportar como oxidante e como redutor, dependendo da espécie com quem reaja, pois apresenta potenciais de  $E^\circ = -0,33\text{ V}$  e  $E^\circ = 0,94\text{ V}$  para sua redução e oxidação, respectivamente (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

De acordo com Figueira e colaboradores (2013), quando a rotenona está presente, um inibidor da ligação UQ, conhecido por bloquear o fluxo de elétrons no complexo I, há um aumento na produção de  $O_2^{\cdot-}$ . Isto sugere que o complexo I produz ânion radical superóxido em um local que é próximo ao sítio de ligação da rotenona durante o fluxo de elétrons a partir de NADH.

Segundo Halliwell e Gutteridge (2012), o  $O_2^{\cdot-}$  desaparece rapidamente em solução aquosa, isso é devido à reação de dismutação. Um radical  $O_2^{\cdot-}$  é oxidado para  $O_2$  e outro é reduzido para  $H_2O_2$ . A definição de dismutação é uma reação química em que a mesma espécie é tanto oxidada quanto reduzida. A reação global consiste em:



A produção de  $O_2^{\cdot-}$  equivale de 1 a 2% do consumo de oxigênio mitocondrial (ANDREYEV, KUSHNAREVA, STARKOV, 2005; FIGUEIRA et al., 2013), porém embora saiba que a mitocôndria pode gerar  $O_2^{\cdot-}$  em diferentes locais, não é possível afirmar precisamente a taxa de produção desse radical mediante vários substratos e diferentes demandas de energia, por isso é um desafio metodológico medir  $O_2^{\cdot-}$  em diferentes tipos de mitocôndrias, e, mais ainda, *in vivo*.

Outra espécie reativa é o  $H_2O_2$ . Ele é tóxico para células em diversos níveis, em que na faixa de 10 a 100  $\mu M$ , causa a senescência ou apoptose, mas em níveis mais baixos pode promover a proliferação de certos tipos de células, e em níveis mais elevados suprime a apoptose e promove a morte celular por necrose. Várias enzimas podem gerar  $H_2O_2$ , incluindo xantinas e oxidases como as superóxidos dismutases (SOD) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

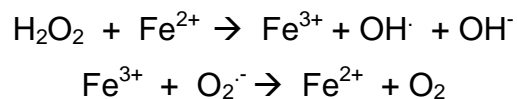
Outra classe de oxidases que produzem peróxido de hidrogênio são as L-Aminoácidos Oxidases (LAOs). As LAOs são flavoenzimas que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos em  $\alpha$ -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio (LI & LI, 2014). Essa classe de enzimas está amplamente distribuída em várias espécies de seres vivos, como nas peçonhas de serpentes, insetos, bactérias, fungos (BURIN, 2011) e em peixes (KITANI et al., 2007; WANG et al., 2011; WANG, XIE, LI, 2010).

O  $H_2O_2$  gerado na mitocôndria tem muitos destinos possíveis. Por ser relativamente estável, quando comparado com o ânion radical superóxido, esse composto pode permear membranas, através de transportadores presentes na membrana mitocondrial interna (KOWALTOWSKI et al., 2009).

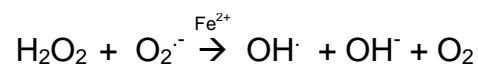
Entretanto, pode ser removido por sistemas antioxidantes citosólicos como a catalase, glutathione peroxidase e tioredoxina peroxidase na matriz mitocondrial (FIGUEIRA et al., 2013). Contudo, o peróxido de hidrogênio é continuamente produzido em muitos tecidos, e estudos sobre fígado em perfusão sugerem concentrações de estado estacionário de  $10^{-7}$  a  $10^{-8}$  M.

A mitocôndria contribui significativamente para a geração de  $H_2O_2$  celular, tanto por oxidases como por dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  da cadeia transportadora de elétrons. O  $H_2O_2$  foi estimado para alcançar uma concentração no estado estacionário de cerca de 5 nM na matriz mitocondrial, embora possa haver uma grande variação de níveis entre mitocôndrias a partir de tecidos diferentes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

O radical hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ) é outro exemplo de espécie reativa de oxigênio. Esse radical pode ser formado de diferentes maneiras, como por meio de uma fissão homolítica de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de radiação UV, através da fissão homolítica da água quando essa é submetida a raios  $\gamma$ . Porém, uma das maneiras que esse radical pode ser formado, até mesmo no interior da célula, é por meio da reação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  com íons ferro, mais conhecida como reação de Fenton (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).



A reação de Fenton pode ser simplificada como:



Entretanto, essa reação, também conhecida como Reação de Haber-Weiss pode ocorrer naturalmente no organismo sem a presença do íon ferro. Por ser altamente reativo, acredita-se que o radical hidroxil atue essencialmente como uma molécula nociva. Por esta razão, as mitocôndrias desenvolveram sistemas de remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  eficientes, bem como mecanismos que envolvem quelantes de metais, evitando a formação deste radical. Experimentos usando agentes quelantes de ferro para evitar danos mitocondriais e perda de integridade devido à maior geração de EROs demonstram que  $\text{OH}\cdot$  age como uma espécie prejudicial nas mitocôndrias (KOWALTOWSKI et al., 2009).

O radical hidroxil é capaz de abstrair hidrogênio praticamente de qualquer ligação C-H. Ele pode reagir com lipídios, promovendo a peroxidação lipídica na membrana mitocondrial, com proteínas, inativando enzimas e oxidar ácidos nucleicos, modificando o DNA mitocondrial (MELO; PASSOS, 2015).

Além do radical hidroxil, outras espécies reativas de oxigênio também podem causar danos oxidativos em componentes não-protéicos da mitocôndria. Há uma grande oxidação lipídica em paralelo à TPM quando as mitocôndrias são tratadas com altas concentrações de  $\text{Pi}$ , que por sua vez, estimula a oxidação lipídica devido a sua habilidade em catalisar a tautomerização de aldeídos, produzindo enóis que, quando oxidados por proteínas heme produz um estado *triplet* nos aldeídos, sendo



estes também oxigênios reativos. A peroxidação lipídica pode aumentar os efeitos lesivos da TPM na célula, pois também desencadeia o inchamento mitocondrial, a liberação de citocromo c e impede a fosforilação oxidativa (KOWALTOWSKI et al., 1996).

Na verdade, a peroxidação lipídica causa danos irreversíveis à mitocôndria, conseqüentemente à célula, o que torna essa oxidação de lipídeos mais prejudicial que a TPM, pois esta pode ser reversível logo após seu início (KOWALTOWSKI; CASTILHO; VERCESI, 2001).

A ativação da TPM é considerada uma das principais causas de morte de células sob uma variedade de estados patofisiológicos, incluindo isquemia/reperfusão, doença neurodegenerativa, lesão cerebral traumática, distrofia muscular, e a toxicidade de fármaco (FIGUEIRA et al., 2013).

De acordo com Silva e Ferrari (2011), espécies radicalares podem inativar enzimas, ativar genes pró-inflamatórios, levar a um aumento do risco de câncer e estão também relacionados a várias doenças crônicas associadas ao envelhecimento (doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, síndrome metabólica, artrite reumatóide, Alzheimer, Parkinson).

A fim de combater esses e outros danos provocados pelo estresse oxidativo, a mitocôndria faz uso de um eficiente sistema de defesa antioxidante. Antioxidante é um termo amplamente usado e apresenta diversas conotações dependendo de sua aplicação, mas pode-se definir antioxidante como qualquer substância que, em baixas concentrações, retarda, impede ou elimina os danos oxidativos causados em uma molécula alvo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

Dentre as enzimas que fazem parte do sistema antioxidante das mitocôndrias pode-se citar a ação da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e os sistemas glutatonas e tiorredoxinas.

A produção de ânion radical superóxido e de peróxido de hidrogênio pela mitocôndria foi reportada pela primeira vez a mais de quarenta anos (LOSCHEN et al., 1973; BOVERIS, CADENAS, 1975). Estes resultados, em conjunto com a descoberta da enzima SOD na matriz mitocondrial (WEISIGER; FRIDOVICH, 1973) chamaram a atenção para esta organela como uma importante fonte intracelular geradora de espécies reativas de oxigênio (KOWALTOWSKI et al., 2009).

Os mamíferos apresentam três isoformas da enzima SOD, as quais são capazes de promover a dismutação do ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) à  $H_2O_2$  em

diferentes compartimentos celulares. As isoformas são: CuZn-SOD (SOD 1), encontrada no citosol e no espaço intermembranas da mitocôndria, a Mn-SOD (SOD2) presente na matriz mitocondrial e a CuZn-SOD (SOD 3) no espaço extracelular (AUGUSTO, 2006).

Nos peixes, assim como nos demais animais, existem duas formas de SOD que contêm cobre e zinco, a CuZn-SOD. Uma delas corresponde à enzima presente principalmente no citoplasma das células, que é a CuZn-SOD, nomeada como SOD 1; porém essa enzima também pode ser encontrada nos lisossomos, peroxissomos, núcleo e espaço intermembranoso das mitocôndrias. Outro tipo de CuZn-SOD (SOD 3) corresponde à SOD extracelular, a qual normalmente está associada à superfície das células, especialmente nos vasos sanguíneos (UMASUTHAN, et al ., 2013; HERMES-LIMA, 2004).

A sequência completa dos aminoácidos que constituem as isoformas SOD 1 e SOD 3 são muito similares entre si. CuZn-SOD de mamíferos é uma enzima dimérica com dimensões elipsoidais de cerca de 30 x 40 x 70 Å. Cada subunidade contém 153 resíduos de aminoácidos mais um íon zinco e um íon cobre. As enzimas CuZn-SOD são extraordinariamente estáveis. A maioria das CuZn-SODs são bastante resistentes ao aquecimento, ataque por proteases e desnaturação por reagentes tais como cloreto de guanidina, de dodecil-sulfato de sódio (SDS) e uréia (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

A MnSOD é encontrada em bactérias, plantas e animais. Na maior parte dos tecidos animais e em leveduras, MnSOD é normalmente localizada nas mitocôndrias, embora algumas leveduras expressam uma MnSOD citoplasmática sob certas condições de crescimento. A MnSOD de organismos superiores contém geralmente quatro subunidades da proteína e tem um íon de Mn por subunidade. A remoção do Mn do sítio ativo faz com que haja perda de atividade catalítica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

Apesar das diferenças estruturais, MnSOD catalisa essencialmente a mesma reação que CuZn-SOD, isto é, dismutação de  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ . A abundância desta enzima, bem como a sua presença, em ambos os compartimentos mitocondriais, atesta a importância das mitocôndrias em remover o  $O_2^-$  gerado (KOWALTOWSKI et al., 2009). De acordo com Lebovitz e colaboradores (1996) tem sido associada que a má atividade da MnSOD em seres humanos pode acarretar em várias doenças crônicas, como o câncer de ovário e diabetes tipo I. Ratos que não expressavam a

enzima MnSOD apresentaram neurodegeneração, injúrias no miocárdio e letalidade perinatal (LEBOVITZ et al., 1996).

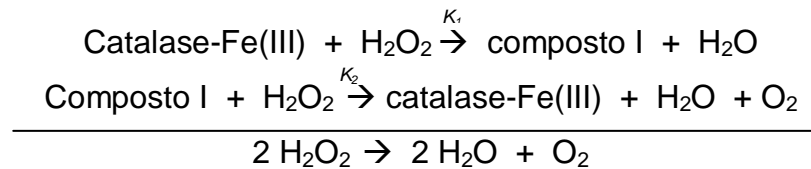
Além disso, Nascimento et al. (2014) e Ferreira et al. (2015) ao estudarem o sistema antioxidante de mitocôndrias do tecido cardíaco e tronco encefálico de ratos, respectivamente, cujas mães foram submetidas a uma dieta com restrição proteica durante o período gestacional, apresentaram uma diminuição da atividade da SOD, comprovando que uma dieta com baixo teor protéico induz à doenças cardiovasculares devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria, as quais provocam aumento dos níveis de estresse oxidativo em tecidos do miocárdio.

Além disso, a inibição da superóxido dismutase (SOD) pode aumentar a concentração de ânions radicais superóxido dentro das células, ativando assim o crescimento de células cardíacas. Dessa forma, EROs podem agir como moléculas de sinalização que promovem o crescimento dos cardiomiócitos levando à hipertrofia, visto que promovem a redução dos níveis de grupos tiólicos, níveis de glutatona e a atividade das enzimas catalase e SOD (CALDAS et al., 2015).

A maioria dos seres aeróbios contém a enzima catalase (CAT), assim como algumas bactérias anaeróbicas, como *Propionibacterium shermanii*. Em animais, a CAT está especialmente concentrada no fígado. Cérebro, coração e músculo esquelético têm baixos níveis de CAT, embora a sua atividade possa variar entre os diferentes tipos de células (KOWALTOWSKI et al., 2009; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

CAT de animais contém quatro subunidades, cada uma das quais apresentam um grupo heme de Fe (III) no seu sítio ativo. O grupo heme encontra-se a pelo menos 20 Å abaixo da superfície molecular, sendo acessível por apenas um canal alinhado com resíduos hidrofóbicos. Cada uma das subunidades tem geralmente uma molécula de NADPH ligado a ela. A dissociação da CAT, de suas subunidades, ocorre facilmente devido à desidratação ou a exposição da enzima a ácido ou base, o que faz com que perca sua atividade (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

Assim como a SOD, a catalase acelera a reação de dismutação do peróxido de hidrogênio. De acordo com Halliwell e Gutteridge (2012), a reação em que essa enzima está envolvida é:



No composto I da equação acima, o ferro foi oxidado de Fe(III) para uma valência de Fe(IV). Na verdade, um cátion radical oxoporfirina de Fe(IV), [(heme<sup>+</sup>) Fe(IV)O], é formado, devido a oxidação do grupo heme pela perda de um elétron (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

Da mesma forma que a SOD, os experimentos de Nascimento et al. (2014) e Ferreira et al. (2015) também demonstraram uma redução da atividade da CAT em proles de ratas submetidas à dietas com baixo teor proteico durante a gestação. Os resultados obtidos por esses autores também corroboram com o fato de que níveis elevados de EROs estão associados com doenças cardiovasculares.

Outro estudo mostrou que a administração exógena de peróxido de hidrogênio próximo de locais do tronco cerebral de ratos está associada com o aumento da atividade cerebral, ou seja, com ambas as respostas simpáticas e parassimpáticas, e que esta ação é invertida pela administração da enzima antioxidante CAT (CARDOSO et al., 2006). Entretanto, quando a CAT está super expressa em mitocôndrias do coração ela impede a oxidação de proteínas, a hipertrofia ventricular esquerda, e a disfunção diastólica (DAI et al., 2009).

A mitocôndria também contém peroxirredoxinas e redutases eficientes associadas a fim de remover H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estes incluem o sistema mitocondrial glutathione peroxidase/glutathione reductase, que remove H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> utilizando glutathione reduzida como uma fonte de elétrons, e o sistema mitocondrial thioredoxina peroxidase / thioredoxin reductase, que utiliza elétrons da thioredoxina (KOWALTOWSKI et al., 2009).

Glutathione peroxidase (GPx) remove o peróxido de hidrogênio promovendo sua redução à H<sub>2</sub>O com oxidação da glutathione reduzida, GSH, um tripeptídeo contendo tiol, conforme reação simplificada a seguir:



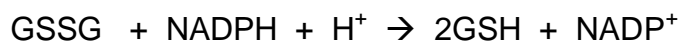
De acordo com Halliwell e Gutteridge (2012), a enzima GPx é menos comum em plantas ou bactérias. No entanto, a GSH é presente em animais, plantas e muitas bactérias aeróbicas, em concentrações intracelulares frequentemente na ordem de mM, mas é encontrado com menos frequência em bactérias anaeróbicas.

A enzima GPx é largamente distribuída nos tecidos dos animais e é altamente seletiva para GSH como um doador de hidrogênio. Contêm quatro subunidades proteicas, cada uma das quais comporta um átomo de selênio no seu sítio ativo.

Estudos têm mostrado que uma suplementação de selênio na dieta tem efeito positivo sobre o conteúdo plasmático da GPx, mostrando-se eficiente no combate de EROs e ao estresse oxidativo promovido por exercícios físicos, visto que a deficiência de selênio diminui a atividade da enzima GPx, (LUCENA, 2010).

Além de ser um cofator para a enzima GPx, a GSH está envolvida em muitos outros processos metabólicos, incluindo o metabolismo do ascorbato, mantendo a comunicação entre as células através de junções e impedindo a oxidação de grupos SH de proteínas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

A relação dos níveis de glutatona oxidada e reduzida em células normais é elevada, sendo que a conversão de GSSG para a GSH se dá por meio da enzima glutatona redutase, que catalisa a seguinte reação:

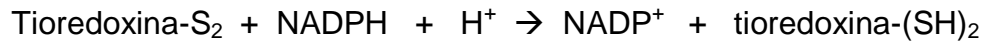


Glutatona redutase contém duas subunidades, cada uma com FAD em seu sítio ativo. NADPH reduz o FAD, que, em seguida, passa os seus elétrons para uma ponte de dissulfeto presente no sítio ativo da enzima. Os dois grupos SH assim formados passam a interagir com GSSG e reduzi-la a 2GSH, refazendo a ligação dissulfeto da enzima (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012). Da mesma forma que SOD e CAT, Nascimento et al. (2014) e Ferreira et al. (2015) obtiveram uma redução da atividade da GPx em ratos provenientes de uma gestação com baixo teor proteico. Mais uma vez comprova-se a importância de se ter um eficiente sistema antioxidante no combate de EROs.

O sistema de tiorredoxina, que compreende NADPH, tiorredoxina redutase (TrxR), e tiorredoxina (Trx), é um importante sistema de redução de dissulfeto que pode fornecer elétrons para uma grande variedade de enzimas (LU; HOLMGREN, 2014). Tiorredoxina apresenta importante papel na defesa antioxidante e regulamentação do estado redox em animais. *In vivo*, a tiorredoxina atua como um agente redutor para ribonucleotídeo redutase e metionina sulfóxido redutase, enzimas que reparam o dano oxidativo de resíduos de metionina nas proteínas. Tiorredoxinas são polipeptídeos de massa molecular relativa de 12kDa, encontradas

em procariontes e eucariontes, sendo amplamente distribuídas em células de mamíferos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012).

Tiorredoxinas oxidadas são reduzidas, *in vivo*, pela enzima tiorredoxina redutase (TrxR), que contém selênio e FAD em seu sítio ativo, mostrando assim, semelhanças com a glutatona redutase, incluindo o uso de NADPH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012) como mostra a reação simplificada abaixo.

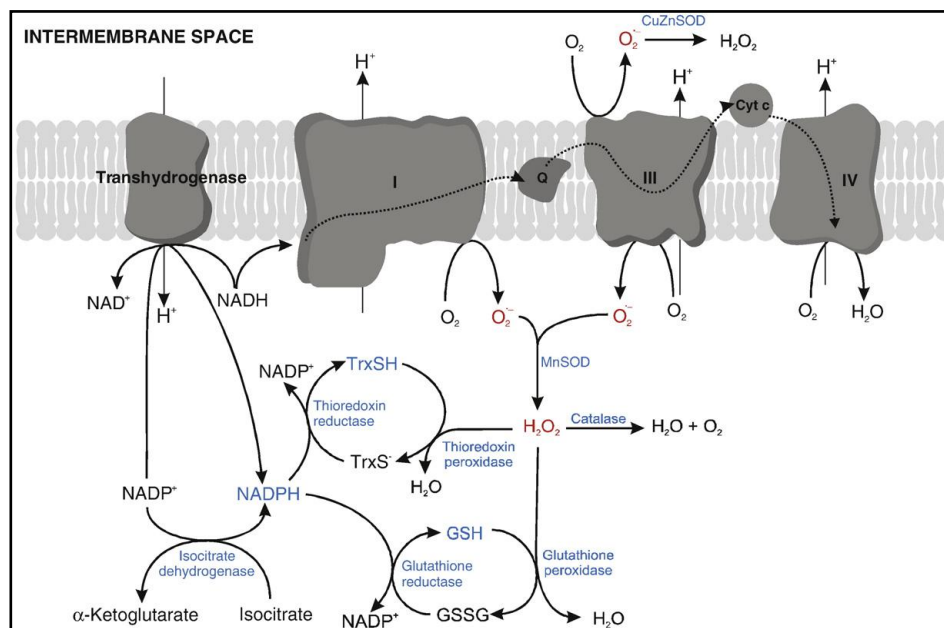


Três TrxRs são encontradas em células de mamíferos, TrxR1 citosólica, TrxR2 mitocondrial, e uma específica em testículos, tiorredoxina glutatona redutase (TGR) (LU; HOLMGREN, 2014).

O sistema tiorredoxina apresenta um papel chave na defesa contra o estresse oxidativo através da sua regulação na atividade da dissulfeto redutase regulando o equilíbrio ditiol/dissulfeto da proteína. O sistema Trx fornece os elétrons para peroxidases dependentes de tiol (peroxirredoxinas) para remover espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a uma rápida taxa de reação (LU; HOLMGREN, 2014).

O sistema antioxidante enzimático mitocondrial pode ser esquematizado conforme **Figura 2**.

**Figura 2:** Sistema antioxidante enzimático mitocondrial.



Fonte: Kowaltowski et al., 2009.

Transição de permeabilidade mitocondrial e estresse oxidativo são eventos que podem ocorrer em qualquer célula, desde que esta esteja em uma condição de desequilíbrio homeostático. Dessa forma, assim como em qualquer ser vivo, tais processos são igualmente ocasionados em mitocôndrias de peixes, os quais também possuem um eficiente sistema antioxidante.

### **1.3 Bioenergética Mitocondrial e Espécies Reativas de Oxigênio em peixes**

Além das funções já discutidas, as mitocôndrias estão sendo reconhecidas como biossensores para a toxicidade induzida por drogas (MOREIRA et al., 2011). A interação dessas organelas com xenobióticos é reconhecida por provocar alterações na bioenergética mitocondrial e induzir a formação de fatores que levam ao estresse.

Além disso, quando nas condições de poluentes, metais como cádmio (Cd), cobre (Cu), níquel (Ni), mercúrio (Hg), ferro (Fe) e dioxinas já foram identificados como agentes danificadores mitocondriais. Estes poluentes ambientais foram descritos como indutor do poro de TPM, levando ao inchamento mitocondrial, ativação da respiração basal e despolarização da membrana, bem como a diminuição da razão do controle respiratório (CR) e por induzir o estresse oxidativo (PARDO et al., 2009).

Grande parte dos modelos para estudos biológicos são os ratos, contudo, os peixes têm sido amplamente utilizados como modelos para avaliar a saúde dos ecossistemas aquáticos e algumas patologias toxicológicas (PEIXOTO et al. 2006; MACRAE; PETERSON, 2015).

Os peixes gastam quantidades significativas de energia para lidar com os inúmeros fatores bióticos e abióticos potencialmente estressantes em que eles comumente se encontram nos ambientes aquáticos. Isso acaba exigindo mais das mitocôndrias em respostas às mudanças ambientais (SAPPAL et al., 2015).

Quando submetidos a agentes estressores, os peixes passam a apresentar um desequilíbrio homeostático. Alterações no ambiente aquático como salinidade, temperatura e o oxigênio dissolvido afetam o crescimento, o metabolismo, a reprodução, a osmorregulação e a função imune (FOLTRAN, 2012). Desses fatores, a temperatura tem sido reportada como uma das principais causas de aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em peixes (FOLTRAN, 2012).

Como consequência, a capacidade de se adaptar a variações de temperatura

do ambiente é dependente da alteração dos processos metabólicos e bioquímicos, a fim de manter a homeostase (IFTIKAR; HICKEY, 2013). Por exemplo, quando submetidos à baixa temperatura, os peixes modificam a estrutura e função mitocondrial para melhorar o metabolismo aeróbio compensando assim as limitações funcionais e físicas impostas por essa diminuição na temperatura (KRAFFE et al., 2007; GUDERLEY, 2011).

Estudo realizado por Sappal e colaboradores (2015) investigou os efeitos que a interação do estresse térmico, condições de hipóxia-reoxigenação (HRO) e a presença cobre (Cu) podem causar à cadeia transportadora de elétrons de mitocôndrias hepáticas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Esses pesquisadores observaram que a aclimação em água com temperatura mais elevada que a ambiente reduziu a velocidade de fosforilação (estado 3) e aumentou a velocidade de repouso (estado 4) levando assim a um desacoplamento da fosforilação oxidativa. Nas condições de HRO, as taxas respiratórias máximas (estado 3) e basais (estado 4) foram profundamente inibidas, reduzindo o controle respiratório (CR). Já a presença de Cu provocou efeitos menos pronunciados na cadeia respiratória, porém inibiu a respiração via complexo II e IV, mas aumentou via complexo I e III.

O primeiro órgão a falhar em animais expostos ao estresse térmico é o coração. Para muitas espécies aquáticas, seus limites máximos de temperatura e insuficiência cardíaca são de apenas alguns graus a mais na temperatura ambiental. Trabalhando com um peixe comum na Nova Zelândia, *Notolabrus celidotus*, Iftikar e Hickey (2013) determinaram que a temperatura para causar insuficiência cardíaca foi de 27,5°C. Os autores observaram que a capacidade de síntese de ATP por mitocôndrias cardíacas foi limitada a 25°C, isto é, antes da temperatura limite para insuficiência cardíaca. Além disso, a 25°C também foram observadas alterações na cadeia transportadora de elétrons, liberação de citocromo c, permeabilidade a NADH e perda da integridade da membrana mitocondrial. Com isso, puderam concluir que as mitocôndrias podem mediar a insuficiência cardíaca quando peixes são submetidos ao estresse térmico.

Assim como a temperatura, os metais podem causar danos às mitocôndrias. Em meados da década de 70, o mercúrio (Hg) em sua forma orgânica, especialmente metil- e etilmercúrio, foram amplamente utilizados na agricultura. No entanto, essa prática foi interrompida em consequência de uma série de



intoxicações em massa, tanto em humanos como em espécies selvagens (CLARKSON; MAGOS, 2006). Nesse sentido, pesquisas recentes mostram que em ambientes aquáticos contaminados por Hg, os peixes desses ambientes apresentam elevados níveis do metal no fígado (NAVARRO et al., 2009; MIEIRO et al., 2012). Contudo, a forma em que esse se apresenta acumulado no organismo destes animais é predominantemente na forma inorgânica (MIEIRO et al., 2009).

A presença desse metal no organismo dos peixes afeta diversas proteínas relacionadas com a função mitocondrial (WANG et al., 2013). Branco et al. (2012) encontraram lesões no fígado de zebrafish quando expostos à Hg. A exposição das mitocôndrias do fígado de dois peixes marinhos (*Solea senegalensis* e *Sparus aurata*) ao cloreto de mercúrio provocou efeitos inibitórios sobre a fosforilação oxidativa e na cadeia transportadora de elétrons, além da inibição das atividades de succinato-desidrogenase e ATP sintase (MIEIRO et al., 2015).

Assim como em qualquer ser vivo, a principal fonte geradora de EROs em peixes é a mitocôndria. Peixes que nadam ativamente possuem as mitocôndrias de músculo vermelho como as principais geradoras de EROS, porém mitocôndrias isoladas de peixes provenientes de outros tecidos como fígado e coração também são importantes fontes geradoras de EROS (RAMSEY et al., 2005).

O sistema antioxidante é similar em diferentes grupos de vertebrados, e a maioria das espécies apresenta diferenças apenas na distribuição e na quantidade de enzimas antioxidantes de diferentes tecidos. Estudos mostraram que alterações nos níveis de atividade das enzimas antioxidantes podem ser usados como possíveis biomarcadores em diferentes organismos aquáticos (ORBEA et al., 2002; REGOLI et al., 2004; PEIXOTO et al., 2006).

Uma espécie aquática que vem sendo muito utilizada como modelo biológico é o zebrafish (*Danio rerio*), um teleósteo tropical que recentemente se tornou uma ferramenta atrativa para se estudar complicadas vias que regulam processos biológicos que fundamentam várias doenças humanas (LIESCHKE; CURRIE, 2007), dentre essas, várias patologias de ordem neurológica (KABASHI et al., 2010; PAQUET; SCHMID; HAASS, 2010).

O zebrafish tornou-se um dos, se não o mais importante modelo vertebrado proeminente para a busca de fenótipos-alvo de várias doenças. Isso se deve à diversas semelhanças entre a biologia humana e a desse peixe (MACRAE; PETERSON, 2015). Estudos recentes têm começado a estabelecer as capacidades

e limitações do zebrafish para a modelagem de doença, o rastreamento de drogas, identificação de alvo farmacológico e toxicológico (MACRAE; PETERSON, 2015).

Mitocôndrias de cérebro e músculo esquelético de zebrafish na presença de urânio ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) apresentaram elevação na taxa de respiração. Isto foi devido a um aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial interna, resultando numa redução do controle respiratório (LEREBOURS et al., 2010).

A fim de investigar os efeitos da exposição aguda do selênio presente em GSH, o qual é um biomarcador de estresse oxidativo, e a exposição de metalotioneína, um outro biomarcador que também exibe atividade de eliminação de radicais livres, Hauser-Davis et al. (2016) ao estudarem mitocôndrias de rim, fígado e cérebro de zebrafish, observaram que a concentração de GSH no fígado, rim e cérebro aumentou significativamente e que os níveis de metalotioneína no fígado e rim diminuíram, e que aumentaram no cérebro em virtude da ausência de mecanismos rápidos de desintoxicação.

A tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*), uma espécie nativa do continente africano, apresenta diversas características que a tornam um bom modelo biológico para o estudo da biotransformação de xenobióticos em estudos toxicológicos (PEIXOTO et al., 2006), pois segundo Ayroza (2009)

É de rápido crescimento, alimenta-se dos itens básicos da cadeia trófica e aceita grande variedade de alimentos, responde com a mesma eficiência a ingestão de proteínas de origem vegetal e animal, possui capacidade fisiológica de adaptar-se em diferentes ambientes e sistemas de produção, é resistente a doenças, densidades de estocagem elevadas e baixos teores de oxigênio dissolvido (AYROZA, 2009, p. 6).

Alterações significativas nos marcadores de estresse oxidativo relacionados com GSH, aumento na peroxidação de lipídios e de estresse com indução de geração de EROs no fígado de tilápia, foram observados quando expostas à ação do inseticida espinosina (PINER; ÜNER, 2013).

Mitocôndrias de células lesionadas de fígado de tilápia e zebrafish apresentaram elevação nos níveis de EROs e redução da atividade da enzima NADPH oxidase quando comparadas com células sem lesão e com células em processos de cicatrização (WU et al., 2014).

A capacidade de eliminação de EROs foi relatada em hidrolisados enzimáticos de proteínas derivadas de alimentos (RAJAPAKSE et al., 2005). A gelatina é rica em aminoácidos hidrofóbicos, e a abundância destes aminoácidos favorece elevação da atividade antioxidante.

Gelatina de pele de tilápia foi extraída para se obter um hidrolisado com a atividade de eliminação de radicais livres. Uma fração do hidrolisado mostrou uma forte atividade sequestradora do radical  $\text{OH}\cdot$ . Além disso, a atividade do hidrolisado frente a  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), e óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), em comparação com a glutatona reduzida (GSH) mostrou eliminação significativa dessas espécies reativas (ZHUANG, SUM; 2011).

Dessa forma, a tilápia pode ser considerada uma boa espécie para ser utilizada em programas de monitoramento ambiental (PEIXOTO et al., 2009), uma vez que alterações em suas enzimas antioxidantes e seus níveis de biotransformação refletem as condições do ambiente (PEIXOTO et al., 2006), também como modelo para determinação de EROs, poderia ser usada como um ingrediente funcional em medicina e indústrias alimentícias, entre outros fins.

Um peixe nativo da região do São Francisco e que também pode ser utilizado como modelo biológico, assim como o zebrafish e a tilápia, é o Pacamã.

### 1.3.1 *Lophiosilurus alexandri* (Pacamã)

A bacia do rio São Francisco, corresponde a 7,4% do território brasileiro, a qual envolve os Estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco, além do Distrito Federal, sendo que a região do Baixo São Francisco estende-se de Paulo Afonso até a foz no Oceano Atlântico, abrangendo áreas dos Estados da Bahia, Pernambuco, Sergipe e Alagoas. As águas do “Velho Chico”, como é popularmente conhecido, além de produzirem energia, conduzem ao desenvolvimento da região e alimentam a população, tendo a piscicultura como uma atividade de grande importância (PACHECO; LIRA, 2009).

Atualmente, a piscicultura brasileira tem se voltado para as espécies nativas em virtude do grande potencial econômico, quer sejam como peixe de mesa, peixe esportivo ou ornamental (SOUZA, 2015). Dentre as espécies encontradas na região do Baixo São Francisco, pode-se destacar o surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*), o pirá (*Conorhynchus conirostris*), o dourado (*Salminus brasiliensis*), a matrinhã (*Brycon lundii*) e, principalmente, o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

(SEABRA, 2010). Contudo, essas espécies estão em processo de extinção nesta região (TENÓRIO, 2003).

*Lophiosilurus alexandri*, conhecido popularmente como “pacamã” (**Figura 3**), é um peixe encontrado unicamente na América do Sul (SANTOS et al.,2012), sendo nativo e endêmico do rio São Francisco.

**Figura 3:** Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1874).



Esse peixe pertence à ordem Siluriforme e a família Pseudopimelodidae, uma família de bagres neotropicais de água doce, a qual é pouco estudada (BARROS et al., 2007).O pacamã apresenta cabeça achatada, mandíbula que ultrapassa a maxila superior e dentes que ficam fora da boca quando esta se encontra fechada.

É uma espécie carnívora que possui comportamento sedentário, quando comparada com a tilápia (SOUZA, 2015), dando preferência por ambientes lânticos em regiões com fundos de areia ou pedras (SEABRA, 2010) e de hábitos noturnos (COSTA et al., 2015). Sua pele apresenta cor de areia ou pedra, indo do amarelo, bege, marrom, cinza ao preto na parte superior do corpo, aparentemente para facilitar seu mimetismo, na parte inferior é branco (COSTA, 2012).

Essa espécie atinge a maturação de suas gônadas sexuais entre os meses de outubro a fevereiro (SANTOS et al.,2013) e apresenta desova parcelada, liberando seus ovos no substrato arenoso, além de manifestar cuidado parental (SEABRA, 2010). A fecundidade desta espécie é menor quando comparada com outras espécies aquáticas, mas é consistente com a natureza sedentária da espécie e o tamanho dos ovócitos é considerado grande. No entanto, a reprodução do pacamã em condições controladas ainda não foi estudada (COSTA et al., 2015).

Quando adulto, o pacamã pode atingir até 8 kg de peso corporal. Apresenta uma carne saborosa, sendo bastante apreciada devido à qualidade do filé (SANTOS, PEÇANHA, SILVA; 2013) e ausência de espinhos intramusculares (SEABRA, 2010).

Muitos estudos relatam que essa espécie apresenta grande potencial para a aquicultura (SATO et al., 2003; BARROS et al., 2007; GODINHO, 2007, MEURER et al., 2010) em virtude do seu valor de mercado e por ser utilizado em aquários, devido à sua anatomia externa exótica (SANTOS, 2012).

Porém, segundo Santos (2012), a pesca artesanal reduziu a população selvagem de Pacamã, fazendo com que seja pouco encontrada nos mercados de rua. O que agrava ainda mais essa situação é a ausência de criatórios com o intuito de produção em escala comercial (SOUZA, 2015) e o número de barragens de represamento ao longo do leito do rio São Francisco (SEABRA, 2010). Dessa forma, a espécie encontra-se ameaçada de extinção (COSTA et al., 2015).

Como o pacamã encontra-se em processo de extinção nos locais de ocorrência natural, estudos têm sido reportados com o intuito de ampliar o conhecimento sobre essa espécie. É possível encontrar informações na literatura sobre a criação em cativeiro de alevinos e juvenis para a reposição dos estoques naturais (MEUER et al., 2013; SOUZA, 2015).

Birindelli e Shibata (2011) estudaram sobre a morfologia da bexiga natatória e dos músculos constritores. Sua reprodução foi reportada por Sato et al. (2003) e Santos et al. (2013), a homologia entre os principais elementos dorsais do arco branquial em vertebrados com mandíbulas (*Gnathostomata*), entre eles *Lophosilurus alexandri*, foi evidenciada por Carvalho e colaboradores (2013).

Porém, nada se conhece a respeito dos parâmetros bioquímicos, sobretudo bioenergéticos dessa espécie, a qual pode ser utilizada futuramente como modelo biológico assim como o zebrafish e a tilápia.

Por ser um trabalho pioneiro a respeito da bioenergética mitocondrial de *Lophosilurus alexandri*, esse estudo representa uma grande relevância para as pesquisas bioquímicas no tocante a essa espécie, visto que a mitocôndria assume ampla participação no metabolismo celular, influenciando direta ou indiretamente os processos bioquímicos do animal como um todo. Assim, por encontrar-se em processo de extinção na região, o cultivo do pacamã é de suma importância para o seu repovoamento, assim como possibilitará a continuidade dos estudos referentes a seus parâmetros bioquímicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Estudar a bioenergética mitocondrial de mitocôndrias hepáticas isoladas *Lophiosilurus alexandri* comparadas com as mitocôndrias de *Oreochromis niloticus*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade dos complexos I, II, III e IV de mitocôndrias hepáticas isoladas do *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e *Oreochromis niloticus* (tilápia) *in vitro*;
- Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio das mitocôndrias hepáticas isoladas do *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e *Oreochromis niloticus* (tilápia) *in vitro*;
- Avaliar o sistema antioxidante do fígado do *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e *Oreochromis niloticus* (tilápia) *in vitro*, através da atividade das enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx).

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Materiais e Reagentes**

Os reagentes utilizados nos ensaios são de grau analítico de pureza. As soluções foram preparadas com água ultra pura com resistividade específica de 18,2 M $\Omega$  cm, a partir de um sistema de purificação Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA).

#### **3.2 Animais e Tratamento**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo e Proteomica (LAMP) do IQB/UFAL. Os pacamãs foram doados pela 3ª Superintendência Regional da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF - Petrolina/PE) e 5ª Superintendência Regional da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF - Porto Real do Colégio/ AL). Por outro lado, as tilápias foram adquiridas exclusivamente da CODEVASF - Porto Real do Colégio/AL.

Foram utilizados oito aquários de poliestireno com capacidade de 70L cada e os animais, 73 pacamãs, com peso médio de 2,57  $\pm$  0,122 g e 26 tilápias, com peso médio de 102,3  $\pm$  5,462 g foram distribuídos numa densidade de cinco peixes por aquário, respectivamente, e em períodos experimentais diferentes.

Estes aquários eram dotados de sistema de recirculação de água com biofiltro e sistema de aeração por meio da queda da água pelo retorno aos aquários com a utilização de bomba submersa colocada dentro do filtro. Para a filtração biológica, foi utilizado o acelerador biológico Spacial Blend (Microbe Lift®), composto à base de bactérias nitrificantes que reduzem os níveis de amônia e nitratos, remove odores e limpa a água turva.

Os animais permaneceram nos aquários sem qualquer procedimento experimental, por um período de 15 dias, para adaptação ao ambiente, manejo e fornecimento de ração, sendo esta fornecida três vezes ao dia (8; 14 e as 18 h). O último fornecimento foi intensificado, garantindo uma maior quantidade e a permanência do alimento durante a noite, visto que o hábito alimentar da espécie é noturno. Todos os dias, antes do primeiro fornecimento de ração, os aquários foram limpos através de sifonamento para garantir a retirada de fezes e resíduos de ração e propiciar a manutenção de qualidade da água.

Para confecção da dieta padrão, **Tabela 1**, os ingredientes foram moídos em um moinho de faca, com peneira 0,5 mm e misturados de maneira homogênea. Efetuou-se a peletização das rações por umedecimento das mesmas (25% do peso seco da ração) com água à temperatura de 65°C, e então foram peletizadas e secas em estufa de ventilação forçada (TECNAL TE-394/2, Brasil). Após este procedimento os peletes foram classificados com a finalidade de propiciar o tamanho adequado ao consumo do animal.

**Tabela 1:** Composição percentual e nutricional da dieta padrão.

| INGREDIENTES                  | Porcentagem (%) |
|-------------------------------|-----------------|
| Farelo Soja                   | 56,94           |
| Farinha Peixe                 | 5,00            |
| Fubá Milho                    | 30,20           |
| Celulose                      | 0,59            |
| DL – Metionina                | 0,22            |
| Óleo Soja                     | 0,84            |
| Fosfato Bicálcico             | 4,37            |
| Calcário                      | 1,20            |
| Vit C                         | 0,05            |
| Sal comum                     | 0,07            |
| Premix vitam/min <sup>1</sup> | 0,50            |
| BHT                           | 0,02            |
| <b>Total</b>                  | <b>100,0</b>    |

<sup>1</sup>SUPREMAIS: ácido fólico 600 mg, biotina 24 mg, cloreto de colina 54 g, niacina 12000 mg, pantetonato de cálcio 6000 mg, vit.A 600000 UI, vitB<sub>1</sub> 2400 mg, vitB<sub>12</sub> 2400 mg, vitB<sub>2</sub> 2400 mg, vitB<sub>6</sub> 2400 mg, vitC 24 g, vitD<sub>3</sub> 100000 UI, vitE 6000 mg, vitK<sub>3</sub> 1200 mg, Co1 mg Cu 300 mg, Fe 5000 mg, iodo 10 mg, Mg 2000 mg, Se 10 mg, Zn 3000 mg.

**Fonte:** elaborado pela autora, 2016.

Os cuidados realizados com o pacamã referentes ao tempo de adaptação, alimentação e limpeza dos aquários, foram os mesmos realizados para a tilápia, apesar da criação dos animais não ter ocorrido concomitantemente no mesmo período. Entretanto, o número de animais utilizados para a realização desse estudo foi baseado conforme o tipo de experimento realizado. Para avaliar o consumo de oxigênio e estimativa da produção de EROs, foram sacrificados três pacamãs, em que os fígados provenientes de cada animal (três fígados no total) formaram um *pool* de mitocôndrias. Uma unidade experimental (n) foi considerada como sendo o número de experimentos interdependentes realizados.



Enquanto para as tilápias, em virtude do tamanho do animal, conseqüentemente do fígado, ser maior em comparação com os do pacamã, não foi preciso fazer um *pool* de mitocôndrias, ou seja, utilizar mais de um fígado para realizar as análises. Dessa forma, uma unidade experimental (n) considerando as tilápias no experimento de consumo de oxigênio (10 animais) e para a estimativa da produção de EROs (3 animais), representa o número de animais sacrificados. Por outro lado, para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes uma unidade experimental (n) representa o número de fígados unitários utilizados (n=5) nas análises em ambas as espécies.

### **3.3 Isolamento de Mitocôndrias Hepáticas**

O sacrifício dos animais ocorreu através do uso de uma super dosagem do anestésico benzocaína a uma concentração de 250 mg.L<sup>-1</sup> diluídos na água. O sacrifício foi conduzido conforme as normas do Colégio Brasileiro de Ética em Experimentação Animal, COBEA, da Declaração de Helsinque e sobre a orientação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFAL (Projeto 23/2013).

As mitocôndrias foram isoladas de fígado de pacamã de acordo com metodologia de Zhao (2011), onde após a retirada de tal órgão, o mesmo foi pesado com auxílio de balança analítica eletrônica, Marte (modelo AY220, Brasil), e imediatamente colocado em meio de isolamento gelado (750 mM sacarose, 215 mM manitol, 1 mM EDTA, 15 mM HEPES, 0,1% (m/v) de albumina bovina sérica (BSA), pH 7,2). A finalidade de inserir o órgão neste meio de isolamento consiste na possibilidade de manter as mitocôndrias em um ambiente que simula as condições osmóticas da célula, permanecendo, assim, sua vitalidade.

Em seguida, o fígado, presente no meio de isolamento, foi picotado manualmente com o auxílio de uma tesoura. Posteriormente, foi homogeneizado em homogeneizador Potter-Elvehjem, utilizando um agitador mecânico IKA-LABORTECHNIK (modelo IKARW20N, EUA). Vale salientar que todo esse procedimento, desde a retirada do fígado, foi realizado em gelo. Por fim, o homogenato foi centrifugado, utilizando uma centrífuga HERMLE (modelo Z326, Brasil), a 4°C durante 10 minutos à 1000xg. A finalidade dessa primeira centrifugação consiste em eliminar os resíduos de células intactas, núcleos, membranas e demais organelas. O sobrenadante resultante foi removido, com o auxílio de um pipeta de Pasteur, e centrifugado a 4°C por 10 minutos à 10000x g. O

pellet foi ressuspenso no meio de isolamento e centrifugado novamente à 10000xg na mesma temperatura e pelo mesmo tempo. Com isso, obteve-se uma suspensão mitocondrial.

### **3.4 Dosagem de Proteína**

Logo após o isolamento, a concentração de proteína de tal suspensão mitocondrial foi determinada pelo método de Bradford (1976) usando um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo Shimadzu (modelo TCC-240A, Japão) equipado com cubetas de vidro de 1,0 cm de caminho óptico. Uma curva de calibração com concentrações conhecidas de BSA a  $2\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  foi utilizada como padrão.

### **3.5 Meio de Reação Padrão**

Os experimentos foram realizados em meio de reação padrão contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 2mM de fosfato inorgânico, 1mM de  $\text{MgCl}_2$  e 10 mM de HEPES. O pH foi aferido a 7,2 utilizando um medidor de pH Marconi (modelo MA255/P, Brasil).

### **3.6 Consumo de Oxigênio Mitocondrial**

Para a medição do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas, foi utilizado um eletrodo de oxigênio do tipo OXIGY Oxygraph (Hansatech Instrument, EUA) contendo uma câmara de vidro de 1,0 mL equipada com agitador magnético. A concentração de oxigênio inicial no meio de reação foi de  $228\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$  (ROBINSON, COOPER, 1970). Antes da realização dos experimentos, o eletrodo era calibrado utilizando ditionito de sódio.

Para avaliar os quatro complexos da cadeia respiratória, foram ofertados substratos e alguns inibidores específicos para os referidos complexos. A fim de avaliar a atividade da enzima NADH desidrogenase (complexo I) foi ofertado às mitocôndrias de fígado de pacamã e tilápia uma mistura de substratos (malato 0,68 mM, glutamato 0,34 mM,  $\alpha$ -cetogluturato 0,34 mM e piruvato 0,34 mM) que são geradores de NADH. Já para se avaliar ação da succinato desidrogenase (complexo II), foi primeiramente utilizado um inibidor do complexo I, rotenona 1,0 mM, e em seguida, succinato 1,0 M, que leva à geração de  $\text{FADH}_2$ , como substrato para o referido complexo.

A fim de avaliar o consumo de oxigênio no complexo III e no complexo IV, as mitocôndrias isoladas de fígado de pacamã e tilápia foram submetidas à presença de 1mM de antimicina A (AA), uma droga que bloqueia a transferência de elétrons do citocromo b ao citocromo  $c_1$ , e aos substratos TMPD a 100 mM e ascorbato 500 mM para o complexo IV e o inibidor deste mesmo complexo, KCN a 1M. As análises foram realizadas em triplicata. Os valores para consumo de oxigênio são representados em  $\text{nmol O}_2 \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ .

### **3.7 Estimativa da Produção de EROS**

A geração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi monitorada por espectrofluorimetria, utilizando um espectrofluorímetro Shimadzu RF (modelo 5301PC, Japão) utilizando cubetas de quartzo com capacidade de 1 mL, respectivamente, com 1,0 cm de caminho óptico. Como sonda, foi utilizado o AmplexRed (N-acetil-3,7-dihydroxyphenoxazine) a 50  $\mu\text{M}$  na presença de 0,025  $\mu\text{M}$  de peroxidase (HRP) (ZHOU et al, 1997).

A referida sonda é seletiva para determinação de peróxido de hidrogênio. É um composto não fluorescente que é convertido pela ação do catalisador, peroxidase (HRP), na presença de peróxido de hidrogênio à resorufina, um produto altamente fluorescente. A estequiometria desta reação é da ordem de 1:1 em relação ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado e a sonda fluorescente. Esta fluorescência foi monitorada em um comprimento de onda de 563 nm para excitação e, 587 nm para emissão, com a largura da fenda de 3 mm. A curva de calibração foi feita com quantidades conhecidas de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , a fim de obter uma concentração final de 50 nM. As análises foram realizadas em triplicata.

### **3.8 Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidantes**

A avaliação da atividade das enzimas antioxidantes se deve mediante a utilização do tecido por completo. Neste caso, foram utilizados, individualmente, os fígados dos animais para quantificar as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutational Peroxidase (GPx).

#### *3.8.1 Determinação de superóxido dismutase (SOD)*

A atividade dessa enzima foi avaliada através do método de auto-oxidação do pirogallol, o qual compete com a SOD podendo ser medido em espectrofotômetro a 420 nm. Em uma cubeta de quartzo de 1 mL, foi adicionado tampão fosfato 50mM,

amostra, catalase e pirogalol. Após a adição de cada um dos reagentes era realizada uma homogenização manual com o auxílio de uma micropipeta (100-1000 $\mu$ L). A absorbância foi registrada por um período de 3 minutos. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína (MARKLUND, 1985). Uma unidade da SOD é definida como sendo a quantidade de proteína requerida para inibir a auto oxidação de 1  $\mu$ mol de pirogalol por minuto.

### 3.8.2 Ensaio da catalase (CAT)

O princípio do ensaio é baseado na determinação da constante k de decomposição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (AEBI; 1984). Nas condições experimentais empregadas (20°C de temperatura, pH 7,0 e 50 mM de tampão fosfato), a constante k foi definida como 4,6 x 10<sup>7</sup>. A atividade enzimática da catalase foi medida através das mudanças na absorbância em 240 nm por minuto, durante 2 min. Os resultados foram expressos em unidade por miligrama de proteína. Uma unidade de catalase é definida como sendo a concentração de proteína requerida para converter 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto a H<sub>2</sub>O.

### 3.8.3 Atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

A atividade da Glutathiona peroxidase foi medida de acordo com PAGLIA, VALENTINE (1967). Foram misturados tampão fosfato 50 mM (pH 7,0) contendo 5mM de EDTA, NADPH 8,4 mM, glutathiona redutase (100 $\mu$ L/mg proteína/ml), NaN<sub>3</sub> 1,125M, glutathiona reduzida 0,15M e a amostra. A reação enzimática iniciou-se pela adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2,2 mM. A conversão do NADPH em NADP foi medida pela absorbância do sistema em espectrofotômetro a 340 nm por 4 minutos após o início da reação. A unidade enzimática é definida como oxidação de 1  $\mu$ mol de NADPH por minuto por miligrama de proteína e foi calculado com base na absorvidade molar do NADPH a 340 nm.

## 3.9 Análise Estatística

Foi considerado um mínimo de três ensaios independentes para a realização do tratamento estatístico. Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SE). As comparações entre os grupos foram analisadas através do teste t de

Student, para comparações não pareadas entre grupos experimentais, e One-Way ANOVA utilizando o software GraphPad Prism 6. O nível mínimo de significância estatística foi estabelecido em  $p < 0,05$  em todas as análises.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Consumo de Oxigênio de Mitocôndrias Hepáticas

Devido à ausência de conhecimentos da bioenergética mitocondrial do *Lophiosilurus alexandri*, o primeiro passo para tal estudo foi a avaliação de cada um dos quatro complexos da cadeia transportadora de elétrons através do consumo de oxigênio.

Os resultados presentes na **Tabela 2** mostram que a velocidade de fosforilação (estado III), nomeada nos experimentos como V<sub>3</sub> foi maior para o complexo I do que para o complexo II, no pacamã. Já a velocidade de repouso (estado IV), nomeada como V<sub>4</sub>, e a velocidade de desacoplamento (V<sub>FCCP</sub>) apresentaram valores menores para o complexo I, quando comparados com os valores obtidos pelo complexo II do pacamã.

**Tabela 2:** Consumo de oxigênio de mitocôndrias hepáticas do *Lophiosilurus alexandri* utilizando substratos ligados ao NADH para o complexo I e succinato para o complexo II.

|             | V <sub>3</sub><br>(nmol O <sub>2</sub> /mg/min) | V <sub>4</sub><br>(nmol O <sub>2</sub> /mg/min) | V <sub>FCCP</sub><br>(nmol O <sub>2</sub> /mg/min) |
|-------------|---|---|--|
| Complexo I  | 2,61 ± 0,26                                     | 1,01 ± 0,08                                     | 1,79 ± 0,23  |
| Complexo II | 1,77 ± 0,24                                     | 1,17 ± 0,07                                     | 2,17 ± 0,34  |

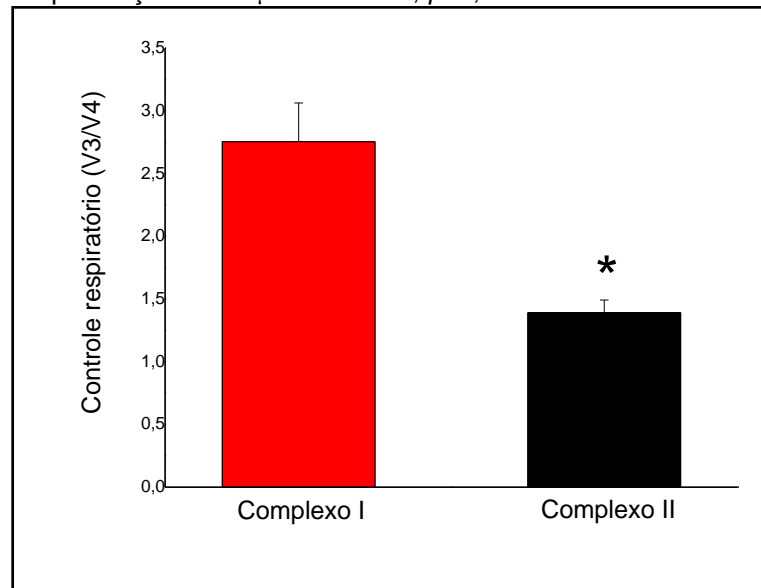
Mitocôndrias hepáticas do *Lophiosilurus alexandri* (0,5mg/ml) incubadas em meio de reação padrão na presença de 200µM de EGTA. Resultados são médias ± SE  $p > 0,05$ , n=4.

**Fonte:** elaborado pela autora, 2016.

É possível observar pela **Tabela 2** que não há diferença estatística no estado III e no estado IV para os complexos I e II do pacamã. Os resultados ainda demonstraram que, independente do substrato ofertado, não há diferença na velocidade de desacoplamento em ambos os complexos dessa espécie.

A razão entre os valores de V<sub>3</sub> e V<sub>4</sub> determina o controle Respiratório (CR). Na **Figura 4** observa-se os CRs de mitocôndrias isoladas de fígado de pacamã para os complexos I e II. Os resultados demonstram que maior controle respiratório foi obtido pela oxidação do substrato via complexo I.

**Figura 4:** Controle respiratório na presença de substratos para o complexo I e complexo II em mitocôndrias de fígado do *Lophiosilurus alexandri* (MFL). MFL (0,5mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão na presença de 200  $\mu$ M de EGTA,  $p < 0,05$ . Resultados são médias  $\pm$  SE (n=4).



**Fonte:** elaborado pela autora, 2016.

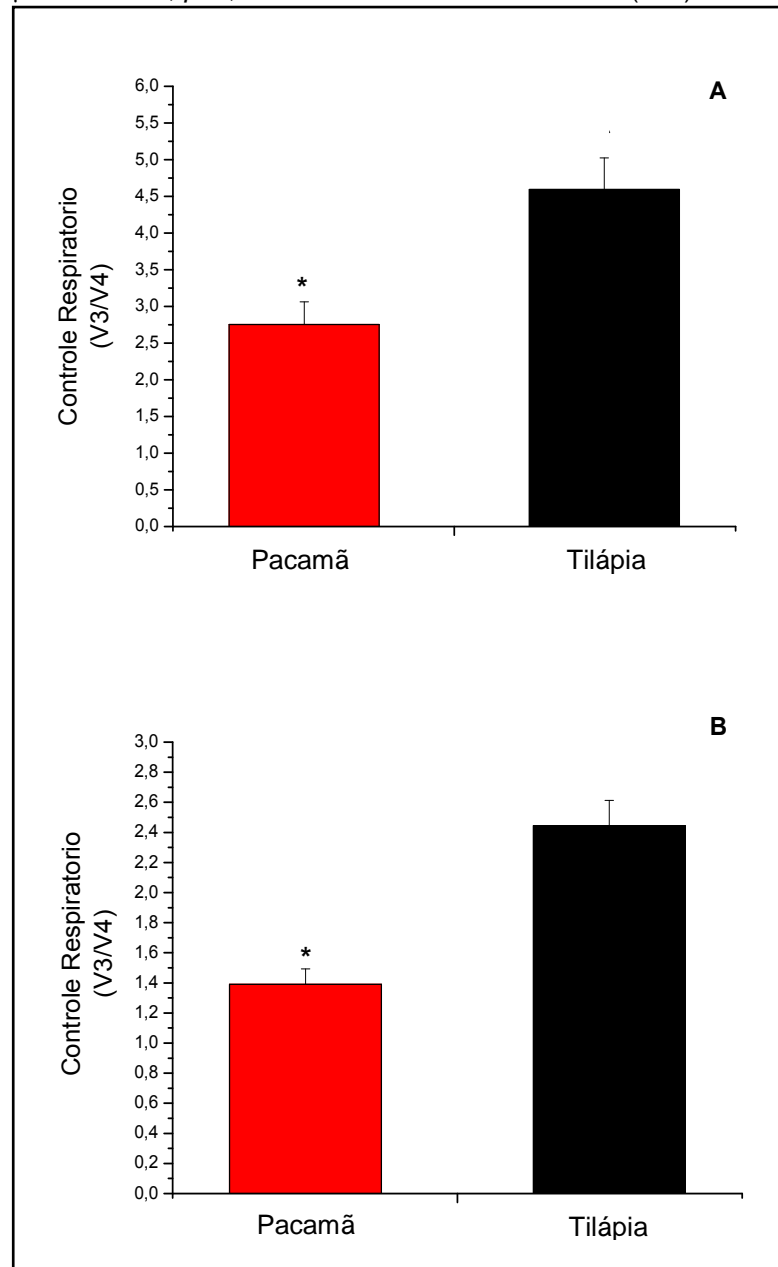
Apesar dos valores de V3 e V4 não apresentarem diferença estatística, para ambos os complexos, os resultados para controle respiratório demonstram apresentar essa diferença, a qual foi dependente do substrato ofertado.

Na tentativa de se ampliar os conhecimentos sobre a bioenergética do pacamã encontrados na região, foram desenvolvidos experimentos com a tilápia, como peixe comparativo, visto que não há na literatura estudos retratando o metabolismo energético do modelo experimental. De forma semelhante, Ronchi e colaboradores (2015) ao trabalharem com um marsupial (*Gracilinanus microtarsus*) do qual nenhum parâmetro bioenergético era conhecido, realizaram comparações com camundongos.

A **Figura 5A** mostra que mitocôndrias hepáticas de tilápia apresentam maior controle respiratório via complexo I quando comparado aos valores obtidos desse mesmo complexo para mitocôndrias isoladas de fígado de pacamã. Os resultados obtidos expressam que o controle respiratório do pacamã é 20% menor do que o da tilápia quando se utilizam substratos do complexo I.

Na **Figura 5B** é possível observar que as mitocôndrias de tilápia possuem maior controle respiratório mediante oxidação do succinato via complexo II em comparação à oxidação do mesmo substrato no referido complexo nas mitocôndrias do pacamã. Tal resultado representa que o controle respiratório do pacamã é cerca de 28% menor do que o da tilápia para este complexo.

**Figura 5:** Controle respiratório de mitocôndrias hepáticas isoladas do *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e *Oreochromis niloticus* (tilápia). Na presença de substrato para complexo I (5 mM substratos ligados ao NADH) **(A)** e na presença de substrato para complexo II (5 mM de succinato e 2 uM rotenona) **(B)**. Mitocôndrias (0,5mg/ml) foram incubadas em meio de reação padrão na presença de 200  $\mu$ M de EGTA,  $p < 0,05$ . Resultados são médias  $\pm$  SE (n=5).



Fonte: elaborado pela autora, 2016

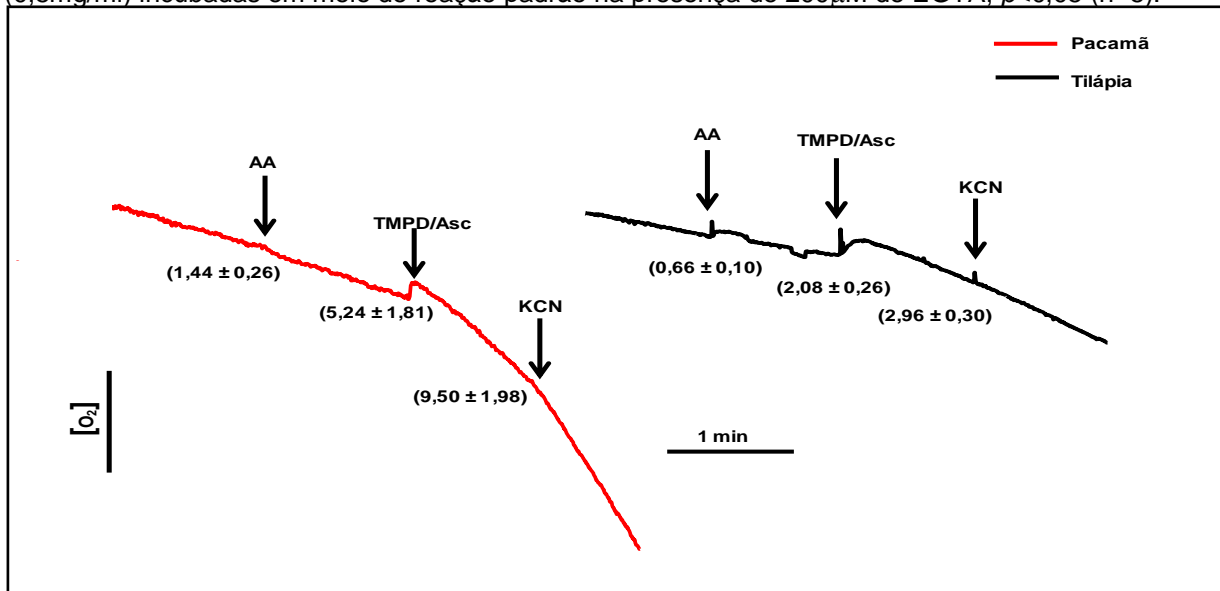
Os resultados obtidos também apontam que o controle respiratório de tilápia é maior quando se utiliza uma mistura de substratos (malato, glutamato,  $\alpha$ -cetoglutarato e piruvato) para o complexo I do que quando se utiliza succinato como substrato para o complexo II.

Dando continuidade aos experimentos sobre o funcionamento dos complexos da cadeia transportadora de elétrons, é possível observar na **Figura 6** que há um



maior consumo de oxigênio pelas mitocôndrias de pacamã do que na tilápia, tanto via complexo III como complexo IV.

**Figura 6:** Efeito de AA, TMPD/Asc e KCN sobre consumo de oxigênio de mitocôndrias isoladas de fígado do *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e *Oreochromis niloticus* (tilápia). Mitocôndrias hepáticas (0,5mg/ml) incubadas em meio de reação padrão na presença de 200 $\mu$ M de EGTA,  $p < 0,05$  (n=5).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

#### 4.2 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio em Mitocôndrias Hepáticas

Ao ser medida a produção de espécies reativas de oxigênio, mais precisamente de peróxido de hidrogênio, é possível observar na **Figura 7A** a alteração na fluorescência ao se utilizar o Amplex-Red entre as mitocôndrias hepáticas de pacamã e tilápia. Na **Figura 7B** observa-se que alterações nas fluorescências das mitocôndrias isoladas de fígado de pacamã e tilápia indicam que os pacamãs estão com uma maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que a encontrada na tilápia. Esse resultado sugere que a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou sua taxa de eliminação é significativamente maior em mitocôndrias de pacamã, em relação ao produzido pelas tilápias.

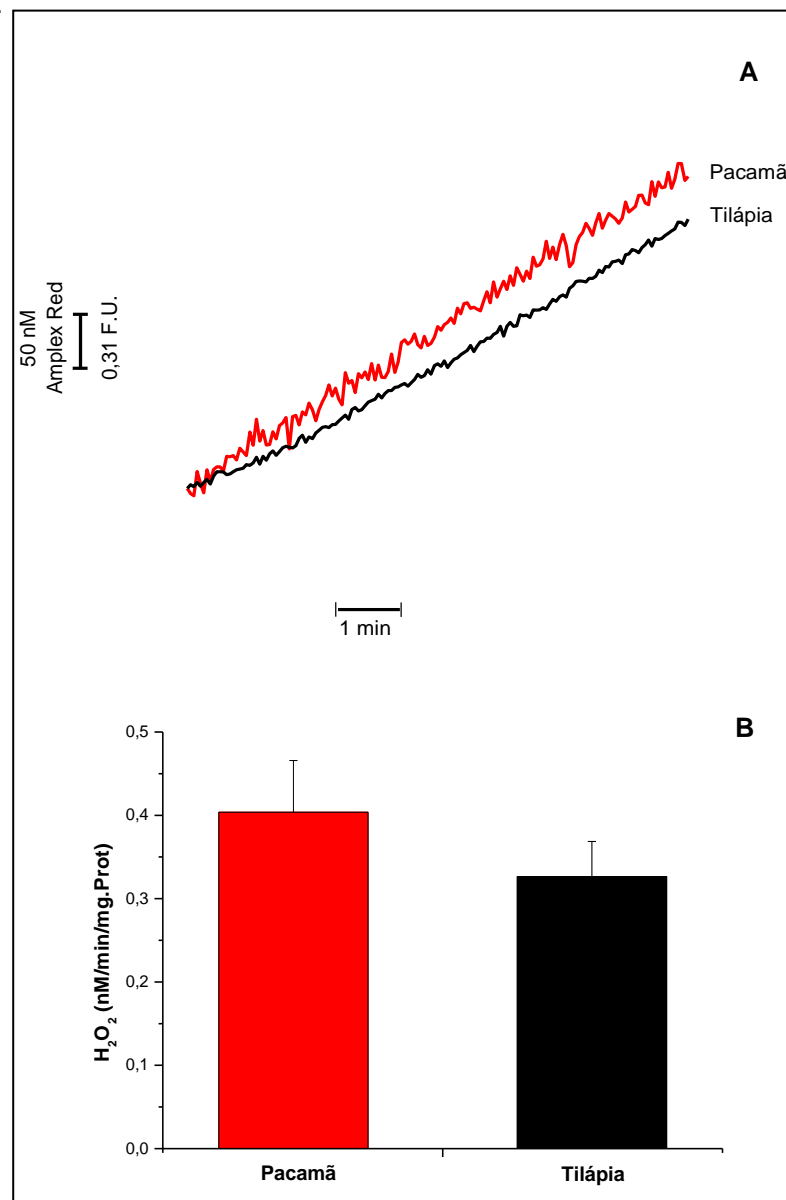
A concentração de cálcio endógeno mitocondrial (controle) é de 10  $\mu$ M de Ca<sup>2+</sup>, que são provenientes dos estoques fisiológicos da mitocôndria (KOWALTOWSKI, 1996). Porém, quando expostas a uma condição em que há excesso de cálcio e/ou EGTA, as mitocôndrias hepáticas de pacamã apresentaram alterações na produção de peróxido de hidrogênio (**Figura 8**).

Ao serem submetidas a uma concentração de cálcio exógeno ( $\approx 10$   $\mu$ M), a suspensão mitocondrial, apresentou um aumento de 14% na geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

quando comparada com a condição controle. Já quando as mitocôndrias de fígado de pacamã encontravam-se em um meio em que há um alto teor de EGTA (200  $\mu\text{M}$ ) foi observado um decréscimo de 10% na produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  frente à situação controle. Estas condições não foram avaliadas para as mitocôndrias de tilápia, uma vez que essa espécie não era o foco principal do estudo.

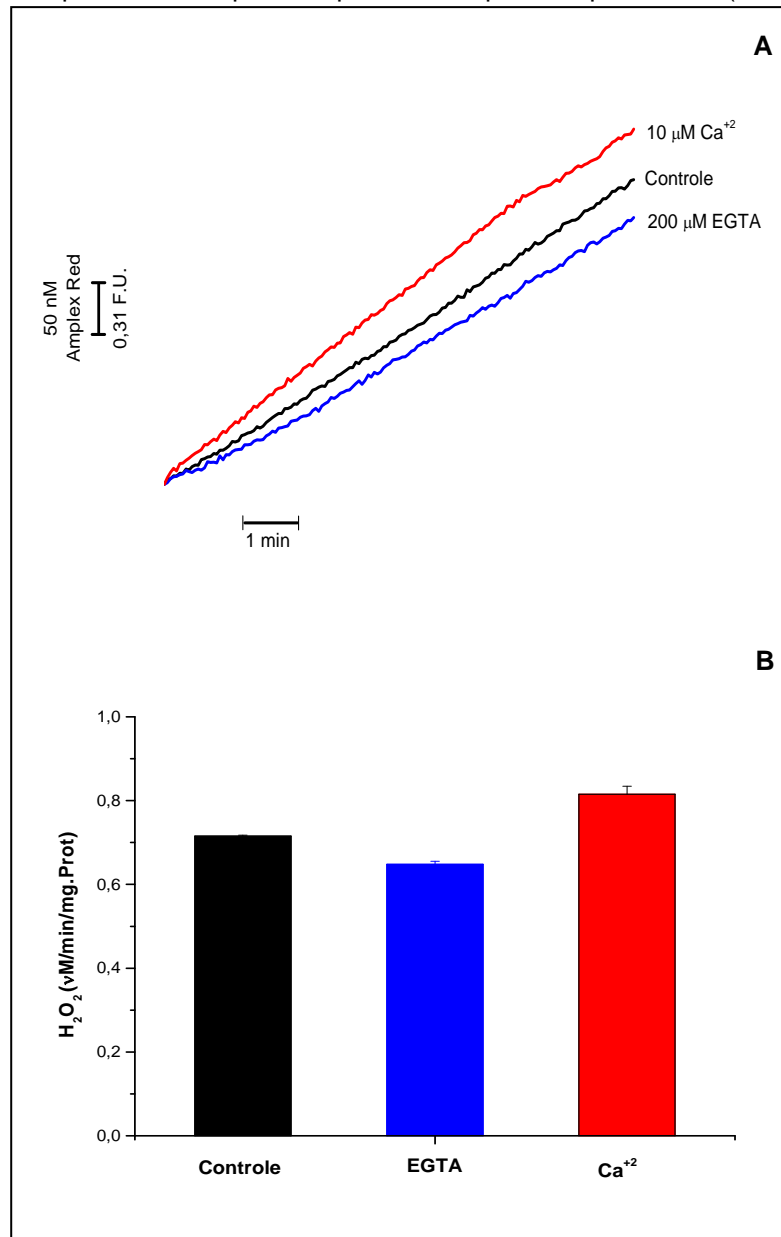
Na **Figura 8A** são observadas alterações nas fluorescências emitidas pela sonda utilizada (Amplex-Red) nas condições apresentadas. A **Figura 8B** apresenta a quantificação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido pelas mitocôndrias quando na presença de cálcio contaminante (controle) e em altas concentrações de cálcio e EGTA.

**Figura 7:** Medida da geração de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias do fígado do *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e de *Oreochromis niloticus* (tilápia) **(A)**. Quantificação da produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  na presença de 10  $\mu\text{M}$  de cálcio, **(B)**. Resultados são médias  $\pm$  SE  $p < 0,386$  para Pacamã e  $p < 0,263$  para tilápia ( $n=3$ ).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

**Figura 8:** Medida da geração de peróxido de hidrogênio em mitocôndrias do fígado de *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) **(A)**. Produção de produção de  $H_2O_2$  na presença de  $10 \mu M$  de cálcio,  $200 \mu M$  de EGTA e na condição controle (Fig. 8A). Produção de  $H_2O_2$  em diferentes situações **(B)**. Resultados são médias  $\pm$  SE  $p < 0,013$  para controle,  $p < 0,048$  para EGTA,  $p < 0,118$  para cálcio ( $n=3$ ).

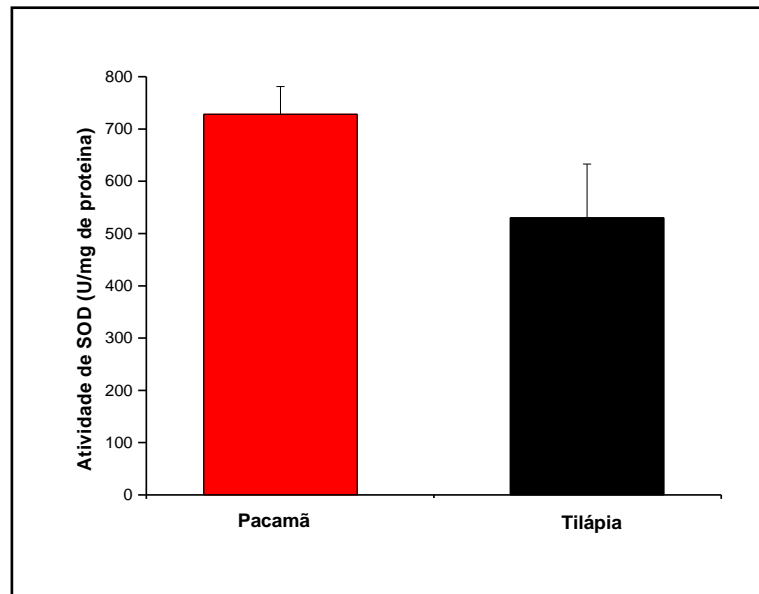


Fonte: elaborado pela autora, 2016.

### 4.3 Atividade das Enzimas Antioxidantes

Com a finalidade de avaliar através de outros parâmetros o estresse oxidativo nesses animais, foi analisada a atividade das enzimas antioxidantes de fígado de pacamã e tilápia. Por meio da **Figura 9** é possível observar uma maior atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) de fígado de pacamã do que no fígado de tilápia.

**Figura 9:** Atividade da enzima superóxido dismutase no fígado do *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e *Oreochromis niloticus* (tilápia). Valores representam a média  $\pm$  S.E.  $p < 0,125$  (n=5).



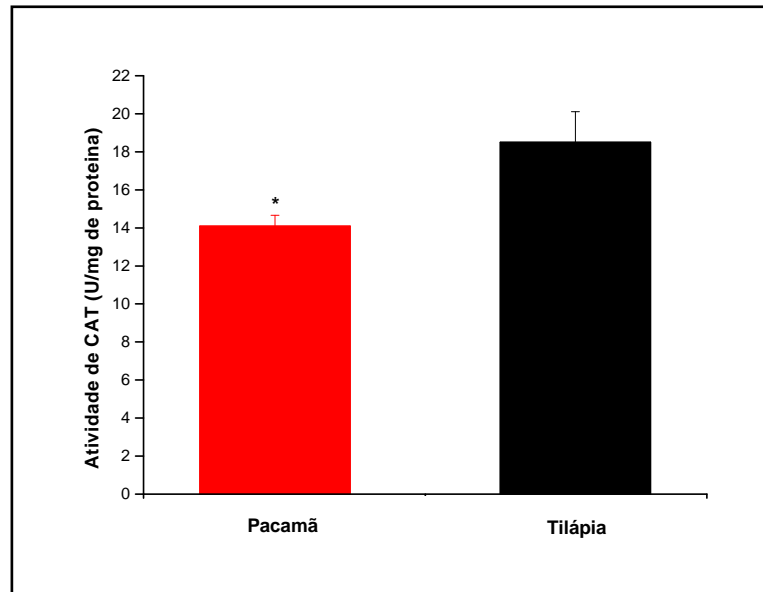
**Fonte:** elaborado pela autora, 2016.

Os resultados não diferem estatisticamente entre os valores obtidos para esse ensaio. Contudo, não é possível inferir que o pacamã encontrava-se em uma maior condição de estresse do que a tilápia, pois não há na literatura científica trabalhos com o pacamã em homeostase e estresse para que pudesse haver uma comparação efetiva, assim, tal condição pode ser inerente da espécie. Entretanto, os dados obtidos sugerem que a maior produção de  $H_2O_2$  pode estar relacionada com uma atividade superior da enzima SOD no pacamã. Em contrapartida, uma atividade inferior a 27,2% observada no fígado de tilápia corrobora com o dado de menor produção de peróxido de hidrogênio nessa espécie.

Outra enzima antioxidante chave no processo de estresse oxidativo avaliada foi a catalase (CAT). A fim de reduzir os níveis de peróxido de hidrogênio na mitocôndria, essa hemoproteína catalisa a redução de  $H_2O_2$  em água e oxigênio.

Na **Figura 10** pode-se observar que a função da enzima catalase estava mais evidenciada no fígado de tilápia do que no pacamã. Com esse resultado foi possível inferir que as mitocôndrias de tilápia apresentavam uma elevada atividade dessa enzima na conversão do peróxido de hidrogênio a oxigênio molecular e água. Tal resultado sugere que em virtude da alta concentração de  $H_2O_2$  pelas mitocôndrias de pacamã, a enzima catalase desse animal possivelmente encontra-se saturada com o substrato ( $H_2O_2$ ), ou seja, pode não haver enzima disponível para catalisar a degradação do peróxido.

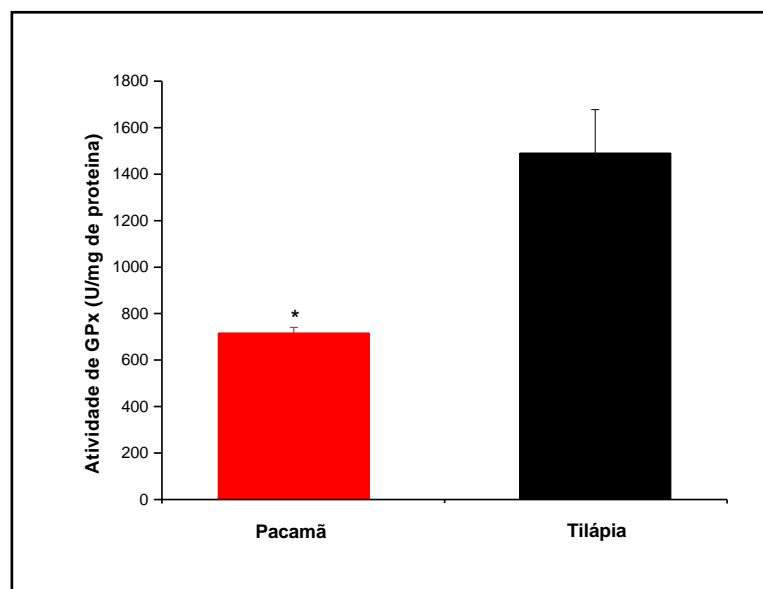
**Figura 10:** Atividade da enzima catalase no fígado de *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e *Oreochromis niloticus* (tilápia). Os valores são média  $\pm$  SE, \* $p < 0,0418$  (n= 4).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

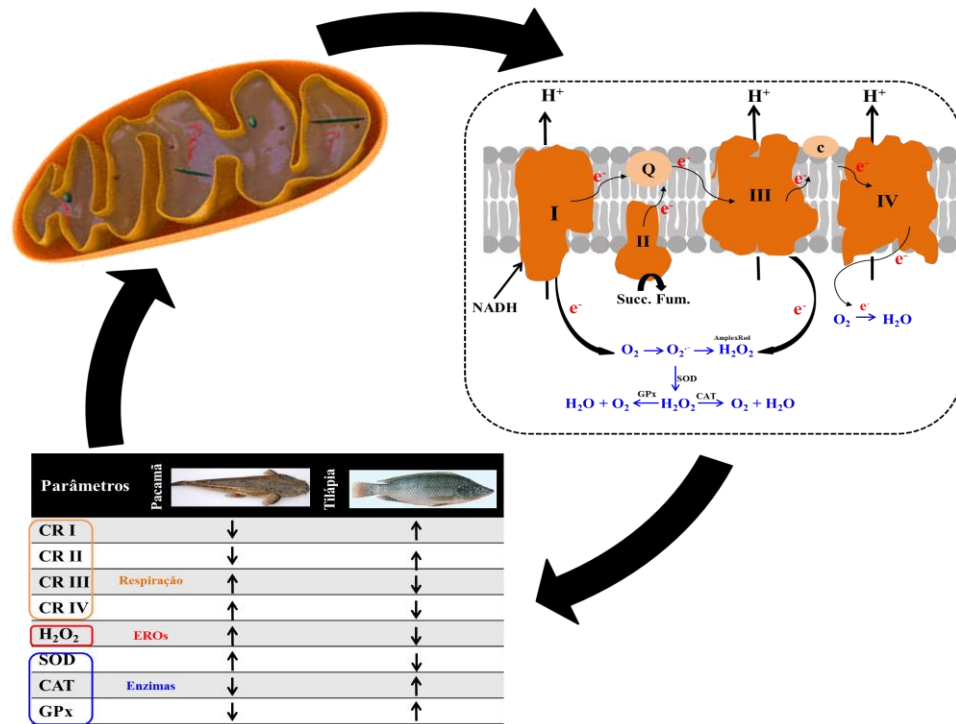
Por fim, foi analisada também a atividade da enzima glutathione peroxidase. Essa enzima também catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio à água ao utilizar como substrato a glutathione reduzida. A atividade da glutathione peroxidase (GPx) mostrou-se maior no fígado de tilápia do que no de pacamã (**Figura 11**). Esse resultado corrobora com o que foi apresentado através da atividade da enzima catalase e apresentou diferença estatística de forma considerável.

**Figura 11:** Atividade de glutathione peroxidase no fígado do *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) e *Oreochromis niloticus* (tilápia). Os valores representam média  $\pm$  SE, \* $p < 0,006$  (n= 4).



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

Dessa forma, também é possível supor que o fígado de tilápia apresenta maior capacidade de conversão do peróxido de hidrogênio a água, que o fígado de pacamã. Segue abaixo um esquema comparativo dos resultados obtidos para o Pacamã e a Tilápia.



Fonte: elaborado pela autora, 2016.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Consumo de Oxigênio de Mitocôndrias Hepáticas

Os resultados demonstraram (**Tabela 2**) que ao ser ofertado substrato para o complexo I ocorre um maior consumo de oxigênio na velocidade de fosforilação ( $V_3$ ), ou seja, na presença de ADP exógeno em mitocôndrias hepáticas de pacamã. Ainda na presença do substrato para complexo I, as velocidades de repouso ( $V_4$ ) e de desacoplamento ( $V_{FCCP}$ ) apresentaram um consumo de oxigênio diminuído.

As velocidades de fosforilação ( $V_3$ ) e repouso ( $V_4$ ) são parâmetros da função mitocondrial que indicam o grau de acoplamento entre a oxidação dos substratos respiratórios e a produção de ATP.

A ação da succinato desidrogenase (complexo II) foi avaliada na presença de succinato, substrato que gera  $FADH_2$ , e de rotenona, inibidor do complexo I, que além de inibir a ligação UQ (FIGUEIRA et al., 2013), não permite a passagem do próton originado da oxidação de NADH para o espaço intermembranar via complexo I (NICHOLLS, 1976). A menor despolarização quando da adição de ADP é um indicador de menor eficiência fosforilativa, a qual foi possível observar pelos registros relativos ao consumo de oxigênio em estado III para o complexo II, isto é as mitocôndrias de pacamã respiram menos eficientemente quando se oferta substrato específico para complexo II.

Tal resultado mostra-se coerente com o controle respiratório obtido para os dois complexos, comprovando que as mitocôndrias isoladas de fígado de pacamã consomem mais oxigênio via complexo I. Dessa forma tem-se um controle respiratório maior quando se utiliza o substrato para o complexo I do que quando se fornece substrato para complexo II (**Figura 4**). Isso já era esperado, pois em virtude do complexo II não bombear prótons para o espaço intermembranas (NELSON; COX, 2014), há menos prótons para retornar pela ATP sintase. Isso leva a uma menor atividade de tal complexo, conseqüentemente, uma menor síntese de ATP.

Estudos mostram que o complexo I de alguns animais apresentaram maior controle respiratório quando comparados com o complexo II. Tais resultados foram concordantes em diversos modelos experimentais, tanto em ratos (TAHARA et al., 2009) como em peixes das espécies *Oreochromis niloticus* (Peixoto et al., 2009) e *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii* (MARK et al., 2012), dentre várias outras

espécies de animais e vegetais (SAVINA, EMELYANOVA, BELYAEVA, 2006; SLOCINSKA et al., 2013; YANG et al., 2014).

Sabendo que o estado IV é um estado de repouso, quimicamente é possível modular a inibição da ATP sintase através de uma droga amplamente utilizada nesses tipos de estudos, que é a oligomicina. Esse inibidor se liga especificamente na subunidade Fo da ATP sintase, impedindo o fluxo de elétrons em mitocôndrias acopladas (NELSON; COX, 2014).

Tahara e colaboradores (2009) obtiveram baixo controle respiratório via complexo II em virtude dos elevados valores para V3 e V4 em mitocôndrias isoladas de rim de rato. Adiele e colaboradores (2012) observaram diminuição no estado III e IV de mitocôndrias hepáticas de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) na presença de cádmio e cálcio, na ocasião os pesquisadores sugeriram que os complexos I e III são os locais de ação de cádmio e cálcio, havendo uma redução da síntese de ATP pela mitocôndria.

A cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa são processos interdependentes, pois o ATP é sintetizado quando prótons fluem de volta através do complexo enzimático ATP sintase. No entanto, este processo pode ser inibido por meio da dissociação entre a oxidação e fosforilação, permitindo a entrada de prótons na matriz sem ser através da ATP sintase (NICHOLLS; FERGUSON, 2002). Isso ocorre por meio da adição de desacopladores químicos, que são compostos lipofílicos, que desfazem o gradiente eletroquímico.

O desacoplador químico utilizado para avaliar o grau de acoplamento na suspensão mitocondrial foi o carbonilcianeto-*p*-trifluorometoxifenilidrazona (FCCP), um ácido fraco com propriedades hidrofóbicas que difunde-se através da membrana de forma protonada, dissipando o próton na matriz (NELSON, COX, 2014). Desta forma, conseguiu-se avaliar a velocidade de desacoplamento ( $V_{FCCP}$  ou  $V_{desacoplamento}$ ) que mostra como a cadeia transportadora de elétrons funciona sem que haja síntese de ATP.

Ainda nos resultados apresentados (**Tabela 2**), foi encontrada uma velocidade de desacoplamento utilizando succinato, substrato para o complexo II, maior do que quando foi utilizado substratos para o complexo I nas mitocôndrias de pacamã, demonstrando que os prótons oriundos da oxidação dos substratos ofertados às mitocôndrias retornam por meio dessa droga através da membrana mitocondrial interna, para a matriz. Para os valores obtidos nas velocidades de fosforilação,



velocidade de repouso e velocidade de desacoplamento não foram observadas diferenças estatísticas.

Neste estudo, também foram realizadas análises em mitocôndrias isoladas de tilápia com a finalidade de comparação entre essas duas espécies de peixes (**Figura 5**). A avaliação da cadeia respiratória mostrou controles respiratórios via complexos I e II de tilápia maiores do que os controles respiratórios do pacamã para os mesmos complexos. Os resultados, no entanto, não excluem a possibilidade de que as mitocôndrias hepáticas de pacamã possam estar utilizando vias alternativas na liberação de elétrons para a cadeia transportadora.

É possível mencionar duas vias que utilizam substratos diferentes dos ofertados para os complexos I e II da cadeia respiratória, por exemplo, outros substratos para as desidrogenases mitocondriais, onde passam elétrons para a cadeia respiratória no nível da ubiquinona, mas não através dos complexos I e II. Uma das vias ocorre através da  $\beta$ -oxidação da acil-CoA dos ácidos graxos enquanto que o outro substrato doador de elétrons para a cadeia transportadora é o glicerol-3-fosfato (NELSON; COX, 2014).

Dessa forma, propõe-se que os substratos ofertados via complexos I e II para as mitocôndrias hepáticas de pacamã podem não ser suficientes para a promoção de um controle respiratório maior do que o encontrado para a tilápia.

Há uma série de diferentes tipos de mecanismos de desacoplamento nas mitocôndrias, dentre eles pode-se mencionar os canais de K sensíveis a ATP, também chamados de mitoK<sub>ATP</sub>, os quais apresentam atividade acentuada quando a respiração é inibida, como ocorre durante a isquemia (FACUNDO, de PAULA, KOWALTOWSKI, 2005). Além desses canais, pode estar presente nas mitocôndrias a enzima AOX, uma oxidase alternativa resistente a cianeto que pode diminuir significativamente o bombeamento de prótons, assim como pode promover a oxidação de substratos sem qualquer fosforilação (VERCESI et al., 2006), a qual já foi encontrada, além das plantas, em fungos, leveduras e protozoários (JOSEPH-HORNE, HOLLOMON, WOOD, 2001).

Outra via de desacoplamento muito estudada em diversos tecidos são as proteínas desacopladoras: UCP1, encontrada em tecido adiposo marrom (NICHOLLS, 1975; NICHOLLS, RIAL, 1999), UCP2, presente no fígado, coração, pulmão, cérebro, pâncreas, entre outros (FLEURY et al., 1997), UCP3 localizada no músculo esquelético (BOSS, 1997; SANTOS, PEÇANHA, SILVA, 2013), UCP4 e

UCP5 identificadas no cérebro (VERCESI et al., 2006). Também foi encontrada uma proteína desacopladora similar a UCP1 em plantas PUMP (*Plant Uncoupling Mitochondrial Protein*), (VERCESI et al. 1995).

Diante disso, outra suposição feita é o fato das mitocôndrias de fígado de pacamã poder apresentar uma proteína desacopladora (UCP), a qual tem por principal função dissipar o gradiente eletroquímico de prótons através da passagem de  $H^+$  ligado a ácidos graxos (VERCESI et al., 2006), dessa forma, menos ATP é sintetizado pela ATP sintase.

A presença de UCPs já foi reportada em diferentes espécies. Dentre essas pode-se citar: os tomates, os quais dependendo do estado de maturação apresentaram diferentes níveis de atividade da UCP (COSTA et al., 1999); a *Candida albicans*, em que a presença de UCPs na mitocôndria provocou alterações no potencial elétrico e na cadeia respiratória (CAVALHEIRO et al, 2004); e o zebrafish (*Danio rerio*), em que presente no músculo esquelético essa proteína desacopladora promoveu uma diminuição no controle respiratório e no potencial de membrana (SANTOS; PEÇANHA; SILVA, 2004).

Como já demonstrado por Peixoto et al. (2009), os resultados obtidos nesse estudo apontam que o controle respiratório de tilápia é maior quando se utiliza substrato para o complexo I do que quando se utiliza substrato para o complexo II. No estudo do referido autor as mitocôndrias isoladas de fígado de tilápia apresentaram um controle respiratório mitocondrial melhor para os substratos ligados ao NADH do que para o  $FADH_2$ .

Fisiologicamente as mitocôndrias utilizam apenas NADH e FADH, ou seja, em condições padrões os complexos I e II são os responsáveis pela “sobrevivência” da mitocôndria. Entretanto, quimicamente, em mitocôndrias isoladas, pode-se modular os demais complexos da cadeia transportadora de elétrons. Como exemplo, no complexo III é possível bloquear a transferência de elétrons do citocromo b ao citocromo  $c_1$  utilizando antimicina A (AA). Outra droga que pode ser usada é o mixotiazol que impede a transferência de elétrons do centro Fe-S à ubiquinona (NELSON; COX, 2014).

Nos experimentos realizados foi utilizado a antimicina A para avaliar o consumo de oxigênio pelo complexo III, onde observou-se que o consumo de  $O_2$  se mostrou maior no pacamã do que na tilápia (**Figura 6**).

Quimicamente também se utiliza um substrato para o complexo IV, usualmente oferta-se o TMPD (tetrametil-*p*-fenileno diamina), o qual reduz citocromo oxidase através do citocromo c. Neste último caso, o ascorbato é geralmente adicionado como o redutor para regenerar o TMPD a partir da sua forma oxidada (NICHOLLS; FERGUSON, 2002).

Em relação ao complexo IV, ainda é possível utilizar compostos a base de cianeto e monóxido de carbono para a inibição da transferência de elétrons (NELSON; COX, 2014). Também foi avaliado o complexo IV, que ao ser bloqueado leva a uma total inibição da passagem de elétrons na cadeia, ou seja, não há redução do O<sub>2</sub> à H<sub>2</sub>O. Como consequência não há bombeamento de prótons pelos complexos da cadeia que são transmembranares, o que culmina em último grau, com morte da célula por inibir a síntese de ATP (NICHOLLS; FERGUSON, 2014). Os resultados obtidos demonstraram que, da mesma forma que antimicina A, ao utilizar TMPD/ascorbato como substrato, há um maior consumo de oxigênio na mitocôndria hepática isolada de pacamã do que na mitocôndria hepática isolada de tilápia (**Figura 6**). Para inibir a ação desse complexo fez-se uso do KCN, o que resultou em uma morte mitocondrial.

Esse resultado corrobora com o controle respiratório obtido para as mitocôndrias hepáticas de pacamã, pois sendo maior quando comparado com o controle respiratório da tilápia comprova que o complexo IV é um dos principais locais de regulação da fosforilação oxidativa. Isso foi comprovado através do estudo de Li e colaboradores (2006) que ao estudar o referido complexo de mitocôndrias de ratos obtiveram uma redução no consumo de oxigênio, na síntese de ATP e na redução do potencial de membrana quando uma subunidade do complexo IV não estava expressa.

Foi reportado por Kayser et al (2004), ao avaliar a cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias de nematóides, que na presença de TMPD/ascorbato há uma elevada taxa de respiração, indicando a alta capacidade de transporte de elétrons do complexo IV para promover a redução do oxigênio a água.

Uma possibilidade de comprovação da presença dos quatro complexos mitocondriais reside no fato deles poderem ser fisicamente separados. Um leve tratamento da membrana mitocondrial interna com detergentes, por exemplo digitonina, seguida de uma cromatografia de troca iônica, permite a separação dos quatro complexos mitocondriais (NELSON; COX, 2014).

Através dos ensaios apresentados, é possível comprovar que todos os componentes endógenos da cadeia transportadora de elétrons estavam presentes em mitocôndrias hepáticas da espécie que foi foco desse estudo, o *Lophisilurus alexandri*.

## 5.2 Produção de Espécies Reativas de Oxigênio em Mitocôndrias Hepáticas

O metabolismo energético mitocondrial tem sido reconhecido como a principal fonte geradora de espécies reativas de oxigênio (EROs) na maioria das células eucarióticas. Essas espécies reativas são conhecidas por atuarem em várias redes de sinalização e numa variedade de processos degenerativos (KOWALTOWSKI et al, 2009).

Quando a mitocôndria é exposta a elevadas concentrações de cálcio, há a formação de EROs, entre elas o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual pode ser facilmente detectado em suspensões mitocondriais, sendo por isso, muito usado como indicador de estresse oxidativo.

Com o intuito de avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio, mais precisamente a presença de  $H_2O_2$  nas suspensões mitocondriais de fígado de pacamã e tilápia, procurou-se observar a ação do cálcio endógeno mitocondrial (10  $\mu M$ ) (KOWALTOWSKI et al., 1996) frente à produção de EROs.

Sustentando-se no resultado obtido pela respiração mitocondrial de ambas as espécies, buscou-se comprovar se as mitocôndrias hepáticas de pacamã eram capazes de produzir mais EROs do que mitocôndrias de tilápia (**Figuras 7A e 7B**).

Sabendo-se que fisiologicamente o complexo I é o mais ativo, foi utilizado apenas o substrato para o referido complexo nos experimentos para determinação de EROs. Além disso, usou-se como marcador da produção de peróxido de hidrogênio o Amplex-Red, uma sonda que fornece um método ultra-sensível para detectar continuamente a formação de peróxido de hidrogênio no metabolismo do ácido glutâmico ou para monitorar a atividade da glutamato oxidase, além de medir indiretamente, por meio da formação de peróxido, os níveis de glicose, galactose, xantina, ácido úrico e produção de EROs mitocondrial. Neste último, Amplex-Red é altamente seletivo, específico e eficiente na medição de pequenas concentrações, na ordem de nM, de  $H_2O_2$  produzido pelas mitocôndrias (VOTYAKOVA, REYNOLDS, 2004; RESZKA et al., 2005; ZHAO, SUMMERS, MASON, 2012).

Frente aos resultados obtidos, foi possível observar que as mitocôndrias isoladas de pacamã produziram mais  $H_2O_2$  do que a tilápia quando as mitocôndrias foram submetidas às mesmas condições. Isso pode estar relacionado com o fato das mitocôndrias de pacamã apresentarem uma menor taxa de respiração para os complexos I e II que a tilápia.

Esse resultado está de acordo com outros trabalhos encontrados na literatura, os quais associam a produção de EROs com a respiração mitocondrial. Como essas espécies reativas são continuamente geradas como subproduto da fosforilação oxidativa, foi observado um aumento de EROs em mitocôndrias de diferentes tecidos (fígado, rim, coração, cérebro e músculo esquelético) de ratos quando os estados III e IV da cadeia respiratória foram alterados (TAHARA et al., 2009).

Um estudo recente comprovou a relação entre a taxa de consumo de oxigênio e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Salin e colaboradores (2015) ao trabalharem com truta marrom (*Salmo trutta*) *in vivo* e obtiveram uma variação no teor de  $H_2O_2$ , o qual foi até 26 vezes entre os peixes da mesma idade, em condições ambientais e estados nutricionais idênticos. Segundo os autores, a variação interindividual no conteúdo de  $H_2O_2$  não estava relacionada com a densidade mitocondrial, mas foi significativamente associada com a variação na taxa metabólica padrão: os indivíduos com taxas de consumo de oxigênio mais elevada, apresentaram baixos níveis de  $H_2O_2$ .

Com isso, supõe-se que o fato de mitocôndrias hepáticas de tilápia produzirem menos peróxido de hidrogênio que mitocôndrias de fígado de pacamã está provavelmente relacionada com uma maior taxa metabólica da tilápia, o que é comprovado através dos controles respiratórios via complexo I e II obtidos por essa espécie, neste estudo.

Além disso, pode-se sustentar essa hipótese com a possibilidade das mitocôndrias de pacamã poderem utilizar vias alternativas para a transferência de elétrons através da cadeia transportadora, uma vez que a ação das desidrogenases envolvidas promovem um *pool* de elétrons para a redução da ubiquinona.

Ao analisar o fato de que os modelos experimentais estiveram sujeitos às mesmas condições de criação nos tanques e sabendo que a concentração de oxigênio experimentada por células de um organismo multicelular vai depender de quão longe o  $O_2$  tem que se mover para alcançá-los, bem como sobre a rapidez com que eles e outras células ao seu redor podem consumi-lo, além disso, o  $O_2$  ainda

tem que atravessar a célula para chegar até as mitocôndrias (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012). Sendo assim, provavelmente a demanda de oxigênio para o pacamã é pequena visto que, é uma espécie de fundo, necessitando que esse gás chegue mais ao fundo do tanque, pois sua disponibilidade nessa área é baixa (BRASIL, 2014). Por outro lado, a tilápia por ser uma espécie de meio corpo d'água, na qual a concentração de oxigênio é maior, utiliza-o de forma mais efetiva para a geração de ATP, o qual é fundamental para o desempenho de suas atividades vitais.

Entretanto, a baixa demanda de oxigênio no fundo do tanque não prejudica a cadeia respiratória do pacamã, pois como já reportado, por esse ser uma espécie de fundo, está adaptado a condições em que há menor quantidade de oxigênio dissolvido. Isso corrobora com a sua capacidade de geração de EROs, uma vez que sua cadeia respiratória é lenta. A formação de EROs, mais precisamente a formação de ânion radical superóxido parecem conduzir a ativação de UCP (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2012), esse achado reforça a hipótese previamente levantada de que mitocôndrias hepáticas de pacamã podem apresentar UCP ou alguma outra via alternativa.

Além disso, a tilápia é um peixe que tem um metabolismo mais ativo, visto que tem uma atividade bem maior que o pacamã, um peixe que fica a maior parte do tempo sem se locomover. Apesar de baixas concentrações do cálcio endógeno, esse pode ser responsável por elevar os níveis de EROs nas mitocôndrias. Foi reportado por Orrenius e colaboradores (1989) que um aumento sustentado na concentração de  $Ca^{2+}$  citosólico é frequentemente associado ao aparecimento de citotoxicidade e que tal aumento pode provocar perturbações em outros componentes celulares – por exemplo nas mitocôndrias – e promover a morte celular.

A fim de avaliar a geração de peróxido de hidrogênio pelas mitocôndrias de pacamã na presença de uma maior concentração de cálcio (10  $\mu$ M) observou-se um aumento de 14% na produção de  $H_2O_2$  comparando-se com a condição basal, isto é na presença de cálcio endógeno e uma diminuição de 10% na produção de peróxido quando submetido à suspensão mitocondrial à EGTA (200  $\mu$ M) (**Figuras 8A e 8B**).

Além das EROs oriundas da cadeia transportadora de elétrons, diferentes fontes já foram reportados como causadores de estresse oxidativo em peixes. Elevação da temperatura provocou lipoperoxidação devido ao aumento de EROs em

*Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii* (MARK et al., 2012). O inseticida spinosina acarretou em uma maior geração de EROs no fígado de tilápia, (PINER; ÜNER, 2013). Células inflamatórias ativadas serviram como fonte de espécies reativas de oxigênio em mitocôndrias hepáticas de zebrafish e tilápia (WU et al., 2014).

A concentração de oxigênio dissolvido na água também é um dos agentes estressores em peixes (OBA et al., 2009). Segundo Onukwufore colaboradores (2014), quando mitocôndrias hepáticas de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foram submetidas a uma condição de hipóxia ( $0 < PO_2 < 2$  Torr), houve produção de EROs em resposta aos efeitos deletérios causados por essa diminuição de oxigênio. Apesar da produção de EROs poder estar associada à uma cadeia respiratória mais lenta e à altas concentrações de cálcio, os seres vivos possuem um eficiente sistema de defesa antioxidante.

### 5.3 Atividade das Enzimas Antioxidantes

Quando as condições fisiológicas são alteradas, as mitocôndrias podem acumular espécies reativas de oxigênio e, conseqüentemente, sofrer os danos ocasionados pelo estresse oxidativo (KOWALTOWSKI et al., 2009). Espécies reativas de oxigênio podem ser dismutadas por ação de enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Estudando a atividade das enzimas antioxidantes pôde-se avaliar o nível de produção de EROs em que se encontravam os modelos de estudo, através da atividade da SOD, CAT e GPx de fígado de pacamã e tilápia.

Corroborando com os resultados anteriormente mostrados nesse estudo, pode-se inferir que o ânion radical superóxido é formado em maior proporção no fígado de pacamã do que de tilápia e que esse é eficientemente dismutado à  $H_2O_2$  pela enzima superóxido dismutase (**Figura 9**). A literatura reporta diferentes trabalhos em que determinados peixes encontravam-se em condições de estresse oxidativo, e foram avaliados por meio da ação da SOD.

Wu e colaboradores (2015) relataram que fígado, brânquias e cérebro de zebrafish quando submetidos a uma condição de estresse térmico a frio ( $12^\circ C$ ) apresentam um incremento na atividade da enzima superóxido dismutase. Da mesma forma, o trabalho de MARK et al. (2012) mostra que uma diminuição na temperatura elevou os níveis de EROs e uma maior atividade da SOD.

Maior atividade de SOD foi encontrada em mitocôndrias de ovários de fêmeas inférteis do peixe *Alburnus tarichi* quando comparados com o de fêmeas férteis da mesma espécie, confirmando a proposta do autor sobre a maior produção de EROs em fêmeas inférteis (KAPTANER, 2015).

Diferentes proporções de um suplemento alimentar (IMUNO-2865<sup>®</sup>) foram avaliadas frente à atividade de SOD no peixe *Sparus aurata*. Na ocasião, Zupan e colaboradores (2015) obtiveram um aumento da atividade dessa enzima no grupo que recebeu mais suplemento em comparação com o grupo controle, sugerindo assim, que o uso de IMUNO-2865<sup>®</sup> em aquicultura é seguro e possui um efeito imunoestimulante acumulativo sobre *Sparus aurata*, visto que houve ausência de mortalidade dessa espécie durante o estudo.

Diante do exposto, observa-se que uma alta atividade da SOD está relacionada com níveis elevados de EROs, dessa forma, tem-se que nas condições experimentais o pacamã mostrou possuir maior capacidade de produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do que a tilápia, como comprovado nos experimentos anteriores (**Figura 9**).

Avaliando as atividades das enzimas catalase e glutathiona peroxidase no fígado de pacamã e tilápia, observou-se que o fígado de tilápia apresenta maior atividade nessas duas enzimas que o fígado de pacamã.

Em relação à atividade da CAT na tilápia, o resultado obtido (**Figura 10**) está de acordo com o que foi exposto por Peixoto e colaboradores (2006), que também obtiveram níveis elevados da atividade da CAT em tilápias. Nesse estudo, os autores não avaliaram a atividade da enzima GPx, mas analisaram os níveis de glutathiona (GSH) via atividade da enzima Glutathiona Redutase (GR). Eles obtiveram uma elevada atividade dessa enzima, o que significa que o sistema de reconstituição da glutathiona encontrava-se eficiente. Dessa forma, é possível inferir indiretamente que a atividade da glutathiona peroxidase também é elevada, visto que o funcionamento da GPx ocorre mediante presença de GSH.

As atividades elevadas de CAT e GPx encontradas neste estudo (**Figuras 10 e 11**) também apresentaram-se coerentes com os altos níveis de atividade de acordo com o trabalho de Hamed et al. (2015). Na ocasião, os pesquisadores avaliaram a atividade de GST (Glutathiona S-Transferase), GPx, GR (Glutathiona Redutase) e CAT em testículo de tilápia, sendo que tais enzimas apresentaram valores elevados em comparação com seus valores correspondentes em homogeneizados de ovário de tilápia.



Pode-se supor que a baixa atividade da enzima GPx encontrada no fígado de pacamã consiste em pequenos níveis de GSH, uma vez que esse substrato é necessário para que a enzima realize suas funções. Outro fator que se propõe para uma menor atividade da enzima glutathione peroxidase é a que tal enzima deve encontrar-se em uma condição de saturação, ou seja, que a enzima atingiu um estado estacionário, onde a ligação entre a enzima e o substrato, nesse caso  $H_2O_2$ , permanece constante ao longo do tempo.

Avaliando o nível de catalase no pacamã propõe-se que essa se encontra em baixas concentrações e assim como a GPx pode estar em um estado estacionário, no qual o complexo enzima/substrato (catalase/ $H_2O_2$ ) permanece constante ao longo do tempo, independente da concentração de substrato disponível (NELSON; COX, 2014).

A atividade dessas duas enzimas em fígado e brânquias de *Solea spp* também mostrou ser bastante pronunciada quando submetidas a um biomarcador xenobiótico (SISCAR et al., 2015). Wu e colaboradores (2015) observaram um aumento na atividade de CAT e GPx em fígado, brânquias e cérebro de zebrafish quando esses eram submetidos a uma diminuição na temperatura em que se encontravam.

*Piaractus mesopotamicus*, também conhecido como Pacu, ao receber uma alimentação suplementada com selênio apresentou maior atividade das enzimas CAT, GPx e GST (glutathione s-transferase), resultando em uma diminuição no estresse oxidativo (BILLER-TAKAHASHI et al., 2015).

Também foi reportado uma elevação na atividade de GPx em ovários de fêmeas inférteis de *Alburnus tarichi*, na ocasião o autor afirmou que os altos níveis dessa e das outras enzimas avaliadas (SOD e GST) estavam relacionados com o aumento do estresse oxidativo, como resultado da poluição (KAPTANER, 2015).

E ainda, fígado de tilápia quando submetido a crescentes doses do inseticida espinosina, acarretou em alterações significativas nos marcadores de estresse oxidativo relacionados com GSH, dentre eles, GPx. Os autores justificaram as alterações nas atividades enzimáticas devido a promoção de EROs desencadeada pelo inseticida (PINER; ÜNER, 2013).

## 6 CONCLUSÃO

Mitocôndrias hepáticas de pacamã apresentam o complexo I com maior relevância para a produção de ATP, pois o controle respiratório obtido por esse complexo é maior que o obtido via complexo II, assim como é observado para a tilápia. Para os complexos III e IV, verifica-se que o pacamã apresenta maior consumo de oxigênio do que a tilápia. Da mesma forma, a inibição feita pelo KCN é mais eficiente sobre mitocôndrias isoladas de pacamã comparado com a tilápia.

Sobre a produção de EROs induzida pelo cálcio endógeno, percebe-se que as mitocôndrias hepáticas de pacamã produzem maior concentração de  $H_2O_2$ , em relação à sua produção em tilápia. Já quando administradas altas  $[Ca^{2+}]$  em mitocôndrias de fígado de pacamã há uma produção substancial de  $H_2O_2$  o qual tem sua produção diminuída frente à ação do EGTA.

As mitocôndrias pacamã apresentam uma maior atividade da enzima superóxido dismutase que a tilápia, porém o mesmo não foi observado para as enzimas catalase e glutathione peroxidase, uma vez que a tilápia apresentou maior atividade dessas enzimas.

Diante disso, pode-se dizer que este trabalho possibilita a avaliação dos parâmetros metabólicos e, sobretudo a bioenergética mitocondrial em peixes nativos. Sendo assim, o pacamã pode ser tido como um modelo biológico promissor frente a estudos metabólicos e bioenergéticos.

## REFERÊNCIAS

- ADIELE, R. C.; STEVENS, D.; KAMUND, C. Differential Inhibition of Electron Transport Chain Enzyme Complexes by Cadmium and Calcium in Isolated Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Hepatic Mitochondria. **Toxicological sciences**.v 127, n.1, p. 110–119, 2012.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**. v. 105, p.121–126, 1984.
- AGUILAR, Manuel Gutiérrez; BAINE, Christopher P. Structural mechanisms of cyclophilin D-dependent control of the mitochondrial permeability transition pore. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1850, p.2041–2047, 2015.
- ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV, A.A. Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. **Biochemistry (Moscow)**. v. 70, n. 2, pp. 200-214, 2005.
- AUGUSTO, Ohara. **Radicais Livres: bons, maus e naturais**. Oficina de textos, São Paulo, 2006.
- AYROZA, Luiz Marques da Silva. **Criação de tilápia-do-nilo, *oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na usina hidrelétrica de chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR**. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2009.
- AZZOLIN L.; BASSO E.; ARGENTON F.; BERNARDI P. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport and permeability transition in zebrafish (*Danio rerio*). **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1797, p. 1775-1779, 2010.
- BARROS, M.D.M.; GUIMARÃES-CRUZ, R.J.; VELOSO-JÚNIOR, V.C.; SANTOS, J.E. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.24, n.1, p.213-221, 2007.
- BAZIL, Jason N.; BUZZARD, Gregory T.; RUNDELL, Ann E. A bioenergetic model of the mitochondrial population undergoing permeability transition. **Journal of Theoretical Biology**. v. 265, p. 672–690, 2010.
- BILLER-TAKAHASHI, Jaqueline D.; TAKAHASHI, Leonardo S.; MINGATTO, Fabio E.; URBINATI, Elisabeth C. The immune system is limited by oxidative stress: Dietary selenium promotes optimal antioxidative status and greatest immune defense in pacu *Piaractus mesopotamicus*. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 47, p. 360-367, 2015.
- BIRINDELLI, José L. O.; SHIBATTA, Oscar A. Morphology of the Gas Bladder in Bumblebee Catfishes (Siluriformes, Pseudopimelodidae). **Journal of Morphology**. v. 272, p. 890–896, 2011.
- BOSS, Oliver; SAMEC, Sônia; GIACOBINO, Ariane P.; ROSSIER, Colette; DULLON, Abdul; SEYDOUX, Joseane; MUZZIN, Patrick; GIACOBINO, Jean-Paul. Uncoupling

protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression. **Febs Letters**. V. 408, p. 39-42, 1997.

BOVERIS, A.; CADENAS, E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. **FEBS Letters**.v.54, p. 311–314; 1975.

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

BRAGINA, Olga et al. Metallothionein 2A affects the cell respiration by suppressing the expression of mitochondrial protein cytochrome c oxidase subunit II. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**.v.47, p. 209 - 216, 2015.

BRANCO, V.; RAMOS, P.; CANARIO, J.; LU, J.; HOLMGREN, A.; CARVALHO, C.; Biomarkers of adverse response to mercury: histopathology versus thioredoxin reductase activity. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v. 2, p. 1-9, 2012.

BRAND, Martin D. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. **Experimental Gerontology**. v. 45, p. 466-472, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. **Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde**. – Brasília : Funasa, 112 p. , 2014.

BRDICZKA D.; BEUTNER G.; RÜCK A.; DOLDER M.; WALLIMANN T. The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. **Biofactors**. v. 8, p. 235-242, 1998.

BURGH, Robert van der; BOES, Marianne. Mitochondria in autoinflammation: cause, mediator or bystander? **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 26, n. 5, p. 263-271, 2015.

BURIN, Sandra Mara. **Efeito do veneno bruto e da L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* em células BCR-ABL positivas**. Dissertação (Mestrado em ciências) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2011.

CALDAS, F. R. L. et al. Mitochondrial ATP-sensitive Potassium Channel Opening Inhibits Isoproterenol-induced Cardiac Hypertrophy by Preventing Oxidative Damage. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. v. 65, p. 393-397, 2015.

CARDOSO, A.R.; CHAUSSE, B.; DA CUNHA, F.M.; LUEVANO-MARTINEZ, L. A.; MARAZZI, T.B.; PESSOA P.S.; QUELICONI, B.B.; KOWALTOWSKI, A.J. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. **Free Radical Biology and Medicine**.v. 52, p.2201–2208, 2012.

CARDOSO, M. L.; de ALMEIDA, D.S. C.; VANDERLEI, M. J.; ALVES, C.D., Jr. COLOMBARI, E. Cardiovascular responses produced by central injection of

hydrogen peroxide in conscious rats. **Brain Research Bulletin**. v. 71, p. 37– 44, 2006.

CARVALHO, M.; BOCKMANN, F. A.; CARVALHO, M. R. Homology of the Fifth Epibranchial and Accessory Elements of the Ceratobranchials among Gnathostomes: Insights from the Development of Ostariophysans. **Plos One**. v. 8, 2013.

CAVALHEIRO, R.A.; BORECKÝ, J.; FORTES, F.; FAUSTINONI, V.C.; SCHREIBER, A.Z; VERCESI, A.E. Respiration, oxidative phosphorylation, and uncoupling protein in *Candida albicans*. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**. v.37, n. 10, p. 1455-1461, 2004.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Critical Reviews in Toxicology**. v. 36, n. 8, p.609-662, 2006.

COSTA, A. D. T.; NANTES, I. L.; JEZĚK, P.; LEITE, A.; ARRUDA, P.; VERCESI, A. E. Plant Uncoupling Mitochondrial Protein Activity in Mitochondria Isolated from Tomatoes at Different Stages of Ripening. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. v. 31, n. 5, p. 527-533, 1999.

COSTA, D. C.; SOUZA E SILVA, W.; MELILLO FILHO, R.; MIRANDA FILHO, K. C.; SANTOS, J. C. E.; LUZ, R. K. Capture, adaptation and artificial control of reproduction of *Lophosilurus alexandri*: A carnivorous freshwater species. **Animal Reproduction Science**. v.159, p. 148–154, 2015.

COSTA, Daniel Pereira. **Efeito da temperatura da água no desempenho e variáveis hematológicas e bioquímicas de juvenis de pacamã *Lophosilurus alexandri***. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2012.

CROMPTON, M.; ELLINGER, H.; COSTI, A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. **Biochemical Journal**. v. 255,p. 357-360, 1988.

DAI D.F.; SANTANA, L.F.; VERMULST, M. et al. Overexpression of Catalase targeted to mitochondria attenuates murine cardiac aging. **Circulation**. v. 119, p. 2789–2797, 2009.

FACUNDO, H. T.F.; de PAULA, J.G.; KOWALTOWSKI, A.J. Mitochondrial ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channels Prevent Oxidative Stress, Permeability Transition and Cell Death. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**.v. 37, n. 2, p. 74-82, 2005.

FAGIAN M.M.; da SILVA, Pereira L.; MARTINS I.S.; VERCESI A.E. Membrane protein thiol cross-linking associated with the permeabilization of the inner mitochondrial membrane by Ca<sup>2+</sup> plus prooxidants. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 265, p.19955-19960, 1990.

FERREIRA, D.J.S.; LIU, Y.; FERNANDES, M. P.; LAGRANHA, C. J. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. **Nutritional Neuroscience**, 2015 (*no prelo*).

FIGUEIRA, T. R.; BARROS, M. H.; CAMARGO, A. A.; CASTILHO, R. F.; FERREIRA, J. C.B.; KOWALTOWSKI, A. J.; SLUSE, F. E.; SOUZA-PINTO, N. C.; VERCESI, A. E. Mitochondria as a Source of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: From Molecular Mechanisms to Human Health. **Antioxidants & Redox Signaling**. v.18, p. 2030-2050, 2013.

FLEURY, Christophe et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. **Nature genetics**. v. 15, p. 269-272, 1997.

FOLTRAN, Camile. **BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM PEIXES ANTÁRTICOS *Notothenia coriiceps* (RICHARDSON 1844) E *Notothenia rossii* (RICHARDSON 1844) SUBMETIDOS A ALTAS TEMPERATURAS**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2012.

GIORGIO, V.; VON, S. S.; ANTONIEL, M.; FABBRO, A.; FOGOLARI, F.; FORTE, M.; GLICK, G.D.; PETRONILLI, V.; ZORATTI, M.; SZABÓ, I.; LIPPE, G.; BERNARDI, P. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 110, p. 5887-5892, 2013.

GODINHO, H.P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.3, p.351-360, 2007.

GRISHAM, Matthew B. Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 165, p. 429–438, 2013.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press. Fourth edition, 2012.

HAMED, R. R.; SALEH, N. S. M.; SHOKEER, A.; GUNEIDY, R. A.; ABDEL-GHANY, S. S. Glutathione and its related enzymes in the gonad of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish Physiology and Biochemistry**. Publicado online em 17 de outubro de 2015.

HAUSER-DAVIS, R.A.; SILVA, J.A.; ROCHA, R. C.C.; SAINT'PIERRE, T.; ZIOLLI, R.L.; ARRUDA, M.A. Acute selenium selenite exposure effects on oxidative stress biomarkers and essential metals and trace-elements in the model organism zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**. v.33, p.68-72, 2016.

HERMES-LIMA, M.; CASTILHO, R. F.; VALLE, V.G.R.; BECHARA, E. J.H.; VERCESI, A. E. Calcium-dependent mitochondrial oxidative damage promoted by 5-aminolevulinic acid. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1180, p. 201-206, 1992.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals**. In: STOREY, K.B. (ed.) Functional metabolism: regulation and adaptation. New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 319-368, 2004.

IFTIKAR, F. I.; HICKEY, A. J. R. Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus*. **Plos one**. v. 8, p. 1-15, 2013.

JOSEPH-HORNE, T; HOLLOMON, D.M.; WOOD, P.M. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. **Biochimica et Biophysica Acta**.v.1504, p.179-195,2001.

KABASHI, E.; CHAMPAGNE, N.; BRUSTEIN, E.; DRAPEAU, P. In the swim of things: recent insights to neurogenetic disorders from zebrafish. **Trends Genet**. v. 26, p. 373-81, 2010.

KAPTANER, Burak. Relation between increased oxidative stress and histological abnormalities in the ovaries of *Alburnus tarichi* in Lake Van, Turkey. **Monitoring & Environmental Analysis**. v. 187, n. 702, p. 1-11, 2015.

KAYSER, Ernst-Bernhard; SEDENSKY, Margaret M.; MORGAN, Phil G.; HOPPE Charles L. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Is Defective in the Long-lived Mutant *clk-1*. **The Journal of Biological Chemistry** . v. 279, n. 52, pp. 54479 – 54486, 2004.

KITANI, Y., TSUKAMOTO, C., ZHANG, G., NAGAI H, I. M, ISHIZAKI S. Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. **FEBS Journal**. v. 274, p.125-136, 2007.

KOWALTOWSKI, Alicia J.; CASTILHO, Roger F.; GRIJALBA, Mercedes T.; BECHARA, Etelvino J. H.; VERCESI, Anibal E. Effect of Inorganic Phosphate Concentration on the Nature of Inner Mitochondrial Membrane Alterations Mediated by  $Ca^{2+}$  Ions: A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, p. 2929 –2934, 1996.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, Roger F.; VERCESI, Anibal E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **FEBS Letters**, v.495, p.12-15. 2001.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R.F.; VERCESI, A. E. Opening of the mitochondrial permeability transition pore by uncoupling or inorganic phosphate in the presence of  $Ca^{2+}$  is dependent on mitochondrial-generated reactive oxygen species. **FEBS Letters**. v. 378, p. 150-152, 1996.

KOWALTOWSKI, Alicia J.; SOUZA-PINTO, Nadja C., CASTILHO, Roger F.; VERCESI, Anibal E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 47, p. 333–343, 2009.

KOWALTOWSKI, Alicia J.; VERCESI, Anibal E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 26, n. 3/4, p. 463–471, 1999.

KRAFFE, E.; MARTY, Y.; GUDERLEY, H. Changes in mitochondrial oxidative capacities during thermal acclimation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: roles of membrane proteins, phospholipids and their fatty acid compositions. **Journal of Experimental Biology**. v. 210, p.149-165, 2007.

KÜHLBRANDT, Werner. Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. **BMC Biology**. v. 13, n. 89, p. 1-11, 2015.

LEBOVITZ, Russell M.; ZHANG, Heju; VOGEL, Hannes; CARTWRIGHT, Joiner ; DIONNE, Lianna; LU, NAIFANG; HUANG, Shiu; MATZUK, Martin M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.93, n. 13, p. 9782-9787, 1996.

LEHNINGER, A. L. et al. Regulation of  $Ca^{2+}$  release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.75, n.4, Apr, p.1690-1694, 1978.

LEREBOURS, A.; ADAM-GUILLERMIN, C.; BRÈTHES, D.; FRELON, S.; FLORIANI, M.; CAMILLERI, V.; GARNIER-LAPLACE, J.; BOURDINEAUD J.P. Mitochondrial energetic metabolism perturbations in skeletal muscles and brain of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to low concentrations of waterborne uranium. **Aquatic Toxicology**. v. 100, p. 66–74, 2010.

LI, Y.; PARK, Jeong-Soon; D. , Jian-Hong; BAI, Y. Cytochrome c Oxidase Subunit IV is Essential for Assembly and Respiratory Function of the Enzyme Complex. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. v. 38, pp. 283-291, 2006.

LI, R.; LI, A. Antibacterial efficacy of recombinant *siganus oramin* L-amino acid expressed in *Pichia pastoris*. **Fish e Shellfish Immunology**, v. 41, p. 356-361, 2014.

LIESCHKE, G.J.; CURRIE, P.D. Animal models Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, p. 353– 367, 2007.

LOSCHEN, G.; AZZI, A.; FLOHÉ, L. Mitochondrial  $H_2O_2$  formation: relationship with energy conservation. **FEBS Letters**. v. 33, p.84–87; 1973.

LU, Jun; HOLMGREN, Arne. The thioredoxin antioxidant system. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 66, p.75–87, 2014.

LUCENA, Camila Ferraz. Antioxidantes em exercícios aeróbios: papel do selênio e glutatona peroxidase. **Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte**. v. 9, p.54-61, 2010.

MARK, Felix C. et al. Mitochondrial Function in Antarctic Nototheniids with ND6 Translocation. **PLoS ONE**. V.7, n. 2, p. 1 – 12, 2012.

MARKLUND, S. Handbook of Methods for Oxygen radical Research. Boca Raton. **CRC Press Online**, p.243-247, 1985.

MECRAE, C.A.; PETERSON, R.T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**. v.10, p. 721-31, 2015.

MELO, Clara Correia; PASSOS, João F. Mitochondria: Are they causal players in cellular senescence? **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1847, p. 1373–1379, 2015.



MEURER, F.; OLIVEIRA, S. T. L.; DOS SANTOS, L.; OLIVEIRA, J. S.; COLPINI, LEDA M. S. Níveis de oferta de alimento vivo para alevinos de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). **Revista brasileira de ciências agrárias**. v.5, p.111-116, 2010.

MIEIRO, C.L.; PACHECO, M.; PEREIRA, M. E.; DUARTE, A.C. Mercury distribution in key tissues of fish (*Liza aurata*) inhabiting a contaminated estuary—implications for human and ecosystem health risk assessment. **J. Environmental Monitoring and Assessment**. v. 11, p. 1004-1011, 2009.

MIEIRO, C.L.; COELHO, J.P.; PACHECO, M.; DUARTE, A.C. PEREIRA, M. E. Evaluation of species-specific dissimilarities in two marine fish species: Mercury accumulation as a function of metal levels in consumed prey. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** v. 63, n. 1, p. 125-136, 2012.

MIEIRO, C.L.; PARDAL, M.; DUARTE, A.C.; PEREIRA, M. E.; PALMEIRA, C.M. Impairment of mitochondrial energy metabolism of two marine fish by in vitro mercuric chloride exposure. **Marine Pollution Bulletin**. v. 97, p. 488–493, 2015.

MITCHELL, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. **Nature**. v. 191, p. 144-1448, 1961.

MIWA, Satomi; ZGLINICKI, Thomas von. Measuring hydrogen peroxide release from isolated liver mitochondria using Amplex Red: A critical evaluation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**. v.1837, Supplement, 2014.

MOREIRA, A.C., MACHADO, N.G., BERNARDO, T.C., SARDÃO, V.A., OLIVEIRA, P.J. **Mitochondria as a biosensor for drug-induced toxicity – is it really relevant?** In: Prof. Pier Andrea Serra (Ed.), *Biosensors for Health, Environment and Biosecurity*, p. 411–444, 2011.

MUFTUOGLU, Meltem; MORI, Mateus P.; de SOUZA-PINTO, Nadja C. Formation and repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA. **Mitochondrion**. v.17, p. 164–181, 2014.

NASCIMENTO, Luciana et al. The effect of maternal low-protein diet on the heart of adult offspring: role of mitochondria and oxidative stress. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v.39, p.1–8, 2014.

NAVARRO, A.; QUIRÓS, L.; CASADO, M.; FARIA, M.; CARRASCO, L.; BENEJAM, L.; BENITO, J.; DÍEZ, S.; RALDÚA, D.; BARATA, C.; BAYONA, J.M.; PIÑA, B. Physiological responses to mercury in feral carp populations inhabiting the low Ebro River (NE Spain), a historically contaminated site. **Aquatic Toxicology**. v. 993, p. 150–157, 2009.

NELSON, David L., COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Artmed, Porto Alegre, 6 ed., 1274 p., 2014.

NICHOLLS, David G. The bioenergetics of brown adipose tissue mitochondrial. **Febs Letters**. v. 61, n. 2, p. 103-110, 1975

NICHOLLS, David G. Hamster Brown-Adipose-Tissue Mitochondria. Purine Nucleotide Control of the Ion Conductance of the Inner Membrane, the Nature of Nucleotide Binding Site. **European Journal of Biochemistry** v. 62, p. 223-228, 1976.

NICHOLLS, David G.; RIAL, Eduardo. A history of the first uncoupling protein,UCP1. **Journal of bioenergetics and biomembranes**. v. 31, n. 5, p.399-406, 1999.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 3**.Academic Press.An Elsevier Science Imprint. London, UK. 2002.

NICHOLLS, D. G.; FERGUSON, S. J. **Bioenergetics 2**.Academic Press.An Elsevier Science Imprint. London, UK. 2014.

OBA, Eliene T.; MARIANO, Wagner dos Santos; dos SANTOS, Laila R. B. **Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável**. In: **Manejo Sanidade de Peixes em Cultivo**. DIAS-TAVARES, M. (Org.). Macapá: Embrapa Amapá, 2009.

ONUWUFOR J.O.; MACDONALD, N.; KIBENGE, F.; STEVENS, D.; KAMUNDE, C. Effects of hypoxia-cadmium interactions on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mitochondrial bioenergetics: attenuation of hypoxia-induced proton leak by low doses of cadmium. **Journal of Experimental Biology**,v. 217, p.831-840, 2014.

ORBEA, A.; ORTIZ-ZARRAGOITIA, M; SOLÉ, M.; PORTE, C.; CAJARAVILLE, M.P. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay). **Aquatic Toxicology**. v. 58,p. 75–98, 2002.

ORRENIUS, Sten; MCCONKEY, David J.; BELLOMO, Giorgio; NICOTERA, Pierluigi.Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing.**Tips**. v. 10, p. 281-285, 1989.

PACHECO, Maria Inês Nogueira; LIRA, Fernando José. A piscicultura no Baixo São Francisco: possibilidades e limites. **Economia política do desenvolvimento de Maceió**, v. 1, p. 67-95, 2009.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**. v. 70, p. 158-69, 1967.

PAQUET, D.; SCHMID, B.; HAASS, C. Transgenic zebrafish as a novel animal model to study tauopathies and other neurodegenerative disorders in vivo. **Neurodegenerative Diseases**. v. 7, p. 99-102, 2010.

PARDO, A.G.L; INADA, N.M.; VERCESI, A.E. CURTI, C. Uncoupling and oxidative stress in liver mitochondria isolated from rats with acute iron overload. **Archives of Toxicology**, v. 83, p. 47-57, 2009.

PEIXOTO, F.; ALVES-FERNANDES, D.; SANTOS, D.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia

*Oreochromis niloticus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 85, p. 91–96, 2006.

PEIXOTO, F.P.; SANTOS, D.L.; VILELA, S.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A. Caracterização da mitocôndria isolada de fígado de tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*) e alterações da bioenergética mitocondrial causadas pela exposiçãoo herbicida oxifluorfena. **Arquivo Brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v.61, p. 386-392, 2009.

PEDROSO, F. C.; CAMPELLO, A. P.; WERNECK, L. C.; KLUPPEL, M. L. W. Caracterização de miopatias mitocondriais através da avaliação das atividades enzimáticas envolvidas no metabolismo energético. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria** v. 55, n. 2, p. 249-257, 1997.

PINER, Petek; ÜNER, Nevin. Oxidative stress and apoptosis was induced by bio-insecticide spinosad in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 36, p. 956–963, 2013.

RAJAPAKSE, N.; MENDIS, E.; JUNG, Won-Kyo, J.E.; Jae-Young, KIM, Se-Kwon. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**. v.38, p. 175–182, 2005.

RAMSEY J.J.; HARPER M.E.; HUMBLE S.J.; KOOMSON E.K.; RAM J.J.; BEVILAQUA L.; HAGOPIAN K. Influence of mitochondrial fatty acid composition on protein leak and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in liver. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 140B, p. 99-108, 2005.

REGOLI, F.; FRENZILLI, G.; BOCHETTI, R.; ANNARUMMA, F.; SCARCELLI, V.; FATTORINI, D.; NIGRO, M. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. **Aquatic Toxicology**. v. 68, p. 167–178, 2004.

RESZKA, K.J.; WAGNER, B.A.; BURNS, C.P.; BRITIGAN, B. E. Effects of peroxidase substrates on the Amplex red/peroxidase assay: Antioxidant properties of anthracyclines. **Analytical Biochemistry**. v. 342, p. 327–337, 2005.

ROBINSON, J.; COOPER, J. M. Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 33, p. 390-399, 1970.

RONCHI, Juliana A.; VERCESE, Anibal E.; CASTILHO, Roger F. Reactive oxygen species and permeability transition pore in rat liver and kidney mitoplasts. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. v.43, p. 709 - 715, outubro, 2011.

RONCHI, Juliana A.; HENNING, Barbara; Ravagnani, Felipe G.; Figueira, Tiago R.; Castilho, Roger F.; dos Reis, Sergio F.; Vercesi, Anibal E. Increased Susceptibility of *Gracilinanus microtarsus* Liver Mitochondria to Ca<sup>2+</sup>-Induced Permeability Transition Is Associated with a More Oxidized State of NAD(P). **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. v.15, p.1-10, 2015.

SALIN, Karine; AUER, Sonya K., RUDOLF, Agata M.; ANDERSON, Graeme J.;

CAIRNS, A. G.; MULLEN, W.; HARTLEY, R. C.; SELMAN, C.; METCALFE, N. B. Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species in vivo. **Biology Letters**, v. 11, p. 2015.

SALVADOR, Maria de Jesus Repas. **Influência de grupos amínicos na actividade dos complexos respiratórios mitocondriais**. Dissertação (Mestrado em Biologia animal). Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

SANTOS, Reinaldo Sousa dos; PEÇANHA, Flavia Letícia Martins; SILVA, Wagner Seixas. Functional characterization of an uncoupling protein in goldfish white skeletal muscle. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. v. 45, p. 243–251, 2013.

SANTOS, Hélio Batista ; SAMPAIO, Edson Vieira; ARANTES, Fábio Pereira; SATO, Yoshimi. Induced spawning and reproductive variables of the catfish *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). **Neotropical Ichthyology**, v.11, p. 607-614, 2013.

SANTOS, L. D. dos; SILVA, L. C. R. da; AMORIN, J. V. O.; BALEN, R. E.; MEURER, F. Effect of food processing on the development of pacamã fingerlings (*Lophiosilurus alexandri*). **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, Umuarama**, v. 15, n. 2, p. 115-120, 2012.

SAPPAL, Ravinder; MACDOUGALD, Michele; FAST, Mark; STEVENS, Don; KIBENGE, Fred; SIAH, Ahmed; KAMUNDE, Collins. Alterations in mitochondrial electron transport system activity in response to warm acclimation, hypoxia-reoxygenation and copper in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic Toxicology**. v.165, p. 51–63, 2015.

SATO, Y.; FENRICH-VERANI, N.; NUÑER, A.P.O.; GODINHO, H.P.; VERANI, J.R. **Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco**. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (Ed.). **Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, p.229-274. 2003.

SAVINA, Margarita V.; EMELYANOVA, Larisa V.; BELYAEVA, Elena A. Bioenergetic parameters of lamprey and frog liver mitochondria during metabolic depression and activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. v.145, p. 296–305, 2006.

SEABRA, Ana Gabriela Lins. **Manejo alimentar das fases iniciais do pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência animal). Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, 2010.

SILVA, Wallison Juno Martins; FERRARI, Carlos Kusano Bucalen. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**. v. 14, p. 441-451, 2011.

SISCAR, R., et al., Hepatic and branchial xenobiotic biomarker responses in Solea spp. from several NW Mediterranean fishing grounds. **Marine Environmental Research** (2015), <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.09.001>

SLOCINSKA, Malgorzata; LUBAWY, Jan; JARMUSZKIEWICZ, Wieslawa; ROSINSKI, Grzegorz. Evidences for an ATP-sensitive potassium channel (KATP) in muscle and fat body mitochondria of insect. **Journal of Insect Physiology**. v.59, p.1125–1132, 2013.

SOUZA, Anderson Miranda. **Avaliação de subprodutos de frutas do vale do São Francisco na alimentação de pacamãs *Lophiosilurus alexandri***. Dissertação (Mestrado em Ciência animal). Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, 2015.

SCHMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia Animal: adaptação e meio ambiente**. 5 ed. São Paulo: Livraria Santos Editora, 1996.

SHI, Y.; ZHANG, G.; LIU, J.; ZANG, W. Effects of temperature and salinity on oxygen consumption of tawny puffer *Takigifu flavidus* juvenile. **Aquaculture Research**, v. 42, p.301-307, 2011.

STEFFENS, W. **Principios fundamentales de la alimentación de los peces**. Zaragoza: ACRIBIA S.A., 1987.

TAHARA, Erich B; NAVARETE, Felipe D.T.; KOWALTOWSKI Alicia J. Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation. **Free Radical Biology & Medicine** . v. 46, p. 1283–1297, 2009.

TENÓRIO, R. A. **Aspectos da biologia reprodutiva do Niquim *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Actinopterygii, Pimelodidae) e crescimento da progênie em diferentes condições ambientais**. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, 2003.

UMASUTHAN, N., et al. A manganese superoxide dismutase with potent antioxidant activity identified from *Oplegnathus fasciatus*: Genomic structure and transcriptional characterization. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, p. 23-27, 2013.

VERCESI A. E. The participation of NADP, the transmembrane potential and the energy-linked NAD(P) transhydrogenase in the process of  $Ca^{2+}$  efflux from rat liver mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.252, p.171-178, 1987.

VERCESI, A.E.; BORECKY, J.; MAIA, I.; ARRUDA, P.; CUCCOVIA, I. M.; CHAIMOVICH, H. Plant Uncoupling Mitochondrial Proteins. **Annual Review of Plant Biology**, v.57, p. 383–404, 2006.

VERCESI, A. E.; MARTINS, L. S.; SILVA, M. A. P.; LEITE, H. M. F.; CUCCOVIA, I.M.; CHAIMOVICH, H. PUMPing plants. **Nature**. v. 375, n. 25, 1995.

VOTYAKOVA, T. V. REYNOLDS, I.J. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 431, p.138-144, 2004.

WANG, F.H., XIE, M.Q., LI, A.X. A novel protein isolated from the serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) is lethal to Cryptocaryon irritans. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 29, p. 32-41, 2010.

WANG, F.H., XIE, M.Q., LI, A.X. The serum of rabbitfish (*Siganus oramin*) has antimicrobial activity to some pathogenic organisms and a novel serum L-amino acid oxidase is isolated. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 30, p. 1095-1108, 2011.

WANG, M.; WANG, Y.; ZHANG, L.; WANG, J.; HONG, H.; WANG, D. Quantitative proteomic analysis reveals the mode-of-action for chronic mercury hepatotoxicity to marine medaka (*Oryzias melastigma*). **Aquatic Toxicology**. v. 130, p. 123-131, 2013.

WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Mitochondrial superoxide simutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 248, p.4793–4796; 1973.

WU, Yu-Sheng; HUANG, Shih-Ling; NAN, Fan-Hua; CHANG , Ching-Sheng; HSIAO, Chien-Mei; LAI, Kam-Chiu; CHEN, Shiu-Nan. Over-inhibition of NADPH oxidase reduce the wound healing in liver of finfish. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 40, p.174-181, 2014.

WU, Su Mei; LIU, Jia-Hao; SHU, Li-Hsin; CHEN, Ching Hsein. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 187, p. 202–213, 2015.

YANG, Zhenfeng; CAO, Shifeng; SU, Xinguo; JIANG, Yueming. Respiratory activity and mitochondrial membrane associated with fruitsenescence in postharvest peaches in response to UV-C treatment. **Food Chemistry**. v.161, p. 16–21, 2014.

ZHAO, Baozhong; SUMMER, Fiona A.; MASON, Ronald P. Photooxidation of Amplex red to resorufin: Implications of exposing the Amplex red assay to light. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 53, p. 1080–1087, 2012.

ZHAO, Y.; XIE, P.; FAN, H.; ZHAO, S. Impairment of the Mitochondrial Oxidative Phosphorylation system and oxidative stress in livre of crucian carp (*Carassius auratus* l.) exposed to microcystins. **Environmental Toxicology**. v. 29, p. 30-39, 2011.

ZHOU, M.; DIWU, Z.; PANCHUK-VOLOSHINA, N.; HAUGLAND, R.P. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. **Analytical Biochemistry**. v. 253, p.162-168, 1997.

ZHUANG , Yongliang; SUN, Liping. Preparation of Reactive Oxygen Scavenging Peptides from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Skin Gelatin: Optimization Using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science** . v. 76, n. 3, p. 483-489, 2011.

ZUPAN, Ivan et al. Supplementation with imuno-2865® in gilthead sea bream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758): Effects on hematological and antioxidant parameters. **Fish & Shellfish Immunology**. v. 47, p. 590-594, 2015.