



Universidade Federal do Paraná

Departamento de Biologia Celular

**IMPACTO DO FLUORETO NA RESPOSTA METABÓLICA
DO PEIXE ANTÁRTICO *NOTOTHENIA ROSSII*
(RICHARDSON, 1844) ACLIMATADO SOB CONDIÇÕES DE
ESTRESSE TÉRMICO E HIPOSMÓTICO.**

Edson Rodrigues Júnior
Dissertação de Mestrado

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

Curitiba – 2010

ÉDSON RODRIGUES JÚNIOR

IMPACTO DO FLUORETO NA RESPOSTA METABÓLICA DO PEIXE ANTÁRTICO *NOTOTHENIA ROSSII* (RICHARDSON, 1844) ACLIMATADO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE TÉRMICO E HIPOSMÓTICO.

Dissertação proposta ao Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

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

Curitiba – 2010

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Rodrigues Junior, Édson

Impacto do fluoreto na resposta metabólica do peixe antártico
Notothenia rossii (Richardson, 1844) aclimatado sob condições de estresse
térmico e hiposmótico. / Édson Rodrigues Junior. – Curitiba, 2010.
93 f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Lucélia Donatti

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular.

1. Peixe - Antártida 2. Fluoretos I. Título II. Donatti, Lucélia III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.


CDD (20. ed.) 597.09989


PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICCC/IOCRUZ)

PARECER

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:


Prof. Dra. Lucélia Donatti
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Francisco Filipak Neto
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dra. Sílvia Maria Suter Correa Cadena
Universidade Federal do Paraná - UFPR

E tendo como suplentes,


Prof. Dr. Metry Bacila
Universidade Católica do Paraná - PUCPR

Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir o mestrando **Edson Rodrigues Júnior**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Impacto do fluoreto na resposta metabólica do peixe Antártico *Notothernia rossii* (Richardson, 1844) aclimatado sob condições de estresse térmico e hiposmótico", é de parecer favorável à ~~aprovação~~ do acadêmico, habilitando-o(a) ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós Graduação.

Curitiba, 14 de dezembro de 2010


Prof. Dr. Fernando Mazzilli Louzada
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 168060

Dedico

A **Deus** por amenizar e me fortalecer em todas as etapas da minha vida, tornando os obstáculos cada vez mais tranquilos e transponíveis.

Aos meus **Pais e Irmãos**, por estarem sempre ao meu lado me apoiando e incentivando, ao longo de toda minha formação pessoal e profissional.

À minha **Noiva** pelo amor e dedicação incondicional.

**“Se um dia tiver que escolher entre o mundo e o amor...
Lembre-se. Se escolher o mundo ficará sem o amor, mas se escolher o amor com ele
você conquistará o mundo.”**
(Albert Einstein)

Agradeço

À Professora Dr^a. Lucélia Donatti, pela orientação, incentivo e companheirismo para que as etapas deste trabalho fossem transpostas com tranquilidade, destreza e qualidade.

Ao meu Pai e professor Edson Rodrigues, pelo apoio, incentivo e compreensão, sempre me guiando para uma melhor formação pessoal e profissional, demonstrando e desvendando os mais brilhantes e complexos caminhos da Ciência e da vida..

À minha mãe Maria de Fátima, por me escutar, aconselhar, acolher e corrigir sempre que precisei.. e quando achava que não precisava também.. durante toda minha vida..

Aos meus irmãos Aline e César, pela compreensão de estar sempre atarefado e com pouco tempo, por tornarem meus obstáculos cada vez mais amenos e agradáveis, por fazerem parte da minha história, tornando-a cada vez melhor.. e mais engraçada.

À minha incansável e dedicada noiva Marianni, por sua... compreensão, dedicação, companheirismo, incentivo e Amor.. por sempre estar ao meu lado nas dificuldades e conquistas, superando e apoiando para que todos obstáculos fossem transpostos com calma e serenidade.. pelo sacrifício e dedicação ao longo desses anos de trabalho e convívio.

Às primas Ana Cristina, Camila e Izabela, pelo apoio e sempre me acolherem durante minha estada em Curitiba.

À amiga Mariana Feijó de Oliveira, sendo de fundamental apoio para que este trabalho se realizasse, não medindo esforços, tanto na coletar quanto na compilação dos dados, sempre disposta a ajudar com seu conhecimento e serenidade nos momentos de maior preocupação..

Às amigas Danielle e Maria Rosa, pela paciência, esforço e amizade nos difíceis e intermináveis processos experimentais que envolveram esta dissertação.. essenciais para que os diferentes bioensaios fossem controlados com precisão.

Às companheiras de laboratório Camilla e Marina, pelo companheirismo e amizade.. primordiais nos momentos de descontração, amenizando e incentivando nos difíceis momentos laborais dessa dissertação..

Aos auxiliares, pelo fundamental trabalho no laboratório, providenciando sempre todo material necessário para pesquisa, ..ao Ronaldo Paulo Merenda... pela grande amizade, descontração, grande incentivo e interesse nas diversas áreas da ciência.. por tornar a convivência no laboratório mais harmônica e agradável, indispensável nos momentos de tensão.. ; a Kelly, que me acompanha e auxilia desde a graduação, sempre disposta a ajudar e fornecer todo material necessário, animando e nos apoiando sempre que possível.

Às professoras do Laboratório de Bioquímica da Universidade de Taubaté, Gannabathula Sree Vani, pelo exemplo de pessoa, e incentivo desde muito tempo atrás, Cecília Suda e professora Kassab, pelo apoio e incentivo científico e acadêmico.

Aos amigos, Danilo, Priscila e Camille da Universidade Federal do Paraná, auxiliando-me e guiando-me durante todo processo metodológico que envolveu o processamento e análise de microestruturas.

Aos professores Ciro Alberto de Oliveira e Francisco Filipak, do laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal do Paraná, que gentilmente abriram as portas do laboratório, acrescentando e enaltecendo este trabalho de grande conhecimento, agradeço a amizade e apoio científico.. essenciais para minha formação.

A Universidade de Taubaté, por ceder o espaço físico do laboratório de Bioquímica, para a realização de todas as análises bioquímicas que compreenderam esta dissertação.

À Marinha do Brasil, a qual forneceu apoio logístico, e imprescindível durante toda fase de coleta, realização dos bioensaios e transporte do material biológico para o Brasil.

Ao Arsenal de Marinha do Rio de Janeiro, de suma importância para que a logística dos bioensaios fosse realizada com sucesso.

À SECIRM pelo apoio logístico e incentivo durante toda Operação Antártica.

Ao CNPq, pelo apoio e fomento, indispensável para a realização dessa dissertação.

A CAPES e ao REUNI, pelo apoio financeiro durante grande parte do período que cursei a pós-graduação.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. História Paleoclimática da Antártida.....	19
1.2. Evolução, Biodiversidade e Adaptações Moleculares da Ictiofauna.....	21
1.3. Malha Trófica do Ecossistema Antártico.....	24
1.4. Ilha Rei George	28
1.5. Objetivos	29
1.6. Justificativa	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	33
2.1. Material Biológico.....	33
2.2. Protocolo Experimental	35
2.3. Obtenção de Homogeneizados Teciduais.....	37
2.4. Procedimentos Analíticos.....	37
2.4.1. Constituintes Plasmáticos.....	37
2.4.2. Determinação da atividade enzimática	39
2.4.3. Conteúdo Protéico dos Homogeneizados	42
2.5. Procedimentos de Microscopia.....	42
2.5.1. Microscopia de Luz	42
2.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	42
2.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	43
2.5.4. Alterações celulares analisadas.....	43
2.6. Tratamento Estatístico	44
3. RESULTADOS.....	45
3.1. Morfologia e Histopatologia Branquial	45
3.1.1. Estrutura padrão das brânquias de <i>Notothenia rossii</i>	45
3.1.2. Alterações histopatológicas e ultraestruturais	
das brânquias de <i>Notothenia rossii</i>	48
3.2. Parâmetros Metabólicos da <i>Notothenia rossii</i>.....	50
3.2.1. Parâmetros Sanguíneos.....	51
3.2.2. Metabolismo Branquial	55
3.2.3. Metabolismo Renal	59
4. DISCUSSÃO	65

4.1. Ecofisiologia e Modulação Metabólica	72
5. CONCLUSÕES	83
6. REFERÊNCIAS.....	85

Figuras

Figura 1. Corrente Circumpolar Antártica	20
Figura 2. Temperatura da água do oceano austral durante a era cenozóica.....	21
Figura 3. Fauna de peixes antárticos descritos ao sul da Frente Polar Antártica	23
Figura 4. Produtividade primária do ambiente marinho da Ilha Adelaide, Antártida	25
Figura 5. Malha trófica antártica	27
Figura 6. Localização da ASMA, Ilha Rei George (Antártica)	29
Figura 7. Inter relações do metabolismo energético.....	32
Figura 8. Localização dos pontos de coleta de <i>Notothenia rossii</i>	33
Figura 9. Lancha oceanográfica “Skua” e bote pneumático	34
Figura 10. Módulo de aquários da Estação Antártica Comandante Ferraz.....	36
Figura 11. Leitor de microplacas Fluostar Optima	38
Figura 12. Microscopia Eletrônica de Varredura de brânquias de <i>Notothenia rossii</i>	46
Figura 13. Microscopia Eletrônica de Transmissão de brânquias de <i>Notothenia rossii</i>	47
Figura 14. Microscopia de Luz das brânquias de <i>Notothenia rossii</i>	48
Figura 15. Histograma com a freqüência das principais histopatologias encontradas em <i>Notothenia rossii</i>	49
Figura 16. Freqüência das histopatologias encontradas nos experimentos associados à presença de fluoreto	50
Figura 17. Níveis plasmáticos de proteínas	53

Figura 18. Níveis plasmáticos de eletrólitos não protéicos.....	54
Figura 19. Níveis plasmáticos de metabólitos não protéicos.....	55
Figura 20. Atividade das enzimas branquiais de <i>Notothenia rossii</i> , na condição experimental controle (SFD035).....	55
Figura 21. Níveis relativos de enzimas branquiais de <i>Notothenia rossii</i> (experimento FD035).....	56
Figura 22. Níveis relativos de enzimas branquiais de <i>Notothenia rossii</i> (experimentos SFD435 e FD435).....	57
Figura 23. Níveis relativos de enzimas branquiais de <i>Notothenia rossii</i> (experimentos SFD020 e FD020).....	58
Figura 24. Níveis relativos de enzimas branquiais de <i>Notothenia rossii</i> (experimentos SFD420 e FD420).....	59
Figura 25. Atividade das enzimas renais de <i>Notothenia rossii</i> , na condição experimental controle (SFD035).....	60
Figura 26. Níveis relativos de enzimas renais de <i>Notothenia rossii</i> (experimento FD035).....	61
Figura 27. Níveis relativos de enzimas renais de <i>Notothenia rossii</i> (experimentos SFD435 e FD435).....	62
Figura 28. Níveis relativos de enzimas renais de <i>Notothenia rossii</i> (experimentos SFD020 e FD020).....	63
Figura 29. Níveis relativos de enzimas renais de <i>Notothenia rossii</i> (experimentos SFD420 e FD420).....	64
Figura 30. Níveis relativos de enzimas branquiais de <i>Notothenia rossii</i> (experimentos SFD035, SFD020, SFD435, SFD420).....	68
Figura 31. Níveis relativos de enzimas renais de <i>Notothenia rossii</i> (experimentos SFD035, SFD020, SFD435, SFD420).....	70
Figura 32. Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo Branquial de <i>N. rossii</i> (FD035).....	73
Figura 33. Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo Renal de <i>N. rossii</i> (FD035).....	75
Figura 34. Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo Branquial de <i>N. rossii</i> (FD435).....	76

Tabelas

Tabela 1. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nas brânquias de <i>Notothenia rossii</i>.....	49
Tabela 2. Tabela 2: Número de espécimes de <i>Notothenia rossii</i> viáveis após a conclusão do bioensaio (11 dias).....	51

Lista de Abreviaturas

$\mu\text{gF}^-/\text{g}$	micrograma de fluoreto por grama
μL	microlitro
μM	micromolar
ACC	Corrente Circumpolar Antártica
AFGP	Proteína anticongelante
Alb	Albumina
ALFAC	Fixador (Álcool, Formaldeído e Ácido Acético Glacial)
AMP	Adenosina monofosfato
ARG	Arginase
ASMA	Área Antártica Especialmente Gerenciada
ATP	Adenosina Trifosfato
ATPase Na/K	Adenosina Trifosfatase de Sódio e Potássio
BCA	Acido bicinchonicic
C/F	Com Fluoreto
Ca^{2+}	Cálcio
Cl	Cloreto
Col	Colesterol
CS	Citrato sintase
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DP	Desvio Padrão
EACF	Estação Antártica Comandante Ferraz
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ENO	Enolase
ENSO	“El Nino Southern Oscillation”
FD020	Fluoreto na dieta, 0 °C, 20 psu
FD035	Fluoreto na dieta, 0 °C, 35 psu
FD420	Fluoreto na dieta, 4 °C, 20 psu
FD435	Fluoreto na dieta, 4 °C, 35 psu
g	grama
G-6-PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
Gli	Glicose
Glob	Globulina

GPase	Glicogênio Fosforilase
HCl	Ácido Clorídrico
HE	Hematoxilina Eosina
HK	Hexoquinase
[S] _{0,5}	Concentração do substrato que fornece metade da velocidade máxima da reação
Kcat	Constante catalítica
K _m	Constante de Michaelis
Km ²	Quilometro quadrado
LDH	Lactato Desidrogenase
m	metros
M	Molar
MDH	Malato desidrogenase
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Mg	Magnésio
mg	miligrama
mg/L	miligramas por Litro
Mg ²⁺	Íon magnésio
mM	milimolar
mU/mg/Kg	Miliunidade internacional por miligrama por quilograma
n	numero amostral de espécimes
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato – forma oxidada
NADPH+H ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato – forma reduzida
nm	Nanômetro
NOS	Espécies reativas de nitrogênio
p/v	Relação peso volume
PFK	Fosfofrutoquinase
Pi	Fosfato
PP	Punta Plaza
Prot	Proteínas Totais
PSU	Unidade Prática de salinidade (Practical Salinity Unity)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
S/F	Sem Fluoreto

SFD020	Sem fluoreto na dieta, 0 °C, 20 psu
SFD035	Sem fluoreto na dieta, 0 °C, 35 psu
SFD420	Sem fluoreto na dieta, 4 °C, 20 psu
SFD435	Sem fluoreto na dieta, 4 °C, 35 psu
TCA	Ciclo dos acidos tricarboxilicos
TG	Triglicerides
U/mg/Kg	Unidade internacional por miligrama por quilograma
U/mL	Unidade internacional por mL

RESUMO

A Antártica é considerada a região mais preservada do planeta e apresenta características de um ambiente único. A extinção da antiga fauna antártica e o estabelecimento da atual ocorreu sob a pressão seletiva das baixas temperaturas. Durante o inverno austral, a baixa produtividade primária do ambiente marinho antártico restringe a disponibilidade de alimento na coluna d'água e a sua transferência para o sistema bentônico. A Península Antártica é uma das três regiões do planeta que sofre aquecimento acelerado. O fluoreto presente no exoesqueleto do Krill antártico tem suscitado questões sobre a tolerância metabólica dos organismos que se alimentam de Krill à ação tóxica desse halogênio. O presente estudo objetivou entender o impacto do fluoreto da dieta, sobre o metabolismo glicolítico, glicogenolítico, do ciclo dos ácidos tricarbóxílicos, da via das pentoses e arginínolítico e as estruturas morfofuncionais, de brânquias e rins, do peixe antártico *Notothenia rossii* sob condições experimentais de estresse térmico (4 °C) e salino (20 psu). As principais alterações morfológicas branquiais observadas na condição trófica com fluoreto foram o descolamento branquial, hiperplasia e aneurisma. A condição salina em 20 elevou os níveis plasmáticos de glicose, proteínas totais e triglicérido, bem como reduziu o cálcio. O fluoreto trófico modulou positivamente os níveis de TG e potencializou o aumento glicêmico na condição salina em 20, mas não foi capaz de induzir alterações nos níveis de proteínas totais e albumina. O efeito do estresse térmico, salino e do fluoreto sobre os tecidos renal e branquial foram marcados por modulações de atividades enzimáticas. O estresse térmico modulou positivamente os níveis da ATPase Na/K do tecido branquial e negativamente a do tecido renal. A atividade arginínolítica branquial foi modulada positivamente na condição térmica de 4°C com fluoreto, e o tecido renal apenas na condição termo-salina 4-20 com fluoreto. O fluoreto trófico também foi capaz de modular os segmentos metabólicos ativador da glicose, glicogenolítico, glicolítico, "shunt" das pentoses e ciclo dos ácidos tricarbóxílicos. As principais alterações foram: a) elevação do potencial ativador da glicose na condição termo-salina 4-20 no tecido branquial e em 4-35 no tecido renal, em ambos os casos com fluoreto trófico; b) elevação da G6PDH na condição térmica em 4°C com fluoreto e na condição termo-salina 0-20 sem fluoreto em ambos os tecidos; c) comparado ao controle, a CS foi modulada negativa no tecido branquial em todas condições termo-salino-troficas, exceto na condição termo-salina 4-20 com fluoreto trófico onde a atividade foi modulada positivamente. d) comparada ao controle, a atividade da CS renal foi elevada no estresse térmico, independente da condição salina e de fluoreto trófico.

ABSTRACT

Antarctica is considered as best preserved region with a unique environmental characteristics. The extinction of the earlier fauna and establishment of the current fauna took place on the selective pressure of low temperatures. During the austral winter, the low primary production in the Antarctic marine environment restricts the available food in the water column and its transfer to the benthic chain. The Antarctic Peninsula is one of the three regions on the planet where the effect of the global warming is most pronounced. The fluoride in the exoskeleton in the Antarctic krill has given rise to questions about the metabolic tolerance in Krill eater organisms to toxic effect of this halogen. The objective of the present study is to understand the effect of dietary fluoride on the glycolytic and glycogenolytic metabolism, the tricarboxylic acid cycles, the pentose and argininolytic pathways and on the morphology and structural functions of the gills and kidneys of the Antarctic fish *Notothernia rossii* under experimental conditions of thermal (4 °C) and saline (20 psu) stress. The principal morphological changes in the gills arising from the trophic fluoride, was the gill detachment, hyperplasia and aneurism. Salinity of 20 psu, elevated the plasma levels of glucose, total proteins and triglycerides along with a reduction in calcium. At a salinity of 20psu, the trophic fluoride positively modulated the plasma levels of TG and increased glycaemia, but did not induce any changes in the total protein or albumin levels. The effect of thermal, saline and fluoride stress on the gill and renal tissues were marked by the enzymatic activity modulation. Thermal stress positively modulated the levels of ATPase Na/K in the gill tissues and negatively in the renal tissues. The gill argininolytic activity was positively modulated at 4°C and in the presence of fluoride, whereas in the renal tissues, this positive modulation appears only at 4°C-20psu with fluoride. The trophic fluoride alone had the capacity to modulate the activator segments of glucose, glycogenolytic, glycolytic, the pentose “shunt” and tricarboxylic acid cycle. The principal changes were a) elevation of the activation potential of glucose at 4-20 in the gill tissues and at 4-35 in renal tissues, in both cases with trophic fluoride b) elevation of G6PDH at 4°C with fluoride and at 4°C-20psu without fluoride in both tissues; c) compared to the controls, CS was negatively modulated in the gills tissues for all trophic thermo-salinity conditions, except at 4-20 with trophic fluoride where it is positively modulated. d) compared to the controls, the renal CS activity was elevated under thermal stress independent of the salinity or trophic fluoride.

1. INTRODUÇÃO

O isolamento da Antártida pela corrente circumpolar (Barker e Thomas, 2004), as temperaturas baixas e estáveis, o elevado endemismo de peixes e invertebrados (Eastman, 1993), os níveis naturalmente elevados de metais pesados em algumas regiões litorâneas (Ahn, et al., 1996) e as restrições alimentares impostas pela sazonalidade (Rodrigues, et al., 2009), tornam esse ambiente único para estudos de evolução e adaptação.

1.1. História Paleoclimática da Antártida

Há cerca de 80 milhões de anos o processo de fragmentação do supercontinente Gondwana ainda não havia sido finalizado e a Antártida permanecia fisicamente ligada à Austrália. A temperatura superficial da água do mar mantinha-se de 12 a 14 °C. No final do Paleoceno e início do Eoceno, a região correspondente à Antártica aqueceu e a temperatura superficial da água do mar atingiu valores entre 17 a 20 °C e, nos milhões de anos subseqüentes, essa temperatura foi declinando gradativamente, com registros esporádicos de aquecimento (Andrew Clarke e Ian A. Johnston, 1996).

O isolamento oceanográfico da Antártida ocorreu há cerca de 35 a 22 milhões de anos com a separação da Tasmânia, e a abertura da Passagem de Drake, que separou por completo a América do Sul da Península Antártica. Os eventos tectônicos que propiciaram o surgimento da Corrente Circumpolar Antártica (ACC) (Pfuhl e McCave, 2005), protagonizaram uma das principais reorganizações climática-geológicas da história (figura 1). Esses eventos foram acompanhados de ampla e súbita glaciação, declínio do CO₂ atmosférico e extinção em massa de várias espécies terrestres e marinhas (DeConto e Pollard, 2003; Clarke, et al., 2007).

As mudanças climáticas ocorridas no período de Eoceno-Oligoceno foram responsáveis pela extinção de grandes predadores como *durophagous* (peixe “quebaconcha”), crustáceos decápodos, tubarões e raias, os quais apresentavam ampla distribuição global e desapareceram do ambiente marinho Antártico. Concomitante a esse processo, a radiação evolucionária pós-Paleozoica regrediu a comunidade bentônica Antártica a níveis arcaicos, nas quais os principais predadores bentônicos são nemátodos, estrelas do mar e outros invertebrados (Aronson, et al., 2009).

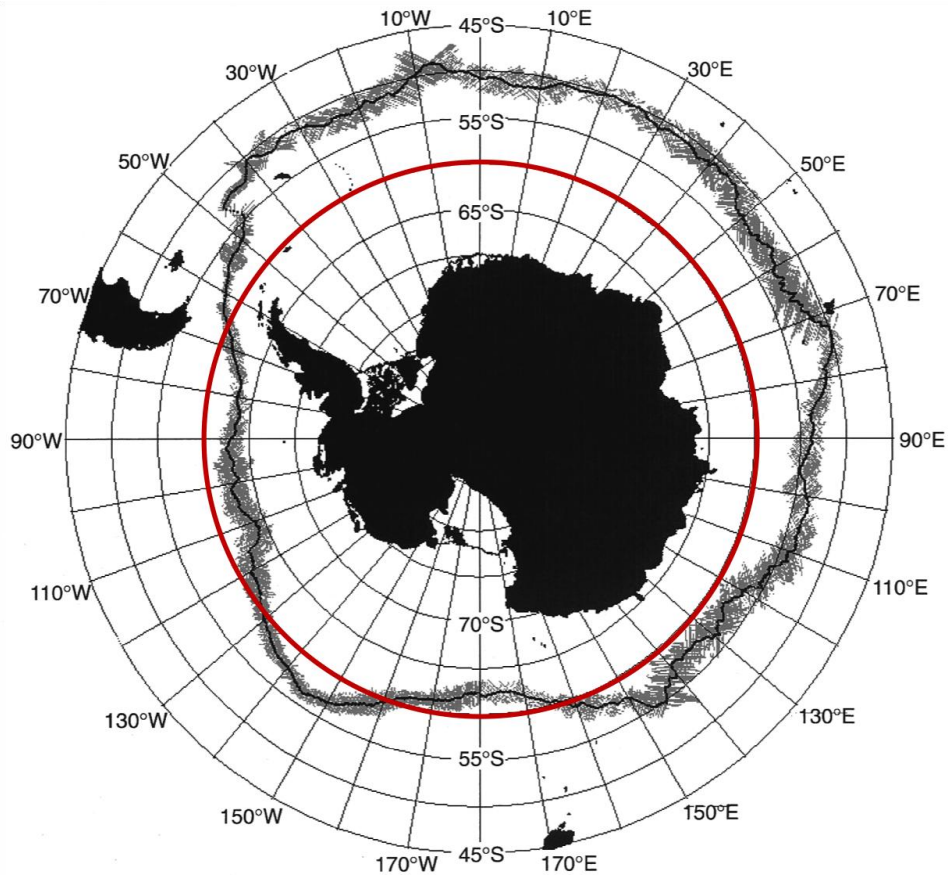


Figura 1. Corrente Circumpolar Antártica, formando a Frente Polar ou Convergência Antártica, e responsável pelo isolamento do oceano Austral em relação aos demais oceanos (Adaptado de Moore et al. (1999)).

Em meados do mioceno (≈ 20 milhões de anos) a temperatura da água sofreu elevação de aproximadamente $3\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, na sequência, declinou em cerca de 4 a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, intercalando breves períodos de aquecimento (figura 2). No final do Plioceno e início do Pleistoceno (≈ 5 milhões de anos), a temperatura da água do mar oscilou entre 2 a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, desencadeando a retração de áreas cobertas por gelo marinho em regiões próximas ao litoral, proporcionando um novo habitat para ocupação e diversificação de organismos. Na sequência de eventos, a temperatura superficial da água do mar declinou lentamente para os valores atuais, que oscila entre a temperatura da interface da água do mar com o gelo marinho e $+1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Andrew Clarke e Ian A. Johnston, 1996; Barnes, et al., 2006).

1.2. Evolução, Biodiversidade e Adaptações Moleculares da Ictiofauna

Comparada com a ictiofauna global, representada por 16.764 espécies de peixes, a antártica apresenta baixa diversidade com cerca de 322 espécies (Eastman, 2005) distribuídas em uma área correspondente a 10% do total dos oceanos. Isso significa que apenas 1,9% das espécies marinhas de peixes estão representadas nos mares antárticos (Eschmeyer, et al., 2010).

Dados compilados da ictiofauna antártica, presente ao sul do Fronte Polar Antártico (figura 3), revelaram que das 50 famílias de peixes antárticos, 19 são de peixes bentônicos, totalizando 222 espécies (70% da ictiofauna). O grupo perciforme Notothenioidei é o mais expressivo e congrega 101 espécies bentônicas distribuídas em seis famílias. O endemismo da ictiofauna antártica é no mínimo três vezes maior do que qualquer outro ambiente marinho isolado e tem sido estimado em 88% (Eastman, 2005). Essa baixa diversidade e elevado endemismo tem sido atribuída a pressão seletiva das sucessivas glaciações, a produtividade primária sazonal do oceano austral e ao isolamento físico imposto pela ACC (Eastman, 1993).

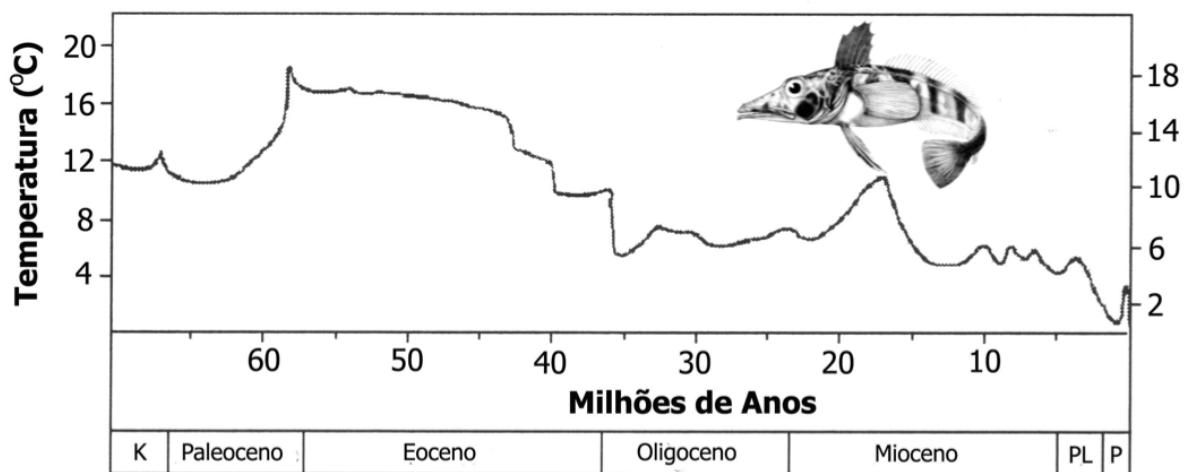


Figura 2. Temperatura da água do oceano austral durante a Era Cenozóica. O final do período Cretáceo (K) foi marcado por alterações climáticas que levaram a extinção em larga escala de diversos organismos (Adaptado de Clarke (1996)).

Como a temperatura interfere diretamente nas velocidades das reações químicas, diversos estudos foram conduzidos por bioquímicos e fisiologistas antárticos com o objetivo de entender as adaptações moleculares experimentadas pelos ectotérmicos

antárticos, em temperaturas subzero, ao longo do processo evolutivo (Fields e Somero, 1998; Hochachka e Somero, 2002b).

O sucesso adaptativo da atual ictiofauna antártica tem sido atribuído à seleção de mecanismos moleculares capazes de compensar o efeito negativo das baixas temperaturas sobre a velocidade das reações químicas. A seleção de sistemas enzimáticos, com propriedades cinéticas adaptadas às baixas temperaturas, viabilizou, de forma eficaz, as velocidades das reações em temperaturas subzero. Estudos cinéticos com a enzima lactato desidrogenase (LDH) revelaram que o processo evolutivo selecionou formas moleculares com propriedades cinéticas diferenciadas, caracterizadas pelos baixos valores de K_m e elevados de K_{cat} . Essa eficiência tem sido associada a seleção de estruturas protéicas mais flexíveis, capazes ligar e converter o substrato em produto, na condição subzero de temperatura dos mares antárticos, quando comparadas a proteínas homólogas de peixes de regiões temperadas (Somero, 2004). Nesse sentido, Rodrigues et al., (1994) observaram um comportamento semelhante trabalhando com a enzima fosfofrutoquinase (PFK) do músculo epaxial do peixe antártico *Trematomus bernacchii*. O valor de $[S]_{0,5}$ da PFK foi 20 vezes menor na temperatura de 5 °C do que o valor determinado a 20 °C. O estudo também evidenciou que o efeito inibitório do ATP sobre a atividade da PFK é menor a 5 °C do que a 20 °C, indicando que a adaptação enzimática dos peixes antárticos não está restrita apenas à capacidade de ligar e transformar substratos em produtos, mas também na modulação da atividade de enzimas reguladoras como a PFK.

Os peixes antárticos também experimentaram as adaptações morfofuncionais responsáveis pela manutenção dos sistemas fisiológicos. O baixo hematócrito dos peixes antárticos tem sido visto como um mecanismo compensatório que se opõem ao aumento da viscosidade sanguínea determinado pelas temperaturas subzero. Ainda nesse sentido, os tecidos de peixes antárticos apresentam densidade capilar e mitocondrial elevadas que são pontuadas com adaptações morfológicas compensatórias à redução do hematócrito (Di Prisco, et al., 2002; Johnston, 2003). Essas adaptações morfofuncionais são mais evidentes nos peixes da família Channichthyidae, onde a incapacidade de sintetizar hemoglobina foi acompanhada pelo aumento do débito cardíaco, da densidade capilar e do número de mitocôndrias (Fitch, et al., 1984; Sidell, 1998; O'Brien e Sidell, 2000; Eastman e Lannoo, 2004; Sidell e O'Brien, 2006)

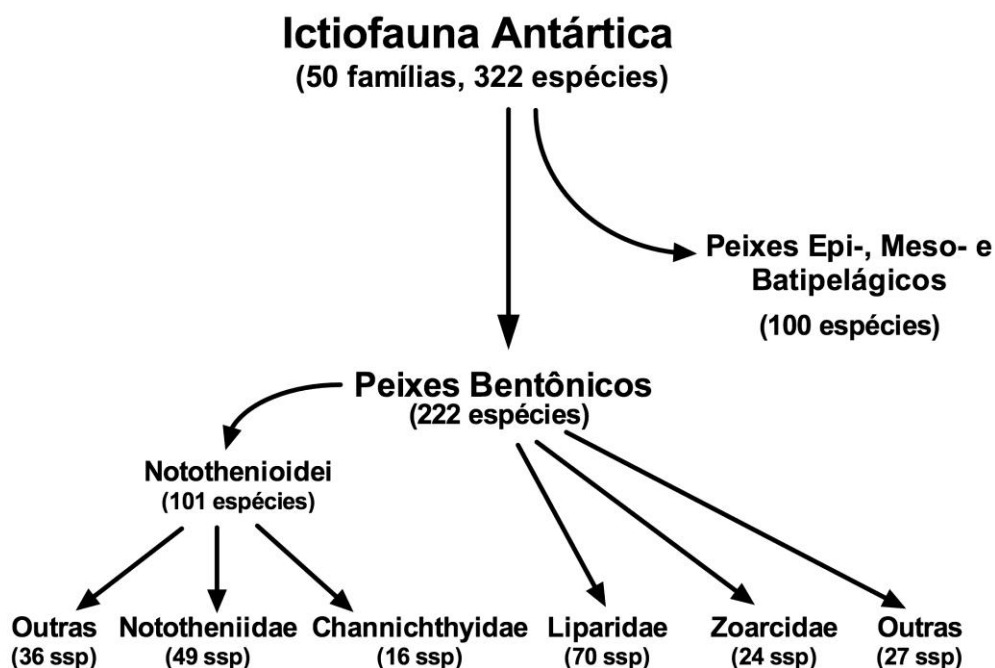


Figura 3. Fauna de peixes antárticos descritos ao sul da Frente Polar Antártica. As espécies bentônicas da classe perciforme Notothenioidei dominam o ambiente marinho antártico (Dados compilados de Eastman (2005)).

Contudo, o evento molecular de maior relevância adaptativa foi o surgimento das glicoproteínas anticongelantes (AFGP) no sangue dos notothenioides antárticos, a cerca de 5 a 14 milhões de anos, considerado como responsável pela fluidez dos fluídos biológicos em temperaturas subzero. Essas glicoproteínas evitam o crescimento de cristais de gelo e o congelamento completo do sangue, mediante mecanismos que independem do efeito coligativo de solutos (Harrison, et al., 1987). A secreção de AFGP na luz intestinal evita o congelamento da água do mar do trato digestório e viabiliza os processos de digestão e absorção. Embora o fígado tenha capacidade de sintetizar AFGP, os principais sítios de síntese são o pâncreas e a parte anterior do estômago (Cheng e Detrich III, 2007). A provável origem evolutiva das AFGP reside na mutação do gene da proteína digestiva tripsinogênio (Chen, et al., 1997).

A temperatura é considerada o principal fator abiótico que influencia a biogeografia (Hochachka e Somero, 2002b). Nesse sentido, os crustáceos da família Lithodidae (Crustacea: Decapoda: Anomura), encontrados normalmente nos oceanos profundos, são encontrados apenas de forma isolada em algumas regiões próximas à Península Antártica. Experimentos laboratoriais revelaram que as formas larvais desses

crustáceos não se desenvolvem adequadamente em temperaturas entre 0 a 2 °C. Dessa forma, o limite biogeográfico desses organismos se estende até as latitudes ao sul, nas quais a temperatura da água encontra-se acima de 0,5 °C. Essa indispensável adaptação termofisiológica dificulta o desenvolvimento larval desses predadores e impede a invasão dos mares Antárticos (Hall e Thatje, 2010). A ineficiência adaptativa de crustáceos brachyura e anomura adultos, às baixas temperaturas, tem sido associada ao controle de magnésio nos fluídos biológicos e, nessas condições, a ineficiência metabólica aeróbia desses crustáceos em temperaturas abaixo de +1,0 °C leva ao acúmulo de produtos do metabolismo anaeróbio e dificulta o controle dos níveis de magnésio. Assim, o acúmulo de Mg^{2+} nesses crustáceos tem efeito narcótico letal em baixas temperaturas (Frederich, et al., 2001; Aronson, et al., 2009).

1.3. Malha Trófica do Ecossistema Antártico

A produção primária do oceano austral apresenta elevada sazonalidade, com baixa produtividade durante o longo período de inverno e elevada durante o verão. No período que se estende do mês de abril até novembro, a baixa incidência solar e o aumento da cobertura de gelo sobre a superfície dos mares antárticos limitam a produção primária fitoplanctônica (figura 4), em especial no que diz respeito aos ambientes marinhos próximos ao litoral (Brockington, 2001).

O impacto da disponibilidade sazonal de alimentos sobre o comportamento bioquímico e fisiológico dos organismos antárticos varia muito em função da sua posição na cadeia alimentar. Os organismos herbívoros, em especial os filtradores, estão mais expostos ao impacto da sazonalidade, enquanto os detritívoros e predadores de topo da cadeia podem encontrar com maior facilidade o seu alimento durante o inverno (Clarke, 1988).

Durante o longo período de inverno, alguns organismos antárticos experimentam um estado de dormência metabólica, reduzindo o consumo de oxigênio e limitando as suas atividades fisiológicas. O comportamento do filtrador *Laternula elliptica* é um exemplo de adaptação a essa condição sazonal extrema. Esses bivalves, que apresentam ampla distribuição circumpolar, ocorrem em manchas densas e vivem enterrados no sedimento, em profundidades de 30 a 40 cm, de onde projetam o seu sifão até a superfície para viabilizar o processo de filtração. Durante o inverno austral, quando a concentração de clorofila *a* sofre drástica redução, a *L. elliptica* retrai o sifão durante boa parte do tempo, interrompe o processo de filtração, reduz o consumo de oxigênio e

experimenta um estado de dormência metabólica marcado pelo reduzido consumo de oxigênio (Rodrigues, et al., 2007).

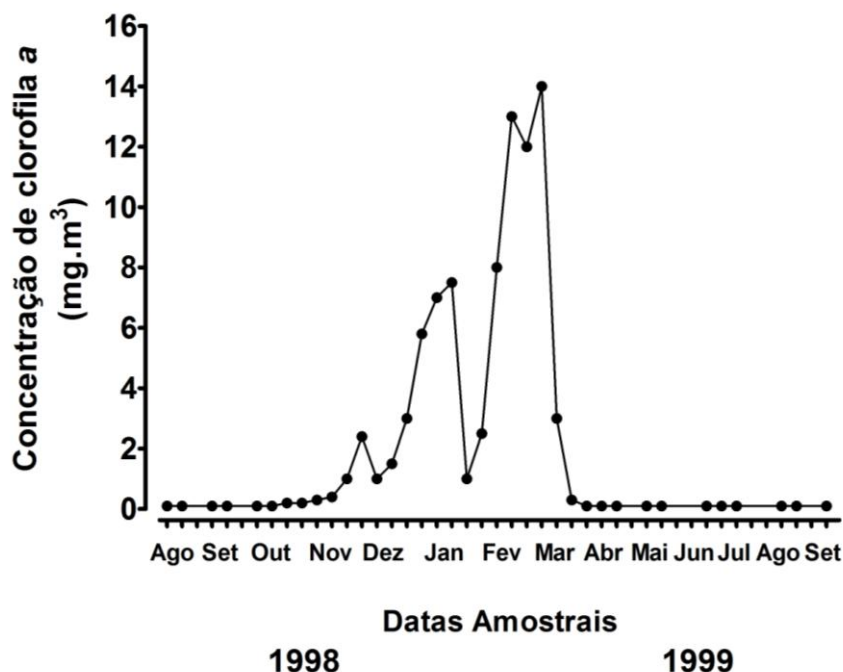


Figura 4. Produtividade primária do ambiente marinho da Ilha Adelaide, Antártida, próximo à Estação Científica de Rothera - Programa Antártico Britânico, em profundidade de 15m. A concentração total de clorofila a foi determinada entre agosto de 1998 e setembro de 1999. Durante o longo inverno antártico (6 meses) a produtividade foi extremamente baixa em comparação aos meses de verão (Adaptado de Bronckington (2001)).

O metabolismo desse molusco é baseado em proteínas e a excreção nitrogenada se faz principalmente na forma de amônia (90%) e uréia (10%) (Brockington, 2001). A formação de uréia em organismo preponderantemente amoniotélicos tem sido atribuída a hidrólise do aminoácido L-arginina em uréia e L-ornitina (Rodrigues, et al., 2007).

O tecido branquial de alguns moluscos marinhos apresentam atividade arginínolítica elevada como forma de controlar os níveis de L-arginina nos fluídos biológicos e promover a excreção de uréia (Carvajal, et al., 1984; Carvajal, et al., 1988). Contudo, o tecido renal da *L. elliptica* apresenta a maior atividade arginínolítica e o maior potencial gerador de ATP, quando comparado aos demais tecidos. O papel central desse tecido pode estar relacionado com a retração do sifão e a conseqüente redução da taxa de filtração

durante o inverno, o que pode limitar os processos excretórios branquiais (Rodrigues, et al., 2009).

Essa distribuição sazonal de alimento na coluna d'água é marcante sobre a biomassa de Krill antártico, que apresenta pico de produtividade no período entre os meses de novembro a abril, correspondente ao verão austral (Siegel, 2005). Esse pequeno crustáceo zooplanctônico é alimento direto ou indireto de todos os vertebrados antárticos (figura 5) (Ross e Quetin, 1986; Nicol e de la Mare, 1993).

A bioacumulação de fluoreto no exoesqueleto do Krill e a sua biomagnificação nos vertebrados que se alimentam de Krill (peixes, pingüins e focas), expõem sistemas enzimáticos aos efeitos desse halogênio que é o elemento químico de maior reatividade (Adelung, et al., 1985; Sands, et al., 1998; Camargo, 2003). A concentração de fluoreto no exoesqueleto de crustáceos marinhos varia de aproximadamente 20 a 6000 $\mu\text{gF}^{-1}/\text{g}$ de peso seco. As maiores concentrações foram encontradas no exoesqueleto dos crustáceos antárticos, *Euphausia crystallorophias* (5977 $\mu\text{gF}/\text{g}$ de peso seco) e *Euphausia superba* (2594 $\mu\text{gF}/\text{g}$ de peso seco), embora a concentração muscular seja relativamente baixa, variando entre 0,78 à 257 $\mu\text{gF}/\text{g}$ de peso seco (Adelung, et al., 1987; Sands, et al., 1998). Os efeitos tóxicos agudos do fluoreto, que precedem a morte de peixes, são: hipoeccitabilidade, velocidade respiratória reduzida, letargia e comportamento apático, bem como níveis elevados de fluoreto no sangue (Sigler e Neuhold, 1972; Camargo e Tarazona, 1991).

Embora a base molecular da fluorose ainda seja pouco conhecida, o efeito tóxico primário do fluoreto reside na inibição enzimática. Enzimas como as enolases, arginases, succinato desidrogenases, dentre outras (Camargo, 2003; Rodrigues, et al., 2009) são inibidas diretamente por fluoreto. A fluorose também acelera a formação de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e NOS) e peroxidação de lipídeos e o aumento da atividade do sistema antioxidante (Zhang, et al., 2007; Lu, et al., 2010), causando deformações morfológicas e neoplásicas (Tsutsui, et al., 1984), colapsando o funcionamento do retículo endoplasmático (RE), ocasionando inibição da síntese e secreção protéica (Sharma, et al., 2008), e, conseqüentemente, dependendo da dose/concentração, acarretando severo risco a saúde de organismos aquáticos e terrestres (Camargo, 2003).

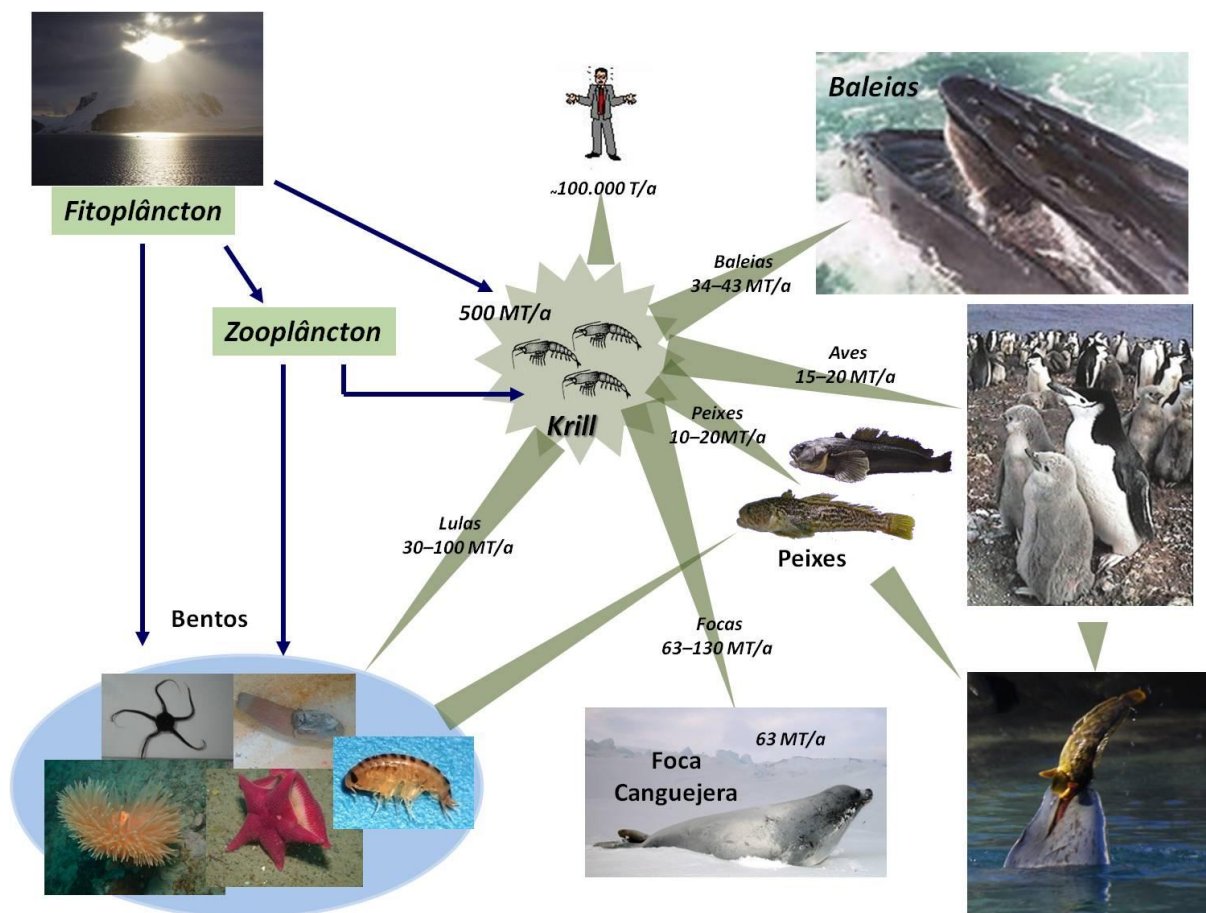


Figura 5. Segmento trófico de organismos que direta ou indiretamente se alimentam do Krill presente no ambiente marinho Antártico.

Lu, et al. (2010), estudando a resposta molecular do fluoreto sobre tecido hepático do peixe *Takifugu rubripes*, verificaram que a exposição ao fluoreto (35mg/L, dissolvidos em água do mar), eleva a expressão de 16 proteínas e a redução de outras 35, podendo ter relação com o efeito do fluoreto sobre o retículo endoplasmático. Nesse caso, uma série de proteínas mal formadas poderiam estar originando danos celulares, como por exemplo, alterações no DNA e ativação da cascata apoptótica (Ghiselli, 2006).

Em experimento, Angelovic et. al. (1961), submeteram trutas *Oncorhynchus mykiss* durante 10 dias, em aquários contendo fluoreto de 25 mg/L, sob condições de estresse térmico, resultando em redução da taxa de mortalidade, atribuída ao aumento da taxa metabólica. Nesse sentido, Neuhold e Singer (1962), observaram que o efeito tóxico do fluoreto sobre trutas *O. mykiss* é reduzido com o aumento da concentração de íons cloreto na água dos aquários, o qual pode estar favorecendo excreção desse halogênio.

Estudando o efeito do fluoreto sobre a enolase de organismos Antárticos, Bacila, et al. (1989) verificaram que a enolase do peixe Antártico *Notothenia coriiceps neglecta* é mais sensível a inibição pelo fluoreto do que a do pingüim papua e a do Krill Antártico. Além do efeito inibitório direto sobre a atividade enzimática, os níveis elevados de fluoreto podem prejudicar a síntese de proteínas, o metabolismo da glicose e alterar a composição de ácidos graxos insaturados de lipídeos estruturais e de reserva (Wang, et al., 2000).

Os peixes antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* são endêmicos da região antártica e representam duas das quatro espécies mais abundantes das Ilhas Shetlands do Sul, Antártida (Casaux, et al., 1990). A dieta desses peixes é muito diversificada, incluindo peixes, Krill, gastrópodes, poliquetas e fragmentos de algas (Barrera-Oro, 2002; Corbisier, et al., 2004). A migração vertical da *N. rossii* viabiliza a sua alimentação com organismos pelágicos (Casaux, et al., 1990), em especial Krill, o que justifica os níveis elevados de fluoreto encontrado no seu tecido ósseo, quando comparado aos de peixes marinhos de águas temperadas (Camargo, 2003).

1.4. Ilha Rei George

A região do arquipélago das Shetlands do Sul, apresentam os registros mais longos (últimos 40 anos), confiáveis e contínuos da temperatura superficial das águas, no entrono da península Antártica, em profundidades de 10 a 20m, sendo que a variabilidade térmica interanual dessas águas apresentam correlação com os fenômenos “El Niño” e “La Niña” (eventos ENSO – “El Niño Southern Oscillation”). Apesar da proximidade geográfica com as Ilhas Anvers e Geórgia do Sul nas duas ilhas, que também apresentam registros longos de temperatura, o aquecimento das águas litorâneas registrado no ano de 2002 na Ilha Rei George, em profundidades de 30 a 100m, foram incompatíveis com algumas das alterações registradas no litoral das ilhas Georgia do Sul e Anvers. A presença de fiordes poderia explicar essas anomalias térmicas no litoral da Ilha Rei George, semelhante ao que ocorre na Península Antártica (Barnes, et al., 2006).

A Ilha Rei George (62°02'S e 58°21'W), é a maior Ilha do Arquipélago das Shetlands do Sul, abriga instalações científicas de 5 Países (Brasil, Equador, EUA, Peru Polônia), um Sítio Especial de Interesse Científico (SSSI N° 8) e uma Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA), correspondente a Baía do Almirantado (figura 6), com 362 Km² (Braun, et al., 2001; Arigony-Neto, et al., 2004).

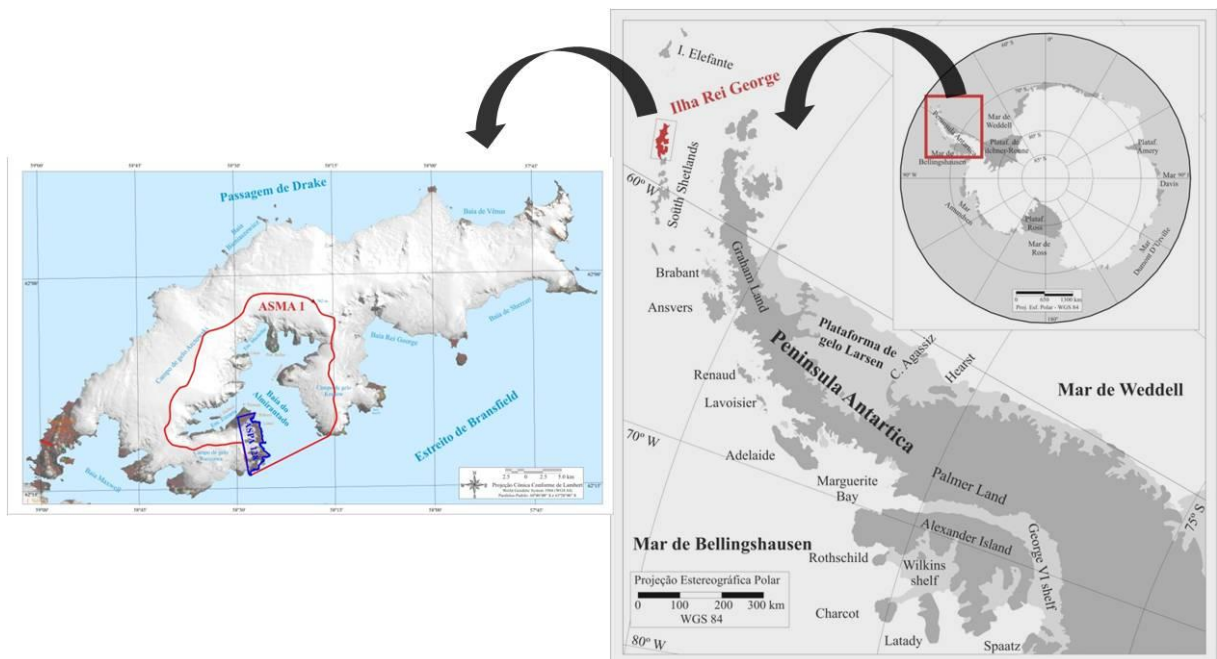


Figura 6. Localização da Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA) da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetlands do Sul, Antártida.

Essa longa série de registros térmicos, a presença de fiordes, o aquecimento acelerado da região, o derretimento das geleiras e a possível formação de microambientes marinhos com salinidade reduzida, decorrentes do aporte de água doce no ambiente marinho, justificam os estudos sobre o efeito da temperatura e salinidade sobre organismos marinhos do ambiente da Ilha Rei George.

1.5. Objetivos

O presente estudo objetivou entender o impacto do fluoreto presente na dieta sobre o metabolismo e estruturas morfofuncionais de brânquias e rins do peixe antártico *Notothenia rossii* sob condições experimentais de estresse térmico (4 °C) e hipossalino (20 psu). Especificamente procuramos entender como a dose de 15 mg de fluoreto por quilo de peixe, administrada via entérica, estaria causando impacto nos seguintes seguimentos: a) nos níveis plasmáticos de proteínas; b) nos níveis plasmáticos de metabolitos e eletrólitos não protéicos; c) nos níveis renais e branquiais de enzimas dos segmentos metabólicos

glicogenolítico, glicolítico, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), na via das pentoses e arginínolítico; d) nas estruturas morfofuncionais do tecido branquial.

1.6. Justificativa

O peixe *Notothenia rossii* é endêmico da região antártica e representa uma das quatro espécies dominantes da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártida. A temperatura do ambiente marinho antártico varia entre $-1,86\text{ }^{\circ}\text{C}$, na interface do gelo marinho com a água do mar durante o inverno, e chega a atingir, aproximadamente, $+2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante o verão (Barnes, et al., 2006). Excetuando as poças de maré e as enseadas muito estreitas, com entrada de grandes volumes de água doce proveniente do degelo, a salinidade da água do mar é de aproximadamente 35 psu (Romão, et al., 2001). Já a dieta desse peixe é diversificada, mas durante o verão austral, quando a densidade de Krill no ambiente marinho é elevada, a *N. rossii* se alimenta com quantidades consideráveis desse crustáceo e experimenta uma dieta rica em fluoreto (Barrera-Oro, 2002). Contudo, nessas condições, o fluoreto da dieta acaba se depositando, em parte, no tecido ósseo da *N. rossii* que funciona como um sistema tamponante de fluoreto, evitando o seu efeito tóxico sobre os tecidos moles (Camargo, 2003).

Contudo, a região da Península Antártica é uma das três áreas do planeta que vem sofrendo aquecimento acelerado, tendo aquecido $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ entre 1950 a 2006, contra $0,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ do restante do planeta (Clarke, et al., 2007). Considerando que ao longo dos últimos 50 milhões de anos a Antártida resfriou lentamente em $0,03\text{ }^{\circ}\text{C}$ a cada 100.000 anos (média) (Eastman, 1993), o aquecimento rápido e recente da região da Península Antártica tem preocupado a comunidade científica, que agora procura entender o efeito desse aquecimento sobre os limites da plasticidade metabólica de ectotérmicos antárticos.

No presente estudo, consideramos as condições de $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 35 psu como sendo próximas à ambiental da *N. rossii* da Baía do Almirantado e assumimos essa condição como controle experimental (bioensaio). A condição de estresse térmico foi definida em 4°C , considerando que acima dessa temperatura os peixes antárticos começam a manifestar alterações bioquímicas e fisiológicas (Mark, et al., 2005; Mark, et al., 2006). A escolha da salinidade de 20 psu, utilizada nos experimentos de hipossalinidade, levou em consideração a menor salinidade, 16,4 psu, descrita por Rakusa-Suszczewski (1993). Diante da ausência de informações sobre o consumo diário de Krill da *N. rossii*, optamos em estabelecer a sobrecarga de fluoreto com base na dieta de pingüins que chegam a ingerir

um quilo de Krill por dia (Volkman, et al., 1980). Nesse caso, a dose de 15 mg de fluoreto por quilo de massa de *N. rossii*, corresponde a ingestão de aproximadamente 50 g de Krill por quilo de peixe.

Nas condições naturais do ecossistema antártico, o fluoreto presente no exoesqueleto do Krill não exerce efeito tóxico sobre o metabolismo do peixe antártico *N. rossii* (Sands, et al., 1998). Contudo, não está claro o impacto do fluoreto sobre o metabolismo da *N. rossii* sob condições de estresse térmico e hipossalino. O conhecimento dos limites da plasticidade metabólica da *N. rossii*, sob estresse térmico e salino, no contexto de uma alimentação rica em fluoreto, pode contribuir para prever o impacto de alterações ambientais nas relações tróficas desse ecossistema.

A escolha dos tecidos renal e branquial levou em consideração o papel central desses tecidos no controle da osmolalidade dos fluidos biológicos, bem como possíveis rotas de saída do fluoreto e produtos de excreção.

Os marcadores histopatológicos escolhidos para avaliar o impacto do fluoreto no sistema respiratório branquial foram o descolamento de epitélios ou edema, hipertrofia de células, proliferação celular ou hiperplasia, aneurismas e vacuolização.

Os marcadores sanguíneos escolhidos para avaliar o comportamento metabólico foram proteínas totais e albumina, eletrólitos não protéicos (cloreto, magnésio, fosfato inorgânico e cálcio) e metabólitos não protéicos (glicose, triglicerídeos e colesterol), com o objetivo de avaliar o impacto do fluoreto sobre o metabolismo de proteínas plasmáticas, de íons envolvidos com o controle da osmolalidade e do metabolismo energético, bem como o controle dos níveis plasmáticos de metabólitos energéticos (Hochachka e Somero, 2002a).

Como marcadores metabólicos foram escolhidos as enzimas hexoquinase (HK), responsável pela introdução da glicose no metabolismo energético; glicogênio fosforilase (GPase), enzima reguladora da glicogenólise; glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), reguladora da via das pentoses e do pool redutor de NADPH+H⁺; fosfofructoquinase (PFK), principal enzima reguladora da via glicolítica e marca passo desse segmento metabólico; enolase (ENO), enzima sensível a inibição por fluoreto; lactato desidrogenase, marcadora do metabolismo anaeróbico; citrato sintase (CS), enzima marca passo do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e marcadora do metabolismo aeróbico; malato desidrogenase (MDH), marcadora do metabolismo aeróbico e enzima chave na conectividade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos com a gliconeogênese. Esse conjunto de enzimas integra

o metabolismo de carboidratos e direta ou indiretamente estão envolvidas com o potencial gerador de ATP e com a manutenção do potencial redox de $\text{NADPH}+\text{H}^+$, necessário para biossíntese de diversos compostos, em especial a de lipídeos, bem como para a defesa antioxidante das células (Hochachka e Somero, 2002a)

A enzima ATPase Na/K, foi escolhida como marcadora do gradiente de sódio e potássio necessário para manter o transporte ativo indireto de diversos metabólitos e íons inorgânicos, especialmente nas brânquias e rins (Marshall e Bryson, 1998).

Como marcadora do metabolismo do aminoácido L-arginina, escolhemos a arginase (ARG) devido o seu papel central na manutenção dos níveis do aminoácido L-arginina nos fluídos biológicos, necessário para síntese de proteínas e de óxido nítrico, um modulador de diversas atividades metabólicas, bem como na síntese do aminoácido não protéico L-ornitina, substrato do processo de síntese de poliaminas, vital para divisão celular (Jenkinson, et al., 1996). A figura 7 resume as inter-relações metabólicas dos principais segmentos metabólicos envolvidos no presente trabalho.

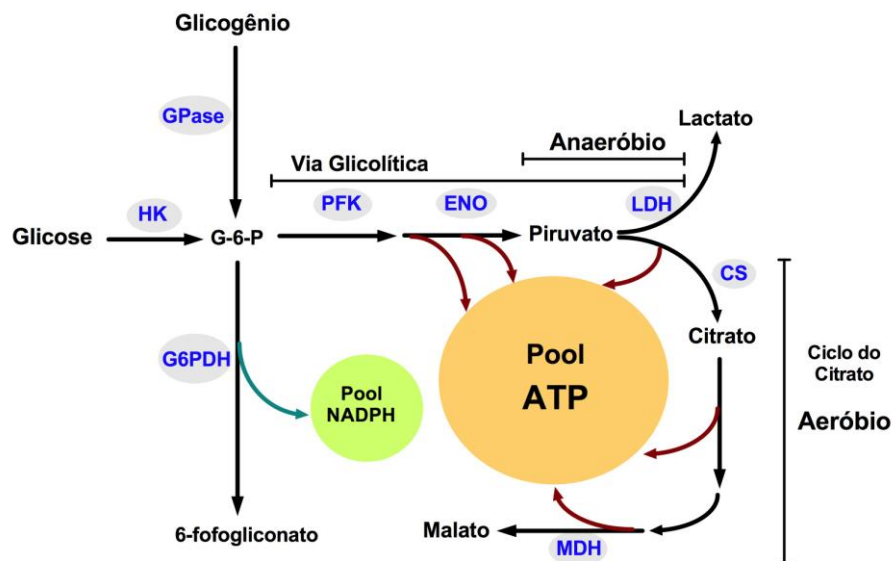


Figura 7. Principais inter relações do metabolismo energético e do potencial gerador de ATP celular, abordadas neste trabalho. Enzimas envolvidas nestas vias: HK – Hexoquinase; GPase – Glicogênio fosforilase; G6PDH – Glicose-6-fosfato desidrogenase; PFK – Fosfofrutoquinase; ENO – Enolase; LDH – Lactato desidrogenase; CS – Citrato sintase; MDH – Malato desidrogenase.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material Biológico

Espécimes de *N. rossii*, pesando entre 260 a 605 g, foram capturados na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártida, no período de novembro de 2009 a fevereiro de 2010, em profundidade de 10 a 20 metros, utilizando linha e anzol. Os peixes utilizados como “controle da Natureza” foram coletados em Punta Plaza (PP), local próximo à Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) e distante 10 Km da colônia de pingüins de Arctowski, e Glaciar Ecology (ECO), adjacente à colônia de pingüins de Arctowski (figura 8).

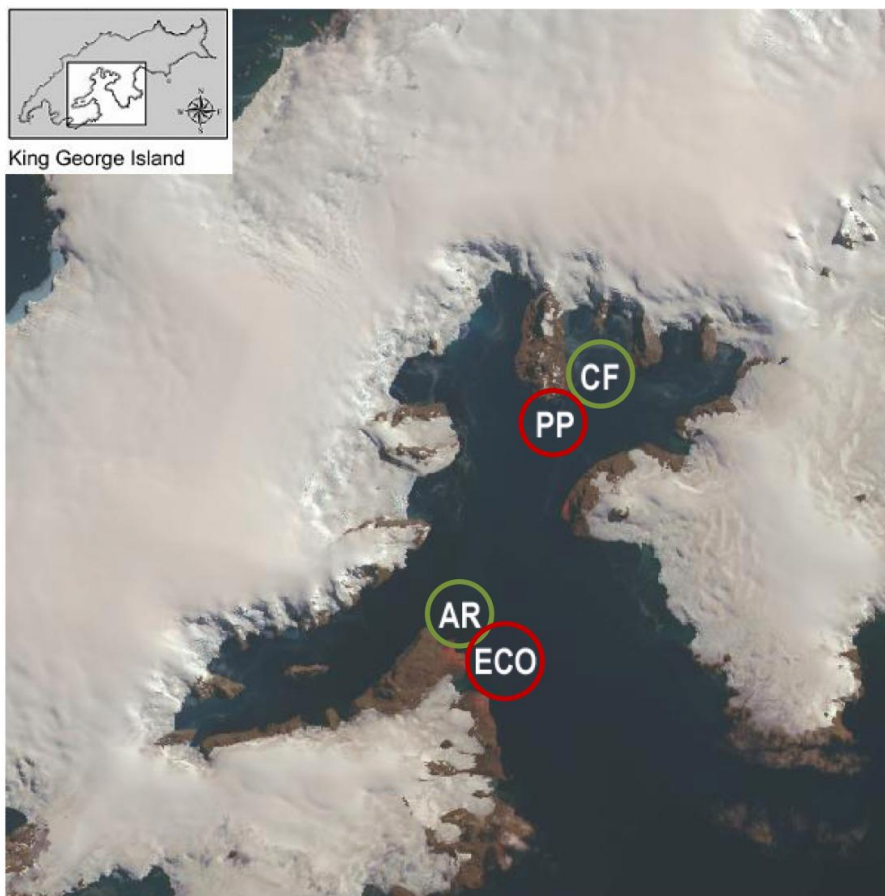


Figura 8. Localização dos pontos de coleta de *Nototothenia rossii* em Punta Plaza (PP) ($62^{\circ}05'26,9''S/58^{\circ}24'11,9''W$) e Glaciar Ecology (ECO) ($62^{\circ}10'03,5''S/58^{\circ}26'59,8''W$), bem como a localização da Estação Antártica Comandante Ferraz (CF) ($62^{\circ}05'0''S/ 58^{\circ}23'28''W$) e a Estação Científica de Arctowski (AR), na Baía do Almirantado – Ilha Rei George.

As coletas foram realizadas, preferencialmente, a bordo da lancha oceanográfica “Skua” e, eventualmente, em botes pneumáticos (figura 9). Na lancha “Skua” os peixes foram mantidos em aquários com renovação contínua de água. No bote pneumático os peixes foram mantidos em caixa de “marfinite” (volume de 0,15 m³). No retorno, os peixes foram imediatamente transferidos para os tanques aquário da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF).



Figura 9. Lancha oceanográfica “Skua” (A) e bote pneumático (B) em procedimento de coleta na Baía do Almirantado, Ilha Rei George.

Como etapa preliminar dos bioensaios, os peixes foram mantidos nos aquários da EACF durante 24 a 48h, para minimizar o estado de estresse. Na sequência, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1% p/v dissolvida em água do mar), pesados, marcados com linha colorida na nadadeira dorsal e mantidos sob condições próximas a da natureza (0 °C e 35 psu) durante 3 dias. A aeração dos aquários foi mantida de forma contínua, com fotoperíodo de 12h, e alimentação diária à base de músculo epaxial de peixes Antárticos, correspondente a 1% da sua massa corpórea.

2.2. Protocolo Experimental

Os bioensaios foram conduzidos em tanques aquário de 1000 L, com peixes de massa média 475 ± 350 g e densidade de 1 peixe por 150 a 170 L de água do mar (figura 10). A salinidade dos experimentos em ambiente hiposmótico foi reduzida, gradativamente, ao longo de um período de 6h, de 35 psu para 20 psu. A temperatura dos aquários dos experimentos de estresse térmico foi elevada, gradativamente, de 0 °C para 4 °C, ao longo de um período de 6 horas. Todos os experimentos foram conduzidos em fotoperíodo de 12h.

O alimento à base de músculo epaxial de peixe antártico foi oferecido diariamente, correspondente a 1% da massa corpórea de cada espécime. Foram considerados como válidos, ao final dos experimentos, apenas os peixes que se alimentaram regularmente. O fluoreto enteral foi administrado via alimento (filé de músculo epaxial de peixe antártico) contaminando com solução de fluoreto de sódio, dissolvido em solução fisiológica, e injetado na parte central do alimento, para dose final de 15 mg de fluoreto por quilo do espécime em experimento. Os peixes foram treinados durante três dias, no período anterior aos experimentos, a buscar o alimento na ponta de um estilete. Após mergulhar o alimento no aquário, estabelecemos o tempo máximo de 30 segundos para alimentação como forma de preservar a dose de fluoreto presente no alimento. No caso de insucesso, o alimento foi substituído e oferecido novamente para o peixe.

Os níveis de amônia e nitrito foram monitorados diariamente e os aquários limpos a cada dois dias, renovando 50% da água, nas condições do experimento. Os peixes foram mantidos sob as condições experimentais específicas de cada um dos bioensaios durante 11 dias.

Os bioensaios com fluoreto enteral foram conduzidos com o alimento (músculo de peixe antártico) contaminado com fluoreto e denominados de grupos experimentais. Os peixes dos controles experimentais receberam alimento injetado com solução salina. Todos os experimentos foram iniciados com 8 peixes e aqueles que deixaram de se alimentar foram excluídos ao final do experimento.



Figura 10. Módulo de aquários da Estação Antártica Comandante Ferraz. Os peixes foram mantidos em tanques aquário (A) de 1000 L nas condições experimentais dos bioensaios (B).

As condições experimentais de temperatura, salinidade e fluoreto na dieta foram: ❶) 0 °C, 35 psu, sem fluoreto (SFD035); ❷) 0 °C, 35 psu, com fluoreto (FD035); ❸) 0 °C, 20 psu, sem fluoreto (SFD020); ❹) 0 °C, 20 psu, com fluoreto (FD020); ❺) 4 °C, 35 psu, sem fluoreto (SFD435); ❻) 4 °C, 35 psu, com fluoreto (FD435); ❼) 4 °C, 20 psu, sem fluoreto (SFD420); ❽) 4 °C, 20 psu, com fluoreto (FD420).

Ao final de cada experimento, a veia caudal foi puncionada e o sangue coletado com seringa heparinizada, centrifugado à 2.000 rpm por 5 minutos, o plasma transferido para criotubos e congelado em nitrogênio líquido. Imediatamente após a coleta de sangue, a coluna vertebral do peixe foi seccionada em local próximo à região cefálica e, e o rim direito e lamelas do segundo arco branquial direitos, foram retirados, transferidos para criotubos e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. O tecido branquial correspondente ao lado esquerdo foi coletado e fixada em Karnovsky para os procedimentos de microscopia eletrônica e de transmissão (MET) e varredura (MEV), bem como em Alfac para microscopia de luz.

O material congelado em nitrogênio líquido foi transportado a bordo do Navio de Apoio Oceanográfico (NApOC) Ary Rongel da Antártida até o Arsenal de Marinha no Rio de Janeiro. O material destinado a microscopia foi mantido sob refrigeração e transportado

para os Laboratórios da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e o material para análise bioquímica, transportado para Universidade de Taubaté (UNITAU).

2.3. Obtenção de Homogeneizados Teciduais

Brânquias e rins de *N. rossii* foram homogeneizados em Potter-Elvehjen, a uma temperatura de 0 – 4 °C, na proporção de 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) para cada grama de tecido. Os homogeneizados foram sonicados durante 15 segundos e centrifugados a 14.000 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes dessa etapa foram utilizados para determinação da atividade das enzimas hexoquinase (HK), glicogênio fosforilase (GPase), glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) fosfofructoquinase (PFK), enolase (ENO), lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH), citrato sintase (CS) e arginase (ARG). O tampão de homogeneização foi preparado como descrito por Sangiao et al. (2005) com modificações.

As atividades ATPase Na/K branquial e renal foram determinadas em homogeneizados obtidos em Potter-Elvehjen, na proporção de 5 mL de tampão SEID (tampão imidazol 50 mM (pH 7,3), EDTA 10 mM, sacarose 250 mM e ácido desoxicólico 0,3% (p/v)) por grama de tecido. Os homogeneizados foram sonicados durante 15 segundos, centrifugados a 10.000 g por 10 minutos, e a fração sobrenadante utilizada para determinação da atividade da ATPase Na/K (McCormick, 1993).

Todos os procedimentos para a obtenção dos homogeneizados teciduais foram realizados em banho de gelo e centrifugados a 4 °C.

2.4. Procedimentos Analíticos

Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas em duplicata no leitor de microplacas FLUOstar Optima, fabricado pela BMG Labtech (Figura 11).

2.4.1. Constituintes Plasmáticos

Proteínas totais, albumina, cálcio, fosfato inorgânico, magnésio, cloreto, triglicerídeos, colesterol e glicose foram determinados no plasma sanguíneo de *N. rossii* utilizando Kits reagentes da Labtest Diagnóstica S.A. – Vista Alegre, Minas Gerais, Brasil. Os métodos analíticos foram adaptados para microvolumes entre 200 a 250 µL.

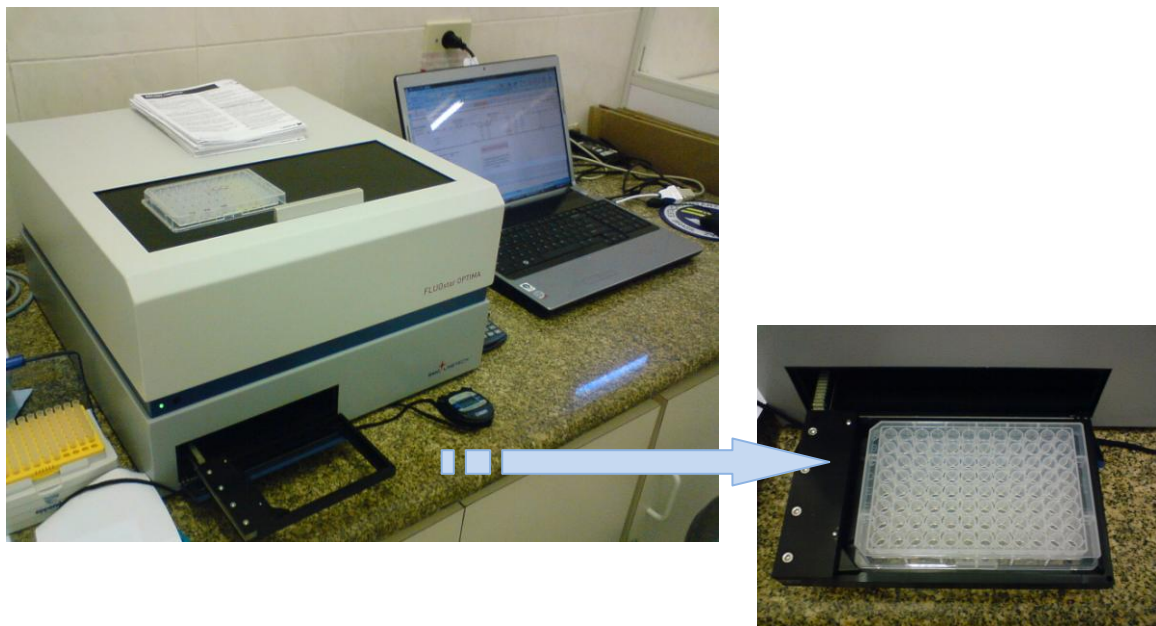


Figura 11. Leitor de microplacas Fluostar Optima acoplado a microcomputador para aquisição de dados (A). As determinações de constituintes plasmáticos foram conduzidas em microplacas de 96 poços (B) e de enzimas em placas de 384 poços.

Os conteúdos plasmáticos de proteína total, albumina e globulinas foram expressos em g/L. As concentrações dos demais constituintes plasmáticos foram expressas em mmol/L. O limite da linearidade dos métodos analíticos foi estabelecido mediante curva de referência. As amostras que excederam esse limite foram diluídas com solução salina 9 g/L. Todas as reações foram de ponto final.

Metabólitos não Proteicos

A glicose plasmática foi determinada enzimaticamente pelo método da hexoquinase. A glicose-6-fosfato formada na reação catalisada pela hexoquinase foi oxidada a fosfogliconato na presença da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e NADP^+ como agente oxidante. O $\text{NADPH} + \text{H}^+$ formado foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 340 nm.

O colesterol plasmático total (esterificado e não esterificado) foi determinado pelo método enzimático Trinder. O colesterol esterificado presente no plasma foi hidrolisado na presença de esterase em colesterol e ácido graxo. O colesterol total foi oxidado na presença de colesterol oxidase, originando água oxigenada, que na presença de 4-

aminoantipirina e fenol, e sob a ação de peroxidases, originou o cromóforo antipirilquinonimina. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 505 nm.

Os triacilglicerois plasmáticos foram determinados pelo método enzimático Trinder. Os ésteres de glicerol presentes nas lipoproteínas plasmáticas foram hidrolisados na presença da lipase lipoproteica. O glicerol formado na reação foi fosforilado pela gliceroquinase em glicerol-3-fosfato que, na sequência, foi oxidado pela glicerol-3-fosfato oxidase formando água oxigenada, que na presença de 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, originou o cromóforo quinoneimina. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em comprimento de onda de 505 nm.

Proteínas

O conteúdo protéico total foi determinado pelo método de Biureto em comprimento de onda de 550 nm. A fração albumínica foi quantificada pelo método do verde de bromocresol. O complexo albumina-verde de bromocresol foi quantificado em comprimento de onda de 600nm. A fração globulínica do plasma sanguínea foi calculada subtraindo a fração albumínica da proteína total.

Eletrólitos não Proteicos

O magnésio foi determinado pelo método do magon sulfonado. O complexo magon-magnésio foi quantificado espectrofotometricamente em comprimento de onda de 505 nm. O método da cresoltaleína complexona foi utilizado na determinação do cálcio, no qual o complexo formado entre a púrpura ftaleína e o cálcio foi quantificado em comprimento de onda de 560 nm. O cloreto foi determinado pelo método do tiocianato de mercúrio, no qual o tiocianato liberado na reação reage com íons féricos, originando tiocianato férrico de coloração amarelada, que absorve luz em 505 nm. A concentração de fosfato inorgânico foi determinada pelo método de Fiske e Subarrow (1925), no qual o fosfato inorgânico reage com molibdato de amônio, em meio alcalino, formando o azul de molibdênio, que absorve luz em 340 nm.

2.4.2. Determinação da Atividade Enzimática

As análises enzimáticas foram realizadas em microplacas de 384 poços, exceto as da arginase que foram determinadas em placas de 96 poços. As leituras de

absorbância foram realizadas no leitor de microplacas FLUOstar OPTMA. Todas as reações enzimáticas foram realizadas na temperatura de 20°C.

A atividade da glicogênio fosforilase (GPase, EC.3.1.3.9) foi determinada em tampão fosfato de potássio 45 mM (pH 7,0), contendo glicogênio 0,2 mg/ml, NADP⁺ 0,34 mM, Glicose-1,6-bisfosfato 4μM, EDTA 0,1 mM, cloreto de magnésio 15 mM, fosfoglicomutase 1,6 U/mL e glicose- 6-fosfato desidrogenase 12 U/mL. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (Chang, et al., 2007).

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH, EC. 1.1.1.49) foi determinada em tampão Tris-HCl 80 mM (pH 7,8), contendo glicose-6-fosfato 1,0 mM e NADP⁺ 0,2 mM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (Ciardiello, et al., 1995).

A atividade da hexoquinase (HK, EC. 2.7.1.1) foi determinada em tampão Imidazol 50 mM (pH 7,4), contendo glicose 2,0 mM, ATP 2,0 mM, cloreto de magnésio 10,0 mM, NADP⁺ 0,4 mM, ditioneitol 1,0 mM, cloreto de potássio 2,0 mM e glicose-6-fosfato desidrogenase 0,3 U/mL. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (Baldwin, et al., 2007).

A atividade da fosfofructoquinase (PFK, EC. 2.7.1.11) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), contendo cloreto de magnésio 10 mM, ATP 1,0 mM, NADH+H⁺ 0,15 mM, AMP 2,0 mM, cloreto de potássio 250 mM, glicerolfosfato desidrogenase 1 U/mL, aldolase 1,2 U/mL, triose fosfato isomerase 10 U/mL e frutose-6-fosfato 5,0 mM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (Baldwin, et al., 2007).

A atividade da enolase (ENO, EC. 4.2.1.11) foi determinada em tampão imidazol 50 mM (pH 7,4), contendo D-glicerato-2-fosfato 1,25 mM, cloreto de magnésio 2,0 mM, cloreto de potássio 250 mM, ADP 0,5 mM, NADH+H⁺ 150 μM, piruvato quinase 3 U/mL e lactato desidrogenase 4 U/mL. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (Gorsich, et al., 1999).

A atividade da lactato desidrogenase (LDH, EC. 1.1.1.27) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,2), contendo piruvato de sódio 2,0 mM, cloreto de potássio 100 mM e NADH+H⁺ 150 μM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (Thuesen, et al., 2005).

A atividade da citrato sintase (CS, EC. 4.1.3.7) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo cloreto de potássio 100 mM, EDTA 1,0 mM, DTNB 0,2 mM, acetil coenzima A 0,2 mM e oxaloacetato 0,4 mM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em $\lambda=410$ nm (Saborowski, et al., 2002).

A atividade da malato desidrogenase (MDH, EC. 1.1.1.37) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo oxaloacetato 0,4 mM, cloreto de magnésio 20 mM e NADH+H⁺ 150 μ M. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em $\lambda=340$ nm (Childress e Somero, 1979).

A atividade da adenosina trifosfatase de sódio e potássio (ATPase Na⁺/K⁺, EC. 2.4.1.1) foi determinada em tampão Imidazol 50 mM (pH 7,5), contendo fosfoenolpiruvato 2 mM, NADH+H⁺ 0,16 mM, ATP 0,5 mM, lactato desidrogenase 2,86 U/L, piruvato quinase 3,57 U/L, cloreto de magnésio 3,5 mM, cloreto de potássio 28 mM, cloreto de sódio 63 mM e ouabaína 0,5 mM. A atividade total da ATPase, foi determinada em meio de reação sem ouabaína. A variação de absorbância foi acompanhada em $\lambda=340$ nm. A atividade da ATPase Na/K foi calculada subtraindo a atividade total da atividade da ATPase na presença de ouabaína (McCormick, 1993).

A atividade da arginase (ARG, EC. 4.2.1.11) foi determinada por método descontínuo em tampão glicina 50 mM (pH 9,5), contendo L-arginina 100 mM (pH 9,5) e cloreto de manganês 1 mM. A reação enzimática foi conduzida em microtubos, transferindo alíquotas de homogeneizado entre 10 e 40 μ L para um volume final de sistema de reação de 250 μ L. A reação foi interrompida com 250 μ L de HCl 0,75 M e o conteúdo dos tubos centrifugado durante 5 minutos a 10.000 rpm. Alíquotas de 25 μ L dos sobrenadantes foram transferidas para microtubos contendo 25 μ L de água e 100 μ L de ninhydrin (6% p/v em 2-metoxietanol). Os microtubos foram aquecidos a 100 °C por 25 minutos. Desse volume, foram transferidas alíquotas de 100 μ L para placa de 96 poços e as leituras de absorbâncias foram realizadas em $\lambda=520$ nm. O método em questão foi adaptado de Iyamu, et al. (2008).

Todas as atividades enzimáticas foram expressas em Unidade Internacional (U), definida como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um μ mol de substrato em produto no tempo de um minuto. As atividades específicas foram calculadas com base na concentração protéica dos homogeneizados e na massa dos peixes. Os resultados foram expressos em U/mg/Kg de peixe. As atividades foram expressas em U/mg/Kg ou mU/mg/Kg dependendo da ordem de grandeza do resultado. As atividades enzimáticas foram relativizadas considerando: a) dividindo as respectivas atividades

enzimáticas dos grupos pelas do controle geral dos experimentos (condição termo-salina 0-35); b) dividindo as atividades enzimáticas dentro do mesmo experimento pela atividade da hexoquinase.

2.4.3. Conteúdo Protéico dos Homogeneizados

A proteína total dos homogeneizados foi determinada pelo método do ácido bicinchoninic (BCA), utilizando o Kit reagente QuantiPro BCA da Sigma-Aldrich.

2.5. Procedimentos de Microscopia

2.5.1. Microscopia de Luz

As brânquias foram fixadas em ALFAC (*Álcool, Formaldeído e Ácido Acético Glacial*), e seguiram o processamento histológico para microscopia de luz, desidratadas em séries alcoólicas crescentes, diafanizadas em xileno, impregnadas e incluídas em Paraplast Plus®.

A trimagem ocorreu em um micrótomo para parafina, marca Leica RM 2145, e a distensão dos cortes em lâminas de vidro contendo uma fina camada de albumina de Mayer 1% e água destilada (Culling, et al., 1985). Em seguida, as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina (Clark, 1981). O meio de montagem utilizado foi o Permount® (Sigma). As lâminas permanentes foram previamente selecionadas em microscópio de luz Micromaster e posteriormente analisadas e fotografadas em Fotomicroscópio Olympus PM AD do Laboratório de Biologia Adaptativa do Departamento de Biologia Celular da UFPR.

2.5.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a microscopia eletrônica de varredura, as brânquias foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C) (Karnovsky, 1965). O material foi desidratado em série alcoólica crescente e acetona, sendo o ponto crítico obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico. A metalização em ouro foi obtida em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram feitas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do Centro de Microscopia Eletrônica – Universidade Federal do Paraná.

2.5.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As brânquias foram fixadas em Karnovsky (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C), em seguida foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C. Posteriormente o material foi pós-fixado em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 durante 1 hora. A contrastação em blocos foi feita com acetato de uranila 2% durante 2 horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e em seguida colocado em acetona. A impregnação e inclusão ocorreram em resina Epon-812 (Luft, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante.

Os cortes ultra-finos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (Watson, 1958) e nitrato/acetato de chumbo (Reynolds, 1963). A observação do material foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR.

2.5.4. Alterações celulares analisadas

As análises branquiais foram feitas utilizando-se o critério de ausência e presença da alteração histopatológica em questão. No tecido branquial, as seguintes alterações morfológicas foram analisadas e identificadas segundo Mallat (1985), Reichenbach-Klinke (1973) e Roberts (1989).

Descolamento do Epitélio Respiratório ou Edema: Alteração caracterizada pela elevação de uma lâmina contínua do epitélio lamelar para longe do sistema de células pilares, aumentando assim a distância entre o meio externo e o sangue. Ocorre a formação de um espaço que pode ser preenchido por água.

Hipertrofia das Células do Epitélio Respiratório: Ocorre o aumento do volume das células do epitélio respiratório sem que ocorra a divisão celular devido a elevação da síntese protéica em consequência de um aumento na demanda funcional ou por estímulos hormonais. Irá ocorrer o aumento no tamanho do órgão.

Proliferação Celular ou Hiperplasia do Epitélio Interlamelar (Fusão das Lamelas Respiratórias): O termo hiperplasia é usado quando se quer mencionar o aumento do número de células num órgão ou num tecido. A hiperplasia ocorre se a população celular for capaz de sintetizar DNA, permitindo assim, que ocorra a mitose.

Aneurisma, Talangectasia ou Congestão Sanguínea: Ocorre o aumento do volume de sangue em uma região por intensificação do aporte sanguíneo ou diminuição do

escoamento venoso. Quando há lesão das células pilares, esta congestão é seguida de uma dilatação do espaço sanguíneo.

Vacuolização: Formação de vacúolos intracelulares nas células epiteliais. Pode estar relacionado a um distúrbio hídrico celular oriundo de lesões na permeabilidade celular ou mitocondrial. É uma lesão reversível, recuperando a condição normal na ausência do agente agressor.

Desestruturação das Lamelas Secundárias: Caracterizada pela necrose levando a perda da estrutura padrão das lamelas. Pode ser letal para o organismo quando ocorre em grandes proporções. No entanto, em condições não letais, há a proliferação celular e a substituição das células mortas.

2.6. Tratamento Estatístico

A comparação estatística entre as atividades enzimáticas do grupo controle e os experimentais foram conduzidas utilizando análise de variância “one-way”, seguido do pós teste de Tukey de múltipla comparação, bem como a comparação entre os níveis dos constituintes plasmáticos do grupo controle com os experimentais. A comparação estatística entre os níveis de constituintes plasmáticos dos controles da natureza, Punta Plaza e Glaciar Ecology, foram conduzidas utilizando o teste t. As diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$ (Motulsky, 1995).

Todas as análises estatísticas e gráficos foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism, versão 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

3. RESULTADOS

3.1. Morfologia e Histopatologia Branquial

3.1.1. Estrutura padrão das brânquias de *Notothenia rossii*

A morfologia branquial de *Notothenia rossii* segue o padrão descrito para os peixes teleósteos e podem ser visualizadas nas figuras 12 e 13. Esta estrutura padrão foi observada na grande maioria dos animais analisados, tanto experimentais quanto controle, submetidos às diferentes temperaturas (0 °C e 4 °C), salinidades (35 psu e 20 psu) e dieta contaminada com fluoreto.

O filamento branquial da *N. rossii* é formado por uma lamela primária, que por sua vez, apresenta duas fileiras de lamelas respiratórias ou secundárias (figuras. 12A a 12D). Quanto a organização histológica e ultraestrutural, as lamelas secundárias são revestidas por células epiteliais pavimentosas que estão separadas pelas células pilares e pelos espaços sanguíneos (figuras. 13A, 13B). Os espaços sanguíneos existentes nas lamelas respiratórias não apresentam endotélio e possuem conexões com os vasos aferentes do filamento branquial. As células do tecido epitelial apresentam aspecto achatado com núcleo alongado (figuras 12A, 12B). Na membrana das células epiteliais adjacentes foram encontradas estruturas de adesão do tipo desmossomos.

Tanto nas lamelas primárias quanto secundárias foram observadas a presença de células de muco (figura 13C), as quais produzem mucosubstâncias de natureza diversa não determinadas neste trabalho. No entanto, na figura 13C podem ser visualizados os grânulos de secreção. As células de cloreto foram observadas na região interlamelar (figura 13D). Estas células possuem mitocôndrias espalhadas por todo seu citoplasma envoltas por um sistema tubular de membrana (figura 13D). O núcleo das células de cloreto possui envoltório nuclear com muitos poros, heterocratina periférica e grande quantidade de eucromatina evidenciando o alto metabolismo dessa célula.

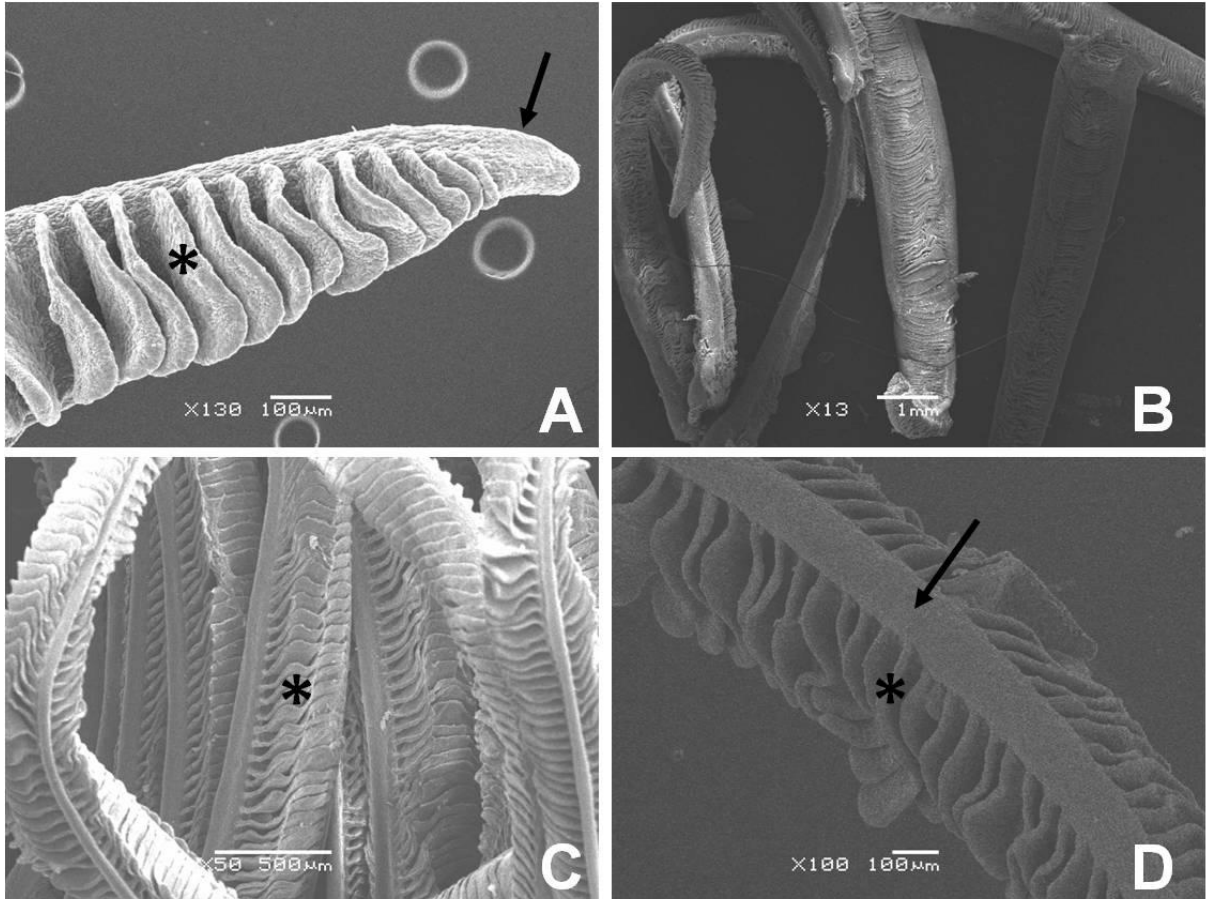


Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura da estrutura branquial padrão de *Notothenia rossi*. **(A)** Peixe experimental – 4 °C, 35 psu; **(B)** Peixe controle – 4 °C, 35 psu; **(C)** Peixe experimental – 0 °C, 20 psu; **(D)** Peixe controle – 0 °C, 20 psu. A integridade das lamelas primárias (seta preta) e das lamelas secundárias (asterisco) pode ser observada nas imagens acima.

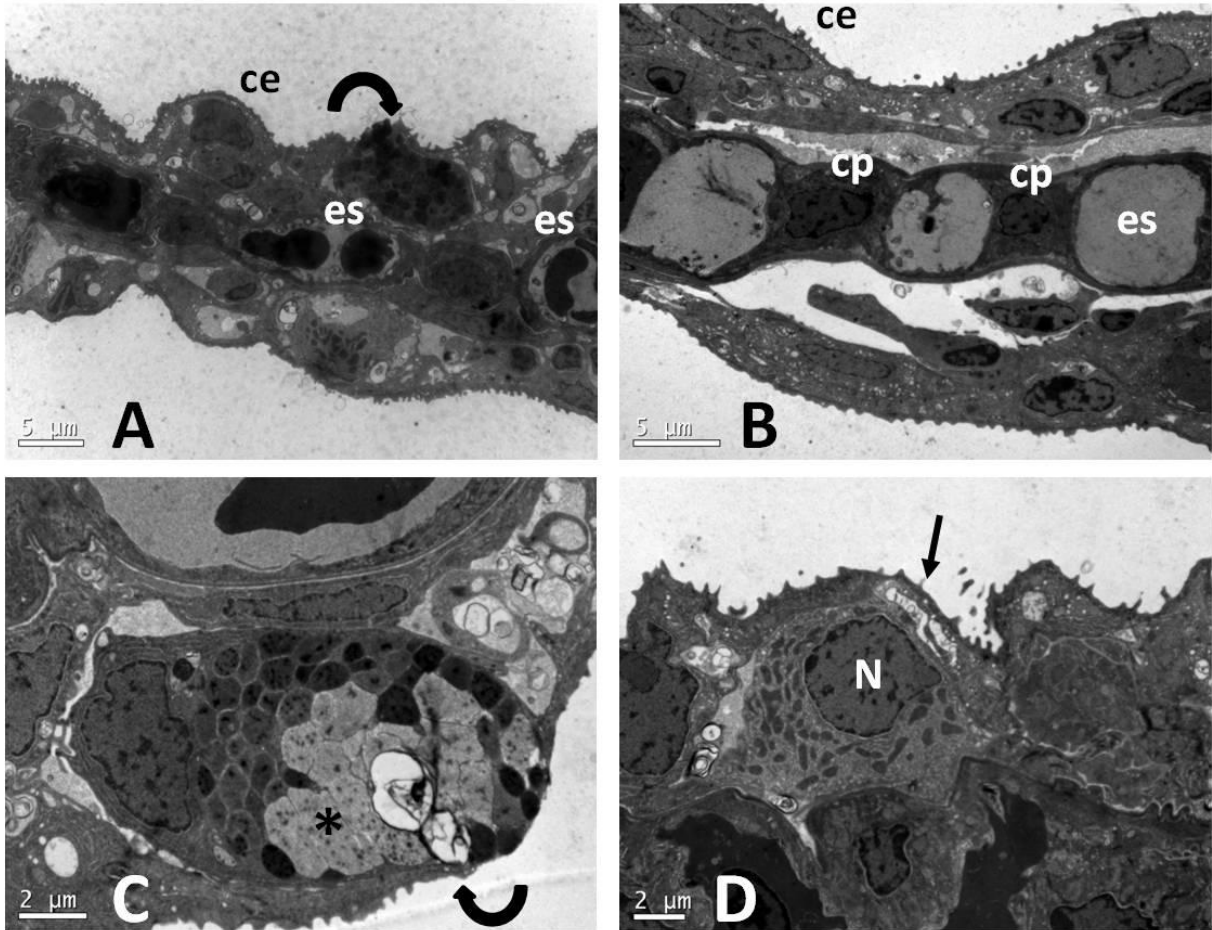


Figura 13: Microscopia eletrônica de transmissão das brânquias de *Nototothenia rossii*. (A) peixe experimental, 0 °C, 35 psu, foram observadas as células de muco (seta curva), espaços sangüíneos (es) e células epiteliais (ce); (B) peixe controle 4 °C, 35 psu, foram observadas células epiteliais (ce), células pilares (cp) e espaços sangüíneos (es); (C) peixe experimental, 4 °C, 20 psu, foram observadas células de muco (seta curva) e os grânulos de secreção (asterisco); (D) peixe experimental, 4 °C, 20 psu, foram observadas células de cloreto (seta reta) com núcleo (N).

3.1.2. Alterações histopatológicas e ultraestruturais das brânquias de *Notothenia rossii*

Nas análises de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura não foi observada nenhuma alteração ultraestrutural nas brânquias de *N. rossii*, tanto em animais controle quanto experimentais, submetidos ao estresse térmico (4 °C), salino (20 psu) e administração de fluoreto.

Na figura 14 temos em microscopia de luz as histopatológicas observadas tanto em animais controle e experimentais submetidos ao estresse térmico, salino e com administração de fluoreto. Nas diferentes situações experimentais o descolamento branquial, hiperplasia e aneurisma foram as alterações histopatológicas observadas, sendo que aneurismas foram as principais histopatologias encontradas nas condições de estresse térmico (SFD435) e salino (SFD020), assim como o aumento expressivo de hiperplasias na condição experimental de estresse térmico e salino (SFD420) (figura 15 e tabela 1).

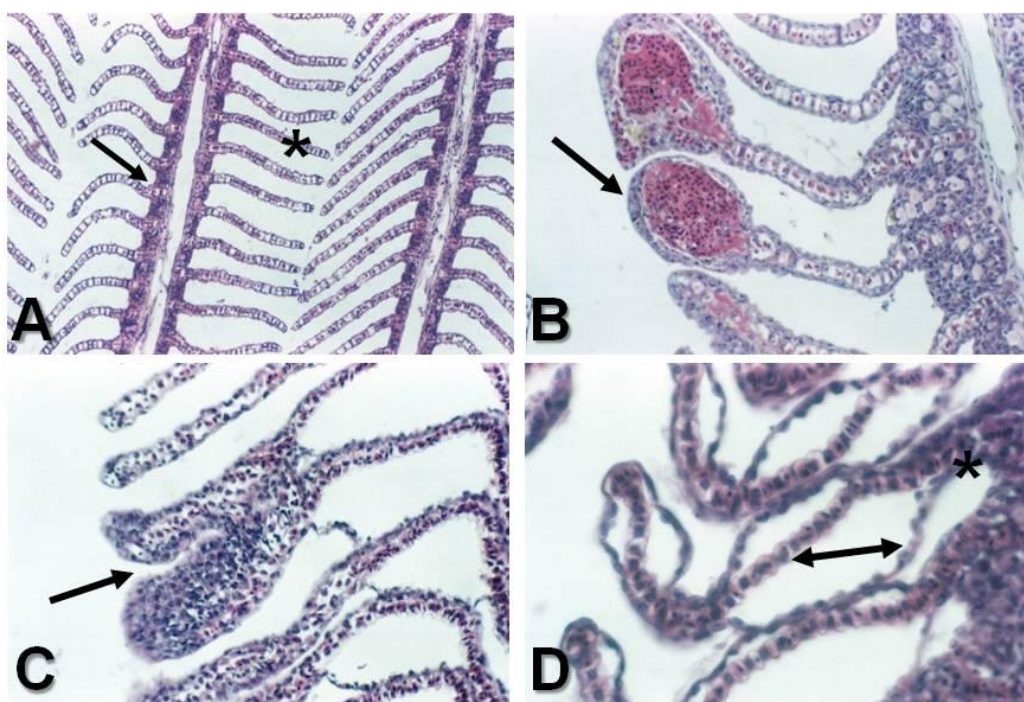


Figura 14. Microscopia de luz das alterações histopatológicas branquiais de *Notothenia rossii* coradas com H.E. (A) Estrutura padrão do peixe controle 0 °C, 35 psu e (B) a (D) alterações histopatológicas dos grupos experimentais. A normalidade das lamelas primárias (seta preta) e secundárias (asterisco) pode ser observada em (A), no aumento de 100 vezes. O aneurisma (seta preta) do peixe experimental na condição 4 °C e 20 psu pode ser visto em (B), no aumento de 200 vezes. A hiperplasia das lamelas respiratórias (seta preta) do peixe experimental na condição de 0 °C e 35 psu pode ser observada em (C), no aumento de 200 vezes. O descolamento do epitélio respiratório (asterisco), com formação de edema (seta), pode ser observado em (D), no peixe experimental 0 °C e 35 psu, no aumento de 40 vezes.

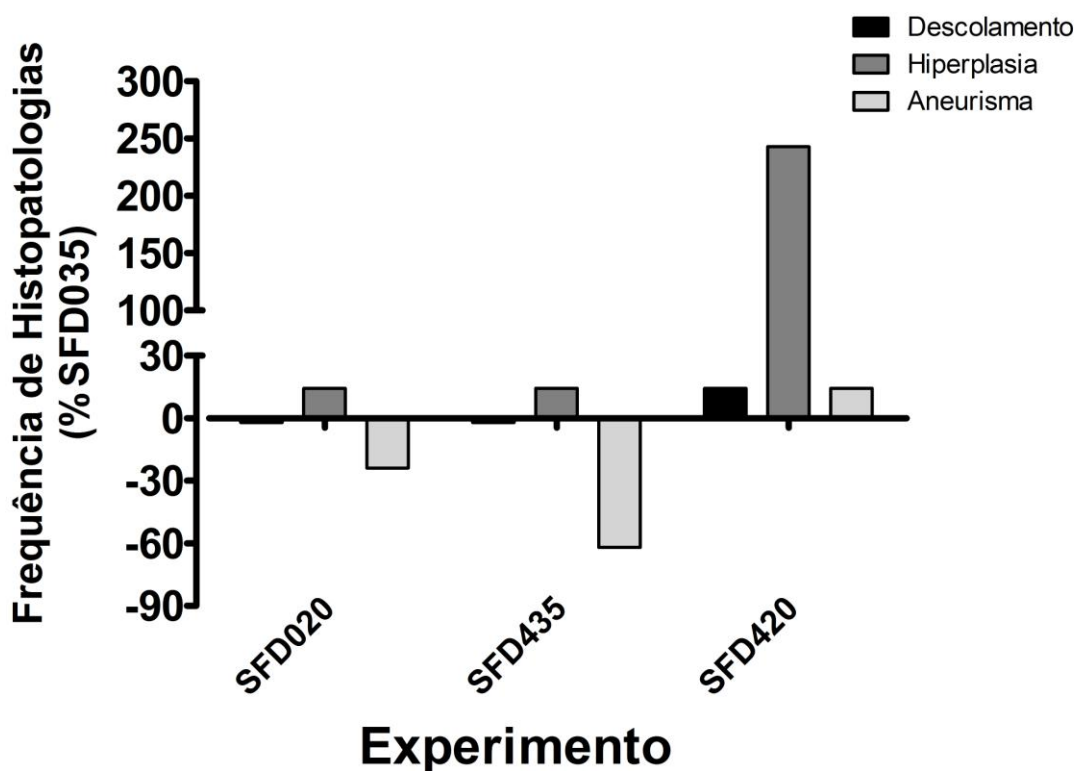


Figura 15. Relação da frequência das histopatologias encontradas em brânquias de *Notothenia rossii*, nas condições de estresse térmico, hipossalino e na condição associada de estresse térmico e salino.

Tabela 1. Frequência de alterações histopatológicas encontradas nos peixes controles e experimentais dos bioensaios com *Notothenia rossii*.

Experimento Alimentação	Controle/ Experimentais	Descolamento Branquial (%)	Hiperplasia (%)	Aneurisma (%)
0°C 35 psu	Controle	87,5	12,5	37,5
	Experimentais	100	25	25
0°C 20 psu	Controle	85,7	14,3	28,6
	Experimentais	87,5	25	50
4°C 35psu	Controle	85,7	14,3	14,3
	Experimentais	100	22,2	22,2
4°C 20psu	Controle	100	42,8	42,8
	Experimentais	100	37,5	12,5

Nas diferentes condições experimentais (0 – 4 °C; 35 – 20 psu), as quais foram submetidos os espécimes, quando associada a presença de fluoreto na dieta, pode-se observar o aumento principalmente na frequência de hiperplasias, principalmente na condição FD420 (figura 16).

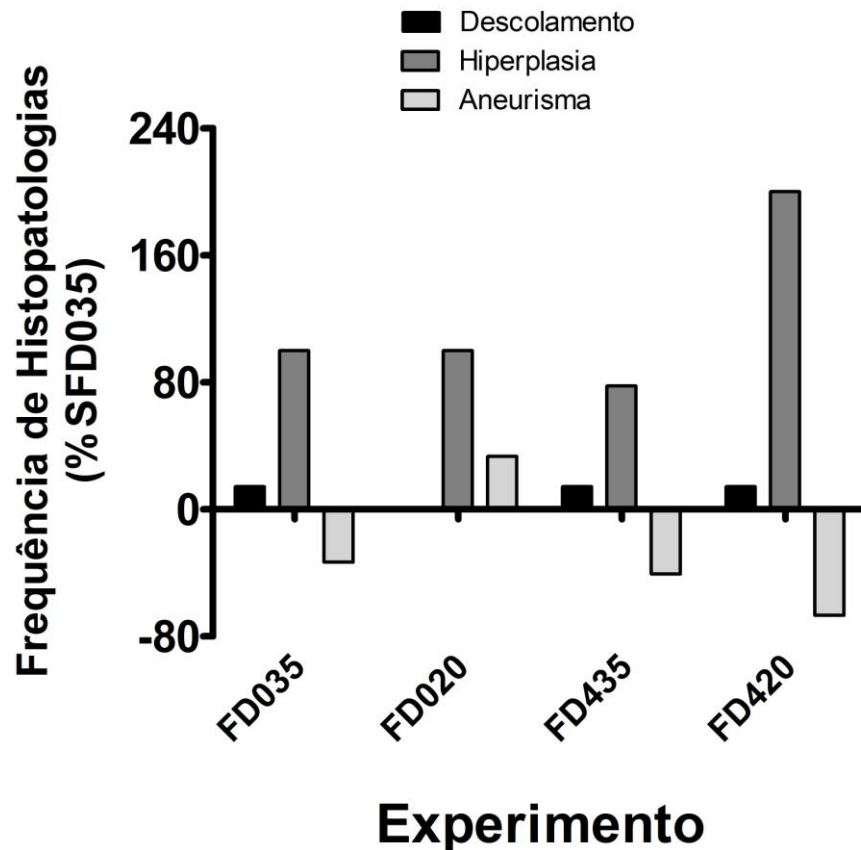


Figura 16. Frequência das histopatologias encontradas em brânquias de *Notothenia rossii*, nas condições de estresse térmico, hipossalino associadas à presença de fluoreto na dieta.

3.2. Parâmetros Metabólicos da *Notothenia rossii*

O número de espécimes utilizados nos grupos controle e experimentais sofreu redução em função da imprevisibilidade comportamental dos peixes no que diz respeito à aceitação do alimento, bem como às limitações logísticas para aumentar o número de peixes dos bioensaios. O número de peixes viáveis ao final de cada bioensaio foram está especificado na tabela 2.

Tabela 2: Número de espécimes de *Notothenia rossii* viáveis após a conclusão do bioensaio (11 dias). S/F – Sem fluoreto; C/F – Com fluoreto; PP – Punta Plaza; ECO – Glaciar Ecology; “n” – número de animais.

Salinidade 35psu				Salinidade 20psu				Natureza	
0 °C		4 °C		0 °C		4 °C		PP (n= 5)	ECO (n= 5)
S/F (n= 6)	C/F (n= 7)	S/F (n= 6)	C/F (n= 6)	S/F (n= 4)	C/F (n= 4)	S/F (n= 4)	C/F (n= 4)		

O efeito do fluoreto sobre os parâmetros metabólicos sistêmicos do peixe *N. rossii* foi avaliado considerando os níveis plasmáticos de proteínas, bem como os de metabólitos e eletrólitos não protéicos. Os níveis enzimáticos dos segmentos metabólicos glicogenolítico, glicolítico, da via das pentoses, osmorregulador e arginínolítico renal e branquial do peixe antártico *N. rossii* foram utilizados como indicadores do potencial de cada um desses segmentos metabólicos.

3.2.1. Parâmetros Sanguíneos

A comparação estatística foi realizada entre o grupo controle experimental (SFD035) e os demais grupos controles e experimentais. Comparado ao grupo controle SFD035, apenas os grupos experimentais SFD020 e FD020 tiveram os níveis de proteínas totais aumentados significativamente. Esse aumento foi decorrente da elevação dos níveis de uma ou mais proteínas da fração globulínica, visto que a fração albumínica não foi alterada nas condições experimentais de estresse térmico, salino e fluoreto (figura 17). Em nenhuma das condições experimentais e dos respectivos controles o fluoreto foi capaz de alterar significativamente os níveis protéicos plasmáticos.

Os níveis plasmáticos de cloreto, magnésio, cálcio e fosfato inorgânico (eletrólitos não protéicos) estão representados na figura 18. Na hipossalidade os níveis de cálcio sofreram redução significativa. Embora os valores de cálcio sejam levemente menores na presença de fluoreto, na normosalinidade e estresse térmico, essas diferenças não foram significativas. O mesmo foi observado em relação aos controles da natureza. As diferenças entre os níveis plasmáticos de fosfato inorgânico, bem como de magnésio, não foram significativas diferentes quando comparados ao controle (SFD035). Contudo, o estresse térmico resultou em redução não significativa dos níveis plasmáticos de magnésio. O impacto do fluoreto sobre os níveis de cloreto plasmático só foram significativamente

diferentes na condição extrema de estresse térmico e hipossalidade na presença de fluoreto (FD420).

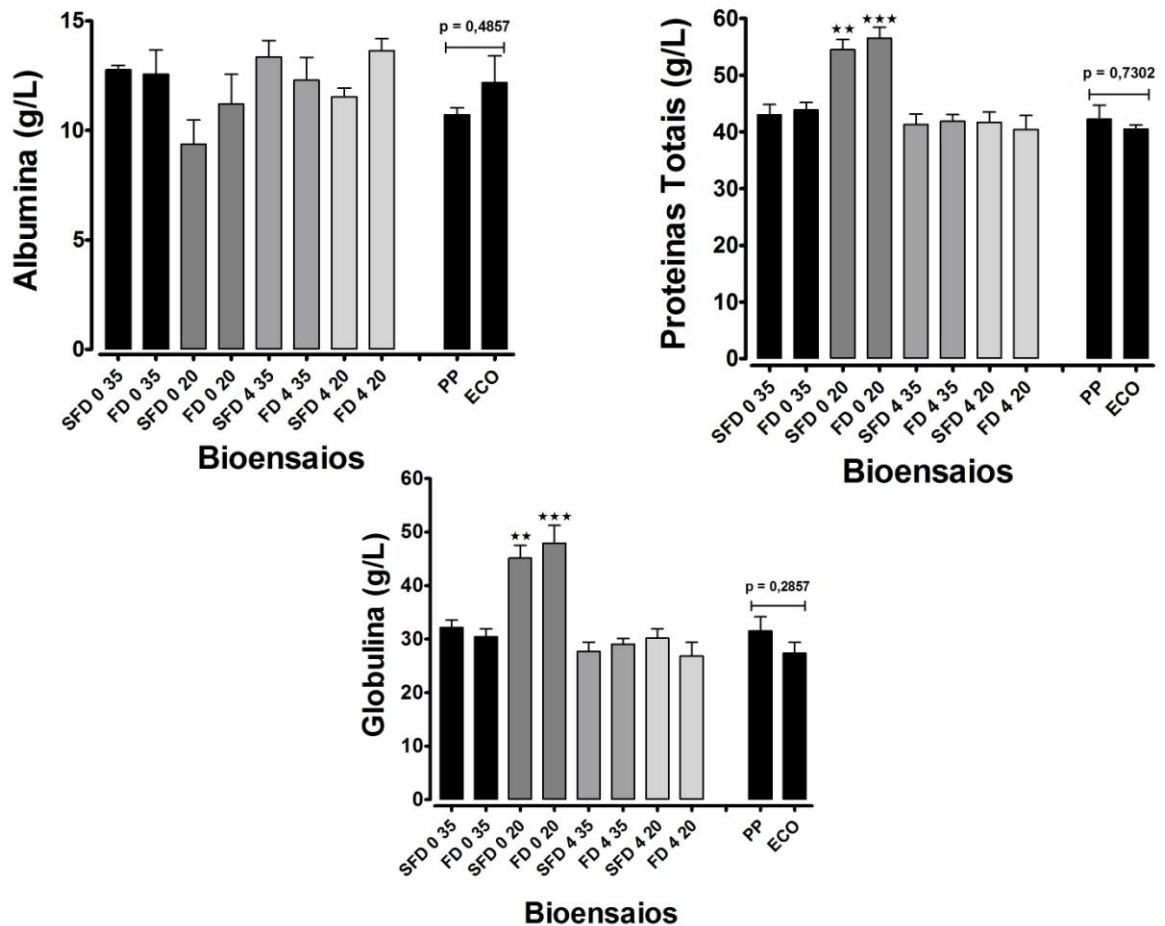


Figura 17. Níveis plasmáticos de proteínas totais, albumina e globulina presentes no sangue do peixe antártico *Notothenia rossii*, sob condições de estresse térmico, hipossalino e dieta adicionada de fluoreto. As diferenças significativas em relação ao controle (SFD035), para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, estão representadas por (**) e (***) , respectivamente.

Os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triglicerídeos (metabólitos não protéicos) estão representados na figura 19. A presença de fluoreto na dieta elevou significativamente os níveis de TG na condição 0 °C e 35 psu. A condição hipossalina isolada (SFD020) também determinou aumento de TG, mas a presença de fluoreto na dieta não elevou expressivamente os níveis de TG quando comparado ao controle hipossalino sem fluoreto (SFD020). O estresse térmico isolado não alterou os níveis de TG (SFD435), mas na presença de fluoreto os níveis desse lipídeo sofreram elevação (FD435). A condição

de estresse térmico e hipossalino, nas condições com e sem fluoreto, os níveis de TG permaneceram muito próximos do controle geral (SFD035). Já os níveis de TG dos controles da natureza, Punta Plaza e Glaciar Ecology, foram significativamente diferentes.

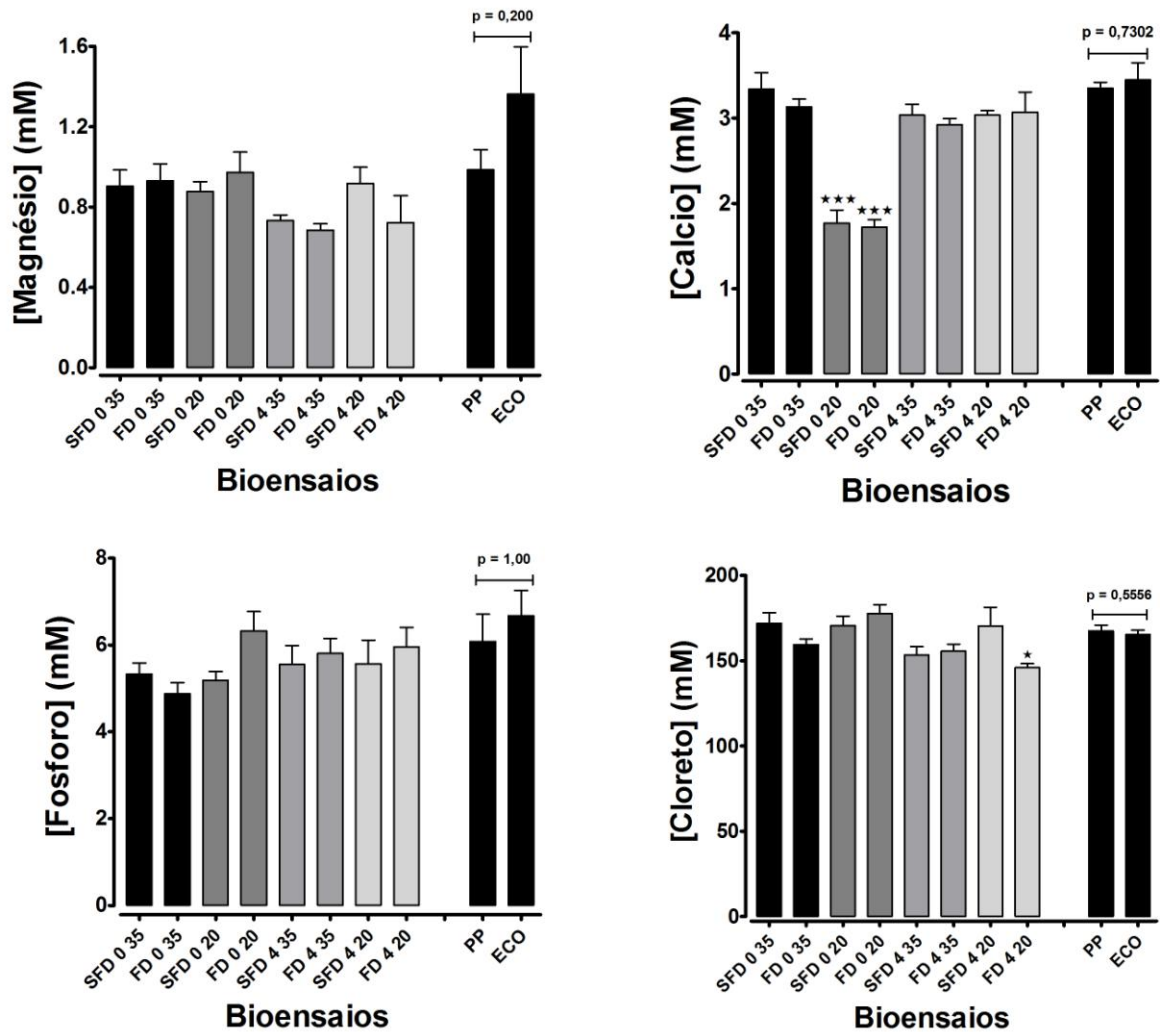


Figura 18. Níveis plasmáticos de cálcio, fosfato, magnésio e cloreto de *Notothernia rossii*, sob condições de estresse térmico, hipossalino e dieta adicionada de fluoreto. As diferenças significativas em relação ao controle (SFD035), para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, estão representadas por (*) e (***), respectivamente.

Os níveis glicêmicos sofreram redução não significativa na presença de fluoreto na condição 35 psu e 0 °C. O efeito isolado da hipossalinação (SF020) resultou em aumento dos níveis glicêmicos, que foi acentuado na presença de fluoreto (FD020). Na

condição 35 psu, o fluoreto da dieta tende a reduzir os valores glicêmicos, tanto a 0 °C como a 4 °C, e na condição hipossalina o efeito do fluoreto é no sentido contrário. Contudo, na condição de estresse térmico e hipossalino, a presença de fluoreto na dieta não alterou significativamente os níveis glicêmicos. Por outro lado, as *N. rossii* coletadas no Glaciar Ecology apresentaram níveis glicêmicos mais baixos do que as de Punta Plaza, mas a diferença não foi significativa.

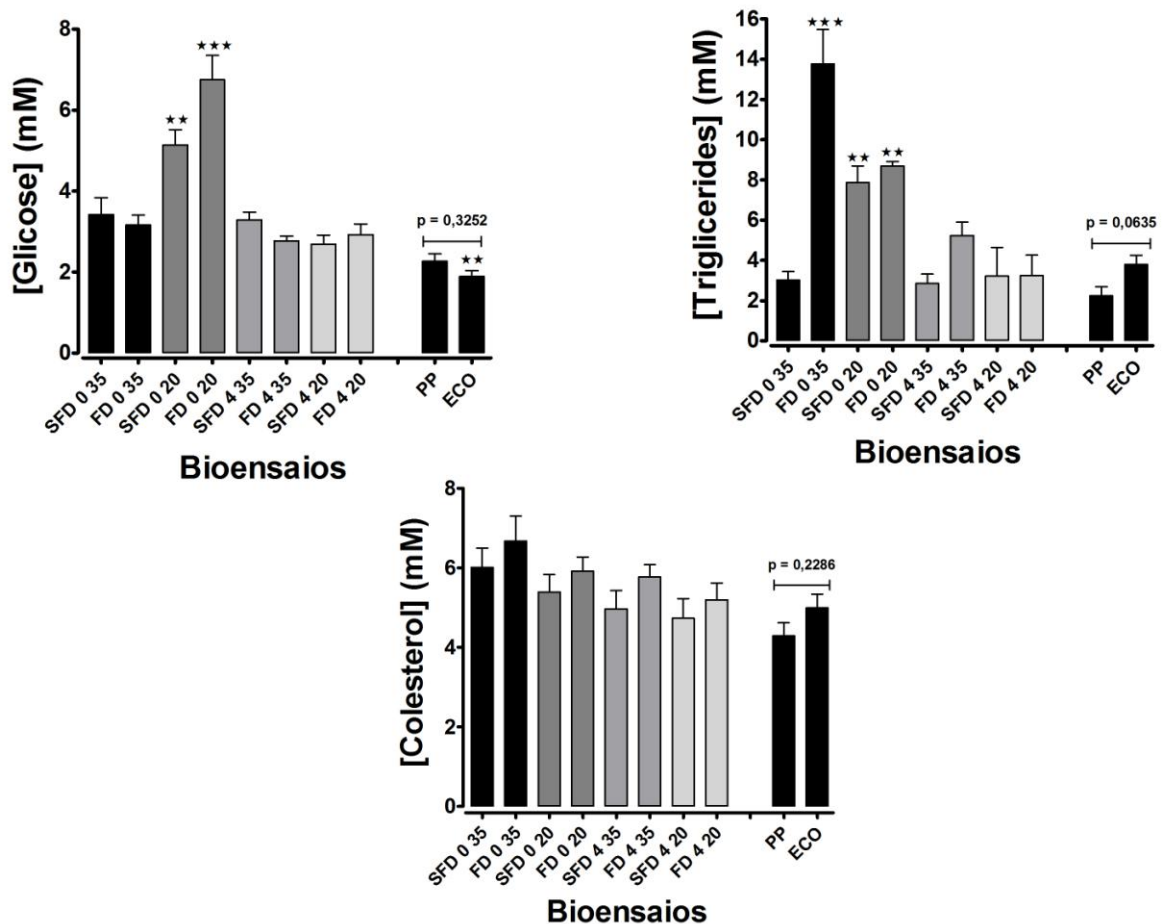


Figura 19. Níveis plasmáticos de glicose, triglicerídeos e colesterol de *Notothenia rossii*, sob condições de estresse térmico, hipossalino e dieta adicionada de fluoreto. As diferenças significativas em relação ao controle (SFD035), para $p < 0,05$ e $p < 0,001$, estão representadas por (**) e (***), respectivamente.

3.2.2. Metabolismo Branquial

Os resultados das atividades enzimáticas branquiais, na condição experimental termo-salina 0-35, estão sumarizados na figura 20. A enzima glicolítica de menor atividade específica foi a PFK, com apenas 18% da atividade da HK, a qual é responsável pela introdução da glicose no metabolismo celular.

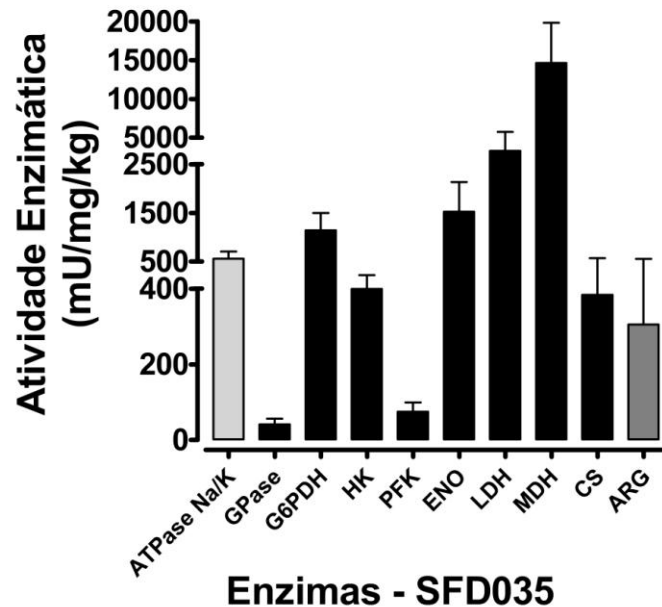


Figura 20. Níveis de enzimas branquiais de *Notothenia rossii*, na condição termo-salina de 0 °C e 35 psu, sem fluoreto na dieta (SFD035). As atividades foram expressas em miliunidade internacional por miligrama de proteína por kg de peixe (mU/mg/kg).

As atividades enzimáticas relativas ao controle experimental (0 °C, 35) e a atividade da hexoquinase estão sumarizadas nas figuras 21 a 24. As atividades relativizadas facilitaram a visualização das variações dos níveis enzimáticos nos tecidos branquiais, nas diferentes condições experimentais, em relação ao controle experimental, que representa a condição termo-salina (0-35) mais próxima da natureza, bem como em relação aos níveis de hexoquinas, enzima responsável por introduzir a glicose no metabolismo.

O fluoreto trófico na condição termo-salina 0-35 (FD035), modulou positivamente os níveis de ATPase, HK e G6PDH, e negativamente os níveis de ENO, MDH, CS e ARG (figura 21A). As diferenças entre as atividades relativas à HK, das enzimas G6PDH (1%), PFK (16%), LDH (15%) e ATPase Na/K (11%) (figura 21B), foram pequenas entre as duas condições tróficas. Já as atividades das enzimas MDH, GPase, ENO, CS, e

ARG foram mais discrepantes, com diferenças de 20 à 50%, entre as duas condições tróficas (figura 21B).

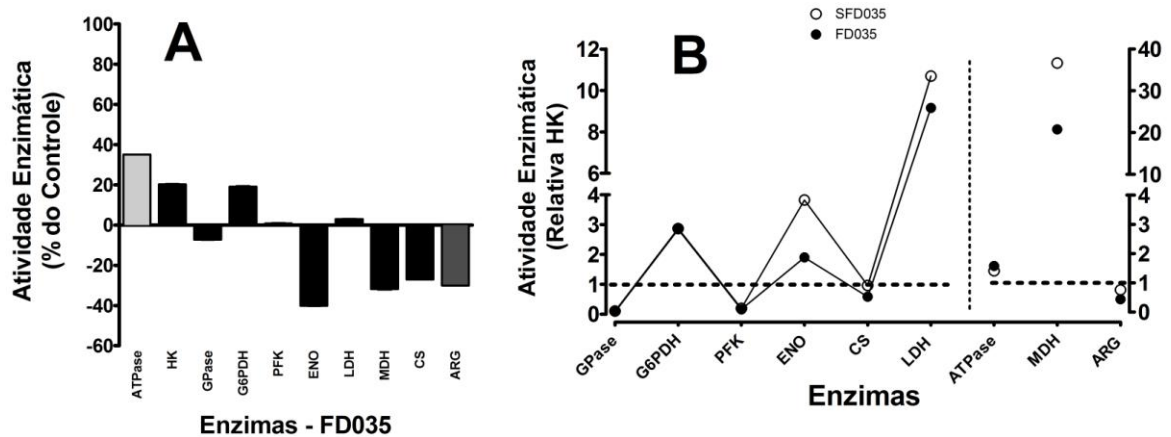


Figura 21. Atividade relativa das enzimas branquiais de *Notothenia rossii* na condição termo-salina-trófica 0 °C, 35 psu e fluoreto trófico (FD035). Os níveis enzimáticos relativos ao controle experimental estão representados em (A) e os níveis relativos à HK, na mesma condição termo-salina-trófica, estão representados em (B).

A condição termo-salina 4-35 modulou negativamente os níveis enzimáticos dos segmentos metabólicos glicolítico, glicogenolítico, via das pentoses, TCA e argininolítico, e positivamente os níveis da ATPase Na/K (figura 22A). Nesse caso, o fluoreto trófico (figura 22B) elevou os níveis branquiais da HK, G6PDH, LDH e ARG.

As atividades relativas das enzimas ATPase Na/K (19%), GPase (7%), G6PDH (5%), ENO (1%), ARG (20%) LDH (3%) e MDH (1%) foram mantidas em níveis próximos nas duas condições tróficas. Já as atividades relativas das enzimas PFK (28%) e CS (44%) apresentaram valores discrepantes entre as duas condições tróficas (figura 22C).

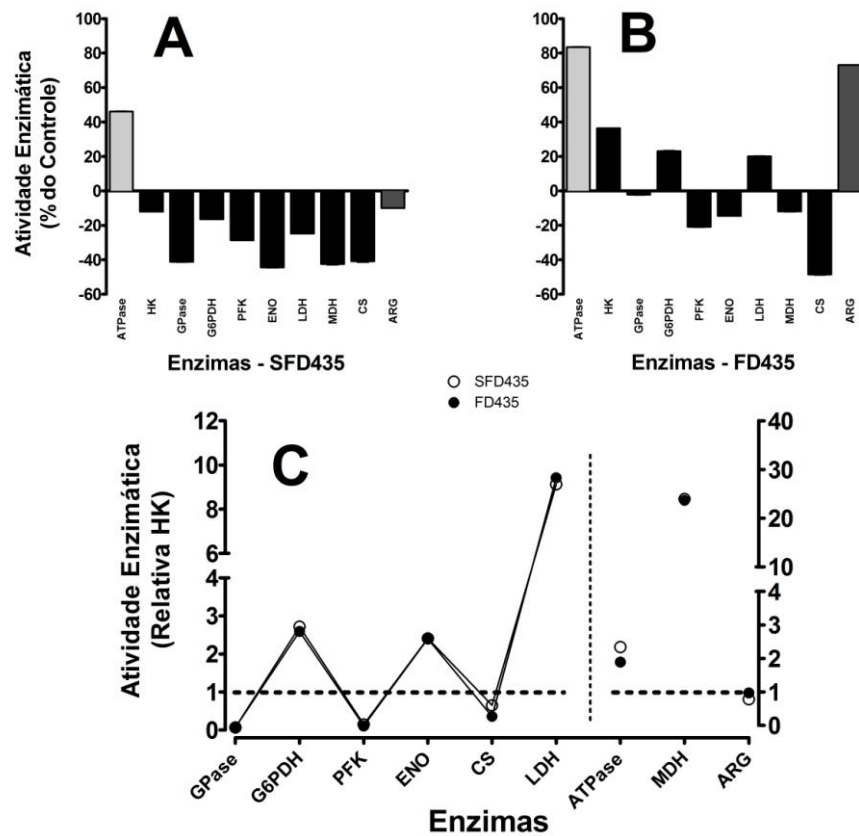


Figura 22. Atividade relativa das enzimas branquiais de *Notothenia rossii* na condição termo-salina de 4 °C e 35 psu. Os níveis enzimáticos relativos ao controle experimental estão representados em (A), para a condição sem fluoreto trófico, e em (B) com fluoreto trófico. Os níveis relativos à HK na mesma condição termo-salina-trófica estão representados em (C).

Na condição termo-salina 0-20 os níveis branquiais das HK, G6PDH, LDH e ARG foram modulados positivamente e o das enzimas do metabolismo respiratório (CS e MDH), negativamente (figura 23A). A amplitude desse perfil foi modulada pelo fluoreto trófico, mas as tendências não sofreram alterações, exceto no que diz respeito a ARG que teve o seu valor relativo modulado de forma inversa (figura 23B). As diferenças entre as atividades enzimáticas relativas à HK, entre as condições tróficas com e sem fluoreto, foram pequenas para as enzimas ATPase Na/K (6%), GPase (15%), G6PDH (9%), PFK (15%), ENO (11%) e LDH (5%), e mais expressivas em relação as enzimas ARG (38%), CS (42%) e MDH (37%) (figura 23C).

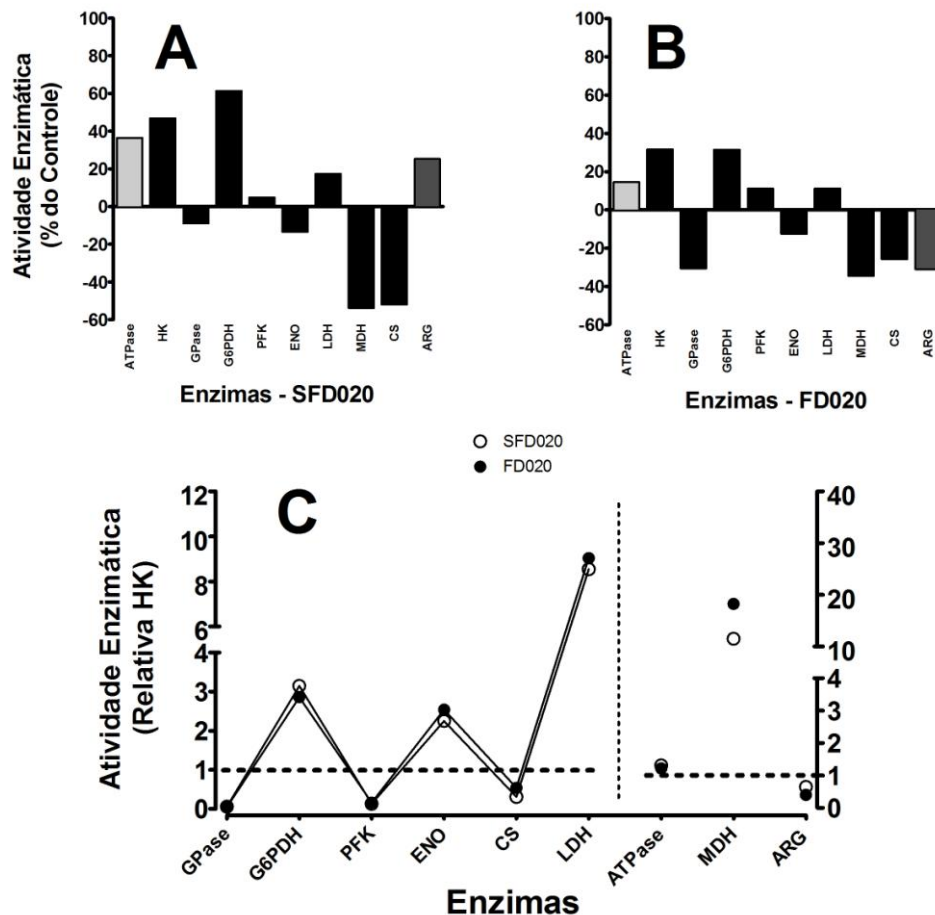


Figura 23. Atividade relativa das enzimas branquiais de *Notothenia rossii* na condição termo-salina de 0 °C e 20 psu. Os níveis enzimáticos relativos ao controle experimental estão representados em (A), para a condição sem fluoreto trófico, e em (B) com fluoreto trófico. Os níveis relativos à HK na mesma condição termo-salina-trófica estão representados em (C).

Na condição termo-salina 4-20 o tecido branquial da *N. rossii* modulou positivamente os níveis de HK, G6PDH e PFK, e negativamente os níveis das enzimas ENO, LDH, ENO, CS e ARG, em relação ao controle SFD035 (figura 24A). Na presença de fluoreto, os níveis relativos de todas as enzimas analisadas aumentaram, exceto ENO e MDH (figura 24B). Os níveis das enzimas branquiais ATPase (8%), GPase (13%), G6PDH (13%), PFK (3%) e MDH (6%), relativizados em função da atividade da HK, foram pouco afetados em relação a condição trófica, diferente das enzimas ARG (40%) CS (21%) que apresentaram diferenças mais expressivas nos seus níveis.

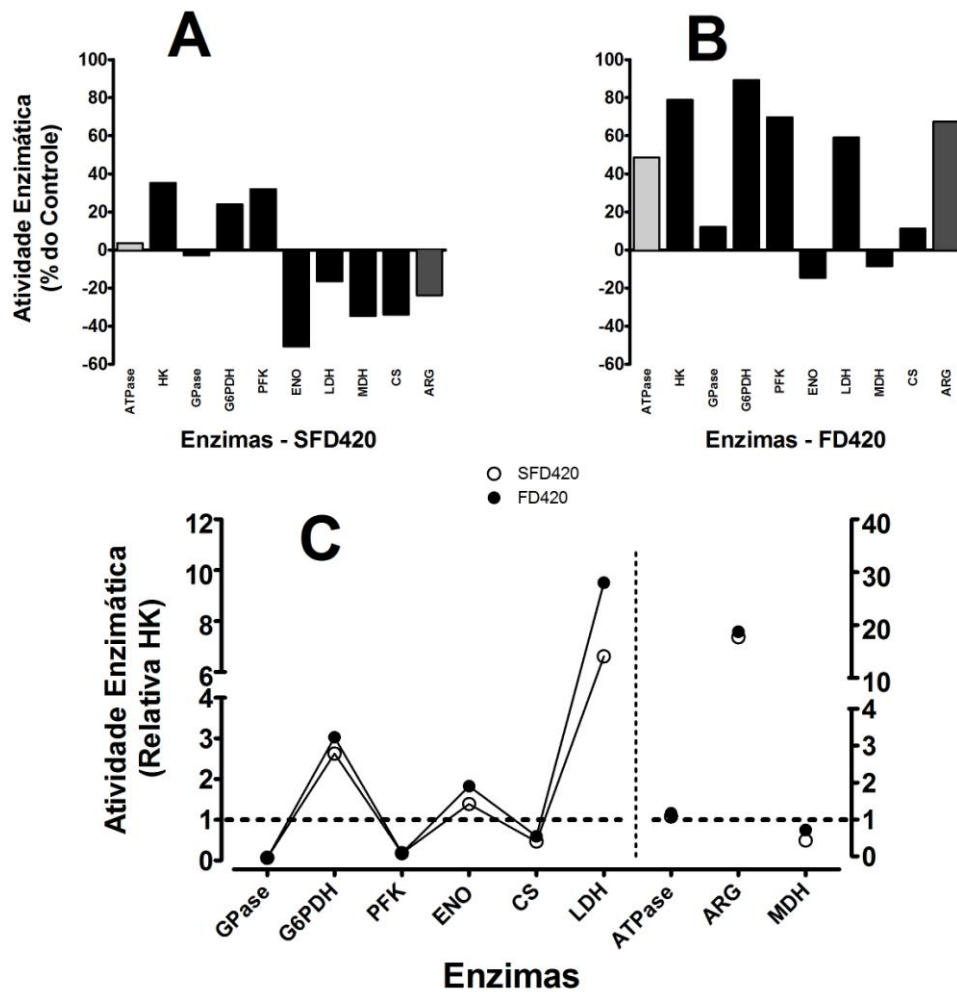


Figura 24. Atividade relativa das enzimas branquiais de *Notothenia rossii* na condição termo-salina de 4 °C e 20 psu. Os níveis enzimáticos relativos ao controle experimental estão representados em (A), para a condição sem fluoreto trófico, e em (B) com fluoreto trófico. Os níveis relativos à HK na mesma condição termo-salina-trófica estão representados em (C).

3.2.3. Metabolismo Renal

A PFK no tecido renal do peixe antártico *N. rossii* apresentou a menor atividade dentre as enzimas glicolíticas, correspondendo a apenas 12% da atividade da hexoquinase na condição controle 0 °C, 35 psu sem fluoreto (Fig. 25).

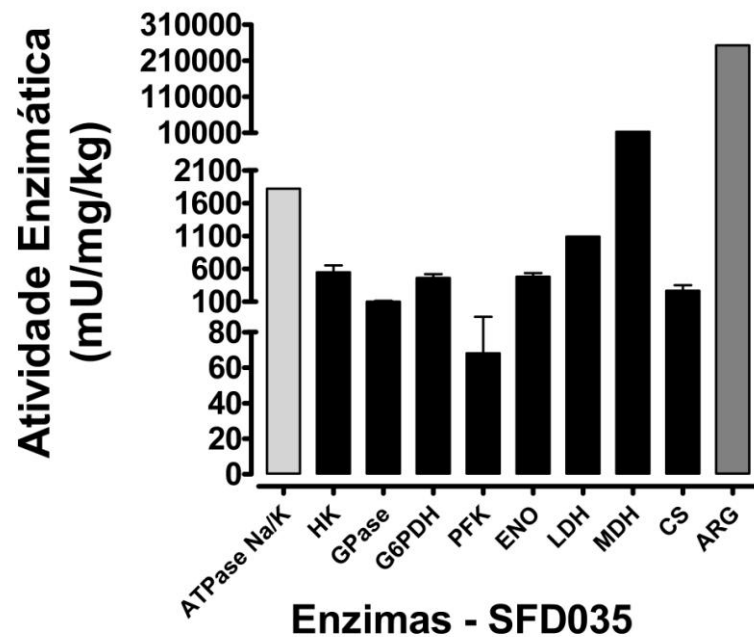


Figura 25. Níveis de enzimas renais de *Notothenia rossii*, na condição termo-salina de 0 °C e 35 psu, sem fluoreto na dieta (SFD035). As atividades foram expressas em miliunidade internacional por miligrama de proteína por kg de peixe (mU/mg/kg).

Os níveis enzimáticos do tecido renal da *N. rossii*, aclimatadas sob diferentes condições experimentais, foram relativizados em função do controle experimental (SFD035) e, dentro da mesma condição termo-salina-trófica, em relação à HK. Os resultados estão sumarizados nas figuras de 26 a 29.

Na condição termo-salina 0-35 o fluoreto trófico modulou positivamente os níveis relativos de ENO, e negativamente os níveis de MDH, ATPase Na/K e ARG (figura 26A). Os níveis enzimáticos relativos a atividade da HK apresentaram valores próximos para as enzimas G6PDH (11%), PFK (18%), ENO (15%), CS (16%), GPase (4%) e LDH (11%), e discrepantes em relação as atividades relativas das ATPase Na/K (42%), MDH (49%) e ARG (55%) (26B).

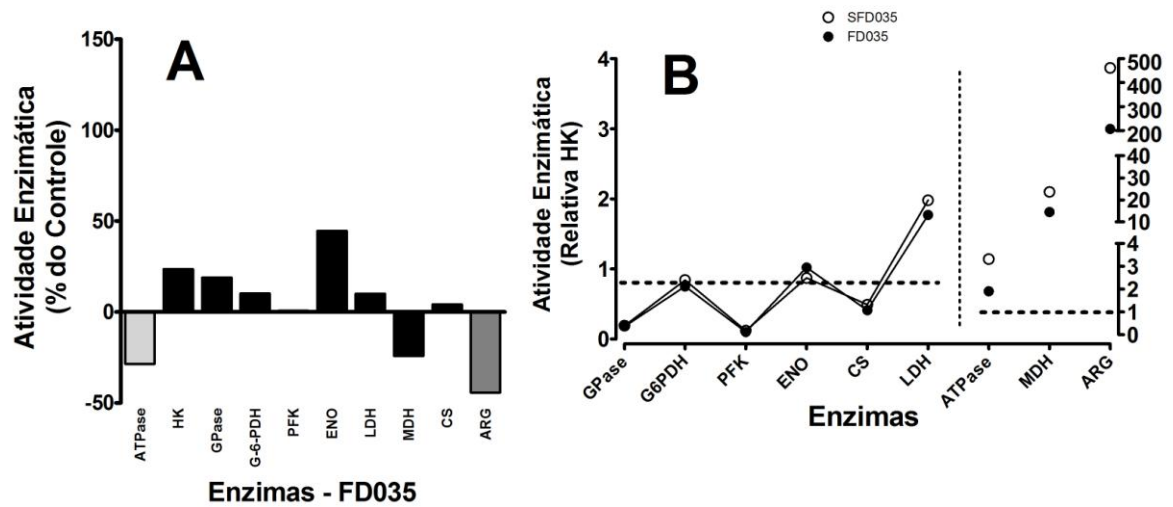


Figura 26. Atividade relativa das enzimas renais de *Notothenia rossii* na condição termo-salina-trófica 0 °C, 35 psu e fluoreto trófico (FD035). Os níveis enzimáticos relativos ao controle experimental estão representados em (A) e os níveis relativos à HK, na mesma condição termo-salina-trófica, estão representados em (B).

A condição termo-salina-trófica 4-35 sem fluoreto, modulou positivamente a atividade das enzimas dos segmentos metabólicos glicolítico, glicogenolítico, via das pentoses, TCA e arginínolítico em relação ao controle experimental, e negativamente a ATPase Na/K (figura 27A). Já na condição trófica com fluoreto (figura 27B) os níveis de HK, G6PDH e GPase sofreram elevação e os da MDH e LDH redução.

Os níveis enzimáticos relativos da GPase (1%) e ARG (11%), G6PDH (12%), PFK (13%) normalizados em função da HK dentro da mesma condição termo-salina, variaram pouco comparado com os níveis das enzimas ATPase Na/K (46%), CS (31%), ENO (34%), LDH (49%) e MDH (47%) (figura 27C).

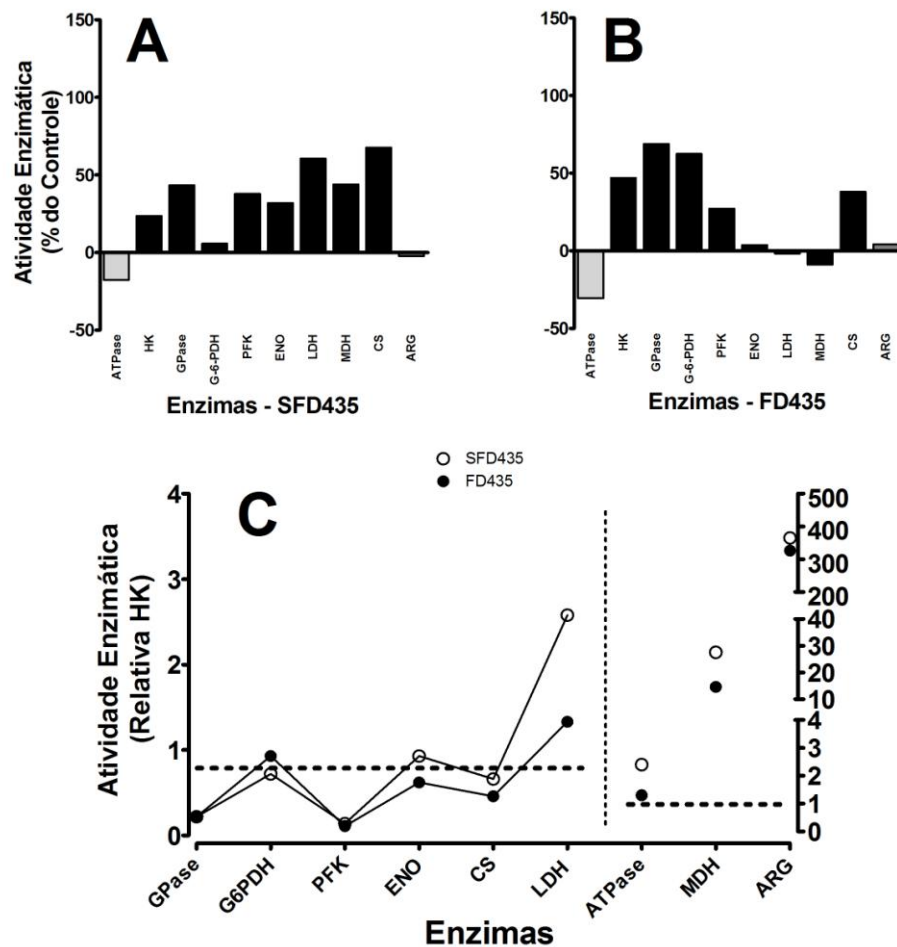


Figura 27. Atividade relativa das enzimas renais de *Notothenia rossii* na condição termo-salina de 4 °C e 35 psu. Os níveis enzimáticos relativos ao controle experimental estão representados em (A), para a condição sem fluoreto trófico, e em (B) com fluoreto trófico. Os níveis relativos à HK na mesma condição termo-salina-trófica estão representados em (C).

Na condição termo-salina 0-20 sem fluoreto trófico, o nível renal de G6PDH sofreu expressiva elevação comparado o controle SFD035 (figura 28A). Com fluoreto trófico os níveis de G6PDH permaneceram elevados e os níveis das enzimas GPase, PFK e ENO também sofreram forte modulação positiva (figura 28B). Os níveis das enzimas ATPase Na/K (15%), MDH (7%), CS (6%) e ARG (8%), normalizados em função do potencial ativador da glicose (HK), foram pouco influenciados pela condição trófica. Já os níveis relativos das enzimas PFK (22%), G6PDH (25%), GPase (51%), ENO (31%) e LDH (25%) foram influenciados de forma mais intensa (figura 28C).

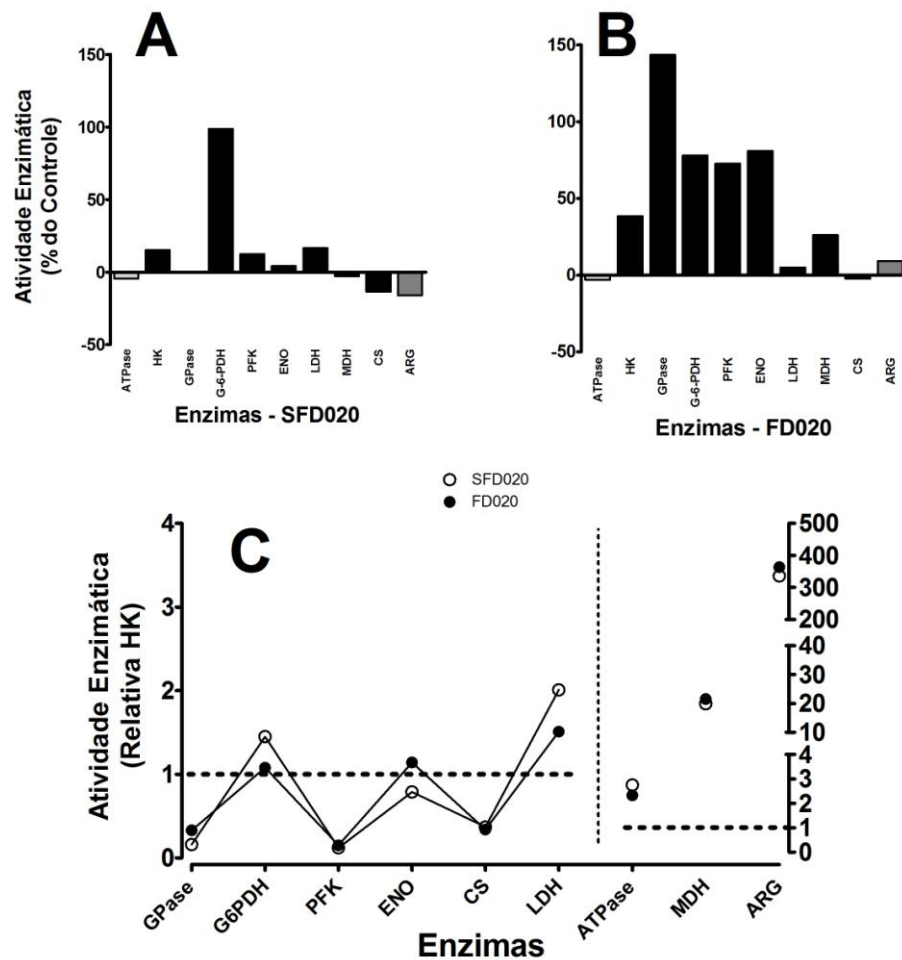


Figura 28. Atividade relativa das enzimas renais de *Notothenia rossii* na condição termo-salina de 0 °C e 20 psu. Os níveis enzimáticos relativos ao controle experimental estão representados em (A), para a condição sem fluoreto trófico, e em (B) com fluoreto trófico. Os níveis relativos à HK na mesma condição termo-salina-trófica estão representados em (C).

Na condição termo-salina 4-20 sem fluoreto, os níveis de HK, G6PDH, PFK, ENO, LDH e CS foram modulados positivamente e os da ATPase Na/K e MDH negativamente, em relação ao controle experimental (figura 29A). Já na condição trófica com fluoreto, os níveis das enzimas foram moduladas positivamente, exceto os níveis de ATPase Na/K (figura 29B).

Os níveis relativos das enzimas ATPase (12%), GPase (12%), G6PDH (18%), ENO (16%) e CS (8%), normalizados em função da atividade HK, foram pouco influenciados pela condição trófica com fluoreto, diferente dos níveis relativos das enzimas PFK (24%),

ARG (48%), MDH (36%), e LDH (44%) que foram moduladas de forma mais intensa pelo fluoreto.

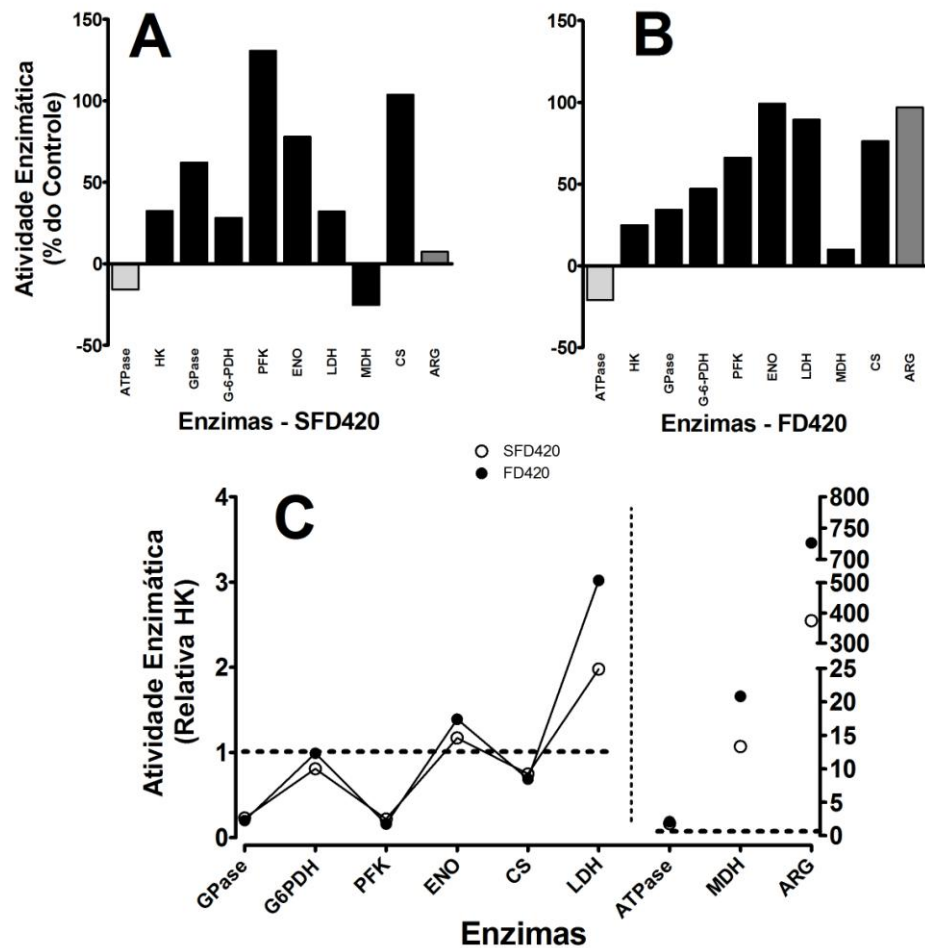


Figura 29. Atividade relativa das enzimas renais de *Notothenia rossii* na condição termo-salina de 4 °C e 20 psu. Os níveis enzimáticos relativos ao controle experimental estão representados em (A), para a condição sem fluoreto trófico, e em (B) com fluoreto trófico. Os níveis relativos à HK na mesma condição termo-salina-trófica estão representados em (C).

4. DISCUSSÃO

O peixe *Notothenia rossii*, também conhecido como bacalhau marmorata, é endêmico da região antártica e uma das quatro espécies mais abundantes na Baía do Almirantado, Ilha Rei George. O seu comportamento alimentar inclui anfípodos, pequenos peixes, algas, isopodas e Krill antártico. Durante a primavera e o verão, quando a biomassa de Krill aumenta na coluna d'água, a *N. rossii* migra verticalmente e se alimenta de Krill (Burchett, 1983; Barrera-Oro, 2002; Corbisier, et al., 2004).

Direta ou indiretamente todos os vertebrados antárticos se alimentam de Krill, e apresentam normalmente níveis elevados de fluoreto no esqueleto, não apresentam sintomatologia, alterações morfológicas ou bioquímicas características da fluorose. Nesse caso, o tecido ósseo estaria tamponando o fluoreto e evitando o seu efeito tóxico sobre os tecidos moles (Adelung, et al., 1985; Camargo, 2003). Na falta de informações sobre o consumo diário de Krill dos peixes antárticos, a dose diária de fluoreto 15 mg/Kg foi definida com base no consumo diário de Krill pelos pingüins. A via escolhida para administração do fluoreto foi a trófica, semelhante ao que ocorre na natureza.

Alterações histopatológicas foram observadas somente nas análises de microscopia de luz. Isto pode ser explicado quando levamos em consideração o número de indivíduos (n = 2) e a pequena área branquial analisada em microscopia eletrônica. Nas análises de microscopia de luz, foi utilizado o método da frequência e ausência, não utilizando nenhuma metodologia morfométrica específica. No entanto, foi observado em microscopia de luz que as histopatologias foram pontuais, em baixa frequência e atingiram pequena área branquial, características que dificultariam as análises em microscopia eletrônica.

Descolamento, hiperplasia e aneurisma foram as histopatologias encontradas em todas as situações experimentais, inclusive animais considerados controle e submetidos a condição experimental de 0 °C e 35 psu e que receberam alimentação sem o fluoreto. Estas alterações nas lamelas branquiais apresentam um efeito comum que é o aumento da distância entre a água e o sangue, distanciando, com isso, o agente agressor do sistema de distribuição de moléculas do organismo (Mallatt, 1985).

No descolamento branquial ocorre um influxo de água através da lesão epitelial, aumentando o volume do edema e conseqüentemente o descolamento. Há um aumento da distância de difusão através da qual o agente agressor precisa percorrer para alcançar a corrente sangüínea (Richmonds e Dutta, 1989; Thophon, et al., 2003).

Acreditamos que o descolamento observado até o momento não reflete ações específicas do fluoreto, mas sim, uma resposta fisiológica natural do peixe. Esta resposta pode ser regulada por fatores internos às brânquias ou ser parte de uma resposta sistêmica ao estresse.

Neste trabalho foi observada uma grande incidência de aneurismas tanto nos animais controle quanto nos experimentais. Para Van Den Heuvel et al. (2000) os aneurismas do tecido branquial provavelmente resultam da morte das células pilares resultando na perda de integridade estrutural da lamela secundária e acúmulo de células sanguíneas.

A hiperplasia, outra das lesões observadas, das células epiteliais é uma alteração que ocorre entre as lamelas secundárias e pode levar a fusão entre duas ou mais lamelas secundárias. Segundo Machado e Fanta (2003) a proliferação celular entre as lamelas secundárias diminui a área superficial, dificultando as trocas gasosas.

O efeito do fluoreto trófico sobre os constituintes plasmáticos indicam que esse halogênio tem efeito sobre o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. O efeito do fluoreto trófico sobre os níveis de enzimas branquiais e renais revelou que esse halogênio é capaz de modular a expressão de enzimas da glicogenólise, glicólise, ciclo dos ácidos tricarbóxicos e da via das pentoses. Os estudos também revelaram que a condição termo-salina afeta de forma marcante os níveis de enzimas branquiais e renais.

A escolha dos locais para captura de *N. rossii* (Punta Plaza e Glaciar Ecology) levou em consideração a provável transferência de fluoreto dos solos ornitogênicos para os sedimentos marinhos adjacentes. A colônia de pinguins de Arctowski, adjacente a estação Científica de Actowski (Polônia), recebe todo verão cerca de 10.000 espécimes de pinguins, que ingerem entre 0,5 a 1,0 Kg de Krill antártico por dia (Volkman, et al., 1980). Isso corresponde a cerca de 135 a 270 mg de fluoreto por dia e representa algo em torno de 5 a 10 toneladas de Krill por dia (135 a 270 g fluoreto/dia). Como boa parte dos excrementos dessas aves acaba sendo depositado na colônia, é provável que a lixiviação do solo transporte parte do fluoreto excretado pelas aves para a superfície do sedimento marinho do infralitoral adjacente.

Os ambientes marinhos escolhidos para captura de *N. rossii* foram o do Glaciar Ecology (ECO), adjacente à colônia de pinguins de Arctowski, e o de Punta Plaza (PP), distante 10 Km da colônia de pinguins mais próxima. Outra diferença entre esses dois ambientes marinhos reside na descarga de geleiras, na qual ECO recebe a descarga do Glaciar Ecology e a geleira mais próxima de PP está localizada a 3 Km distancia.

No caso dos metabólitos plasmáticos não protéicos, os níveis de glicose foram significativamente maiores em relação ao controle SFD035 na condição experimental hipossalina, sendo maiores no grupo experimental hipossalino alimentado com fluoreto. Nesse sentido, o aumento da glicemia tem sido utilizado como indicador de estresse em peixes (Fernandes, et al., 2008). Situações de estresse em peixes normalmente são mediadas pelo hormônio cortisol. Na aclimação hiposmótica, hiperosmótica e em diversas situações de estresse, o cortisol plasmático normalmente se encontra aumentado (Polakof, et al., 2006) e tem sido considerado o principal responsável pela proliferação de células de cloreto e aumento da expressão da subunidade α -ATPase Na/K nas brânquias (Laiz-Carrión, et al., 2002).

O efeito hiperglicemiante do cortisol tem sido atribuído a ativação da gliconeogênese hepática, como uma consequência da indução hormonal da proteólise periférica. Esse hormônio também tem ação sobre a mobilização lipídica e o aumento dos níveis de ácidos graxos no sangue (Mommsen, et al., 1999). Contudo, os níveis elevados de triglicerídeos observados na condição experimental 0 °C, 35 psu e fluoreto, não foram acompanhados de hiperglicemia, o que pode ser considerado um efeito independente da resposta hormonal típica de peixes sob estresse, que estariam desencadeando simultaneamente hiperglicemia e hiperlipemia.

O tecido muscular de peixes antárticos apresenta vasto depósito e elevada capacidade oxidativa de lipídeos, sendo secundária a oxidação de glicose e lactato como fonte de energia para regeneração do ATP. Nesse caso, os tecidos muscular epaxial e o cardíaco têm preferência oxidativa por ácidos graxos monoinsaturados (Sidell, et al., 1995). Já o tecido branquial é capaz de utilizar uma série de metabólitos circulantes como combustíveis energéticos. Contudo, o tecido branquial apresenta capacidade limitada para utilizar ácidos graxos como substrato energético. Em teleósteos marinhos, o potencial oxidativo de glicose e do aminoácido glutamato é muito maior do que o de ácidos graxos monoinsaturados. Nesse caso, uma forte correlação positiva entre os níveis da enzima citrato sintase e hexoquinase suportaram a hipótese de que o metabolismo aeróbio da glicose deve ser o principal responsável pela regeneração do ATP (Crockett, et al., 1999).

Por outro lado, o rim de teleósteos antárticos não é capaz de concentrar a urina em relação à água do mar, sendo que a osmolalidade urinária é comandada pela excreção de magnésio e cloreto. O rim de peixes antárticos excreta ativamente magnésio e cálcio, com baixa capacidade de excretar sódio e potássio (Dobbs III e DeVries, 1974).

Nesse sentido, os nossos estudos sobre estresse térmico, salino e fluoreto trófico sobre o metabolismo branquial e renal da *N. rossii*, objetivaram entender o impacto dessas condições experimentais sobre as principais vias oxidativas do metabolismo da glicose, bem como sobre a glicogenólise, a osmorregulação e o metabolismo argininolítico. A potencialidade metabólica dessas vias foi avaliada pelos níveis de enzimas chaves e os valores relativizados em relação aos níveis da enzima hexoquinase, que catalisa a fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato, introduzindo esse carboidrato no metabolismo intermediário. O uso de valores enzimáticos relativos à atividade da hexoquinase permite estabelecer correlações entre o uso da glicose com combustível metabólico. Os níveis de enzimas da via glicolítica relativos a hexoquinase, foram utilizado por Bacila et al. (1989) para comparar o potencial glicolítico da musculatura cardíaca dos peixes antárticos *Notothenia coriiceps*, *N. rossii* e *Chaenocephalus aceratus*.

Os níveis de HK na condição termo-salina 0-35 foram maiores do que nas condições de estresse térmico e menores no estresse hipossalino. No estresse térmico e hipossalino, o nível de HK foi maior do que na condição 0 °C 35 psu. Para entender o impacto dessas condições experimentais controle sobre o metabolismo branquial, os valores enzimáticos foram expressos em relação ao potencial ativador da glicose (figura 30).

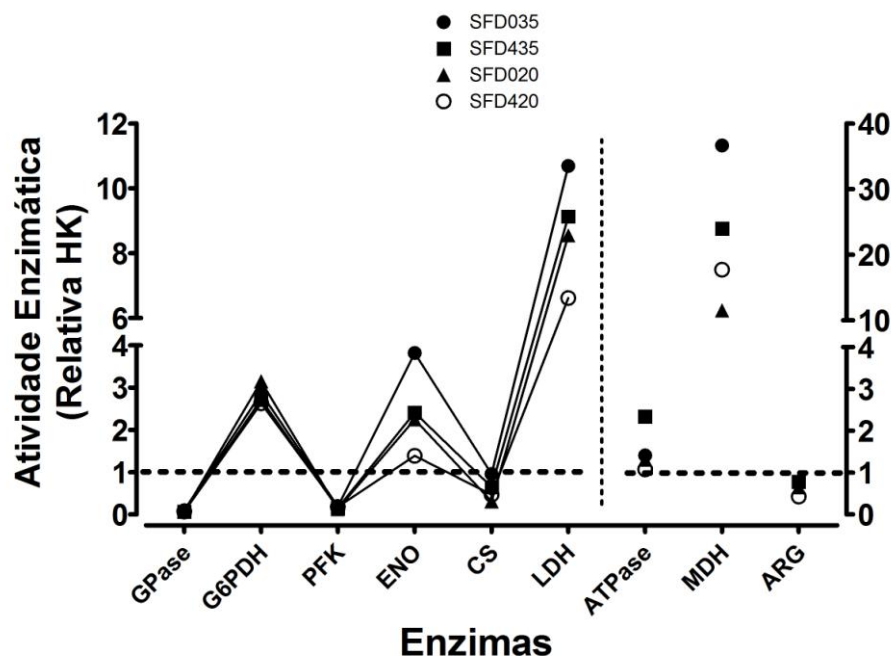


Figura 30. Níveis relativos de enzimas branquiais de *Notothenia rossii*, sob condições experimentais próximas à da natureza (SFD035), estresse térmico (SFD435), estresse hipossalino (SFD020) e estresse térmico e hipossalino (SFD420). As atividades foram calculadas em relação à HK do controle experimental (SFD035).

Comparando os valores relativos de atividade na condição SFD035 com os níveis enzimáticos branquiais dos demais experimentos, sem adição de fluoreto trófico, verificamos que a enzima G6PDH apresentou elevada correlação com os níveis de HK em todas as condições experimentais, indicando a potencial demanda de $\text{NADPH} + \text{H}^+$ e a sua dependência de glicose exógena. Em todas as condições experimentais, a correlação entre o potencial de HK e a LDH (62 a 85%) foi maior do que CS (33 a 67%), indicando que a demanda de glicose nas condições de estresse térmico e hipossalino está sendo potencialmente direcionada para o metabolismo anaeróbico. A diferença entre a atividade relativa da ATPase Na/K nas condições termo-salina 0-20 e controle experimental, foi de apenas 6%, indicou que a demanda energética do estresse hipossalino, para manutenção da bomba sódio/potássio, foi mantida em valores muito próximos ao do controle experimental. O mesmo não aconteceu nas condições termo-salinas 4-35 e 4-20, no qual as diferença entre as atividades relativas da ATPase Na/K e o controle experimental foram de aumento em 40% e redução em 23%, respectivamente, indicando que a potencial demanda branquial energética de glicose para manutenção da nessas ATPase Na/K, nessas duas condições termo-salinas, é bem diferente da condição termo-salina controle.

Comparado ao controle SFD035, os níveis de HK renal, nas condições experimentais sem fluoreto SFD435, SFD020 e SFD420, foram maiores em 20%, 13% e 25%, respectivamente, revelando a potencial demanda desse tecido. Estudo com truta marrom *in vivo*, revelou que baço, cérebro, rim e brânquias apresentam maiores taxas de consumo de glicose, se comparado aos demais tecidos (Blasco, et al., 2001). Como a reação catalisada pela HK introduz a glicose no metabolismo celular, a modulação positiva dos níveis de HK pode estar refletindo a demanda desse tecido por glicose.

Na condição SFD435, o estresse térmico modulou positivamente a atividade de todas as enzimas renais estudadas, exceto ATPase Na/K. Por outro lado, a razão entre as atividades da GPase e HK foram mantidas em valores muito próximos em todas as condições termo-salinas sem fluoreto trófico, revelando o sinergismo entre esses dois processos metabólicos que disponibilizam glicose-6-fosfato para o metabolismo energético celular. A atividade da LDH relativizada em função da atividade da HK foi maior do que a atividade relativa da CS, que é a enzima marca passo do ciclo dos ácidos tricarbóxicos. Como a razão CS/HK foi menor do que um, ficou claro que o potencial de fosforilação da glicose no rim é maior do o potencial oxidativo dos carbonos do acetil-SCoA da oxidação da glicose (figura 31).

Nas condições termo-salinas 0-20 e 4-35, sem fluoreto, as diferenças das atividades da PFK renal relativa à HK foram muito próximas a do controle experimental, mas diferente em relação à condição termo-salina 4-20. A atividade da ATPase Na/K relativa à HK foi próxima a do controle SFD035 na condição SFD020. A atividade da G6PDH relativa à atividade da HK apresentou valores muito próximos em todas as condições termo-salinas, exceto na condição SFD020, o que pode estar indicando uma demanda específica dessa condição termo-salina, no que diz respeito à atividade da via oxidativa do "shunt" da hexose-monofosfato.

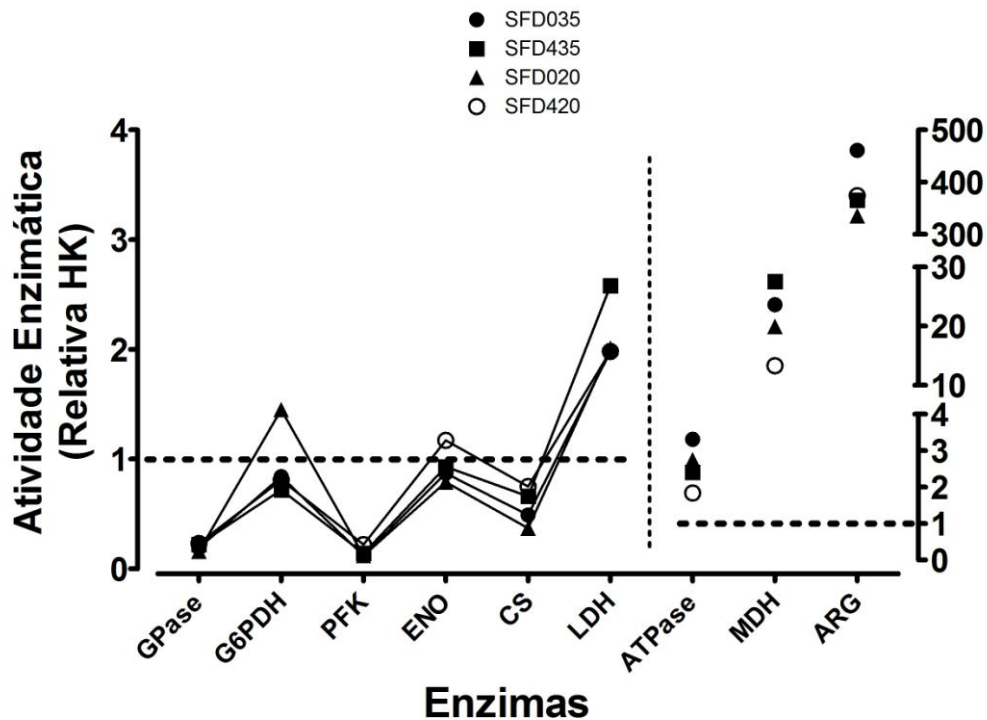


Figura 31. Níveis relativos de enzimas renais de *Notothenia rossii*, sob condições experimentais próximas a da natureza (SFD035), estresse térmico (SFD435), estresse hipossalino (SFD020) e estresse térmico e hipossalino (SFD420). As atividades foram calculadas em relação à HK do controle experimental (SFD035).

Na condição termo-salina 0-35 o fluoreto trófico modulou o metabolismo das brânquias elevando o potencial do metabolismo anaeróbio da glicose. Também ficou evidente a estreita relação entre a elevação dos níveis de G6PDH e HK, na qual a razão da atividade G6PDH/HK foi mantida constante, independente da condição trófica. Assim, o aumento da atividade da G6PDH na condição trófica com fluoreto, eleva o potencial gerador

de $\text{NADPH}+\text{H}^+$ no tecido branquial, que em princípio está sendo suportado pelo aumento do potencial ativador da glicose.

Na condição FD435, as atividades branquiais das enzimas G6PDH, LDH, MDH, relativizadas em função da atividade da HK, foram mantidas em valores próximos aos da condição trófica sem fluoreto, indicando que o efeito do fluoreto na condição térmica em 4 °C, demandou aumento da atividade da HK proporcional ao do potencial gerador de $\text{NADPH}+\text{H}^+$, do metabolismo oxidativo anaeróbico da glicose e argininolítico. Já na condição termo-salina 0-20 com fluoreto trófico (FD020), a atividade das enzimas ATPase Na/K, da G6PDH e da LDH foram modulados negativamente pelo fluoreto, na mesma proporção da atividade da HK. Na condição termo-salina 4-20, as atividades da G6PDH e da ATPase Na/K foram moduladas na mesma intensidade da HK.

O efeito do fluoreto sobre o metabolismo renal de *N. rossii* na condição termo-salina 0-35 modulou positivamente os níveis de HK. Nessa condição, as atividades das enzimas G6PDH, CS e LDH foram moduladas na mesma proporção da atividade da HK, indicando uma estreita relação entre o potencial ativador da glicose nas células e a demandas envolvendo os potenciais geradores de $\text{NADP}+\text{H}^+$ e ATP (aeróbico e anaeróbico).

Na condição termo-salina 4-35, o impacto do fluoreto elevou os níveis de HK, e os níveis das enzimas G6PDH e ARG acompanharam essa elevação. Contudo, as atividades das enzimas marcadoras do metabolismo aeróbico e anaeróbico não acompanharam, na mesma proporção, a modulação da atividade da HK. Assim, a oxidação de outros combustíveis energéticos pode estar contribuindo de forma mais expressiva para manutenção da demanda energética. Nesse caso, o aumento da atividade da ARG pode refletir essa condição, considerando que os peixes antárticos são amoniotélicos e a excreção de uréia está ligada ao potencial argininolítico dos tecidos, em especial do rim (Rodrigues, et al., 2006).

A condição termo-salina 0-20 sem fluoreto trófico modulou positivamente a atividade da HK renal, bem como das enzimas G6PDH, GPase, PFK e ENO, comparado a condição termo-salina 0-35. A razão entre as atividades das enzimas G6PDH, GPase, PFK e ENO e a atividade da enzima HK foi mantida em valores muito próximos nas duas condições termo-salinas. Contudo, os níveis das enzimas marcadoras do potencial aeróbico e anaeróbico geradores de ATP na condição termo-salina 0-20 foi mantido no mesmo patamar da condição termo-salina 0-35, indicando que a provável demanda de glicose para o metabolismo renal está relacionada com o “shunt” da hexose monofosfato e a geração de

NADP+H⁺. Como a atividade GPase indica o potencial glicogenolítico do tecido, o aumento da atividade dessa enzima pode estar aumentando o suprimento de glicose-6-fosfato para atender as demandas metabólicas, em especial do "shunt" da hexose monofosfato.

Na condição termo-salina 4-20, o fluoreto trófico modulou positivamente as atividades relativas das enzimas ARG, MDH e LDH, em relação às demais enzimas. Nesse caso, o aumento expressivo dos níveis de arginase pode estar relacionado com a necessidade de catabolizar a L-arginina, um aminoácido protéico que tem a sua concentração modulada pela arginase. Assim, nessa condição termo-salina-trófica, as necessidades metabólicas poderiam estar sendo supridas, em parte, pelo catabolismo protéico.

Modulação da Resposta Metabólica

A condição termo-salina e o fluoreto trófico foram capazes de modular os níveis dos parâmetros sanguíneos da *N. rossii*, bem como o metabolismo branquial e renal. O tecido renal e branquial de peixes apresentam excelente capacidade metabólica por glicose como substrato energético (Blasco, et al., 2001). Em peixes antárticos a elevada capacidade do tecido branquial oxidar glicose e glutamato como substratos energéticos também ficou evidente (Crockett, et al., 1999). No presente estudo ficou evidente que o fluoreto modula positivamente a atividade enzimática da hexoquinase no tecido branquial e renal.

Na condição termo-salina 0-35, a presença do fluoreto trófico induziu aumento da atividade da hexoquinase no tecido branquial, com pequena redução da atividade das enzimas marcadoras da glicogenólise, glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e do catabolismo da L-arginina. Também ficou evidente que o aumento da atividade da hexoquinase foi acompanhado pelo aumento da atividade da G6PDH, enzima reguladora do "shunt" da hexose monofosfato e principal via geradora de NADPH+H⁺ e pentoses do metabolismo celular. Nesse sentido, a modulação positiva do potencial gerador de pentoses e NADPH+H⁺ foi acompanhada pelo aumento da frequência de hiperplasia no tecido branquial (figura 32).

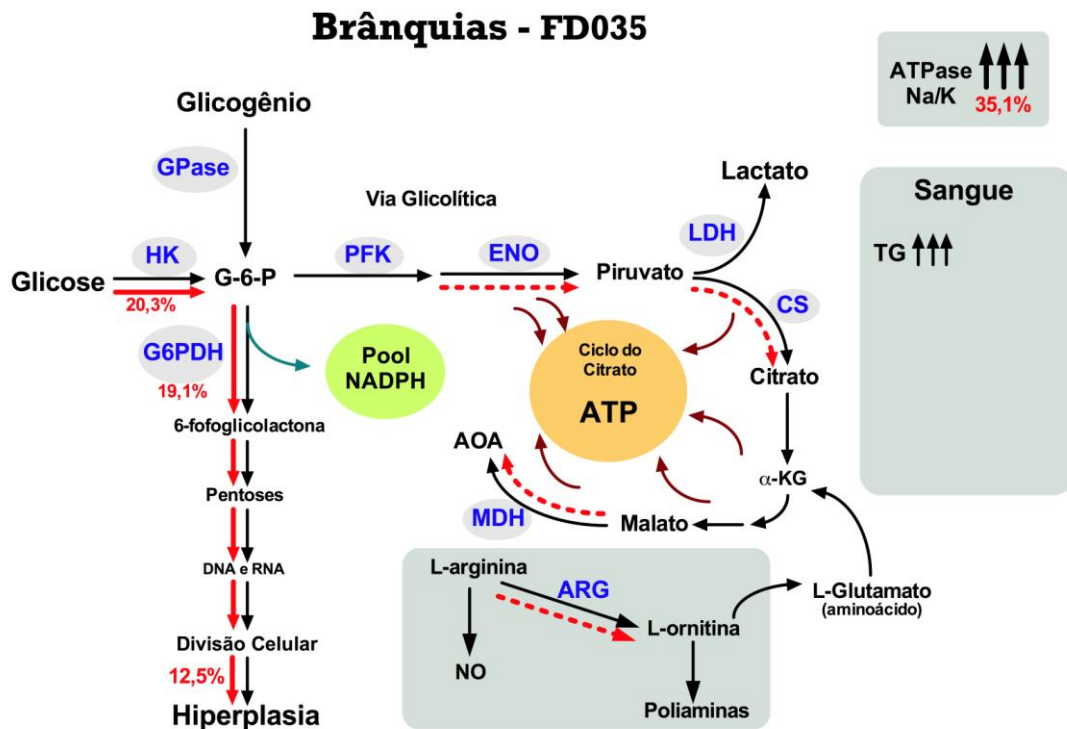


Figura 32: Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo branquial do peixe antártico *Notothenia rossii*, na condição termo-salina 0-35. As setas vermelhas contínuas e os valores numéricos expressos em porcentagem indicam o grau da modulação positiva dos níveis enzimáticos e de hiperplasia. As setas vermelhas tracejadas indicam modulação negativa.

O efeito do fluoreto trófico modulou positivamente os níveis de TG no sangue da *N. rossii* disponibilizando lipídeos, como substrato energético, para os demais tecidos. O fluoreto é capaz de inibir a atividade da enzima ATPase Na/K, independente da presença de alumínio, bem como existem evidências de que esse halogênio inibe a CaATPase e o processo de fosforilação (Murphy e Hoover, 1992). Nesse caso, a modulação positiva da atividade da ATPase Na/K pode representar uma resposta protetora do tecido branquial, que estaria compensando a inibição da ATPase Na/K imposta pelo fluoreto, com o aumento dos níveis da ATPase Na/K.

O metabolismo excretório nitrogenado dos peixes é típico de organismos amoniotélicos, sendo que algumas espécies apresentam elevada capacidade ureogênica com finalidades ureosmóticas (Mommsen e Walsh, 1989). Os níveis de arginase nos tecidos de peixes tem sido relacionado ao controle dos níveis do aminoácido L-arginina nos tecidos (Jenkinson, et al., 1996). Nesse caso, o catabolismo proteico tecidual e a digestão de proteínas estão constantemente disponibilizando L-arginina para os fluidos biológicos. A manutenção de níveis adequados desse aminoácido nos fluidos biológicos é de extrema

importância considerando o seu papel central na síntese de óxido nítrico e poliaminas (Wu e Morris, 1998). O tecido hepático e renal apresentam os maiores níveis de arginase em peixes antárticos (Rodrigues, et al., 2006). Nesse caso, o tecido hepático estaria atuando com filtro metabólico modulando a entrada L-arginina no sistema circulatório. Já a arginase renal está estrategicamente localizada em um tecido de caráter excretório, capaz de depurar a uréia formada na reação de hidrólise da L-arginina, catalisada pela arginase. Assim, os níveis teciduais de arginase são normalmente modulados em função das necessidades teciduais de hidrolisar o aminoácido L-arginina (Morris Jr, 2002).

Na condição térmica-salina 0-35, o fluoreto trófico também modulou positivamente os níveis renais da hexoquinase e da G6PDH, sugerindo que o aumento do potencial ativador da glicose no tecido renal estaria atendendo em parte as demandas metabólicas que dependem do "shunt" da hexose monofosfato (figura 33). A modulação positiva dos níveis de GPase também refletem o aumento da demanda do tecido renal por glicose-6-fosfato como substrato do metabolismo oxidativo. Diferente do tecido branquial, essa condição termo-salina-trófica modulou positivamente a oxidação da glicose via anaeróbia e aeróbio, bem como modulou negativamente os níveis da ATPase Na/K. A modulação negativa dos níveis de arginase, sugere que a demanda catabólica de L-arginina derivada do metabolismo proteico diminuiu.

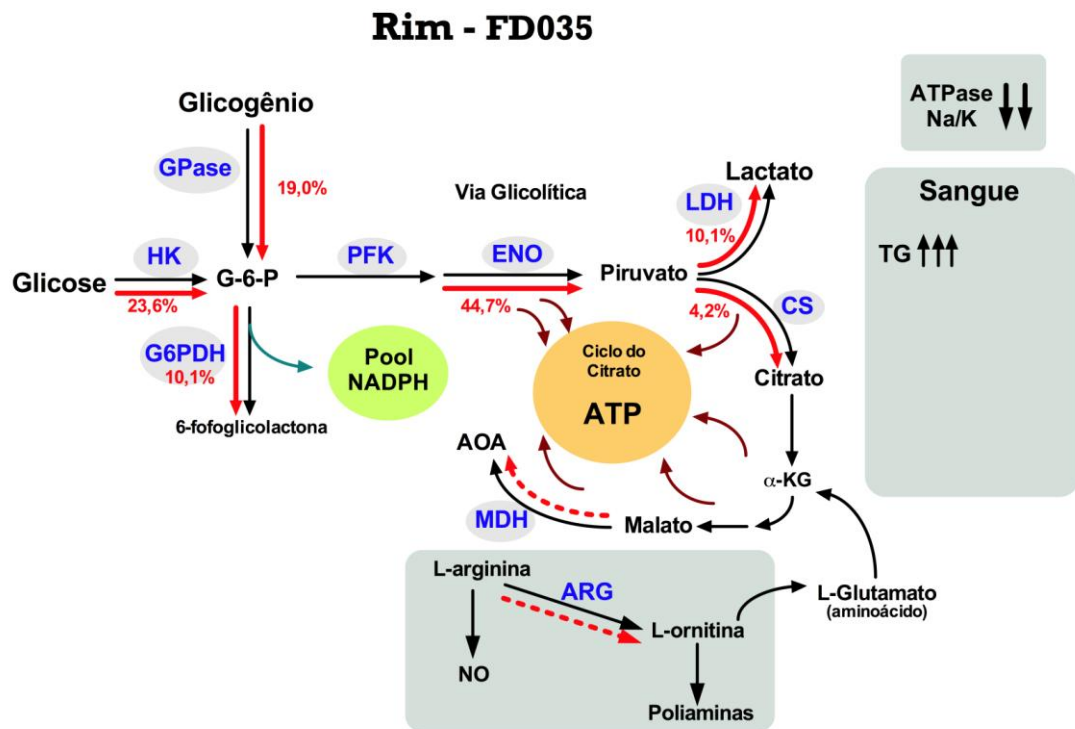


Figura 33: Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo renal do peixe antártico *Notothenia rossii*, na condição termo-salina 0-35. As setas vermelhas contínuas e os valores numéricos expressos em porcentagem indicam o grau da modulação positiva dos níveis enzimáticos e de hiperplasia. As setas vermelhas tracejadas indicam modulação negativa.

O fluoreto trófico na condição termo-salina 4-35 modulou positivamente os níveis branquiais de arginase em relação aos controles SFD035 e SFD435, aumentando o potencial argininolítico. Como o tecido branquial apresenta elevada capacidade oxidativa para L-glutamato (Crockett, et al., 1999), o aumento do potencial argininolítico pode estar contribuindo para síntese de L-glutamato (figura 34). A modulação positiva dos níveis de hexoquinase, G6PDH e LDH, em relação aos controles SFD035 e SFD435, indicou que o fluoreto, aumenta o potencial ativador de glicose no tecido branquial, disponibilizando G-6-P para o "shunt" da hexose monofosfato e glicólise. Como o tecido hepático, muscular esquelético e cardíaco de peixes antárticos utilizam preferencialmente ácidos graxos mono insaturados como substratos energéticos (Crockett e Sidell, 1993; Sidell, et al., 1995), o aumento da concentração de triglicerídeos plasmáticos pode representar uma importante fonte de ácidos graxos para o metabolismo energético desses tecidos, na condição de estresse térmico.

A modulação positiva dos níveis da ATPase Na/K na condição termo-salina 4-35 com fluoreto trófico, em relação aos controles SFD035 e SFD435, pode ter sido resultado

da ação de dois fatores: a) o estresse térmico que reconhecidamente eleva os níveis dessa enzima no tecido branquial de peixes antárticos (Morrison, et al., 2006) e; b) do fluoreto que pode ter induzido o aumento nessa condição trófica, semelhante ao observado na condição termo-salina-trófica 0-35-fluoreto.

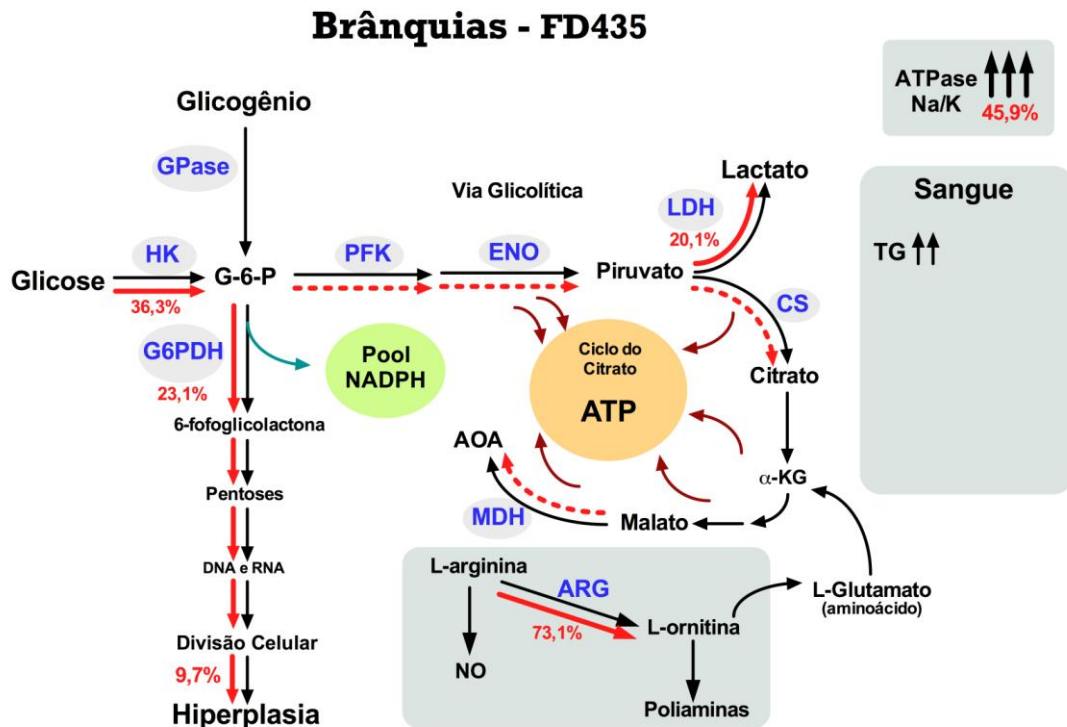


Figura 34: Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo branquial do peixe antártico *Notothenia rossii*, na condição termo-salina 4-35. As setas vermelhas contínuas e os valores numéricos expressos em porcentagem indicam o grau da modulação positiva dos níveis enzimáticos e de hiperplasia. As setas vermelhas tracejadas indicam modulação negativa. As alterações foram expressas em relação ao controle experimental SFD035.

Na condição termo-salina 4-35 com fluoreto trófico, o tecido renal elevou os níveis de hexoquinase, GPase e G6PDH em relação aos controles SFD035 e SFD435. O aumento dos níveis de HK e GPase, nessa condição termo-salino-trófica, indicou que o tecido renal está potencializando a formação de G-6-P com o provável objetivo de atender de atender as demandas do "shunt" da hexose monofosfato que modulou positivamente os níveis da G6PDH. A modulação positiva dos níveis renais das enzimas PFK e CS sinalizou o aumento do potencial aeróbio (figura 35). Semelhante ao observado na condição termo-salino-trófica 0-35-fluoreto, os níveis de triglicerídeos plasmáticos foram modulados positivamente e os níveis renais da ATPase Na/K, negativamente em relação aos controles SFD035 e SFD435.

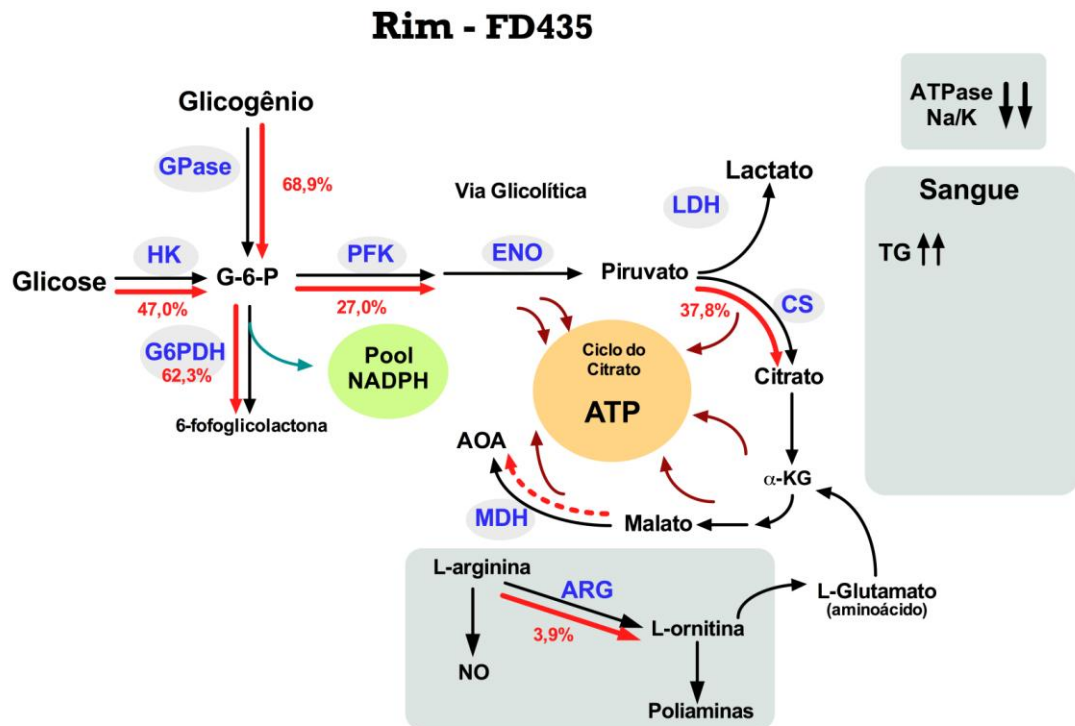


Figura 35: Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo renal do peixe antártico *Notothernia rossii*, na condição termo-salina 4-35. As setas vermelhas contínuas e os valores numéricos expressos em porcentagem indicam o grau da modulação positiva dos níveis enzimáticos e de hiperplasia. As setas vermelhas tracejadas indicam modulação negativa. As alterações foram expressas em relação ao controle experimental SFD035.

A condição termo-salina 0-20, independente da condição trófica, os níveis de glicose no sangue da *N. rossii* foram modulados positivamente. Contudo, na condição de fluoreto trófico, o aumento glicêmico foi mais acentuado. Nessa condição termo-salina também ficou evidente a modulação positiva dos níveis de TG e proteínas totais, e negativa dos níveis de cálcio e albumina (figuras 17 e 19). A concentração de cálcio na água do mar está por volta de 10 mM e a calcemia dos teleósteos entre 1,7 à 1,9 mM (Sundell e Björnsson, 1988; Cooper, et al., 2010). Contudo, o nível de cálcio no plasma de *N. rossii*, na condição termo-salina 0-35, foi de $3,34 \pm 0,47$ mM, bem acima da maioria dos teleósteos marinhos e semelhante ao do peixe bruxa ($3,06 \pm 0,07$ mM), um craniata que mantêm a sua osmolalidade sanguínea próxima a da água do mar.

Como a água do mar com salinidade de 20 foi diluída com água de degelo, na condição termo-salina 0-20, a concentração de cálcio na água dos aquários foi reduzida para concentrações próximas de 5,7 mM. O metabolismo do cálcio em peixes ainda permanece em discussão, mas acredita-se que a entrada de cálcio ocorre principalmente via

branquial, sendo que o intestino, semelhante aos de mamíferos absorve e secreta cálcio e participa ativamente do controle da calcemia (Marshall e Bryson, 1998). O efluxo de cálcio intestinal parece ser maior do que o influxo desse cátion em teleósteos (Sundell e Björnsson, 1988). Isso em parte deve-se a secreção de bicarbonato no intestino de teleósteos marinhos, que tem como finalidade evitar a absorção de cálcio, mediante precipitação na forma de carbonato de cálcio, o que facilita a absorção de água (Whittamore, et al., 2010). Na condição termo-salina 0-20, ficou evidente que a *N. rossii* não foi capaz de manter a sua calcemia em 3,34 mM, contudo, os níveis de cálcio no sangue declinaram para valores próximos aos da grande maioria de teleósteos.

Já na condição termo-salina 4-20, as alterações no metabolismo do cálcio não foram evidentes e o cálcio plasmático foi mantido em $3,03 \pm 0,11$ mM, em níveis semelhantes aos dos controles experimental e da natureza. A condição de estresse térmico (4 °C) aumenta a atividade da ATPase Na/K branquial e diminui a osmolalidade plasmática dos peixes antárticos, acentuando a diferença osmolar entre os fluídos biológicos dos peixes antárticas e a água do mar, o que acarreta a perda passiva de água (Guynn, et al., 2002; Brauer, et al., 2005). Para compensar, os peixes antárticos bebem mais água (4 à 5 vezes mais) repondo dessa forma a água perdida passivamente (Petzel, 2005). Nesse caso, provavelmente a *N. rossii* aumenta a ingestão de água do mar para compensar a perda passiva de água imposta pelo estresse térmico. Assim, a baixa concentração de cálcio na salinidade em 20 estaria sendo compensada pelo aumento da ingestão de água (figura 18).

A redução dos níveis de albumina e aumento de proteínas totais na condição termo-salina 0-20, podem ter relação com o metabolismo do cálcio, considerando que a albumina é um importante transportador de cálcio e albumina no sangue dos animais. Normalmente os peixes apresentam níveis de albumina mais baixos do que os mamíferos e aves. Aparentemente, o peixe antártico *Dissostichus mawsoni* não apresenta albumina no sangue e o transporte de ácidos graxos é feito pela lipoproteína de alta densidade (HDL) (Metcalf, et al., 1998; Metcalf, et al., 1999).

Na condição termo-salina 0-20 a *N. rossii* apresentou alterações típicas de estresse em peixes, como o aumento da glicemia (Laiz-Carrión, et al., 2002). Na condição de fluoreto trófico, o tecido branquial da *N. rossii* modulou positivamente os níveis de HK no tecido branquial apenas em relação ao controle SFD035, que foi acompanhado pelo aumento nos níveis de GPase, indicando que as alterações foram decorrentes da ação do estresse hipossalino. Nesse caso, o aumento do potencial ativador da glicose provavelmente foi direcionado para o "shunt" da hexose monofosfato, considerando que a

atividade da enzima G6PDH e a frequência de hiperplasia branquial aumentaram (figura 36). A modulação negativa da atividade argininolítica ficou na condição trófica com fluoreto, em relação aos controles SFD035 e SFD020, indicando que o fluoreto é o responsável pela modulação da atividade argininolítica nessa condição termo-salina. A atividade da ATPase Na/K também foi modulada positivamente em relação aos controles SFD035, mas não em relação a condição termo-salina 0-20 sem fluoreto, indicando que a condição termo-salina responde pela modulação positiva da atividade da ATPase Na/K.

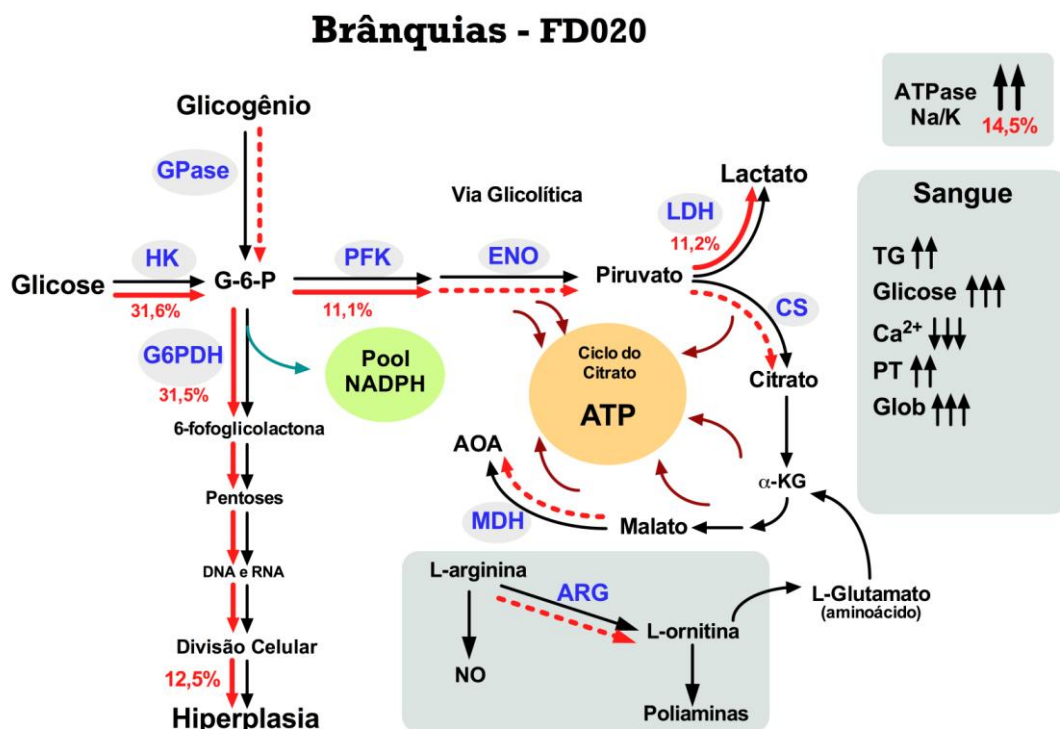


Figura 36: Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo branquial do peixe antártico *Notothenia rossii*, na condição termo-salina 0-20. As setas vermelhas contínuas e os valores numéricos expressos em porcentagem indicam o grau da modulação positiva dos níveis enzimáticos e de hiperplasia. As setas vermelhas tracejadas indicam modulação negativa. As alterações foram expressas em relação ao controle experimental SFD035.

O fluoreto trófico, na condição termo-salina de 0-20, modulou positivamente os níveis da HK renal em relação aos controles SFD035 e SFD020. Essa modulação também foi observada em relação as enzimas GPase, PFK, ENO, e MDH e os dois controles (figura 37). O aumento da atividade da G6PDH só ficou evidente em relação ao controle SFD035, indicando que a modulação positiva dessa enzima não está vinculada a condição trófica, mas sim em relação a condição termo-salina. Assim, a ação isolada do

fluoreto potencializou o metabolismo da glicose pela via glicolítica, enquanto que a condição termo-salina 0-20 tende a direcionar a glicose pela via da hexose monofosfato.

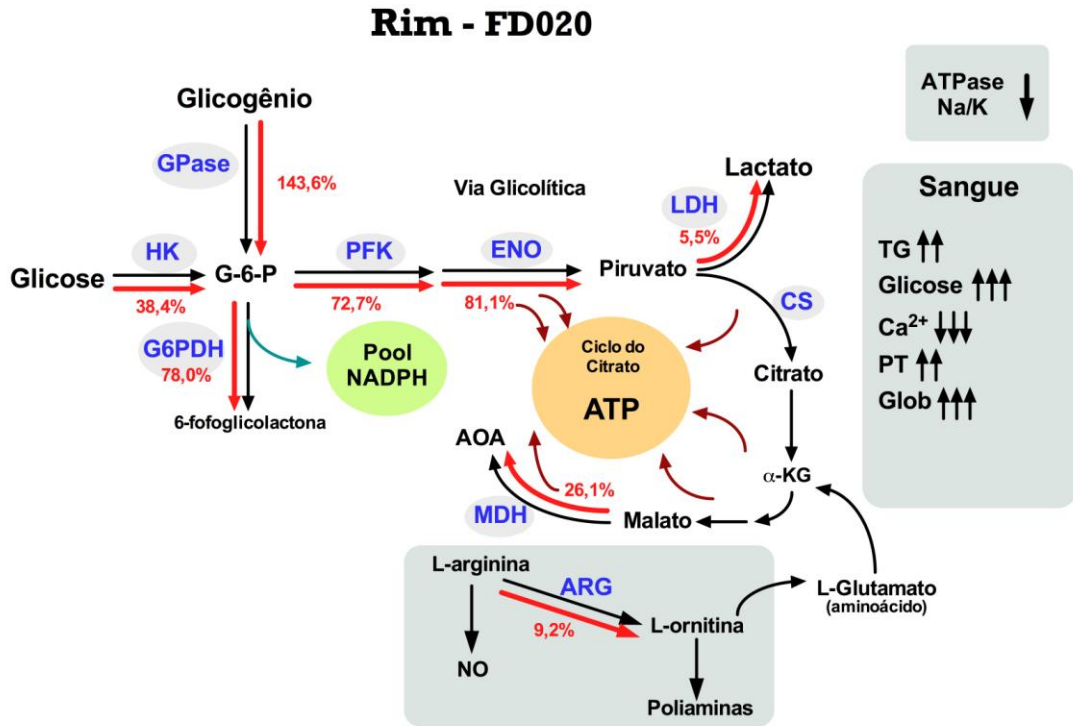


Figura 37: Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo renal do peixe antártico *Notothenia rossii*, na condição termo-salina 0-20. As setas vermelhas contínuas e os valores numéricos expressos em porcentagem indicam o grau da modulação positiva dos níveis enzimáticos e de hiperplasia. As setas vermelhas tracejadas indicam modulação negativa. As alterações foram expressas em relação ao controle experimental SFD035.

Na condição termo-salina 4-20, o fluoreto não foi capaz de alterar os níveis de TG plasmático e promover as alterações glicêmicas observadas na condição termo-salina 0-20. Provavelmente, o estresse térmico está induzindo a *N. rossii* a beber mais água, como já comentado acima, e, disponibilizando uma quantidade maior de cálcio no intestino. Essa condição favorece a formação de CaF_2 que apresenta um produto de solubilidade de $3,9 \times 10^{-11}$. A relação entre o metabolismo do cálcio e do fluoreto tem sido sugerida desde 1948, indicando que o fluoreto pode alterar a homeostasia do cálcio e prevenir a fluorose (Barbier, et al., 2010). Nesse caso, o metabolismo do cálcio pode ter reduzido a biodisponibilidade do fluoreto para *N. rossii*.

Contudo, a condição termo-salina-trófica 4-20-fluoreto foi capaz de modular positivamente os níveis branquiais da HK em relação aos controles SFD035 e SFD420. Esse comportamento foi observado em relação as enzimas PFK, GPase, G6PDH, LDH, CS,

ARG e ATPase Na/K em relação aos dois controles, e da ENO apenas em relação ao controle SFD420. Embora o aporte de cálcio possa ter reduzido a biodisponibilidade de fluoreto, isso não foi suficiente para evitar o seu efeito sobre o metabolismo branquial (figura 38). Os níveis relativamente elevados das enzimas do metabolismo energético, do "shunt" da hexose monofosfato e do catabolismo da L-arginina, revelaram que a condição termo-salina 4-20 na presença de fluoreto trófico induziu as maiores alterações do potencial metabólico branquial.

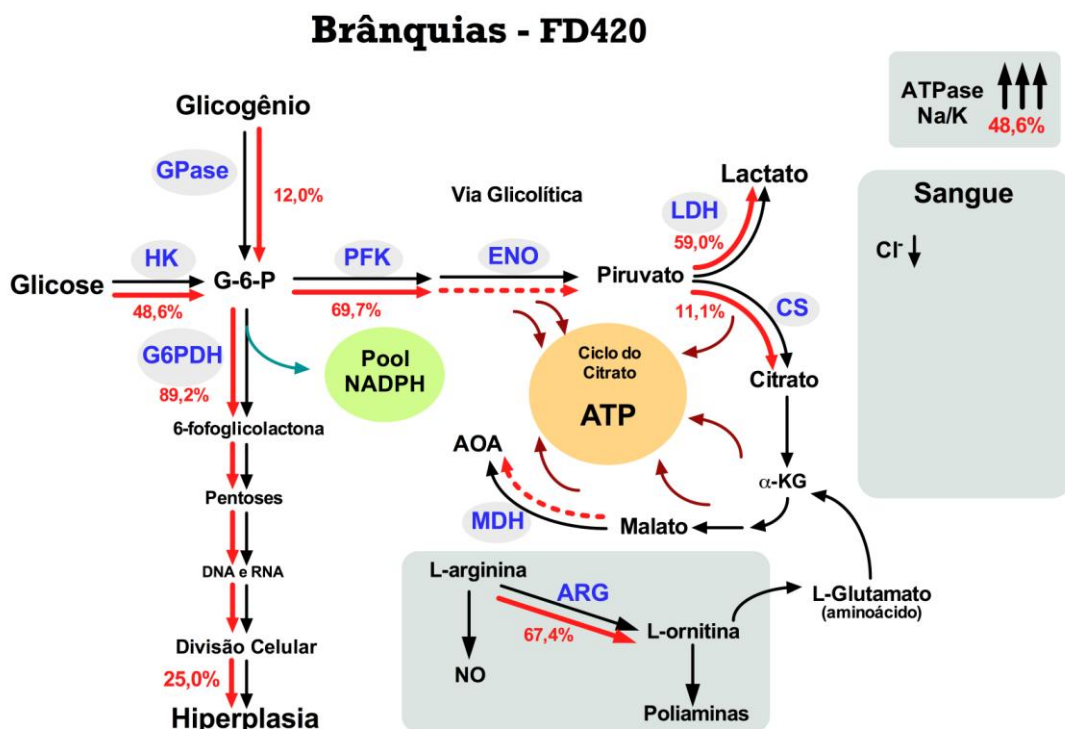


Figura 38: Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo branquial do peixe antártico *Notothenia rossii*, na condição termo-salina 4-20. As setas vermelhas contínuas e os valores numéricos expressos em porcentagem indicam o grau da modulação positiva dos níveis enzimáticos e de hiperplasia. As setas vermelhas tracejadas indicam modulação negativa. As alterações foram expressas em relação ao controle experimental SFD035.

O fluoreto trófico também modulou positivamente os níveis renais das enzimas HK, MDH, LDH, ENO, ARG e G6PDH em relação aos controles SFD035 e SFD420. Os níveis das enzimas GPase e CS foram modulados positivamente apenas em relação ao controle SFD035, indicando que o fluoreto trófico não foi o responsável pelo aumento da atividade. Os níveis da ATPase Na/K foram modulados negativamente apenas em relação ao controle SFD035, revelando o estresse térmico e hipossalino como fator responsável pela regulação negativa (figura 39).

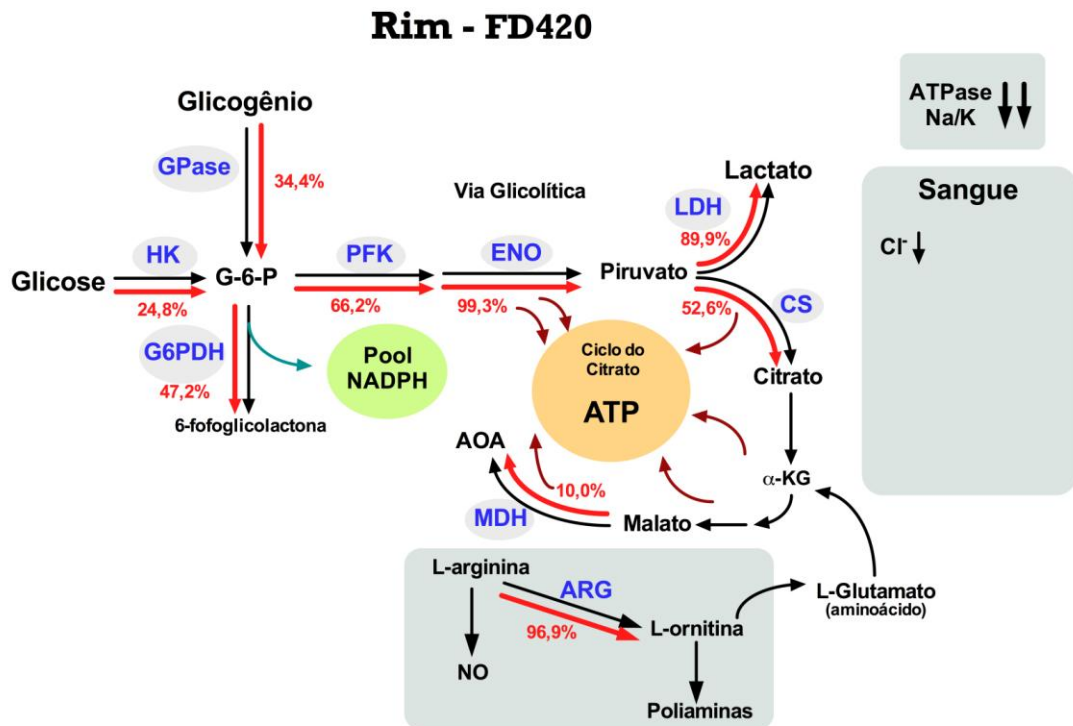


Figura 39: Efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo renal do peixe antártico *Notothenia rossii*, na condição termo-salina 4-20. As setas vermelhas contínuas e os valores numéricos expressos em porcentagem indicam o grau da modulação positiva dos níveis enzimáticos e de hiperplasia. As setas vermelhas tracejadas indicam modulação negativa. As alterações foram expressas em relação ao controle experimental SFD035.

5. CONCLUSÕES

- A histopatologia do tipo aneurisma foi observada com maior frequência nas condições de estresse térmico e salino;
- As patologias hiperplásicas apresentaram um grande aumento na frequência, quando os animais foram submetidos à condição experimental que envolveu a presença de fluoreto, independente da condição térmica ou salina;
- O fluoreto da dieta do peixe antártico *Notothenia rossii* promove hipertrigliceridemia e hiperglicemia na condição hipossalina e hipertriglicerimiantes na condição normossalina, apenas na temperatura de 0 °C;
- A condição hipossalina, na temperatura de 0 °C, promove hipertrigliceridemia e hipocalcemia independente da presença de fluoreto na dieta;
- As diferenças encontradas entre níveis glicêmicos, de triglicédeos e colesterol, dos peixes coletados no ambiente do Glaciar Ecologoy, localizado próximo à pinguineira de Arctowski e, provavelmente, impactado por fluoreto, e o de Punta Plaza, local sem evidências de impacto por fluoreto, seguiram as mesmas tendências observadas nos experimentos realizados a 0°C e 35 psu, com fluoreto e sem fluoreto, respectivamente;
- O impacto do fluoreto no tecido branquial da *Notothenia rossii* envolveu modulações compensatórias do metabolismo da glicose, osmorregulador e arginínolítico. O fluoreto aumenta o potencial ativador da glicose a 0° C e no estresse térmico, e reduz esse potencial na hipossalinidade, mas apenas a 0 °C;
- O metabolismo branquial impactado pelo fluoreto da dieta manteve estreita correlação entre o potencial ativador da glicose e o potencial gerador de NADPH+H⁺ em todas as condições experimentais; gerador anaeróbico de ATP, independente da temperatura à 35 psu e a 0°C, 20 psu; potencial glicogenolítico em todas as condições experimentais e, potencial osmorregulador na condição hipossalina independente da temperatura;
- O metabolismo renal impactado pelo fluoreto da dieta manteve estreita correlação entre o potencial ativador da glicose e os potenciais geradores de NADPH+H⁺ em todas as condições experimentais; o gerador aeróbico de ATP em todas as condições experimentais, exceto na condição 4 °C, 35 psu; o glicogenolítico em todas as

condições experimentais, exceto a 0 °C, 20 psu; o gerador anaeróbio de ATP na condição 0°C, 35 psu; e o potencial osmorregulador nas condições hipossalinas;

- O nível de arginase no tecido branquial é modulado negativamente pelo fluoreto na temperatura de 0 °C e positivamente na temperatura de 4 °C, independente do efeito da salinidade;
- O nível de arginase no tecido renal é modulado negativamente na condição de 0 °C, 35 psu e positivamente a 4 °C, 20 psu.

6. REFERÊNCIAS

Adelung, D., Bößmann, K. e Rößler, D. The distribution of fluoride in some antarctic seals. **Polar Biology**, v.5, n.1, p.31-34. 1985.

Adelung, D., Buchholz, F., Culik, B. e Keck, A. Fluoride in tissues of Krill *Euphausia superba* Dana and *Meganyctiphanes norvegica* M. Sars in relation to the moult cycle. **Polar Biology**, v.7, n.1, p.43-50. 1987.

Ahn, I.-Y., Lee, S. H., Kim, K. T., Shim, J. H. e Kim, D.-Y. Baseline heavy metal concentrations in the Antarctic clam, *Laternula elliptica* in Maxwell Bay, King George Island, Antarctica. **Marine Pollution Bulletin**, v.32, n.8-9, p.592-598. 1996.

Angelovic, J. W., Sigler, W. F. e Neuhold, J. M. Temperature and fluorosis in rainbow trout. **J. Water Pollut. Control Fed.**, v. April, p.371-381. 1961.

Arigony-Neto, J., Simões, J. C. e Bremer, U. F. Implementantion of the Admiralty Bay Geographic Information System, King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**, v.4, p.187-190. 2004.

Aronson, R. B., Moody, R. M., Ivany, L. C., Blake, D. B., Werner, J. E. e Glass, A. Climate change and trophic response of the Antarctic bottom fauna. **PLoS ONE**, v.4, n.2. 2009.

Bacila, M., Rosa, R. e Rodrigues, E. Fluoride inhibition of enolase from Antarctic organisms. **Pesquisa Antártica Brasileira**, v.1, n.1, p.31 - 34. 1989.

Bacila, M., Rosa, R., Rodrigues, E., Lucchiari, P. H. e Rosa, C. D. Tissue metabolism of the ice-fish *Chaenocephalus aceratus* Loenberg. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.92, n.2, p.313-318. 1989.

Baldwin, J., Elias, J. P., Wells, R. M. G. e Donovan, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.342, n.2, p.213-225. 2007.

Barbier, O., Arreola-Mendoza, L. e Del Razo, L. M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v.188, n.2, p.319-333. 2010.

Barker, P. F. e Thomas, E. Origin, signature and palaeoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. **Earth-Science Reviews**, v.66, n.1-2, p.143-162. 2004.

Barnes, D. K. A., Fuentes, V., Clarke, A., Schloss, I. R. e Wallace, M. I. Spatial and temporal variation in shallow seawater temperatures around Antarctica. **Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v.53, n.8-10, p.853-865. 2006.

Barrera-Oro, E. The role of fish in the Antarctic marine food web: differences between inshore and offshore waters in the southern Scotia Arc and west Antarctic Peninsula. **Antarctic Science**, v.14, n.04, p.293-309. 2002.

Blasco, J., Marimón, I., Viaplana, I. e Fernández-Borrás, J. Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: Effects of fasting and glucose loading. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.24, n.3, p.247-258. 2001.

- Brauer, P. R., Sanmann, J. N. e Petzel, D. H. Effects of warm acclimation on Na⁺,K⁺-ATPase α -subunit expression in chloride cells of antarctic fish. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, v.285, n.1, p.600-609. 2005.
- Braun, M., Simões, J. C., Vogt, S., Bremer, U. F., Blindow, N., Pfender, M., Saurer, H., Aquino, F. E. e Ferron, F. A. An improved topographic database for King George Island: Compilation, application and outlook. **Antarctic Science**, v.13, n.1, p.41-52. 2001.
- Brockington, S. The seasonal energetics of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) at Rothera Point, Adelaide Island. **Polar Biology**, v.24, n.7, p.523-530. 2001.
- Burchett, M. S. Food, feeding and behaviour of *Notothenia rossii* nearshore at South Georgia. **British Antarctic Survey Bulletin**, v.61, p.45-51. 1983.
- Camargo, J. A. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. **Chemosphere**, v.50, n.3, p.251-264. 2003.
- Camargo, J. A. e Tarazona, J. V. Short-term toxicity of fluoride ion (F⁻) in soft water to rainbow trout and brown trout. **Chemosphere**, v.22, n.5-6, p.605-611. 1991.
- Carvajal, N., Bustamante, M., Hinrichsen, P. e Torres, A. Properties of arginase from the sea mollusc *Concholepas concholepas*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.78, n.3, p.591-594. 1984.
- Carvajal, N., Kessi, E., Bidart, J. e Rojas, A. Properties of arginase from the foot muscle of *Chiton latus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.90, n.2, p.385-388. 1988.
- Casaux, R. J., Mazzotta, A. S. e Barrera-Oro, E. R. Seasonal aspects of the biology and diet of nearshore nototheniid fish at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, v.11, n.1, p.63-72. 1990.
- Chang, J. C. H., Wu, S. M., Tseng, Y. C., Lee, Y. C., Baba, O. e Hwang, P. P. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. **Journal of Experimental Biology**, v.210, n.19, p.3494-3504. 2007.
- Chen, L., Devries, A. L. e Cheng, C. H. C. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic nototheniid fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, n.8, p.3811-3816. 1997.
- Cheng, C. H. C. e Detrich Iii, H. W. Molecular ecophysiology of Antarctic nototheniid fishes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.362, n.1488, p.2215-2232. 2007.
- Childress, J. J. e Somero, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v.52, n.3, p.273-283. 1979.

Ciardello, M. A., Camardella, L. e Di Prisco, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two antarctic teleosts: Correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v.1250, n.1, p.76-82. 1995.

Clark, G. **Staining procedures**. Willians & Wilkins. 1981. 512 p.

Clarke, A. Seasonality in the antarctic marine environment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.90, n.3, p.461-473. 1988.

Clarke, A. e Johnston, I. A. Evolution and adaptive radiation of antarctic fishes. **Trends in Ecology & Evolution**, v.11, n.5, p.212-218. 1996.

Clarke, A. e Johnston, I. A. Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. **Trends in Ecology and Evolution**, v.11, n.5, p.212-218. 1996.

Clarke, A., Murphy, E. J., Meredith, M. P., King, J. C., Peck, L. S., Barnes, D. K. A. e Smith, R. C. Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.362, n.1477, p.149-166. 2007.

Cooper, C. A., Whittamore, J. M. e Wilson, R. W. Ca²⁺-driven intestinal HCO₃⁻ secretion and CaCO₃ precipitation in the European flounder in vivo: Influences on acid-base regulation and blood gas transport. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.298, n.4, p.R870-R876. 2010.

Corbisier, T., Petti, M. V., Skowronski, R. P. e Brito, T. S. Trophic relationships in the nearshore zone of Martel Inlet (King George Island, Antarctica): d¹³C stable-isotope analysis. **Polar Biology**, v.27, n.2, p.75-82. 2004.

Crockett, E. L., Londraville, R. L., Wilkes, E. E. e Popesco, M. C. Enzymatic capacities for β -oxidation of fatty fuels are low in the gill of teleost fishes despite presence of fatty acid-binding protein. **Journal of Experimental Zoology**, v.284, n.3, p.276-285. 1999.

Crockett, E. L. e Sidell, B. D. Substrate selectivities differ for hepatic mitochondrial and peroxisomal β -oxidation in an Antarctic fish, *Notothenia gibberifrons*. **Biochemical Journal**, v.289, n.2, p.427-433. 1993.

Culling, C. F. A., Allison, R. T. e Barr, W. T. **Cellular pathology technique**. Butterworths. 1985. 642 p.

Deconto, R. M. e Pollard, D. Rapid Cenozoic glaciation of Antarctica induced by declining atmospheric CO₂. **Nature**, v.421, n.6920, p.245-249. 2003.

Di Prisco, G., Cocca, E., Parker, S. K. e Detrich Iii, H. W. Tracking the evolutionary loss of hemoglobin expression by the white-blooded Antarctic icefishes. **Gene**, v.295, n.2, p.185-191. 2002.

Dobbs Iii, G. H. e Devries, A. L. Renal function in Antarctic teleost fishes: Serum and urine composition. **Marine Biology**, v.29, n.1, p.59-70. 1974.

- Eastman, J. T. **Antarctic Fish Biology - Evolution in a Unique Environment**. Academic Press, Inc. 1993. 322 p.
- Eastman, J. T. The nature of the diversity of Antarctic fishes. **Polar Biology**, v.28, n.2, p.93-107. 2005.
- Eastman, J. T. e Lannoo, M. J. Brain and sense organ anatomy and histology in hemoglobinless Antarctic icefishes (Perciformes: Notothenioidei: Channichthyidae). **Journal of Morphology**, v.260, n.1, p.117-140. 2004.
- Eschmeyer, W. N., Fricke, R., Fong, J. D. e Polack, D. A. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). **Zootaxa**, v.2525, p.19-50. 2010.
- Fernandes, C., Fontainhas-Fernandes, A., Rocha, E. e Salgado, M. A. Monitoring pollution in Esmoriz-Paramos lagoon, Portugal: Liver histological and biochemical effects in *Liza saliens*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.145, n.1-3, p.315-322. 2008.
- Fields, P. A. e Somero, G. N. Hot spots in cold adaptation: Localized increases in conformational flexibility in lactate dehydrogenase A4 orthologs of Antarctic nototheniid fishes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.95, n.19, p.11476-11481. 1998.
- Fiske, C. H. e Subbarow, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biological Chemistry** v.66, n.2, December 1, 1925, p.375-400. 1925.
- Fitch, N. A., Johnston, I. A. e Wood, R. E. Skeletal muscle capillary supply in a fish that lacks respiratory pigments. **Respiration Physiology**, v.57, n.2, p.201-211. 1984.
- Frederich, M., Sartoris, F. J. e Portner, H. O. Distribution patterns of decapod crustaceans in polar areas: A result of magnesium regulation? **Polar Biology**, v.24, n.10, p.719-723. 2001.
- Ghiselli, G. SMC3 knockdown triggers genomic instability and p53-dependent apoptosis in human and zebrafish cells. **Molecular Cancer**, v.5. 2006.
- Gorsich, S. W., Barrows, V., Halbert, J. e Farrar, W. W. Purification and Properties of $\gamma\gamma$ -Enolase from Pig Brain. **Journal of Protein Chemistry**, v.18, n.1, p.103-115. 1999.
- Guynn, S., Dowd, F. e Petzel, D. Characterization of gill Na/K-ATPase activity and ouabain binding in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v.131, n.2, p.363-374. 2002.
- Hall, S. e Thatje, S. Temperature-driven biogeography of the deep-sea family Lithodidae (Crustacea: Decapoda: Anomura) in the Southern Ocean. **Polar Biology**, p.1-8. 2010.
- Harrison, K., Hallett, J., Burcham, T. S., Feeney, R. E., Kerr, W. L. e Yeh, Y. Ice growth in supercooled solutions of antifreeze glycoprotein. **Nature**, v.328, n.6127, p.241-243. 1987.
- Hochachka, P. W. e Somero, G. N. **Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution**. Oxford University Press. 2002a. 466 p.

Hochachka, P. W. e Somero, G. N. Temperature. In: P. W. Hochachka e G. N. Somero (Ed.). **Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution**. New York: Oxford University Press, 2002b. Temperature, p.466.

Iyamu, E. W., Asakura, T. e Woods, G. M. A colorimetric microplate assay method for high-throughput analysis of arginase activity in vitro. **Analytical Biochemistry**, v.383, n.2, p.332-334. 2008.

Jenkinson, C. P., Grody, W. W. e Cederbaum, S. D. Comparative properties of arginases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.114, n.1, p.107-132. 1996.

Johnston, I. A. Muscle metabolism and growth in Antarctic fishes (suborder Notothenioidei): evolution in a cold environment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.136, n.4, p.701-713. 2003.

Karnovsky, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **J Cell. Biol**, v.27, p.137-138. 1965.

Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J. M., Martín Del Río, M. P., Míguez, J. M., Soengas, J. L. e Mancera, J. M. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.27, n.3-4, p.179-188. 2002.

Lu, J., Zheng, J., Liu, H., Li, J., Xu, Q. e Chen, K. Proteomics analysis of liver samples from puffer fish *Takifugu rubripes* exposed to excessive fluoride: An insight into molecular response to fluorosis. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v.24, n.1, p.21-28. 2010.

Luft, J. H. Improvements in epoxy resin embedding methods. **Journal of Cell Biology**, v.9, n.2, February 1, 1961, p.409-414. 1961.

Machado, M. R. e Fanta, E. Effects of the organophosphorous methyl parathion on the branchial epithelium of a freshwater fish *Metynnis roosevelti*. **Brazilian Archives of Biology and Technology** v.46, n.3, p.361-372. 2003.

Mallatt, J. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: A statistical review. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.42, n.4, p.630-648. 1985.

Mark, F., Hirse, T. e Pörtner, H. Thermal sensitivity of cellular energy budgets in some Antarctic fish hepatocytes. **Polar Biology**, v.28, n.11, p.805-814. 2005.

Mark, F. C., Lucassen, M. e Pörtner, H. O. Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics**, v.1, n.3, p.365-374. 2006.

Marshall, W. S. e Bryson, S. E. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: An inclusive model of a multifunctional cell. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v.119, n.1, p.97-106. 1998.

Mccormick, S. D. Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺ - ATPase activity. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science**, v.50, p.656 - 658. 1993.

Metcalf, V., Brennan, S., Chambers, G. e George, P. The Albumins of Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Brown Trout (*Salmo trutta*) Appear to Lack a Propeptide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.350, n.2, p.239-244. 1998.

Metcalf, V. J., Brennan, S. O. e George, P. M. The Antarctic toothfish (*Dissostichus mawsoni*) lacks plasma albumin and utilises high density lipoprotein as its major palmitate binding protein. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v.124, n.2, p.147-155. 1999.

Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. e Moon, T. W. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, n.3, p.211-268. 1999.

Mommsen, T. P. e Walsh, P. J. Evolution of urea synthesis in vertebrates: the piscine connection. v.243, p.72-74. 1989.

Moore, J. K., Abbott, M. R. e Richman, J. G. Location and dynamics of the Antarctic Polar Front from satellite sea surface temperature data. **Journal of Geophysical Research C: Oceans**, v.104, n.C2, p.3059-3073. 1999.

Morris Jr, S. M. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. **Annual Review of Nutrition**. 22: 87-105 p. 2002.

Morrison, J. F., Guynn, S. R., Scofield, M. A., Dowd, F. J. e Petzel, D. H. Warm acclimation changes the expression of the Na⁺,K⁺-ATPase α ± subunit isoforms in Antarctic fish gills. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.333, n.1, p.129-139. 2006.

Motulsky, H. **Intuitive Biostatistics**. Oxford University Press. 1995. 386 p.

Murphy, A. J. e Hoover, J. C. Inhibition of the Na,K-ATPase by fluoride. Parallels with its inhibition of the sarcoplasmic reticulum CaATPase. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.24, p.16995-17000. 1992.

Neuhold, J. M. e Sigler, W. F. Chlorides affect the toxicity of fluorides to rainbow trout. **Science**, v.135, n.3505, p.732-733. 1962.

Nicol, S. e De La Mare, W. Ecosystem management and the Antarctic Krill. **American Scientist**, v.81, p.36-47. 1993.

O'brien, K. M. e Sidell, B. D. The interplay among cardiac ultrastructure, metabolism and the expression of oxygen-binding proteins in Antarctic fishes. **Journal of Experimental Biology**, v.203, n.8, p.1287-1297. 2000.

Petzel, D. Drinking in Antarctic fishes. **Polar Biology**, v.28, n.10, p.763-768. 2005.

Pfuhl, H. A. e Mccave, I. N. Evidence for late Oligocene establishment of the Antarctic Circumpolar Current. **Earth and Planetary Science Letters**, v.235, n.3-4, p.715-728. 2005.

Polakof, S., Arjona, F. J., Sangiao-Alvarellos, S., Mart \neq N Del R \neq O, M. P., Mancera, J. M. e Soengas, J. L. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream *Sparus auratus*. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v.176, n.5, p.441-452. 2006.

Rakusa-Suszczewski, S. **The Marine Antarctic Coastal Ecosystem of Admiralty Bay.** Polish Academy of Sciences. 1993. p.

Reichenbach-Klinke, H. H. **Fish pathology.** 1973. p.

Reynolds, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy **Journal of Cell Biology**, v.17, n.1, April 1, 1963, p.208-212. 1963.

Richmonds, C. R. e Dutta, H. M. Histopathological changes induced by malathion in the gills of buegill *Lepomis macrochirus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology Comparative Biochemistry and Physiology C Comparative Pharmacology and Toxicology**, v.43, p.123-130. 1989.

Roberts, R. J. **Fish pathology.** 1989. p.

Rodrigues, E., Ribeiro, A. C. M. T. e Bacila, M. L-arginine metabolism in mitochondria isolated from the liver of Antarctic fish *Notothenia rossii* and *Notothenia neglecta*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, p.825-833. 2006.

Rodrigues, E., Rosa, R., Fukuchi, M., Numanami, H. e Bacila, M. The effect of temperature on the kinetic properties of phosphoafuctokinase and hexokinase from the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Proceeding NIPR Symposium Polar Biology**, v.7, p.110-117. 1994.

Rodrigues, E., Santos, M. R. D. S., Rodrigues Júnior, E., Gannabathula, S. V. e Lavrado, H. P. Arginine metabolism of the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip, 1831): An ecophysiological approach. **Polar Biology**, v.32, n.5, p.691-702. 2009.

Rodrigues, E., Sree Vani, G. e Lavrado, H. P. Nitrogen metabolism of the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip) and its potential use as biomarker. **Oecologia Brasiliensis**, v.11, n.1, p.37 - 49. 2007.

Romão, S., Freire, C. A. e Fanta, E. Ionic regulation and Na⁺,K⁺-ATPase activity in gills and kidney of the Antarctic aglomerular cod icefish exposed to dilute sea water. **Journal of Fish Biology**, v.59, n.2, p.463-468. 2001.

Ross, R. M. e Quetin, L. B. How productive are antarctic krill. **Bioscience**, v.36, n.4, p.264-269. 1986.

Saborowski, Saborowski, R., Buchholz e Buchholz, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v.140, n.3, p.557-565. 2002.

Sands, M., Nicol, S. e Mcminn, A. Fluoride in Antarctic marine crustaceans. **Marine Biology**, v.132, n.4, p.591-598. 1998.

Sangiao-Alvarellos, S., Arjona, F. J., Martín Del Río, M. P., Míguez, J. M., Mancera, J. M. e Soengas, J. L. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. **Journal of Experimental Biology**, v.208, n.22, p.4291-4304. 2005.

Sharma, R., Tsuchiya, M. e Bartlett, J. D. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. **Environmental Health Perspectives**, v.116, n.9, p.1142-1146. 2008.

Sidell, B. D. Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. **The Journal of experimental biology**, v.201, n.Pt 8, p.1119-1128. 1998.

Sidell, B. D., Crockett, E. L. e Driedzic, W. R. Antarctic fish tissues preferentially catabolize monoenoic fatty acids. **Journal of Experimental Zoology**, v.271, n.2, p.73-81. 1995.

Sidell, B. D. e O'brien, K. M. When bad things happen to good fish: The loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes. **Journal of Experimental Biology**, v.209, n.10, p.1791-1802. 2006.

Siegel, V. Distribution and population dynamics of *Euphausia superba*: summary of recent findings. **Polar Biology**, v.29, n.1, p.1-22. 2005.

Sigler, W. F. e Neuhold, J. M. Fluoride intoxication in fish: a review. **Journal of Wildlife Diseases**, v.8, n.3, July 1, 1972, p.252-254. 1972.

Somero, G. N. 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. 2004.

Sundell, K. e Björnsson, B. T. Kinetics of calcium fluxes across the intestinal mucosa of the marine teleost, *Gadus morhua*, measured using an in vitro perfusion method. **Journal of Experimental Biology**, v.140, p.171-186. 1988.

Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S. e Jaritkhuan, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v.121, p.307-320. 2003.

Thuesen, E. V., McCullough, K. D. e Childress, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the UK**, v.85, n.03, p.603-611. 2005.

Tsutsui, T., Suzuki, N. e Ohmori, M. Sodium fluoride-induced morphological and neoplastic transformation, chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, and unscheduled DNA synthesis in cultured Syrian hamster embryo cells. **Cancer Research**, v.44, n.3, p.938-941. 1984.

Van Den Heuvel, M. R., Power, M., Richards, J., Mackinnon, M. e Dixon, D. G. Disease and gill lesions in yellow perch (*perca flavescens*) exposed to oil sands mining-associated waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.46, n.3, p.334-341. 2000.

Volkman, N. J., Presler, P. e Trivelpiece, W. Diets of pygoscelid penguins at King George Island, Antarctica. **Condor**, v.82, p.373-378. 1980.

Wang, Y. N., Xiao, K. Q., Liu, J. L., Dallner, G. e Guan, Z. Z. Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver. **Toxicology**, v.146, n.2-3, p.161-169. 2000.

Watson, M. L. Staining of Tissue Sections for Electron Microscopy with Heavy Metals. **Journal of Cell Biology**, v.4, n.4, July 25, 1958, p.475-478. 1958.

Whittamore, J. M., Cooper, C. A. e Wilson, R. W. HCO₃⁻ secretion and CaCO₃ precipitation play major roles in intestinal water absorption in marine teleost fish in vivo. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.298, n.4, p.R877-R886. 2010.

Wu, G. e Morris, S. M., Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. **Biochemical Journal**, v.336, p.1-17. 1998.

Zhang, Y., Huang, D., Zhao, D., Long, J., Song, G. e Li, A. Long-term toxicity effects of cadmium and lead on *Bufo raddei* tadpoles. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.79, n.2, p.178-183. 2007.