UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Lucas Feijó Bianchini

Sistema de defesa antioxidante na larva do quironomídeo *Tanytarsus minutipalpus*: Adaptação às condições ambientais extremas do Lago Magadi (Quênia, África).

Rio Grande

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB

PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS -
FISIOLOGIA ANIMAL COMPARADA

Sistema de defesa antioxidante na larva do quironomídeo *Tanytarsus minutipalpus*: Adaptação às condições ambientais extremas do Lago Magadi (Quênia, África).

Trabalho a ser apresentado ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, por Lucas Feijó Bianchini, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre. Orientador: Prof. Dr. Adalto Bianchini

Rio Grande

2015

Dedico esta dissertação de mestrado ao meu pai Adalto Bianchini, por todo apoio, orientação e dedicação incessantes. És e sempre serás um de meus maiores exemplos de vida.
Te amo!

Agradecimentos

Inicialmente quero agradecer ao Grande Arquiteto do Universo que é Deus, por ter me dado saúde, força e uma família maravilhosa que me guia e apoia sempre.

Agradeço à minha mãe Joice Maria Feijó Bianchini, por todo auxílio e incentivo nessa caminhada. Pelo ombro amigo e conselhos, por sempre estar ao meu lado nos momentos que mais preciso e naqueles instantes de felicidade também. Pelo carinho e aconchego de sempre e pelo amor incondicional que esta "pequena grande" mulher tem.

Agradeço ao meu pai e orientador Adalto Bianchini, por ser o meu guia nessa jornada chamada mestrado, por estar perto nos momentos bons e ruins e por me aconselhar sempre que necessário. Sem ele nada disso teria se concretizado.

Agradeço à minha irmã Aline Feijó Bianchini, por mesmo de longe sempre me apoiar em minhas decisões, incentivar e torcer por mim em todos os momentos da minha vida.

Agradeço à minha esposa Camila Jung Bianchini, por estar comigo em todos os momentos, me apoiar, ajudar a superar as dificuldades, aconselhar e ser essa pessoa maravilhosa que me ensina a cada dia. Aproveito para agradecer pela paciência e incentivo durante todo meu mestrado.

Agradeço a família Kleinubing Jung, a qual considero minha segunda família, pelas orações dedicadas a mim, pelo incentivo e conselhos. Por ajudarem a mim e minha esposa sempre que precisamos e por serem pessoas especiais em minha vida.

Quero dizer a todos vocês uma frase que levo para toda vida e que foi dita por Isaac Newton, "Se vi mais longe, foi por estar em pé sobre ombros de gigantes".

Agradeço a todos os professores que me ensinaram mais do que alguma disciplina do colégio, faculdade ou pós-graduação, mas me ensinaram a viver.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Pinho, docente da UFSC, pela identificação taxonômica do animal utilizado no presente estudo.

Agradeço a todos os funcionários e técnicos do PPGCF-FAC por dar o auxílio necessário para que se tenha um ambiente de trabalho confortável, organizado e agradável.

Agradeço aos meus amigos, pelas risadas e momentos de descontração que foram fundamentais para relaxar e conseguir encarar as dificuldades que a vida nos impõe.

Agradeço a equipe de expedição para África por todo apoio e auxílio nas coletas e análises realizadas em conjunto. Agradeço também pela união e espírito de equipe durante os períodos que convivemos juntos no Quênia.

Às agências de fomento (CAPES e CNPq) pelo apoio financeiro e concessão da bolsa.

Por fim, quero agradecer os animais, sem eles não haveria a mínima possibilidade deste trabalho ocorrer. Aproveito para agradecer ao Fred e ao Valente, nossos cães, que sempre me esperaram de patas abertas e carinhas alegres para animar os meus dias.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL 1

INTRODUÇÃO 2

OBJETIVO 15

ARTIGO 16

SUMMARY 18

INTRODUCTION 20

MATERIALS AND METHODS 23

RESULTS 26

DISCUSSION 27

ACKNOWLEDGMENTS 38

AUTHORS CONTRIBUTIONS 38

COMPETING INTERESTS 38

FUNDING 38

REFERENCES 39

CAPTIONS TO FIGURES 46

DISCUSSÃO GERAL 51

BIBLIOGRAFIA GERAL 62

RESUMO GERAL

Foram avaliadas alterações no metabolismo e no sistema de defesa antioxidante na larva do quironomídeo *Tanytarsus minutipalpus* frente a variações diárias e extremas nas condições físico-químicas no "Flamingo Pool" no Lago Magadi (Quênia). Em diferentes horas do dia (7:00 h, 13:00 h e 19:00 h do mesmo dia e 1:00 h e 7:00 h do dia seguinte), em diferentes dias de Julho/Agosto de 2010 e Julho de 2013, foram medidos a temperatura, teor de oxigênio dissolvido e pH da água. As larvas de *T. minutipalpus* foram coletadas com rede de zooplâncton, separadas manualmente e utilizadas para análise de parâmetros metabólicos (atividade da colinesterase e concentrações de glicose, triglicerídeos, colesterol, proteínas, uréia, hemoglobina e bilirrubina) e do estado oxidativo [espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO), glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG), mucoproteínas, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), glutamato-cisteína ligase (GCL), capacidade antioxidante total (TOSC), lipoperoxidação (LPO) e dano no DNA]. Não houve variação no pH (10.0 ± 0.03) da água, porém foram observadas amplas variações diárias de temperatura (20.2-29.3^{o}C) e oxigênio dissolvido (3.2-18.6 mg O_2/L), com os valores médios mais altos sendo observados às 13:00 h. Foram observados aumentos temporários na colinesterase, glicose, colesterol, ureia, creatinina, hemoglobina SOD, GPx, GR, GSH e GSSG nas larvas coletadas às 13:00 h. Estes resultados indicam que a larva de *T. minutipalpus* apresenta ajustes metabólicos e no sistema de defesa antioxidante que respondem positivamente e de forma cooperativa frente às variações diárias e extremas na temperatura e oxigênio dissolvido nas águas do Lago Magadi.

Palavras-chave: África, estado oxidativo, Lago Magadi, metabolismo, quironomídeo, *Tanitarsus minutipalpus*.

INTRODUÇÃO

Na presença de oxigênio, a produção de energia (ATP) é mais eficiente e vantajosa, quando comparada àquela gerada a partir do metabolismo anaeróbico (Lehningher *et al.*, 2005). Entretanto, a utilização do oxigênio como aceptor final de elétrons, bem como a utilização de coenzimas reduzidas (NADH e $FADH_2$) produzidas pelas vias metabólicas aeróbicas na cadeia transportadora de elétrons, leva à produção de uma variedade de espécies reativas de oxigênio (ROS), uma vez que o oxigênio é reduzido apenas parcialmente durante os processos oxidativos celulares (Halliwell & Guteridge, 1990). Além disso, a quebra de moléculas não radicais através da utilização de alta energia pode gerar uma nova molécula com radical livre, sendo que a reação mais clássica é a quebra da molécula de água formando um radical hidroxil ($^{\cdot}OH$) e um hidrogênio ($H^{\cdot}$) (Fridovich, 2004). Segundo Hermes-Lima (2004), um radical livre é definido como sendo um átomo ou molécula com um ou mais elétrons desemparelhados em suas camadas e possui uma afinidade por diversas outras moléculas, podendo ou não transformar a molécula que está sofrendo oxidação em uma nova espécie reativa.

Assim, ROS são compostos formados por oxigênio que apresentam alta reatividade, podendo ser radicais, quando o átomo de oxigênio sozinho ou associado a outro elemento possui um ou mais elétrons desemparelhados como no caso da hidroxila ($HO^{\cdot}$), superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peroxila ($ROO^{\cdot}$) e alcoxila ($RO^{\cdot}$), ou por espécies não radicalares, como o oxigênio singlet ($^1O_2$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que mesmo não sendo radicais livres, possuem alta reatividade (Sies, 1985; Halliwell & Guteridge, 1990; Bergendi *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.* 2005). Atualmente, estima-se que 0,1% do oxigênio consumido se torna um radical livre. Porém, um incremento no metabolismo aeróbico, como aquele induzido pela elevação da temperatura, pode aumentar significativamente a produção de ROS (Fridovich, 2004).

De uma forma geral, a maioria das moléculas de oxigênio que agem como aceptoras finais de elétrons são totalmente reduzidas por 4 elétrons formando água. Caso o aceptor é reduzida apenas por 1 elétron, este gera o radical superóxido (Storey, 1996). O radical superóxido é a primeira ROS gerada durante o metabolismo oxidativo (Fig. 1). Este radical pode ser formado através de diferentes vias metabólicas, dentre elas, a cadeia respiratória mitocondrial e o sistema xantina/xantina oxidase. Além disso, este radical pode ser gerado através da NADPH oxidase em células fagocíticas, via síntese de prostaglandinas no retículo endoplasmático liso e no sistema NADPH citocromo P-450 redutase microssomal (Ribeiro *et al*. 2005). O radical superóxido pode agir como oxidante ou redutor, dando origem a outras ROS (Fridovich, 1989). Apesar de esta espécie ser pouco ativa, ela é responsável pela geração de outras ROS com maior poder oxidante e, portanto, mais danosas para os sistemas biológicos (Fig. 1).

A partir de uma reação espontânea ou catalisada pela superóxido dismutase (SOD), o radical superóxido pode gerar o peróxido de hidrogênio. Além disso, ele pode induzir também a formação do radical hidroxila através da reação de Fenton. Neste caso, o ânion superóxido reduz principalmente os metais cobre e ferro, sendo que estes reagem com o peróxido de hidrogênio formando o radical hidroxila (Sies, 1985). O radical superóxido pode gerar o radical hidroxila através da reação de Haber-Weiss. Neste caso, o radical superóxido reage com o peróxido de hidrogênio, formando assim o radical hidroxila (Sies, 1985; Ribeiro *et al*. 2005). Por fim, o radical superóxido também pode reagir com o radical hidroxila, produzindo assim o oxigênio singleto.

Ao contrário do superóxido, a hidroxila é um dos radicais mais reativos, interagindo rapidamente com todos os tipos de moléculas. Este radical está envolvido na iniciação da LPO de membranas biológicas, bem como a oxidação e danos às proteínas, DNA nuclear e mitocondrial. Além disso, os carboidratos e o ácido ribonucléico (RNA)

também são alvos importantes do radical hidroxila (Halliwell & Guteridge, 2007). Além dos radicais superóxido e hidroxila, outras ROS, como os radicais peroxila e alcoxila, são formadas a partir de hidroperóxidos orgânicos e radicais orgânicos centrados no oxigênio, respectivamente. Sabe-se que estas ROS podem agir como intermediários na LPO, bem como na oxidação de outras biomoléculas (Bergendi *et al*., 1999). Além da relevância das ROS geradas a partir da redução do oxigênio, cabe ressaltar ainda que radicais livres também podem ser produzidos a partir da redução do nitrogênio, os quais podem produzir danos oxidativos às biomoléculas quando encontrados em concentrações excessivas (Fig. 1).

O óxido nítrico ($NO^{\cdot}$) é um gás que exerce um importante papel bioquímico e fisiológico. No entanto, é também considerado um radical livre por possuir um elétron desemparelhado em seu último orbital. Sua formação é catalisada pela óxido nítrico sintetase, uma enzima envolvida na sinalização celular e nas respostas imunológicas. No que se refere ao metabolismo oxidativo, o óxido nítrico está associado à formação do radical peroxinitrito ($ONOO^{-}$), que possui grande poder oxidante sobre ácidos nucleicos, proteínas e lipídeos (Dusse *et al.*, 2003) (Fig. 1).

Para conter os danos oxidativos causados pelas ROS, os organismos aeróbicos possuem estratégias de defesa, as quais são divididas em três níveis: prevenção da formação de ROS, eliminação das ROS formadas e reparo das moléculas modificadas pelas ROS (Storey, 1996; Ribeiro *et al*. 2005). Dentre os níveis de adaptação, se destacam os mecanismos de eliminação das ROS, que se dão por meio da atividade de enzimas antioxidantes e do envolvimento de agentes antioxidantes não enzimáticos, os quais tem como papel central a proteção dos alvos biológicos contra os potenciais danos oxidativos das ROS (Fig. 2).

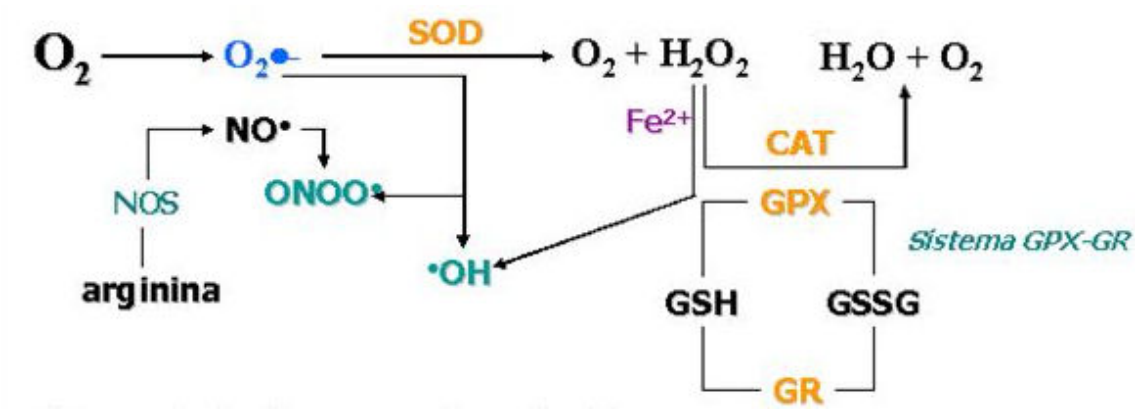


Figura 1. Diferentes vias do metabolismo oxidativo envolvidas na geração e neutralização de espécies reativas de oxigênio. SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase, GPx: glutationa peroxidase; GR: glutationa redutase; NOS: óxido nítrico sintase. Outros compostos participantes do metabolismo oxidativo incluem oxigênio (O_2), radical superóxido (O_2^{-}), radical hidroxila ($OH^{\cdot}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical peroxinitrito ($ONOO^{-}$), ferro (Fe^{+2}), arginina (Arg), óxido nítrico ($NO^{\cdot}$), glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG) e água (H_2O). Fonte: *http://www.efdeportes.com*

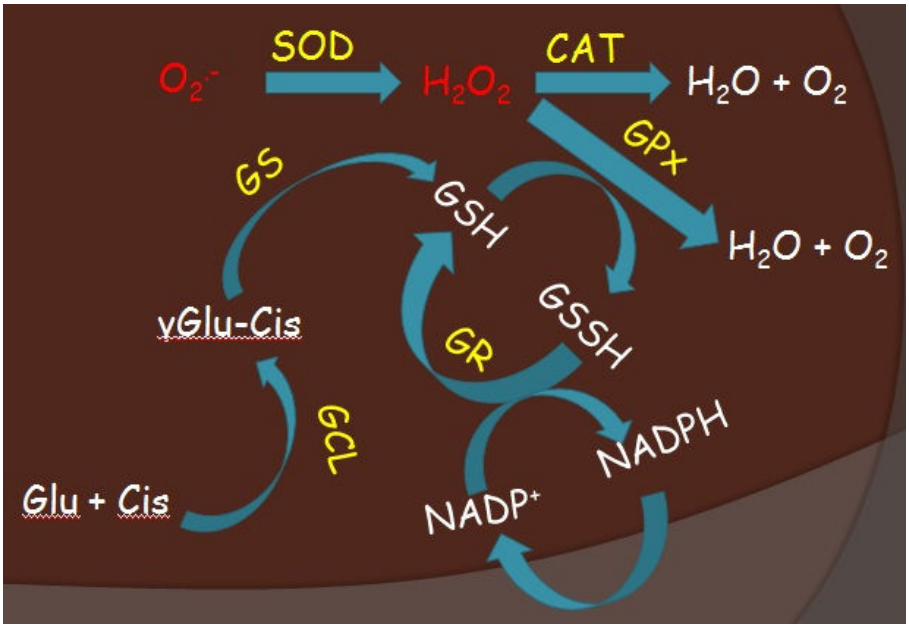


Figura 2. Esquema representativo das principais estratégias enzimáticas antioxidantes envolvendo a formação e reciclagem da glutationa, antioxidante não enzimático com papel central na eliminação de espécies reativas de oxigênio. $OH^{\cdot}$: radical hidroxila, peróxido de hidrogênio H_2O_2; SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutationa peroxidase; GR: glutationa redutase; GS: glutationa sintetase; GCL: glutamato-cisteína ligase; γ-Glu-Cis: γ-glutamil-cisteina; Glu: glutationa; Cis: cisteína; GSH: glutationa reduzida; GSSG: gluationa oxidada; O_2: oxigênio; H_2O: água. *Fonte: Remacle et al. (1992), Sies (1999) e Hermes-Lima (2004).*

As enzimas envolvidas no mecanismo de defesa antioxidante constituem a proteção antioxidante primária na eliminação das ROS formadas, sendo que o mecanismo clássico de eliminação ocorre através da ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR) (Michiels *et al*., 1994) (Fig. 2).

A SOD é a principal e primeira defesa contra o radical superóxido, pois ela cataliza a reação espontânea de dismutação do radical superóxido (Fridovich, 1997). No caso dos vertebrados, a família da SOD possui quatro diferentes enzimas, sendo duas formas de cobre-zinco SOD, a manganês-SOD e a ferro-SOD, que se diferenciam principalmente pelo ligante metálico e a localização nas células (Hermes-Lima, 2004).

Por sua vez, a CAT é uma enzima encontrada na maioria das espécies já estudadas, sendo prioritariamente encontrada nos peroxissomos e em mitocôndrias, por serem as organelas que sofrem a maior presença do peróxido de hidrogênio. Portanto, a CAT é uma das enzimas responsáveis pela conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (Hermes-Lima, 2004). No entanto, cabe notar que a GPx é uma enzima selênio-dependente e também uma das enzimas responsáveis na eliminação do peróxido de hidrogênio. Além disso, a GPx também é responsável pela eliminação de hidroperóxidos orgânicos, bem como de hidroperóxidos de ácidos graxos (LOOH). As reações de eliminação de ROS catalisadas pela GPx têm como agente redutor o tripeptídeo glutationa (GSH) (Hermes-Lima, 2004).

A GSH é um dos mais abundantes tióis de baixo peso molecular em células animais, desempenhando assim um papel importante em vários processos celulares, sendo o principal composto envolvido no mecanismo de defesa antioxidante não enzimático. Entre suas funções destaca-se a eliminação de radicais livres, a redução de peróxidos e a conjugação com compostos eletrofílicos, fornecendo às células diversas

defesas contra as ROS e seus subprodutos tóxicos (Meister e Anderson, 1983). A GSH é particularmente eficaz contra os radicais hidroxila, que são altamente tóxicos e para os quais não se conhecem as defesas enzimáticas (Bains & Shaw, 1997).

Após a sua utilização nos processos de defesa antioxidante, os níveis de GSH no organismo são renovados pela reciclagem da glutationa oxidada (GSSH) em glutationa reduzida (GSH), através da atividade da GR e/ou a produção de novas moléculas de GSH (Fig. 2). Este tripeptídeo é sintetizado nas células pela ação consecutiva de duas enzimas dependentes de ATP. A glutamato-cisteína ligase (GCL) catalisa a reação entre o glutamato e a cisteína para formar o dipeptídeo γGlu-Cys, que é então combinado com a glicina para gerar GSH em uma reação catalisada pela glutationa sintase (GS) (Fig. 2). A síntese da GSH nas células é normalmente regulada pela concentração de GSH disponível no organismo, ou seja, quando os níveis de GSH estão altos ocorre uma inibição da GCL (feedback negativo) e quando os níveis estão baixos esse feedback é cortado, sinalizando a produção (Maher, 2005).

Além da GSH, está demonstrado na literatura que as mucoproteínas podem também exercer importante papel antioxidante contra as ROS. De fato, a secreção de muco contribui de forma significativa no sistema de defesa antioxidante em invertebrados aquáticos, como os poliquetos. Monserrat *et al.* (2007) consideram que este mecanismo químico de proteção contra as ROS representa um processo adaptativo nos organismos que habitam ambientes estressantes quanto à variações nos parâmetros físico-químicos da água, tais como os estuários.

Pela definição clássica, um organismo encontra-se em estresse oxidativo quando a concentração de ROS é mais elevada que a capacidade do sistema de defesa antioxidante do organismo para eliminá-las, proporcionando assim um aumento na oxidação das biomoléculas. Os danos mais comuns evidenciados em uma situação de

estresse oxidativo são a peroxidação de lipídios (LPO), a oxidação de proteínas (carbonilação) e danos ao DNA (Giorgio *et al.,* 2007).

Portanto, os radicais livres e as ROS podem causar sérios danos oxidativos às biomoléculas, sendo que as reações causadas por moléculas com elétrons desemparelhados podem ter diferentes naturezas. No caso do dano ao DNA, pode ocorrer oxidação de bases nitrogenadas e quebras na fita do DNA. No caso da LPO, o processo oxidativo ocorre através da remoção de um elétron dos ácidos graxos poli-insaturados pelo ROS (Hermes-Lima, 2004; Halliwell & Guteridge, 2007), sendo este considerado como uma das principais causas de lesão e morte celular. Neste caso, ocorre uma reação em cadeia, onde oxidantes fortes causam a degradação dos fosfolipídios da membrana que contêm ácidos graxos poli-insaturados. Os processos oxidativos causam danos que podem variar desde uma redução local, alteração na fluidez e ruptura completa da membrana celular, dependendo da natureza e da concentração do oxidante (Abuja & Albertini, 2001).

Por outro lado, a maioria dos estudos envolvendo a avaliação de danos oxidativos gerados pelas ROS em proteínas está focada em determinadas enzimas purificadas ou são realizados utilizando-se células, organelas e amostras de tecidos, onde a oxidação proteica geral é determinada e relacionada aos processos gerais associadas ao estresse oxidativo. Ao contrário do que ocorre com o DNA, são poucos os mecanismos celulares envolvidos na proteção contra oxidação proteica e na reparação de proteínas danificadas. Neste caso, as proteínas danificadas são orientadas para a degradação por proteases endógenas, incluindo a catepsina C, calpaína, tripsina e proteassoma. A reciclagem de proteínas oxidadas por meio de proteólise é a maneira das células evitarem o acúmulo de proteínas com defeito (Hermes-Lima, 2004).

Figura 3. Vista parcial do Lago Magadi, situado no Leste da África (Cidade de Magadi, Distrito de Kajiado), na depressão do Rift Valley ao sul do Quênia (Latitude: 1°43'S-2°10'S; Longitude: 36°00'E-36°30'E). *Fonte: https://it.wikipedia.org/wiki/Lago_Magadi*

Considerando o que foi descrito acima, denota-se que a tolerância dos organismos aeróbicos a variações extremas nas condições físico-químicas da água, especialmente aquelas relacionadas à temperatura e oxigênio dissolvido, depende da adequada capacidade de resposta do sistema de defesa antioxidante destes organismos.

O Lago Magadi (Fig.3), situado no Leste da África (Cidade de Magadi, Distrito de Kajiado), mais precisamente na depressão do Rift Valley ao sul do Quênia, é envolto por colinas e apresenta as águas salobras mais concentradas do Rift Valley africano (Warren, 2006; Kodikara *et al.*, 2012). Estas águas sofrem intensa evaporação de forma intermitente, ocorrendo com isso uma grande precipitação dos minerais Trona ($Na_2CO_3.NaHCO_3.2H_2O$), Quartzo (SiO_2), Magadiíta ($NaSi_7O_{13}(OH)_3.3H_2O$) e Queniaíta ($NaSi_{11}O_{20.5}(OH)_4.3H_2O$). O depósito da Trona pode chegar a se estender por

47 km^2 e apresentar uma espessura de 7 a 50 m. Portanto, a precipitação, redissolução, reprecipitação e reações são comuns neste ambiente (Kodikara *et al.*, 2012). Desta forma, as águas do Lago Magadi ficam sujeitas a evaporação, tanto na superfície quanto pelo processo de capilaridade. Além disso, ocorre uma circulação hidrotermal associada a numerosas atividades alcalinas e vulcânicas que geram as fontes naturais de água termal, situadas às margens deste lago, e que suprem toda a região com água (Warren, 2006). As águas provenientes das fontes termais situadas no noroeste e no sul do lago podem atingir a temperatura de até 86°C (Jones, 1977).

Análises dos parâmetros físico-químicos das águas do Lago Magadi indicam grandes variações diárias de temperatura (20-43°C) e teor de oxigênio dissolvido (3-18 mg O_2/L) (Reite *et al.*, 1974; Johansen *et al.*, 1975; Johannsson *et al.*, 2014). De fato, este ambiente é considerado um dos mais inóspitos do planeta para a manutenção da vida aquática. Portanto, devem ocorrer também variações diárias na atividade dos organismos aquáticos habitantes neste ambiente, o que pode resultar em frequentes e importantes alterações no metabolismo oxidativo e energético destas espécies. Além disso, é importante salientar que as águas do Lago Magadi apresentam outras condições extremas para sobrevivência e desenvolvimento de espécies aquáticas, tais como pH alcalino (~10), altas concentrações de sais (densidade específica: 1.015 osmolaridade: ~600 mOsmol/L) e de ROS (2.53-8.10 μM), bem como elevada alcalinidade (~380 mM) e incidência de radiação ultravioleta (Reite *et al.*, 1974; Johansen *et al.*, 1975; Narahara *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2004; Johannsson *et al.*, 2014).

Além das possíveis adaptações associadas às variações diárias de temperatura e oxigênio dissolvido, bem como aquelas relacionadas aos balanços hídrico e eletrolítico necessárias para sobrevivência e desenvolvimento nas águas salinas do Lago Magadi, as propriedades físico-químicas características deste ambiente forçam outras adaptações

para que os animais tolerem tais condições extremas. Por exemplo, Randall *et al.* (1989) e Wood *et al.* (1989) mostraram que a tilápia *Oreochromis alcalicus grahami* (atualmente descrita como *Alcolapia grahami*), que é endêmica do Lago Magadi, excreta todo seu nitrogênio em excesso na forma de ureia ao invés de amônia, portanto, ao contrário do que ocorre na maioria dos peixes. Segundo Wood *et al*. (1994), isto mostra que esta espécie de tilápia está altamente adaptada a este ambiente alcalino, uma vez que a maioria dos peixes teleósteos são amoniotélicos. Isto se explicaria pelo fato de que seria muito difícil ou até mesmo impossível a tilápia excretar amônia através das brânquias em uma água com pH 10, uma vez que isto provocaria uma alteração importante no equilíbrio ácido-base do organismo (Wood *et al.*, 1989). Outro fator importante a ser levado em consideração em termos das estratégias adaptativas desenvolvidas por esses animais é que o pH sanguíneo e os níveis de $NHCO_3^-$ são elevados na tilápia *A. grahami*, quando comparados àqueles observados nos peixes teleósteos, fato este que está associado ao ambiente altamente alcalino onde o animal vive (Johansen *et al.*, 1975; Wood *et al.*, 1989).

No que se refere aos aspectos adaptativos à vida aquática no Lago Magadi, apesar do importante conhecimento já relatado para a espécie de tilápia endêmica deste lago (*A. grahami*), não existe nenhum estudo relacionado às adaptações bioquímicas e fisiológicas em invertebrados habitantes deste sistema. De fato, uma cadeia trófica simples, porém altamente produtiva sobrevive nas condições extremas das águas do Lago Magadi. Esta cadeia seria composta por cianobactérias, ocasionalmente copépodes ciclopóides, larvas de insetos, a tilápia *A.grahami* e um grande número de aves aquáticas piscívoras (garças, andorinhas, gaivotas e ocasionalmente pelicanos) e flamingos (Coe, 1966; Javor, 1989; Johannsson et al., 2014). Durante nossas recentes expedições realizadas neste lago em 2010 e 2013, não foram observados os copépodes

ciclopóides relatados por Coe (1966), porém foram encontradas larvas de quironomídeos (Johannsson et al., 2014).

Dentre os invertebrados aquáticos, os insetos da família Chironomidae apresentam a mais ampla distribuição no mundo, ocorrendo em todas as regiões zoogeográficas (Trivinho-Strixino, 2010). Elas podem ocorrer em quase todos os ambientes dulcícolas, em sistemas lóticos e lênticos, fontes termais, lagos vulcânicos, águas de degelo, água acumulada em folhas e madeiras, solo úmido, águas salobras, zona intermareal e poços de petróleo (Pinder e Reiss, 1983). Isto faz com que este grupo animal seja considerado como sendo o melhor adaptado dentre os insetos aquáticos, quando se leva em conta a diversidade de habitat ocupado por estes organismos.

Quanto à alimentação, os quironomídeos podem ser saprófagos, detritívoros, herbívoros ou predadores (Merritt e Cummins, 1984; Ward, 1992; Trivinho-Strixino e Strixino, 1995). Os quironomídeos, assim como todos os representantes da Ordem Diptera, passam por uma metamorfose completa durante o seu ciclo de vida (Fig. 4). Neste caso, os estágios imaturo e adulto são muito diferentes na forma, hábitos e no tipo de habitat que ocupam. A maioria das larvas são aquáticas, com algumas ocorrendo em substâncias em decomposição, sob cascas de árvore e no solo úmido. Por sua vez, os adultos geralmente vivem pouco e, com algumas exceções, não se alimentam (Rasmussen, 1996; Jurenka, 2015). Por exemplo, os quironomídeos *Goeldichironomus luridus* e *G. maculatus* apresentaram um ciclo de vida médio de 20 e 28 dias em 21-26ºC, respectivamente. Em ambos os casos, o tempo de incubação foi curto (48 h) e o desenvolvimento larval se deu em 4 estágios (Corbi e Trivinho-Strixino, 2006).

No entanto, sabe-se que a atividade corporal, o desenvolvimento e o crescimento larval, e consequentemente o metabolismo oxidativo e energético em insetos, incluindo os quironomídeos, variam com a temperatura e a disponibilidade de oxigênio dissolvido

no ambiente (Chapman, 1998; Jurenka, 2015). Neste caso, o oxigênio necessário ao metabolismo oxidativo e consequentemente à produção de energia (ATP) para manutenção das atividades corporais, após ser absorvido por difusão através da cutícula, vai para a traqueia e depois é estocado pela hemoglobina presente nos tecidos das larvas dos insetos da família Chironomidae (Lankester, 1867; Walshe, 1947; Panis *et al*., 1995; Rasmussen, 1996). Por sua vez, o comportamento locomotor e de ventilação nos insetos (Jensen *et al.*, 1997), incluindo os quironomídeos (Azevedo-Pereira *et al.*, 2011), podem ser avaliados através da análise da atividade da colinesterase. De fato, há muito tempo se sabe que esta enzima tem ampla distribuição nos tecidos, especialmente no sistema nervoso central, exercendo um papel fundamental na regulação das atividades funcionais nos insetos (Booth e Lee, 1971; Pitman, 1971; Toutant, 1989; Chapman, 1998; Jurenka, 2015).

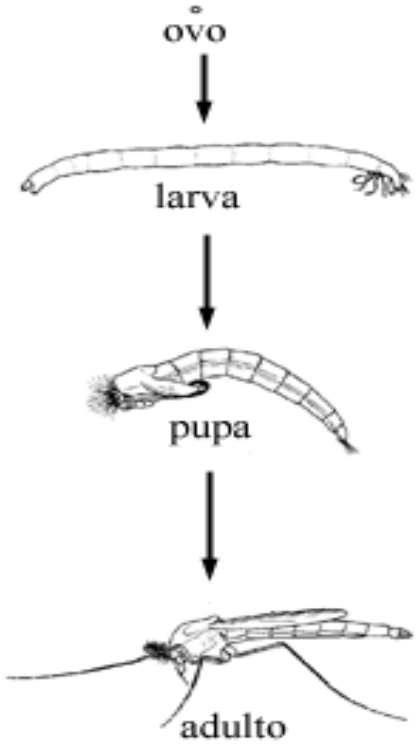


Figura 4. Esquema simplificado mostrando o ciclo de vida de um inseto da Ordem Diptera. *Fonte: http://www.ufscar.br*

Como mencionado acima, o teor de oxigênio dissolvido na água é uma variável ecológica fundamental que interfere na fisiologia e sobrevivência dos insetos, principalmente quando associado à temperatura, uma vez que está diretamente relacionado à obtenção da energia necessária aos processos biológicos essenciais (Chapman, 1998, Rasmussen, 1996, Jurenka, 2015). Por sua vez, a temperatura pode alterar a integridade estrutural, bioquímica e funcional das biomoléculas, sendo assim o fator físico que mais afeta a vida e o desenvolvimento dos insetos. Assim, a temperatura ótima de uma espécie é aquela em que o consumo de alimento é otimizado e a liberação da energia necessária à multiplicação celular e ao crescimento é ideal, ocorrendo assim um adequado desenvolvimento, crescimento e reprodução (Régnière *et al*., 2012).

Na maioria dos casos, a elevação da temperatura é acompanhada por um aumento no metabolismo aeróbico, a qual reflete em um maior consumo de oxigênio, bem como alterações nos substratos energéticos (livres ou estocados), tais como carboidratos, lipídios e proteínas, e seus metabólitos (Lehningher *et al.*, 2005). Por exemplo, estudos demonstram que o nível de creatinina no líquido circulante e no corpo gorduroso indica a taxa de mobilização e deposição das proteínas ao longo do desenvolvimento larval de insetos. Por isso, este composto pode ser considerado como um potencial indicador do metabolismo proteico nestes animais (Shinzato *et al.,* 1997). Por sua vez, a bilirrubina, um metabólito da degradação da hemoglobina, também faz parte da biossíntese e pode se depositar no corpo gorduroso dos insetos (Rockstein, 1978; Morgan, 2010). Assim, medidas dos níveis de hemoglobina e de bilirrubina, em combinação com análises de substratos energéticos (carboidratos, lipídeos e proteínas) e seus metabólitos, podem se constituir importantes ferramentas para a análise da atividade metabólica em insetos.

No contexto do presente estudo, ressalta-se que um aumento excessivo no consumo de oxigênio possibilita o vazamento de prótons na mitocôndria, o que potencializa a geração de ROS e uma possível geração da condição de estresse oxidativo. Neste caso, as amplas variações intermitentes nas propriedades físico-químicas das águas do Lago Magadi, especialmente temperatura, oxigênio dissolvido e ROS, devem exigir adaptações fisiológicas e bioquímicas específicas nas larvas de quironomídeos encontradas neste ambiente hostil, assim como relatado para a tilápia *A. grahami* endêmica do Lago Magadi. Neste caso, destacam-se as análises realizadas no presente estudo visando caracterizar o sistema de defesa antioxidante (enzimático e não enzimático) nas larvas dos quironomídeos encontrados no Lago Magadi, bem como avaliar as possíveis respostas deste sistema em função das variações diárias e extremas nos parâmetros físico-químicos das águas do Lago Magadi.

OBJETIVO

O objetivo central do presente estudo foi avaliar as alterações no metabolismo e sistema de defesa antioxidante na larva do quironomídeo *Tanitarsus minutipalpus* frente às variações diárias e extremas de temperatura e oxigênio dissolvido nas águas do Lago Magadi (Cidade de Magadi, Distrito de Kajiado, Rift Valley, Quênia, África).

Para atender a este objetivo, foram analisados ao longo do dia os principais parâmetros físico-químicos da água (temperatura, teor de oxigênio dissolvido e pH) do Lago Magadi, bem como avaliados parâmetros relacionados ao metabolismo corporal (consumo de oxigênio, atividade da colinesterase, glicose, triglicerídeos, colesterol, proteínas, uréia, hemoglobina e bilirrubina), aos agentes pró-oxidantes (ROS e óxido nítrico), aos agentes antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR, GCL, GR, GSSG e

mucoproteínas) e ao balanço oxidativo (TOSC, LPO e dano no DNA) nas larvas do quironomídeo do Lago Magadi.

ARTIGO

Os resultados obtidos nos estudos realizados no âmbito da presente Dissertação de Mestrado estão descritos no artigo científico intitulado "Antioxidant defense system in larvae of the chironomid *Tanytarsus minutipalpus*: Adaptation to the extreme environmental conditions of the Lake Magadi (Kenya, Africa)". Este artigo será submetido para publicação na revista científica "*The Journal of Experimental Biology*" (fator de impacto: 2.90).

METABOLISM AND ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM IN THE LARVAE OF THE CHIRONOMID Tanytarsus minutipalpus: ADAPTATION TO THE EXTREME ENVIRONMENTAL CONDITIONS OF THE LAKE MAGADI (KENYA, AFRICA)

Lucas F. Bianchini[1], Chris M. Wood[1,2], Harold L. Bergman[3], Ora E. Johannsson[5], Pierre Laurent[1], Claudine Chevalier[1], Mosiany L. Kisipan[6], Geraldine D. Kavembe[7], Michael B. Papah[8], Gudrun De Boeck[9], John N. Maina[10], Rodi O. Ojoo[8] and Adalto Bianchini[1*]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas - Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Avenida Itália km 8, 96.203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

[2] Department of Biology, McMaster University, Hamilton, ON, Canada L8S 4K1

[3] Department of Zoology, University of British Columbia,Vancouver, BC, Canada V6T 1Z4

[4] Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, Laramie, WY 82071, USA

[5] Great Lakes Laboratory for Fisheries and Aquatic Sciences, Department of Fisheries and Oceans, Canada, Burlington, ON, Canada L7R 4A6

[6] Dept. of Veterinary Anatomy and Physiology, Faculty of Veterinary Medicine and Surgery, Egerton University, 536 - 20115, Egerton

[7] Department of Range and Wildlife Sciences, South Eastern University College, 170-90200, Kitui, Kenya

[8] Department of Veterinary Anatomy and Physiology, University of Nairobi, Kenya

[9] Department of Biology, University of Antwerp, Belgium

[10] Department of Zoology, University of Johannesburg, South Africa

[*] Corresponding author: Adalto Bianchini
Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Ciências Biológicas - ICB
96.203-900 - Rio Grande, RS, Brasil
Phone: +55 53 32935255
FAX: +55 53 32336848
e-mail: adaltobianchini@furg.br

SUMMARY

In the present study, we report for the first time the occurrence of the immature chironomid *Tanytarsus minutipalpus* in the Lake Magadi (Kenya, Africa). Adaptive responses in metabolism and antioxidant defense system to the diel variations in the extreme environmental conditions of the Lake Magadi were evaluated in chironomid larvae. In July-August 2010 and 2013, we performed measurements of water physicochemical parameters (temperature, dissolved oxygen and pH) and chironomid sampling at different times of day (7:00 am, 1:00 pm and 7:00 pm of the first day; and 1:00 am and 7:00 am of the following day). Larvae were collected using a bean trawl net (90-µm mesh), manually separated and immediately placed in liquid nitrogen or quickly transferred to laboratory for analyses of parameters indicative of metabolism (cholinesterase activity and glucose, triglycerides, cholesterol, proteins, urea, creatinine, hemoglobin and bilirubin concentration), pro-oxidant status [reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) concentration], antioxidant status [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glutamate-cysteine ligase (GCL) activity, as well as total glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and mucoproteins concentration], and oxidative status [total antioxidant capacity (TOSC), lipid peroxidation (LPO) and DNA damage]. Wide variations in water temperature (20.2-29.3^{o}C) and dissolved oxygen (3.2-18.6 mg O_2/L) were observed at different times of day, without any significant change in water pH (10.0 ± 0.03). Higher mean values of water temperature and dissolved oxygen were observed at 1:00 pm (29.3 ± 0.8^{o}C and 18.6 ± 1.0 mg O_2/L, respectively) and 7:00 pm (29.3 ± 1.4^{o}C and 16.2 ± 1.6 mg O_2/L, respectively). Significant increases in parameters related to metabolism (cholinesterase, glucose, cholesterol, urea, creatinine and hemoglobin) paralleled by significant increases in the major components of the

antioxidant system (SOD, GPx, GR, GSH and GSSG) were observed in chironomid larvae collected at 1:00 pm. On the other hand, no significant changes were observed in pro-oxidants (ROS and NO), TOSC and oxidative damage parameters (LPO and DNA damage). These findings clearly show that the antioxidant system of *T. minutipalpus* larvae acts positively and cooperatively to face an increased metabolism in response to increasing temperature and O_2 content in Lake Magadi waters. They also indicate that biochemical and physiological adjustments performed by the chironomid larvae were efficient in keeping body homeostasis, as well as protecting biomolecules against oxidative damage. GSH-GSSG and GPx-GR systems were shown to play an essential role in the adaptive response displayed by the chironomid larvae when facing the diel changes in the extreme conditions of the Lake Magadi.

Key words: Africa, antioxidant system, chironomid larvae, extreme conditions, Lake Magadi, metabolism, oxidative stress

INTRODUCTION

The Lake Magadi in southern Kenya (east Africa) shows the briniest waters of the African Rift Valley (Kodikara et al., 2012). Also, waters coming from the northwestern and southeast thermal springs in the lake can reach up to 86°C (Jones, 1977). In fact, physicochemical analyses of the Lake Magadi waters indicate marked diel changes in temperature (20-43°C) and dissolved oxygen content (3-18 mg O_2/L). Indeed, this lake is considered as one of the most extreme aquatic environments on Earth (pH ~10, carbonate alkalinity ~380 mequiv/L; specific density: 1.015; osmolality: ~600 mosmol/L; and high incidence of UV light) (Reite et al., 1974; Johansen et al., 1975; Narahara *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2004; Johannsson *et al.*, 2014).

The tolerance of aerobic aquatic animals to extreme environmental conditions, especially temperature and dissolved oxygen content, is shown to be dependent on the presence of morphological, biochemical, physiological and behavioral adaptations (Hermes-Lima et al., 2004; Wilson et al., 2004; Régnière et al., 2012; Johannsson et al., 2014). Therefore, animals living in the Lake Magadi must have evolved adaptive processes to colonize and develop successfully under the extreme conditions of the lake. For example, Randall et al. (1989) and Wood et al. (1989) showed that *Alcolapia grahami* (formerly *Oreochromis alcalicus grahami*), an endemic tilapia from the Lake Magadi, excretes all excess of nitrogen as urea and not ammonia, thus being different from most fish. Although several studies were already performed focusing on the adaptive responses of the tilapia *A. grahami* to the extreme environmental conditions of Lake Magadi (for example, Reite et al., 1974; Johansen et al., 1975; Randall et al., 1989; Wood et al., 1989; Narahara et al., 1996; Wilson et al., 2004; Wood et al., 2012; 2013; Johannsson et al., 2014), there are no studies available on the adaptive features in invertebrates from this lake. Indeed, a simple but high productive trophic web survives

in the extreme conditions of the Lake Magadi. This food web is comprised by the cianobacteria *Artrospira* sp., copepods, insect larvae, the tilapia *A.grahami*, and a variety of piscivorous birds (egrets, herons, terns, gulls and occasional pelican) and flamingos (Coe, 1966; Javor, 1989; Johannsson, 2014). During expeditions to Lake Magadi in 2010 and 2013, we have collected larvae of chironomids which were used to perform the present study.

Among aquatic insects, those belonging to the Chironomidae family show a wide distribution around the world, being present in all zoogeographical regions (Trivinho-Strixino, 2010). They can be found in almost all freshwater environments (lotic and lentic systems), thermal springs, volcanic lakes, melting waters, brackish waters, intertidal zones and even in oil wells (Pinder and Reiss, 1983). They can be saprophytes, herbivorous, detritivorous or predators (Merritt and Cummins, 1984; Ward, 1992; Trivinho-Strixino and Strixino, 1995). As other insects belonging to the Diptera order, chironomids perform a complete metamorphosis during their life cycle. Immature stages and adults show morphological, physiological, behavioral and ecological differences (Chapman, 2008; Jurenka, 2015). Larvae of most species are aquatic, with some occurring under organic matter under decomposition, bark of plants and humid soils. On the other hand, adults generally have a very short life and do not feed, with few exceptions (Rasmussen, 1996; Jurenka, 2015).

In the scope of the present study, it is worth noting that water temperature and dissolved oxygen content have a great influence on the metabolism of larvae of aquatic insects, including chironomids (Rasmussen, 1996; Chapman, 1998; Corbi and Trivinho-Strixino, 2006; Jurenka, 2015). In turn, the oxygen needed to fulfill the metabolic requirements of chironomids is stored by the hemoglobin present in tissues (Lankester, 1867; Walshe, 1947; Panis et al., 1995; Rasmussen, 1996). Therefore, changes in insect

metabolism induced by increasing water temperature or dissolved oxygen content can be evaluated using alternative indicators such as hemoglobin and its metabolite bilirubin. In turn, changes in ventilation and locomotor behavior in insects can be evaluated through cholinesterase activity (Jensen et al., 1997; Azevedo-Pereira et al., 2011).

In most cases, increased environmental temperature is paralleled by an enhanced metabolism in insects, which could be reflected by changes in the amount of free and stored energy substrates such as carbohydrates, lipids and proteins, as well as their metabolites (Chapman, 1998; Jurenka, 2015). However, significant changes are generally easier observed in carbohydrate and lipid stores than in protein levels. It is worth noting that creatine and creatinine are found in the circulating fluid, fat body and excreta of insects (Lazar and Mohamed, 1988a,b). Therefore, these compounds can be used as alternative indicators of changes in protein metabolism in insects.

Extreme conditions and marked diel variations in temperature and dissolved oxygen content have been reported in Lake Magadi waters for decades (Reite et al., 1974; Johansen et al., 1975; Narahara *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2004). Very recently, we have demonstrated that Lake Magadi waters also undergo levels of reactive oxygen species (ROS) that can reach up to 8.10 μM H_2O_2, which are amongst the higher values already reported in the literature (Johannsson et al., 2014). It is important to stress that the marked increases in water temperature and dissolved oxygen content observed during daytime in Lake Magadi waters (Reite et al., 1974; Johansen et al., 1975; Narahara *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2004) can lead to an excessive oxygen consumption followed by an enhanced generation of ROS which could induce an oxidative stress condition. Indeed, a worst scenario may be established when this condition is combined with the high levels of ROS found in Lake Magadi waters (Johannsson et al., 2014).

As reported for the tilapia *O. alcalicus grahami*, which is endemic from the Lake Magadi, the larvae of chironomids we collected in this lake must have also acquired specific biochemical and physiological adaptations to face the extreme environmental conditions of Lake Magadi. In particular, an adaptive response of the antioxidant system to face the extreme and unique conditions of Lake Magadi waters, especially those related to temperature, dissolved oxygen and ROS would be expected in the chironomid larvae.

In light of the above, the main goal of the present study was to evaluate diel changes in metabolism, as well as pro-oxidant, antioxidant and oxidative status in the chironomid larvae found in Lake Magadi to the diel changes in the extreme environmental conditions of this lake in parallel with changes in a suite of parameters related to metabolism.

MATERIALS AND METHODS

All experiments complied with the laws of Kenya, and were performed under a research permit (No. NCST/RRI/12/1/MAS/99) issued by the National Council for Science and Technology of the Ministry of Higher Education, Science, and Technology of the Republic of Kenya.

Chironomid larvae were collected from 29 July to 02 August 2010 and from 20 to 29 July 2013 at the Flamingo Lagoon, close to the Magadi Township (Kajiado District, Rift Valley, Kenya, Africa). This lagoon is one the four ponds or lagoons belonging to the Fish Springs Lagoon complex (1.867^{o} S, 36.267^{o} E), located on the east side of Lake Magadi (for maps and details see: Johannsson et al., 2014). In different days of the two years of field expeditions, chironomid larvae were collected at different times of day (7:00 am, 1:00 pm and 7:00 pm of the first day; and 1:00 am and 7:00 am

of the following day). Collections were performed at the lake shore (< 0.7 m depth) using a bean trawl net (90-µm mesh). At the moment of larvae collection, pH, dissolved oxygen content and temperature of surface water were measured (DMO-2, Digimed, São Paulo, SP, Brasil). Based on results found in the 2010 expedition, larvae sampling for measurements of parameters evaluated in the 2013 expedition was only performed at 7:00 am and 1:00 pm of the first day (see Results section). In fact, increase in water temperature and dissolved oxygen content was always observed between these times of day (Johannsson et al., 2014).

Immediately after collection, larvae were manually separated using a plastic disposable Pasteur-type pipette, pooled (5-10 larva per pool; 4-6 pools per sampling time), frozen in liquid nitrogen and transferred to the field laboratory for further analysis. Also, some larvae were preserved for taxonomical identification while live larvae were transferred to the field laboratory in water from the collection site for ROS concentration analysis.

In laboratory, frozen samples were weighed (wet weight) using an electronic scale (Model AD500S, Marte Científica, São Paulo, SP, Brazil), homogenized in cold saline solution (0.9 g/L NaCl) using an ultrasound processor (Sonaer Ultrasonics, Farmingdale, NY, EUA), and centrifuged at 2,800 g for 5 min (Model NT800, Nova Técnica, Piracicaba, SP, Brazil). The supernatant was collected and readily used for biochemical analyses using colorimetric methods, as described below.

The following parameters were measured using commercial reagent kits from Labtest Diagnóstica (Lagoa Santa, MG, Brazil): cholinesterase activity (Colinesterase Liquiform kit) and glucose (Glicose PAP Liquiform kit), triglycerides (Triglicérides Liquiform kit), cholesterol (Colesterol Liquiform kit), proteins (Sensiprot kit), urea

(Uréia CE kit), creatinine (Creatinina K kit), hemoglobin (Hemoglobina kit), bilirubin (Bilirrubina kit), and mucoproteins (Mucoproteínas kit) concentration.

The following parameters were measured using reagent kits from PromoCell GmbH (Heidelberg, Germany): superoxide dismutase (SOD) activity (SOD Assay Kit), glutathione reductase (GR) activity (Colorimetric Glutathione Reductase Activity Kit), reduced glutathione (GSH) concentration (Colorimetric Glutathione Detection Kit), and DNA damage (Genomic DNA Isolation Kit I and DNA Damage Detection Kit).

The following parameters were measured using commercial reagent kits from Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, EUA): catalase (CAT) activity (Spectrophotometric Assay for Catalase), glutathione peroxidase (GPx) activity (Colorimetric Assay for Cellular Glutathione Peroxidase), oxidized glutathione (GSSG) concentration (Microplate Assay for GSH/GSSG), glutamate-cysteine ligase (GCL) activity (GCLM Elisa kit), nitric oxide (NO) concentration (Nitric Oxide Colorimetric Assay Kit), total antioxidant scavenging capacity (TOSC) level (Total Antioxidant Power Kit), and lipid peroxidation (LPO) level (Lipid Peroxidation Microplate Assay Kit).

In all cases, we followed the instructions of the reagent kit manufacturer. Whenever possible, assays were adapted to a 96-well microplate. Therefore, sample absorbance readings were performed using either a microplate reader (ELx-800, Biotek, Winooski, VT, EUA) or a spectrophotometer (Espectronic 20, Milton Roy Company, Houston, TX, USA). Data were expressed considering the wet body weight or the protein content in the larvae homogenate.

Upon arrival in the laboratory, live larvae were immediately used for ROS measurements. They were pooled, homogenized and centrifuged as described above for frozen samples. However, samples were homogenized using a buffer phosphate solution

containing NaCl (140 mM), potassium phosphate (10 mM, pH 7.0) and dextrose (5.5 mM). ROS concentration was determined in the homogenate supernatant using the colorimetric method described by Fowler et al. (2003), which is based on the measurement of H_2O_2 using phenol red and peroxidase. A standard curve was built with solutions of H_2O_2 at different concentrations (7.5-30 μM) prepared in the homogenizing buffer. Protein content in the homogenate supernatant was measured as described above for the frozen samples. Data were expressed as μmol H_2O_2/mg protein.

Data were expressed as mean ± standard error (n = 4-6 pools of 5-10 larvae per pool). They were previously tested for homogeneity of variances using the Cochran C test. In turn, data normality was checked by the normal probability plot of raw residuals. Data for all parameters analyzed were parametric (normal distribution and homogeneity of variances). Therefore, mean values were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's test. In all cases, the significance level adopted was 95% ($\alpha = 0.05$).

RESULTS

Water physicochemical parameters measured in the Flamingo Lagoon (Lake Magadi) are shown in Figure 1. Wide variations in water temperature (20.2-29.3^{o}C) and dissolved oxygen content (3.2-18.6 mg O_2/L) were observed at the different times of day. Higher mean values of water temperature and dissolved oxygen were observed at 1:00 pm and 7:00 pm (Fig. 1). On the other hand, there was no significant change in water pH at the different times of day. Therefore, a general mean value was calculated (pH = 10.0 ± 0.03).

According to Dr. Luiz Carlos de Pinho of the Department of Zoology and Ecology of the Federal University of Santa Catarina (UFSC, Florianópolis, SC, Brazil),

the immature chironomid collected in the Lake Magadi and used in the present study was identified as *Tanytarsus minutipalpus* (Insecta, Diptera, Chironomidae).

Data for the several indicators of metabolic activity analyzed are shown in Table 1. Whole-body cholinesterase activity and glucose, cholesterol, creatinine, and hemoglobin concentrations were significantly higher in chironomid larvae collected at 1:00 pm than in those collected in the other times of day (7:00 am and 7:00 pm of the next day, and 01:00 am and 7:00 am of the next day). Whole body urea concentration was higher in chironomid larvae collected at 1:00 pm than in those collected in the morning (7:00 am of the first day and 7:00 am of the following day). There were no significant changes in whole-body concentrations of triglycerides, proteins, bilirubin and mucroproteins in larvae collected at the different times of day. Also, no significant diel changes were observed in the concentrations of pro-oxidants (ROS and NO), as well as in the total antioxidant capacity (TOSC). Furthermore, no significant variations were observed in LPO and DNA damage levels in larvae collected at the different times of day (Table 1).

Activities of SOD (Fig. 2), GPx and GR (Fig. 3), as well as concentrations of reduced and oxidized glutathione (Fig. 4) were significantly higher in chironomid larvae collected at 1:00 pm than in those collected at different times of day. The GSH/GSSH ratio was within 19.5-25.3 at the different times of day, with reduced GSH corresponding to 94.8-96.0% of the total GSH content. On the other hand, no significant diel variation was observed in CAT activity (Fig. 2).

DISCUSSION

The immature chironomid collected at the Flamingo Lagoon on the east side of Lake Magadi was identified as the larvae of *T. minutipalpus* (Insecta, Diptera,

Chironomidae). *Tanytarsus* is described as one of the most diverse genuses of the Chironomidae family (Pinder and Reis, 1983; Rasmussen, 1996; Chapman, 2008; Jurenka, 2015). It is important to note that *T. minutipalpus* was described for the first time in 1999, with the occurrence of adult and larvae being reported for some salty lakes of Ethiopia, Tanzania and Kenya. However, no reference was made for Lake Magadi in Kenya (Ekrem and Harrison, 1999). Therefore, at the best of our knowledge, this study is the first to report the occurrence of the chironomid *T. minutipalpus* in the Lake Magadi.

Also, the present study is the first to report biochemical and physiological responses of an invertebrate species to variations in the extreme conditions of Lake Magadi. It was expected that larvae of *T. minutipalpus* would display specific adaptations to live under the extreme variable and stressing physicochemical conditions of Lake Magadi waters. As reported by Verschuren (1997), *Tanytarsus* sp. is anoxia intolerant and the only genus of chironomid to thrive in metasaline African soda Lakes. In the present study, we report changes in parameters associated with metabolism with a particular focus on the antioxidant system and the oxidative status of *T. minutipalpus* larvae. As further discussed, these changes seem to be an adaptive feature of this aquatic animal in response to the diel variations in physicochemical conditions of the Lake Magadi waters.

The diel variations in water temperature (20.2-29.3^{o}C) and dissolved oxygen (3.2-18.6 mg O_2/L) content, as well as the constant water pH (10.0 ± 0.03) reported in the present study are quite similar to those previously reported for Lake Magadi waters (Reite et al., 1974; Johansen et al., 1975; Narahara et al., 1996; Wilson et al., 2004; Johannsson et al., 2014). These variations induced significant metabolic changes in *T. minutipalpus* larvae. This statement is based on the fact that significant increases were

observed in whole-body cholinesterase activity and concentrations of hemoglobin, creatinine, urea and glucose in larvae collected at 1:00 pm.

It is well known that cholinesterase has a large distribution in chironomid tissues, especially in the central nervous system, playing an essential role in the regulation of functional activities, including ventilation (Booth and Lee, 1971; Pitman, 1971; Toutant, 1989; Chapman, 1998; Azevedo-Pereira et al., 2011; Jurenka, 2015). Therefore, the increased cholinesterase activity observed in chironomid larvae collected at 1:00 pm can be explained considering an enhanced ventilation activity of *T. minutipalpus* larvae following the metabolic changes related to the marked raise in temperature and dissolved oxygen content observed in Lake Magadi waters at this time of day. Also, it is worth noting that cholinesterase activity in larvae collected at 7:00 pm was restored back to values similar to those found in larvae collected at 7:00 am of the same day and 1:00 am and 7:00 am of the next day. However, mean values of water temperature and dissolved oxygen content at 7:00 pm were as high as those observed at 1:00 pm of the same day. Taken together these findings strongly suggest that increasing temperature and/or dissolved oxygen content may be triggering the observed response of *T. minutipalpus* larvae to the diel variations in water physicochemical parameters. They also suggest that biochemical and physiological adjustments performed at the end of the period of daylight (7:00 pm) seems to be dependent on other signaling factor than temperature. A possible explanation would be the existence of an intrinsic biological rhythm in the chironomid larvae associated with daylight. Therefore, future studies are necessary for a better understanding of the mechanisms involved in the signaling process.

Although an increased nervous cholinergic activity was observed in *T. minutipalpus* larvae collected at 1:00 pm, the occurrence of an enhanced metabolism in

other tissues cannot be ruled out. This statement is based on the fact that a significantly higher whole-body concentration of creatinine was observed in larvae collected at 1:00 pm. This is a strong evidence of an enhanced muscular activity in these larvae. In insects, the metabolism of creatine and creatinine is similar to that observed in vertebrates. In fact, they can be found in the fat body, circulating fluids and excreta of insects (Lazar and Mohamed, 1988a,b). Indeed, the level of creatine and creatinine in blood and fat body is shown to be an indicative of the rate of mobilization and deposition of proteins through the larval development of insects (Shinzato *et al.,* 1997).

In light of the discussed above, it seems that both nervous and muscular activities are increased in chironomid larvae collected at 1:00 pm respect with those collected in other times of day. A higher whole-body activity would imply in enhanced oxygen absorption, distribution and consumption. Indeed, a significantly higher concentration of hemoglobin was observed in chironomid larvae collected at 1:00 pm. It is important to stress that bilirubin, a metabolite from hemoglobin degradation, can be stored in the fat body of insects (Rockstein, 1978; Morgan, 2010). Therefore, the increase in hemoglobin concentration together with the lack of change in bilirubin concentration observed in larvae collected at 1:00 pm suggest that the blood O_2-carrying capacity of these larvae is enhanced respect with those collected at other times of day. Indeed, an increased amount of oxygen needed to fulfill enhanced energy requirements for larvae development and growth at increasing temperatures would be expected to be absorbed by diffusion through the cuticle, stored in the tracheal system, transferred and stored in tissue hemoglobin for further metabolic use. In fact, hemoglobin is shown to have a comparatively high affinity for O_2 and be widely distributed in tissues of chironomids, including those of the genus *Tanytarsus* (Lankester, 1867; Walshe, 1947; Panis et al., 1995; Rasmussen, 1996). Under this condition, the increased levels of

dissolved oxygen content observed in Lake Magadi waters between 1:00 pm and 7:00 pm would enhance the gradient of O_2 established between the environment and larvae hemoglobin, thus insuring the diffusion of adequate amounts of O_2 into the chironomid larvae.

On the energy budget side, the increased metabolism observed in chironomid larvae collected at 1:00 pm seems to rely on the absorption, mobilization and use of all major biomolecules (carbohydrates, lipids and proteins). This statement is based on the increased concentrations of glucose, urea and cholesterol observed in larvae collected at 1:00 pm. The increased whole-body glucose would be explained considering the typical stress response to environmental changes (Chapman, 1998; Jurenka, 2015), with this carbohydrate serving as the main source of energy during increasing temperature (from 7:00 am to 1:00 pm). In turn, the increased whole-body urea concentration paralleled by a lack of change in total protein concentration would indicate a higher rate of protein metabolism, which is usually observed during development and growth of insect larvae (Régnière et al., 2012; Jurenka, 2015). It is worth noting that whole-body urea concentration remained elevated for a longer period of time (from 1:00 pm to 7:00 pm) than the whole-body glucose level. This could be an indicative that development and growth of larvae occurs mainly during the period where water temperature and dissolved oxygen levels are kept at maximum values along the daytime, slowing down between 7:00 pm and 7:00 am.

Now let us consider the observed diel variation in whole-body cholesterol concentration. In insects, sterols are involved in critical functions such as components of cellular membranes, precursors for many hormones and regulators of genes involved in development processes (Canavoso et al., 2001; Behmer et al., 2003). Therefore, the observed increase in whole-body cholesterol concentration would be likely associated

with a higher ingestion of cholesterol. This statement is based on the fact that insects, differently from most other animals, have a dietary requirement for sterols because they lack the ability to synthesize sterols (Behmer et al., 2003). In turn, a higher food ingestion rate in chironomidae larvae collected at 1:00 pm could be related to higher food availability at this time of day associated with the increased water temperature (Coe, 1966; Javor, 1989; Johannsson, 2014).

As discussed above, a higher metabolism was observed in chironomid larvae collected at 1:00 pm. In turn, an enhanced metabolism would imply in higher energy consumption. However, the use of oxygen as a final electron acceptor, as well as the consumption of reduced coenzymes (NADH e $FADH_2$) produced in the aerobic pathways at the electron-transporting chain generates a variety of ROS. It is estimated that 0.1% of the oxygen consumed is converted into free radicals. However, higher rates of ROS generation can be observed during increasing aerobic metabolism associated with increases in water temperature (Fridovich, 2004). Although there was a lack of change in ROS concentration in chironomid larvae collected at 1:00 pm, the increased SOD activity observed in these larvae is evidence of an increased ROS generation. This statement is based on the fact that superoxide radical is the first free radical generated during oxidative processes such as the electron-transporting chain and the xanthine/xanthine oxidase system. The superoxide radical generated undergo dismutation and is converted into hydrogen peroxide in a reaction catalyzed by SOD. Indeed, this enzyme is considered as the first line of defense against the superoxide radical (Fridovich, 1997). Therefore, the higher SOD activity observed in chironomidae larvae collected at 1:00 pm respect with those collected in other times of day suggests that these larvae are producing more superoxide radical during increase of temperature (from 7:00 am to 1:00 pm) in Lake Magadi waters.

It is important to note that the superoxide radical generated in the oxidative processes can act as either an oxidizing or a reducing agent, thus generating other ROS which are more aggressive to biomolecules (Fridovich, 1989). In fact, this free radical can induce the generation of the hydroxyl radical through the Fenton and Haber-Weiss reactions, as well as react with hydroxyl radical generating the singlet oxygen (Sies, 1985). In fact, hydroxyl is one of the most reactive free radicals, interacting and oxidizing all kinds of major biomolecules (Halliwell and Guteridge, 2007).

The hydrogen peroxide produced after dismutation of the superoxide radical would be converted into water in a reaction catalyzed by CAT (Hermes-Lima, 2004). However, no significant diel variation was observed in CAT activity in the larvae of the chironomid *T. minutipalpus*. This would suggest that the superoxide radical generated would be accumulated, thus leading to an oxidative stress condition. It is worth noting that excessively elevated levels of ROS were also reported to occur in Lake Magadi waters at 1:00 pm (Johannsson et al., 2014). Therefore, an oxidative stress condition would be favored under this scenario. However, no significant diel change in TOSC, as well as any indication of altered level of oxidative damage (LPO and number of AP sites) was observed in chironomid larvae. This finding can be explained considering the increased GPx activity observed in chironomid larvae collected at 1:00 pm. Indeed, GPx is a major enzyme involved in the degradation of hydrogen peroxide and elimination of organic hydroperoxides (LOOH) (Fridovich, 1997; Hermes-Lima, 2004). Therefore, our findings clearly indicate that GPx plays a crucial role in the antioxidant system of *T. minutipalpus* larvae from Lake Magadi. They also suggest that CAT seems not to be involved in the response of the antioxidant system of *T. minutipalpus* larvae to the diel variations in water temperature and dissolved oxygen content observed in Lake Magadi. An alternative explanation for the observed lack of CAT response would be to consider

that this enzyme would be working at its maximum activity at any time of day. In this case, CAT would be considered as a non target for regulation, differently of the discussed above for SOD, GPx and GR.

Reactions catalyzed by GPx have GSH as the reducing agent (Meister and Anderson, 1983). Therefore, an expected higher generation of ROS would lead to a higher rate of GSSG production. In fact, a higher whole-body GSSG concentration was observed in larvae of *T. minutipalpus* collected at 1:00 pm. This finding is in complete agreement with the increase SOD activity observed in these larvae. After the formation of GSSG by oxidative processes, the cellular level of GSH is restored back through the oxidizing-reducing cycling mediated by the GR-GPx enzymatic system (Fridovich, 1997; Hermes-Lima, 2004). The proportional and significant increase in GPx and GR activities observed in chironomid larvae collected at 1:00 pm is strong evidence that these two enzymes are working cooperatively, making the GSH/GSSG cycling as a pivotal mechanism in the antioxidant system of the *T. minutipalpus* larvae.

Additionally to the cycling system involving GPx and GR, cellular levels of GSH can be increased after a de novo synthesis of GSH mediated by two ATP-dependent enzymes, the glutamate-cysteine ligase (GCL) and the glutathione synthase (GS). GLC catalyzes the reaction between glutamate and cysteine to form the dipeptide γGlu-Cys while GS combines the dipeptide with glicine to generate GSH (Maher, 2005). In the present study, we have also analyzed the GCL activity in the whole-body of *T. minutipalpus* larvae from Lake Magadi. Actually, we found no significant difference between chironomid larvae collected at 7:00 am and 1:00 pm. This finding suggests that *T. minutipalpus* larvae were able to scavenge ROS produced without changing the rate of GSH production, thus reinforcing the major role of the GPx-GR system in the maintenance of the oxidative status in the chironomid larvae. However,

the involvement of other non-enzymatic antioxidants cannot be ruled out. Metalothioneins, biliverdin and mucoproteins are also described as important antioxidants in aquatic invertebrates subjected to environmental stressing conditions leading to oxidative stress (Monserrat et al., 2007). In the present study, we have measured the whole-body concentration of mucoproteins in *T. minutipalpus* larvae collected at 7:00 am and 1:00 pm. However, there was no significant difference among the two groups of chironomids. This finding reinforces the major role played by GSH in scavenging both superoxide and hydroxyl radicals generated during the oxidative metabolism in the larvae of the chironomid *T. minutipalpus*. In fact, we found that approximately only 5% of the whole-body GSH content is under the oxydized form (GSSG) in *T. minutipalpus* larvae, thus evidencing the great potential of this antioxidant when the chironomidae larvae is exposed to environmental stressing conditions.

As superoxide and hydroxyl radicals, other free radicals such as peroxyl and alkoxyl can be also generated from organic hydroperoxides and oxygen-centered radicals, respectively. It is known that these ROS can act as intermediaries in the lipid peroxidation (LPO), as well as other oxidizing process (Bergendi et al., 1999). As no significant diel variation in oxidative damage (LPO and AP sites) was observed in chironomid larvae evaluated in the present study, we can suggest that no significant amounts of peroxyl and/or alkoxyl were generated.

As a higher concentration of creatinine was observed in chironomid larvae collected at 1:00 pm, we can infer that these larvae were more active at this time of day. In this case, an increased body (muscular) activity could be leading to a higher production of reactive nitrogen species. In fact, increased nitric oxide is observed during exercise in humans (Souza Júnior et al., 2014). At this point, it is interesting to note that the nitric oxide system is also well characterized in insects (Müller, 1997). Therefore, as

observed for oxygen-centered free radicals, cellular oxidizing processes can also lead to the generation of nitrogen-centered free radicals. Although NO is a gas which plays important biochemical and physiological roles, it can be also considered as a free radical. This reactive nitrogen species (RNS) is generated through the activity of the nitric oxidase synthase, an enzyme involved in cellular signaling and immunological responses. In the oxidative metabolism, NO is associated with the generation of the peroxynitrite radical ($ONOO^-$) (Dusse et al., 2003). However, as observed for ROS, no significant variation in whole-body NO concentration was seen in *T. minutipalpus* larvae collected at different times of day. This finding suggests that RNS are not involved in the response of the antioxidant system of *T. minutipalpus* larvae to the diel variations occurring in physicochemical parameters of the Lake Magadi waters.

As discussed above, both oxygen- and nitrogen-centered radicals can lead to an oxidative stress condition with consequent damage to biomolecules. The most common damages are LPO, protein carbonylation and DNA oxidation (Dusse et al., 2003; Giorgio et al., 2007). Peroxidation of membrane lipids is one of the main causes of cell lesion and death (Abuja and Albertini, 2001). However, it is interesting to note that an organism undergoes oxidative stress only when the concentration of ROS, and likely RNS, overwhelms its antioxidant capacity. Data reported in the present study clearly show that larvae of *T. minutipalpus* did not undergo an oxidative stress condition associated with the diel variations in temperature and dissolved oxygen content observed in Lake Magadi waters. This statement is based on the fact that no significant changes in the levels of damage to lipids and DNA were observed. This can be explained considering the lack of significant changes in TOSC level, as well as ROS and NO concentrations in chironomid larvae collected at the different times of day.

Therefore, it is clear from these findings that larvae of *T. minutipalpus* has an

efficient antioxidant system to scavenge all the pro-oxidants generated when facing the stressful conditions of Lake Magadi waters. However, the occurrence of other adaptive mechanisms to prevent ROS formation and/or repair molecules affected by ROS (Storey, 1996; Ribeiro et al., 2005) cannot be disregarded.

In summary, in the present study we analyzed a large suite of biomarkers related to metabolism and the antioxidant system involved in ROS scavenging in the larvae of the chironomid *T. minutipalpus* from Lake Magadi. Considering that major enzymes involved in this scavenging capacity are SOD, CAT, GPx and GR (Michiels et al., 1994), our findings clearly indicate that all enzymatic components of a typical antioxidant system are present in the chironomid larvae. However, as expected, the mechanism involved in ROS scavenging in *T. minutipalpus* larvae is comprised not only of antioxidant enzymes, but also of ROS-binding (non-enzymatic) antioxidants. In the present study, we evaluated the involvement of GSH and mucoproteins in this mechanism. As expected, GSH was shown to be abundant in larvae of *T. minutipalpus* and play a crucial role in the antioxidant system of *T. minutipalpus* larvae. Indeed, GSH concentrations were found to be in average 20-fold higher than those of GSSG at any time of day. This is indication of the important role and potential of GSH as a non-enzymatic antioxidant for the whole-body antioxidant capacity of the chironomid larvae. This role is even more important when we consider the following facts: hydroxyl radicals are highly toxic to biomolecules; there are no known enzymatic defenses against these free radicals (Bains & Shaw, 1997); and GSH is particularly efficient to protect against the adverse effects of hydroxyl radicals. Therefore, our findings support the idea that larvae of the chironomid *T. minutipalpus* rely on a very important pool of GSH to avoid a potential oxidative stress imposed by the extreme and harsh physicochemical conditions of Lake Magadi waters. In turn, this pool is kept at

adequate levels by an active and efficient oxidizing-reducing cycling system mediated by GPx and GR.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Magadi Soda Company, particularly John Ndonga and John Kabera, for their cooperation and the University of Nairobi for logistic support. Dishon Muthee and George Muthee provided assistance in the field.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.F.B. and A.B. designed the study, performed most of the experiments, analyzed the samples in the laboratory, and wrote the first draft; C.M.W., O.E.J., P.L. and C.C. performed some experiments; H.L.B., G.D.K., M.B.P., J.N.M. and R.O.O. collected material and performed some of the experiments; R.O.O. organized the field campaign; all authors contributed to the execution and interpretation of the study, and to drafting and revising the article.

COMPETING INTERESTS

No competing interests declared.

FUNDING

A.B. is a Research Fellow from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and is supported by the International Canada Research Chair Program from the International Development Research Centre (IDRC; Ottawa, Canada). C.M.W. is supported by the Canada Research Chair Program. L.F.B. was recipient of a Master Fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de

Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brazil). This research was funded by a grant from the Brazilian CNPq to A.B., a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) Discovery grant to C.M.W., and a grant from the National Research Foundation of South Africa to J.M.

REFERENCES

Abuja, P. M. and Albertini, R. (2001). Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* **306**: 1-17.

Azevedo-Pereira, H. M. V. S., Lemos, M. F. L. and Soares A. M. V. M. (2011). Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 1210-1215.

Behmer, S.T. and Nes, W. D. (2003) Insect sterol nutrition and physiology: a global overview. *Adv. Insect Physiol.* **31**, 1-72.

Bergendi, L., Benes, L., Duracková Z. and Ferencik, M. (1999). Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* **65**, 1865-1874.

Booth, G. M. and Lee, A-H. (1971). Distribution of cholinesterases in insects. *Bull. World Health Org.* **44**, 91-98.

Canavoso, L. E., Jouni, Z. E., Joy Karnas, K., Pennington, J. E., Wells, M. A. (2001). Fat metabolism in insects. *Ann. Rev. Nutr.* **21**, 23-46.

Chapman, R. F. (1998). The Insects - Structure and Function. Cambridge: Cambridge University Press.

Coe, M. J. (1966). The biology of *Tilapia grahami* (Boulenger) in Lake Magadi, Kenya. *Acta Tropica* **23,** 146-176.

Corbi, J. J. and Trivinho-Strixino, S. (2006). Ciclo de vida de duas espécies de *Goeldichironomus* (Diptera, Chironomidae). *Rev. Bras. Entomol.* **50**, 72-75.

Dusse, L. M. S., Vieira, L. M. and Carvalho, M. G. (2003). Revisão sobre o óxido nítrico. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **39**, 343-350.

Fowler, G., Daroszewska, M. and Ingold, K. U. (2003). Melatonin does not "directly scavenge hydrogen peroxide": Demise of another myth. *Free Rad. Biol. Med.* **34**, 77-83.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2007). Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University Press.

Hermes-Lima, M. (2004). Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation* (Ed. K. B. Storey K.B.), pp. 319-368. NewYork, NY: John Wiley & Sons.

Javor, B. (1989). Hypersaline Environments. Microbiology and Biogeochemistry. Berlin-New York-Heildelberg: Springer-Verlag.

Jensen, C. S., Garsdal, L. and Baatrup, E. (1997). Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1727-1732.

Johannsson, O. E., Bergman, H. L., Wood, C. M., Laurent, P., Kavembe, D. G., Bianchini, A., Maina, J. N., Chevalier, C., Bianchini, L. F., Michael, B. P. and Ojoo, R. O. 2014. Air breathing in the Lake Magadi tilapia *Alcolapia grahami,* under normoxic and hyperoxic conditions, and the association with sunlight and ROS. *J. Fish Biol.* **84**, 844-863.

Johansen, K., Maloiy, G. M. and Lykkeboe, G. (1975). A fish in extreme alkalinity. *Respir. Physiol.* **24**, 159-162.

Jurenka, R. (2015). Advances in Insect Physiology. New York, NY: Academic Press.

Kodikara, G. R. L., Woldai, T., Van Ruitenbeek, F. J. A., Kuria, Z., van Der Meer, F., Shepherd, K.D. and van Hummel, G. J. (2012). Hyperspectral remote sensing of evaporate minerals and associated sediments in Lake Magadi area, Kenya. *Int. J. Appl. Earth Observation & Geoinformation* **14**, 22-32.

Lankester, E. R. 1867. Preliminary notice of some observations with the spectroscope on animal substances. *J. Anat. Physiol.* **2**, 114-116.

Lazar, K. V. and Mohamed, U. V. K. (1988a). Creatine and creatinine levels in the larval fat body of the moth, *Spodoptera mauritia,* during development. *Proc. Indian Natn. Sci. Acad.* **BS4**, 143-144.

Lazar, K. V. and Mohamed, U. V. K. (1988b). Amino transferases and glucose levels in developing larvae of the moth, *Spodoptera mauritia*. *J. Anim. Morphol. Physiol*. **45**, 41-43.

Merritt, R. W. and Cummins, K. W. 1984. An introduction to the Aquatic Insects of the North America. Dubuque: Kendall/Hunt Publishing.

Monserrat, J. M., Martínez, P. B., Geracitano, L. A., Amado, L. L., Martins, C. M. G., Pinho, G. L. L., Chaves, I. S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J. and Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol. C* **146**, 221-234.

Morgan, D. (2010). Biosynthesis in Insects. Cambridge: RSC Publishing.

Müller, U. (1997). The nitric oxide system in insects. *Prog. Neurobiol.* **51**, 363-381.

Narahara, A. B., Bergman, H. L., Laurent, P., Maina, J. N., Walsh, P. J. and Wood, C. M. (1996). Respiration physiology of the lake Magadi tilapia (*Oreochromis alcalicus grahami*), a fish adapted to a hot alkaline, and frequently hypoxic condition. *Physiol. Zool.* **69,** 1114-1136.

Panis, L. I., Goddeeris, B. and Verheyen R. (1995). The hemoglobin concentration of *Chironomus cf. plumosus* L. (Diptera, Chironomidae) larvae from two lenthic habitats. *Neth. J. Aquat. Ecol.* **29**, 1-4.

Pinder, L. C. V. and Reiss, F. (1983). The larvae of Chironominae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic region - keys and diagnoses. Part 1 - Larvae. *Entomology Scand. Suppl.* **19**, 293-435.

Pitman, R. M. (1971). Transmitter substances in insects: A review. *Comp. Gen. Pharm.* **2**, 347-371.

Randall, D. J., Wood, C. M., Perry, S. F., Bergman, H. L., Maloiy, G. M. O., Mommsen, T. P. and Wright, P.A. (1989). Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment. *Nature* **337**, 165-166.

Rasmussen, A. (1996). Least oxygen dependent. In *The University of Florida Book of Insect Records* (Ed. T.J. Walker), pp. 46-48. Gainesville: University of Florida.

Régnière, J., Powell, J., Bentz, B. and Nealis, V. (2012). Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: Experimental design, data analysis and modeling. *J. Insect Physiol.* **58**, 634-647.

Reite, O. B., Maloiy, G. M. O. and Aasehaug, B. (1974). pH, salinity and temperature tolerance of Lake Magadi tilapia. *Nature* 247, 315.

Ribeiro, S. M., Queiroz, J. H., Pelúzo, M. C. G., Costa, N. M. B., Matta, S. L. P. and Queiroz, M. E. L. R. (2005). The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media *Biosci. J.* **12**, 133-149.

Rockstein, M. (1978). Biochemistry of Insects. New York, NY: Academic Press.

Shinzato, T., Nakai, S., Miwa, M., Iwayama, N., Takai, I., Matsumoto, Y., Morita, H. and Maeda, K. (1997). New method for calculate creatinine generation rate using pre and post dialysis concentration. *Artif. Organs* **21**, 864-87.

Sies, H. (1985). Oxidative stress. London: Academic Press.

Toutant, J.P. (1989). Insect acetylcholinesterase: Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Progr. Neurobiol.* **32**, 423-446.

Trivinho-Strixino, S. (2010). Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotrop.* **11(Supl. 1)**, 675-684.

Trivinho-Strixino, S. and Strixino, G. B. M. A. (1995). Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo: Guia de Identificação e Diagnose dos Gêneros. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos.

Verschuren, D. (1997). Taxonomy and ecology of fossil Chironomidae (Insecta, Diptera) from Rift Valley lakes in central Kenya. *Arch. Hydrobiol. Beih.* **107**, 467-512.

Walshe, B. M. 1947. The function of haemoglobin in *Tanytarsus* (Chironomidae). *J. Exp. Biol.* **24**, 343-351.

Ward, J.V. (1992). Aquatic Insect Ecology. 1. Biology and Habitat. New York, NY: John Wiley & Sons.

Wilson, P. J., Wood, C. M., Walsh, P. J., Bergman, A. N., Bergman, H. L., Laurent, P. and White, B. N. (2004). Discordance between genetic structure and morphological, ecological, and physiological adaptation in Lake Magadi tilapia. *Physiol. Biochem. Zool.* **77**, 537-555.

Wood, C.M., Bergman, H. L., Laurent, P., Maina, J. N., Narahara, A. and Walsh, P. J. (1994). Urea production, acid–base regulation and their interactions in the Lake Magadi tilapia, a unique teleost adapted to a highly alkaline environment. *J. Exp. Biol.* **189**, 13-36.

Wood, C.M., Nawata, M. C., Wilson, J. M., Laurent, P., Chevalier, C., Bergman, H. L., Bianchini, A., Maina, J.N., Johannsson, O.E., Bianchini, L. F., Kavembe,

G. D., Papah, M. B. and Ojoo, R. O. (2013). Rh proteins and NH_4^+-activated Na^+-ATPase in the Magadi tilapia (*Alcolapia grahami*), a 100% ureotelic teleost fish. *J. Exp. Biol.* **216**, 2998-3007

Wood, C.M., Bergman, H. L., Bianchini, A., Laurent, P., Maina, J.N., Johannsson, O.E., Bianchini, L. F., Chevalier, C., Kavembe, G. D., Papah, M. B. and Ojoo, R. O. (2013). Transepithelial potential in the Magadi tilapia, a fish living in extreme alkalinity. *J Comp Physiol B* **182,** 247-258.

Wood, C.M., Perry, S. F., Wright, P. A., Bergman, H. L. and Randall, D.J. (1989). Ammonia and urea dynamics in the Lake Magadi tilapia, a ureotelic teleost fish adapted to an extremely alkaline environment. *Respir. Physiol.* **77,** 1-20.

Table 1. Diel variations in whole-body parameters in the larvae of the chironomid *Tanytarsus minutipalpus* from Lake Magadi at different times of day. Data are mean ± standard error (n = 4-6 pools; 5-10 larvae per pool). Different letters indicate significantly different mean values among treatments for each environmental parameter ($p < 0.05$). ChE: cholinesterase activity (absorbance units/mg protein); Gluc: glucose (mg/g ww); Trig: triglycerides (mg/g ww); Chol: cholesterol (µmol/g ww); Prot: proteins (mg/g ww); Urea: urea (µmol/g ww); Crea: creatinine (µg/g ww); Hem: hemoglobin (mg/g protein); Bil: bilirubin (µg/mg protein); Muco: mucoproteins (ng/mg proteins); ROS: reactive oxygen species (µmol/mg protein); NO: nitric oxide (µmol/g protein); TOSC: total oxyradical scavenging capacity (mmol copper reducing equivalents/g protein); LPO: lipid peroxidation (mmol MDA/g protein); AP: apurinic/apurymidinic sites (AP sites/10^7 base pairs). * next day; nd: not determined.

Parameter	Time of day				
	7:00 am	1:00 pm	7:00 pm	1:00 am*	7:00 am*
ChE	1.19 ± 0.21^{a}	2.61 ± 0.12^{b}	1.33 ± 0.17^{a}	1.52 ± 0.08^{a}	1.38 ± 0.22^{a}
Gluc	0.44 ± 0.16^{a}	1.48 ± 0.46^{b}	0.48 ± 0.12^{a}	0.29 ± 0.02^{a}	0.42 ± 0.13^{a}
Trig	0.11 ± 0.03^{a}	0.11 ± 0.03^{a}	0.11 ± 0.03^{a}	0.12 ± 0.04^{a}	0.13 ± 0.02^{a}
Chol	0.47 ± 0.10^{a}	0.95 ± 0.14^{b}	0.51 ± 0.12^{a}	0.51 ± 0.16^{a}	0.49 ± 0.08^{a}
Prot	0.60 ± 0.10^{a}	0.42 ± 0.14^{a}	0.67 ± 0.12^{a}	0.64 ± 0.17^{a}	0.72 ± 0.14^{a}
Urea	0.35 ± 0.08^{a}	0.80 ± 0.19^{b}	0.63 ± 0.19^{ab}	0.42 ± 0.18^{ab}	0.42 ± 0.11^{a}
Crea	13.1 ± 1.3^{a}	24.4 ± 1.4^{b}	14.3 ± 1.0^{a}	11.1 ± 1.4^{a}	10.8 ± 1.9^{a}
Hem	1.03 ± 0.35^{a}	2.85 ± 0.38^{b}	Nd	nd	nd
Bil	83.1 ± 7.7^{a}	90.6 ± 10.7^{a}	Nd	nd	nd
Muco	21.4 ± 2.7^{a}	19.9 ± 1.7^{a}	Nd	nd	nd
ROS	0.18 ± 0.04^{a}	0.14 ± 0.06^{a}	Nd	nd	nd
NO	67.1 ± 4.2^{a}	86.8 ± 16.8^{a}	61.9 ± 11.9^{a}	44.4 ± 3.7^{a}	48.1 ± 3.1^{a}
TOSC	46.0 ± 7.2^{a}	47.0 ± 9.7^{a}	46.9 ± 8.9^{a}	25.0 ± 5.9^{a}	35.1 ± 6.1^{a}
LPO	0.29 ± 0.04^{a}	0.28 ± 0.06^{a}	0.20 ± 0.02^{a}	0.18 ± 0.02^{a}	0.17 ± 0.02^{a}
AP	3.1 ± 0.5^{a}	2.6 ± 0.4^{a}	2.8 ± 0.5^{a}	3.0 ± 0.1^{a}	3.4 ± 0.8^{a}

CAPTIONS TO FIGURES

Figure 1. Diel variations in water temperature and dissolved oxygen content at the Flamingo Lagoon in the Lake Magadi. Measurements were performed in July 2010 and 2013. Data are mean ± standard error (n = 6). Different letters indicate significantly different mean values among times of day for each environmental parameter ($p < 0.05$).

Figure 2. Whole-body superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activity in larvae of the chironomid *Tanytarsus minutipalpus* collected at the Flamingo Lagoon in the Lake Magadi at different times of day. Data are mean ± standard error (n = 4-6 pools; 5-10 larva per pool). Different letters indicate significantly different mean values among treatments for each parameter ($p < 0.05$).

Figure 3. Whole-body glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPx) and glutamate-cysteine ligase (GCL) activity in larvae of the chironomid *Tanytarsus minutipalpus* collected at the Flamingo pool in the Lake Magadi at different times of day. Data are mean ± standard error (n = 4-6 pools; 5-10 larva per pool). Different letters indicate significantly different mean values among treatments for each parameter ($p < 0.05$).

Figure 4. Whole-body reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG) and GSH/GSSG concentration rate in larvae of the chironomid *Tanytarsus minutipalpus* collected at the Flamingo pool in the Lake Magadi at different times of day. Data are mean ± standard error (n = 4-6 pools; 5- 10 larva per pool). Different letters indicate significantly different mean values among treatments for each parameter ($p < 0.05$).

Figure 1

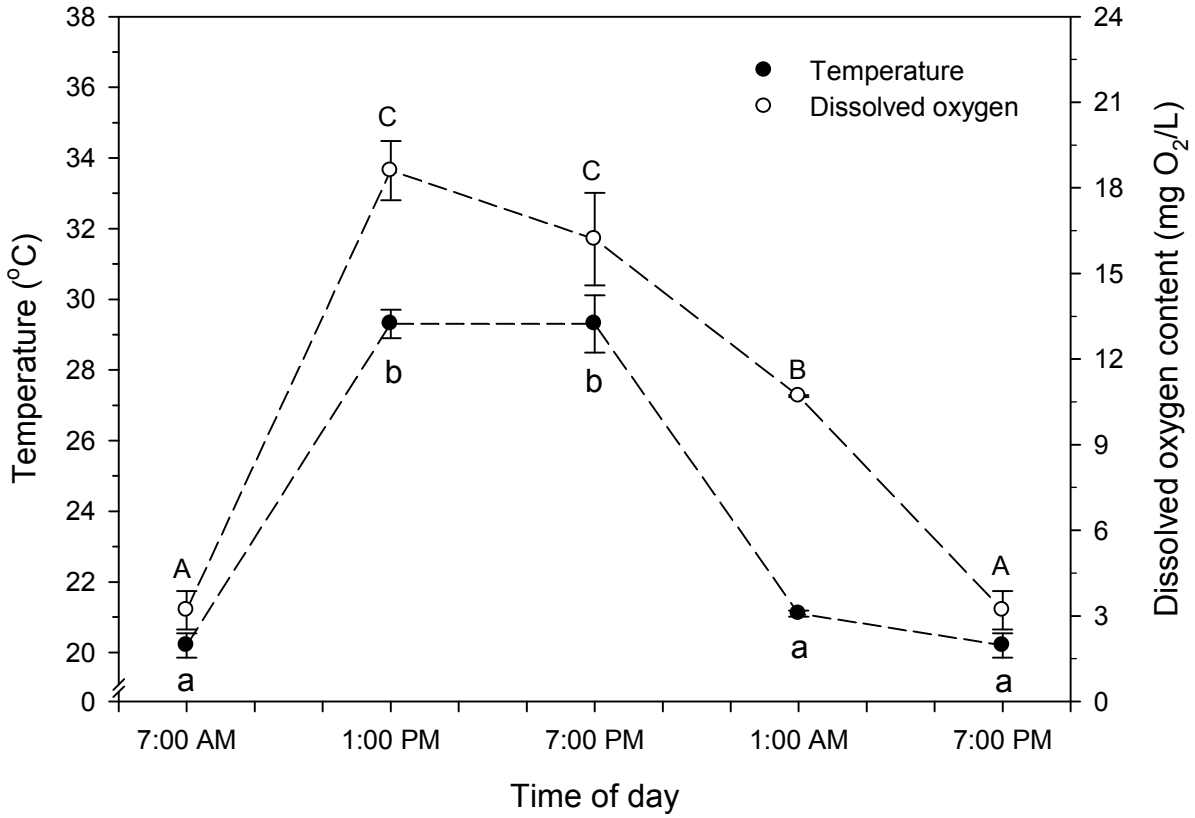

Temperature
Dissolved oxygen
Temperature (°C)
Dissolved oxygen content (mg O2/L)
Time of day
7:00 AM
1:00 PM
7:00 PM
1:00 AM
7:00 PM
A
C
C
B
A
a
b
b
a
a
38
36
34
32
30
28
26
24
22
20
0
24
21
18
15
12
9
6
3
0

Figure 2

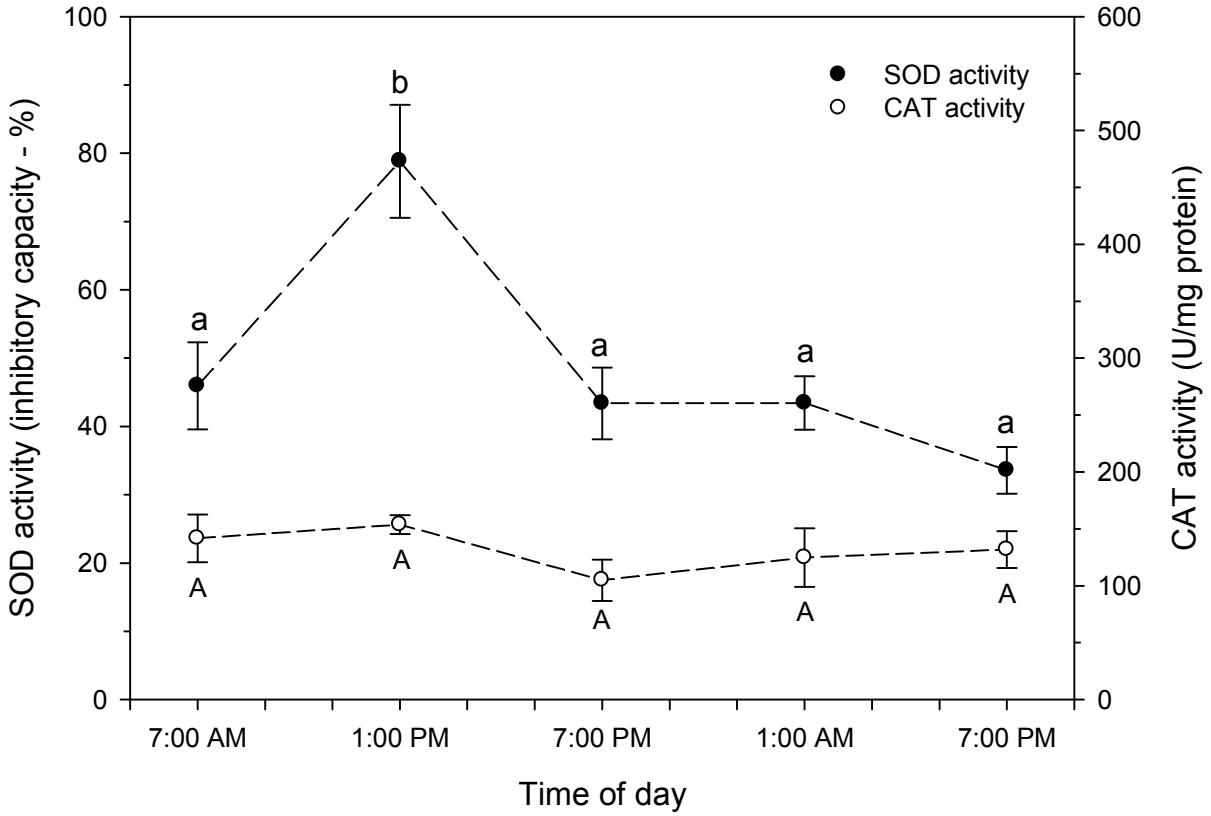

SOD activity
CAT activity
SOD activity (inhibitory capacity - %)
CAT activity (U/mg protein)
Time of day
7:00 AM
1:00 PM
7:00 PM
1:00 AM
7:00 PM
a
b
a
a
a
A
A
A
A
A
0
20
40
60
80
100
0
100
200
300
400
500
600

Figure 3

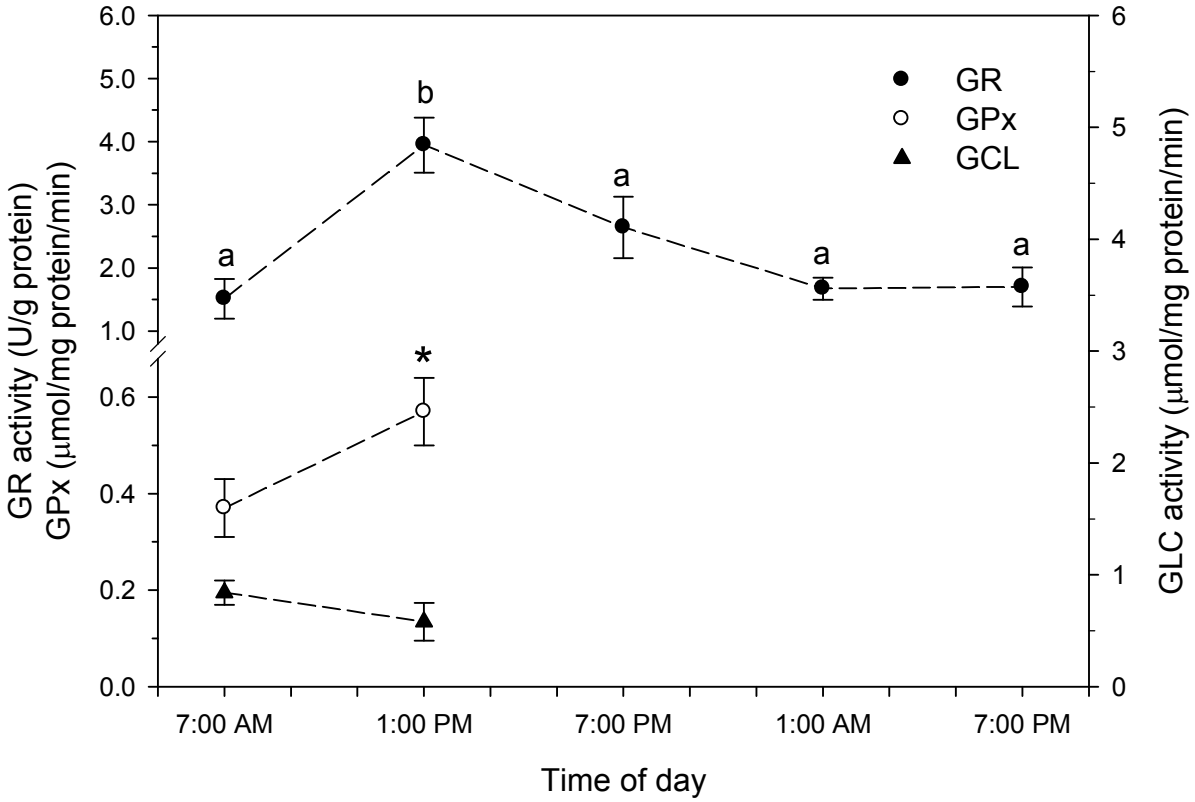
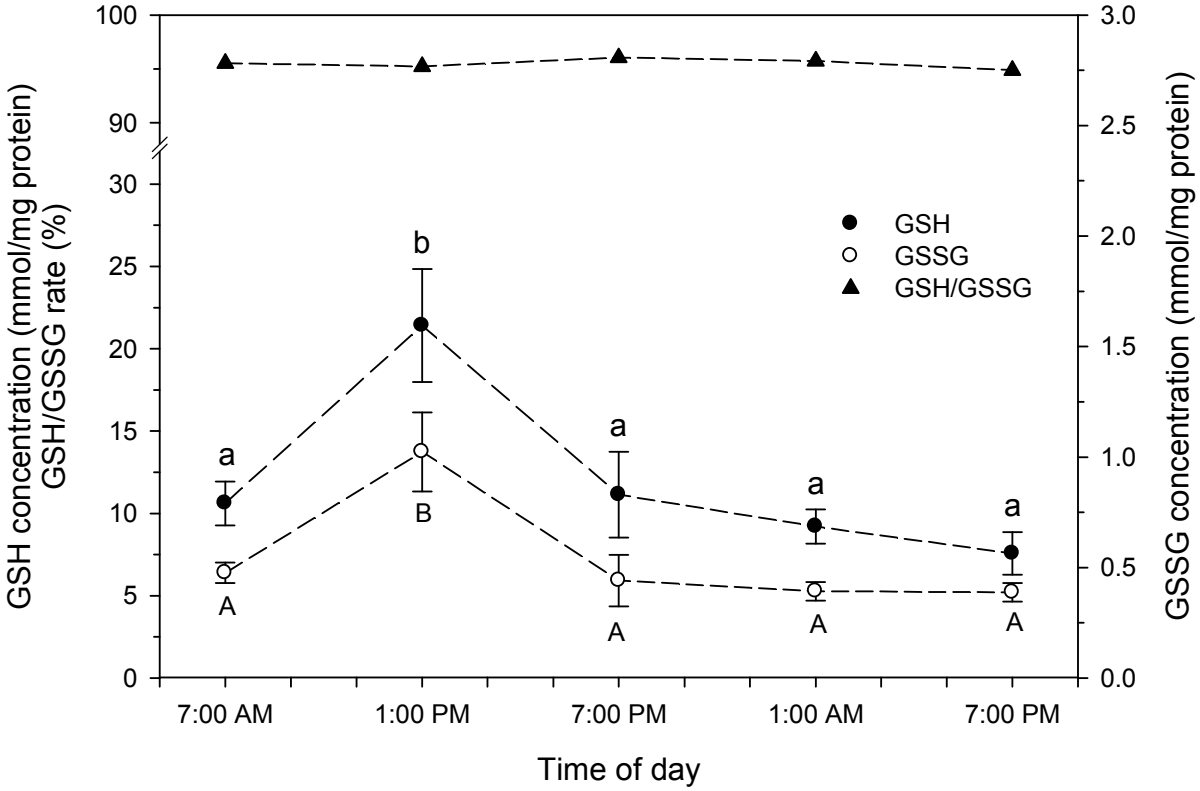

GR
GPx
GCL
a
b
a
a
a
*
GR activity (U/g protein)
GPx (μmol/mg protein/min)
GLC activity (μmol/mg protein/min)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.6
0.4
0.2
0.0
6
5
4
3
2
1
0
7:00 AM
1:00 PM
7:00 PM
1:00 AM
7:00 PM
Time of day

Figure 4


GSH concentration (mmol/mg protein)
GSH/GSSG rate (%)
GSSG concentration (mmol/mg protein)
Time of day
7:00 AM
1:00 PM
7:00 PM
1:00 AM
7:00 PM
GSH
GSSG
GSH/GSSG
a
b
a
a
a
A
B
A
A
A
100
90
30
25
20
15
10
5
0
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

DISCUSSÃO GERAL

Nas expedições realizadas ao Quênia em 2010 e 1013, foram coletadas larvas de quironomídeo na "Lagoa dos Flamingos" no complexo denominado "Termas dos Peixes" na costa leste do Lago Magadi, local próximo à cidade de Magadi (Distrito de Kajiado, Vale do Rift, Quênia, África; 1.867^{o} S, 36.267^{o} E). Estas larvas foram identificadas pelo Dr. Luiz Carlos Pinho (Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brasil) como sendo a larva do quironomídeo *Tanytarsus minutipalpus* (Insecta, Diptera, Chironomidae). É importante salientar que a espécie *T. minutipalpus* foi descrita somente em 1999, sendo que a ocorrência de indivíduos adultos e larvas foi relatada para alguns lagos salgados da Etiópia, Tanzânia e Quênia. Entretanto, nenhuma referência de ocorrência de *T. minutipalpus* foi feita para o Lago Magadi no Quênia (Ekrem e Harrison, 1999). Portanto, este estudo é o primeiro a relatar a ocorrência da larva do quironomídeo *T. minutipalpus* no Lago Magadi.

Além disso, o presente estudo é também o primeiro a relatar respostas metabólicas e do sistema de defesa antioxidante em uma espécie de invertebrado às condições extremas encontradas no Lago Magadi. Portanto, esperava-se que a larva de *T. minutipalpus* apresentasse adaptações específicas para viver nas estressantes condições físico-químicas extremas e variáveis das águas do Lago Magadi. Como relatado por Verschuren (1997), *Tanytarsus* sp. é uma espécie intolerante à anoxia e é o único gênero de quironomídeo a explorar os lagos de soda metasalinos da África. No presente estudo, são relatadas alterações nos parâmetros associados ao metabolismo com particular interesse no sistema antioxidante e no estado oxidativo da larva de *T. minutipalpus*. Como discutido a seguir, estas alterações parecem fazer parte de um

conjunto de ajustes que este animal aquático realiza em resposta às amplas variações diárias das condições físico-químicas extremas que ocorrem nas águas do Lago Magadi.

As variações diárias na temperatura (20,2-29,3^{o}C) e conteúdo de oxigênio dissolvido (3,2-18,6 mg O_2/L), bem como a constância de um pH extremamente básico da água (10.0 ± 0.03) relatadas no presente estudo são muito similares àquelas já relatadas anteriormente para as águas do Lago Magadi (Reite *et al.*, 1974; Johansen *et al.*, 1975; Narahara *et al.*, 1996; Wilson *et al.*, 2004; Johannsson *et al.*, 2014). No entanto, foi observado no presente estudo que estas variações induziram mudanças significativas no metabolismo da larva de *T. minutipalpus*. Esta afirmativa está baseada no fato de que foram observados aumentos significativos em diversos indicadores de metabolismo (atividade colinesterásica e concentrações de hemoglobina, creatinina, uréia e glicose) em larvas coletadas às 13h00min, hora do dia em que os valores médios de temperatura e conteúdo de oxigênio dissolvido atingiram seus valores máximos ao longo do dia.

Sabe-se há muito tempo que a colinesterase tem uma ampla distribuição nos tecidos de quironomídeos, especialmente no sistema nervoso central, atuando de forma importante na regulação de atividades funcionais (Booth e Lee, 1971; Pitman, 1971; Toutant, 1989; Chapman, 1998; Jurenka, 2015). Portanto, a atividade aumentada da colinesterase nas larvas de quironomídeo coletadas às 13h00min pode ser explicada, pelo menos em parte, por uma atividade aumentada do sistema nervoso da larva de *T. minutipalpus*, quando também é observado o aumento máximo na temperatura da água. Neste momento, é importante salientar que a atividade da colinesterase nas larvas coletadas às 19h00min retornou ao nível daquela observada nas larvas coletadas às 07h00min do mesmo dia, bem como naquelas coletadas à 1h00min e às 07h00min do dia seguinte. Entretanto, os valores médios de temperatura e oxigênio dissolvido na

água às 19h00min foram ainda tão elevados quanto àqueles observados às 13h00min do mesmo dia. Este conjunto de resultados sugere que o aumento na temperatura ambiental e/ou conteúdo de oxigênio dissolvido pode estar desencadeando respostas de ajuste metabólico e do sistema de defesa antioxidante da larva de *T. minutipalpus* para lidar adequadamente com as amplas variações diárias observadas nas condições extremas das águas do Lago Magadi. Eles também sugerem que os ajustes bioquímicos e fisiológicos realizados pela larva no final do período do dia (19h00min) parecem ser dependentes de outros fatores sinalizadores. Neste caso, uma possível explicação seria a possibilidade de existência de um ritmo circadiano estar envolvido nas respostas da larva do quironomídeo às variações ambientais diárias observadas nas águas do Lago Magadi. Portanto, futuros estudos com ênfase nos mecanismos envolvidos neste processo de sinalização seriam importantes para elucidar esta questão.

Apesar de que um amento na atividade colinérgica foi observado nas larvas de *T. minutipalpus* coletadas às 13h00min, a possibilidade de um aumento do metabolismo em outros tecidos, além do tecido nervoso, não pode ser desconsiderada. Esta afirmação está baseada no fato de que uma maior concentração corporal de creatinina foi observada nas larvas coletadas às 13h00min. Esta é uma evidência de que houve um aumento na atividade muscular nestas larvas. Em insetos, o metabolismo da creatina e da creatinina é similar àquele observado nos vertebrados. De fato, estes compostos podem ser encontrados no corpo gorduroso, nos líquidos circulantes e na excreta destes insetos (Lazar e Mohamed, 1988a,b). Além disso, os níveis de creatina e creatinina no sangue e no corpo gorduroso são indicadores da taxa de mobilização e deposição de proteínas ao longo do desenvolvimento larval nos insetos (Shinzato *et al.,* 1997).

Considerando o exposto acima, parece que tanto a atividade do sistema nervoso central quanto à do sistema muscular estão aumentadas nas larvas de quironomídeo

coletadas às 13h00min, em relação àquelas coletas nas demais horas do dia. Uma maior atividade corporal implicaria em uma maior absorção, distribuição e consumo de oxigênio. Neste caso, cabe ressaltar que uma maior concentração de hemoglobina foi verificada nas larvas de quironomídeo coletadas às 13h:00min. É importante salientar que a bilirrubina, um metabólito da hemoglobina, pode ser estocada no corpo gorduroso dos insetos (Rockstein, 1978; Morgan, 2010). Portanto, a maior concentração de hemoglobina, em conjunto com a falta de variação na concentração de bilirrubina observada nas larvas coletadas às 13h00min, sugere que a capacidade carreadora de oxigênio do sangue está aumentada em relação àquela observada nas larvas coletadas em outras horas do dia. De fato, quando uma maior quantidade de oxigênio é necessária para satisfazer os requerimentos energéticos do desenvolvimento e crescimento da larva em temperaturas mais elevadas, é necessário que mais oxigênio seja absorvido por difusão através da cutícula, estocado no sistema traqueal e transportada para hemoglobina presente nos tecidos. Foi mostrado que a hemoglobina de insetos tem uma maior afinidade pelo O_2, quando comparada aquela de outros invertebrados. Além disso, foi relatado que a hemoglobina está amplamente distribuída nos tecidos dos quironomídeos, inclusive nas espécies do gênero *Tanytarsus* (Lankester, 1867; Walshe, 1947; Panis *et al.*, 1995; Rasmussen, 1996). Nesta condição, os níveis aumentados de oxigênio dissolvido observados na água do Lago Magadi entre 13h00min e 19h00min aumentaria o gradiente de O_2 existente entre o ambiente e a hemoglobina do animal, garantindo assim uma difusão de quantidades adequadas de O_2 para o interior da larva do quironomídeo.

Do ponto de vista energético, o metabolismo aumentado que foi observado nas larvas de quironomídeo coletadas às 13h00min parece depender da absorção, mobilização e uso das principais biomoléculas (carboidratos, lipídios e proteínas). Esta

afirmativa está baseada nas concentrações aumentadas de glicose, ureia e colesterol que foram observadas nas larvas coletadas às 13h00min. Os níveis aumentados de glicose seriam explicados considerando-se a resposta típica de estresse frente às variações ambientais (Chapman, 1998; Jurenka, 2015), com a glicose servindo de fonte principal de energia durante o período de aumento de temperatura (das 07h00min às 13h00min). Por outro lado, o aumento na concentração corporal de ureia em conjunto com a falta de alteração na concentração de proteínas totais indicaria uma maior taxa de metabolismo proteico, a qual é geralmente observada durante o desenvolvimento e crescimento das larvas de insetos (Régnière *et al.*, 2012; Jurenka, 2015). É importante salientar que a concentração corporal de ureia permaneceu elevada por um período mais longo de tempo (das 13h00min às 19h00min) do que a concentração corporal de glicose. Este fato pode ser um indicativo de que o desenvolvimento e crescimento da larva ocorrem durante o período onde a temperatura e os níveis de oxigênio dissolvido na água são mantidos nos seus valores máximos ao longo do período do dia, diminuindo entre 19h00min do dia anterior e 07h00min da manhã do dia seguinte.

Considerando-se as variações diárias observadas na concentração de colesterol, é importante salientar que nos insetos os esteróis estão envolvidos em função críticas tais como componentes de membranas celulares, precursores de muitos hormônios e reguladores de genes envolvidos nos processos de desenvolvimento (Canavoso *et al.*, 2001; Behmer *et al.*, 2003). Portanto, o aumento observado na concentração corporal de colesterol estaria provavelmente associado a uma maior ingestão de colesterol. Esta afirmativa está baseada no fato de que os insetos, diferentemente da maioria dos animais, tem um requerimento de esteróis na dieta, uma vez que eles não têm a habilidade de sintetizar colesterol (Behmer *et al.*, 2003). Por sua vez, uma maior taxa de ingestão de alimento pelas larvas do quironomídeo poderia estar relacionada a uma

maior disponibilidade de alimento associada ao aumento da temperatura e do oxigênio dissolvido na água às 13h:00min (Coe, 1966; Javor, 1989; Johannsson, 2014).

A ocorrência de um maior metabolismo nas larvas de quironomídeo coletadas às 13h00min implicaria em um maior consumo de oxigênio. Entretanto, o uso do oxigênio como aceptor final de elétrons pode gerar uma diversidade de ROS. Atualmente, estima-se que 0.1% do oxigênio consumido é convertido em radicais livres. Entretanto, maiores taxas de geração de ROS podem ser observadas durante o aumento do metabolismo aeróbico associado aos aumentos na temperatura da água (Fridovich, 2004), uma condição que foi observada às 13h00min nas águas do Lago Magadi. O aumento observado na atividade da SOD das larvas coletadas às 13h:00min dá suporte a esta ideia. Esta afirmativa está baseada no fato de que o radical superóxido é o primeiro radical livre a ser formado durante os processos oxidativos tais como a cadeia transportadora de elétrons e o sistema xantina/xantina oxidase. O radical superóxido gerado sofre dismutação e é convertido em peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada pela SOD. De fato, esta enzima é considerada como sendo a primeira linha de defesa contra o radical superóxido (Fridovich, 1997). Portanto, a maior atividade da SOD observada nas larvas de quironomídeo coletadas às 13h:00min em relação àquelas coletadas nas outras horas do dia é uma boa evidência de que estas larvas estão produzindo mais radical superóxido quando a temperatura da água está aumentando (das 07h:00min às 13h:00m) no Lago Magadi.

É importante notar que o radical superóxido gerado nos processos oxidativos pode atuar tanto como um agente oxidante como um agente redutor, levando assim à formação de outras ROS que, por sua vez, são ainda mais agressivas às biomoléculas (Fridovich, 1989). De fato, este radical livre pode induzir a geração de radicais hidroxil através das reações de Fenton e Haber-Weiss, bem como reagir com radical hidroxil e

gerar o oxigênio singleto (Sies, 1985). Assim, o radical hidroxil é um dos radicais livres mais reativos, interagindo com todas as principais biomoléculas e oxidando-as (Halliwell and Guteridge, 2007).

O peróxido de hidrogênio formado após a dismutação do radical superóxido seria ser convertido em água na reação catalizada pela CAT (Hermes-Lima, 2004). Entretanto, nenhuma variação diária significativa foi observada na atividade da CAT na larva do quironomídeo *T. minutipalpus*. Isto sugere que o radical superóxido gerado poderia se acumular e levar a uma condição de estresse oxidativo. É importante notar que os excessivos elevados níveis de ROS que foram relatados para as águas do Lago Magadi também ocorreram às 13h00min (Johannsson *et al.*, 2014). Portanto, uma condição de estresse oxidativo estaria favorecida neste cenário. Entretanto, nenhuma variação diária signficativa foi observada no TOSC, nem tampouco nenhum indicativo de alteração nos níveis de dano oxidativo (LPO e número de sítios AP) foi observado nas larvas de quironomídeo. Este resultado pode ser explicado considerando-se o aumento observado na atividade da GPx nas larvas de quironomídeos coletadas às 13h:00min. De fato, a GPx é a enzima mais importante envolvida na degradação do peróxido de hidrogênio e na eliminação de hidroperóxidos orgânicos (LOOH) (Fridovich, 1997; Hermes-Lima, 2004). Portanto, os resultados do presente estudo indicam claramente que a GPx tem um papel crucial no sistema antioxidante das larvas de *T. minutipalpus* Lago Magadi. Eles também sugerem que a CAT pode não estar envolvida na resposta do sistema antioxidante das larvas de *T. minutipalpus* às variações diárias na temperatura e oxigênio dissolvido observadas nas águas do Lago Magadi. No entanto, a falta de reposta da CAT às variações diárias nas condições físico-químicas do Lago Magadi também pode ser explicada se considerarmos que esta enzima já se encontrava operando em sua atividade máxima durante todas as horas do dia. Neste

caso, ao contrário do que foi discutido acima para SOD, GPx e GR, a CAT poderia ser considerada como uma enzima não alvo de regulação frente às variações ambientais observadas.

As reações catalizadas pela GPx tem a GSH como agente redutor (Meister and Anderson, 1983). Portanto, uma maior geração de ROS levaria a uma maior taxa de produção de GSSG. De fato, uma maior concentração corporal de GSSG foi observada nas larvas de *T. minutipalpus* coletadas às 13h00min. Este resultado está completamente de acordo com o aumento observado na atividade da SOD nestas larvas. Após a formação da GSSG pelos processos oxidativos, o nível celular de GSH é restaurado através da ciclagem oxidante-redutora mediada pelo sistema enzimático GR-GPx (Fridovich, 1997; Hermes-Lima, 2004). O aumento significativo e proporcional nas atividades da GPx e da GR observado nas larvas de quironomídeo coletadas às 13h:00min é uma importante evidência de que estas duas enzimas estão trabalhando de forma cooperativa, fazendo com que a ciclagem GSH/GSSG seja um mecanismo com papel central no sistema de defensa antioxidante da larva de *T. minutipalpus*.

Adicionalmente ao sistema de ciclagem envolvendo a GPx e a GR, os níveis celulares de GSH podem ser aumentados após uma síntese de novo da GSH, a qual é mediada por 2 enzimas dependentes de ATP, a glutamato-cisteína ligase (GCL) e a glutathiona synthase (GS). A GLC catalisa a reação entre glutamato e cisteína para formar o dipeptídeo γGlu-Cys, enquanto a GS combina o dipeptídeo com a glicina para gerar a GSH (Maher, 2005). No presente estudo, também foi analisada a atividade da GCL corporal nas larvas de *T. minutipalpus* do Lake Magadi. Porém, não foi encontrada diferença significativa entre as larvas de quironomídeos coletadas às 07h00min e às 13h00min. Este resultado sugere que as larvas de *T. minutipalpus* foram capazes de neutralizar as ROS produzidas sem alterar a taxa de produção de GSH, reforçando assim

o papel central do sistema GPx-GR na manutenção do estado oxidativo na larva do quironomídeo. Entretanto, o envolvimento de outros antioxidantes não enzimáticos não pode ser descartado. As metalotioneínas, a biliverdina e as mucoproteínas têm sido também descritas como importantes agentes antioxidantes em invertebrados aquáticos sujeitos a condições ambientais estressantes que levam ao estresse oxidativo (Monserrat *et al.*, 2007). No presente estudo, foi medida a concentração corporal de mucoproteínas nas larvas de *T. minutipalpus* coletadas às 07h00min e às 13h00min. Entretanto, não houve diferença significativa entre estes dois grupos de larvas de quironomídeos. Este resultado só reforça ainda mais o papel fundamental da GSH na neutralização dos radicais hidroxil e peroxil gerados durante o metabolismo oxidativo na larva do quironomídeo *T. minutipalpus*.

Como ocorre para os radicais superóxido e hidroxil, outros radicais livres como os peroxil e alcoxil também podem ser gerados a partir de hidroperóxidos orgânicos e radicais centrados no oxigênio, respectivamente. Sabe-se que estas ROS podem atuar como intermediários na lipoperoxidação (LPO), bem como em outros processos oxidativos (Bergendi *et al.*, 1999). Como foi observada uma ausência de variação diária significativa no dano oxidativo (LPO e AP sites) nas larvas do quironomídeo avaliado no presente estudo, sugere-se que quantidades significativas de radicais peroxil e alcoxil não foram geradas durante os processos de ajuste às variações ambientais observadas.

Como uma maior concentração de creatinina foi observada nas larvas de quironomídeo coletadas às 13h00min, supõe-se que estas larvas estivessem mais ativas nesta hora do dia. Neste caso, uma atividade corporal (muscular) aumentada levaria a uma maior produção de espécies reativas de nitrogênio (RNS). De fato, o sistema do óxido nítrico está bem caracterizado nos insetos (Müller, 1997). Portanto, como foi discutido para os radicais livres centrados no oxigênio, os processos oxidativos celulares

podem levar à geração de espécies reativas centradas no nitrogênio. Apesar de o óxido nítrico ser um gás que tem importantes funções bioquímicas e fisiológicas, ele pode ser considerado com um radical livre. Esta RNS é gerada através da atividade da óxido nítrico sintase, uma enzima envolvida na sinalização celular e respostas imunológicas. No metabolismo oxidativo, o óxido nítrico está associado com a geração do radical peroxinitritito ($ONOO^-$) (Dusse *et al.*, 2003). Entretanto, como observado para ROS, não foi observada nenhuma variação significativa na concentração corporal de óxido nítrico entre os grupos de larvas de *T. minutipalpus* coletadas em diferentes horários do dia. Este resultado sugere que as RNS não estão envolvidas na resposta do sistema antioxidante das larvas de *T. minutipalpus* às variações diárias que ocorrem nos parâmetros físico-químicos nas águas do Lago Magadi.

Como discutido acima, tanto os radicais centrados no oxigênio quanto aqueles centrados no nitrogênio podem levar a uma condição de estresse oxidativo com consequente dano às biomoléculas. Os danos mais comuns são LPO, carbonilação de proteínas e oxidação do DNA (Dusse *et al.*, 2003; Giorgio *et al.*, 2007). Neste caso, a peroxidação de lipídios de membrana é uma das principais causas de lesão e morte celular (Abuja e Albertini, 2001). Entretanto, é interessante notar que um organismo sofre um estresse oxidativo somente quando a concentração de ROS, e provavelmente de RNS, sobrepuja a sua capacidade antioxidante. Os dados relatados no presente estudo mostraram claramente que as larvas de *T. minutipalpus* não sofrem uma condição de estresse oxidativo associado com as variações diárias de temperatura e oxigênio dissolvido que ocorrem nas águas do Lago Magadi. Esta afirmativa está baseada no fato de que nenhuma variação significativa foi observada nos níveis de dano aos lipídios e ao DNA. Este fato pode ser explicado considerando-se a ausência de alterações

significativas nos níveis de TOSC, bem como de ROS e óxido nítrico entre os grupos de larvas coletadas nas diferentes horas do dia.

Assim, os resultados relatados no presente estudo mostram claramente que a larva de *T. minutipalpus* possui ajustes metabólicos adequados e um eficiente sistema de defesa antioxidante para neutralizar todos os agentes pro-oxidantes gerados quando enfrenta as condições ambientais estressantes e assim lidar com sucesso com as amplas variações diárias observadas nas condições extremas das águas do Lake Magadi. Para contrapor os efeitos deletérios dos pro-oxidantes e se proteger contra o dano oxidativo potencial destes compostos, as larvas do quironomídeo possuem um poderoso sistema antioxidante de neutralização de ROS. Entretanto, a possibilidade de ocorrência de outros mecanismos adaptativos para prevenir a formação de ROS e/ou reparar moléculas afetadas pelas ROS (Storey, 1996; Ribeiro *et al.*, 2005) não pode ser descartada.

Em resumo, no presente estudo foram analisados diversos parâmetros indicadores de metabolismo e componentes do sistema antioxidante na larva do quironomídeo *T. minutipalpus* do Lago Magadi. Considerando que as principais enzimas envolvidas na capacidade antioxidante são a SOD, CAT, GPx e GR (Michiels *et al.*, 1994), os resultados descritos no presente estudo indicam que todos os componentes enzimáticos de um sistema antioxidante típico estão presentes na larva do quironomídeo. Entretanto, como esperado, o mecanismo envolvido na capacidade antioxidante nas larvas de *T. minutipalpus* está composto não somente por enzimas antioxidantes, mas também por antioxidantes não enzimáticos que tem a capacidade de se ligar a ROS. No presente estudo, foram analizadas as contribuições da GSH e das mucoproteínas. Como esperado, a GSH se apresentou de forma abundante na larva do quironomídeo e mostrou desempenhar um papel crucial no sistema antioxidante na larva

de *T. minutipalpus*. De fato, as concentrações observadas de GSH foram aproximadamente 20 vezes maiores do que aquelas de GSSG, sendo que 95-96% da GSH corporal se encontra na forma reduzida. Isto é uma evidência do importante papel desempenhado pela GSH como um antioxidante não enzimático para a capacidade antioxidante total do animal. Este papel se torna ainda mais importante quando os seguintes fatos são considerados: os radicais hidroxil são altamente tóxicos às biomoléculas; não existem defensas enzimáticas conhecidas contra estes radicais (Bains & Shaw, 1997); e a GSH é particularmente eficiente no combate contra os radicais hidroxil. Portanto, os resultados descritos no presente estudo suportam a ideia de que a larva do quironomídeo *T. minutipalpus* apresenta ajustes metabólicos adequados e conta com um importante reservatório corporal de GSH para evitar o potencial dano oxidativo que pode estar associado a um aumento de ROS, que por sua vez está relacionado ao aumento do metabolismo corporal, frente às variações nas condições físico-químicas extremas e severas das águas do Lago Magadi. Por sua vez, este reservatório de GSH é mantido em níveis adequados por um ativo e eficiente sistema oxidante-redutor de reciclagem da GSH mediado pela GPx e GR.

BIBLIOGRAFIA GERAL

ABUJA P.M., ALBERTINI R. 2001. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinical Chimica Acta* 306: 1–17.

AZEVEDO-PEREIRA H.M.V.S., LEMOS M.F.L., SOARES A.M.V.M. 2011. Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: Linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1210-1215.

BEHMER S.T., NES W.D. 2003. Insect sterol nutrition and physiology: a global overview. *Advances in Insect Physiology* 31, 1-72.

BERGENDI L., BENES L., DURACKOVÁ Z., FERENCIK M. 1999. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65: 1865-1874.

BOOTH G.M., LEE A-H. 1971. Distribution of cholinesterases in insects. *Bulletin of the World Health Organization* 44: 91-98.

CANAVOSO L.E., JOUNI Z.E., JOY KARNAS K., PENNINGTON J.E., WELLS M.A. 2001. Fat metabolism in insects. *Annual Review of Nutrition* 21: 23-46.

CHAPMAN R.F. 1998. The Insects - Structure and Function. *Cambridge University Press: Cambridge*. 749 pp.

COE, M. J. (1966). The biology of *Tilapia grahami* (Boulenger) in Lake Magadi, Kenya. *Acta Tropica* 23, 146-176.

CORBI J.J., TRIVINHO-STRIXINO S. 2006. Ciclo de vida de duas espécies de *Goeldichironomus* (Diptera, Chironomidae). *Revista Brasileira de Entomologia* 50: 72-75.

DUSSE L.M.S., VIEIRA L.M., CARVALHO M.G. 2003. Revisão sobre o óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de* Patologia *e Medicina Laboratorial* 39: 343-350.

FOWLER G., DAROSZEWSKA M., INGOLD K.U. 2003. Melatonin does not "directly scavenge hydrogen peroxide": Demise of another myth. *Free Radical Biology & Medicine* 34: 77-83.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. 2007. Free radicals in biology and medicine. *Oxford University Press, New York.*

HERMES-LIMA M. 2004. Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. In: Functional Metabolism: Regulation and Adaptation (Storey K.B., Ed.). *John Wiley & Sons: NewYork.* pp. 319-368.

JAVOR B. 1989. Hypersaline Environments. Microbiology and Biogeochemistry. Berlin-New York-Heildelberg: Springer-Verlag.

JENSEN C.S., GARSDAL L., BAATRUP E. 1997. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1727-1732.

JOHANNSSON O.E., BERGMAN H.L., WOOD C.M., LAURENT P., KAVEMBE D.G., BIANCHINI A., MAINA J.N., CHEVALIER C., BIANCHINI L.F., MICHAEL B.P., OJOO R.O. 2014. Air breathing in the Lake Magadi tilapia *Alcolapia grahami,* under normoxic and hyperoxic conditions, and the association with sunlight and ROS. *Journal of Fish Biology* 84: 844-863.

JOHANSEN, K., MALOIY, G.M., LYKKEBOE, G., 1975. A fish in extreme alkalinity. *Respiration and Physiology* 24: 159-162.

JURENKA R. 2015. Advances in Insect Physiology. *Academic Press: New York.* 186 pp.

KODIKARA G.R.L., WOLDAI T., VAN RUITENBEEK F.J.A., KURIA Z., VAN DER MEER F., SHEPHERD K.D., VAN HUMMEL G.J. 2012. Hyperspectral remote sensing of evaporate minerals and associated sediments in Lake Magadi area, Kenya. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 14: 22-32.

LANKESTER E.R. 1867. Preliminary notice of some observations with the spectroscope on animal substances. *Journal of Anatomy and Physiology* 2: 114-116.

LAZAR K.V., MOHAMED U.V.K. 1988a. Creatine and creatinine levels in the larval fat body of the moth, *Spodoptera mauritia,* during development. *Proceedings of Indian Nacional Science Academy.* B54, 143-144.

LAZAR, K.V., MOHAMED, U.V.K. 1988b. Amino transferases and glucose levels in developing larvae of the moth, *Spodoptera mauritia*. *Journal of Animal Morphology and Physiology*. 45: 41-43.

LEHNINGHER A., NELSON D.L., COX M.M. 2005. Princípios de Bioquímica. W.H. Freeman.

MERRITT R.W., CUMMINS, K.W. 1984. An introduction to the Aquatic Insects of the North America. *Kendall/Hunt Publishing: Dubuque, Iowa*. 772 pp.

MONSERRAT J.M., MARTÍNEZ P.B., GERACITANO L.A., AMADO L.L., MARTINS C.M.G., PINHO G.L.L., CHAVES I.S., FERREIRA-CRAVO M., VENTURA-LIMA J., BIANCHINI A. 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 146, 221-234.

MORGAN D. 2010. Biosynthesis in Insects. *RSC Publishing, Cambridge, UK.*

MÜLLER, U. 1997. The nitric oxide system in insects. *Progress in Neurobiology* **51**, 363-381.

NARAHARA A.B., BERGMAN H.L., LAURENT P., MAINA J.N., WALSH P.J., WOOD C.M. 1996. Respiration physiology of the lake Magadi tilapia (*Oreochromis alcalicus grahami*), a fish adapted to a hot alkaline, and frequently hypoxic condition. *Physiological Zoology* 69: 1114-1136.

PANIS L.I., GODDEERIS B., VERHEYEN R. 1995. The hemoglobin concentration of *Chironomus cf. plumosus* L. (Diptera, Chironomidae) larvae from two lenthic habitats. Netherlands Journal of Aquatic Ecology 29: 1-4.

PINDER L.C.V., REISS F. 1983. The larvae of Chironominae (Diptera: Chironomidae) of the Holarctic Region - keys and diagnoses. Part 1 - Larvae. *Entomologica Scandinavica Supplement* 19: 293-435.

PITMAN R.M. 1971. Transmitter substances in insects: A review. *Comparative and General Pharmacology* 2: 347-371.

RANDALL D.J., WOOD C.M., PERRY S.F., BERGMAN H.L., MALOIY G.M.O., MOMMSEN T.P., WRIGHT P.A. 1989. Urea excretion as a strategy for survival in a fish living in a very alkaline environment. *Nature* 337: 165-166.

RASMUSSEN A. 1996. Least oxygen dependent. In: The University of Florida Book of Insect Records. *University of Florida: Gainesville.* pp. 46-48.

RÉGNIÈRE J., POWELL J., BENTZ B., NEALIS V. 2012. Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: Experimental design, data analysis and modeling. *Journal of Insect Physiology* 58: 634-647.

REITE O.B., MALOIY G.M.O., AASEHAUG B. 1974. pH, salinity and temperature tolerance of Lake Magadi tilapia. *Nature* 247, 315.

RIBEIRO S.M., QUEIROZ J.H., PELÚZO M.C.G., COSTA N.M.B., MATTA S.L.P., QUEIROZ M.E.L.R. 2005. The formation and the effects of the reactive oxygen species in biological media *Bioscience Journal* 12: 133-149.

ROCKSTEIN M. 1978. Biochemistry of Insects. *Academic Press, New York.*

SHINZATO, T., NAKAI, S., MIWA, M., IWAYAMA, N., TAKAI, I., MATSUMOTO, Y., MORITA, H. AND MAEDA, K. 1997. New method for calculate creatinine generation rate using pre and post dialysis concentration. *Artificial Organs* 21: 864-87

SIES H. 1985. Oxidative stress. *Academic Press: London*. 507 p.

TOUTANT J.P. 1989. Insect acetylcholinesterase: Catalytic properties, tissue distribution and molecular forms. *Progress in Neurobiology* 32: 423-446.

TRIVINHO-STRIXINO S. 2010. Chironomidae (Insecta, Diptera, Nematocera) do Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil. *Biota Neotropica* 11 (Sup. 1): 675-684.

TRIVINHO-STRIXINO S., STRIXINO G.B.M.A. 1995. Larvas de Chironomidae (Diptera) do Estado de São Paulo: Guia de Identificação e Diagnose dos Gêneros. *PPGE-RN, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.* 227 pp.

VERSCHUREN, D. 1997. Taxonomy and ecology of fossil Chironomidae (Insecta, Diptera) from Rift Valley lakes in central Kenya. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 107: 467-512.

WALSHE B.M. 1947. The function of haemoglobin in *Tanytarsus* (Chironomidae). *Journal of Experimental Biology* 24: 343-351.

WARD J.V. 1992. Aquatic Insect Ecology. 1. Biology and Habitat. *John Wiley & Sons: New York*. 456 pp.

WILSON P.J., WOOD C.M., WALSH P.J., BERGMAN A.N., BERGMAN H.L., LAURENT P.,WHITE B.N. 2004. Discordance between genetic structure and morphological, ecological, and physiological adaptation in Lake Magadi tilapia. *Physiological and Biochemical Zoology* 77: 537-555.

WOOD C.M., BERGMAN H.L., LAURENT P., MAINA J.N., NARAHARA A., WALSH P.J. 1994. Urea production, acid–base regulation and their interactions in the lake magadi tilapia, a unique teleost adapted to a highly alkaline environment. *Journal of Experimental Biology* 189: 13-36.

WOOD C.M., PERRY S.F., WRIGHT P.A., BERGMAN H.L., RANDALL D.J. 1989. Ammonia and urea dynamics in the Lake Magadi tilapia, a ureotelic teleost fish adapted to an extremely alkaline environment. *Respiration Physiology* 77: 1-20.