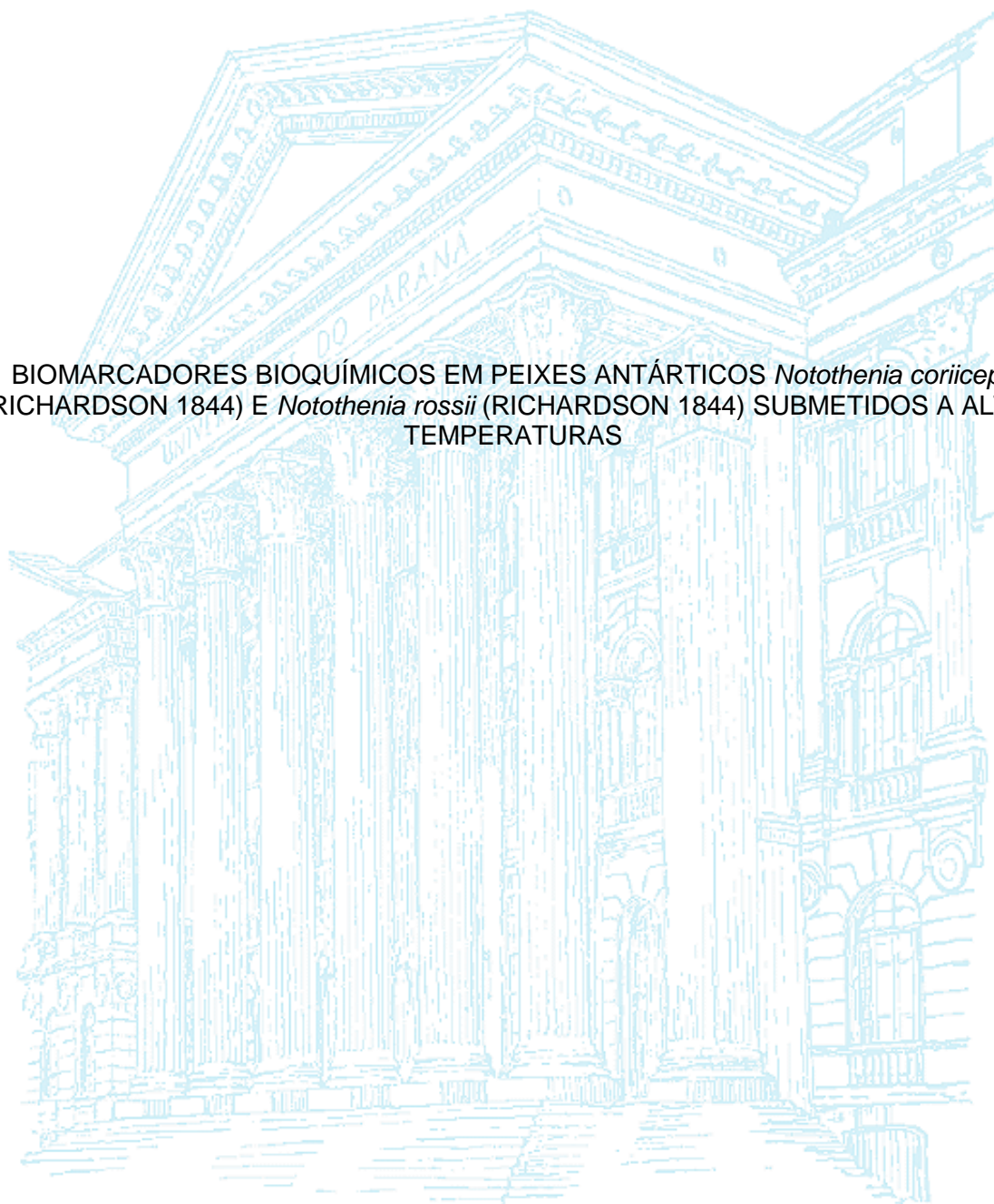


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAMILE FOLTRAN

BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM PEIXES ANTÁRTICOS *Notothenia coriiceps*
(RICHARDSON 1844) E *Notothenia rossii* (RICHARDSON 1844) SUBMETIDOS A ALTAS
TEMPERATURAS



CURITIBA
2012

CAMILE FOLTRAN

BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM PEIXES ANTÁRTICOS *Notothenia coriiceps*
(RICHARDSON 1844) E *Notothenia rossii* (RICHARDSON 1844) SUBMETIDOS A ALTAS
TEMPERATURAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti

Coorientador: Prof. Dr. Francisco Filipak Neto

CURITIBA
2012

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Professora Dra. Lucélia Donatti, meu sincero agradecimento pela confiança, orientação e amizade;

Ao meu coorientador, Professor Dr. Francisco Filipak Neto, do Departamento de Biologia Celular, agradeço por sua atenção e auxílio durante as análises;

Ao Professor Dr. André Padial, pela dedicação, paciência necessária para as análises estatísticas;

A minha família, abrigo de todas as horas, obrigada pela dedicação e companheirismo;

Ao CNPq, pelo apoio financeiro;

A todos os meus amigos do laboratório, principalmente Tânia, Gabriela, Cintia, Banana, Maria Rosa e Danilo pelos momentos de descontração e muita ajuda;

Aos professores do programa de pós-graduação em Ecologia e Conservação da UFPR, pela incomparável contribuição na minha formação como mestre;

Ao meu namorado Gustavo, por todo carinho, respeito, compreensão e apoio moral;

A Deus.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar” (Chico Xavier).

RESUMO

A Península Antártica, atualmente, é um laboratório natural para estudos de adaptação térmica em organismos marinhos antárticos, dentre os quais estão os peixes. A temperatura é uma importante variável ambiental para esses organismos ectotérmicos. Nos ambientes polares a sobrevivência a baixas temperaturas foi garantida por adaptações evolutivas nas propriedades fisiológicas, bioquímicas e comportamentais dos indivíduos. A capacidade de responder bioquimicamente ao aumento de temperatura de duas espécies de nototeniídeos antárticos, *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) foi avaliada através do estresse oxidativo, por meio da lipoperoxidação (LPO) e pela atividade da enzima glutationa-S-transferase (GST). Outro parâmetro avaliado foi a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no encéfalo das duas espécies e no músculo de *N. coriiceps*. Tais enzimas mostram ser importantes nos mecanismos de regulação das células e a LPO apresenta-se como uma boa indicadora de possíveis danos causados às membranas celulares. Os experimentos foram elaborados na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) localizada na Baía do Almirantado, ilha Rei George, na Península Antártica. Os exemplares das duas espécies foram submetidos às temperaturas de 0°C (controle), 4°C e 8°C durante 1, 4, 15 e 30 dias. *N. coriiceps* sobreviveu em todos os períodos de exposição (1, 4, 15 e 30 dias) na temperatura de 4°C, enquanto que em 8°C, resistiu somente até o sexto dia. Já *N. rossii* sobreviveu em todos os períodos de exposição (1, 4, 15 e 30 dias) nas temperaturas avaliadas (0°C, 4°C e 8°C). A maior resistência de *N. rossii* ao estresse térmico pode estar relacionada à sua capacidade de regulação, a qual influencia na sua distribuição geográfica. As análises enzimáticas da AChE demonstraram que sua atividade no encéfalo em *N. coriiceps* foi maior que em seu tecido muscular em todos os experimentos de estresse térmico. Fato que pode ser explicado pela maior quantidade de sinapses presentes no encéfalo quando comparado com o músculo. Em *N. coriiceps* a atividade da AChE no encéfalo mostrou uma redução significativa somente no primeiro dia a 4°C em relação ao controle. Já a atividade da AChE em *N. rossii* variou com a temperatura (0°C, 4°C e 8°C). Quando comparamos 8°C e 0°C, observa-se que os níveis de AChE aumentam nos períodos de exposição a 8°C, sugerindo que essa maior temperatura influencia de forma significativa o metabolismo da AChE em *N. rossii*. Tal alteração indica que esta espécie deve ter mecanismos mais eficientes de ajustes quando comparada com *N. coriiceps*. As atividades da GST e LPO, quando comparadas entre si, indicam uma tendência a serem inversamente proporcionais nas duas espécies analisadas. Em *N. coriiceps* a atividade da GST aumentou entre os períodos de exposição a 0°C acompanhando a tendência de redução dos níveis de LPO. A 4°C não houve diferença significativa entre os períodos de exposição, mas podemos observar uma tendência de aumento da GST em 15 dias e conseqüente diminuição da LPO. A atividade da GST em *N. rossii* foi maior em 15 dias de exposição a 0°C, juntamente com uma tendência a reduzir a LPO em 15 e 30 dias, fato observado também a 4°C, mas não a 8°C. Podemos concluir que, *N. coriiceps* e *N. rossii* respondem de forma diferenciada ao aumento da temperatura sugerindo que *N. rossii* possui uma faixa maior de tolerância térmica e mecanismos de ajustes mais eficientes quando comparada com *N. coriiceps*. Nas temperaturas e tempos de exposição analisados, a atividade da enzima GST bem como os níveis de LPO não podem ser utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo induzido por estresse térmico,

sendo necessária a análise de mais parâmetros bioquímicos do sistema antioxidante dos peixes *N. coriiceps* e *N. rossii*.

Palavras-chave: Temperatura. Estresse oxidativo. Peixes, Antártica. Acetilcolinesterase.

ABSTRACT

The Antarctica Peninsula, now a days, is a natural laboratory for studies of thermal adaptation in Antarctic marine organisms, among these the fish. The temperature is an important environmental variable to ectothermic organisms. In polar environments the survival to low temperatures of the water was guaranteed by evolutionary adaptations in physiology, biochemistry and behavior of the organisms. The capacity to respond biochemically to the rise of temperature of two species, *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) and *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) were evaluated through oxidative stress, via lipoperoxidation (LPO) and by the enzyme activity glutathione-S-transferase (GST). Another parameter evaluated was the activity of acetylcholinesterase (AChE) in the brain of both species and muscle of *N. coriiceps*. Such enzymes prove to be important in the regulation mechanisms of the cells and LPO is presented as a good indicator of possible damage to cell membranes. The experiments were performed in the Antarctic Station Captain Ferraz located in Admiralty Bay, King George Island, Antarctic Peninsula. The two specimens were submitted to 0°C (control), 4°C and 8°C temperatures during 1, 4, 15 e 30 days. *N. coriiceps* survived to all day exposures (1, 4, 15 e 30 days) at 4°C temperature. At 8°C it resisted only until the sixth day. *N. rossii* survived to all periods of exposures (1, 4, 15 e 30 days) at the evaluated temperatures (0°C, 4°C e 8°C). This greater resistance of *N. rossii* to the thermal stress might be related to its regulatory capacity, which influences their geographical distribution. The enzyme analyses of AChE demonstrated that its activities in the *N. coriiceps* brain were greater than in the muscle tissue in all of the thermal stress experiments. This fact may be explained by the greater quantity of synapses in the brain compared to the muscle. In *N. coriiceps*, AChE activity in the brain showed a significant reduction when compared only the first day at 4 °C to control. The activity of AChE in *N. rossii* varied at temperatures (0°C, 4°C e 8°C), when comparing 8°C to 0°C, it was observed that the levels of AChE increased in all periods of exposures at 8°C, indicating that this temperature influences significantly the metabolism of AChE in *N. rossii*. This alteration indicates that this species may have more efficient mechanisms of adaptation compared to *N. coriiceps*. The activities of GST and LPO when compared to each other, indicate a tendency to be inversely proportional in the two species. In *N. coriiceps* the GST activity increased between the periods of exposure at 0°C agreeing with the tendency of reduction in LPO levels. At 4°C there was not a significant difference between the periods of exposure, but we can observe the tendency of GST increase in 15 days and consequently LPO decrease. The GST activity in *N. rossii* was greater after 15 days of exposure at 0°C, along with the tendency to reduce LPO in 15 and 30 days, this fact was also observed at 4°C, but not at 8°C. We can conclude that *N. coriiceps* and *N. rossii* respond differently to the temperature rise, suggesting that *N. rossii* has a bigger thermal tolerance and more efficient mechanisms of adaptation compared to *N. coriiceps*. At the temperatures and exposure times analyzed the activity of the enzyme GST and LPO levels cannot be used as biomarkers of oxidative stress induced by thermal stress, is necessary analyze further biochemical parameters of the antioxidant system of fish *N. coriiceps* and *N. rossii*.

Key words: Temperature. Oxidative stress. Fish. Antarctica. Acetylcholinesterase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Mapa do Continente Antártico.....	15
FIGURA 2 – Representação esquemática dos peixes antárticos <i>Notothenia coriiceps</i> e <i>Notothenia rossii</i>	17
FIGURA 3 – Reação de hidrólise da acetilcolina.....	19
FIGURA 4 – Representação esquemática das fases da peroxidação lipídica.....	24
FIGURA 5 – Conjunção da Glutathione com um composto eletrofílico endógeno ou exógeno através da GST.....	26
FIGURA 6 – Mapas do Continente Antártico indicando os locais de coleta.....	30
FIGURA 7 – Meios de coleta utilizados na captura dos animais.....	31
FIGURA 8 – Módulo de tanques da EACF.....	32
FIGURA 9 – Fluxograma dos experimentos envolvendo <i>N. rossii</i> indicando as temperaturas (0°C, 4°C e 8°C) e tempos testados (1, 4, 15 e 30 dias). Em <i>N. coriiceps</i> o experimento ocorreu nas temperaturas 0°C e 4°C.....	32
FIGURA 10 - Média ± desvio padrão da atividade da AChE do encéfalo de <i>N. coriiceps</i>	37
FIGURA 11 - Média ± desvio padrão da atividade da AChE do músculo de <i>N. coriiceps</i>	38
FIGURA 12 - Média ± desvio padrão da atividade da GST do encéfalo de <i>N. coriiceps</i>	39
FIGURA 13 - Média ± desvio padrão dos níveis de LPO do encéfalo de <i>N. coriiceps</i>	40
FIGURA 14 - Média ± desvio padrão da atividade da enzima AChE do encéfalo de <i>N. rossii</i>	41
FIGURA 15 - Média ± desvio padrão da atividade da enzima GST do encéfalo de <i>N. rossii</i>	42
FIGURA 16 - Média ± desvio padrão dos níveis de LPO do encéfalo de <i>N. rossii</i>	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Parâmetros bioquímicos, órgãos, temperaturas e tempos de exposição analisados em <i>N. coriiceps</i> e <i>N. rossii</i>	35
TABELA 2 - <i>n</i> Amostral utilizado em cada análise de <i>Notothenia coriiceps</i> submetida em diferentes temperaturas (0°C, 4°C e 8°C) e tempos de exposição (1, 4, 15 e 30 dias).....	36
TABELA 3 - <i>n</i> Amostral em cada análise de <i>Notothenia rossii</i> submetida em diferentes temperaturas (0°C, 4°C e 8°C) e tempos de exposição (1, 4,15 e 3 0 dias).....	36

LISTA DE ABERVIATURAS

AR	– Arctowski
ATP	– Adenosina trifosfato
ACh	– Acetilcolina
AChE	– Acetilcolinesterase
AFGP	– Glicoproteínas anticongelantes (do inglês <i>Anti Freeze Glico Proteins</i>)
BChE	– Butirilcolinesterase
BCh	– Butirilcolina
BHT	– Hidroxitolueno butilado
°C	– Graus Celsius
CDNB	– (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno)
ChE	– Colina
DNA	– Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DTNB	– Ácido nitrobenzóico (5,5'- Ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico))
EACF	– Estação Antártica Comandante Ferraz
EC	– Comissão de Enzimas (do inglês <i>Enzyme Commission</i>)
EDTA	– Ácido etileno diamino tetraacético (do inglês <i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>)
FOX	– Ferrous Oxidation-Xylenol <i>Orange</i>
GAAM	– Grupo de Assessoramento Ambiental
GSH	– Glutathiona reduzida
GST	– Glutathiona – S –Transferase
LOOH	– Hidroperóxido lipídico
H ₂ O ₂	– Peróxido de hidrogênio
k _{cat}	– Constante que representa a eficiência da atividade catalítica de uma enzima
Km	– Constante de Michaelis-Menten para uma enzima e expressa a relação entre a concentração inicial de substrato e enzima no estado estacionário
L•	– Radical lipídico
LO•	– Alcoxila
LOO•	– Peroxila
LPO	– Lipoperoxidação
M	– Metros
MIN	– Minutos
MG	– Miligramas
MMA	– Ministério do meio ambiente
MUFA	– Ácido graxo monoinsaturado (do inglês <i>Monounsaturated fatty acid</i>)
NADPH	– (do inglês <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>).
NM	– Nanômetros
NO•	– Óxido Nítrico
O ₂ • ⁻	– Superóxido
•OH	– Radical hidroxila
PP	– Punta Plaza
PSU	– Unidades Práticas de Salinidade (ou do inglês <i>Practical Salinity Units</i>)
PUFA	– Ácido graxo poliinsaturado (do inglês <i>Poliunsaturated fatty acid</i>)
ROS	– Espécie reativa de oxigênio (do inglês <i>Reactive oxygen species</i>)
SCAR	– Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (do inglês <i>Scientific Committee on Antarctic Research</i>)
U	– Unidades Internacionais de enzimas
UFPR	– Universidade Federal do Paraná
XO	– Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 CONTINENTE ANTÁRTICO	14
2.2 PEIXES ANTÁRTICOS E TEMPERATURA	15
2.3 ACETILCOLINESTERASE (ACHE)	19
2.4 ESTRESSE OXIDATIVO	21
2.5 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO).....	23
2.6 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).....	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO.....	29
4.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	31
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	33
4.3.1 CONCENTRAÇÃO PROTÉICA	33
4.3.2 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)	34
4.3.3 ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST).....	34
4.3.4 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO).....	34
4.4 ANÁLISE DE DADOS	35
5 RESULTADOS	36
5.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM <i>NOTOTHENIA CORIICEPS</i>	37
5.1.1 ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	37
5.1.2 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST).....	38
5.1.3 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO).....	39
5.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM <i>NOTOTHENIA ROSSII</i>	40
5.2.1 ACETILCOLINESTERASE (AChE).....	40
5.2.2 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST).....	41
5.2.3 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO).....	43
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	50
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
ANEXO I – TABELAS COM VALORES DE P	

1 INTRODUÇÃO

A biogeografia marinha e os padrões de biodiversidade são amplamente influenciados pelos efeitos diretos da temperatura (Murawski, 1993; Astorga *et al.*, 2003). Os peixes, como organismos termo-dependentes, estão submetidos a flutuações no regime térmico que podem afetar sua reprodução, crescimento e sobrevivência (Dippner, 1997; Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

O continente antártico é um local detentor de características particulares de temperatura, salinidade e fotoperíodo. Seus habitantes estão adaptados a tais características e assim, evitam possíveis danos gerados pelas baixas temperaturas (di Prisco, 1998; Crossley, 1995). Dentre os mecanismos preservados ao longo da evolução dos peixes antárticos a temperaturas subzero, podemos citar os ajustes bioquímicos e morfofuncionais envolvendo a expressão de enzimas com elevada eficiência catalítica e a composição da membrana plasmática (Gutt, 2002; Verde *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2007).

O aquecimento acelerado da Península Antártica e das ilhas adjacentes têm suscitado questões sobre a plasticidade térmica dos ectotérmicos antárticos (Meredith, 2005; di Prisco & Verde, 2011). Sabe-se que a proximidade geográfica com a fronteira polar Antártica faz com que estas ilhas tornem-se vulneráveis a eventuais mudanças ambientais decorrentes do aquecimento desta área. Clarke *et al.* (2007), relatam que a Península Antártica é uma das três regiões do planeta que vem sofrendo aquecimento acelerado, tendo sua temperatura elevada a 1,5°C entre 1950 a 2006, contra 0,6°C do restante do planeta. Isso aumenta as taxas de derretimento das grandes geleiras continentais, as quais desembocam no oceano e, também, dificulta a formação do gelo marinho durante os invernos polares. Neste ambiente, habitam as espécies de peixes *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii*, dois notothenídeos endêmicos da Antártica e duas das quatro espécies dominantes da Baía do Almirantado, região localizada na Ilha Rei George, Península Antártica, e local deste estudo.

Os peixes estão expostos a agentes estressores que podem ser divididos em dois grandes grupos, fatores físicos e químicos. Os fatores físicos, como a salinidade, temperatura e o oxigênio dissolvido afetam o crescimento, o metabolismo, a reprodução, a osmorregulação e a função imune, causando efeitos negativos como distúrbios no crescimento e na reprodução (Lushchak, 2011). Quando um ser vivo é exposto a um estímulo estressor, o organismo sofre regulações visando à recuperação da homeostase. Um estímulo, independente da sua natureza, que eleve a produção excessiva de radicais livres ou induza a depleção de antioxidantes faz com que o balanço entre produção/depleção seja alterado, gerando o que denominamos de estresse oxidativo

(Dröge, 2002). Dentre os fatores indutores do estresse oxidativo está a temperatura (Elsayed, 2001). O estresse induzido por mudanças térmicas tem sido associado com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem levar ao estresse oxidativo (Heise *et al.*, 2007; Parihar & Dubey, 1995) e induzir a lipoperoxidação (Bagnyukova *et al.*, 2007). O aumento da temperatura pode ainda, influenciar nas atividades das enzimas, dentre elas, a acetilcolinesterase (AChE) (Oliveira *et al.*, 2007) e a glutathiona S-transferase (GST) (Bagnyukova *et al.*, 2007).

A AChE é um componente chave das sinapses colinérgicas cerebrais e junções neuromusculares (Štěpánková & Komers, 2008). Possui a função de regular essa transmissão, reduzindo a concentração de acetilcolina (ACh) na junção e prevenindo contínuas passagens de impulsos, sendo vital para um normal funcionamento do sistema sensorial e neuromuscular (Stenesh, 1998). Na literatura, existem poucos estudos sobre a influência do estresse térmico na atividade enzimática da AChE. Desse modo, há necessidade de investigar se o estresse térmico em peixes antárticos reduz a atividade da AChE.

A lipoperoxidação (LPO) é uma das consequências do estresse oxidativo (Bride *et al.*, 1999). Consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado (AGPI), produzindo um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário (Lima *et al.*, 2001). A oxidação dos AGPI requer um oxigênio na forma ativada para capturar um átomo de hidrogênio do grupo metileno, e formar um radical de carbono. Assim, o ácido graxo com um elétron desemparelhado se combina com o oxigênio formando o radical peroxil. Este radical é altamente reativo podendo danificar moléculas biológicas, incluindo os lipídios, proteínas, DNA e ainda gerar outros radicais de carbono promovendo a etapa de propagação (Gutteridge, 1995). A peroxidação lipídica extensiva em membranas biológicas leva a perda de fluidez, decaimento do potencial de membrana, aumento da permeabilidade, e eventual ruptura (Gutteridge, 1995; Dutra *et al.*, 2008).

As células são protegidas das espécies reativas de oxigênio (ROS) e dos danos do estresse oxidativo através de complexos sistemas de defesas antioxidantes (Grim *et al.*, 2010; An *et al.*, 2010). Os mecanismos de defesa antioxidante podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas enzimáticos envolvem as enzimas do sistema da glutathiona e também incluem a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). Há ainda a proteção não enzimática como a vitamina E (α -tocoferol), vitamina C (ácido L-ascórbico) e a vitamina A (β -caroteno) (Sentürker, *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1997).

A glutathiona-S-transferase (GST) é uma família de enzimas multifuncionais presentes no citosol da maioria das células, que catalisa a conjugação da glutathiona tripeptídica a uma variedade de compostos com grupos eletrofílicos. Isso gera compostos menos tóxicos e mais solúveis em água, facilmente excretados das células (Menezes *et al.*, 2009). Portanto,

estão envolvidas na desintoxicação de xenobióticos e de produtos endógenos reativos resultantes do metabolismo celular (Bartlin *et al.*, 1993).

O entendimento dos mecanismos fisiológicos e da plasticidade metabólica dos peixes antárticos submetidos ao estresse térmico a altas temperaturas é de fundamental importância, pois pode fornecer subsídios que poderão contribuir para a tomada de decisão em relação aos ecossistemas e organismos sujeitos a possíveis alterações climáticas globais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CONTINENTE ANTÁRTICO

A formação da Península Antártica e a emersão gradual das ilhas subantárticas do oceano incidiu com a separação do grande continente Gondwana. Por volta de 23 milhões de anos atrás, o surgimento da passagem de Drake entre a Antártica e a América do Sul resultou na Corrente Circumpolar Antártica, principal motivo do resfriamento continental. O gelo propagou-se, substituindo florestas que cobriam o continente (di Prisco, 1991; McGonidal, 2009). Durante 20 milhões de anos sua temperatura diminuiu gradualmente, estimando-se que o ecossistema marinho antártico esteja abaixo de 0°C a três ou cinco milhões de anos, gerando forte pressão seletiva na composição faunística através das baixas temperaturas e da sazonalidade (Kennett, 1977).

O continente antártico está localizado ao sul do paralelo de 60°S e possui cerca de 14 milhões de km², 99% dessa área é recoberta por gelo. Está cercado pelo Oceano Antártico ou Austral, considerado o limite do continente (Bellisio & Tomo, 1973). Este oceano possui uma das maiores e mais velozes correntes marítimas da Terra, a Corrente Circumpolar Antártica, podendo atingir a velocidade de 60 km por dia (McGonidal, 2009).

Fisicamente a Antártica é dividida pelas Montanhas Transantárticas em duas regiões, a Antártica Oriental ou Maior e a Antártica Ocidental ou Menor (Eastman, 1993; Riffenburgh, 2007) (Figura 1). A parte oriental corresponde a dois terços da área da Antártica, e contém 88% do total da plataforma de gelo que cobre o continente. É formada por uma única massa continental, possuindo as maiores altitudes da Antártica (Bellisio & Tomo, 1973; Crossley, 1995; Satish-Kumar, *et al.*, 2006). Já a região Ocidental é menor em extensão e mais baixa que a Oriental, embora possua o maior pico de montanhas do continente. É constituída por blocos de terra que possivelmente foram formados durante a separação da Antártica da América do Sul enquanto ocorria a fragmentação do supercontinente Gondwana (Crossley, 1995).

A influência da Antártica se estende ainda mais ao norte do mar Austral em uma zona conhecida como Convergência Antártica. Essa zona é caracterizada pelo encontro das águas frias densas vindas da Antártica com águas de temperaturas mais amenas e menos densas vindas da parte oceânica subtropical (Oceanos Atlântico, Pacífico e Índico). A Zona de Convergência afeta as condições locais da Antártica, durante o verão, quando a temperatura do ar se eleva acima do ponto de congelamento, ocorre fluxo d'água de derretimento das geleiras e da neve sazonal nas áreas costeiras. Isso é mais importante nas

regiões situadas na periferia do continente, onde as temperaturas no verão são mais altas e o derretimento expõe o solo ou a rocha (Eastman, 1993; Brito, 2006).

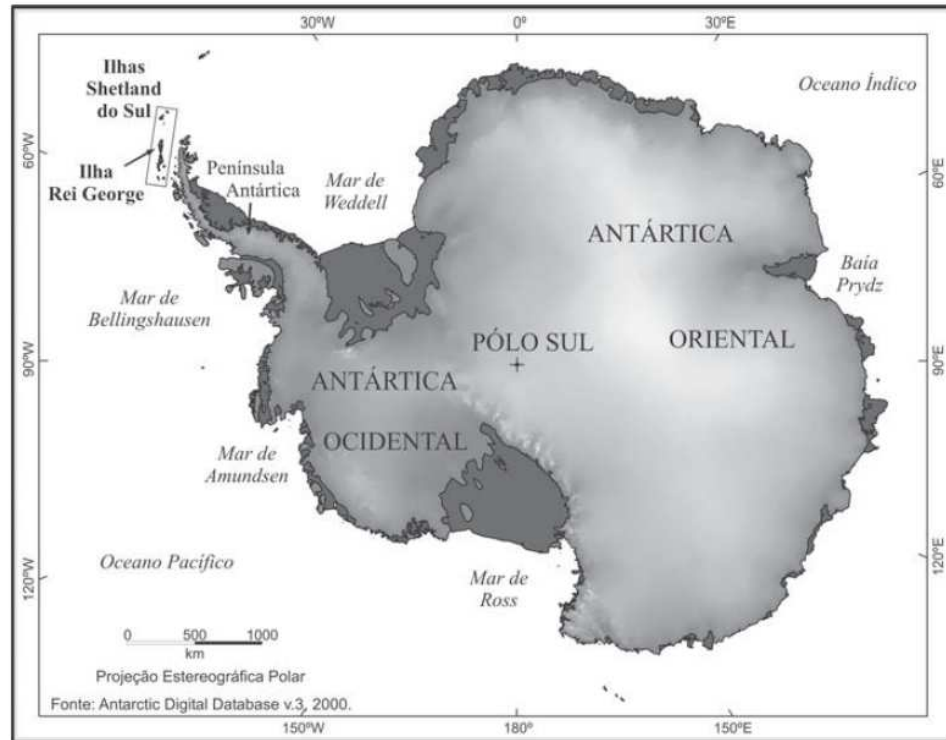


FIGURA 1 - Mapa do Continente Antártico. Fonte: Antarctic Digital Database v.3, British Antarctic Survey (2000).

2.2 PEIXES ANTÁRTICOS E TEMPERATURA

O Oceano Antártico ocupa aproximadamente 10% dos oceanos, sua composição de peixes é formada por 322 espécies, o equivalente a 1% das espécies conhecidas atualmente (Eastman, 1993; 2005). A ictiofauna Antártica é altamente endêmica, onde 88% das espécies estão confinadas nesta região (Eastman, 1993; 2005).

O grupo dominante de peixes antárticos pertence à subordem Notothenioidei, a qual consiste de seis famílias com pelo menos 120 espécies (Eastman, 1993), sendo Nototheniidae a família predominante. Os notothenídeos possuem um amplo gradiente de ocupação (Eastman, 1993), estando presentes em habitats bênticos e coluna d'água (DeWitt, 1971). Geralmente são sedentários, possuem longo ciclo de vida, reduzida taxa de

fecundidade e crescimento mais lento que outras espécies de peixes habitantes de águas geladas (Everson, 1977).

Notothenia coriiceps (Figura 2 A, B) habita locais próximos a costas, em profundidades de 0 a 450 m, mas são comumente encontrados em profundidades menores de 200 m (Bellisio & Tomo, 1973). Na Ilha Rei George a espécie permanece em áreas costeiras durante todo seu ciclo de vida (Burchett, 1983; Casaux *et al.*, 1990), já na Ilha Elefante e em outras ilhas do arquipélago Shetlands do Sul os indivíduos parecem migrar para águas mais profundas para desovar (Hureau, 1970; Everson, 1977). Os hábitos alimentares de *N. coriiceps* podem variar de acordo com a localidade. Em águas rasas (1-20m de profundidade), a dieta consiste de animais bentônicos, como anfípodas, gastrópodes e bivalves, e poucos organismos pelágicos (Richardson, 1975). Já, em águas mais profundas (acima de 170m de profundidade) possuem uma dieta com predominância de animais pelágicos, como o krill (*Euphasia superba*), peixes menores e anfípodas hiperídeos. Em geral, o tamanho e a quantidade de presas consumidas e o número de diferentes espécies predadas são incrementadas à medida que o peixe cresce (Knox, 1994). Alguns estudos indicam que esta espécie também se alimenta de algas (Iken, 1997).

Notothenia rossii (Figura 2 C, D) apresenta um alto valor comercial devido à textura e palatabilidade da sua carne (di Prisco, 1998; CCAMLR, 2011), por isso no início dos anos 70 foi alvo de intensa pesca, provocando um esgotamento de seu estoque. Knox (1994) relata que indivíduos jovens de *N. rossii* são demersais, preferindo profundidades de 3 a 200 m, já os adultos são demerso-pelágicos, sendo frequentemente encontrados entre 200 e 1000 m de profundidade. Os espécimes juvenis de peixes antárticos da Baía do Almirantado, dentre eles *N. rossii*, vivem em águas rasas (Skora & Neyelov, 1992). Em relação ao hábito alimentar, são consumidores de organismos bentônicos, tendo preferência pelo krill (*Euphasia spp.*). Sua dieta varia ontogeneticamente tendo um amplo espectro trófico decorrente da baixa diversidade de peixes, proporcionando uma competição pouca intensa (Targett, 1981). Tal mudança de dieta está relacionada à preferência por diferentes profundidades (Gon & Heemstra, 1990). Adultos de *Notothenia rossii* ingerem principalmente ctenóforos, hidrozoários, anfípodas, eufasídeos e peixes, dependendo da oportunidade dos organismos-presa (Laws, 1984; Barrera-Oro, 2003; Barrera-Oro & Winter, 2008).

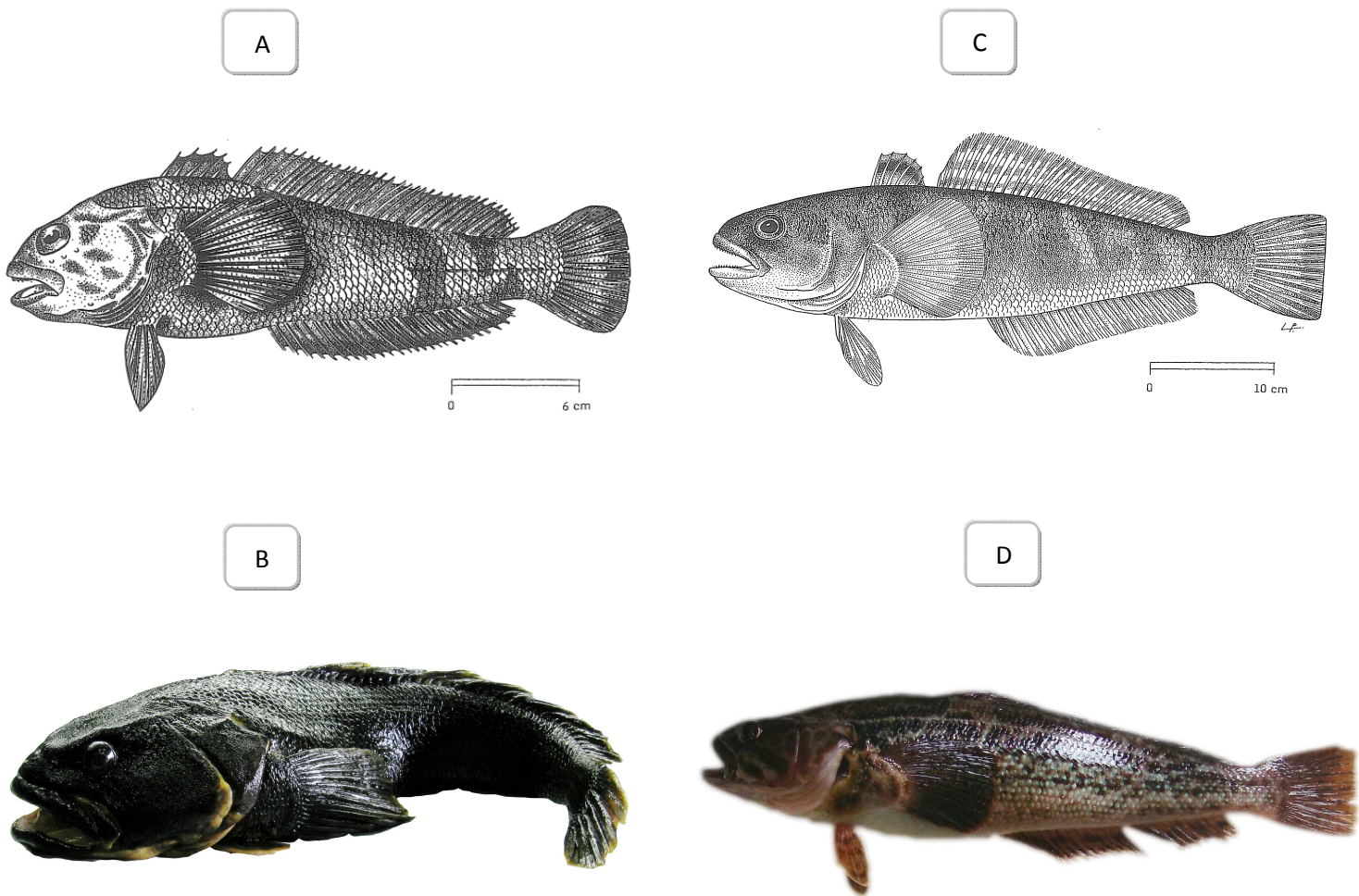


FIGURA 2 – Representação esquemática dos peixes antárticos (A) *Notothenia coriiceps* e (C) *Notothenia rossii*. Fonte: Fisher e Hureau (1985). Fotos dos peixes antárticos (B) *Notothenia coriiceps* e (D) *Notothenia rossii*. Fonte: (B) Donatti (2009) e (D) Pedreiro (2011).

A biodiversidade dos mares antárticos está relacionada às baixas temperaturas, que exibem elevada solubilidade de oxigênio (Crockett, 2011), ao confinamento ecológico e a oscilação sazonal do suprimento alimentar, parcialmente explicada pela limitação sazonal de luminosidade (Eastman, 1993). A estabilidade térmica do ambiente, em especial das zonas de gelo marinho permanente, pode ter sido muito importante para o processo de seleção e adaptação molecular dos organismos antárticos.

Os peixes antárticos, habitantes de águas frias e termicamente estáveis, adquiriram durante suas histórias evolutivas, adaptações para evitar os possíveis danos gerados pelas baixas temperaturas (Crossley, 1995; Jin & DeVries, 2006). Dentre elas podemos citar a estenotermia (Somero *et al.*, 1996; Van Dijk *et al.*, 1999; Brodte *et al.*, 2008), a escassez de hemoglobina, ou até a ausência em algumas espécies (di Prisco, *et al.*, 2007), a

compensação cardiovascular (O'Brien & Sidell, 2000), a presença de glicoproteínas com propriedades anticongelantes (AFGPs - *Anti Freeze Glico Proteins*) (Chen *et al.*, 1997; Harding *et al.*, 2003; Jin e Devries, 2006), e a alta concentração de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) (Bottino *et al.*, 1967; Gieseg *et al.*, 2000; Brodte *et al.*, 2008; Crockett, 2011).

Peixes antárticos são espécies adaptadas ou especializadas ao frio (Hochachka & Somero, 1968; Wilson *et al.*, 2002; Johnston, 2003). A evidente compensação metabólica quanto às baixas temperaturas, em peixes antárticos, é observada na eficiência enzimática, com valores reduzidos da constante de Michaelis-Menten (K_m^1) e elevada atividade catalítica (k_{cat}^2) (Clarke, 2003; Somero, 2004) além do enriquecido conteúdo enzimático mitocondrial (Londrville & Sidell, 1990; O'brien & Sidell, 2000). Este último possibilita a produção de moléculas armazenadoras de energia química em consonância com as exigências e demandas metabólicas teciduais (Rodrigues *et al.*, 2011).

Pouco se sabe sobre a capacidade de regulação a temperaturas mais quentes dos animais ectotérmicos antárticos, dentre eles os peixes (Podabsky & Somero, 2006). Geralmente as espécies possuem estreitas zonas de tolerância térmica. Isso inclui a fauna de peixes da subordem Notothenioidei, os quais são considerados como exemplos de estenotermia dentre os animais ectotérmicos (Somero & DeVries, 1967; Macdonald *et al.*, 1987; Petricorena & Somero, 2007).

Poucos estudos focando a fisiologia natural sob estresse térmico a temperaturas elevadas têm sido realizados em organismos antárticos. Somero & DeVries (1967), analisando três espécies de peixes antárticos (*Trematomus bernacchii*, *Pagothenia borchgrevinki* e *Trematomus hansonii*) apontaram que temperaturas próximas a 5°C e 6°C são letais para espécimes da família Nototheniidae. Nesta faixa de temperatura, outros estudos foram realizados, onde *T. bernacchii* sobreviveu durante três semanas e *Pagothenia borchgrevinki* durante 16 semanas a 4°C e *Pachycara brachycephalum* resistiu por 16 semanas a 6°C.

A tolerância térmica em peixes difere entre espécies, temperatura e tempo de exposição ao agente estressor (Das *et al.*, 2004). A variação térmica age como uma pressão ambiental capaz de provocar estresse e em determinados organismos, pode ser superada através da capacidade adaptativa ao promover ajustes comportamentais e fisiológicos (Bilyk & Devries, 2011). Organismos ectotérmicos aclimatados a diferentes temperaturas geralmente apresentam menor sensibilidade térmica. Isso sugere a presença de mecanismos de regulação quando aumentado o estresse térmico (Somero, 2004).

¹ K_m é a constante de Michaelis-Menten e fornece um parâmetro de especificidade, Crockett (2011). Quanto menor o K_m , maior a especificidade enzima-substrato.

² O k_{cat} de uma enzima é uma constante da taxa catalítica e indica sua eficiência metabólica representando o valor máximo de reações enzimáticas catalisadas segundo Nelson & Cox (2008).

Podrabsky & Somero (2006), trabalhando com dois notothenídeos antárticos (*T. bernacchii* e *T. pennellii*) constataram que após aclimação a 4°C ocorreu um aumento na tolerância térmica. Peixes aclimatados suportaram até 14°C, a qual seria letal para indivíduos mantidos à temperatura do ambiente. O estudo similar realizado por Bilyk & Devries (2011) com outras espécies antárticas legitima tal afirmação.

O estresse térmico a altas temperaturas foi avaliado no peixe antártico *P. brachycephalum*, sendo que a temperatura foi elevada em 1°C a cada 24 h. Ao atingir 10°C, os indivíduos perderam o equilíbrio, suportando 10 horas nesta temperatura (Van Dijk *et al.*, 1999). Ao ultrapassar o limiar crítico de temperatura (9°C), os autores observaram o acúmulo de produtos finais de vias anaeróbicas nos tecidos musculares (lactato) e hepáticos (succinato). Lowe & Davison (2005) observaram que o aumento da temperatura (entre 0°C e 6°C) gerou um aumento na velocidade de consumo de oxigênio e uma redução na glicemia e na osmolaridade sanguínea nos peixes antárticos *P. borchgrevinki* e *T. bernacchii* mantidos sob estresse térmico (6°C). Por outro lado, o consumo pós-exercício de oxigênio em *P. borchgrevinki* diminuiu quando a temperatura esteve entre 3°C a 6°C, indicando que a disponibilidade de oxigênio é um fator limitante no comportamento aeróbio em temperaturas elevadas.

2.3 ACETILCOLINESTERASE (ACHE)

A enzima acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) é foco deste estudo devido ao seu papel fundamental na função neural e pela sua força catalítica acentuada (Hochachka, 1974; Malany *et al.*, 1999). O papel da AChE é catalisar a hidrólise da acetilcolina (ACh), a qual é transformada em colina e acetato com a liberação de um próton (Stepánková & Komers, 2004; Silman & Sussman, 2005; Dvir *et al.*, 2010) segundo a reação abaixo:

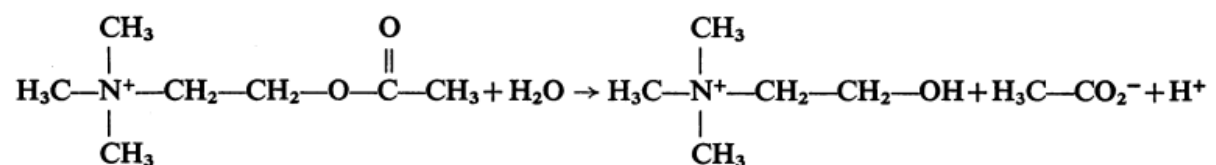


FIGURA 3 – Reação de hidrólise da acetilcolina. Fonte: Hochachka (1974).

Atualmente são conhecidos dois tipos de colinesterases, as que possuem uma elevada afinidade para a ACh, e aquelas com afinidade para butirilcolina (BCh, EC 3.1.1.8), também conhecidas como pseudocolinesterase (Van der Oost *et al.*, 2003). AChE e a butirilcolinesterase (BChE) são reguladas separadamente e podem diferir em suas respostas ao ambiente e a fatores biológicos. A AChE é essencial para a neurotransmissão colinérgica, entretanto o papel fisiológico da BChE permanece obscuro (Sturm *et al.*, 1999). O encéfalo contém exclusivamente AChE na maioria dos teleósteos (Kozlovskaya *et al.*, 1993), e o músculo pode conter exclusivamente AChE, em muitos teleósteos de água doce, ou ambos, AChE e BChE, na maioria das espécies marinhas (Leibel, 1988; Sturm *et al.*, 1999; de la Torre *et al.*, 2002; Štěpánková & Komers, 2008).

Na transmissão sináptica colinérgica é essencial que a ACh seja degradada rapidamente antes da chegada de um novo impulso elétrico, sendo tal reação mediada pela AChE (Stenesh, 1998; Matozzo *et al.*, 2005). A inibição da atividade da AChE resulta em um acúmulo de ACh, causando potenciais excitatórios pós-sinápticos prolongados. Isso faz com que ocorram disparos descontrolados de impulsos neuronais, promovendo uma hiperestimulação dos nervos, fibras dos músculos e, por fim, paralisia e morte eventual (Chebbi & David, 2009; Xuereb *et al.*, 2009, Pretto *et al.*, 2010). O comportamento dos peixes está muito relacionado com a atividade da AChE nos tecidos (Scott & Sloman, 2004; Durieux *et al.*, 2011), assim, a detecção da inibição da enzima é também reconhecido com sinal de deficiência comportamental, que pode, por sua vez, reduzir a sobrevivência (Baldwin *et al.*, 2009). Na literatura há a comprovação de várias substâncias que alteram a atividade da AChE, como os organofosforados (Kopecka *et al.*, 2004; Chebbi & David, 2009) e os compostos carbamatos (liberados no ambiente após o uso como pesticidas) (Kopecka *et al.*, 2004).

Basicamente, a atividade das ChEs difere tanto inter quanto intra especificamente (Habig & Di Giulio, 1991). As fontes potenciais de variação dentro de espécies incluem diferenças de idade, sexo, e tamanho dos peixes, bem como fatores ambientais, como a temperatura da água (Beauvais *et al.*, 2001). Vários estudos foram feitos sobre a influência do estresse térmico na atividade enzimática da AChE no sistema nervoso dos peixes, mas muitas vezes acabam indicando resultados inconsistentes (Oliveira *et al.*, 2007; Durieux *et al.*, 2011). Tal inconsistência é vista pela ampla variação dos resultados encontrados pelos autores. Hogan (1970) realizou um experimento de campo no peixe de água doce, *Lepomis macrochirus*, que revelou forte variação da atividade da AChE cerebral, a qual estava positivamente ligada à temperatura da água. Do mesmo modo, mais recentemente, Durieux *et al.* (2011), com o peixe *Morone saxatilis*, constatou a mesma correlação. Por outro lado, Beauvais *et al.* (2001) e Phillips *et al.* (2002), não identificaram nenhuma variação na

atividade de AChE cerebral nos peixes de água doce submetidos em diferentes temperaturas de água.

Em peixes antárticos, a AChE foi estudada visando determinar as relações de afinidade entre enzima – substrato, para isso, o tecido encefálico de diferentes espécies foi exposto a diferentes ambientes térmicos. Observou-se que o K_m da ACh para AChE no peixe *Pagothenia borchgrevinki* aumenta rapidamente com a elevação da temperatura, e a 5°C seu valor é superior aos encontrados para peixes de clima temperado e tropical em suas temperaturas corporais normais (Baldwin, 1971). Em duas espécies de peixes antárticos, *Notothenia gibberifrons* e *Pseudochaenichthys georgianus*, foi estudado o efeito da temperatura na atividade da AChE, sendo tal atividade maior a 18°C e 37°C nas duas espécies respectivamente (Niemierko *et al.*, 1977).

Não há registro na literatura sobre estudos de peixes antárticos, que analisem a atividade da enzima AChE quando o organismo é exposto ao estresse térmico.

2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS) são substâncias eletricamente instáveis, potencialmente reativas com moléculas biológicas e são capazes de causar oxidação e danos irreversíveis às células. Um radical livre é definido como qualquer átomo ou moléculas com um elétron não pareado ocupando uma órbita externa (Abele & Putarulo, 2004). O ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$) e o óxido nítrico (NO^{\bullet}) são exemplos de radicais livres. Entretanto, existem compostos igualmente reativos, mas que não possuem elétron não pareado na última camada, não sendo classificados como radicais livres. São, portanto classificados de uma forma mais ampla, como espécies reativas de oxigênio, que incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Halliwell & Gutteridge 2000). Os radicais livres ou ROS são produzidos em vários compartimentos celulares (mitocôndria, microsomas, peroxissomos e citosol) e são originados por mecanismos enzimáticos como a xantina oxidase (XO), NADPH oxidase, sistema P-450 e por mecanismos não enzimáticos, envolvendo hemoproteínas e compostos de ferro (Dröge, 2002). A produção normal de espécies reativas no metabolismo celular é proveniente da geração oxidativa de energia pela cadeia mitocondrial, do mecanismo de defesa dos fagócitos que produzem radical superóxido para causar morte em microorganismos, dentre outros mecanismos (Shiloh, 1999). Durante a degradação de xenobióticos pelo citocromo P450, pode ocorrer a formação do ânion superóxido que ao ser dismutado pela enzima superóxido dismutase (SOD), gera peróxido de hidrogênio, que por sua vez, na presença de

metais de transição pode gerar o radical hidroxila e este reagir inespecificamente com constituintes celulares (Lionel & Marta 2003).

O desequilíbrio entre a produção excessiva de ROS/ radicais livres e a deficiência de sua remoção pelos sistemas antioxidantes é denominado de estresse oxidativo (Dröge, 2002). As principais consequências ao estresse oxidativo em sistemas biológicos são a lipoperoxidação da membrana nuclear, a oxidação de proteínas e a lesão DNA/RNA celular (Parihar, 1996).

Todos os componentes celulares são suscetíveis ao ataque de ROS, especialmente por $\cdot\text{OH}$. Ataques ocorridos em proteínas podem conduzir a modificações de aminoácidos, oxidação de grupos sulfidríla (gerando alterações conformacionais), atividade enzimática alterada, mudanças na clivagem da ligação peptídica, bem como perda de metal em metaloproteínas e aumento na suscetibilidade proteolítica (Vasconcelos *et al.*, 2007). Os danos mais graves relacionados às ROS são aqueles causados ao DNA e RNA, pois quando a cadeia do DNA é quebrada, pode ser reconectada em outra posição alterando, assim, a ordem de suas bases (Barreiros *et al.* 2006). Ainda, a cisão do anel desoxirribose dos ácidos nucleicos, pelos radicais livres, promove mutações e inibição da síntese proteica (Oliveira 1999). As espécies reativas de oxigênio produzidas pelo sistema biológico são desintoxicadas por mecanismos de defesa antioxidante que são encontrados em todas as espécies de animais e nos diferentes tipos de tecidos, inclusive nos organismos aquáticos (Avci *et al.* 2005).

No metabolismo celular, três níveis de proteção antioxidante são conhecidos - prevenção da formação de ROS, remoção de ROS utilizando enzimas antioxidantes e reparação de componentes celulares danificados (Storey, 1996). Enzimas envolvidas nas defesas antioxidantes formam um sistema coordenado e incluem a superóxido dismutase (SOD), que cataboliza radicais superóxido, a catalase (CAT) e a glutatona peroxidase (GPX) que degradam o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos respectivamente (Simmons & Jamall, 1988). Enzimas secundárias na defesa antioxidante incluem aquelas do metabolismo da glutatona. A glutatona S-transferase (GST) catalisa a conjugação de glutatona reduzida (GSH) com componentes celulares danificados por ataque ROS, levando a desintoxicação (Storey, 1996). Há ainda a proteção não enzimática, como peptídeos de histidina e proteínas ligadas ao ferro (Gutteridge, 1995). Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza aqueles provenientes da dieta como as vitamina C e E. A vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel com ação antioxidante e serve principalmente, para prevenir a formação de hidroperóxido de lipídios e proteger os lipídios das membranas celulares. O ascorbato atua juntamente com GSH para proteger a célula dos danos oxidativos (Nordberg & Arnér, 2001). Porém, quando em dose elevada ou na presença de metais (ferro ou cobre) a vitamina C pode agir como um pró-oxidante, levando

à lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 1999). A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel presente nas membranas biológicas. Ela contém um grupo hidroxila através do qual ela reage com elétrons desemparelhados, podendo assim, reduzir radicais peroxil (Nordberg & Arnér, 2001). Segundo Halliwell & Gutteridge (1999) a vitamina E é provavelmente, o mais importante inibidor da reação em cadeia da peroxidação de lipídios em animais. Os carotenoides destacam-se também como agentes antioxidantes, dentre os quais a pró-vitamina A (β -caroteno), sendo o carotenoide mais abundante e de maior atividade. Estudos recentes indicam uma possível atividade anti-cancerígena do β -caroteno, sendo usado como corante e antioxidante em alimentos (Barreiros & David, 2006).

2.5 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

O organismo obtém grande parte da energia que necessita através da fosforilação oxidativa mitocondrial, que gera ATP e reduz o oxigênio molecular em água. Em determinadas condições, espécies reativas de oxigênio (ROS), como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), podem ser gerados como subprodutos secundários deste processo (Rang *et al.*, 2003). O desequilíbrio entre a produção excessiva destas espécies e a deficiência de sua remoção pelos sistemas antioxidantes é denominado de estresse oxidativo (Dröge, 2002). Assim, inicia-se o ataque a muitas moléculas importantes, dentre elas os lipídios de membrana. A reação de espécies reativas de oxigênio com ácidos graxos poliinsaturados presentes nas membranas celulares e nas lipoproteínas, dá início a uma cascata de eventos conhecida como lipoperoxidação, indicadora do estresse oxidativo. Possíveis danos às membranas geram transtornos na permeabilidade seletiva, alterando o fluxo iônico e de outras substâncias (Lima *et al.*, 2001).

Organismos ectotérmicos, incluindo peixes, muitas vezes são submetidos a variações térmicas no meio em que vivem. Tais alterações influenciam na taxa metabólica e no consumo de oxigênio, que são proporcionais a temperatura ambiente (Hochachka & Somero, 1984; Eastman, 1993). Como a geração de ROS e de radicais livres está relacionada com o consumo de oxigênio (Halliwell & Gutteridge, 1999), espera-se que ocorra uma maior produção destes elementos de acordo com o aumento da temperatura, e, portanto uma resposta por parte das defesas antioxidantes (Bagnyukova *et al.*, 2007). A elevação dos níveis de peroxidação lipídica tem sido relatada em muitos estudos após exposição de peixes tropicais e subtropicais ao estresse térmico (Parihar & Dubey, 1995; Lushchak & Bagnyukova, 2006; Bagnyukova *et al.*, 2007; An *et al.*, 2010).

Basicamente, a LPO consiste na incorporação de oxigênio molecular a um AGPI para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. O processo da LPO pode ser dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Figura 4). A primeira fase representa o início da peroxidação, em que o AGPI (LH) sofre ataque de algumas espécies reativas que abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno, tal sequestro pode ser realizado pelo OH^\bullet ou pelo LO^\bullet (radical alcóxila), com conseqüente formação do L^\bullet (radical lipídico) (Gutteridge, 1995). Na primeira equação de propagação, o L^\bullet reage rapidamente com o O_2 em meio aeróbio, resultando em LOO^\bullet (radical peróxila) que propagam a cadeia de peroxidação. A reação do radical peróxila com um novo átomo de hidrogênio abstraído gera um hidroperóxido lipídico (LOOH), formando novamente o L^\bullet na segunda equação de propagação (Lima *et al.*, 2001). Íons de metais de transição, como Fe^{nt} e Cu^{nt} , podem participar do processo catalisando a formação de radicais lipídicos alcóxila (LO^\bullet), peróxila (LOO^\bullet) e hidroxila a partir dos hidroperóxidos. Os principais produtos finais da lipoxidação compreendem álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos derivados da decomposição de hidroperóxidos (Halliwell & Gutteridge, 1999).

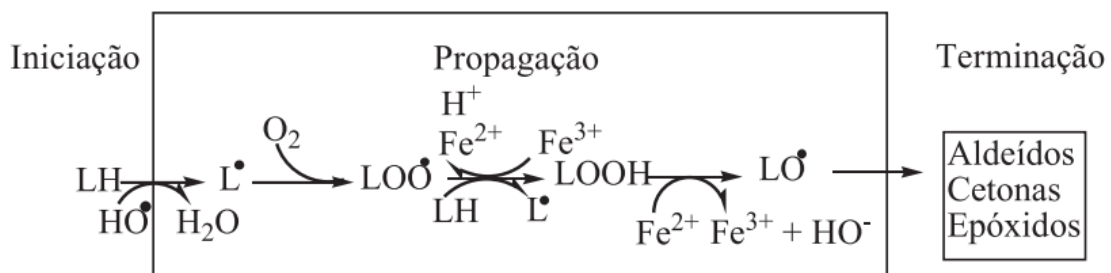


FIGURA 4 – Representação esquemática das fases da peroxidação lipídica. Fonte: Santos & Batista (2007).

Peixes antárticos são mais susceptíveis a danos oxidativos, particularmente a peroxidação lipídica, pois possuem grandes quantidades de lipídios intracelulares e membranas biológicas enriquecidas em AGPI (Crockett, 2011). Em *Pleuragramma antarcticum* a LPO foi estudada para caracterizar o sistema antioxidante e a capacidade de resposta para o aumento natural das condições pró-oxidativas no início da primavera (Regoli *et al.*, 2005a). Defesas antioxidantes, como a catalase, glutathione redutase, glutathione peroxidase e glutathione-S-transferase, foram rapidamente observadas, contudo não impediram o aumento nos níveis de peroxidação lipídica (Regoli *et al.*, 2005a). Já Devor *et al.* (2011) testaram se temperaturas elevadas aumentam a LPO em maior escala nos peixes

antárticos sem hemoglobina (*icefishes*) do que em notothenídeos, peixes antárticos com hemoglobina. Corações de ambas as espécies de *icefishes* (*Chaenocephalus aceratus* e *Chionodraco rastrospinosus*) bem como as espécies de sangue vermelho com o menor hematócrito (*Lepidonotothen kempii*) apresentaram 1,3 vezes mais produtos de lipoperoxidação quando submetidos ao estresse térmico em relação aos animais controles. O coração de *N. coriiceps*, e os outros órgãos de todas as espécies, não mostraram aumento nos produtos de lipoperoxidação quando expostos a suas temperaturas máximas. Estes dados indicam que os danos da LPO contribuem para os limites de tolerância térmica em *icefishes* e *L. kempii*.

2.6 GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)

A biotransformação possui diversos sistemas enzimáticos que atuam em inúmeros tipos de substratos, grande parte dessas enzimas têm em comum a função de converter substâncias tóxicas em menos tóxicas e compostos químicos lipofílicos em hidrofílicos, de modo a facilitar sua excreção (Nimmo, 1987). O processo de biotransformação é dividido em duas etapas, as reações de fase I e II, que frequentemente ocorrem sequencialmente. As primeiras são reações catabólicas (oxidação, redução, hidrólise). A fase II consiste em reações anabólicas que envolvem a conjugação de alguns grupos de moléculas resultando em compostos inativos na maioria dos casos (Marionnet *et al.*, 2006).

A glutationa-S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) representa uma importante família de isoenzimas presentes principalmente no citosol e essenciais na proteção contra danos de compostos potencialmente reativos. Esta família é formada por proteínas solúveis compostas por duas subunidades com massas moleculares de 22-27 kDa e classificadas em várias classes (alpha, mu, pi, theta, sigma, kappa, zeta e omega) de acordo com sua estrutura primária, imunológica e propriedades cinéticas (Myrnes & Nilsen, 2007). O papel da GST é de catalisar a conjugação do átomo de enxofre presente na glutationa reduzida (GSH), com grande variedade de compostos endógenos e exógenos, como componentes celulares danificados pelo ataque de ROS, para posteriormente serem eliminados do organismo (Storey, 1996; Sen & Kirikbakan, 2004; Rudneva *et al.*, 2010) (Figura 5). Essa conjugação gera produtos menos reativos e mais fáceis de serem excretados (Falkner & Clark, 1992; Angelucci *et al.*, 2000). Dentre os sistemas de desintoxicação a GST desempenha papéis críticos na proteção contra produtos do estresse oxidativo (Hayes & Pulford, 1995). Desenvolve um papel importante na desintoxicação de peróxidos lipídicos que juntamente com outras enzimas antioxidantes, protegem os organismos de danos

peroxidativos (Storey, 1996). Portanto, sua ação tem um importante papel na proteção contra o estresse oxidativo, auxiliando na manutenção da homeostase.

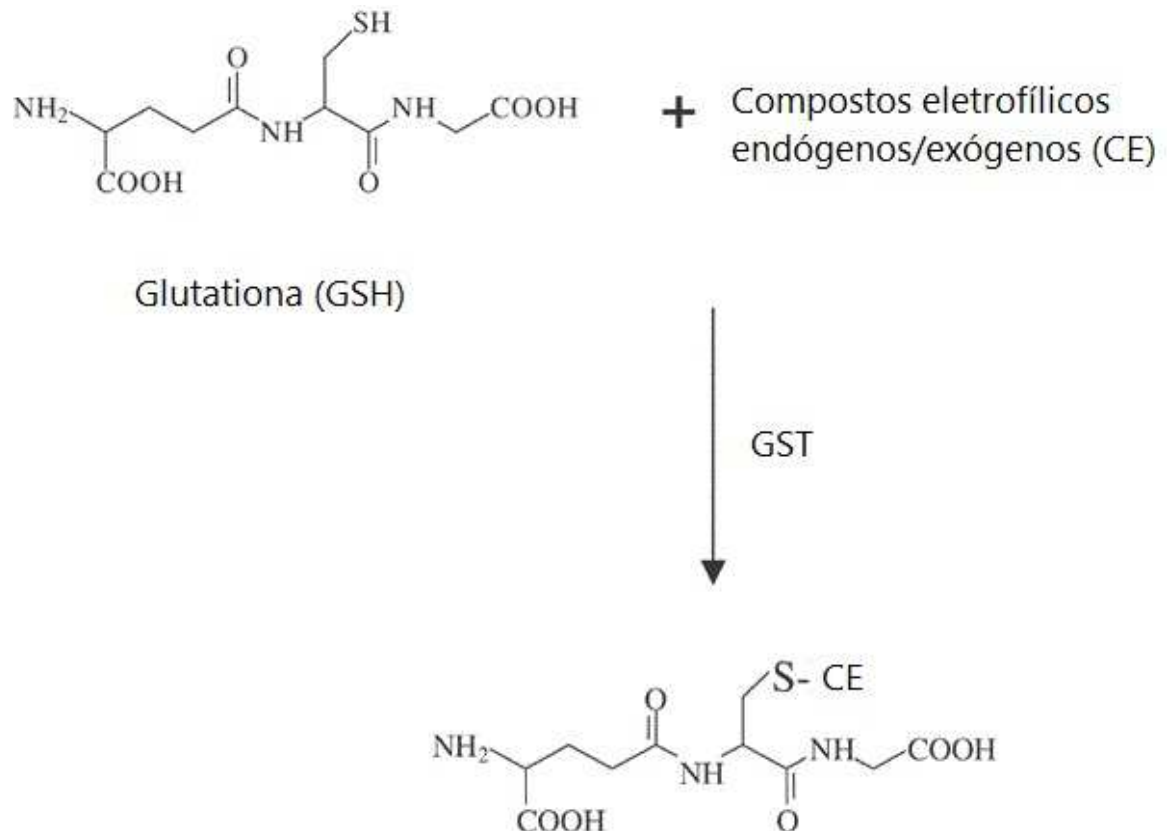


FIGURA 5 – Conjunção da Glutathiona com um composto eletrofilico endógeno ou exógeno (CE) através da GST. Fonte: Modificado de Townsend & Tew (2003).

Estudos sobre efeitos da temperatura na atividade da GST são vistos em bivalves (Park *et al.*, 2008), onde o organismo submetido ao estresse térmico sofre grande aumento na atividade da GST. Em copépodes (Cailleaud *et al.*, 2007), os efeitos de variações térmicas que ocorrem naturalmente em ecossistemas foram avaliados, sendo que os resultados indicaram uma pequena alteração na produção da GST. Contudo tais estudos em peixes permanecem escassos, como exemplo, temos o trabalho de Bagnyukova *et al.*

(2007) que relata o aumento da atividade enzimática no encéfalo do peixe de água doce *Carassius auratus* submetidos a elevadas temperaturas. Utilizando a mesma espécie, envolvendo estresse térmico, Lushchak & Bagnyukova (2006) não identificaram nenhuma alteração na atividade da GST encefálica.

Em dois peixes antárticos, *Dissostichus mawsoni* e *Pagothenia borchgrevinki*, a atividade da GST foi medida em amostras de fígado com o objetivo de purificar e caracterizar as enzimas (Falkner & Clark, 1992). As duas espécies apresentaram uma atividade enzimática significativa quando utilizado 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. Isoenzimas múltiplas foram identificadas em *D.mawsoni*, indicando que a GST tem um papel essencial nestes organismos.

Já a fim de estender o conhecimento do sistema de metabolização de xenobióticos por *T. bernacchii* e melhorar sua utilização como biomarcador no ecossistema antártico, Regoli *et al.* (2005) e Di Bello *et al.* (2007) investigaram dentre outros, a atividade da GST. No primeiro estudo, a exposição ao cádmio revelou respostas contraditórias do metabolismo da glutatona, no entanto, tais respostas não impediram a perda da capacidade antioxidante a radicais peroxila. No segundo, os resultados demonstraram uma expressão hepática basal da GST, indicando uma proteção celular contra intermediários eletrofílicos.

Não há registro na literatura que avaliem a atividade da enzima GST em peixes antárticos submetidos ao estresse térmico.

Para a escolha dos parâmetros bioquímicos analisados neste trabalho levou-se em consideração a importância das enzimas no metabolismo celular, as quais são essenciais nos mecanismos de regulação celular bem como o papel significativo da LPO, um indicador bastante utilizado nos estudos que visam análises de possíveis danos às membranas celulares. Ainda, foram consideradas as condições de refrigeração, armazenamento e transporte (Antártica-Brasil) do material a ser analisado.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar parâmetros bioquímicos nos peixes antárticos *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) em condição de estresse térmico de altas temperaturas, garantindo dados para biomonitoramentos futuros.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o estresse oxidativo através de análises da GST e LPO encefálica dos peixes antárticos *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii* submetidos ao estresse térmico de altas temperaturas.
- ✓ Avaliar a atividade da AChE encefálica e muscular no peixe antártico *Notothenia coriiceps* sob estresse térmico de altas temperaturas.
- ✓ Avaliar a atividade da AChE encefálica no peixe antártico *Notothenia rossii* sob estresse térmico de altas temperaturas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO

Este trabalho foi desenvolvido na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), localizada na Ilha Rei George, no Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica (Figura 6 a, b). As Ilhas Shetlands do Sul formam um arquipélago de 64 ilhas, localizados a oeste da Península Antártica. A Ilha Rei George, a maior deste arquipélago, tem aproximadamente 1300 km² de área, 90% da qual coberta de gelo o ano todo. A Baía do Almirantado, localizada nesta ilha, é a maior baía do local, com 122,08 km² de área de superfície (Rakusa-Suszczewski, 1980 *apud* Cardoso, 2005).

Espécimes de *N. coriiceps* e *N. rossi* foram coletados em dois pontos na Baía do Almirantado, Punta Plaza (PP) (62°05' 64,5" S; 58° 24' 31.7" W) e Arctowski (AR) (62°10', 65" S; 58° 26',5 W) de março a novembro durante os anos de 2009 e 2010 (Figura 6c).

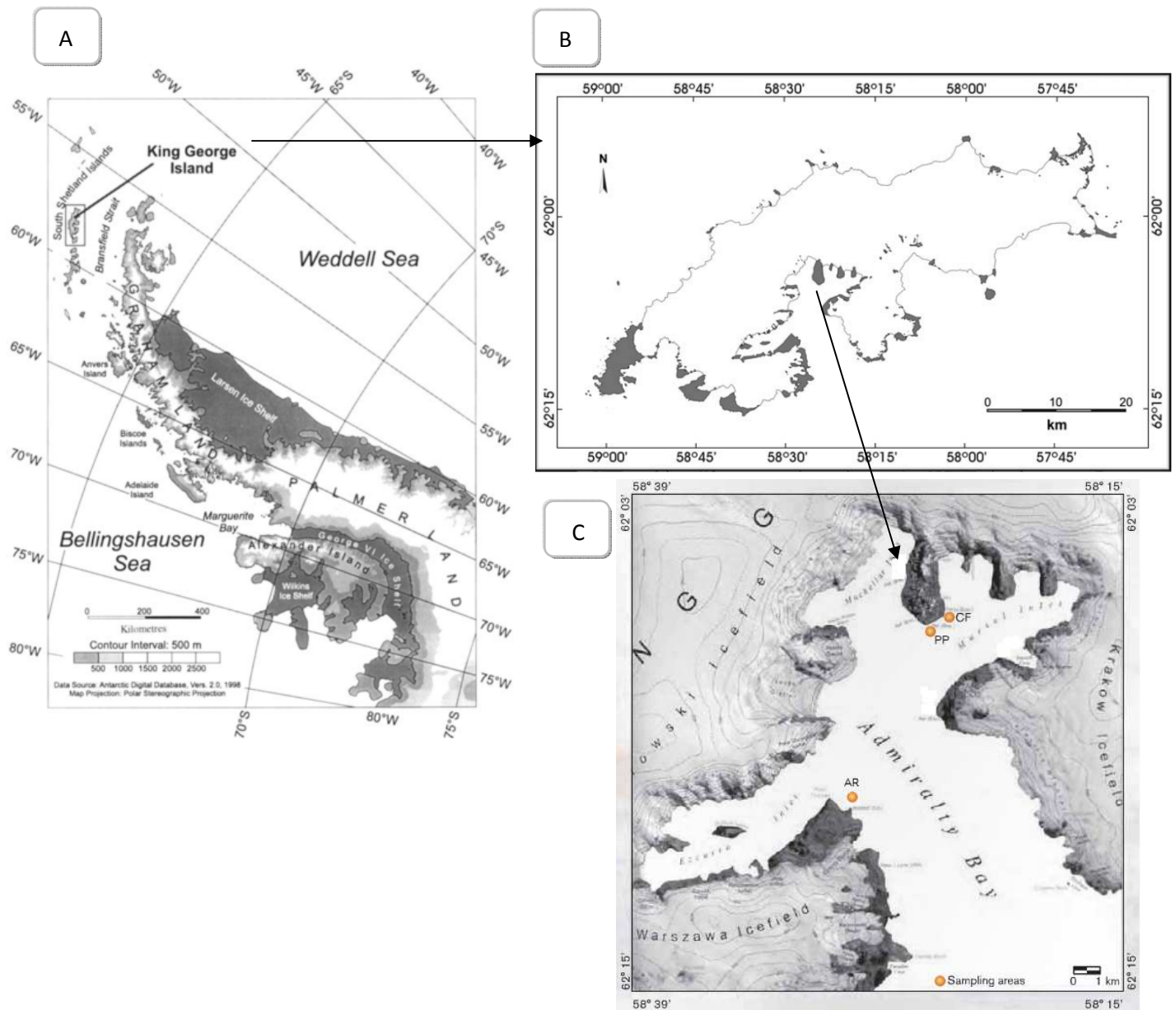


FIGURA 6 – Mapas do Continente Antártico. (A) Península Antártica e ilhas sub-antárticas (B) Ilha Rei George. Fonte: Simões *et al.* (2004); Braun *et al.* (2001). (C) Mapa da Baía do Almirantado indicando os locais de coleta. Os espécimes foram coletados em Punta Plaza (PP) e em Arctowski (AR). A EACF está representada no mapa como CF. Fonte: Adaptado de Braun *et al.* (2001).

A coleta foi realizada com linha e anzol em uma profundidade de 10 a 25 metros, com o auxílio de botes pneumáticos do tipo “Zodiac” ou com a lancha oceanográfica “Skua” (figura 7).

Os grupos de peixes foram aclimatados em tanques de fibra de vidro (capacidade de 1000 l) na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) durante 5 dias em salinidade de 35

$\pm 1,0$ psu, temperatura de $0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. A água do mar captada a uma profundidade de 4 metros, em frente à EACF, foi bombeada até os tanques e renovada 50% a cada 48 horas.

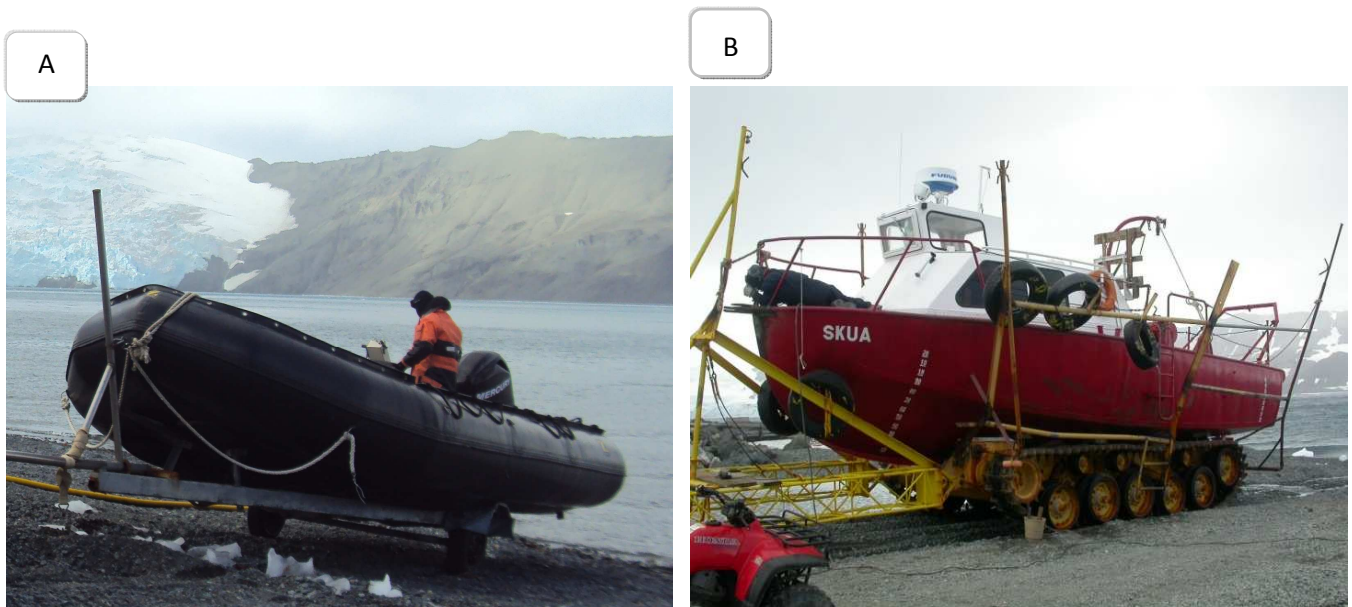


FIGURA 7 – Meios de coleta utilizados na captura dos animais (A) botes pneumáticos do tipo “zodiac” e (B) lancha de apoio oceanográfico “Skua”. Fonte: (1,2) O autor (2011).

A alimentação oferecida foi a base de músculo de peixes antárticos, a cada dois dias (48 horas) na quantidade correspondente a 1% da massa corpórea. Animais que não se alimentaram após 72 horas foram descartados.

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Repetições com grupos de cinco peixes foram colocados em tanques de 1000 l contendo água a temperaturas de 0, 4 e 8°C , controladas por termostatos Aquaterm 08 (Full Cage), não havendo uma aclimatação progressiva, mas sim um choque térmico (Figura 8). Foram realizados 20 experimentos, cada um com 7 peixes em média. Os indivíduos da espécie *N. rossi* foram mantidos nas condições térmicas (0, 4 e 8°C) durante 1, 4, 15 e 30 dias (Figura 9). Os exemplares de *N. coriiceps*, permaneceram durante 1, 4, 15 e 30 dias em 0 e 4°C . Não foram realizados experimentos de 15 e 30 dias a 8°C com *N. coriiceps* pois esta espécie morre no sexto dia de experimento nesta temperatura. Para facilitar as

análises, não constam neste trabalho, dados de *N. coriiceps* mantidos a 8°C durante 1 e 4 dias.



FIGURA 8 – Módulo de tanques da EACF. (A) Sala climatizada contendo os seis tanques experimentais e (B) exemplares de *N. rossii*. Fonte: (a) Krebsbach (2009) e (b) Rodrigues Junior.

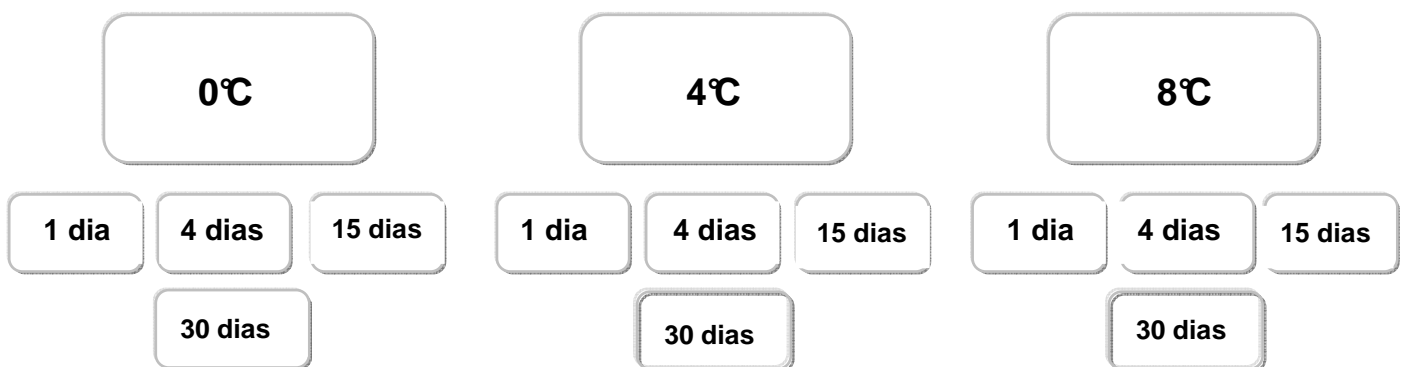


FIGURA 9 – Fluxograma dos experimentos envolvendo *N. rossii* indicando as temperaturas (0°C, 4°C e 8°C) e tempos testados (1, 4, 15 e 30 dias). Em *N. coriiceps* o experimento ocorreu somente nas temperaturas 0°C e 4°C. Fonte: O autor (2012).

Após o término de cada experimento os animais foram anestesiados com benzocaína (1%) e eutanasiados via secção medular. Para cada exemplar, foram coletadas amostras de músculo e encéfalo as quais permaneceram congeladas em freezer -33°C até o momento da análise. No caso de *N. rossii*, amostras de músculo coletados não foram suficientes para o processamento da AChE muscular.

As licenças ambientais foram concedidas pelo Grupo de Assessoramento Ambiental (GAAM) do Ministério do Meio Ambiente (MMA) e o Código de Conduta do Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (Scientific Committee on Antarctic Research - SCAR) foi utilizado na manipulação e sacrifício dos animais. Esta pesquisa está registrada no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o nº 496.

4. 3 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As amostras de músculo e encéfalo foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 0,1 M com pH 7,5 conforme Strum *et al.* (1999) e, em seguida centrifugadas a 12.000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante do músculo foi utilizado para realizar a análise de AChE em *N. coriiceps*, enquanto o do encéfalo para as análises de AChE, GST e LPO em ambas as espécies. Todos os ensaios bioquímicos foram feitos em triplicata e as amostras permaneceram em gelo moído.

4.3.1 CONCENTRAÇÃO PROTÉICA

A quantificação proteica (proteína total) foi realizada visando padronizar os valores de proteína de cada amostra. Possíveis alterações verificadas nos níveis de LPO, GST ou AChE não serão oriundas da concentração proteica desigual existente no tecido. Para isso, foi utilizado o método de Bradford (1976), adaptado por Silva de Assis (1998), onde as amostras foram pipetadas em microplacas e, em seguida, foi adicionado o reagente de Bradford diluído (Bio Rad®). A absorbância das amostras foi verificada a 650 nm e os valores finais da quantificação colorimétrica foram obtidos em mg de proteína por ml de amostra, utilizando-se uma curva padrão pré-estabelecida com diferentes concentrações conhecidas de soro de albumina bovina (BSA).

4.3.2 ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

A atividade da AChE foi medida de acordo com Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). O princípio desta técnica consiste em expor o tecido homogeneizado e o reagente de cor DTNB-5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) ao substrato acetilcolina. Este substrato é hidrolisado pela AChE em tiocolina e acetato. A tiocolina resultante reage com o DTNB gerando o ânion 5-Tio-2-nitrobenzoato, responsável pelo aparecimento da coloração amarelada, a qual é medida em espectrofotômetro a 415 nm. Na microplaca foi adicionado 20 µL de sobrenadante contendo 1 mg de proteína por ml, 130 µL de DTNB 0,75 mM e 50 µL de iodeto de acetilcolina 9 mM sobre cada alíquota.

A atividade da AChE foi calculada pela variação da absorbância de cada amostra (Δ Abs) e a média da absorbância foi utilizada para o cálculo da atividade da AChE, sendo o resultado expresso em nmoles/min/mg de proteína.

4.3.3 ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

A atividade da GST foi medida de acordo com o método descrito por Keen *et al.* (1976). A GST catalisa a reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutatona (GSH), formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância a 340 nm. A atividade foi expressa em nmoles/min/mg proteína.

4.3.4 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Os níveis de LPO foram determinados pelo ensaio FOX (*Ferrous Oxidation-Xylenol Orange*) como descrito por Jiang *et al.* (1992). O método baseia-se na rápida oxidação do Fe^{2+} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{3+} laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 550-570 nm. As amostras, juntamente com a solução do meio de reação composta de xilenol Orange (100µM), ácido sulfúrico (25mM), hidroxitolueno butilado (BHT) (4 mM), sulfato ferroso amoniacal (250µM), e metanol 90%, foram misturadas, e após 20 minutos,

centrifugada novamente durante 10 minutos para serem pipetadas em microplaca e lidas a 560 nm. Os resultados foram expressos em nmoles/min/mg proteína.

4. 4 ANÁLISE DE DADOS

Foi utilizada uma análise de variância bi-fatorial (ANOVA bi-fatorial) para avaliar se havia diferença significativa na atividade das enzimas e nos níveis de LPO em relação as temperaturas, tempos de exposição e na interação temperatura e tempo de exposição. Se a interação for significativa, a temperatura afeta a atividade enzimática dependendo do tempo de exposição e/ou o tempo de exposição afeta a atividade enzimática dependendo da temperatura. Antes de realizar a ANOVA bi-fatorial, a heterogeneidade das variâncias foi avaliada com o teste de Levene e, caso significativo ($P < 0,05$), os dados foram log-transformados. Se algum fator foi significativo, as médias foram comparadas com o teste a posteriori de Tukey ($P < 0,05$).

Devido ao fato da espécie *N. coriiceps* ter sobrevivido somente até o sexto dia e de as amostras de músculo coletadas não serem suficientes para o processamento da AChE muscular no caso de *N. rossii*, as análises estatísticas foram feitas relacionando os órgãos e as temperaturas como descrito na tabela abaixo (Tabela 1):

TABELA 1 – Parâmetros bioquímicos, órgãos, temperaturas e tempos de exposição analisados em *N. coriiceps* e *N. rossii*. NC = *N. coriiceps*. NR = *N. rossii*, AChE = acetilcolinesterase, GST = Glutathione S-Transferase e LPO = lipoperoxidação. Fonte: O autor.

Espécie	Parâmetros bioquímicos	Órgão	Temperaturas (°C)	Tempos de exposição (dias)
NC	AChE	Encéfalo	0, 4	1, 4, 15, 30
NC	AChE	Músculo	0, 4	1, 4, 15, 30
NC	GST	Encéfalo	0, 4	1, 4, 15, 30
NC	LPO	Encéfalo	0, 4	1, 4, 15, 30
NR	AChE	Encéfalo	0, 4, 8	1, 4, 15, 30
NR	LPO	Encéfalo	0, 4, 8	1, 4, 15, 30
NR	GST	Encéfalo	0, 4, 8	1, 4, 15, 30

5 RESULTADOS

Nos experimentos realizados, observou-se que espécimes de *N. coriiceps* sobreviveram em todos os tempos de exposição (1, 4, 15 e 30 dias) nas temperaturas de 0°C e 4°C, enquanto que em 8°C os indivíduos desta espécie resistiram somente até o sexto dia de exposição ao estresse térmico. Já os espécimes de *N. rossi* sobreviveram em todos os tempos de exposição (1, 4, 15 e 30 dias) nas três temperaturas avaliadas (0°C, 4°C e 8°C).

O “n” amostral utilizado dependendo da análise e/ou da espécie pode ser visualizado nas Tabelas 2 e 3.

TABELA 2- n Amostral utilizado em cada análise de *Notothenia coriiceps* submetida em diferentes temperaturas (0°C, 4°C e 8°C) e tempos (1, 4, 15 e 30 dias). AChE = acetilcolinesterase, GST = Glutathione S-Transferase e LPO = lipoperoxidação. Fonte: O autor.

Ensaio	Dias de bioensaio											
	1			4			15			30		
	0°C	4°C	8°C	0°C	4°C	8°C	0°C	4°C	8°C	0°C	4°C	8°C
AChE Encéfalo	8	7	9	9	8	10	9	8	-	8	7	-
AChE Músculo	7	8	9	9	10	8	8	8	-	9	7	-
GST	8	6	8	8	8	7	7	7	-	7	5	-
LPO	7	9	9	9	9	10	9	10	-	10	7	-

TABELA 3 - n Amostral em cada análise de *Notothenia rossi* submetida em diferentes temperaturas (0°C, 4°C e 8°C) e tempos (1, 4, 15 e 30 dias). AChE = acetilcolinesterase, GST = Glutathione S-Transferase e LPO = lipoperoxidação. Fonte: O autor.

Ensaio	Dias de bioensaio											
	1			4			15			30		
	0°C	4°C	8°C	0°C	4°C	8°C	0°C	4°C	8°C	0°C	4°C	8°C
AChE Encéfalo	8	7	9	10	8	9	5	9	10	8	10	10
AChE Músculo	9	7	8	-	9	9	-	9	8	7	10	7
GST	8	8	7	8	7	7	7	8	7	9	10	8
LPO	8	6	9	9	8	9	7	9	7	6	9	10

5.1 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Notothenia coriiceps*

5.1.1 ACETILCOLINESTERASE (AChE)

Houve efeito da interação temperatura e tempo de exposição na atividade da AChE cerebral e muscular de *N. coriiceps*. A atividade da AChE diferiu no encéfalo no primeiro dia de exposição a 4°C e em 30 dias de exposição a 4°C no músculo (Figuras 10 e 11).

No encéfalo, observamos que a atividade enzimática se manteve estável nos tempos de exposição (4, 15 e 30 dias) quando comparamos 4°C com o controle, com exceção do primeiro dia, onde verificamos uma redução de 54% nesses níveis (Figura 10).

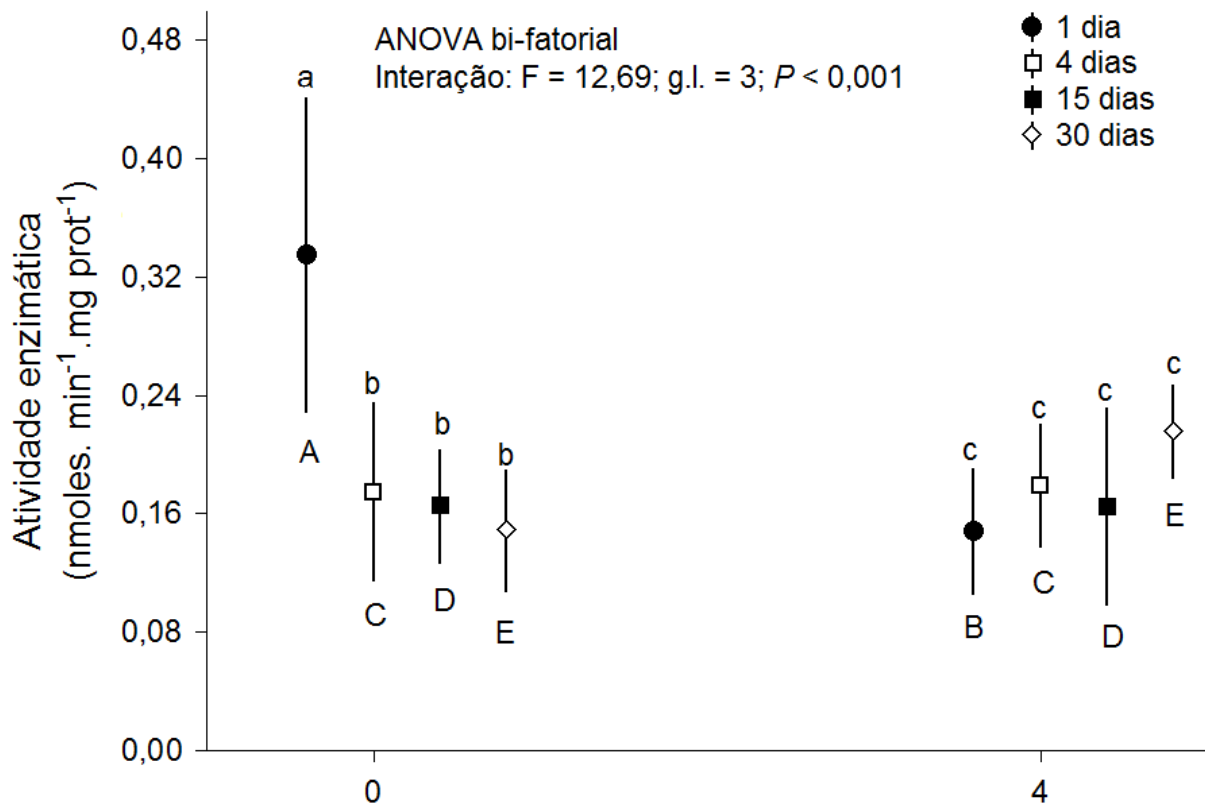


FIGURA 10 - Média \pm desvio padrão da atividade da enzima AChE do encéfalo de *N. coriiceps* submetidas a 0°C e 4°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Os resultados da ANOVA bi-fatorial estão mostrados no gráfico. Letras minúsculas comparam tempos de exposição em cada temperatura, e letras maiúsculas comparam temperaturas em cada tempo de exposição (teste de Tukey, $P < 0,05$).

Não houve mudança significativa na atividade da AChE no músculo de *N. coriiceps* nos distintos tempos de exposição a 0°C. A 4°C a atividade da AChE apresentou diferença

significativa, sendo 44% maior em 30 dias em relação ao primeiro dia de exposição (Figura 11). Quando comparamos 4°C com o controle, observa-se um aumento de 43% na atividade da AChE após 30 dias.

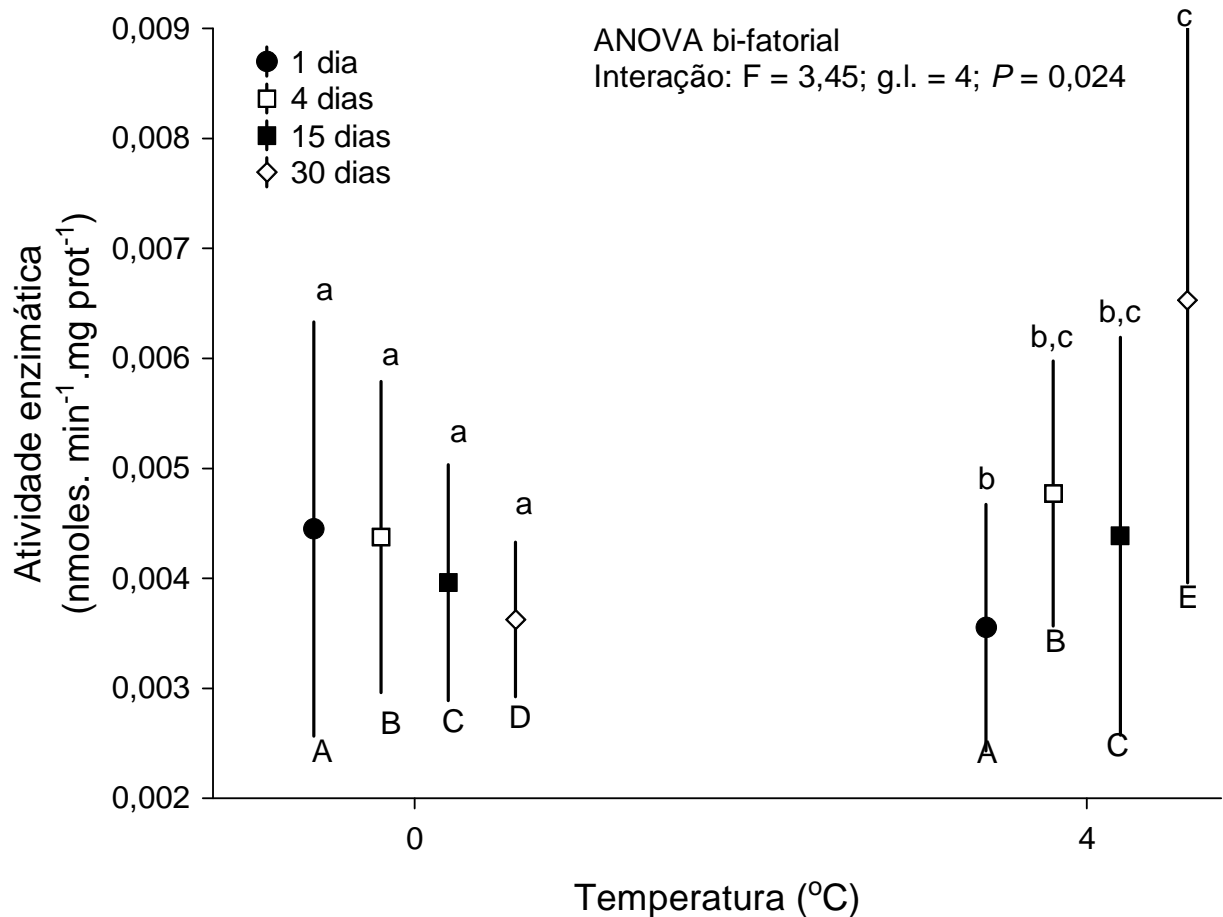


FIGURA 11 - Média \pm desvio padrão da atividade da enzima AChE do músculo de *N. coriiceps* submetidas a 0°C e 4°C nos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Os resultados da ANOVA bi-fatorial estão mostrados no gráfico. Letras minúsculas comparam tempos de exposição em cada temperatura, e letras maiúsculas comparam temperaturas em cada tempo de exposição (teste de Tukey, $P < 0,05$).

5.1.2 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

Houve efeito da interação temperatura e tempo de exposição na atividade da GST analisada em encéfalos de *N. coriiceps*. A atividade da GST em encéfalos de *N. coriiceps* foi significativamente maior (64% e 50%) a 0°C em 30 dias quando comparada com 1 e 4 dias de exposição respectivamente. Na temperatura de 4°C, a variação da atividade da GST

independe do tempo de exposição nas temperaturas testadas. Não houve diferença significativa na atividade enzimática entre o controle e 4°C (Figura 12).

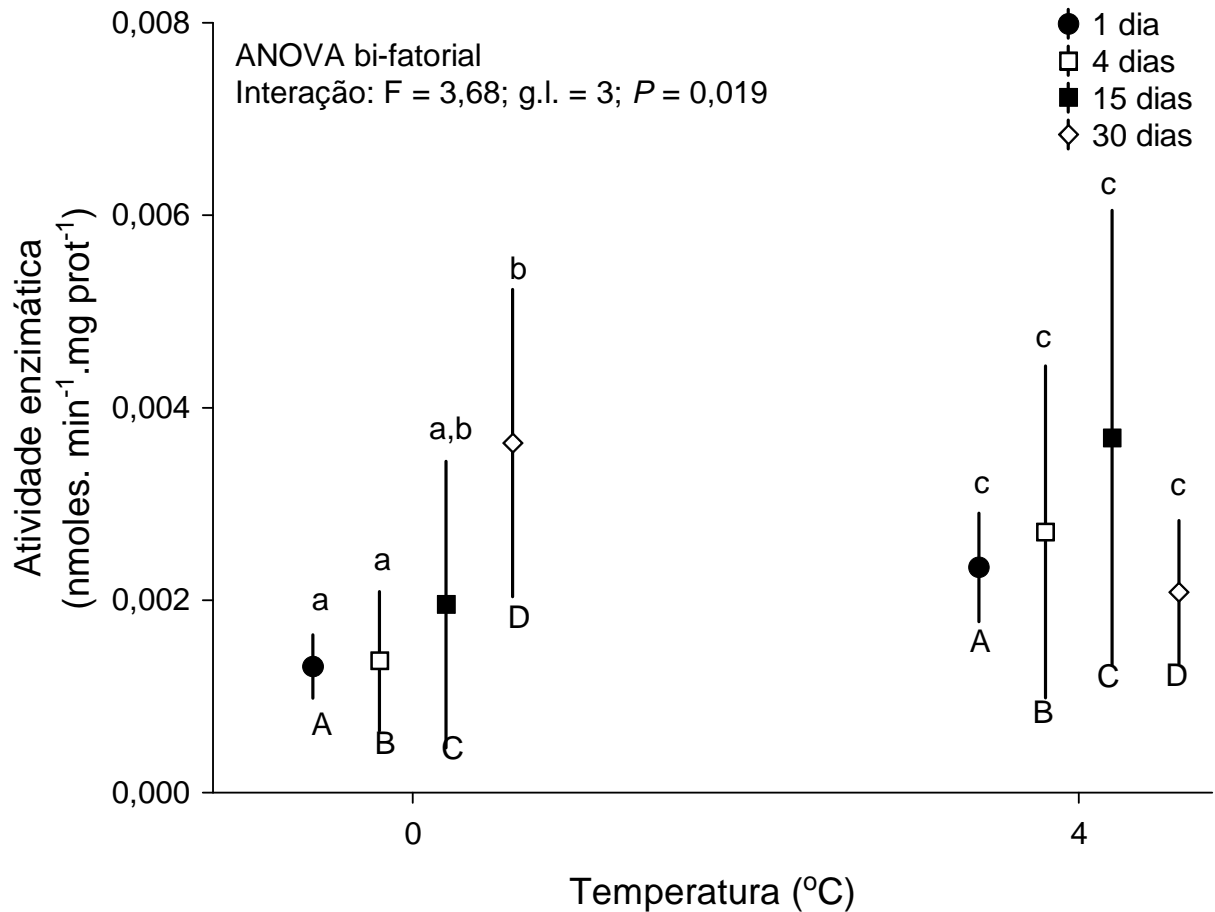


FIGURA 12 - Média \pm desvio padrão da atividade da GST do encéfalo de *N. coriiceps* submetidas a 0°C e 4°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dia s. Os resultados da ANOVA bi-fatorial estão mostrados no gráfico. Letras minúsculas comparam tempos de exposição em cada temperatura, e letras maiúsculas comparam temperaturas em cada tempo de exposição (teste de Tukey, $P < 0,05$).

5.1.3 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Não houve efeito isolado da temperatura ($F = 3,61$; g.l. = 1; $P = 0,063$) e do tempo de exposição ($F = 2,03$; g.l. = 3; $P = 0,121$), nos níveis de LPO em encéfalos de *N. coriiceps*. Também não foi observado efeito da interação entre temperatura e tempo de exposição ($F = 2,03$; g.l. = 3; $P = 0,121$) nos níveis de LPO em encéfalos de *N. coriiceps* (Figura 13).

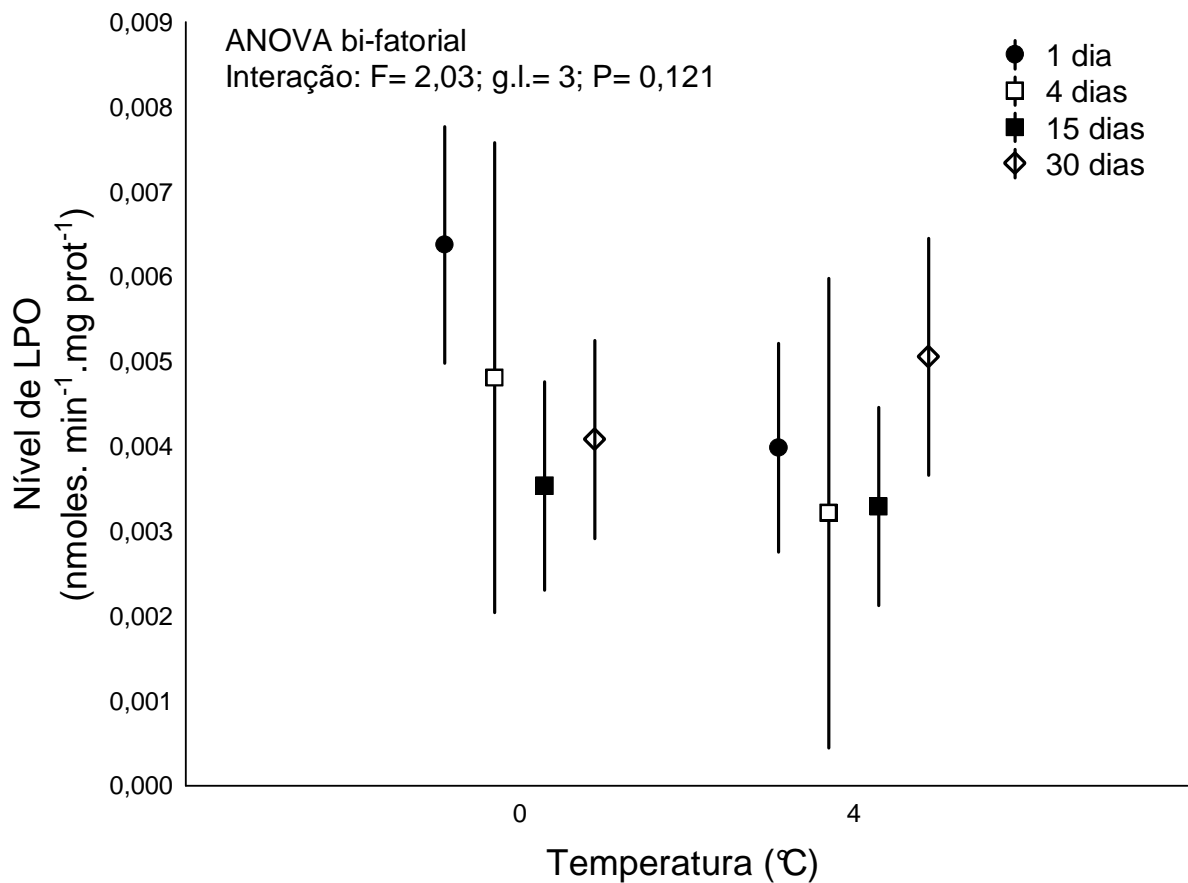


FIGURA 13 - Média \pm desvio padrão dos níveis de LPO do encéfalo de *N. coriiceps* submetidas a 0°C e 4°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Os resultados da ANOVA bi-fatorial estão mostrados no gráfico.

5.2 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS EM *Notothenia rossii*

5.2.1 ACETILCOLINESTERASE (AChE)

Houve efeito da interação temperatura e tempo de exposição na atividade da AChE no encéfalo dos indivíduos de *N. rossii*. A atividade da AChE no encéfalo de *N. rossii* não sofreu mudanças significativas a 0°C nos diferentes tempos de exposição. A 4°C a atividade da AChE foi 30% maior que 15 dias de exposição quando comparado a 30 dias. Em 1 dia de exposição a 8°C a atividade da AChE foi de 0,26 nmoles/min/mg, ocorrendo uma redução de 13%, 22% e 24% em 4, 15 e 30 dias de exposição respectivamente.

Notamos que entre 4°C e o controle, a atividade da AChE é 37% maior a 4°C após 15 dias de exposição. E entre 8°C e o controle, a atividade da AChE foi maior (47%, 32%, 35% e 38%) em 1, 4, 15 e 30 dias respectivamente a 8°C (Figura 14).

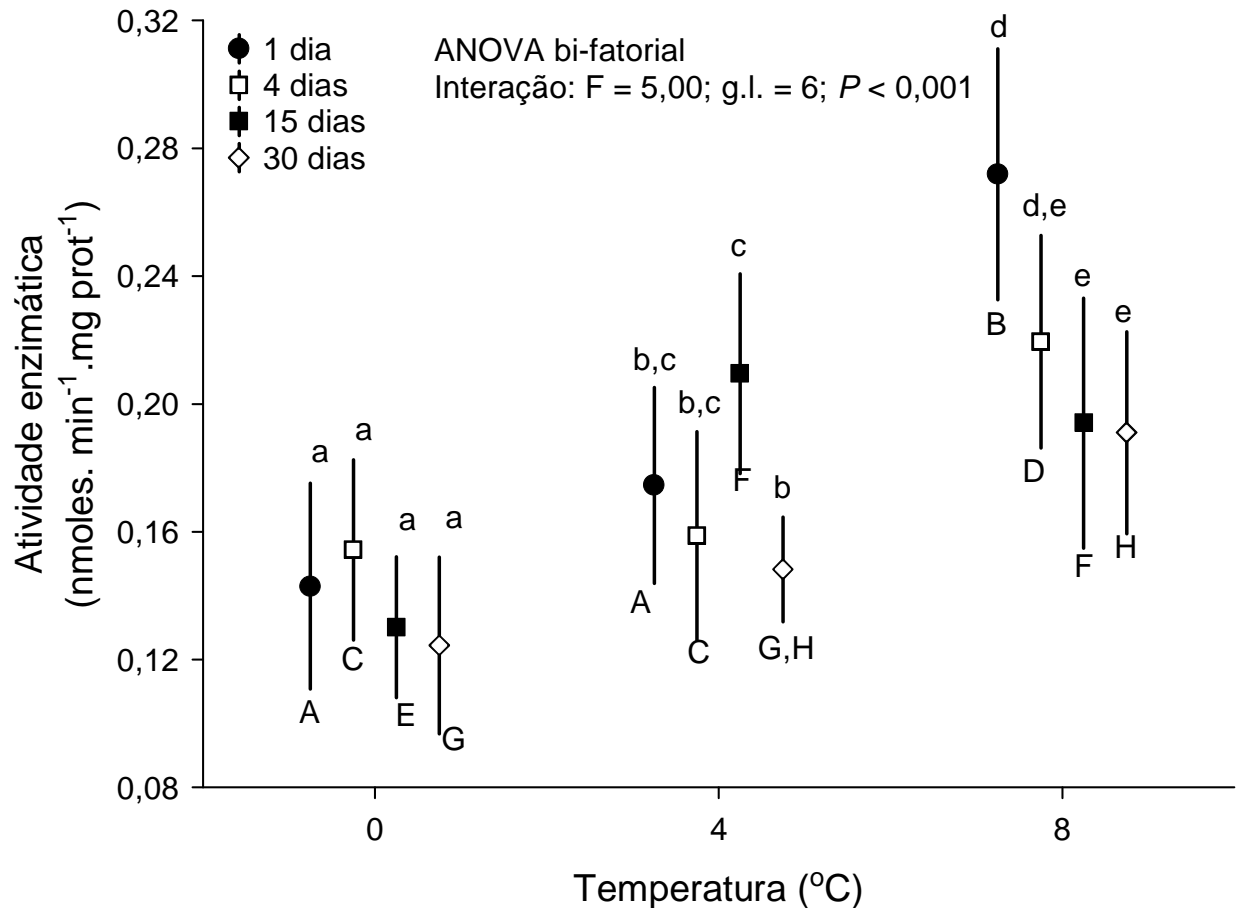


FIGURA 14 - Média \pm desvio padrão da atividade da enzima AChE do encéfalo de *N. rossii* submetidas a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Os resultados da ANOVA bi-fatorial estão mostrados no gráfico. Letras minúsculas comparam tempos de exposição em cada temperatura, e letras maiúsculas comparam temperaturas em cada tempo de exposição (teste de Tukey, $P < 0,05$).

5.2.2 GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST)

Após verificar que houve efeito da interação temperatura e tempo de exposição na atividade da GST no encéfalo dos indivíduos de *N. rossii*, nota-se que a atividade foi

significativamente maior (50%) em 15 dias de exposição a 0°C quando comparamos com o primeiro dia. A 4°C, a atividade da GST não sofreu influência em relação aos diferentes tempos de exposição. A 8°C a atividade foi maior significativamente (45%) em 4 dias quando comparamos com o primeiro dia.

A atividade da GST não diferiu entre 4°C e o controle em nenhum período de exposição. Por outro lado, diferiu significativamente entre 8°C e o controle em 4 dias de exposição, o qual mostra-se maior (42%) quando o peixe foi submetido a 8°C (Figura 15).

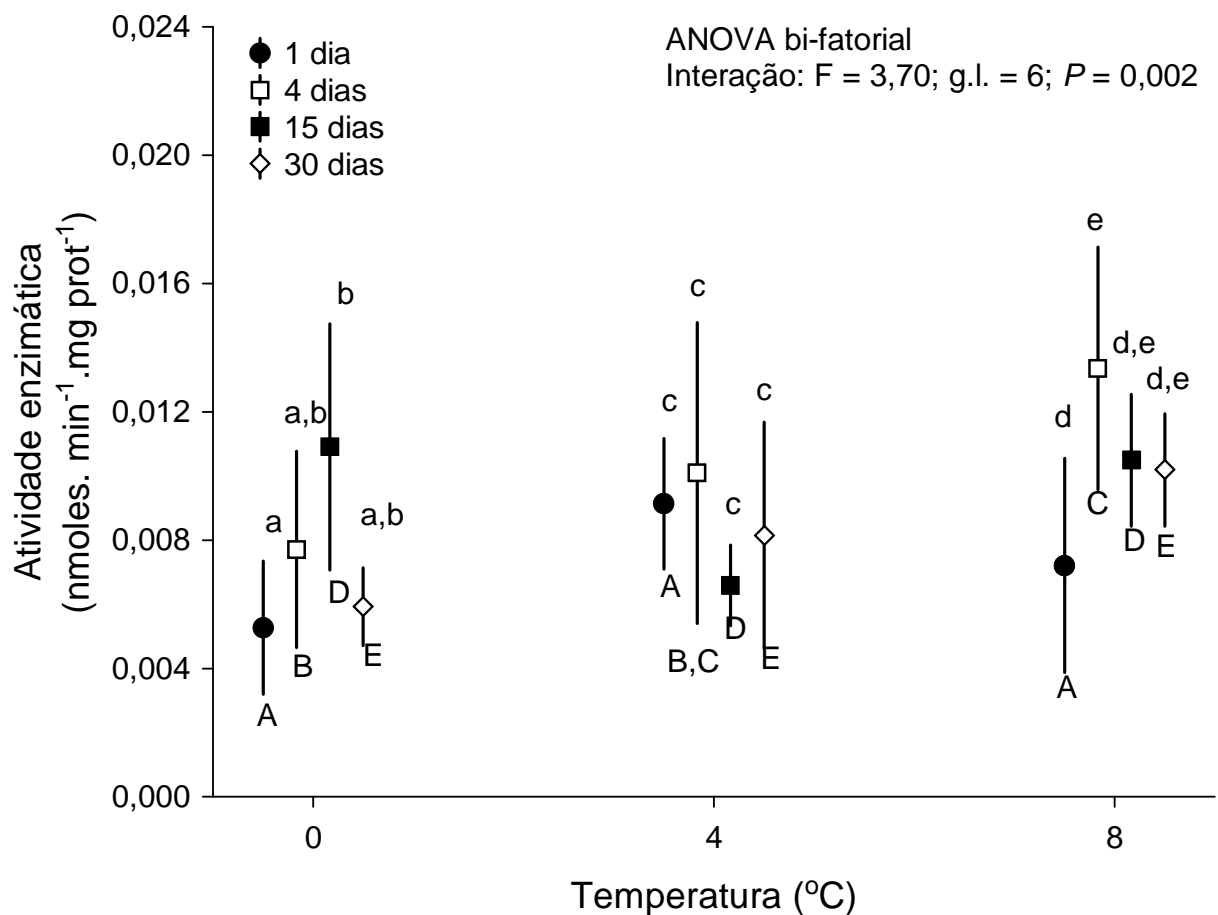


FIGURA 15 - Média \pm desvio padrão da atividade da enzima GST do encéfalo de *N. rossii* submetidas a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Os resultados da ANOVA bi-fatorial estão mostrados no gráfico. Letras minúsculas comparam tempos de exposição em cada temperatura, e letras maiúsculas comparam temperaturas em cada tempo de exposição (teste de Tukey, $P < 0,05$).

5.2.3 LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)

Os níveis de LPO foram menores em 30 dias de exposição a 0°C quando comparados com os demais tempos de exposição (1, 4, 15 e 30 dias).

Quando comparado as temperaturas experimentais com o controle, observa-se que em 4 dias de exposição a 4°C e a 8°C, os níveis de LPO foram significativamente menores (68%) e (61%) respectivamente (Figura 16).

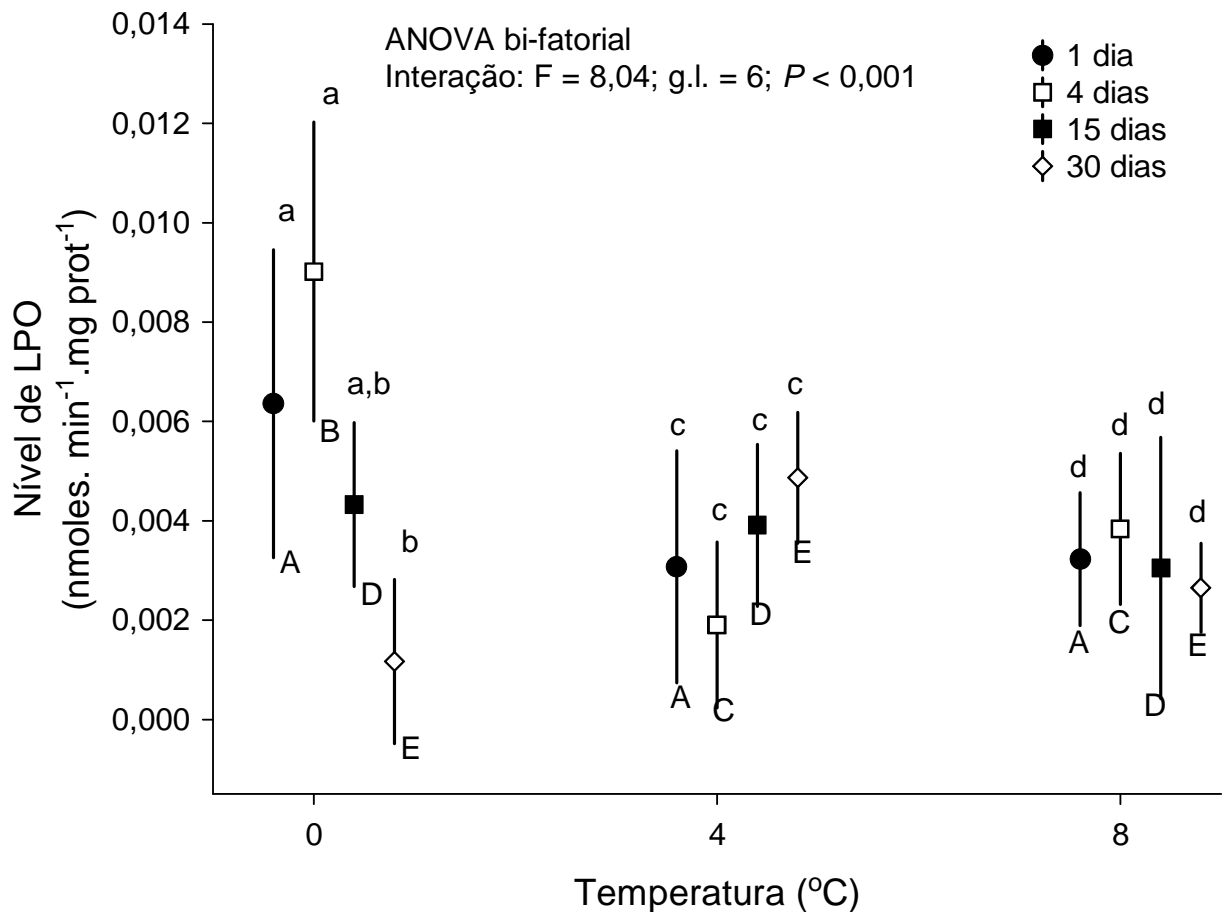


FIGURA 16 - Média \pm desvio padrão dos níveis de LPO do encéfalo de *N. rossii* submetidas a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Os resultados da ANOVA bi-fatorial estão mostrados no gráfico. Letras minúsculas comparam tempos de exposição em cada temperatura, e letras maiúsculas comparam temperaturas em cada tempo de exposição (teste de Tukey, $P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

Nos ambientes polares a sobrevivência a baixas temperaturas da água foi garantida por adaptações evolutivas nas propriedades fisiológicas, bioquímicas e comportamentais dos indivíduos. Graus mais elevados de insaturação na membrana, maior armazenamento de lipídios e incorporação de gotículas de gordura nas células musculares são alguns exemplos dessas adaptações (Hochachka & Somero, 1968; Wilson *et al.*, 2002; Johnston, 2003). As reações bioquímicas em decorrência das baixas temperaturas ocorrem muito mais lentamente do que seriam em regiões temperadas. Contudo, sabe-se que as enzimas dos peixes antárticos são catalisadores mais eficientes do que os de peixes de águas temperadas (Somero *et al.*, 1967; Somero, 2010; Evans & Somero, 2010).

A Península Antártica é considerada uma região vulnerável a eventuais flutuações de temperatura (Di Prisco, 2000; Clarke *et al.*, 2007) devido a sua proximidade com a fronteira polar antártica, gerando algumas discussões relacionadas com a capacidade adaptativa de peixes antárticos frente a essa pressão térmica (Meredith, 2005; di Prisco & Verde, 2011).

Atualmente, a Ilha Rei George e a Baía do Almirantado, local deste estudo, é uma área onde é possível detectar respostas do ambiente às mudanças climáticas globais. Registros meteorológicos indicam um rápido aumento na temperatura atmosférica local, ao longo dos últimos 50 anos. Associado a este aquecimento regional, a ilha perdeu 7% da cobertura de gelo no referido período (Lange, 2007). Devido a esta fragilidade ambiental, em 1996 o Brasil juntamente com outros países propôs um plano de gerenciamento para designar a Baía do Almirantado e seus arredores como uma Área Antártica Especialmente Gerenciada (AAEG). Visando fornecer dados científicos para a elaboração do plano de gerenciamento da Baía do Almirantado, este trabalho foi desenvolvido e teve o objetivo de detectar e estimar os efeitos do estresse térmico no encéfalo e músculo (dependendo o caso) de peixes (*N. coriiceps* e *N. rossii*) encontrados na Baía do Almirantado. Para tanto, a atividade da acetilcolinesterase, da enzima antioxidante glutathione-S-transferase e da lipoperoxidação foram avaliadas, sendo que a importância fisiológica dessas moléculas foi levada em consideração no momento da escolha dos parâmetros a serem analisados.

Alterações de temperatura podem afetar a velocidade das reações químicas, a fluidez das membranas biológicas e os sistemas fisiológicos (Hochachka & Somero, 2002) modificando as propriedades básicas da matéria viva (Kapoor, 1975; Dias, 1998). Organismos aquáticos, dentre eles os peixes, possuem uma faixa de tolerância na variação da temperatura da água, havendo uma temperatura ótima para o crescimento, reprodução e metabolismo. Neste trabalho os peixes antárticos *N. coriiceps* e *N. rossii* foram submetidos ao estresse térmico, em temperaturas de 4°C e 8°C durante 1 a 30 dias, sendo que 8°C foi a

temperatura limitante para a espécie *N. coriiceps*, a qual sobreviveu nessa condição por no máximo 6 dias. Em contrapartida, dados ainda não publicados pelo Laboratório de Biologia Adaptativa - UFPR demonstraram que *N. rossii* sobrevive na condição experimental de 8°C durante 90 dias. Estudos como o de Somero & DeVries (1967) definiram que temperaturas superiores a 5°C são letais para espécies da família Nototheniidae, no entanto, estes limites de sobrevivência estão sendo alterados e revisados a partir de trabalhos que levam em consideração a espécie, a variabilidade individual e a plasticidade metabólica (Ryan, 1995; Van Dijk *et al.*, 1999; Carpenter & Hofmann, 2000; Lowe & Davison, 2005, Jin & DeVries, 2006 e Brodte *et al.*, 2008).

A maior resistência de *N. rossii* ao estresse térmico pode influenciar à sua distribuição geográfica, apesar de ambas espécies terem distribuição circumpolar e em muitas regiões da Antártica serem encontradas nos mesmos locais (Bellisio & Tomo, 1973). *N. coriiceps* possui uma amplitude de sobrevivência pequena, sendo encontrada principalmente ao redor da Península Antártica, onde as águas são mais geladas e constantes, enquanto que, *N. rossii* possui uma amplitude maior de distribuição, aproximando-se de águas mais quentes, vindas dos Oceanos Pacífico, Atlântico e Índico (FishBase, 2009). Niemierko *et al.* (1977), investigaram a temperatura ótima da atividade da AChE encefálica nos peixes antárticos *N. gibberifrons* e *P. georgianus*, e do mesmo modo, concluíram que, as respostas diferenciadas das duas espécies frente a temperatura ótima, podem estar relacionadas dentre outros fatores, com a distribuição geográfica das espécies. *N. gibberifrons* habita regiões detentoras de temperatura aquáticas mais baixas, fator que influencia os mecanismos de regulação visando à manutenção da homeostase.

Os resultados das análises enzimáticas da AChE nesse trabalho demonstraram que sua atividade no encéfalo em *N. coriiceps* foi maior do que nos tecidos musculares em todos os experimentos de estresse térmico. Tal diferença entre os dois órgãos pode ser explicada pelo fato de que a quantidade de sinapses presente no encéfalo é maior do que no tecido muscular (Lent, 2001). Porém, no peixe juvenil de água doce *Carassius auratus (goldfish)*, a atividade específica da AChE foi maior no músculo esquelético do que no cérebro (Bretaud *et al.*, 2000).

Os valores da atividade cerebral de AChE encontrados em *N. coriiceps* e *N. rossii* não podem ser comparados com outros estudos experimentais de estresse térmico em peixes antárticos, pois não há registro na literatura que contenham tais dados. Há, somente o trabalho de Niemierko *et al.* (1977) onde os valores encontrados para AChE nos peixes antárticos estudados (*N. gibberifrons* e *P. georgianus*) são menores quando comparados com outros peixes não antárticos. No presente estudo, os valores no encéfalo de *N. rossii* variaram de 0,12 a 0,26 nmoles/min/mg de proteína aumentando de acordo com o estresse térmico (4°C e 8°C). Já para *N. coriiceps* os valores encefálicos foram de 0,14 a 0,32

nmoles/min/mg de proteína e não variaram com o aumento da temperatura (4°C). Já, Durieux *et al.* (2011) analisando o peixe marinho e estuarino, *Morone saxatilis* observaram que a atividade da AChE cerebral permaneceu em torno de 250 nmoles/min/mg de proteína em espécimes coletados de agosto-outubro (verão) e em seguida, caiu progressivamente até atingir cerca de 100 nmoles/min/mg de proteína em espécimes coletados em janeiro (inverno).

Em *N. coriiceps* a atividade da AChE no encéfalo mostrou uma redução significativa somente a 0°C no primeiro dia em relação aos demais tempos de exposição, mantendo esse patamar na temperatura de 4°C. A estabilidade da AChE em *N. coriiceps* encontrada neste trabalho, corrobora com o estudo de Zinkl *et al.* (1987), onde nenhuma mudança na atividade da AChE foi verificada, ao analisar a truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta por 7 dias a temperaturas de 9°C, 13°C e 20°C. Do mesmo modo, Beauvais *et al.* (2001), testando fontes de variação na atividade colinesterásica, em *bluegill* (*Lepomis macrochirus*), observou que a faixa de temperatura de 20°C a 30°C aparentemente não afeta a atividade colinesterásica. Sendo assim, o autor acredita que tais faixas de variação térmica poderiam ser insuficientes para manifestar alterações na atividade colinesterásica, como pode ser o caso de *N. coriiceps*.

A atividade da AChE em *N. rossi* variou com a temperatura (0°C, 4°C e 8°C) e com o tempo de exposição (1, 4, 15 e 30 dias), entre a temperatura experimental de 8°C e o controle. Os níveis de AChE aumentaram em todos os períodos de exposição na maior temperatura (8°C). Na literatura há uma grande variação de resultados sobre a atividade da AChE, contudo vários trabalhos indicam o aumento da atividade da AChE com o aumento da temperatura. Hogan (1970) relatou a influência de flutuações na temperatura aquática na atividade da AChE em cérebros de *bluegill* (*Lepomis macrochirus*), concluindo que a atividade da AChE foi significativamente correlacionada com a temperatura da água. Hazel (1969) relata que a atividade acetilcolinesterásica em cérebros de *goldfish* (*Carassius auratus*) e *killifish* (*Fundulus heteroclitus*) aclimatados a 25°C foi significativamente superior em relação aos peixes aclimatados a 5°C ou 15°C. Da mesma forma, as observações feitas sobre as variações de atividades em *Limanda limanda* por Bocquené & Galgani (1990), indicam que há variações sazonais na atividade da AChE em três espécies de organismos marinhos (*Pleuronectes platessa*, *Platichthys flesus* e *Palaemon serratus*), concluindo que a temperatura desempenha um importante papel nas variações sazonais de atividades da AChE. A grande variação na atividade da AChE dependendo da temperatura e tempo de exposição encontrada neste trabalho, é um fator que dificulta a discussão dos resultados. Contudo, fica claro que a temperatura de 8°C influencia de forma significativa o metabolismo da acetilcolinesterase em *N. rossi*, indicando que esta espécie pode ter mecanismos mais eficientes de ajustes quando comparada com *N. coriiceps*, a qual morre

no sexto dia quando submetida a 8°C. Experimentos futuros deverão ser feitos visando avaliações da atividade da AChE nesse intervalo de tempo e nessa temperatura, enfatizando, principalmente, as horas iniciais (antes de 24 h) de exposição a 8°C.

O aumento da temperatura tem como consequência a aceleração do metabolismo, e assim, espera-se haver um aumento nas reações químicas por parte do organismo, visando a homeostase. Quando ocorre uma rápida ou eficiente resposta celular por parte do organismo, pode-se dizer que este está mais apto a sobreviver sob o estresse imposto, quando comparamos com organismos sem ou baixa resposta celular. Ao observarmos a variação da AChE com o aumento da temperatura em *N. rossi*, podemos sugerir que esta espécie poderia ter uma resposta celular mais eficiente do que *N. coriiceps*. E, portanto ser mais apta a sobreviver em temperaturas mais elevadas.

Neste trabalho quando decidimos avaliar a atividade da LPO e da GST levamos em consideração a resposta celular e a composição química, por exemplo, das membranas biológicas dos peixes antárticos. Quando o organismo possui uma eficiente resposta celular frente a um estresse, possíveis danos celulares tendem a ser menores, como é o caso da relação entre a produção de defesas antioxidantes e a redução de radicais livres. A manutenção da fluidez da membrana a baixas temperaturas requer um maior grau de insaturação de ácidos graxos e a acumulação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) (Rady *et al*, 1990; Abele & Puntarulo, 2004). PUFAs conferem à membrana um ponto de congelamento mais baixo, permitindo que ela exerça suas funções normais. Contudo, são os principais alvos de ataque pelos radicais livres (devido à exposição do grupo metil com dupla ligação), desde modo, alterações na temperatura podem demandar defesas para evitar a lipoperoxidação (Cosgrove *et al.*, 1987 *apud* Giese *et al.*, 2000; Porter *et al.*, 1995 *apud* Giese *et al.*, 2000).

Sabe-se que a taxa metabólica de animais ectotérmicos e o consumo de oxigênio é proporcional à temperatura do ambiente (Hochachka & Somero, 1984). O consumo de oxigênio por notothenídeos é mais elevado quando comparados com peixes de ambientes temperados (Eastman, 1993). Esse consumo de oxigênio pode afetar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo geração de ânion superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$) (Halliwell & Gutteridge, 1989). Deste modo, espera-se que uma intensificação respiratória, gerada pelo estresse térmico, resulte em um aumento na produção de ROS e, conseqüentemente, que respostas de adaptação por defesas antioxidantes ocorram. A superprodução de ROS em resposta ao estresse ambiental pode levar o aumento de peroxidação lipídica e afetar a viabilidade das células, causando danos à membrana (Nordberg & Arner, 2001). Sistemas de defesa antioxidante complexos mantêm a homeostase, protegem organismos aeróbios contra ROS e contra

danos subsequentes do estresse oxidativo. Os antioxidantes podem ser enzimas como a glutationa-S-transferase (GST).

Ao compararmos os níveis de GST da temperatura experimental de 4°C com o controle, observamos que não houve diferença significativa na sua atividade em *N. coriiceps*. Em *N. rossii*, esta estabilidade também é vista, ao comparamos as temperaturas experimentais com o controle, observamos que somente no quarto dia a 8°C a atividade se elevou. Talvez a relação da defesa antioxidante ao provável estresse oxidativo não tenha ficado claro devido a participação de outras enzimas e defesas não enzimáticas do sistema antioxidante que não foram analisadas nos peixes antárticos analisados neste estudo. Como as enzimas superóxido dismutase (SOD), a qual possui o papel de converter superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a catalase (CAT), que converte H₂O₂ em H₂O e a enzima glutationa peroxidase que na presença de glutationa reduzida, converte ROOH em ROH, água e glutationa oxidada.

A LPO em *N. coriiceps* não revelou diferenças significativas entre os tempo de exposição e entre as temperaturas e em *N. rossi* houve estabilidade também, entre as temperaturas testadas e o controle, só havendo uma redução nos níveis de LPO no quarto dia a 4°C. Uma das características evolutivas que garantiram a adaptação dos peixes ao ambiente antártico foi o conteúdo lipídico, armazenado em células ou presente na membrana, justamente por esse motivo foi considerada a hipótese de uma possível ocorrência do estresse oxidativo e conseqüentemente a lipoperoxidação. Porém é possível que o sistema de defesa ao estresse também tenha se tornado mais eficiente, com respostas em outras estratégias não analisadas, e mesmo com o aumento de ROS elas atuem sem necessitar de alterações nos níveis de GST por evitarem a LPO.

Podemos ainda analisar os gráficos destes dois parâmetros bioquímicos (GST e LPO) comparando-os, uma vez que quando o sistema antioxidante age, espera-se uma redução da LPO. Ao compararmos os períodos de exposição, observamos que em *N. coriiceps* a atividade da GST aumentou a 0°C concordando com a tendência da baixa dos níveis de LPO. A 4°C não houve diferença significativa entre tais tempos de exposição, mas podemos observar uma tendência de aumento da GST em 15 dias e conseqüente diminuição da LPO. A atividade da GST em *N. rossii* foi maior após 15 dias de exposição a 0°C, juntamente com uma tendência a reduzir a LPO em 15 e 30 dias. Essa tendência também é observada a 4°C, mas não a 8°C.

Deste modo, os gráficos da LPO e GST nas duas espécies possuem uma tendência a serem inversamente proporcionais, isso fica bem claro em *N. rossii* a 4°C em 4 e 15 dias. Conforme ocorre um aumento na LPO, as resposta antioxidantes reagem, aumentando seus níveis, e por conseqüência, suprimindo a LPO. Tal fato é corroborado pelo estudo de Bagnyukova *et al.* (2007), onde essa mesma relação é encontrada em *Carassius auratus*

sob estresse térmico. Produtos da peroxidação lipídica aumentaram na maioria dos tecidos, embora os seus níveis tenham sido rapidamente reduzidos no rim. Produtos da peroxidação lipídica não são apenas marcadores de lipoperoxidação, pois possivelmente estão envolvidos no desencadeamento de uma regulação positiva de enzimas antioxidantes (Lushchak & BagnyuKova, 2006).

7 CONCLUSÃO

Os peixes antárticos, *N. coriiceps* e *N. rossii*, foram submetidos ao estresse térmico (4°C e 8°C) nos tempos de 1, 4, 15 e 30 dias visando avaliar a plasticidade metabólica dessas espécies, através de análises da lipoperoxidação (LPO) e da atividade das enzimas glutatona S-transferase (GST) e acetilcolinesterase (AChE). São conclusões deste trabalho:

1 - As duas espécies responderam de forma diferenciada ao estresse térmico, onde *N. rossii* apresenta maior amplitude na faixa de tolerância térmica quando comparada com *N. coriiceps*, sendo que esta capacidade de regulação talvez influencie a distribuição geográfica das espécies;

2 - As faixas de temperatura utilizadas nesse trabalho, para *N. coriiceps* (0°C e 4°C) não foram suficientes para provocar alterações na atividade da AChE enquanto que para *N. rossii* as temperaturas testadas (0°C, 4°C e 8°C) provocaram alterações na atividade desta enzima.

3 - Em *N. rossii* a atividade da AChE variou com a temperatura e com o tempo de exposição (1, 4, 15 e 30 dias) entre 8°C e 0°C, sendo que os níveis de AChE aumentaram na maior temperatura (8°C). Por outro lado, em *N. coriiceps* a atividade manteve-se dentro de certos limites não variando com a temperatura e com o tempo de exposição, com exceção de 24 horas;

4 - As atividades da GST e LPO, quando comparadas entre si, indicam uma tendência de serem inversamente proporcionais nas duas espécies analisadas, corroborando com a premissa de que, havendo aumento na LPO, há um aumento na resposta antioxidante, dentre elas da GST, tendo o objetivo de suprimir a LPO;

5 - Nas temperaturas e tempos de exposição testados a GST e LPO via ensaio FOX não podem ser utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo induzido por estresse térmico, sendo necessária análise de outros parâmetros bioquímicos do sistema antioxidante destes organismos;

6 - Maiores estudos devem ser realizados visando o entendimento da resposta metabólica destas e de outras enzimas frente ao estresse térmico, enfatizando as horas iniciais (antes de 24 horas) de exposição a altas temperaturas, dentre elas, 4°C e 8°C.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abele, D., Puntarulo, S., (2004). Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 138, 405–415.
- An, K. W., Kim, N. N., Shin, H. S., Kil, G. S., & Choi, C. Y. (2010). Profiles of antioxidant gene expression and physiological changes by thermal and hypoosmotic stresses in black porgy (*Acanthopagrus schlegelii*). *Comparative biochemistry and physiology. Molecular & integrative physiology*, 156(2), 262-8.
- Angelucci, S., Sacchetta, P., Moio, P., Melino, S., Petruzzelli, R., Gervasi, P. and Dillio, C. 2000. Purification and characterization of glutathione transferases from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 373(2): 435–441.
- Astorga, A., Fernandez, M., Boschi, E. E., & Lagos, N. (2003). Two oceans, two taxa and one mode of development: latitudinal diversity patterns of South American crabs and test for possible causal processes. *Ecology Letters*, 6(5), 420-427.
- Avci, A.; Kamaz, M.; Duraka, I. (2005) Peroxidation in muscle and liver tissues from fish in a contaminated river due to a petroleum refinery industry. *Ecotoxicol Environ*, 60,01-105.
- Bagnyukova, T., Lushchak, O., Storey, K., & Lushchak, V. (2007). Oxidative stress and antioxidant defense responses by *goldfish* tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. *Journal of Thermal Biology*, 32(4), 227-234.
- Baldwin, B. J., & Hochachka, P. W. (1970). Functional Significance of Isoenzymes in Thermal Acclimatization, 883-887.
- Baldwin, J. (1971). Adaptation of enzymes to temperature: acetylcholinesterases in the central nervous system of fishes. *Comparative Biochemistry*, 40(1), 181-187.
- Baldwin, D.H.; Spromberg, J.A.; Collier, T.K.; Scholz, N.L. (2009) A fish of many scales: extrapolating sublethal pesticide exposures to the productivity of wild salmon populations. *Ecol Appl*, 19:2004–2015.
- Barreiros A.L.B.S., David J.M., David J.P. (2006) Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*, 29, 113-123.
- Barrera-Oro, E. R. (2003). Analysis of dietary overlap in Antarctic fish (Notothenioidae) from the South Shetland Islands: no evidence of food competition. *Polar Biology*, 26(10), 631-637.
- Barrera-Oro, E. R., & Winter, D. J. (2008). Age composition and feeding ecology of early juvenile *Notothenia rossii* (Pisces, Nototheniidae) at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Antarctic Science*, 20(04), 339-341.
- Bartlin, Dieter; Renate Radzio, U. S. and E. W. W. (1993). A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana* Molecular cloning and functional characterization, 586, 579-586.

- BAS. British Antarctic Survey (2000) Antarctic digital database, Version 3.0, Manual and bibliography. Cambridge, *Scientific Committee on Antarctic Research*. 74 pp.
- Beauvais, sheryl L. Cole J. Kevin; Atchison, J. Gary; Coffey, M. (2001). Factors affecting brain cholinesterase activity in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Test*, 249-264.
- Bellisio N.B.; Tomo A. (1973) Biogeografía de la Península Antártica. Archipiélagos y Mares Adyacentes. 93-94
- Bilyk, K. T., & Devries, A. L. (2011). Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 158(4), 382-90.
- Bocquené, G., Galgani, F., Truquet, P., (1990). Characterization and assay conditions for use of AChE activity from several marine species in pollution monitoring. *Mar. Environ. Res.* 30, 75-89.
- Bottino, N. R.; Jeffrey, L. M.; Reiser, R. (1967) The lipids of Antarctic fish. *Antarctic Journal of the United States*, 2, 194-195.
- Bradford, M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-dye Binding. *Anal. Biochem*, 72, 248-254,.
- Braun M, Simões JC, Vogt S, Bremer UF, Blindow N, Pfender M, Saurer H, Aquino FE and Ferron FA. (2001). The compilation of a DTM and a new satellite image map for King George Island (Antarctica). *Geo-Spatial Inform Sci* 4: 47–51.
- Bride, J. M. M. C., Kraemer, W. J., & Box, O. (1999). Free Radicals, Exercise, and Antioxidants. *The Journal of Strength and Conditioning Research*, 13(2), 175-183.
- Brito, T. (2006). Coleção Explorando o Ensino Antártica, 9, 163.
- Brodte, E., Graeve, M., Jacob, U., Knust, R., & Pörtner, H.-O. (2008). Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae). *Fish physiology and biochemistry*, 34(3), 261-74.
- Burchett, M. S. (1983). Food, feeding and behaviour of *Notothenia rossi* nearshore at South Georgia.
- Carpenter, C. M.; Hofmann, G. E. (2000) Expression Of 70 Kda Heat Shock Proteins In Antarctic And New Zealand Notothenioid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*, 125, n. 2, 229-238.
- Casaux, R.J., Mazzota, A.S. & Barrera-Oro, E.R. (1990). Seasonal aspects of the biology and diet of nearshore nototheniid fish at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. *Polar Biology*, 11, 63-72.
- Cailleaud, K., Maillet, G., Budzinski, H., Souissi, S., & Forget-Leray, J. (2007). Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 147(4), 841-9.

- CCAMLR (2011) Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources. Disponível em: < <http://www.ccamlr.org> >
- Chebbi, S. G., & David, M. (2009). Neurobehavioral Responses Of The Freshwater Teleost, *Cyprinus Carpio (Linnaeus)* Under Quinalphos Intoxication. *Molecular Toxicology*, 25, 241-249.
- Chen, L., DeVries, a L., & Cheng, C. H. (1997). Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 3817-22.
- Clarke, A. (2003) Evolution and low temperatures. Evolution on Planet Earth (eds A. Lister & L. Rothschild). *Academic Press, London*. 187–207pp.
- Clarke, A.; Murphy, E. J.; Meredith, M. P.; King, J. C.; Peck, L. S.; Barnes, D. K. & Smith, R. C. (2007). Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 149-166.
- Cosgrove, J. P., Church, D. F., Pryor, W. A. (1987): The kinetics of the autooxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*; 22: 299–304.
- Crockett, Elizabeth L. (2011). Antioxidant potential is positively correlated with mitochondrial enzyme activity in Antarctic and non-Antarctic notothenioid fishes. *Polar Biology*, 34(1), 113-118.
- Crossley, L. (1995). Explore Antarctica. *Cambridge University Press*, 111.
- de la Torre, F. R., Ferrari, L., & Salibián, A. (2002). Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 131(3), 271-80.
- Devor, D.P.; Grim, J.M.; Crockett, E.L.; Elevated temperatures induce lipid peroxidation in cardiac muscle but not other tissues from Antarctic notothenioid fishes Ohio University, Athens. *Society for Integrative and Comparative Biology*.
- Das, T., K. P. A., Chakraborty, S. K., Manush, S., Chatterjee, N., Mukherjee, S. C., & Pal, A. K. (2004). Thermal tolerance and oxygen consumption of Indian Major Carps acclimated to four temperatures. *Journal of Thermal Biology*, 29(3), 157-163.
- DeWitt, H. H. (1971). Antarctic map folio series. *American Geographical Society, New York*, 15.
- di Bello, D., Vaccaro, E., Longo, V., Regoli, F., Nigro, M., Benedetti, M., Gervasi, P. G., et al. (2007). Presence and inducibility by beta-naphthoflavone of CYP1A1, CYP1B1 and phase II enzymes in *Trematomus bernacchii*, an Antarctic fish. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 84(1), 19-26.
- di Prisco, G.; Maresca, B.; Tota, B. (1991). Biology of antarctic fish. *Spriger-Verlag ,Berlin*.
- di Prisco, G.; Pisano, E.; Clarke, A. (1998). Fishes of Antarctica. *Springer*, 355pp.

- di Prisco, G (2000) Life style and biochemical adaptation in Antarctic fishes. *Journal of Marine Systems* 27 253–265
- di Prisco, G., Eastman, J. T., Giordano, D., Parisi, E., & Verde, C. (2007). Biogeography and adaptation of Notothenioid fish: hemoglobin function and globin-gene evolution. *Gene*, 398(1-2), 143-55.
- di Prisco, G., & Verde, C. (2011). Evolution and Biodiversity in the Antarctic - the Response of Life To Change (Eba): Role and Legacy. *Oecologia Australis*, 15(01), 23-31.
- Dias J. , Alvarez, M.J. , Diez, A., Arzel, J., Bautista, J.M. (1998) Regulation of hepatic lipogenesis by dietary proteinrenergy in juvenile *European seabass* and *Dicentrarchus labrax* / *Aquaculture* Ž.161, 169–186
- Dippner, J. W. (1997). Recruitment success of different fish stocks in the North Sea in relation to climate variability. *Deutsche Hydrographische Zeitschrift*, 49(2), 277-293.
- Donatti, L. (2009)- Foto do peixe antártico *Notothenia coriiceps* retirada no laboratório da EACF.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews*, 82(1), 47-95.
- Durieux, E. D. H., Farver, T. B., Fitzgerald, P. S., Eder, K. J., & Ostrach, D. J. (2011). Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish physiology and biochemistry*, 37(1), 21-9.
- Dutra, B. K., Santos, R. B., Bueno, a a P., & Oliveira, G. T. (2008). Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 151(3), 322-8.
- Dvir, H., Silman, I., Harel, M., Rosenberry, T. L., & Sussman, J. L. (2010). Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-biological interactions*, 187(1-3), 10-22.
- Eastman, J. T. (1993). Antarctic Fish Biology. *Academic Press, Inc.* 315pp.
- Eastman, J. T. (2005). The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar Biology*, 28(2), 93-107.
- Ellman, G. L.; Courtney, K. D.; Andreas, V.J.; Featherstone, R.M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol.*7:88.
- Elsayed, N. M. (2001). Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. *Nutrition Burbank Los Angeles County Calif*, 17(10), 828-834.
- Evans, T.G.; Somero, G.N. (2010) Phosphorylation events catalyzed by major cell signaling proteins differ in response to thermal and osmotic stress among native (*Mytilus californianus* and *Mytilus trossulus*) and invasive (*Mytilus galloprovincialis*) species of mussels. *Physiol. Biochem. Zool.* 83 (6): 984-96.

- Everson, I. (1977). Southern Ocean fisheries survey programme. The living resources of the Southern Ocean. Rome: FAO, 160.
- Falkner, K. C., & Clark, A. G. (1992). Glutathione-S-Transferase from an Antarctic Fish, *Dissostichus mawsoni*. *Marine Environmental Research*, 34(1-4), 243-247.
- Fisher, W., Hureau, J.C. (1985) FAO species identification sheets for fisheries purposes. Southern Ocean (Fishing areas 45, 58 and 88), Comm. *Conserv. Antarct. Mar. Living Resour.*, 2, 233–270.
- <http://www.fishbase.org/search.php>
- Gieseg, S. P., Cuddihy, S., Hill, J. V., & Davison, W. (2000). A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 125(3), 371-8.
- Gon, O.; Heemstra, P. C. (1990). Fishes of the Southern Ocean. *Institute of Ichthyology*, 462.
- Grim, J. M., Miles, D. R. B., & Crockett, E. L. (2010). Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. *The Journal of experimental biology*, 213(3), 445-52.
- Gutt, J. (2002). The Antarctic ice shelf : an extreme habitat for notothenioid fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320-322.
- Gutteridge, J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12 Pt 2), 1819-28.
- Habig, C., DiGiulio, R.T., 1991. Biochemical characteristics of cholinesterases in aquatic organisms. In: Mineau, P. (Ed.), *Cholinesterase Inhibiting Insecticides: Their Impact on Wildlife and the Environment*. Elsevier, Amsterdam, 19–33.
- Harding, M. M.; Anderberg, P. I.; Haymet, A. D. J. (2003). “Antifreeze” glycoproteins from polar fish. *European Journal of Biochemistry*, 270, n. 7, 1381-1392.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J. M. (1999). Free radicals in biology and medicine, 3rd edn Oxford University Press. Midsomer Norton Avon UK.
- Hayes, J. D., & Pulford, D. J. (1995). The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 30(6), 445-600.
- Hazel, J.: (1969) The effect of thermal acclimation upon brain acetylcholinesterase activity of *Carassius auratus* and *Fundulus heteroclitus*, *Life Sci.* 8, 775–784.
- Heise, K., Estevez, M. S., Puntarulo, S., Galleano, M., Nikinmaa, M., Pörtner, H. O., & Abele, D. (2007). Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish. *Journal of comparative physiology. B, Biochemical, systemic, and environmental physiology*, 177(7), 765-77.

- Hochachka, P. W.; Somero, G. N. (1968) The adaptation of enzymes to temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 27, n. 3, p. 659-664.
- Hochachka, P. W. (1974). Temperature and pressure adaptation of the binding site of acetylcholinesterase. *The Biochemical journal*, 143(3), 535-9.
- Hochachka, P. W.; Somero, G. N (1984) Biochemical adaptation. *Princeton University Press*, 537 pp
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., (2002) Biochemical adaptation. Mechanism and Process in Physiological Evolution. *Oxford Univ. Press, New York*.
- Hogan JW (1970) Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. *Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology*,5, (4), 347-353.
- Hureau, J. C. (1970). Biologie comparée de quelques poisson antarctiques (Nototheniidae). *Bol. Inst. Océan. Monaco*, 68.
- Iken K, Barrera-Oro ER, Quartino ML, Casaux RJ, Brey T (1997) Grazing by the Antarctic fish *Notothenia coriiceps*:evidence for selective feeding on macroalgae. *Antarct Sci* 9:386–391.
- Jiang, Z-Y.; Hunt, J.V.; Wolff, S.P. (1992) Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. *Anal. Biochem*, 202, p.384-389,.
- Jin, Y., & DeVries, A. L. (2006). Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, 144(3), 290-300.
- Johnston, I. A. (2003) Muscle metabolism and growth in Antarctic fishes (suborder Notothenioidei): Evolution in a cold environment. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 136, 4, 701-713.
- Kapoor, B. G.; Smit, H.; Verighina, I. A (1975) The alimentary canal and digestion in teleost. *Adv. in Mar. Biol.*, v. 13, p. 109-139.
- Keen, J.H.; Habig, W.H.; Jakoby, W.B. (1976) Mechanism for Several Activities of the Glutathione Stransferases. *J. Biol. Chem.*, v.251, p.6183-6188.
- Kennett, J. P. (1977). Cenozoic evolution of antartic glaciation, the circum-Antartic Ocean, and their impact on global paleoceanography. *Jour Geophys Res. AGU*.
- Kim, M., Ahn, I.-Y., Cheon, J., & Park, H. (2009). Molecular cloning and thermal stress-induced expression of a pi-class glutathione S-transferase (GST) in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 152(2), 207-13.
- Knox, G. A. (1994). The biology of the Southern Ocean. *Cambridge University Press*,, 444.

- Kopecka, J., Rybakowas, A., & Pempkowiak, J. (2004). AChE levels in mussels and fish collected off Lithuania and Poland (southern Baltic). *Oceanology*, 46(3).
- Kozlovskaya V.I., Mayer F.L., Menzikova O.V., Chuyko G.M. (1993). Cholinesterase of aquatic animals. *Reviews of Environmental and Contamination and Toxicology*, 132: 117-142.
- Lange, P.K., Tenenbaum, D.R., Braga E.S. and Campos, L.S. (2007) Micro phytoplankton assemblages in shallow waters at Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) during the summer 2002-2003. *Polar Biology*, 30(11), 1438-1492.
- Laws, R. M. (1984). Antarctic Ecology. *London: Academic Press*, 2, 491-532.
- Leibel, W. S. (1988). An analysis of esterase activities from surgeonfish tissues yields evidence of an atypical pseudocholinesterase. *Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry*, 91(3), 437-47.
- Lent, Roberto. (2001) Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências.
- Lima, É. S., Saes, D., & Abdalla, P. (2001). Peroxidação lipídica : mecanismos e avaliação em amostras biológicas, 37.
- Lionel G, Marta A (2003) Genomics and proteomics offers new hopes towards a personalized approach to lung cancer prevention ant treatment. *Electron Biot.* 6: 168-173.
- Londrville, R. L.; Sidell, B. D. (1990) Ultrastructure of aerobic muscle in antarctic fishes may contribute to maintenance of diffusive fluxes. *Journal of Experimental Biology*, v. 150, p. 205-220.
- Lowe, C. J.; Davison, W. (2005) Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. *Journal of Fish Biology*, v. 67, n. 3, p. 752-766.
- Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative biochemistry and physiology Toxicology pharmacology CBP*, 143(1), 36-41.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands*, 101(1), 13-30.
- Macdonald J.A, Montgomery J.C, Wells R.M.G (1987) Comparative physiology of Antarctic fishes. *Adv Mar Biol*, 24, 321-388.
- Malany, S., Baker, N., Verweyst, M., Medhekar, R., Quinn, D. M., Velan, B., Kronman, C., et al. (1999). Theoretical and experimental investigations of electrostatic effects on acetylcholinesterase catalysis and inhibition. *Chemico-biological interactions*, 99-110.
- Marionnet, D., Deschaux, P., & Reynaud, S. (2006). Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish shellfish immunology*, 21(1), 80-91.
- Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A. E., & Sanz, A. (2005). Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1-2), 75-88.

- Matozzo, V., Tomei, A., & Marin, M. G. (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Marine pollution bulletin*, 50(12), 1686-93.
- Mcdonald, M. A.; Smith, M.H.; Smith, M. W.; Novak, M.J.; Johns. P.E; DeVries. (1992) Biochemical systematics of Notothenioid fishes from Antarctica. *Biochem. Syst. Ecol.* 20:233-241,
- McGonidal. (2009). Antarctica Secrets of the Southern Continent. *Global book Publishing*, 393.
- Menezes, S., Soares, A. M. V. M., Guilhermino, L., & Peck, M. R. (2009). Can the Activities of Acetylcholinesterase and Glutathione S-Transferases of *Crangon crangon* (L.) be Used as Biomarkers of Fuel Oil Exposure? *Water, Air, and Soil Pollution*, 208(1-4), 317-322.
- Meredith, Michael P. (2005). Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. *Geophysical Research Letters*, 32(19), 1-5.
- Murawski, S. A. (1993). Climate Change and Marine Fish Distributions: Forecasting from Historical Analogy. *Transactions of the American Fisheries Society*, 122(5), 647-658.
- Myrnes, B., Nilsen, I.W. (2007). Glutathione S-transferase from the Icelandic scallop (*Chlamys islandica*): isolation and partial characterization. *Comp.Biochem. Physiol. C* 144, 403–407
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. (2008) *Lehninger princípios de bioquímica*. 5. New York: Freeman and Company. 1158p
- Niemierko, S; Skangiel-Kramaska, J., Mleczko; M., Rakusa-Suszczewski, S. (1977). The effect of the assay temperature on brain acetylcholinesterase activity of two antarctic fish species. *Bulletin de L'Academie Polonaise Des Sciences*, 15(12), 821-826.
- Nimmo, I. A. (1987). The glutathione S-transferases of fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3(4), 163-172.
- Nordberg J, Arner E S J, 2001. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology and Medicine*, 31: 1287–1312.
- O'Brien, K. M., & Sidell, B. D. (2000). The interplay among cardiac ultrastructure, metabolism and the expression of oxygen-binding proteins in Antarctic fishes. *The Journal of experimental biology*, 203(Pt 8), 1287-97.
- Oliveira CPMS (1999). Efeito da silimarina e verapamil no modelo murino de isquemia e reperfusão hepática: citoproteção e redução do estresse oxidativo. Tese de doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Oliveira, M. M., Silva Filho, M. V., Cunha Bastos, V. L. F., Fernandes, F. C., & Cunha Bastos, J. (2007). Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. *Marine environmental research*, 63(4), 303-12.

- Parihar, M. S., & Dubey, a K. (1995). Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology*, 112(3), 309-13.
- Park, H., Ahn, I.-young, Park, K.-il, & Hyun, S. (2008). Response of antioxidant defence systems to thermal stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. *differences*, 20(6), 521-526.
- Pedreiro, M. (2011) Foto do peixe antártico *Notothenia rossii* retirada no laboratório da EACF.
- Petricorena, Z.L.C.; Somero, G.N.(2007) Biochemical adaptations of notothenioid fishes: Comparisons between cold temperate South American and New Zealand species and Antarctic species *Comparative Biochemistry and Physiology*, 799–807
- Phillips, T. a, Summerfelt, R. C., & Atchison, G. J. (2002). Environmental, biological, and methodological factors affecting cholinesterase activity in walleye (*Stizostedion vitreum*). *Archives of environmental contamination and toxicology*, 43(1), 75-80.
- Podrabsky, J. E., & Somero, G. N. (2006). Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. *Polar Biology*, 30(1), 39-43.
- Porter Na, Caldwell Se, Mills Ka: Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30:277- 290, 1995.
- Pretto, A., Loro, V. L., Morsch, V. M., Moraes, B. S., Menezes, C., Clasen, B., Hoehne, L. (2010). Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 58(4), 1008-14.
- Rady, A.A.R., Csengeri, I., Matkovics, B., (1990) Phospholipid fatty acid composition and lipid peroxidation in some tissues of carp acclimated to different environmental temperatures. *Aquacult. Hungar.* 6, 161–170
- Rang, H. P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G. (2003) *Farmacologia*, 7 edição.
- Regoli, F., Nigro, M., Benedetti, M., Fattorini, D., & Gorbi, S. (2005a). Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. *Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands*, 75(1), 43-52.
- Regoli, F., Nigro, M., Benedetti, M., Gorbi, S., Pretti, C., Gervasi, P. G., & Fattorini, D. (2005b). Interactions between metabolism of trace metals and xenobiotic agonists of the aryl hydrocarbon receptor in the antarctic fish *Trematomus bernacchii*: environmental perspectives. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(6), 1475-1482.
- Richardson, M. G. (1975). The dietary composition of some Antarctic fish. *Br. Antarctic Survive Bulletin*, 41, 113-120.
- Riffenburgh, B. (2007) *Encyclopedia of the Antarctic*. Taylor & Francis Group, 1 186pp.

- Rodrigues, E.; Suda, C. N. K.; Rodrigues Junior, E.; De Oliveira, M. F.; Carvalho, C. D. S.; Vani, G. S. (2011) Antarctic Fish Metabolic Responses as Potential Biomarkers of Environmental Impact. *Oecologia Australis*, 15, 1, 124-129.
- Riffenburgh, B. (2007). *Encyclopedia of the Antarctic*, 1, 186.
- Rudneva, I. I., Kuzminova, N. S., & Skuratovskaya, E. N. (2010). Glutathione-S-Transferase Activity in Tissues of Black Sea Fish Species, 1(1), 141-150.
- Ryan, S. N. (1995) The Effect Of Chronic Heat-Stress On Cortisol-Levels In The Antarctic Fish *Pagothenia-Borchgrevinki*. *Experientia*, V. 51, N. 8, P. 768-774.
- Santos, M. H., & Batista, L. (2007). Influência Do Processamento E Da Torrefação Sobre A Atividade Antioxidante Do Café (*Coffea arabica*), 30(3), 604-610.
- Satish-Kumar, M., J. Hermann, T. Tsunogae, and Y. O. (2006). Carbonation of Cl-rich scapolite boudins in Skallen, East Antarctica: Evidence for changing fluid condition in the continental crust. *J. Metamorphic Geol*, 24, 241-261.
- Scott, G. R., & Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic toxicology Amsterdam Netherlands*, 68(4), 369-392.
- Sen, A, & Kirikbakan, G. (2004). Biochemical characterization and distribution of glutathione S-transferases in leaping mullet (*Liza saliens*). *Biochemistry. Biokhimiia*, 69(9), 993-1000.
- Sentürker S, Karahalil B, Inal M, Yilmaz H, Müslümanoglu H, Gedikoglu G, Dizdaroglu M. (1997): Oxidative DNA base damage and antioxidant enzyme levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *FEBS Lett.*;416, 286-90.
- Shiloh MU, Macmicking JD, Nicholson S, Brause JE, Potter S, Marino M, Fang F, Dinauer M, Nathan C. Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 10: 29–38, 1999.
- Silman, I., & Sussman, J. L. (2005). Acetylcholinesterase: “classical” and “non-classical” functions and pharmacology. *Current opinion in pharmacology*, 5(3), 293-302.
- Silva de Assis, H. C. (1998) Der Einsatz Von Biomarkern zur summarischen Erfassung Von Gewässerverschmutzungen. Berlin, Tese (Doutorado em Ciências Naturais) – Universidade Técnica de Berlin.
- Simmons, T.W. & Jamall, I.S. (1988). Significance of alterations in hepatic antioxidant enzymes, primacy of glutathione peroxidase. *Biochemistry Journal*, 251: 913-917
- Skora A.V.; Neyelov K.E. (1992). Fish of Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica). *Polar Biology*, 12, 469–476.
- Somero, G. N.; Devries, A. L. (1967) Temperature tolerance of some antarctic fishes. *Science*, v. 156, n. 3772, p. 257-&. 1

- Somero, G. N.; Hochachka, P. W. (1968) Effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinases of rainbow trout and antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Biochemical Journal*, v. 110, n. 3, p. 395-&
- Somero, G. N.; Dahlhoff, E.; LIN, J. J. (1996). Stenotherms and eurytherms: mechanisms establishing thermal optima and tolerance ranges. *Society for Experimental Biology Seminar Series*, 59, 53-78.
- Somero, G. N. (2004) Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 139, n. 3, p. 321-333.
- Somero, G.N. (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine "winners" and "losers". *The Journal of Experimental Biology*. 213: 912-920.
- Stenesh, J. (1998). Bioindicadores de Contaminação em Peixes de Água Doce, por Exposição ao Chumbo (II): ensaios laboratoriais e estudos de caso preliminar no Rio Ribeira (SP/PR). *Biochemistry*.
- Štěpánková, Š. & Komers, K. (2008). Cholinesterases and Cholinesterase Inhibitors. *Enzyme*, 160-171.
- Storey, K. B. (1996). Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Brazilian journal of medical and biological research*, 29(12), 1715-33.
- Sturm, A., Silva, H. C., Assis, D., & Hansen, P. (1999). Cholinesterases of marine teleost fish: enzymological characterization and potential use in the monitoring of neurotoxic contamination. *Marine Environmental Research*, 47(4), 389-398.
- Targett, T. E. (1981). Trophic ecology and structure of coastal antarctic fish communities. *Marine Ecology-Progress Series*, 4, 243-263.
- Townsend, D. M., & Tew, K. D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, 22(47), 7369-75.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149.
- Van Dijk, P. L. M.; Tesch, C.; Hardewig, I.; Portner, H. O. (1999). Physiological disturbances at critically high temperatures: A comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). *Journal of Experimental Biology*, 202 (24), 3611-3621.
- Vasconcelos, S.L.M.; Goulart, M.O.F.; Moura, J.B.F.; Manfredini, V.; Benfato, M.S.; Kubota, L.T. (2007) Espécies Reativas De Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua determinação. *Quim. Nova*, 30, 5, 1323-1338.
- Verde, C., Parisi, E., & Prisco, G. (2003). The Evolution of Polar Fish Hemoglobin : A Phylogenetic Analysis of the Ancestral Amino Acid Residues Linked to the Root Effect. *Journal of Molecular Evolution*, 258-267.

- Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., & Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, 94(2), 114-22.
- Wells, P.G.; Kim, P.M.; Laposa, R.R.; Nicol, C.J.; Parman, T.; Winn, L.M. (1997) Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res.* 396, 65-78.
- Wilson, R. S.; Kuchel, L. J.; Franklin, C. E.; Davison, W. (2002) Turning up the heat on subzero fish: thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. *Journal of Thermal Biology*, 27, 5, 381-386.
- Zinkl G.J., Shea P.J., Nakamoto R.J., Callman J.(1987) Brain cholinesterase activity of rainbow trout poisoned by carbaryl. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*,38:29-35.

ANEXO I – TABELAS COM VALORES DE P

Notothenia rossii – Atividade da AChE encefálica

Temperatura	Dias de bioensaio			
	1	4	15	30
0 vs 4	p = 0,859648	p = 1,000000	p = 0,003285	p = 0,233735
0 vs 8	p = 0,000119	p = 0,026367	p = 0,032264	p = 0,021073
4 vs 8	p = 0,000123	p = 0,019638	p = 0,998333	p = 0,293735

Notothenia rossii – Atividade da GST encefálica

Temperatura	Dias de bioensaio			
	1	4	15	30
0 vs 4	p = 0,376046	p = 0,930128	p = 0,219972	p = 0,955672
0 vs 8	p = 0,983443	p = 0,026256	p = 1,000000	p = 0,237037
4 vs 8	p = 0,985017	p = 0,633382	p = 0,362003	p = 0,976307

Notothenia rossii – Nível de LPO encefálica

Temperatura	Dias de bioensaio			
	1	4	15	30
0 vs 4	p = 0,182864	p = 0,000123	p = 1,000000	p = 0,079795
0 vs 8	p = 0,196379	p = 0,001011	p = 0,990985	p = 0,970399
4 vs 8	p = 1,000000	p = 0,841133	p = 0,999751	p = 0,695791

Notothenia coriiceps – Atividade da AChE encefálica

Temperatura	Dias de bioensaio			
	1	4	15	30
0 vs 4	p = 0,000137	p = 1,000	p = 0,999542	p = 0,340567

Notothenia coriiceps – Atividade da AChE muscular

Temperatura	Dias de bioensaio			
	1	4	15	30
0 vs 4	p = 0,954923	p = 0,999718	p = 0,999549	p = 0,030242

Notothenia coriiceps – Atividade da GST encefálica

Temperatura	Dias de bioensaio			
	1	4	15	30
0 vs 4	p = 0,882098	p = 0,667619	p = 0,354956	p = 0,494145

Notothenia coriiceps – Atividade da AChE encefálica

Dias de bioensaio

Temperatura	1 vs 4	1 vs 15	1 vs 30	4 vs 15	4 vs 30	15 vs 30
0	p = 0,000221	p = 0,000181	p = 0,000140	p = 1,000000	p = 0,997447	p = 0,999551
4	p = 0,969698	p = 0,999999	p = 0,239743	p = 0,991443	p = 0,834772	p = 0,339649

Notothenia coriiceps – Atividade da AChE muscular

Dias de bioensaio

Temperatura	1 vs 4	1 vs 15	1 vs 30	4 vs 15	4 vs 30	15 vs 30
0	p = 1,000000	p = 0,998817	p = 0,971418	p = 0,999598	p = 0,983014	p = 0,999903
4	p = 0,810849	p = 0,969995	p = 0,023866	p = 0,999751	p = 0,513754	p = 0,246824

Notothenia coriiceps – Atividade da GST encefálica

Dias de bioensaio

Temperatura	1 vs 4	1 vs 15	1 vs 30	4 vs 15	4 vs 30	15 vs 30
0	p = 1,000000	p = 0,983368	p = 0,040517	p = 0,990311	p = 0,049366	p = 0,282245
4	p = 0,999838	p = 0,744212	p = 0,999985	p = 0,936998	p = 0,994794	p = 0,549702

Notothenia rossii – Atividade da GST encefálica

Dias de bioensaio

Temperatura	1 vs 4	1 vs 15	1 vs 30	4 vs 15	4 vs 30	15 vs 30
0	p = 0,917130	p = 0,026526	p = 0,999999	p = 0,663779	p = 0,991674	p = 0,083601
4	p = 0,999976	p = 0,894210	p = 0,999969	p = 0,529449	p = 0,983696	p = 0,997348
8	p = 0,009981	p = 0,629035	p = 0,754510	p = 0,794733	p = 0,675593	p = 1,000000

Notothenia rossii – Nível de LPO encefálica

Dias de bioensaio

Temperatura	1 vs 4	1 vs 15	1 vs 30	4 vs 15	4 vs 30	15 vs 30
0	p = 0,480901	p = 0,831024	p = 0,001703	p = 0,006797	p = 0,000121	p = 0,228754
4	p = 0,996897	p = 0,999859	p = 0,917693	p = 0,842283	p = 0,318255	p = 0,999512
8	p = 0,999987	p = 1,000000	p = 0,999993	p = 0,999840	p = 0,993006	p = 1,000000

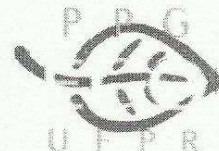
Notothenia rossii – Atividade da AChE encefálica

Dias de bioensaio

Temperatura	1 vs 4	1 vs 15	1 vs 30	4 vs 15	4 vs 30	15 vs 30
0	p = 0,999989	p = 0,999959	p = 0,998632	p = 0,986357	p = 0,0937266	p = 1,000000
4	p = 0,998459	p = 0,646907	p = 0,918095	p = 0,129563	p = 0,9999720	p = 0,025560
8	p = 0,061095	p = 0,000450	p = 0,000272	p = 0,898825	p = 0,0811146	p = 1,000000



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



PARECER

Os abaixo-assinados, membros da banca examinadora da defesa da dissertação de mestrado, a que se submeteu **Camile Foltran** para fins de adquirir o título de Mestre em Ecologia e Conservação, são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do trabalho de conclusão da candidata.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

Curitiba, 25 de maio de 2012.

BANCA EXAMINADORA:

Prof.ª Dra. Lucélia Donatti
Orientadora e Presidente

Prof.ª Dra. Silvia Romão
Membro

Prof.ª Dra. Marisa Fernandes de Castilho
Membro

Visto:

Prof.ª Dra. Maria Regina Torres Boeger
Coordenadora do PPG-ECO