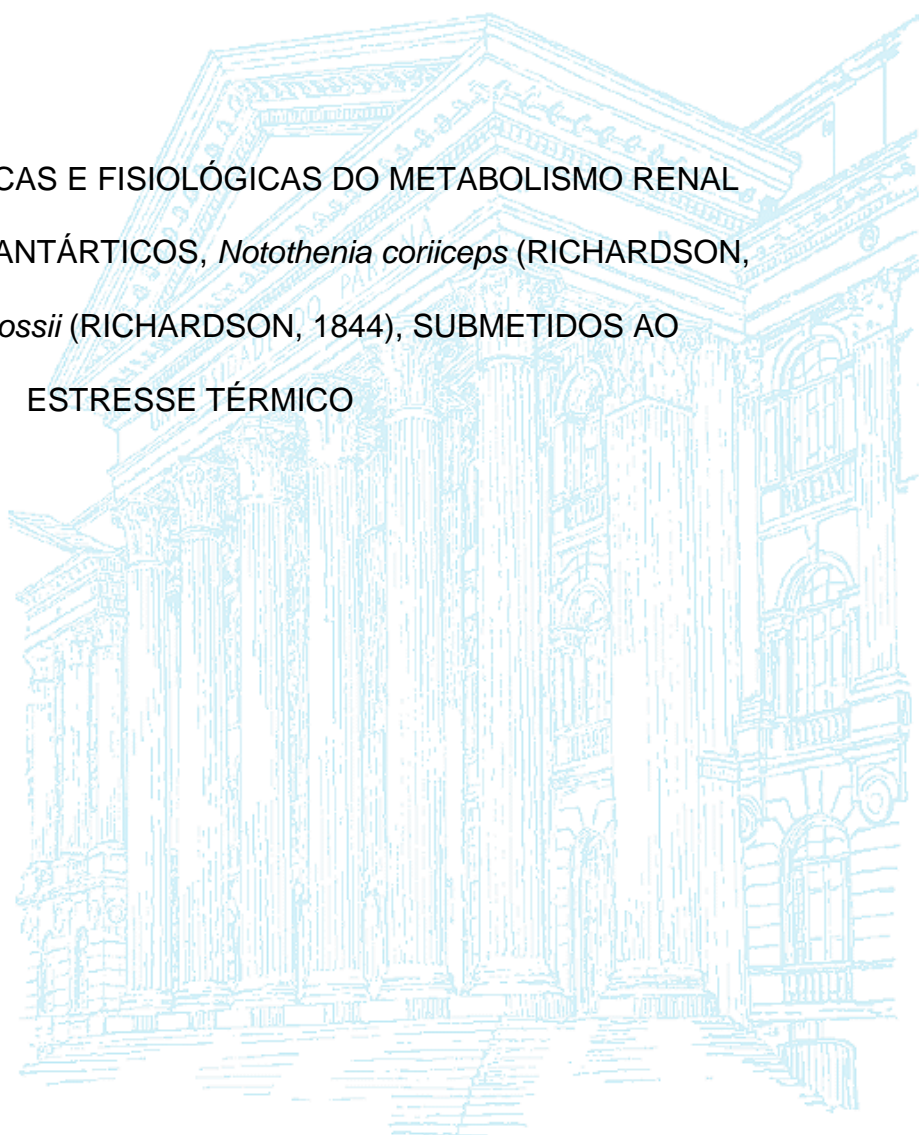


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PRISCILA KREBSBACH

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DO METABOLISMO RENAL
DE DOIS TELEÓSTEOS ANTÁRTICOS, *Notothenia coriiceps* (RICHARDSON,
1844) E *Notothenia rossii* (RICHARDSON, 1844), SUBMETIDOS AO
ESTRESSE TÉRMICO



CURITIBA
2014

PRISCILA KREBSBACH

RESPOSTAS BIOQUÍMICAS E FISIOLÓGICAS DO METABOLISMO RENAL
DE DOIS TELEÓSTEOS ANTÁRTICOS, *Notothenia coriiceps* (RICHARDSON,
1844) E *Notothenia rossii* (RICHARDSON, 1844), SUBMETIDOS AO
ESTRESSE TÉRMICO

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e
Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas,
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Lucélia Donatti

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Krebsbach, Priscila

Respostas bioquímicas e fisiológicas do metabolismo renal de dois teleósteos antárticos, *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) submetidos ao estresse térmico. / Priscila Krebsbach. – Curitiba, 2014.

83 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. Stress oxidativo 3. Metabolismo energético I. Título II. Donatti, Lucélia III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

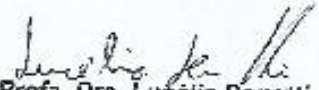
CDD (20. ed.) 597.0924
597.5


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 (ICC/FIOCRUZ)

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. Ricardo Fernandez Perez
Universidade Federal do Paraná - UFPR


Prof. Dr. Rosário Tadeu Hochmuller Fogaça
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Suplente:

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

Após arguir a mestrande **Priscila Krebsbach**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Respostas bioquímicas e fisiológicas do metabolismo renal de dois teleósteos antárticos, *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844), submetidos ao estresse térmico", são de parecer favorável a ~~concessão~~ *concessão* da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração 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, 17 de Fevereiro de 2014



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, que são os meus maiores exemplos;
À minha irmã, que desconfiando da ciência e seus caminhos, incita ainda mais
minha curiosidade;
Ao meu noivo, meu amor, que com carinho e compreensão sempre está ao
meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, bênção e proteção.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Lucélia Donatti, pela sua dedicação, incentivo e orientação nas etapas desse trabalho, compartilhando seus conhecimentos e profissionalismo. Além de abrir os meus horizontes e tornar possível a realização de sonhos.

À Tânia Zaleski pela paciência e ajuda nas análises estatísticas. Sempre disposta a debater os resultados e suas possíveis causas.

À Cintia Machado pela atenção, sempre trazendo as “soluções” para os meus “problemas” da forma mais simples e engraçada. Agradeço pelo carinho e amizade sempre!

À Maria Rosa D. Pedreiro, pela amizade ao longo desses anos, pela ajuda no laboratório, pela companhia em viagens durante a iniciação científica e o mestrado. Nossa volta sempre vem recheada de histórias e aventuras, muitas delas, engraçadas.

À Nádia Sabchuk, por muito me ajudar com o início das análises. Tornando o ambiente de trabalho divertido.

À Alana M. R. G. Kluczkovski e Mariana Forgati por sempre estarem dispostas a ajudar em que for necessário e pelos momentos de descontração no laboratório.

Às meninas que passaram pelo inverno antártico (Cintia Machado, Flavia B. V. Silva, Luciana B. Cettina, Mariana Forgati e Tânia Zaleski) a fim de realizarem as coletas e experimentos, tornando possível a execução desse trabalho. A contribuição de vocês foi essencial!

Ao Édson Rodrigues Júnior, que prontamente me “socorreu” no fim das análises, ao emprestar as microplacas de 384 poços, quando comprá-las virou missão quase impossível.

A todos que fizeram ou fazem parte do Laboratório de Biologia Adaptativa e nos marcam com boas histórias!

Ao Prof. Dr. Francisco Filipak Neto por suas contribuições nos relatórios desenvolvidos durante o mestrado, que muito auxiliaram.

Ao Prof. Dr. Ricardo F. Perez pelas correções e sugestões ao longo do período que contribuíram para a melhoria desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Rosalvo T. H. Fogaça pela atenção e disposição em participar como banca desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Ciro A. O. Ribeiro pelas dicas e conversa instigante.

À minha família pelo carinho e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR e aos professores que contribuíram para a minha formação.

À Marinha do Brasil, em especial a Secirm (Secretaria Interministerial para os Recursos do Mar), por todo apoio logístico proporcionado durante as fases de coleta e realização dos bioensaios.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram e me apoiaram no decorrer desses dois anos, tornando possível a realização deste trabalho.

Obrigada a todos que mostraram que a afirmação de Confúcio pode ser verdadeira:

“Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.”

Com carinho, obrigada!!

RESUMO

A estabilidade térmica do ecossistema marinho Antártico tem permitido aos peixes antárticos evoluir de tal forma que seu metabolismo é mais eficiente em baixas temperaturas. Contudo, o aquecimento dos oceanos em especial em torno da Península Antártica e ilhas adjacentes levantam questões a respeito da plasticidade metabólica e da capacidade de aclimatização dos nototenídeos antárticos ao aumento da temperatura. Este trabalho investiga enzimas do metabolismo energético e do estresse oxidativo de *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii* submetidos à elevação térmica. Os experimentos foram realizados na Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) e ambas as espécies foram expostas a temperaturas de $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ e $8\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 1, 4, 15 e 30 dias. A temperatura de 0°C foi escolhida como controle, já que se encontra dentro da média da variação térmica encontrada na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, onde os peixes foram capturados. Já o aquecimento em 4°C é uma condição térmica experimental capaz de induzir alterações metabólicas em peixes Antárticos e a temperatura experimental de 8°C fica próxima da tolerância térmica destes peixes. A aclimatação de *N. rossii* por 1 dia a 4°C e 8°C , e 15 dias a 4°C levou à redução dos níveis da glicose-6-fosfatase (G6Pase) renal, enquanto que em 30 dias observou-se a modulação negativa em 8°C em relação a 4°C . O aquecimento em 8°C induziu a modulação positiva da citrato sintase (CS) em relação a 0°C em peixes mantidos por 15 dias. A malato desidrogenase (MDH), a lactato desidrogenase (LDH), a catalase (CAT) e a superóxido dismutase (SOD) não apresentaram modulação de seus níveis frente ao aquecimento (4°C e 8°C) em relação ao controle em *N. rossii* enquanto que a glutathione S-transferase (GST) foi modulada negativamente. Já em *N. coriiceps*, os níveis teciduais da G6Pase e SOD não variaram significativamente no tecido renal com o aumento da temperatura. Houve variação dos níveis da CS em consequência do aquecimento (4°C) e do tempo de exposição, enquanto a MDH apresentou redução da atividade em 4°C (4 dias) e em 8°C (1 e 4 dias). A temperatura de 4°C modulou negativamente a atividade da GST e da CAT de *N. coriiceps* expostos por 4 e 15 dias, respectivamente. Em 1 dia de exposição a 8°C , os níveis da GST reduziram marcadamente em relação a 0°C . O conteúdo de malondialdeído (MDA) de *N. rossii* mostrou modulação positiva devido ao aquecimento, exceto em 4 dias. Já *N. coriiceps* apresentou níveis 40% maiores de MDA no grupo submetido a 4°C por 4 dias, enquanto nos demais tempos não houve variação. Dessa forma, nota-se que *N. coriiceps* e *N. rossii* respondem distintamente ao aumento da temperatura, sendo os mecanismos de resposta metabólica diferenciados nas temperaturas de 4°C e 8°C e ao longo do tempo de exposição.

Palavras-chave: Peixes antárticos. Estresse térmico. Estresse oxidativo. Metabolismo energético.

ABSTRACT

The thermal stability of the Antarctic marine ecosystem has allowed Antarctic fishes to evolve efficiently their metabolism at low temperatures. However, the warming of the oceans in particular around the Antarctic Peninsula and adjacent islands raise questions about the metabolic plasticity and acclimation capacity of the Antarctic notothenioid to increasing temperature. This study investigated the levels of activity of some key enzymes of energy metabolism and oxidative stress in *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii* subjected to elevated temperature. The experiments were performed at Comandante Ferraz Antarctic Station (EACF) and both species were exposed to temperatures of $0\pm 0,5^{\circ}\text{C}$, $4\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ and $8\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ for 1, 4, 15 and 30 days. The temperature of 0°C was chosen as a control, since it is within the average of the thermal variation found in Admiralty Bay, King George Island, where the fish were caught. Already warming at 4°C is an experimental thermal condition able to induce metabolic changes and 8°C is close to the thermal tolerance of Antarctic fish. The acclimation of *N. rossii* for 1 day at 4°C e 8°C , and 15 days at 4°C led to lower levels of glucose-6-phosphatase (G6Pase) in kidney, while at 30 days occurred downregulation at 8°C compared with 4°C . The heating in 8°C induced the upregulation of citrate synthase (CS) compared with animals kept at 0°C for 15 days. The malate dehydrogenase (MDH), lactate dehydrogenase (LDH), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) they showed no modulation of their levels due to heating (4°C and 8°C) compared to control in *N. rossii*, while the glutathione S-transferase (GST) was negatively modulated. Already in *N. coriiceps*, tissue levels of G6Pase and SOD did not vary significantly in renal tissue with increasing temperature. There was variation in the levels of CS as a result of heating (4°C) and the exposure time, whereas the MDH activity decreased at 4°C (4 days) and 8°C (1 to 4 days). The temperature of 4°C modulated the activity of GST and CAT negatively in *N. coriiceps* exposed for 4 and 15 days, respectively. At 1 day of exposure at 8°C , the levels of GST markedly reduced compared to 0°C . The content of malondialdehyde (MDA) in *N. rossii* showed upregulation due to heating, except in 4 days. Already *N. coriiceps* showed levels 40% higher of MDA in the group subjected to 4°C for 4 days, while in other times did not change. Therefore, we note that *N. coriiceps* and *N. rossii* responds differently to temperature increase, and the mechanisms of metabolic response are differentiated at temperatures of 4°C to 8°C and over the exposure time.

Key words: Antarctic fish. Thermal stress. Oxidative stress. Energy metabolism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa da Antártica	14
Figura 2. Mapa da Ilha Rei George	15
Figura 3. Representação esquemática da ação da glicose 6-fosfatase	24
Figura 4. Representação esquemática da ação da citrato sintase	24
Figura 5. Representação esquemática da ação da malato desidrogenase	25
Figura 6. Representação esquemática da ação da lactato desidrogenase	25
Figura 7. Esquema com as enzimas do metabolismo energético estudadas no presente trabalho	25
Figura 8. Esquema das enzimas do estresse oxidativo.....	27
Figura 9. Representação esquemática da ação da superóxido dismutase	27
Figura 10. Representação esquemática da ação da catalase	28
Figura 11. Representação esquemática da ação da glutationala S-transferase	28
Figura 12. Mapa da Baía do Almirantado	30
Figura 13. Meios de transporte utilizados nas coletas.	31
Figura 14. Espécies de peixes antárticos estudadas.....	31
Figura 15. Módulo de Aquários na Estação Comandante Ferraz (EACF)	32
Figura 16. Esquema dos bioensaios nas temperaturas de 0, 4 e 8°C por períodos de 1, 4, 15 e 30 dias.....	33
Figura 17. Média \pm erro padrão da atividade da glicose 6-fosfatase no rim de <i>N. rossii</i> e de <i>N. coriiceps</i>	38
Figura 18. Média \pm erro padrão da atividade da citrato sintase no rim de <i>N. rossii</i> e de <i>N. coriiceps</i>	39
Figura 19. Média \pm erro padrão da atividade da malato desidrogenase no rim de <i>N. rossii</i> e de <i>N. coriiceps</i>	40
Figura 20. Média \pm erro padrão da atividade da lactato desidrogenase no rim de <i>N. rossii</i> e de <i>N. coriiceps</i>	41
Figura 21. Média \pm erro padrão da atividade da superóxido dismutase no rim de <i>N. rossii</i> e de <i>N. coriiceps</i>	43
Figura 22. Média \pm erro padrão da atividade da catalase no rim de <i>N. rossii</i> e de <i>N. coriiceps</i>	43
Figura 23. Média \pm erro padrão da atividade da glutationala S-transferase no rim de <i>N. rossii</i> e de <i>N. coriiceps</i>	44
Figura 24. Média \pm erro do conteúdo de malondialdeído no rim de <i>N. rossii</i> e de <i>N. coriiceps</i>	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios + erro padrão da média da atividade das enzimas glicose-6-fosfatase, citrato sintase, malato desidrogenase e lactato desidrogenase no rim de <i>Notothenia rossii</i>	41
Tabela 2: Valores médios + erro padrão da média da atividade das enzimas glicose-6-fosfatase, citrato sintase, malato desidrogenase e lactato desidrogenase no rim de <i>Notothenia coriiceps</i>	42
Tabela 3: Valores médios + erro padrão da média da atividade das enzimas glutaciona S-transferase, superóxido dismutase e catalase no rim de <i>Notothenia rossii</i>	45
Tabela 4: Valores médios + erro padrão da média da atividade das enzimas glutaciona S-transferase, superóxido dismutase e catalase no rim de <i>Notothenia coriiceps</i>	45
Tabela 5: Valores médios + erro padrão da média do conteúdo de malondialdeído no rim de <i>Notothenia rossii</i>	47
Tabela 6: Valores médios + erro padrão da média do conteúdo de malondialdeído no rim de <i>Notothenia coriiceps</i>	47

LISTA DAS PRINCIPAIS SIGLAS

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A

AFGPs – Glicoproteínas anticongelantes (do inglês *AntiFreeze GlicoProteins*)

ATP – Adenosina trifosfato

CAT – Catalase(s)

CDNB – (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno)

CS – Citrato sintase

CTmax – Temperatura Crítica máxima (do inglês *Critical Thermal maximum*)

EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz

EDTA – Ácido etileno diamino tetraacético (do inglês *Ethylenediaminetetracetic acid*)

ERO(s) – Espécie(s) Reativa(s) de Oxigênio

G6Pase – glicose-6-fosfatase

GST – glutationa S-transferase(s)

LDH – Lactato desidrogenase

LPO – Peroxidação lipídica (do inglês *lipid peroxidation*)

MDA – malondialdeído

MDH – Malato desidrogenase

Mg – Miligramas

NAD⁺ – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Forma oxidada

NADH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo – Forma reduzida

Pi – Fosfato inorgânico

SOD – Superóxido dismutase(s)

TBARS – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

U – Unidade Internacional de Enzimas

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Continente Antártico	14
1.2 Ictiofauna Antártica – Nototenídeos antárticos	16
1.3 Mudanças climáticas e a Antártica	18
1.4 Sistema renal de peixes antárticos e as respostas metabólicas e fisiológicas frente ao estresse	20
1.5 Metabolismo energético e sistema renal	23
1.6 Estresse oxidativo, sistema antioxidante e sistema renal	26
2. OBJETIVOS	29
2.1 Geral:	29
2.2 Específicos:	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Coleta e bioensaios	30
3.2 Métodos Analíticos	33
3.2.1 Determinação da atividade enzimática: metabolismo energético	34
3.2.2 Determinação da atividade enzimática: enzimas antioxidantes	35
3.2.3 Determinação de produtos finais da lipoperoxidação	36
3.2.4 Determinação da concentração de proteínas totais	36
3.3 Análise estatística	37
4. RESULTADOS	38
4.1 Enzimas do metabolismo energético	38
4.2 Enzimas do estresse oxidativo	42
4.3 Determinação de produtos finais da lipoperoxidação	45
5. JUSTIFICATIVA	48
6. DISCUSSÃO	50
7. CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS - Processamento enzimático	75
I. Glicose-6-fosfatase	75
II. Citrato sintase	77
III. Malato desidrogenase	78
IV. Lactato desidrogenase	79
V. Superóxido dismutase	80
VI. Catalase	81
VII. Glutathiona S-transferase	82
VIII. Tbars	83

A Zona de Convergência Antártica afeta as condições locais de tempo. Durante os meses de verão, quando a temperatura do ar se eleva acima do ponto de congelamento, ocorre fluxo d'água de derretimento das geleiras e da neve sazonal nas áreas costeiras. Isso é mais importante nas regiões situadas na periferia do continente, ou seja, na Península Antártica e nas ilhas Shetlands do Sul, onde as temperaturas de verão são mais altas e o derretimento expõe o solo ou a rocha (FOSTER, 1984).

A Ilha Rei George (Figura 2) é a maior das ilhas do Arquipélago das Shetlands do Sul. Possui uma área de aproximadamente 1300 km² e tem 90% da superfície coberta de gelo ao longo de todo o ano. O arquipélago encontra-se entre a passagem de Drake e o estreito de Bransfield (DUARTE, 2006). Entre 30 a 14 milhões de anos atrás, o surgimento da passagem de Drake entre a Antártica e a América do Sul resultou no aparecimento da Corrente Circumpolar Antártica, tornando o continente antártico isolado dos outros continentes, tanto climática quanto biologicamente (BARRETT, 2003). Estima-se que o ecossistema antártico esteja abaixo de 0°C a 3 ou 5 milhões de anos (JOHNSTON *et al.*, 1991). É na Ilha Rei George, Baía do Almirantado, que está situada a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) um dos locais de pesquisa do Brasil na Antártica.



Figura 2. Mapa da Ilha Rei George. FONTE: Desconhecido.

A Baía do Almirantado possui cerca de 122 km², apresentando costa litorânea que se estende desde *Demay Point* até *Punta Martins*, totalizando uma extensão de 91 km (SICINSKI, *et al.*, 2011). É a maior baía da Ilha Rei George (CAMPOS, 2007; SICINSKI, *et al.*, 2011), e, cerca de 14,50 % da área total constituem a área livre de gelo. A baía localiza-se na latitude de 62°09'S e longitude 58°26'W, formando juntamente com a Península Antártica, as duas barreiras físicas limites do Estreito de Bransfield. Toda a região da Baía do Almirantado – incluindo terra e mar – foi classificada como Área Antártica Especialmente Gerenciada (AAEG), significando que todos os países ali instalados, devem administrar a região, por meio de um plano de manejo apropriado, a fim de evitar impactos cumulativos (CAMPOS, 2007; SICINSKI, *et al.*, 2011).

1.2 Ictiofauna Antártica – Nototenídeos antárticos

Estudos da composição ictiofaunística na Península Antártica registraram a presença de 39 espécies, pertencentes a 29 gêneros e 10 famílias (SKÓRA E NEYELOV, 1992; KULESZ, 1994; KULESZ, 1999). O grupo dominante de peixes antárticos pertence à superordem Actinopterygii (EVANS, 1993), da ordem dos Perciformes, subordem Notothenioidei, a qual consiste de oito famílias, e, 129 espécies (EASTMAN, 2005). A família de peixes antárticos Nototheniidae é a dominante na Antártica sendo representada por 45% das espécies conhecidas. Possui 12 gêneros e aproximadamente 50 espécies (EASTMAN E EAKIN, 2000).

Os nototenídeos são extremamente bem adaptados às baixas temperaturas, presença de gelo no mar, redução de habitat e grande sazonalidade na produção primária (CLARKE E JOHNSTON, 1996). Estão largamente distribuídos pelo oceano ocorrendo nas altas latitudes do hemisfério Sul e no oceano austral, e ocupam todos os habitats bênticos e de coluna d'água, sendo responsáveis por aproximadamente 91% da biomassa (KOCK, 1992; EASTMAN, 2005).

Dentre as espécies de peixes existentes na Baía do Almirantado, destacam-se *Notothenia rossii* Richardson, 1844 (sinônimo de *N. marmorata*) e *Notothenia coriiceps* Richardson, 1844 (previamente conhecida como *N. neglecta*), endêmicas da região antártica (GON E HEEMSTRA, 1990). *N. rossii* está presente no extremo norte da Península Antártica, Arquipélago das Shetlands do Sul, Órcades do Sul e

Geórgia do Sul, Arco Scotia, Ilhas Príncipe Edward, Crozet, Kerguelen, Heard e Macquarie, e até nos Bancos Ob e Lena (HUREAU, 1966; CARDOSO, 2005; FISHBASE, 2013). *N. coriiceps* é dominante na costa oeste da Península Antártica, incluindo as Ilhas Shetlands do Sul, Arquipélago de Palmer e Ilhas Órcades do Sul. É abundante em áreas de alta densidade de macroalgas. São encontrados comumente em profundidades menores que 200 metros (FISHBASE, 2013).

Em relação às características morfológicas, *N. coriiceps* apresenta duas nadadeiras dorsais, a primeira com 4 a 6 espinhos flexíveis, a segunda com 35 a 38. A nadadeira anal possui de 26 a 30 raios moles. Os raios de barbatana são segmentados e compostos de dois elementos laterais juntos, sendo quase sempre flexível e escamoso. Apresentam grande distância interorbital e não há escamas abaixo do olho (FISHER e HUREAU, 1985; FISHBASE, 2013). *N. rossii* possui 4 a 7 espinhos flexíveis, 32 a 36 raios moles dorsais nas nadadeiras dorsais, e a mesma faixa de raios na nadadeira anal. Já, as nadadeiras peitorais são largas, com 21 a 24 raios. *N. rossii* apresenta cabeça e corpo levemente comprimidos lateralmente, boca oblíqua e maxila estendendo-se posteriormente até a parte mediana ou posterior do olho, a maxila inferior é minimamente protusa (FISHER e HUREAU, 1985; FISHBASE, 2013).

A espécie *N. coriiceps* é caracterizada pela existência de dois tipos de coloração dependentes da maturidade sexual: em imaturos de ambos os sexos, os flancos são vermelho-claro e o ventre é amarelo-ouro. O topo do crânio tem uma mancha preta e a placa opercular é marcada por quatro pontos negros alongados cuja posição é constante (HUREAU, 1970). Entre os indivíduos maduros, os flancos têm a coloração muito variável, mas sempre escura, como castanho-avermelhada, marrom-esverdeada ou até mesmo preta. A parte inferior da cabeça e o ventre são amarelo-claros, podendo ser ligeiramente esverdeado. As manchas presentes nos jovens são encontradas nos adultos. A transição de uma cor para outra representa a maturidade sexual no sexo feminino. Enquanto a cor vermelha persiste por algum tempo mesmo após o início da maturidade sexual dos machos (HUREAU, 1970).

O padrão de coloração de *Notothenia rossii* juvenil varia do amarelo a marrom ou laranja. Já os adultos apresentam coloração marrom claro, com o dorso mais escuro e pontos negros mais ou menos distintos, distribuídos ao longo do corpo (BURCHETT, 1983; FISHER e HUREAU, 1985).

A sazonalidade luminosa encontrada no ecossistema antártico limita a quantidade de biomassa e a produtividade primária do oceano (EASTMAN, 1993). Por isso, *N. rossii* e *N. coriiceps* apresentam como estratégia ecológica baixo ritmo de crescimento, onde é maximizada a aquisição de alimentos e minimizado o custo energético para sobreviver (LAWS, 1984; BARRERA-ORO E WINTER, 2008). Durante o verão há maior acúmulo de alimentos e consequente armazenagem de lipídios; fonte de energia que estará disponível durante períodos de escassez alimentar (por ex.: no inverno) (CLARKE, 1988; PÖRTNER *et al.*, 2004). A dieta de *N. coriiceps* é diversificada, dependendo da disponibilidade da presa, apresentando alta frequência de algas, gastrópodes e pequenos crustáceos como isópodas e anfípodas (LAWS, 1984). Já a dieta alimentar de *Notothenia rossii* varia ao longo do seu ciclo de vida (HUREAU, 1970; BARRERA-ORO E WINTER, 2008), predominando anfípodas e algas (HUREAU, 1970; LAWS, 1984; BARRERA-ORO E WINTER, 2008; RAGA, 2012). O amplo espectro trófico decorre da baixa diversidade de peixes e consequentemente da competição pouco intensa (TARGETT, 1981).

1.3 Mudanças climáticas e a Antártica

Dentre os problemas que atingem atualmente a região Antártica temos as mudanças climáticas globais, observadas nas águas em volta desta e/ou do ar em sua superfície nos últimos 60 anos (STEIG *et al.*, 2009; QIU, 2012). Este aquecimento ocorreu em especial na Península Antártica, entre as latitudes 65° e 70°S, onde se observou um aquecimento mais acentuado do que no resto do continente (aproximadamente 2°C) nos últimos 60 anos (KING E HARANGOZO, 1998; TURNER *et al.*, 2005). Acredita-se que até o fim do século XXI, algumas regiões costeiras do oceano Austral terão suas temperaturas elevadas em 2°C (QIU, 2012). Smith *et al.* (2007) demonstraram que essa tendência é mais acentuada no inverno. Por outro lado, no interior do continente registra-se um resfriamento de cerca de -0,2°C por década (TURNER *et al.*, 2005; 2007).

O oceano Antártico é o principal dissipador de calor atmosférico, absorvendo mais de 80% do calor adicionado ao sistema climático (LEVITUS *et al.*, 2001; LEVITUS *et al.*, 2005). O aquecimento atual da região Antártica está fora do ciclo natural de aquecimento/resfriamento do oceano sendo atribuído a causas

antropogênicas (PIERCE *et al.*, 2006). Como resultado do aumento da temperatura observa-se o descongelamento das geleiras (VAUGHN, 1993), os impactos nas cadeias alimentares caracterizados pela perda de produtividade marinha devido ao comprometimento de comunidades dependentes do gelo no mar e a perda de troca de nutrientes nas correntes de água (ATKINSON *et al.*, 2004; ROBINSON, 2008). A especialização neste ambiente extremo e estável resultou na redução da temperatura crítica máxima (CT_{max}¹) dos organismos antárticos (PECK, 2002; PÖRTNER *et al.*, 2007), ou seja, os tornou os mais estenotérmicos² da Terra (PECK *et al.*, 2004; PÖRTNER *et al.*, 2007; SOMERO, 2010). Entretanto, discute-se, se essa condição estenotérmica é em decorrência da adaptação às baixas temperaturas ou da seleção de um estilo de vida com baixos custos energéticos (CLARKE, 2003; ROBINSON, 2008). Diante disso, esses organismos tornaram-se vulneráveis aos efeitos de alterações climáticas. Porém, algumas espécies antárticas apresentam melhor capacidade metabólica que outras frente a situações adversas sob o ponto de vista antropocêntrico (PECK, 2002; SEEBACHER *et al.*, 2005).

Estudos que abordam a tolerância térmica em organismos antárticos demonstraram que a resposta ao agente estressor é dependente da temperatura e do tempo de exposição (PECK *et al.*, 2004; BEERS E SIDELL, 2011). Ou seja, quando aclimatados em diferentes temperaturas apresentam mecanismos de regulação que normalmente modificam a resistência térmica (SOMERO, 2004). O primeiro estudo com este enfoque em peixes antárticos foi desenvolvido por Somero e DeVries (1967), os quais determinaram que a faixa de tolerância térmica em 3 representantes da família Nototheniidae: *Trematomus bernacchii*, *Pagothenia borchgrevinki* e *Trematomus hansonii* é em torno dos 5-6°C. Trabalhos recentes têm constatado maior plasticidade térmica da ictiofauna Antártica após períodos de aclimação a temperaturas superiores a 0°C (VAN DIJK *et al.*, 1999; MARK *et al.*, 2002; LANNIG *et al.*, 2005; PODRABSKY E SOMERO, 2006; BILYK E DE VRIES, 2011; BILYK *et al.*, 2012; STROBEL *et al.*, 2012; STROBEL *et al.*, 2013). Podrabsky e Somero (2006) observaram que após aclimação a 4°C *T. bernacchii* e *Trematomus pennellii* foram capazes de aumentar sua tolerância térmica,

¹CT_{max} é definida como a temperatura em que os movimentos do indivíduo tornam-se desorganizados e há a perda da homeostase culminando na morte (Cowles e Bogert, 1944).

sobrevivendo por maior período de tempo na CT_{max} de 14°C quando comparado aos espécimes mantidos à -1,8°C. Experimentos semelhantes foram realizados com outras espécies antárticas, incluindo *N. coriiceps* que ao serem aclimatadas a 4°C demonstraram um aumento significativo da CT_{max} (17,39±1,20°C) em relação a CT_{max} ambiental (16,17±1,40°C) (BILYK E DE VRIES, 2011; BILYK *et al.*, 2012).

A tolerância térmica dos organismos à temperatura está relacionada com a capacidade de carreamento de oxigênio nos tecidos havendo estreita relação entre a CT_{max} e o hematócrito (BEERS E SIDELL, 2011). Peixes antárticos de sangue vermelho, como *N. rossii* e *N. coriiceps*, são menos vulneráveis ao aumento da temperatura do que peixes com baixos níveis ou até mesmo com ausência da hemoglobina (peixes de sangue branco) (BEERS E SIDELL, 2011; MUELLER *et al.*, 2011; MUELLER *et al.*, 2012) possivelmente devido a maior capacidade dos primeiros em reparar os danos oxidativos promovidos pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MUELLER *et al.*, 2011; MUELLER *et al.*, 2012). Na literatura há trabalhos que investigam a tolerância térmica e os ajustes compensatórios respiratórios, cardiovasculares, da viscosidade do sangue e enzimáticos, entre outros, de peixes antárticos submetidos a temperaturas elevadas (MARK *et al.*, 2002; LANNIG *et al.*, 2005; LOWE E DAVISON, 2005; SEEBACHER *et al.*, 2005; FRANKLIN *et al.*, 2007; ROBINSON E DAVISON, 2008; BILYK E DE VRIES, 2011; WINDISCH *et al.*, 2011; JAYASUNDARA *et al.*, 2013; STROBEL *et al.*, 2013).

1.4 Sistema renal de peixes antárticos e as respostas metabólicas e fisiológicas frente ao estresse

A estabilidade térmica do ecossistema marinho Antártico tem permitido aos peixes antárticos evoluir de tal forma que seu metabolismo é mais eficiente à baixa temperatura. Por isso, há uma alternância entre alimentação, reprodução e crescimento frente ao baixo nível de energia metabólica disponível para ser despendida nessas atividades (LAWS, 1984; BARRERA-ORO E WINTER, 2008). Para compensar a baixa taxa metabólica houve seleção de alguns mecanismos adaptativos para a sobrevivência neste ambiente, tais como a estenotermia,

resultado direto da temperatura ambiente continuamente baixa a que os nototenídeos estão expostos (LAWS, 1984) e a resistência ao congelamento, com o surgimento das glicoproteínas anticongelantes (AFGPs- *AntiFreeze GlicoProteins*) (CHEN *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 2003; HARDING *et al.*, 2003; JIN E DE VRIES, 2006; CHENG E DETRICH, 2007; CULLINS *et al.*, 2011).

Nos teleósteos, os rins além de apresentarem funções na osmorregulação, ainda atuam na síntese de hormônios e na eliminação de resíduos (ALBINATI, 2006; SCHRECK, 2010). Caso esses processos sejam afetados há consequências para o crescimento, reprodução e até mesmo a sobrevivência dos indivíduos (ALBINATI, 2006; SCHRECK, 2010).

Os peixes antárticos possuem mais íons sódio e cloreto em seu sangue quando comparados com peixes de ambientes temperados (SMITH, 1972; O'GRADY E DE VRIES, 1982). O ponto de congelamento do seu sangue é ainda menor do que o ponto de congelamento da água do mar (CHEN *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 2003; HARDING *et al.*, 2003; JIN E DE VRIES, 2006; CULLINS *et al.*, 2011). Tal característica pode estar relacionada às propriedades anticongelantes das AFGPs (CHEN *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 2003; HARDING *et al.*, 2003; JIN E DE VRIES, 2006; CULLINS *et al.*, 2011), já que evitam que os cristais de gelo se acumulem no sangue e em outros fluidos corporais (CULLINS *et al.*, 2011). Peixes antárticos necessitam também de mecanismos para ajustar a quantidade de sal em seu organismo, visto que no verão e no inverno as proporções de água e sal encontradas são diferentes (LAWS, 1984; ROMÃO *et al.*, 2001).

N. rossii e *N. coriiceps* apresentam rins aglomerulares, onde a urina é produzida pela secreção tubular e não pela ultrafiltração. Com isso, moléculas de baixa massa molecular, como AFGPs não são eliminadas. Tal fato pode ser associado com a conservação dessas moléculas, as quais possuem baixa massa molecular e são necessárias para a sobrevivência dos peixes em temperaturas tão baixas (EASTMAN, 1993; EASTMAN E DE VRIES, 1986 *apud* VERDE *et al.*, 2011). Caso a AFGP fosse filtrada, necessitaria ser degradada em aminoácidos pelos lisossomas dos túbulos renais e, depois, ser resintetizada, havendo grande custo metabólico para o organismo (EASTMAN, 1993). Vale lembrar que ao contrário dos peixes antárticos, os rins da maioria dos peixes subantárticos são glomerulares (DOBBS *et al.*, 1974; EASTMAN, 1993; PÉREZ *et al.*, 2003). Peixes antárticos possuem também especializações bioquímicas e enzimáticas com características

cinéticas eficientes mesmo nas baixas temperaturas (PETRICORENA E SOMERO, 2007). As membranas biológicas são ricas em ácidos graxos insaturados (GONZALEZ-CABRERA *et al.*, 1995), o que favorece na manutenção da sua fluidez entre outras adaptações para a sobrevivência neste ambiente.

Os organismos que vivem em ecossistemas aquáticos enfrentam alterações ambientais rápidas, normalmente não vivenciadas por animais terrestres, como mudanças na disponibilidade de O₂ dissolvido, pH e salinidade, entre outros (MARIANO *et al.*, 2009; OBA *et al.*, 2009). Tais fatores podem ocasionar estresse em decorrência da incapacidade do animal em manter um estado fisiológico normal (HUDSON *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2009). Assim respostas não específicas podem ameaçar a homeostase (BARTON, 2002).

A resposta fisiológica aos agentes estressantes pode ser dividida em: resposta primária, secundária e terciária (BARTON, 2002). O estresse em teleósteos resulta tipicamente em dois tipos de resposta endócrina: a resposta via eixo hipotálamo-hipófise e células interrenais, que culmina com o aumento do cortisol plasmático, e a resposta adrenérgica, que resulta em aumento de catecolaminas plasmáticas (PANKHURST, 2011). Portanto, a hipersecreção de catecolaminas e de corticoesteroides é considerada resposta primária ao estresse (JOBBLING, 1994, MARIANO *et al.*, 2009; OBA *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009). A ação destes hormônios em diversos órgãos-alvo resulta em modificações bioquímicas e fisiológicas para o retorno à homeostase denominadas respostas secundárias ao estresse. Os efeitos metabólicos podem incluir hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e inibição da síntese proteica (WENDELAAR BONGA, 1997; MOMMSEN *et al.*, 1999). Essa resposta endócrina generalizada, que resulta em rápida mobilização de reservas energéticas, pode ser considerada um mecanismo adaptativo que permite ao organismo um aumento na demanda energética durante a exposição a fatores estressantes (WENDELAAR BONGA, 1997; MOMMSEN *et al.*, 1999). Por fim, a resposta terciária ocorre quando a exposição a agentes estressores se torna crônica, de forma que excede a capacidade de adaptação do organismo (estado de exaustão), levando a uma condição patológica ou morte (OBA *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009).

As respostas neuroendócrinas estimulam a liberação de catecolaminas e cortisol. A biossíntese de catecolaminas resulta em efeitos principalmente sobre a circulação, respiração, osmorregulação e metabolismo dos peixes (MAZEAUD *et al.*,

1977; REID *et al.*, 1998). A ativação adrenérgica favorece o aumento da ventilação branquial, aumentando assim, a oxigenação dos tecidos. Contudo, o aumento da perfusão das brânquias favorece a perda de íons por difusão do sangue para o meio externo (MARIANO *et al.*, 2009). Além disso, as catecolaminas estimulam a glicogenólise, resultando em hiperglicemia sob condições de estresse (LIMA *et al.*, 2006).

1.5 Metabolismo energético e sistema renal

A temperatura é um fator ecológico que apresenta forte influência na fisiologia de organismos ectotérmicos como os peixes (WEDEMEYER *et al.*, 1990). Por isso, a especialização térmica otimiza o desempenho do animal em uma determinada faixa de temperatura, de modo que os ectotérmicos muitas vezes respondem a desafios, como o térmico, por compensação da taxa metabólica de repouso, do consumo máximo de oxigênio, da taxa de crescimento, da composição lipídica e da atividade enzimática (CLARKE E JOHNSTON, 1996; HOCHACHKA E SOMERO, 2002; SEEBACHER *et al.*, 2005; TULLIS E BAILLIE, 2005; DONELSON *et al.*, 2011).

A elevação da temperatura tende a modificar a taxa de alguns marcadores, pois a velocidade das reações enzimáticas é dependente da temperatura (CLARKE E JOHNSTON, 1996; VOSLOO *et al.*, 2013). A fim de avaliar as possíveis compensações metabólicas dos organismos frente a mudanças ambientais, indicadores bioquímicos que evidenciam a atividade metabólica de componentes-chave que estão direta ou indiretamente ligados a processos vitais, são utilizados (DAHLHOFF, 2004).

Na literatura existem trabalhos que avaliam a influência da temperatura na atividade compensatória de algumas enzimas relacionadas ao metabolismo energético em diferentes tecidos de peixes antárticos (LANNIG *et al.*, 2005; SEEBACHER *et al.*, 2005; WINDISCH *et al.*, 2011; STROBEL *et al.*, 2012; JAYASUNDARA *et al.*, 2013; STROBEL *et al.*, 2013).

Os tecidos renal e hepático apresentam papel fundamental no controle metabólico, devido a alta expressão da glicose-6-fosfatase (G6Pase), que catalisa a última reação bioquímica da gliconeogênese e da glicogenólise. A G6Pase é uma

enzima intimamente associada ao retículo endoplasmático e membranas nucleares das células renais e hepáticas (NORDLIE E FOSTER, 2010), responsável pela hidrólise de glicose 6-fosfato (principal substrato para as vias metabólicas) em glicose mais fosfato inorgânico (CHIQUOINE, 1953) (Figura 3). Portanto, tais órgãos são cruciais para o controle glicêmico, por serem capazes de exportar açúcar para a corrente sanguínea (ADROGUÉ, 1992; SCHAFTINGEN E GERIN, 2002; MITHIEUX, 2004; GHOSH *et al.*, 2005).

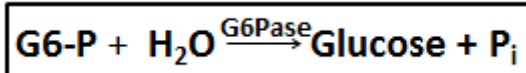


Figura 3. Representação esquemática da ação da glicose 6-fosfatase (G6Pase). FONTE: O autor, 2012.

Na matriz mitocondrial, encontra-se a citrato sintase (CS), que participa do metabolismo aeróbico catalisando a condensação do oxaloacetato e do grupo acetil da acetil coenzima-A, a primeira reação do ciclo de Krebs (NELSON E COX, 2002; VOET E VOET, 2006). Nesta fase, o oxaloacetato reage com acetil CoA e H₂O, produzindo citrato e CoA (Figura 4). Quando o suprimento de energia celular é alto, a CS é inibida por quantidades elevadas de ATP, acetil CoA e NADH. Esta regulação assegura que o ciclo de Krebs não oxide um excesso de acetil CoA quando as concentrações intracelulares de ATP são elevadas (SHEPHERD E GARLAND, 1969 *apud* JANSSENS *et al.*, 2000). A CS é um bom indicador da atividade metabólica nos tecidos (CHILDRESS E SOMERO, 1979 *apud* JANSSENS *et al.*, 2000).

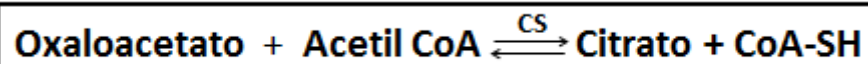


Figura 4. Representação esquemática da ação da citrato sintase (CS). FONTE: O autor, 2012.

A malato desidrogenase (MDH) participa da última etapa do ciclo do ácido cítrico catalisando a conversão reversível do malato a oxaloacetato, com redução do NAD⁺ a NADH (VOET E VOET, 2006) (Figura 5). Pode estar também envolvida no transporte de malato através da membrana mitocondrial (VOET E VOET, 2006). No citosol, o malato é reoxidado pela MDH citosólica em oxaloacetato, o qual é importante em diferentes vias metabólicas, incluindo o ciclo do ácido cítrico, gliconeogênese, síntese de aminoácidos, manutenção do balanço entre oxidação/redução, além de facilitar a troca de metabólitos entre o citoplasma e organelas subcelulares (GOWARD E NICHOLLS, 1994; MUSRATI *et al.*, 1998;

NELSON E COX, 2002) sendo considerado um indicador potencial do metabolismo energético.

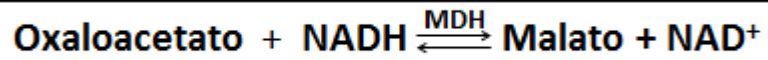


Figura 5. Representação esquemática da ação da malato desidrogenase (MDH). FONTE: O autor, 2012.

A lactato desidrogenase (LDH), localiza-se no citosol e catalisa a etapa terminal do metabolismo anaeróbico, ou seja, a interconversão de piruvato e lactato, concomitante com a oxidação/redução do NADH e NAD⁺ (NELSON E COX, 2002; VOET E VOET, 2006) (Figura 6). O lactato é produto do metabolismo da glicose no eritrócito, músculo, rim e sistema nervoso. A atividade e as propriedades funcionais desta enzima refletem o nível de resistência à situações estressoras (como o estresse térmico) (ZAKHARTSEV *et al.*, 2004).

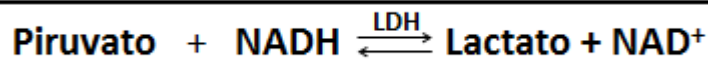


Figura 6. Representação esquemática da ação da lactato desidrogenase (LDH). FONTE: O autor, 2012.

Na Figura 7 segue a esquematização das enzimas do metabolismo energético analisadas neste trabalho.

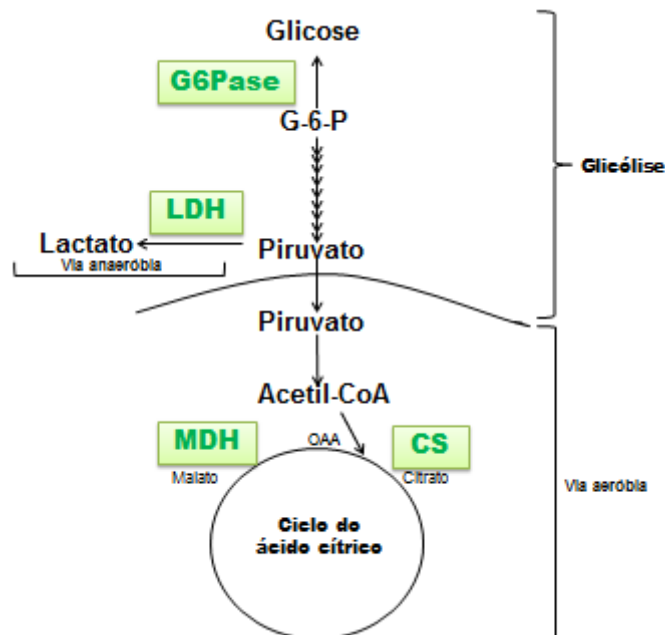


Figura 7. Esquema com as enzimas do metabolismo energético estudadas no presente trabalho. G6Pase: Glicose-6-fosfato; LDH: lactato desidrogenase; CS: citrato sintase e MDH: malato desidrogenase. FONTE: O autor, 2012.

1.6 Estresse oxidativo, sistema antioxidante e sistema renal

Os organismos aquáticos, sob condições fisiológicas normais, dispõem de mecanismos que neutralizam os efeitos gerados pelo estímulo estressor, visando o reestabelecimento da homeostase (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1989). A produção normal de espécies reativas de oxigênio (EROs) no metabolismo celular é proveniente do escape de elétrons da cadeia mitocondrial, em microssomos do retículo endoplasmático, por reações de auto-oxidação do oxigênio molecular e pela ação de células fagocitárias (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2000). A produção intermitente de radicais livres durante os processos metabólicos levou a seleção de um sistema de defesa antioxidante que limitasse os níveis intracelulares destes radicais e impedisse a indução de danos (HALLIWELL, 2007). Em sistemas aeróbicos é essencial o balanço entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes. Contudo, quando há a perda deste equilíbrio, institui-se um estado de estresse oxidativo (AHMAD *et al.*, 2000; LOWE, 2000; MARAN *et al.*, 2009; MODESTO E MARTINEZ, 2010).

O estresse térmico pode levar ao aumento da geração das EROs, moléculas potencialmente reativas capazes de causar oxidação de biomoléculas e dano irreversível à célula (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2000). Entre as formas de EROs mais conhecidas estão os radicais ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($\cdot OH$), e o hidroperóxido (HO_2) (Livingstone, 2001). Já uma molécula antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir os processos de oxidação (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1989), protegendo as células contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de biomoléculas ou estruturas celulares (ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2005). Dentre as biomoléculas que podem ser alvos de danos oxidativos pode-se destacar o processo de injúrias aos lipídios conhecido como lipoperoxidação (LPO). A LPO é resultado de uma cadeia de reações sobre os lipídios das membranas biológicas, levando a alteração da sua fluidez, modificando os processos de troca metabólica, o que pode culminar na morte celular (BENZIE, 1996; VALAVANIDIS *et al.*, 2006).

Os mecanismos de defesa antioxidante (Figura 8) podem ser classificados em enzimáticos e não-enzimáticos. Nos sistemas enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione S-transferase (GST). Já nos sistemas não-enzimáticos encontram-se a glutathione

(GSH), selênio, vitaminas A, C e E, e a metalotioneína, entre outros (HALLIWELL, 1996; SCHLENK *et al.*, 1999).

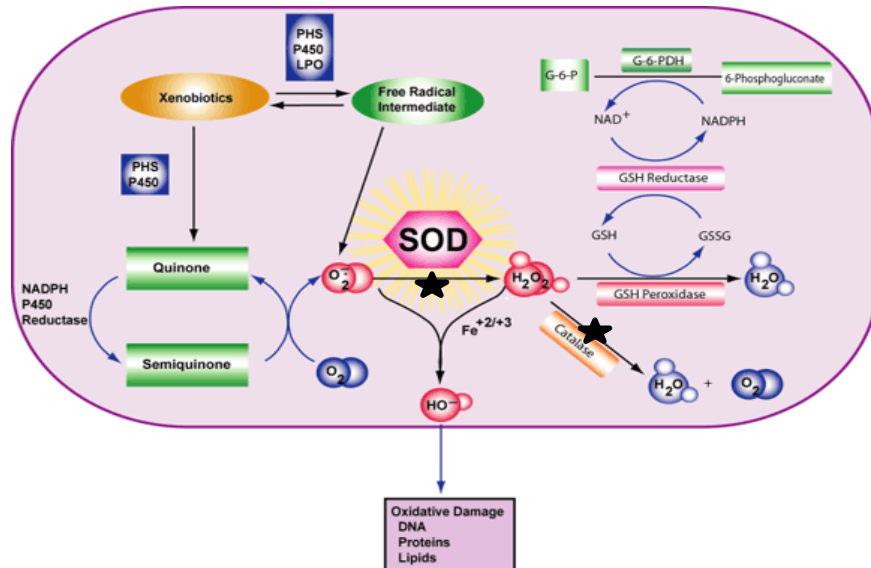


Figura 8. Esquema das enzimas do estresse oxidativo. Destacando-se com uma (★) a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT). FONTE: Sigma, 2013.

A SOD está localizada no citosol, lisossomos, núcleo, matriz e espaço intermembranas mitocondrial. Apresenta como substrato o radical superóxido gerado normalmente nos organismos aeróbios, durante o processo de oxidação. Inicialmente, há a redução da enzima pelo superóxido, resultando na formação de oxigênio. A SOD reduzida reage novamente com outro íon superóxido formando como produto o peróxido de hidrogênio e oxigênio (BERG, 2004; Figura 9).



Figura 9. Representação esquemática da ação da superóxido dismutase (SOD). FONTE: O autor, 2012.

A CAT é encontrada nos peroxissomos, sendo responsável pela desintoxicação celular e oxidação de ácidos graxos de cadeia longa. É responsável pela decomposição de peróxido de hidrogênio a água e oxigênio (AEBI, 1984). Logo é relevante monitorá-la, já que alguns estudos com peixes apontam para o aumento (ATLI E CANLI, 2007) da sua atividade e outros para a redução (BAINY, 1996) ambos indicando situações estressantes (LAM *et al.*, 1995; CHANDRAN *et al.*, 2005; AVILEZ *et al.*, 2008).

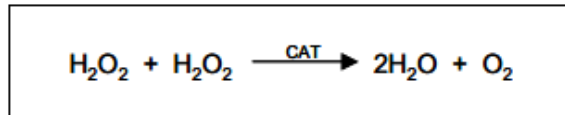


Figura 10. Representação esquemática da ação da catalase (CAT). FONTE: O autor, 2012.

A GST pertence a uma família multifuncional de proteínas envolvidas na biotransformação de uma grande variedade de compostos endógenos e exógenos, a fim de torná-los mais solúveis em água e mais fáceis de serem excretados (CARLETTI *et al.*, 2008; HUBER E ALMEIDA, 2008; Figura 11).

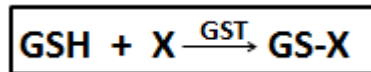


Figura 11. Representação esquemática da ação da glutathione-s-transferase (GST). Sendo X= molécula endobiótica ou xenobiótico. FONTE: O autor, 2012.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Analisar a atividade de algumas enzimas do metabolismo energético e da defesa antioxidante, bem como quantificar os níveis de lipoperoxidação (LPO), no tecido renal dos peixes antárticos *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) submetidos ao aumento da temperatura da água.

2.2 Específicos:

- Avaliar em *N. coriiceps* e em *N. rossii*, submetidos ao aumento da temperatura da água (4°C e 8°C), as possíveis variações na atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo energético, através de análises da atividade da G6Pase, CS, LDH, MDH do tecido renal.
- Avaliar as possíveis variações na atividade das enzimas antioxidantes, CAT, SOD e GST renais, em *N. coriiceps* e em *N. rossii*, submetidos ao aumento da temperatura da água (4°C e 8°C).
- Analisar as possíveis variações nas concentrações de LPO renal causadas pelo aumento da temperatura da água (4°C e 8°C) nos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e bioensaios

Exemplares de *N. coriiceps* (n= 100; comprimento total = 35 ± 3 cm; peso = 747 ± 260 g) e *N. rossii* (n= 120; comprimento total = 36 ± 3 cm; peso = 477 ± 116 g) foram capturados com linha e anzol na Baía do Almirantado (Figura 13) entre as latitudes 61°S e $63^\circ 30'\text{S}$ e longitudes $53^\circ 55'\text{W}$ e $62^\circ 50'\text{W}$, na Ilha Rei George, Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica.

As licenças ambientais foram concedidas pelo Grupo de Assessoramento Ambiental do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. A experimentação foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o n° 496.

As coletas ocorreram com o auxílio de botes pneumáticos ou lancha oceanográfica (Figura 14), sendo os peixes provenientes de profundidades entre 10 a 25 metros (Figura 15). Os indivíduos foram acondicionados em caixas plásticas de $0,150 \text{ m}^3$ havendo trocas manuais de água entre os locais de coleta até o Módulo de Aquário na EACF onde foram mantidos durante 5 dias em tanques/aquários sob condições controladas de temperatura ($0^\circ\text{C} \pm 0.5$), salinidade ($35\text{psu} \pm 1.0$), fotoperíodo (12 horas luz/ 12 horas escuro) e aeração constante.

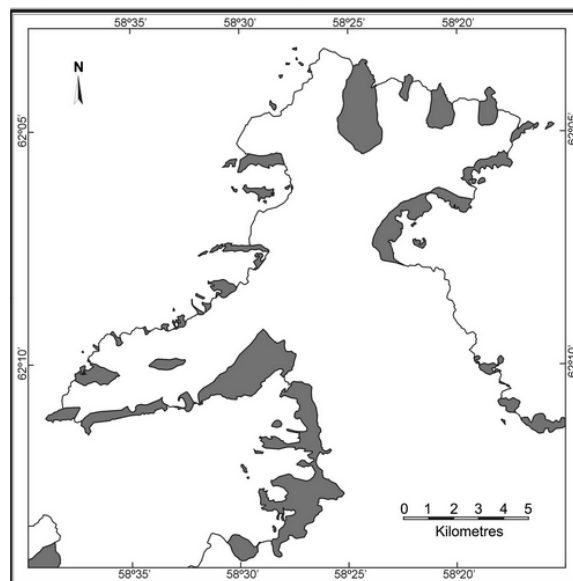


Figura 12. Mapa da Baía do Almirantado. FONTE: Arigony-Neto *et al.*, 2004.



Figura 13. Meios de transporte utilizados nas coletas. **A.** Bote pneumático e **B.** Lancha oceanográfica. Foto: A. O autor, 2011. B. Autor desconhecido.



Figura 14. Espécies de peixes antárticos estudadas. **A.** Exemplar de *N. rossii* e **B.** Exemplar de *N. coriiceps*. Foto: A. Beatriz Bove da Costa Boucinhas, 2010. B. Luciana Badeluk Cettina, 2009.



Figura 15. Módulo de Aquários - sala climatizada contendo os tanques de 1000 litros na Estação Comandante Ferraz (EACF). Foto: O autor, 2011.

Em seguida, exemplares de *N. coriiceps* e de *N. rossii* foram randomicamente selecionados, e transferidos para tanques de 1.000 L com temperatura a $0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 1, 4, 15 e 30 dias e para tanques experimentais com temperatura de $4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ou $8 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ por 1, 4, 15 e 30 dias (Figura 16 e 17). A temperatura da água foi controlada por termostatos Aquaterm 08 (Full Cage) e não houve aclimação progressiva, os peixes foram colocados diretamente na temperatura testada, totalizando 10 peixes por bioensaio.

A água dos tanques era proveniente de um sistema de captura de água do mar, localizado em frente à EACF. A cada dois dias os aquários eram limpos e tinham 50% da água renovada, com temperatura controlada de acordo com o

experimento. A alimentação, a base de músculo epaxial de peixe, ocorreu a cada dois dias, alternando-se a troca de água dos tanques.

Ao fim de cada bioensaio os peixes foram anestesiados com benzocaína 1% ($p v^{-1}$), sacrificados com secção medular e imediatamente dissecados. Amostras de rim (médio e posterior) foram obtidas e armazenadas em microtubos eppendorfs de 2 ml e congeladas em freezer à $-30^{\circ}C$.

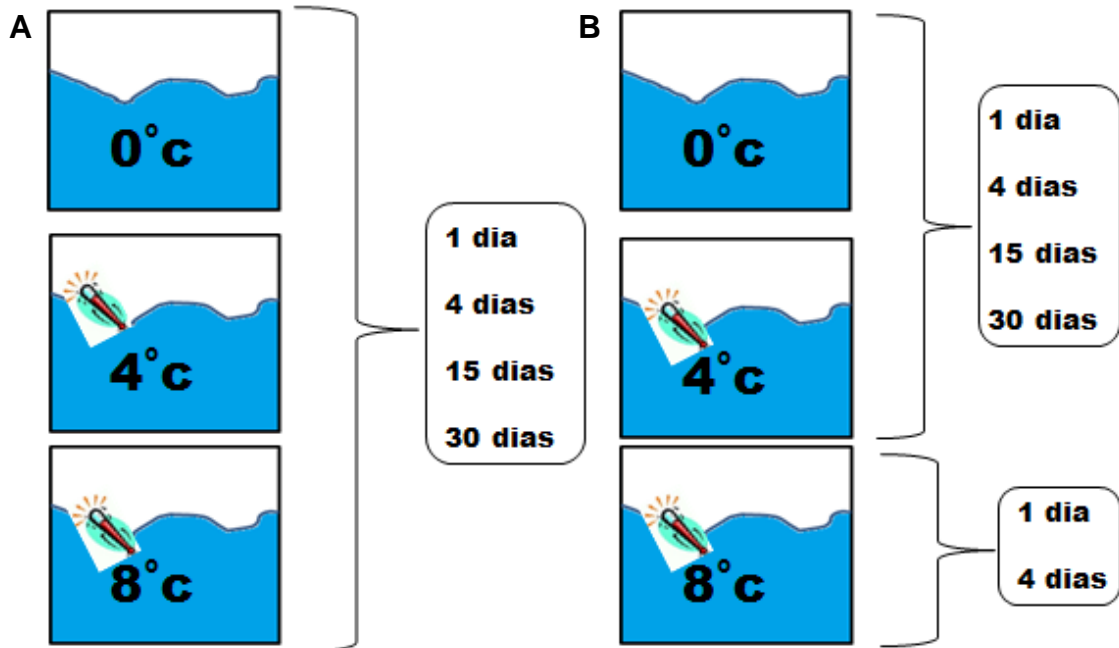


Figura 16. Esquema dos bioensaios A. *N. rossii* e B. *N. coriiceps* nas temperaturas de 0, 4 e 8°C por períodos de 1, 4, 15 e 30 dias. Sendo que *N. coriiceps* sobreviveu apenas 1 e 4 dias a 8°C. FONTE: O autor, 2012.

3.2 Métodos Analíticos

Para a análise das enzimas do metabolismo energético, as amostras de rim médio-posterior foram pesadas e homogeneizadas em tampão Tris-HCl 200 mM com o auxílio do homogeneizador motorizado Potter-Elvehjem. Em seguida, o homogeneizado foi sonicado durante 15 segundos para ruptura de estruturas subcelulares, como retículo endoplasmático e mitocôndria e centrifugado em 14.000g a 4°C durante 10 min. O sobrenadante foi alíquotado para as determinações das atividades enzimáticas. Nas amostras de *N. coriiceps* foi necessário fazer uma dupla centrifugação para a obtenção de um sobrenadante límpido.

Para a determinação das enzimas antioxidantes e da LPO, depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 12.000g a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante aliquoteado.

A análise da CAT foi realizada em cubeta de quartzo no espectrofotômetro Shimadzu UV-2600, enquanto as demais atividades enzimáticas foram determinadas por espectrofotometria em leitora de microplacas Epoch (Bio-Tek) a temperatura ambiente de 20-21°C.

3.2.1 Determinação da atividade enzimática: metabolismo energético

Os ensaios da CS, MDH e LDH foram realizados em triplicata, em microplaca de 384 poços, enquanto que para a avaliação da atividade da G6Pase foram obtidas duplicatas, em microplacas de 96 poços. As médias e o erro padrão foram utilizados na análise estatística.

A velocidade da reação das enzimas analisadas foi expressa em Unidade Internacional (U), onde uma U é a quantidade de enzima capaz de consumir 1 μmol ou formar 1 μmol de produto por minuto por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

A atividade da G6Pase foi determinada pelo método descontínuo descrito por Fathi *et al.* (2002). O meio de reação é composto por tampão Imidazol 100 mM (pH 7,4), ácido etileno diamino tetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid* – EDTA) 1,8 mM, glicose-6-fosfato 26,5 mM. Ao adicionar-se o reativo verde de malachita (molibdato de amônia, verde de malachita e Tween) a reação é interrompida. O fosfato inorgânico formado na reação foi quantificado espectrofotometricamente em 600 nm.

A atividade da CS foi determinada segundo o método descrito por Saborowski e Buchholz (2002), onde a reação é iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio. O meio de reação é composto por tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), cloreto de potássio 100mM, EDTA 1 mM, 5,5'- Ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) 0,2 mM, acetil Coenzima A 0,2 mM e oxaloacetato 0,5 mM. O método baseia-se na condensação do oxaloacetato e do acetil-coenzima A, em reação catalisada pela CS, formando

citrato e coenzima A (CoA). A reação entre DTNB e o grupo tiol da CoA resulta na formação de complexo que absorve luz em 410 nm.

A atividade da MDH foi determinada segundo o método proposto por Childress e Somero (1979). O sistema de reação é composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), oxaloacetato 0,4 mM, cloreto de magnésio 20 mM, NADH 0,155 mM. Nas condições do ensaio, o MDH catalisa a conversão do oxaloacetato em malato. A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH. Determina-se o decréscimo da absorbância em 340 nm.

A atividade da LDH foi determinada com o sistema de reação composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), piruvato de sódio 1 mM, cloreto de potássio 100 mM, β -Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH) 0,254 mM. A reação baseia-se na redução do piruvato em lactato sendo avaliada espectrofotometricamente a velocidade de desaparecimento do NADH medido em 340 nm (THUESEN *et al.*, 2005).

Outras informações a respeito das metodologias utilizadas neste trabalho encontram-se no Anexo I.

3.2.2 Determinação da atividade enzimática: enzimas antioxidantes

Os ensaios da SOD e GST foram realizados em triplicata, em microplaca de 96 poços, enquanto que para a análise da CAT, foi utilizada cubeta de quartzo, obtendo-se duplicatas de cada amostra. As médias e o erro padrão foram utilizados na análise estatística.

Os resultados foram expressos em U/mg de proteína. Onde 1 unidade de SOD equivale a atividade capaz de inibir a redução do NBT em 50%. Uma unidade de CAT e de GST é definida como a quantidade de enzima capaz de consumir 1 μ mol de substrato ou formar 1 μ mol de produto por minuto por miligrama de proteína (U/mg de proteína).

A atividade da SOD foi determinada de acordo com o método de Crouch *et al.* (1981). O sistema de reação é constituído por tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 10,2), EDTA 17,5 μ M e 1 mM de NBT (cloreto de azul de nitrotetrazólio). A reação teve início pela adição de hidroxilamina (37 mM), a qual tem o potencial gerador do superóxido que é capaz de reduzir o NBT presente. A atividade da SOD

inibe a redução do NBT. Essa inibição foi acompanhada através do aumento de absorvância em 560 nm.

A atividade da CAT foi determinada em meio de reação contendo 50mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio a 10 mM. A redução da absorvância foi acompanhada em 240 nm (BEUTLER, 1975).

A atividade da GST foi avaliada após a conjugação do grupo tiol da glutatona reduzida (GSH) ao substrato de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), onde forma-se como produto da reação, o conjugado GS-DNB, o qual foi mensurado espectrofotometricamente em 340 nm. A taxa de aumento da absorção é diretamente proporcional à atividade de GST (KEEN *et al.*, 1976 com modificações).

3.2.3 Determinação de produtos finais da lipoperoxidação (LPO)

A LPO foi estimada pela quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica, dentre eles o malondialdeído (MDA), pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) utilizando malondialdehyde-(bis)-acetate (MDA, Merck, Darmstadt, Germany) como padrão (Federici *et al.*, 2007 com modificações). A mistura foi incubada a 60°C por 60 minutos, em meio ácido. A reação de MDA com o TBA (ácido tiobarbitúrico) forma um produto rosa que pode ser medido espectrofotometricamente a 535nm. Os resultados foram expressos em μmols de MDA por grama de massa úmida (FEDERICI *et al.*, 2007 com modificações).

3.2.4 Determinação da concentração de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford *et al.* (1976), utilizando albumina de soro bovina como padrão. A leitura foi obtida em espectrofotômetro a 595 nm. Os resultados foram utilizados para normalizar os dados da atividade enzimática em 1 mg de proteína por ml de solução.

3.3 Análise estatística

As mudanças ao longo do tempo foram testadas para um nível de significância de 5% mediante análise de variância de duas vias (ANOVA), no qual o tempo de exposição (1, 4, 15 e 30 dias) e a temperatura (0, 4 e 8°C) foram os principais fatores, seguido do pós-teste de Tukey para a comparação das médias. O teste de Levene foi utilizado *a priori* para testar a homogeneidade das variâncias. As análises estatísticas e os gráficos foram feitos utilizando os softwares Statistica 8.0 e GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

Nos bioensaios realizados, *N. rossii* sobreviveu em todas as condições propostas, isto é, nas temperaturas de 0°C, 4°C e 8°C e tempos de 1, 4, 15 e 30 dias. Já, *N. coriiceps* sobreviveu às temperaturas de 0°C e 4°C nos tempos de 1, 4, 15 e 30 dias enquanto que a 8°C sobreviveu somente em 1 e 4 dias.

4.1 Enzimas do metabolismo energético

A atividade da G6Pase em *N. rossii* mostrou interação entre as temperaturas testadas (Figura 17A e Tabela 1). Foi observado que, em 1 e 15 dias de exposição, a elevação da temperatura em 4°C e 8°C, foi responsável pela diminuição na atividade da G6Pase. Em 30 dias, em 8°C houve modulação negativa da G6Pase em relação a 0°C e 4°C, de 48,11% e 60,46%, respectivamente. Em *N. rossii*, a atividade da G6Pase, em 0°C, foi modulada positivamente em 15 dias em relação aos animais mantidos em 4 dias, retornando a níveis menores em 30 dias de exposição. Em 4°C houve aumento da atividade da G6Pase em 30 dias quando comparado aos três tempos anteriores. Já em 8°C, em 15 dias houve modulação positiva da atividade da G6Pase em relação a 1 dia. O perfil da atividade da G6Pase em *N. coriiceps* foi distinto, tendo em vista que não houve modulação em decorrência dos fatores tempo de exposição e elevação da temperatura (Figura 17B e Tabela 2).

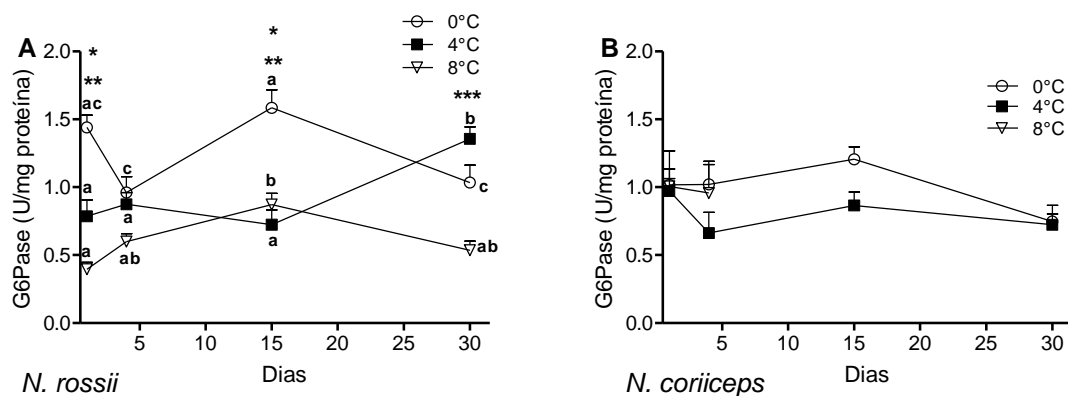


Figura 17. Média \pm erro padrão da atividade da G6Pase no tecido renal de *N. rossii* (A) e de *N. coriiceps* (B) submetidos a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os resultados da ANOVA bifatorial estão mostrados nos gráficos.

Obs.: As letras comparam tempos de exposição em cada temperatura (em 0°C ou 4°C ou 8°C), quando diferentes indicam alteração estatisticamente significativa; (*) indica diferença significativa entre 0 e 4°C; (**) indica diferença significativa entre 0 e 8°C; e, (***) indica diferença significativa entre 4 e 8°C. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Em *N. rossii* houve modulação positiva da CS nos peixes expostos ao aquecimento em 8°C por 15 dias quando comparado com 0°C e 4°C, sendo respectivamente 129% e 135% maiores, em 8°C. Já, em 30 dias, a atividade da CS em 8°C foi 126% maior que em 4°C. A atividade da CS em *N. rossii* expostos a 0°C e 4°C não foi alterada pelo tempo de exposição. Em 8°C, houve modulação dos níveis da CS em 15 dias em relação aos demais tempos experimentais, isto é, em comparação ao grupo de 1 e 4 dias houve aumento da atividade da CS de 76,01% e, 86,05%, respectivamente, retornando a valores próximos ao de 1 e 4 dias em 30 dias (Figura 18A e Tabela 1).

Em *N. coriiceps*, em 4 dias de bioensaio a atividade da CS mostrou-se significativamente menor em indivíduos mantidos a 4°C (54,55%) em relação ao controle e a 8°C (59,68%). Em contrapartida, em 30 dias a 4°C os animais modularam a atividade positivamente em relação a 0°C. Na temperatura de 8°C, em 1 e 4 dias houve modulação positiva da CS em relação aos experimentais de 4°C mantidos pelo mesmo período. Ao longo do tempo de exposição, observa-se que em *N. coriiceps*, os níveis da CS a 0°C decaíram em 30 dias em comparação com 15 dias. Já em 4°C houve aumento gradual a partir de 4 dias, sendo 57,14% maior em 30 dias quando comparado a 4 dias (Figura 18B e Tabela 2).

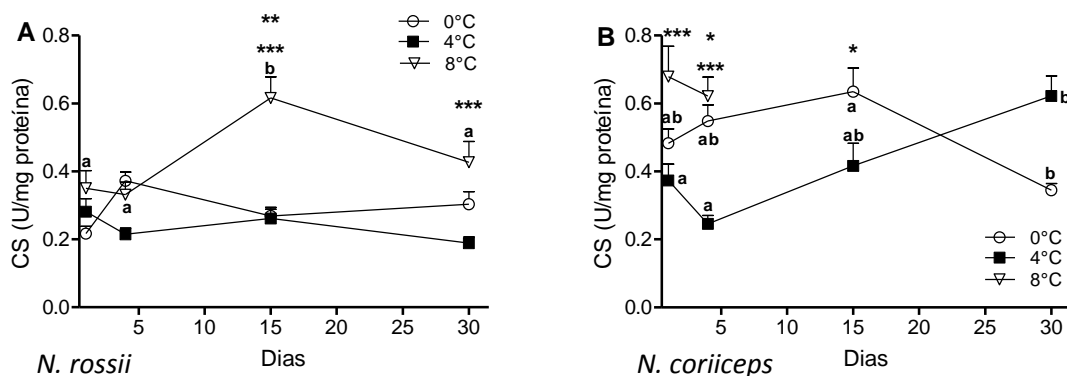


Figura 18. Média \pm erro padrão da atividade da CS no tecido renal de *N. rossii* (A) e de *N. coriiceps* (B) submetidos a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os resultados da ANOVA bifatorial estão mostrados nos gráficos. Obs.: As letras comparam tempos de exposição em cada temperatura (em 0°C ou 4°C ou 8°C), quando diferentes indicam alteração estatisticamente significativa; (*) indica diferença significativa entre 0 e 4°C; (**) indica diferença significativa entre 0 e 8°C; e, (***) indica diferença significativa entre 4 e 8°C. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A MDH em *N. rossii*, apresentou modulação positiva em virtude do aquecimento em 8°C em relação a 4°C, nos tempos de 15 e 30 dias. Em 0°C houve aumento da atividade da MDH em 4 e 15 dias em relação a 1 dia. Os níveis de MDH permaneceram constantes ao longo do período experimental de 4°C, enquanto que em 8°C houve modulação positiva em 15 dias quando comparado com 1 e 4 dias, sendo respectivamente 98,09% e 182,07% maior em 8°C. Em 30 dias, a 8°C, a atividade da MDH foi 128,26% maior que em 4 dias (Figura 19A e Tabela 1).

Em *N. coriiceps* foi observada modulação negativa da MDH em peixes mantidos em 8°C por 1 dia em relação ao grupo controle e experimental (4°C). Em 4 dias em 4°C e 8°C houve menor atividade da MDH em comparação a 0°C. Ao longo do tempo, nos peixes mantidos a 0°C, a MDH apresentou padrão semelhante a atividade da G6Pase e da CS, sendo seus níveis similares nos 15 dias iniciais de experimento, havendo declínio da atividade em 30 dias. Em 4°C houve decréscimo de 45,33%, da atividade da MDH em 4 dias em comparação com 1 dia, seguido de um aumento de 63,31% nos indivíduos mantidos por 15 dias a 4°C (Figura 19B e Tabela 2).

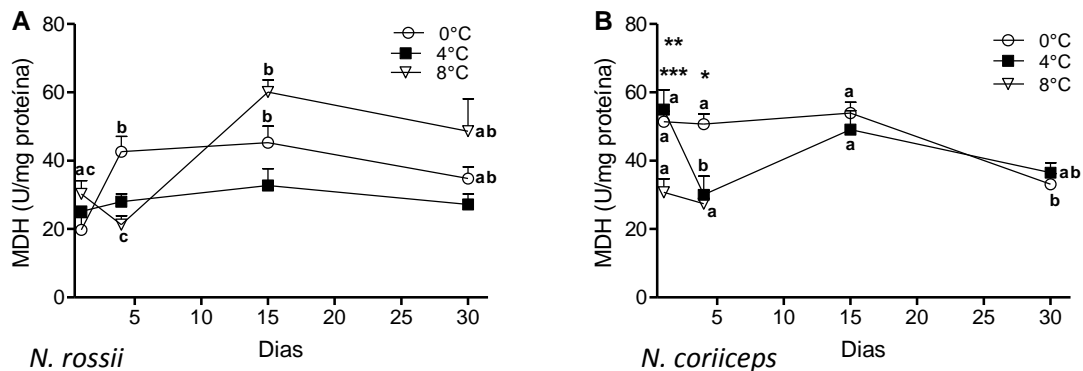


Figura 19. Média \pm erro padrão da atividade da MDH no tecido renal de *N. rossii* (A) e de *N. coriiceps* (B) submetidos a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os resultados da ANOVA bifatorial estão mostrados nos gráficos. Obs.: As letras comparam tempos de exposição em cada temperatura (em 0°C ou 4°C ou 8°C), quando diferentes indicam alteração estatisticamente significativa; (*) indica diferença significativa entre 0 e 4°C; (**) indica diferença significativa entre 0 e 8°C; e, (***) indica diferença significativa entre 4 e 8°C. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

A atividade da LDH em *N. rossii* foi modulada pela temperatura, apenas em 30 dias, onde os níveis dessa enzima foram 72,42% maior em 8°C quando comparado a 4°C. A concentração da LDH manteve-se constante estatisticamente ao longo dos tempos de exposição em *N. rossii* (Figura 20A e Tabela 1).

Em *N. coriiceps*, a atividade da LDH foi modulada negativamente pelo aquecimento em peixes mantidos por 15 dias em 4°C, entretanto em 30 dias houve aumento de 42,05% em seus níveis em relação ao controle. Em *N. coriiceps*, ao longo do tempo, em 0°C houve um decréscimo dos níveis de LDH em 30 dias quando comparado com os demais tempos de exposição enquanto que a 4°C e 8°C a atividade da LDH não foi modulada (Figura 20B e Tabela 2).

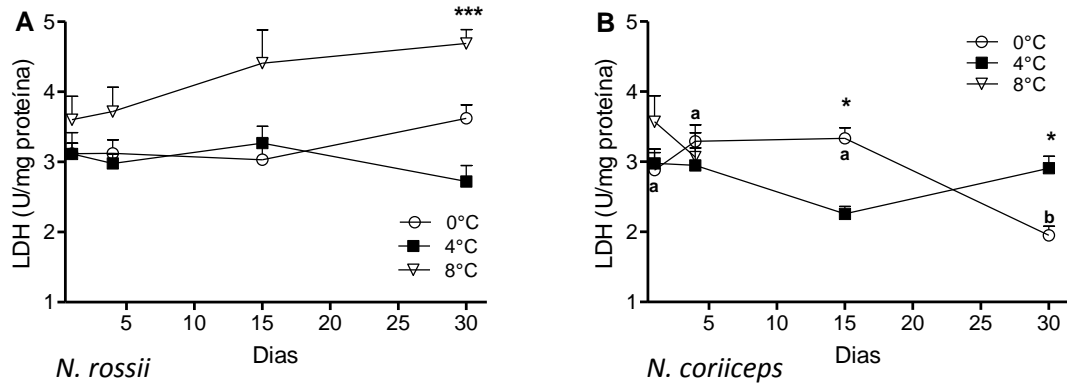


Figura 20. Média \pm erro padrão da atividade da LDH no tecido renal de *N. rossii* (A) e de *N. coriiceps* (B) submetidos a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os resultados da ANOVA bifatorial estão mostrados nos gráficos. Obs.: As letras comparam tempos de exposição em cada temperatura (em 0°C ou 4°C ou 8°C), quando diferentes indicam alteração estatisticamente significativa; (*) indica diferença significativa entre 0 e 4°C; (**) indica diferença significativa entre 0 e 8°C; e, (***) indica diferença significativa entre 4 e 8°C. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

As tabelas 1 e 2 representam os valores médios \pm erro padrão da média da atividade das enzimas do metabolismo energético em U/mg, obtidos nas diferentes temperaturas testadas (0°C, 4°C e 8°C) em determinado tempo de exposição (1,4,15 ou 30 dias) em *N. rossii* e *N. coriiceps*, respectivamente.

TABELA 1 - Valores médios \pm erro padrão da média da atividade das enzimas glicose-6-fosfatase (G6Pase), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH) e lactato desidrogenase (MDH) no tecido renal de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C e 4°C por 1,4,15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Obs.: Dentro do mesmo tempo de exposição, letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Entre parênteses encontra-se o "n" amostral utilizado em cada análise. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tempo	Temperatura	G6Pase	CS	MDH	LDH
1 dia	0°C	1,44 \pm 0,09 (10) ^A	0,22 \pm 0,02 (10) ^A	19,76 \pm 3,59 (10) ^A	3,12 \pm 0,30 (10) ^A
	4°C	0,79 \pm 0,12 (10) ^B	0,28 \pm 0,04 (10) ^A	25,16 \pm 1,53 (10) ^A	3,11 \pm 0,15 (10) ^A
	8°C	0,40 \pm 0,05 (10) ^B	0,35 \pm 0,05 (10) ^A	30,33 \pm 3,85 (10) ^A	3,60 \pm 0,33 (10) ^A
4 dias	0°C	0,96 \pm 0,12 (9) ^C	0,37 \pm 0,03 (9) ^B	42,60 \pm 4,51 (9) ^B	3,12 \pm 0,20 (9) ^B
	4°C	0,87 \pm 0,09 (10) ^C	0,22 \pm 0,02 (10) ^B	28,03 \pm 2,27 (10) ^B	2,98 \pm 0,13 (10) ^B
	8°C	0,60 \pm 0,06 (10) ^C	0,33 \pm 0,04 (10) ^B	21,30 \pm 2,59 (10) ^B	3,72 \pm 0,34 (10) ^B
15 dias	0°C	1,58 \pm 0,13 (7) ^D	0,27 \pm 0,02 (7) ^C	45,28 \pm 4,82 (7) ^C	3,03 \pm 0,30 (7) ^C
	4°C	0,72 \pm 0,11 (10) ^E	0,26 \pm 0,03 (10) ^C	32,77 \pm 4,88 (10) ^C	3,27 \pm 0,24 (10) ^C

	8°C	0,87 ± 0,08 (10) ^E	0,62 ± 0,06 (10) ^D	60,08 ± 3,54 (10) ^C	4,41 ± 0,47 (9) ^C
	0°C	1,03 ± 0,13 (10) ^{FG}	0,30 ± 0,04 (10) ^{EF}	34,74 ± 3,43 (9) ^D	3,62 ± 0,20 (9) ^{EF}
30 dias	4°C	1,36 ± 0,09 (10) ^F	0,19 ± 0,02 (10) ^F	27,25 ± 3,04 (10) ^D	2,72 ± 0,23 (10) ^F
	8°C	0,54 ± 0,07 (9) ^G	0,43 ± 0,06 (9) ^E	48,62 ± 9,46 (9) ^D	4,69 ± 0,20 (9) ^E

TABELA 2 - Valores médios ± erro padrão da média da atividade das enzimas glicose-6-fosfatase (G6Pase), citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) no tecido renal de *Notothenia coriiceps*, expostos as temperaturas de 0°C e 4°C por 1,4,15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg. Obs.: Dentro do mesmo tempo de exposição, letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Entre parênteses encontra-se o "n" amostral utilizado em cada análise. (teste de Tukey, p < 0,05).

Tempo	Temperatura	G6Pase	CS	MDH	LDH
1 dia	0°C	1,02 ± 0,12 (10) ^A	0,48 ± 0,04 (10) ^{AB}	51,42 ± 3,10 (10) ^A	2,88 ± 0,25 (10) ^A
	4°C	0,97 ± 0,31 (10) ^A	0,37 ± 0,12 (10) ^A	54,98 ± 17,39 (10) ^A	2,98 ± 0,94 (10) ^A
	8°C	1,01 ± 0,34 (9) ^A	0,68 ± 0,23 (9) ^B	30,75 ± 10,25 (9) ^B	3,57 ± 1,19 (9) ^A
4 dias	0°C	1,02 ± 0,15 (10) ^B	0,55 ± 0,05 (10) ^C	50,70 ± 3,01 (10) ^C	3,29 ± 0,13 (10) ^B
	4°C	0,66 ± 0,21 (10) ^B	0,25 ± 0,08 (10) ^D	30,06 ± 9,51 (10) ^D	2,95 ± 0,93 (10) ^B
	8°C	0,96 ± 0,34 (8) ^B	0,62 ± 0,22 (8) ^C	27,47 ± 9,71 (8) ^{CD}	3,07 ± 1,08 (8) ^B
15 dias	0°C	1,21 ± 0,38 (10) ^C	0,64 ± 0,20 (10) ^D	53,97 ± 17,07 (10) ^E	3,34 ± 1,05 (10) ^C
	4°C	0,87 ± 0,27 (10) ^C	0,42 ± 0,13 (9) ^E	49,09 ± 15,52 (10) ^E	2,25 ± 0,71 (10) ^D
30 dias	0°C	0,75 ± 0,25 (9) ^D	0,35 ± 0,11 (10) ^F	33,12 ± 10,47 (10) ^F	1,95 ± 0,62 (10) ^E
	4°C	0,72 ± 0,24 (9) ^D	0,62 ± 0,21 (9) ^F	36,47 ± 12,16 (9) ^F	2,91 ± 0,97 (9) ^F

4.2 Enzimas do estresse oxidativo

Em *N. rossii*, mantidos a 4°C e 8°C não houve modulação dos níveis da SOD em relação a 0°C. Ao longo do tempo, em 0°C, 4 dias, houve decréscimo na atividade da SOD em comparação ao primeiro dia, enquanto que em 15 dias houve o aumento de 715,59% da atividade da SOD em relação a 4 dias. Na temperatura de 4°C observou-se a elevação dos valores da SOD em 15 dias, tornando a diminuir em 30 dias. Já, em 8°C, houve modulação positiva em 15 dias em relação a 1, 4 e 30 dias (Figura 21A e Tabela 3).

Em 4°C e 8°C em *N. coriiceps* não houve modulação dos níveis da SOD em relação à 0°C. Ao longo do tempo observou-se que em 0°C houve uma queda nos níveis da SOD em 15 dias em relação ao primeiro dia. Já em 4°C, houve um aumento da atividade da SOD em 4 dias em relação aos demais tempos. Em 8°C, não houve variação significativa entre os dois tempos amostrais, isto é, 1 e 4 dias (Figura 21B e Tabela 4).

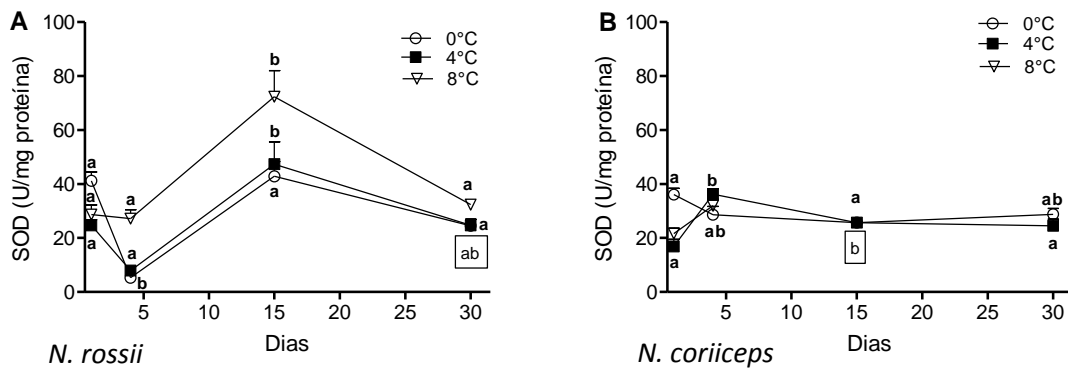


Figura 21. Média \pm erro padrão da atividade da SOD no tecido renal de *N. rossii* (A) e de *N. coriiceps* (B) U/mg de proteína. Os resultados da ANOVA bifatorial estão mostrados nos gráficos. Obs.: As letras comparam tempos de exposição em cada temperatura (em 0°C ou 4°C ou 8°C), quando diferentes indicam alteração estatisticamente significativa; (*) indica diferença significativa entre 0 e 4°C; (**) indica diferença significativa entre 0 e 8°C; (***) indica diferença significativa entre 4 e 8°C; e, quadrado ao redor da letra indica a temperatura de 0°C. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Observou-se que nas temperaturas de 4°C e 8°C em *N. rossii* não houve modulação dos níveis da CAT em relação à temperatura de 0°C e tempos de exposição (Figura 22A e Tabela 3).

Em *N. coriiceps*, submetidos à temperatura de 4°C houve modulação negativa da atividade da CAT em 15 dias. Ao longo do tempo, observou-se que em 15 dias a 0°C houve aumento nos níveis de CAT de 110,53% e 86,05% em relação a 4 e 30 dias, respectivamente. Em 4°C os níveis de atividade da CAT foram modulados positivamente em 30 dias em relação a 15 dias (Figura 22B e Tabela 4).

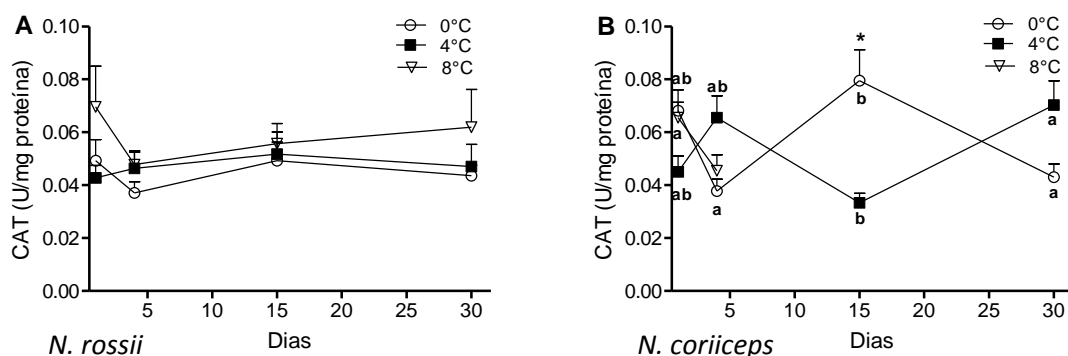


Figura 22. Média \pm erro padrão da atividade da CAT no tecido renal de *N. rossii* (A) e de *N. coriiceps* (B) submetidos a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os resultados da ANOVA bifatorial estão mostrados nos gráficos. Obs.: As letras comparam tempos de exposição em cada temperatura (em 0°C ou 4°C ou 8°C), quando diferentes indicam alteração estatisticamente significativa; (*) indica diferença significativa entre 0 e 4°C; (**) indica diferença significativa entre 0 e 8°C; e, (***) indica diferença significativa entre 4 e 8°C. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Em *N. rossii*, o aquecimento de 4°C e 8°C da temperatura da água modulou negativamente os níveis de GST em relação a 0°C. Em 4°C houve redução de

53,77% da atividade da GST em relação a 0°C em 4 dias. Em 30 dias, a 8°C foi modulado negativamente os níveis de GST em relação a 0°C e 4°C, havendo respectivamente redução de 82,4% e 72,5%. Ao longo do tempo de exposição em 0°C, em *N. rossii*, houve aumento nos níveis de GST, sendo estes significativos em 4, 15 e 30 dias quando comparados a 1 dia, enquanto que em 4°C, em 1 dia foram observados os menores níveis de GST quando comparados com os demais tempos de exposição, havendo queda em 30 dias. Os níveis de GST mantiveram-se constantes ao longo dos tempos de exposição em 8°C (Figura 23A e Tabela 3).

Em *N. coriiceps*, houve modulação negativa da GST em peixes mantidos por 1 dia em 8°C em relação ao controle (0°C) e ao grupo experimental de 4°C. A temperatura de 4°C influenciou a queda da atividade da GST em *N. coriiceps* submetida a essa condição por 4 dias em relação a 0°C, entretanto em 8°C houve aumento da atividade da GST. Os níveis de GST não variaram ao longo do tempo nos peixes mantidos a 0°C e a 8°C apresentando atividade entre 0,11±0,21 e 0,18±0,21, e, 0,055±0,008 e 0,087±0,012 U/mg de proteína respectivamente. Em 4°C houve redução dos níveis da GST em 4 dias em relação a 1 e 15 dias (Figura 23B e Tabela 4).

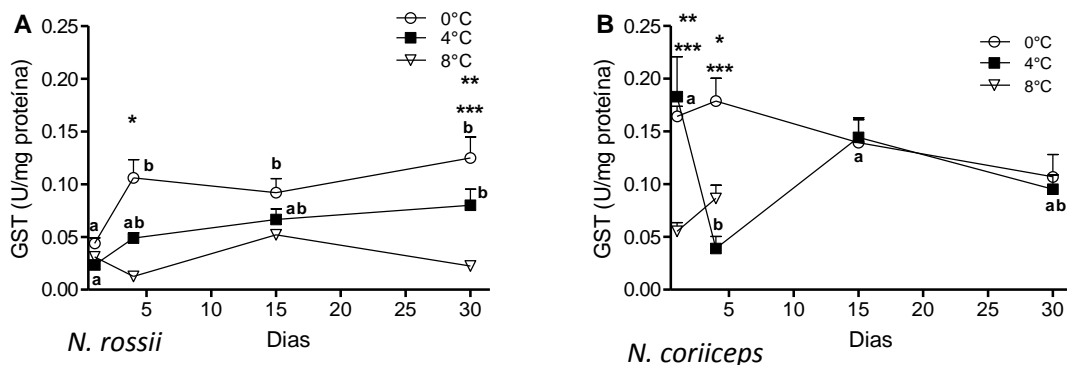


Figura 23. Média \pm erro padrão da atividade da GST no tecido renal de *N. rossii* (A) e de *N. coriiceps* (B) submetidos a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os resultados da ANOVA bifatorial estão mostrados nos gráficos. Obs.: As letras comparam tempos de exposição em cada temperatura (em 0°C ou 4°C ou 8°C), quando diferentes indicam alteração estatisticamente significativa; (*) indica diferença significativa entre 0 e 4°C; (**) indica diferença significativa entre 0 e 8°C; e, (***) indica diferença significativa entre 4 e 8°C. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

As tabelas 3 e 4 representam os valores médios \pm erro padrão da média da atividade das enzimas do estresse oxidativo em U/mg, obtidos nas diferentes temperaturas testadas (0°C, 4°C e 8°C) em determinado tempo de exposição (1,4,15 ou 30 dias) em *N. rossii* e *N. coriiceps*, respectivamente.

TABELA 3 - Valores médios \pm erro padrão da média da atividade das enzimas glutathiona-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido renal de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C, 4°C e 8°C por 1,4,15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Obs.: Dentro do mesmo tempo de exposição, letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Entre parênteses encontra-se o “n” amostral utilizado em cada análise. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tempo	Temperatura	SOD	CAT	GST
1 dia	0°C	41,21 \pm 3,25 (10) ^A	0,049 \pm 0,008 (10) ^A	0,044 \pm 0,005 (9) ^A
	4°C	24,69 \pm 2,12 (10) ^A	0,043 \pm 0,005 (10) ^A	0,023 \pm 0,004 (10) ^A
	8°C	28,71 \pm 3,54 (7) ^A	0,070 \pm 0,015 (7) ^A	0,031 \pm 0,005 (7) ^A
4 dias	0°C	5,26 \pm 0,81 (9) ^B	0,037 \pm 0,004 (9) ^B	0,106 \pm 0,017 (9) ^B
	4°C	7,97 \pm 1,66 (10) ^B	0,046 \pm 0,007 (10) ^B	0,049 \pm 0,005 (10) ^C
	8°C	27,22 \pm 3,26 (10) ^B	0,048 \pm 0,005 (10) ^B	0,013 \pm 0,003 (10) ^{BC}
15 dias	0°C	42,90 \pm 5,38 (7) ^C	0,049 \pm 0,007 (7) ^C	0,091 \pm 0,013 (7) ^D
	4°C	47,38 \pm 8,24 (10) ^C	0,052 \pm 0,012 (10) ^C	0,067 \pm 0,010 (10) ^D
	8°C	72,41 \pm 9,65 (7) ^C	0,056 \pm 0,004 (7) ^C	0,052 \pm 0,003 (7) ^D
30 dias	0°C	24,52 \pm 2,44 (10) ^D	0,044 \pm 0,004 (10) ^D	0,125 \pm 0,019 (10) ^E
	4°C	24,71 \pm 2,20 (10) ^D	0,047 \pm 0,008 (10) ^D	0,080 \pm 0,015 (10) ^E
	8°C	32,41 \pm 1,78 (6) ^D	0,062 \pm 0,014 (6) ^D	0,022 \pm 0,001 (6) ^F

TABELA 4 - Valores médios \pm erro padrão da média da atividade das enzimas glutathiona-S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido renal de *Notothenia coriiceps*, expostos as temperaturas de 0°C e 4°C por 1,4,15 e 30 dias. Atividades expressas em U/mg de proteína. Obs.: Dentro do mesmo tempo de exposição, letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Entre parênteses encontra-se o “n” amostral utilizado em cada análise. (teste de Tukey $p < 0,05$).

Tempo	Temperatura	SOD	CAT	GST
1 dia	0°C	36,11 \pm 2,37 (9) ^A	0,068 \pm 0,008 (9) ^A	0,164 \pm 0,009 (10) ^A
	4°C	16,85 \pm 2,67 (10) ^A	0,045 \pm 0,006 (10) ^A	0,183 \pm 0,038 (10) ^A
	8°C	21,66 \pm 1,94 (9) ^A	0,066 \pm 0,006 (9) ^A	0,055 \pm 0,008(9) ^B
4 dias	0°C	28,63 \pm 3,07 (10) ^B	0,038 \pm 0,004 (10) ^B	0,179 \pm 0,022 (10) ^C
	4°C	36,18 \pm 2,08 (10) ^B	0,066 \pm 0,008 (10) ^B	0,039 \pm 0,012 (10) ^D
	8°C	31,97 \pm 2,44 (6) ^B	0,045 \pm 0,017 (6) ^B	0,087 \pm 0,012(8) ^C
15 dias	0°C	25,71 \pm 1,51 (10) ^C	0,080 \pm 0,012 (10) ^C	0,140 \pm 0,024 (10) ^E
	4°C	25,67 \pm 1,67 (10) ^C	0,033 \pm 0,004 (10) ^D	0,144 \pm 0,0168 (10) ^E
30 dias	0°C	28,80 \pm 2,15 (10) ^D	0,043 \pm 0,005 (10) ^E	0,107 \pm 0,022 (10) ^F
	4°C	24,51 \pm 2,46 (9) ^D	0,070 \pm 0,009 (9) ^E	0,095 \pm 0,013 (9) ^F

4.3 Produtos finais da LPO

Em *N. rossii*, o aquecimento em 4°C elevou os valores de MDA em 1, 15 e 30 dias de experimento em relação aos controles, e em 1 dia houve maiores níveis de MDA em comparação com 8°C. Em 8°C, houve modulação positiva em 15 e 30 dias

em relação a 0°C. Nas três temperaturas estudadas observou-se o mesmo padrão dos níveis de MDA ao longo do tempo. Sendo que em 0°C, em 4 e 30 dias, houve aumento dos produtos da LPO em comparação com 1 dia; enquanto, em 15 dias houve um declínio dos níveis de MDA em relação a 1 e 4 dias. O aquecimento em 4°C modulou positivamente o conteúdo de MDA em 4 e 30 dias em relação a 1 e 15 dias. Em 8°C, observou-se maiores valores de MDA em 4 dias em comparação a 1 e 15 dias, havendo redução significativa em 15 dias em referência a 30 dias (Figura 24A e Tabela 5).

O aquecimento em 4°C em *N. coriiceps*, modulou positivamente os níveis de MDA em 4 dias em relação a 0°C. Em 0°C e 4°C observou-se uma redução dos produtos finais da LPO em 15 e 30 dias comparando-se com 1 dia, sendo que em 4 dias (4°C) também foi observado esse padrão (Figura 24B e Tabela 6).

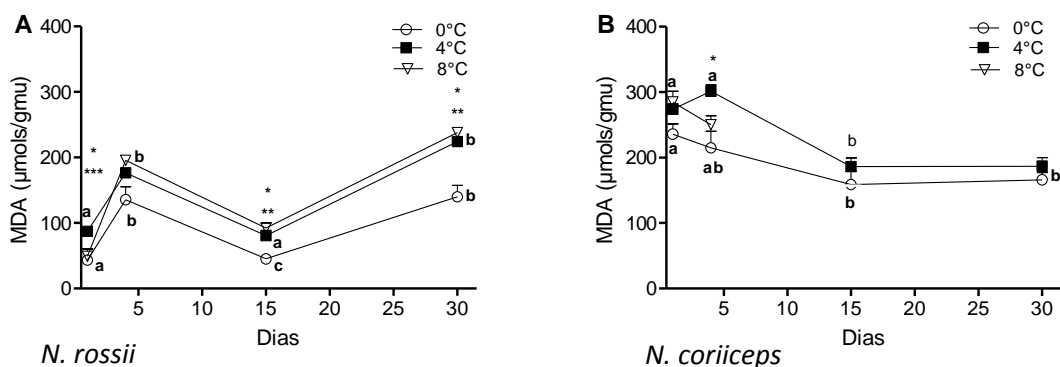


Figura 24. Média \pm erro do conteúdo de malondialdeído (MDA) no tecido renal de *N. rossii* (A) e de *N. coriiceps* (B) submetidos a 0°C, 4°C e 8°C nos tempos de exposição 1, 4, 15 e 30 dias. Atividades expressas em $\mu\text{mols/g}$ de massa úmida. Os resultados da ANOVA bifatorial estão mostrados nos gráficos. Obs.: As letras comparam tempos de exposição em cada temperatura (em 0°C ou 4°C ou 8°C), quando diferentes indicam alteração estatisticamente significativa; (*) indica diferença significativa entre 0 e 4°C; (**) indica diferença significativa entre 0 e 8°C; e, (***) indica diferença significativa entre 4 e 8°C. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

As tabelas 5 e 6 representam os valores médios \pm erro padrão da média do conteúdo de MDA em $\mu\text{mols/g}$ de tecido úmido, obtidos nas diferentes temperaturas testadas (0°C, 4°C e 8°C) em determinado tempo de exposição (1,4,15 ou 30 dias) em *N. rossii* e *N. coriiceps*, respectivamente.

TABELA 5 - Valores médios \pm erro padrão da média do conteúdo de MDA no tecido renal de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C, 4°C e 8°C por 1,4,15 e 30 dias. Atividades expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido úmido. Obs.: Dentro do mesmo tempo de exposição, letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Entre parênteses encontra-se o "n" amostral utilizado em cada análise. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

TABELA 5 - Valores médios \pm erro padrão da média do conteúdo de MDA no tecido renal de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C, 4°C e 8°C por 1,4,15 e 30 dias. Atividades expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido úmido. Obs.: Dentro do mesmo tempo de exposição, letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Entre parênteses encontra-se o “n” amostral utilizado em cada análise. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tempo	Temperatura	LPO
1 dia	0°C	43,19 \pm 3,93 (10) ^A
	4°C	87,30 \pm 4,56 (10) ^B
	8°C	49,14 \pm 10,92 (7) ^A
4 dias	0°C	135,59 \pm 19,56 (9) ^C
	4°C	176,50 \pm 5,57 (10) ^C
	8°C	195,45 \pm 6,42 (10) ^C
15 dias	0°C	45,04 \pm 6,56 (7) ^D
	4°C	80,67 \pm 6,93 (10) ^E
	8°C	92,10 \pm 7,93 (7) ^E
30 dias	0°C	139,9 \pm 17,70 (10) ^F
	4°C	224,26 \pm 6,87 (10) ^G
	8°C	237,71 \pm 7,94 (6) ^G

TABELA 6 - Valores médios \pm erro padrão da média do conteúdo de MDA no tecido renal de *Notothenia coriiceps*, expostos as temperaturas de 0°C, 4°C e 8°C por 1,4,15 e 30 dias. Atividades expressas em $\mu\text{mols/g}$ de tecido úmido. Obs.: Dentro do mesmo tempo de exposição, letras diferentes indicam grupos estatisticamente distintos. Entre parênteses encontra-se o “n” amostral utilizado em cada análise. (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tempo	Temperatura	LPO
1 dia	0°C	235,94 \pm 15,56 (9) ^A
	4°C	273,96 \pm 8,01 (10) ^A
	8°C	284,82 \pm 16,42 (9) ^A
4 dias	0°C	214,71 \pm 25,48 (10) ^B
	4°C	301,45 \pm 9,47 (10) ^C
	8°C	250,08 \pm 13,59 (6) ^{BC}
15 dias	0°C	158,91 \pm 19,93 (10) ^D
	4°C	186,23 \pm 13,35 (10) ^D
30 dias	0°C	166,24 \pm 11,06 (10) ^E
	4°C	186,73 \pm 13,04 (9) ^E

5. JUSTIFICATIVA

Os organismos antárticos habitam um dos ambientes mais termoestáveis do planeta apresentando dessa forma características únicas que possibilitaram a sua sobrevivência em tal ambiente. Alterações na temperatura do oceano Austral, das correntes de água e da extensão do gelo no mar afetam as comunidades marinhas (Robinson, 2008). Consequentemente, há redução da produtividade primária, bem como importantes reflexos na cadeia alimentar desses ecossistemas (Atkinson *et al.*, 2004). Em animais ectotérmicos, como os nototeniídeos antárticos, a mudança da temperatura da água afeta as taxas de processos biológicos e influencia no desempenho do animal (Huey e Stevenson, 1979; Johnson e Bennett, 1995). Apesar da vulnerabilidade destes organismos às mudanças climáticas globais, observa-se que alguns apresentam uma maior plasticidade que outros (Peck, 2002).

Diversos estudos (Turner, 2005, 2007; Machado, 2009; Sirvinskas, 2011) afirmam que a Península Antártica, o Ártico e parte da Sibéria estão com temperaturas mais elevadas que o restante do planeta. Desde meados da década de 60, registraram-se o aumento de até $+0,56^{\circ}\text{C}$ por década na Península Antártica (Turner *et al.*, 2005; 2007). As consequências macroscópicas do aquecimento global são a retração das geleiras, colapso nas plataformas de gelo e exposição de habitats que antes ficavam cobertos de gelo (Clarke *et al.*, 2007). As ilhas sub-antárticas, como a região em estudo, podem tornar-se vulneráveis a eventuais elevações da temperatura. Vale ressaltar que os organismos ali presentes estão adaptados às baixas temperaturas e às demais condições existentes (Di Prisco, 2000; Romão *et al.*, 2001). Flutuações térmicas podem afetar a reprodução, o crescimento, a sobrevivência, entre outros (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

O Brasil juntamente com outros países propôs um plano de gerenciamento para designar a Baía do Almirantado e seus arredores como uma *Antarctic Specially Managed* (ASMA N°.1) durante a XX Reunião do Comitê das partes Consultivas do Tratado Antártico em Utrecht em 1996 (ATCM XXVIII, 2005). Em 2007 durante a XXX Reunião do Comitê das partes Consultivas do Tratado Antártico (ATCM, 2007), determinou-se a realização de programas de monitoramento científicos a longo prazo nos componentes biológicos dessas regiões. Dessa forma, o crescente interesse científico em obter dados para a elaboração do plano de gerenciamento da Baía do Almirantado motivou o desenvolvimento deste trabalho, onde se buscou

detectar e estimar os efeitos da aclimação a altas temperaturas utilizando algumas enzimas do metabolismo energético e do estresse oxidativo, além dos níveis de LPO, no tecido renal de *N. rossii* e *N. coriiceps*, espécies endêmicas e abundantes no ecossistema marinho antártico e na Baía do Almirantado.

A temperatura das águas costeiras da Península Antártica varia entre -1,9°C a +3°C (EASTMAN, 1993; CHEN *et al.*, 1997), e, por esta razão neste trabalho determinou-se como temperatura controle 0°C. A temperatura experimental de 4°C foi escolhida por ser uma condição térmica acima da temperatura encontrada nas áreas costeiras da Península Antártica, além de conhecidamente provocar alterações nos processos fisiológicos (LOWE E DAVISON, 2005; SEEBACHER *et al.*, 2005; FRANKLIN *et al.*, 2007; HUDSON *et al.*, 2008; ROBINSON E DAVISON, 2008; JAYASUNDARA *et al.*, 2013) em peixes antárticos. Já a temperatura de 8°C, conforme dados da literatura, encontra-se próximo a tolerância térmica de peixes antárticos (SOMERO E DE VRIES, 1967; RYAN, 1995; STROBEL *et al.*, 2013).

6. DISCUSSÃO

A temperatura é um fator abiótico importante, pois influencia a velocidade dos processos bioquímicos e conseqüentemente reflete o custo fisiológico que um organismo possui para manter a homeostase em determinado ambiente (HUEY E STEVENSON, 1979; JOHNSON E BENNETT, 1995; CLARKE E JOHNSTON, 1996; HARDEWIG *et al.*, 2004). Dessa forma, o sucesso da ictiofauna Antártica, em um ambiente estável e termicamente frio, pode ser visto como decorrente da seleção natural de enzimas adaptadas para desempenharem sua função na temperatura subzero (MOERLAND, 1995; HOCHACHKA E SOMERO, 2002; WILSON *et al.*, 2002; JOHNSTON, 2003; FIELDS E HOUSEMAN, 2004). O aumento ou a redução da atividade enzimática servem como ótimos indicadores da condição fisiológica perante o fator estressante (TORRES *et al.*, 1994; CHILDRESS E SEIBEL, 1998; LEARY *et al.*, 1998; FERRY-GRAHAM E GIBB, 2001; DAHLHOFF, 2004).

Estudos afirmam que a Península Antártica, local deste estudo, apresentou um aumento próximo de +3°C na temperatura atmosférica ao longo dos últimos 60 anos (KING E HARANGOZO, 1998; MEREDITH E KING, 2005; TURNER *et al.*, 2005; STEIG, *et al.*, 2009; QIU, 2012). Vale ressaltar ainda que, registra-se a tendência de elevação térmica nas águas superficiais (MEREDITH E KING; 2005; CLARKE *et al.*, 2007) e a retração da cobertura de gelo nas ilhas sub-antárticas (COOK *et al.*, 2005; TURNER *et al.*, 2005; CLARKE *et al.*, 2007).

A exposição por longo período de tempo em temperatura superior a encontrada no ambiente é responsável por alterações das taxas fisiológicas e da demanda energética nos organismos ectotérmicos (PÖRTNER, 2002). A resposta a essa mudança leva a ajustes compensatórios do metabolismo, dentre eles, a modulação das atividades de enzimas mitocondriais e glicolíticas (PÖRTNER, 2002), sendo a resposta espécie e tecido-específicas. Os níveis enzimáticos mitocondriais, como por exemplo, da CS e da MDH são referenciais para se estimar a capacidade aeróbica visando à produção de ATP em resposta a mudanças nas condições abióticas (LEARY, *et al.*, 1998; MORGUNOV E SRERE, 1998; LANNIG *et al.*, 2003; SPEERS-ROESCH E BALLANTYNE, 2005; O'BRIEN E MUELLER, 2010; WINDISCH, 2011).

Estudos (KAWALL *et al.*, 2002; ROBINSON, 2008) demonstraram que a atividade da CS varia grandemente entre as espécies provavelmente devido ao estilo de vida, sendo a atividade locomotora importante neste processo. Porém, vale lembrar, que a CS parece estar adaptada em pelo menos 8 espécies de nototenídeos antárticos, mostrando alta atividade no tecido cerebral, em temperaturas subzero, quando comparados com espécies tropicais e subtropicais (MOERLAND, 1995; KAWALL *et al.*, 2002). Este aumento na atividade da CS pode ser em decorrência dos mecanismos qualitativo ou quantitativo, ou ainda a combinação de ambos os mecanismos (MOERLAND, 1995; KAWALL *et al.*, 2002). Nos mecanismos qualitativos, há uma relação entre a flexibilidade e a estabilidade enzimática, sendo que a primeira é necessária para manter a taxa catalítica ideal, enquanto a estabilidade proporciona a correta ligação entre enzima-substrato tornando as enzimas mais eficientes. Já o mecanismo quantitativo é aquele em que os níveis adequados de atividade catalítica resultam de altas concentrações da enzima (SOMERO, 1995; KAWALL *et al.*, 2002)

No tecido hepático do peixe antártico *Pachycara brachycephalum* foi observada redução na atividade da CS (LANNIG *et al.*, 2005; WINDISCH *et al.*, 2011), bem como nos tecidos cardíaco e muscular de *Trematomus bernacchii* (JAYASUNDARA *et al.*, 2013) e no músculo branco de *N. rossii* (STROBEL *et al.*, 2013) aclimatados a temperaturas que variaram de 4,5°C a 7°C indicando um importante mecanismo de economizar energia e ajustar a demanda de oxigênio neste tecido (PÖRTNER, 2002; STROBEL *et al.*, 2013). Tal variação da CS pode refletir indiretamente se eventos de proliferação ou degradação mitocondrial estão ocorrendo (LUCASSEN *et al.*, 2006). No entanto, no tecido cardíaco de *N. rossii*, aclimatados a 7°C, não houve resposta compensatória da CS, no conceito convencional, onde se espera que haja redução da capacidade mitocondrial (STROBEL *et al.*, 2013), similarmente ao observado neste trabalho, onde os níveis de CS mostram-se elevados, em *N. rossii* em 8°C. O alto custo de manutenção mitocondrial nestes tecidos provavelmente é mantido com a utilização dos estoques energéticos de outros tecidos ou por mudanças nas vias metabólicas (STROBEL *et al.*, 2013). Feidantsis *et al.* (2009) analisaram o efeito do choque térmico em altas temperaturas a longo prazo nos tecidos cardíaco e muscular (branco e vermelho) do peixe marinho *Sparus aurata* observando igualmente a elevação da atividade da CS. Dessa forma, sugerem que animais submetidos à elevação térmica podem vir a

ter o sistema aeróbico comprometido em determinada temperatura crítica, havendo a transição para o metabolismo anaeróbico e progressiva insuficiência energética. A redução do metabolismo aeróbico é esperada em virtude da limitação dos sistemas circulatório e ventilatório a fim de manter o aumento do metabolismo basal e conseqüentemente a maior demanda por oxigênio em altas temperaturas (PÖRTNER E KNUST, 2007; NILSSON *et al.*, 2010; SOKOLOVA *et al.*, 2012), fato observado, neste trabalho, em *N. coriiceps* submetida à elevação de 4°C na temperatura da água. Entretanto, em ambas as espécies nota-se que na temperatura de 8°C a enzima CS apresenta níveis acentuados em relação a 4°C, sendo que a aclimação em diferentes temperaturas pode vir a modificar a janela de tolerância térmica nos peixes devido aos distintos reajustes do metabolismo energético (VAN DIJK *et al.*, 1999; PÖRTNER, 2002; SOMMER E PÖRTNER, 2002; SOKOLOVA E PÖRTNER, 2003), além da ação de antioxidantes e chaperonas moleculares (SOKOLOVA *et al.*, 2012)

Neste trabalho, devido a metodologia empregada, houve homogeneização do tecido renal, o que permitiu que tanto a MDH citosólica quanto a mitocondrial estivessem disponíveis durante os ensaios. Sendo, portanto, os resultados apresentados uma combinação da MDH dos dois compartimentos celulares. Em condições aeróbicas, a MDH apresenta a função de ligação de equivalentes redutores produzidos na glicólise e o processamento no sistema de transporte de elétrons, além de catalisar a etapa final do ciclo do ácido cítrico (NELSON E COX, 2002; TORRES *et al.*, 2012). A atividade da MDH em *N. rossii* não foi modulada pelo aquecimento em relação aos grupos-controle, entretanto foi observada uma elevação de seus níveis de forma tempo dependente, concomitante ao aumento da atividade da CS (15 e 30 dias), sugerindo maior taxa metabólica durante exposição prolongada na temperatura de 8°C. Em *N. coriiceps*, nos estágios iniciais em 8°C, há diminuição da atividade da MDH, o que pode indicar a diminuição do funcionamento do ciclo do ácido cítrico, possivelmente por limitar o fluxo de substratos para o mesmo e, conseqüentemente, o comprometimento do processo de produção de ATP (AFSAR *et al.*, 2012).

A LDH é uma enzima essencial em processos envolvendo o metabolismo glicídico e estudos com peixes, dentre eles antárticos, demonstram a presença de diferentes isoformas da LDH, as quais variam de acordo com o tecido e com a temperatura ambiente, visando a manutenção das suas características enzimáticas

(MOERLAND, 1995; KAWALL *et al.*, 2002; FIELDS E HOUSEMAN, 2004; COQUELLE *et al.*, 2007; FEIDANTSIS *et al.*, 2009). Kawall *et al.* (2002) compararam a atividade da LDH em encéfalos de nototeniídeos antárticos e de peixes tropicais e verificaram que a 10°C a atividade da LDH mostrou-se 2,5 vezes maior nos peixes antárticos enquanto que a temperaturas próximas ao habitat de 0°C (peixes antárticos) e 25°C (peixes tropicais) a atividade da LDH foi apenas 0,48 vezes maior em peixes antárticos que nas espécies tropicais.

No músculo esquelético de *Pagothenia borchgrevinki* (SEEBACHER *et al.*, 2005) e *T. bernacchii* (JAYASUNDARA *et al.*, 2013) os níveis de LDH elevaram-se em peixes aclimatados à temperaturas próximas de 4°C sugerindo que a atividade anaeróbia muscular aumentou nos indivíduos expostos ao aquecimento em decorrência da limitação no fornecimento de O₂ e não do comprometimento mitocondrial, a fim de compensar o maior custo energético de viver em temperaturas mais altas. Em *N. coriiceps*, o aquecimento da água em 4°C demonstrou influência sobre os níveis da LDH, pois em 15 dias houve sua redução e em 30 dias o aumento em relação a 0°C, sugerindo nesse último caso maior utilização do lactato como fonte energética (Jayasundara *et al.*, 2013). Em *N. rossii* os níveis de LDH não variaram ao longo do tempo e não houve modificações dos níveis de LDH devido à elevação da temperatura (4°C e 8°C) em relação ao controle (0°C), assim como Vargas-Chacoff *et al.* (2009) relataram para a atividade da LDH renal de *Sparus aurata* submetido ao aumento de 7°C na temperatura da água (de 19°C para 26°C), indicando que provavelmente a função osmorregulatória desse tecido não está sendo comprometida. No entanto, houve variação significativa nos níveis de LDH entre 4°C e 8°C em 30 dias, indicando que *N. rossii* apresenta diferentes estratégias frente à elevação térmica devido a modificações do metabolismo energético (VAN DIJK *et al.*, 1999; PÖRTNER, 2002; SOMMER e PÖRTNER, 2002; SOKOLOVA e PÖRTNER, 2003).

Somente em *N. coriiceps*, em 4°C observaram-se mudanças concomitantes nos níveis da LDH e da CS, indicando uma reorganização da maquinaria metabólica conforme observado por Feidantsis *et al.* (2009). No coração de *T. bernacchii*, as taxas entre LDH e CS permaneceram constantes e conseqüentemente houve um equilíbrio entre o metabolismo aeróbio e anaeróbio (JAYASUNDARA *et al.*, 2013). A redução da atividade das enzimas do metabolismo no tecido pode levar a um inadequado suprimento de ATP no tecido (JAYASUNDARA *et al.*, 2013).

Acredita-se que a glicose sanguínea em peixes apresente um papel secundário na demanda energética, sendo muitas vezes armazenado em forma de glicogênio em órgãos como o fígado e o rim (BLASCO *et al.*, 2001; ENES *et al.*, 2009; MAGNONI *et al.*, 2013). A presença da enzima G6Pase, que participa da manutenção dos níveis glicêmicos, é importante neste processo, pois possibilita a exportação da glicose para outros tecidos (BLASCO *et al.*, 2001; ENES *et al.*, 2009) e para a síntese de moléculas biológicas, como a AFGP (MAGNONI *et al.*, 2013). A oxidação glicídica no tecido renal aumenta, por exemplo, em situações de alteração osmótica (SUAREZ E MOMMSEN, 1987; SOENGAS *et al.*, 1994), já que uma maior demanda por ATP, conduziria a modificações no metabolismo intermediário do rim (MCCORMICK *et al.*, 1989; SOENGAS *et al.*, 1994; KELLY E WOO, 1999).

Em *N. rossii*, a elevação da temperatura (4 e 8°C) acarretou na diminuição da atividade da G6Pase enquanto que em *N. coriiceps* não houve alteração na atividade da G6Pase. No trabalho de Das *et al.* (2006) foi observado que o aumento da temperatura proporcionou a elevação da G6Pase renal e hepática da carpa *Labeo rohita*, indicando grande mobilização de glicogênio para a produção de glicose sanguínea (VIJAYAN *et al.*, 1990). Dados ainda não publicados pelo grupo de Biologia Adaptativa – UFPR, mas em análise pelos editores da revista *Physiology and Biochemistry Zoology*, demonstram que a temperatura de 8°C levou ao aumento da atividade da G6Pase hepática de *N. rossii* e consequente redução do glicogênio hepático em relação à temperatura de 0°C. Nossos dados sugerem que em *N. coriiceps*, a G6Pase renal provavelmente não participa da mobilização de glicogênio frente ao aumento da temperatura.

O aumento da temperatura ambiental desencadeia um aumento no consumo de oxigênio (HOCHACHKA E SOMERO, 2002; BAGNYUKOVA *et al.*, 2003; HEISE *et al.*, 2006) podendo levar a geração de EROs com consequente oxidação celular e a resposta do sistema da defesa antioxidante a fim de manter a homeostase do organismo (LUSHCHAK E BAGNYUKOVA, 2006a). As principais enzimas antioxidantes que atuam na destoxificação de EROs são a SOD, a CAT e as glutatonas dependentes, como por exemplo, a GST (LUSHCHAK E BAGNYUKOVA, 2006b).

Há alguns estudos que verificaram que peixes antárticos de sangue vermelho, incluindo *N. coriiceps*, apresentam maior atividade da SOD (WITAS *et al.*, 1984, CASSINI *et al.*, 1993) e CAT (CASSINI *et al.*, 1993) que peixes antárticos de sangue

branco (WITAS *et al.*, 1984) destacando que os primeiros possuem maior plasticidade frente aos possíveis aumentos da temperatura. Sem contar que, nototenídeos antárticos apresentam maior atividade da SOD quando comparados com peixes de ambiente temperado (CASSINI *et al.*, 1993), enquanto que com os níveis de CAT ocorre o inverso (WITAS *et al.*, 1984; CASSINI *et al.*, 1993).

Ansaldo *et al.* (2000) ao avaliarem a atividade das defesas antioxidantes em diferentes tecidos de peixes das famílias Channichthyidae e Nototheniidae, coletados da natureza, constataram diferenças marcantes nos níveis da SOD e CAT nas brânquias sendo que, nos channichthyides a atividade da SOD foi maior e da CAT menor quando comparados com os notothenídeos. Acredita-se que o peróxido de hidrogênio produzido nas brânquias seja eliminado por difusão na água e não pela atuação enzimática (ANSALDO *et al.*, 2000). Em contrapartida, a SOD sanguínea é maior nos nototenídeos (ANSALDO *et al.*, 2000.). Mueller *et al.* (2012) testaram a capacidade térmica máxima de peixes antárticos de sangue branco (*Chionodraco rastrospinosus* e *Chaenocephalus aceratus*) e de sangue vermelho (*Gobionotothen gibberifrons* e *N. coriiceps*) e encontraram menores atividades dos antioxidantes SOD e CAT no tecido cardíaco dos primeiros. Isso confirma o encontrado por Witas *et al.* (1984), Cassini *et al.* (1993) e Ansaldo *et al.* (2000), sugerindo que os peixes da família Nototheniidae conseguem lidar de forma mais eficaz com as altas concentrações de oxigênio a que estão expostos e conseqüentemente com o estresse oxidativo.

O aquecimento em 4°C e 8°C não modulou a atividade da SOD e da CAT renal em *N. rossii*, enquanto que em *N. coriiceps*, houve modulação negativa somente em 15 dias a 4°C em relação ao controle. Bagnyuka *et al.* (2007) avaliaram os efeitos de uma transferência rápida, da espécie euritérmica *Carassius auratus*, de 3 para 23°C e não observaram alterações nos níveis da CAT e da SOD renais durante o período de exposição (5 dias), sugerindo que a glutathione peroxidase (GPx), seja a responsável pela degradação dos peróxidos enquanto a atividade da SOD encontra-se elevada o suficiente para catalisar a dismutação do ânion superóxido. Ou ainda, acredita-se que em alguns casos a CAT pode ser inibida pela flutuação de radicais superóxido (FILHO, 1996 *apud* MADEIRA *et al.*, 2013). Lushchak e Bagnyuka (2006b) verificaram padrões de resposta diferentes para a SOD, em diferentes órgãos, dentre eles o rim, de *C. auratus*, submetido ao aumento agudo de temperatura (21 para 35°C), onde foi observado, aumento significativo dos

níveis de SOD nos tempos de 6 e 12 horas, sugerindo que a SOD seja uma enzima-chave na resposta ao choque térmico.

Em *N. rossii* e *N. coriiceps*, quando houve modulação da GST, esta apresentou relação inversa com a temperatura. Em peixes de água doce, Lushchak e Bagnyuka (2006b) verificaram que a GST renal não foi modulada frente ao aquecimento enquanto que Bagnyuka *et al.* (2007) mostraram que o perfil enzimático da GST renal em *C. auratus* é variável ao longo do tempo, havendo modulação positiva em 12 e 48 horas de experimento como resposta adaptativa a condição térmica submetida.

O estresse oxidativo induzido pelo choque térmico levou ao aumento dos níveis de MDA no tecido renal de *N. coriiceps* e *N. rossii*, entretanto o perfil da resposta foi distinto entre as espécies, o que vem a corroborar com as diferentes respostas enzimáticas observadas. Já que, os produtos da LPO além de marcadores de danos oxidativos aos lipídios, estão possivelmente envolvidos no desencadeamento da regulação positiva de enzimas antioxidantes (LUSHCHAK E BAGNYUKA, 2006a; MADEIRA *et al.*, 2013). Regoli *et al.* (2005), avaliaram a resposta para o aumento natural das condições pró-oxidativas, que acontece no início da primavera austral, em *Pleuragramma antarcticum* e detectaram níveis elevados de MDA. O aumento nos níveis de MDA e de proteínas oxidadas em corações de *icefishes*, mas não em nototheniids, em resposta a exposição a CTMax, foi verificado por Mueller *et al.* (2012). Em *C. auratus* expostos ao aumento térmico por diferentes períodos de tempo, a alteração dos níveis de MDA renais ocorreu de forma pontual (LUSHCHAK E BAGNYUKA, 2006a; BAGNYUKA *et al.*, 2007), assim como em *N. coriiceps* que nos tempos de 15 e 30 dias apresentou valores de MDA semelhantes entre animais controle e experimentais (4°C).

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o aquecimento a 4°C e 8°C induz a ajustes metabólicos nos níveis e perfis ao longo do tempo nas atividades das enzimas do metabolismo energético (G6Pase, CS, MDH e LDH), da defesa antioxidante (SOD, CAT e GST) e do conteúdo do marcador não enzimático do estresse oxidativo (LPO) do sistema renal de *N. coriiceps* e *N. rossii*. Sendo pontuado que:

- A G6Pase renal foi modulada negativamente em 1 e 15 dias a 4°C e 8°C em relação a 0°C em *N. rossii*;

- A CS do tecido renal de *N. rossii* foi modulada positivamente a 8°C em 15 dias em relação 0°C, enquanto que em *N. coriiceps* observou-se modulação positiva em 4 dias a 8°C em comparação a 0°C, e, a 0°C em 15 dias em relação a 4°C;

- A MDH renal de *N. coriiceps* apresentou modulação negativa em 1 dia a 8°C e em 4 dias a 8°C ambos os casos em relação a 0°C;

- A LDH renal de *N. coriiceps* modulou negativamente em 15 dias a 4°C, havendo o aumento relevante em 30 dias em comparação a 0°C;

- A CAT de *N. coriiceps* foi modulada negativamente em 15 dias a 4°C em relação a 0°C;

- A GST do tecido renal de *N. rossii* em 4 e 30 dias foi modulada positivamente a 0°C em comparação a 4°C e 8°C, respectivamente. Já em *N. coriiceps*, houve maior atividade da GST em 1 e 4 dias a 0°C em relação a 8°C e 4°C, de modo respectivo;

- Os níveis de MDA observados no tecido renal de *N. rossii* foram elevados em 1 (4°C), 15 (4°C e 8°C) e 30 dias (4°C e 8°C) em relação a 0°C. Enquanto que em *N. coriiceps*, a elevação foi pontual a 4°C em 4 dias em relação a 0°C.

As duas espécies estudadas neste trabalho evoluíram em temperaturas estáveis e baixas, sendo que as respostas metabólicas apresentam perfis enzimáticos espécie-específicos, tecido-específicos, termo e tempo-dependentes. A compensação enzimática ao calor ocorreu parcialmente indicando limitação a exposição a temperaturas altas, tendo em vista que a exposição prolongada em

ambiente com temperatura alterada pode comprometer a produção de energia e levar a um estado de insuficiência metabólica.

Dessa forma, para esclarecer o papel das enzimas antioxidantes, bem como a capacidade de modulação das enzimas do metabolismo energético frente ao choque térmico são necessárias investigações enfocando as primeiras 24h, para averiguar se os níveis constitutivos são melhorados, ou então, comprometidos com o aumento da temperatura. Além de esclarecer a importância dos níveis de transcrição, tradução e pós-tradução na regulação desses marcadores para a melhor compreensão dos efeitos do aquecimento em *N. coriiceps* e *N. rossii*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADROGUÉ, H.J. Glucose homeostasis and the kidney. **Kidney International**, v.42, p.1266-1282, 1992.
- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984.
- AFSAR, S.; TAMLOORKAR, H.L.; YASMEEN, R. Malate dehydrogenase activity post exposure recovery from lead intoxicated freshwater fish *Anabas testudineus*. **International Journal of Biomedical and Advance Research**, v.3, p.118-121, 2012.
- AHMAD, I.; HAMID, T.; FATIMA, M.; CHAND, H.S.; JAIN, S.K.; ATHAR, M.; RAISUDDIN, S. Induction of hepatic antioxidantes in freshwater catfish (*Channa punctatus*, Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1519, p.37-48, 2000.
- ALBINATI, A.C.L. **Biomarcadores histológicos na avaliação de testes de toxicidade com o herbicida Roundup® em Piauçu (*Leporinus macrocephalus*)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Tropical). Universidade Federal da Bahia.
- ANDRADE JÚNIOR, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v.31, p.60-68, 2005.
- ANSALDO, M.; LUQUET, C.M.; EVELSON, P.A.; POLO, J.M.; LLESUY, S. Antioxidant levels from different antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**, v.23, p.160-165, 2000.
- AQUINO, F.E. **Conexão climática entre o modo anular do hemisfério sul com a Península Antártica e o sul do Brasil**. 2012. Tese (Doutorado em Geociências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ARIGONY-NETO, J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. Implementation of the Admiralty Bay Geographic Information System, King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**, Rio de Janeiro, v.4, p.187-190, 2004.
- ATCM XXVIII. Review of the Admiralty Bay Antarctic Specially Managed Area Management Plan (ASMA No. 1). **ATCM XXVIII**, Stockholm, p.1–31, 2005.
- ATCM XXX. SCAR Report to XXX ATCM. **ATCM XXX**. New Delhi, p.1-20. 2007.
- ATKINSON, A.; SIEGEL, V.; PAKHOMOV, E.; ROTHERY, P. Long-term decline in krill stock and increase in salps within the Southern Ocean. **Nature**, v.432, p.100-103, 2004.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.145, p.282-287, 2007.

AVILEZ, I.M.; HORI, T.S.F.; ALMEIDA, L.C.; HACKBARTH, A.; BASTOS NETO, J.C.; BASTOS, V.L.F.C.; MORAES, G. Effects of phenol in antioxidant metabolism in matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei; Characidae). **Comparative Biochemistry and physiology Part C**, v.148, p.136-142, 2008.

BAGNYUKOVA, T.V.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. **Journal of Thermal Biology**, v.28, p.21-28, 2003.

BAGNYUKOVA, T.V.; LUSHCHAK, O.V.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. **Journal of Thermal Biology**, v.32, p.227-234, 2007.

BAINY, A.C.D. Oxidative stress as biomarker of polluted aquatic sites. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus-Inpa. p.101-110, 1996.

BARRERA-ORO, E.R.; WINTER, D.J. Age composition and feeding ecology of early juvenile *Notothenia rossii* (Pisces, Nototheniidae) at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctic. **Antarctic Science**, v.20, n.4, p.339-341, 2008.

BARRETT, P.J. Cooling a continent. **Nature**, v.421, p.221-223, 2003.

BARTON, B.A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v.42 n.3, p.517-525, 2002.

BEERS, J.M.; SIDELL, B.D. Thermal Tolerance of Antarctic Notothenioid Fishes Correlates with Level of Circulating Hemoglobin. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.84, n.4, p.353-362, 2011.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.47, p.233-261, 1996.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. New York: Grune & Stratton, p.160, 1975.

BLASCO, J.; MARIMÓN, I.; VIAPLANA, I.; 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, p.247-258, 2001.

BOCKHEIM, J.G.; HALL, K.J.. Permafrost, active-layer dynamics and periglacial environments of continental Antarctica. **Periglacial Research South African Journal of Science**, v.98, p.82-90, 2002.

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

BILYK, K.T.; DEVRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology**, v.158, n.4, p.382-90, 2011.

BILYK, K.T.; EVANS, C. W.; DEVRIES, A. L. Heat hardening in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v.35, p.1447-1451, 2012.

CAMPOS, M., MOTHE, B., MENDES, I.L.V. Antarctic sponges (Porifera, Demospongiae) of the South Shetland Islands and vicinity. Part I. Spirophorida, Hadromerida, Halichondrida and Haplosclerida. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.24, p.687-708, 2007.

CARDOSO, W.E. **Morfologia e Ultraestrutura do intestino do peixe antártico *Notothenia rossi* RICHARDSON, 1844 e sua relação com o hábito alimentar**. 2005. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular). Universidade Federal do Paraná.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BOCCIARELLI, T.; BOCCIO, P.D.; FEDERICI, L.; DI ILIO, C. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v.90, p.48-57, 2008.

CASSINI, A.; FAVERO, M.; ALBERGONI, V. Comparative studies of antioxidant enzymes in red-blooded and white-blooded Antarctic teleost fish *Pagothenia bernacchii* and *Chionodraco hamatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.106, n.2, p.333-336, 1993.

CHANDRAN, R.; SIVAKUMAR, A.A.; MOHANDASS, S.; ARUCHAMI, M. Effect of cadmium and zinc on antioxidant enzyme activity in the gastropod, *Achatina fulica*. **Comparative Biochemistry and physiology Part C**, v.140, p.422-426, 2005.

CHEN, L.; DE VRIES, A.L.; CHENG, C.C. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.94, p.3817-3822, 1997.

CHENG, C.H.; CHEN, L.; NEAR, T. J.; JIN, Y. Functional antifreeze glycoprotein genes in temperate-water New Zealand nototheniid fish infer an Antarctic evolutionary origin. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, n.11, p.1897-1908, 2003.

CHENG, C.H.; DETRICH III, H.W. Molecular ecophysiology of Antarctic notothenioid fishes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.362, p.2215-2232, 2007.

CHILDRESS, J.J.; SEIBEL, B.A. Life at stable low oxygen levels: adaptations of animals to oceanic oxygen minimum layers. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p.1223-1232, 1998.

CHILDRESS, J. J.; 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.

CHIQUOINE, A.D. The distribution of glucose-6-phosphatase in the liver and kidney of the mouse. **Journal Histochemistry & Cytochemistry**, p.429-435, 1953.

CLARKE, A. 1988 Seasonality in the Antarctic marine ecosystem. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.90, p.461-473.

CLARKE, A.; JOHNSTON, I. A. Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. **Tree**, v.11, p.212-218, 1996.

CLARKE, A. Evolution at low temperatures, in **Evolution on Planet Earth: The Impact of the Physical Environment**. eds. L. Rothschild and A. Lister. London: Academic Press, 2003.

CLARKE, A.; MURPHY, E.J.; MEREDITH, M.P.; KING, J.C.; PECK, L.S.; BARNES, D.K.A.; 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, p.149-166, 2007.

COOK, A., FOX, A., VAUGHN, D.; FERRIGNO, J. Retreating glacier fronts on the Antarctic Peninsula over the past half-century. **Science**, v.308, 541-544, 2005.

COQUELLE, N.; FIORAVANTI, E.; WEIK, M.; VELLIEUX, F.; MADERN, D. Activity, Stability and Structural Studies of Lactate Dehydrogenases Adapted to Extreme Thermal Environments. **Journal of Molecular Biology**, v.374, p.547-562, 2007.

COWLES, R. B.; BOGERT, C. M. The critical thermal maximum: history and critique. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v.83, p.261-296, 1944.

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KINSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-241, 1981.

CULLINS, T.L.; DE VRIES, A.L.; TORRES, J.J. Antifreeze proteins in pelagic fishes from Marguerite Bay (Western Antarctica). **Deep-Sea Research II**, v.58, p.1690-1694, 2011.

DAHLHOFF, E.P. Biochemical indicators of stress and metabolism: Applications for marine ecological studies. **Annual Review of Physiology**, v.66, p.183-207, 2004.

DAS, T.; PAL, A.K.; CHAKRABORTY, S.K.; MANUSH, S.M.; CHATTERJEE, N.; APTE, S.K. Metabolic Elasticity and Induction of Heat Shock Protein 70 in *Labeo*

rohita Acclimated to Three Temperatures. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.19, n.7, p.1033-1039, 2006.

DE WITT, H. Coastal and deep-water benthic fishes of the Antarctic. In: BUSHNELL, V. C. **Antarctic Map Folio Series**, Folio 15, New York: American Geographical Society, p.1-10, 1971.

DOBBS, G.H.; LIN, Y; DE VRIES, A.L. Agglomerularism in Antarctic Fish. **Science**, v.185, p.793-794, 1974.

DONELSON, J.M.; MUNDAY, P.L.; MCCORMICK, M.I.; NILSSON, G.E. Acclimation to predicted ocean warming through developmental plasticity in a tropical reef fish. **Global Change Biology**, v.17, p.1712-1719, 2011.

DUARTE, V.S. **Estrutura e variabilidade interanual das massas de água no estreito de Bransfield (Antártica) durante os verões austrais de 2003 e 2004**. 2006. Dissertação (Mestrado em Geociências). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

EASTMAN, J.T. **Antarctic Fish Biology: Evolution in a Unique Environment**. San Diego: Academic Press, 1993.

EASTMAN, J.T.; EAKIN, R.R. An updated species list for notothenioid fish (Perciformes: Notothenioidei), with comments on Antarctic species. **Archive of Fishery Marine Research**, v.48, n.1, p.11-20, 2000.

EASTMAN, J. T. The nature of the diversity of Antarctic fishes. **Polar Biology**, v.28, n.2, p.93-107, 2005.

ENES, P.; Panserat, S.; Kaushik, S.; Oliva-Teles, A. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v.35, p.519-539, 2009.

EVANS, D.H. **The Physiology of Fishes**. Boca Raton, USA: CRC Press, 1993.

FATHI, A. R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; STEINFELDE, R. H. J. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208-214, 2002.

FEDERICI, G.; SHAW, B.J., HANDY, R.D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v.84, p.415-430, 2007.

FEIDANTSIS, K.; PÖRTNER, H.O.; LAZOU, A.; KOSTOGLU, B.; MICHAELIDIS, B. Metabolic and molecular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata* during long-term exposure to increasing temperatures. **Marine Biology**, v.156, p.797-809, 2009.

FERRY-GRAHAM, L.A.; GIBB, A.C. Comparison of fasting and postfeeding metabolic rates in a sedentary shark, *Cephaloscyllium ventriosum*. **Copeia**, 1108-13, 2001.

FIELDS, P.A.; HOUSEMAN, D.E. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A4 -lactate dehydrogenase: evidence from the Antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus*. **Molecular Biology and Evolution**, v.21, p. 2246-2255, 2004.

FISCHER, W.; HUREAU, J. C. FAO Species Identification Sheets for fishery purposes: Southernn Ocean. Roma: **Food and Agriculture Organization of United Nations**, 1985.

Fish Base. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/>>. Acesso em: setembro de 2013.

FOSTER, T. D. The marine environment. In: LAWS, R.M. (Ed.) **Antarctic ecology**. London: Academic Press, 1984. v. 2, p.345-371.

FRANKLIN, C.E.; DAVISON, W.; SEEBACHER, F. Antarctic fish can compensate for rising temperatures: thermal acclimation of cardiac performance in *Pagothenia borchgrevinki*. **The Journal of Experimental Biology**, v.210, p.3068-3074, 2007.

GHOSH, A.; CHEUNG, Y.Y.; MANSFIELD, B.C.; CHOU, J.Y. Brain contains a functional glucose-6-phosphatase complex capable of endogenous glucose production. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, n.12, p.11114-11119, 2005.

GON, O.; HEEMSTRA, P. C. Fishes of the Southern Ocean. **Institute of Ichthyology**, v.462, 1990.

GONZALEZ-CABRERA, P.J.; DOWD, F.; PEDIBHOTLA, V.K.; ROSARIO, R.; STANLEY-SAMUELSON, D.; PETZEL, D. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in Antarctic fish is mediated by increased gill and kidney Na⁺/K⁺-ATPase activities. **The Journal of Experimental Biology**, v.198, p.2279-2291, 1995.

GOWARD, C.R.; NICHOLLS, D.J. Review: Malate dehydrogenase: A model for structure, evolution, and catalysis. **Protein Science**, v.3, p.1883-1888, 1994.

HALLIWELL, B. Oxidative stress nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutrition antioxidant intake in humans. **Free Radical Research**, v.25, p.25-57, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2.ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. Oxford University Press, 2000.

- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v.35, n.5, p.1147-1150, 2007.
- HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H.O.; VAN DIJK, P. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? **Journal of Comparative Physiology Part B**, v.174, p.149-156, 2004.
- HARDING, M.M; ANDERBERG, P.I.; HAYMET, A.D.J. "Antifreeze" glycoproteins from polar fish. **European Journal of Biochemistry**, v.270, n.7, p.1381-92, 2003.
- HEISE, K.; PUNTARULO, S.; NIKINMAA, M.; ABELE, D.; PÖRTNER, H.O. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. **Journal of Experimental Biology**, v.209, p.353-363, 2006.
- HOCHACHKA, P.W., SOMERO, G.N. **Biochemical adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York: Oxford University Press, 2002.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v.31, p.1170-1179, 2008.
- HUDSON, H.A.; BRAUER, P.R.; SCOFIELD, M.A. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v.31, p.991-997, 2008.
- HUEY, R.B.; STEVENSON, R.D. Integrating thermal physiology and ecology of ectotherms: A Discussion of Approaches. **American Zoologist**, v.19, p.357-366, 1979.
- HUREAU, J.C. Biologie de *Chaenichthys rhinoceratus* Richardson, et problème du sang incolore des Chaenichthyidae, poissons de mers australes. **Bulletin de la Société Zoologique**, v.91, n.4, p.735-751, 1966.
- HUREAU, J.C. Biologie comparée de quelques poissons antarctiques (Nototheniidae), **Bulletin de l'Institut Océanographique**, Monaco, v.68, p.1-244, 1970.
- JANSSENS, B.J.; CHILDRESS, J.J.; BAGUET, F.; REES, J.F. Reduced enzymatic antioxidative defense in deep-sea fish. **The Journal of Experimental Biology**, v.203, p.3717-3725, 2000.
- JAYASUNDARA, N.; HEALY, T.M.; SOMERO, G.N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic nototheniid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, 2013.
- JIN, Y.; DE VRIES, A.L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic nototheniid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.144, n.3, p.290-300, 2006.
- JOBLING, M. **Fish bioenergetics**. Chapman & Hall, London. 1994.

JOHNSON, T.P.; BENNETT, A.F. The thermal acclimation of burst escape performance in fish: an integrated study of molecular and cellular physiology and organismal performance. **Journal of Experimental Biology**, v.198, p.2165-2175, 1995.

JOHNSTON, I.A.; CLARKE, A.; WARD, P. Temperature and metabolic rate in sedentary fish from the Antarctic, North Sea and Indo-West Pacific Ocean. **Marine Biology**, v.109, p.191-195, 1991.

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

KAWALL, H.G.; TORRES, J.J.; SIDELL, B.D.; SOMERO, G.N. Metabolic cold adaptation in Antarctic fishes: evidence from enzymatic activities of brain. **Marine Biology**, v.140, p.279-286, 2002.

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for Several Activities of the Glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v.251, p.6183-6188, 1976.

KELLY, S.P.; WOO, N.Y.S. Cellular and biochemical characterization of hyposmotic adaptation in a marine teleost, *Sparus sarba*. **Zoological Science**, v.16, p.505-514, 1999.

KING J.C.; HARANGOZO, S.A. Climate change in the western Antarctic Peninsula since 1945: observations and possible causes. **Annals of Glaciology**, v.27, p.571-575, 1998.

KOCK, K.H. **Antarctic fish and fisheries; Studies in polar research**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1992.

KULESZ, J. Seasonal biology of *Notothenia gihberifrons*, *N. rossi* and *Trematomus newness* as well as respiration of young fish from Admiralty Bay (King George, South Shetland Islands). **Polish Archives of Hydrobiology**, v.41, p.79-102, 1994.

KULESZ, J. Ichthyofauna of lagoons of the Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) in 1997. **Polish Archives of Hydrobiology**, v.46, p.173-184, 1999.

LAM, W.G.; WONG, M.K.; CHEN, N.; SIN, Y.M. Effect of combined copper, zinc, chromium and selenium by orthogonal array design on alkaline phosphatase activity in liver of the red sea bream, *Chrysophrys major*. **Aquaculture**, v.131, p.219-230, 1995.

LANNIG, G.; ECKERLE, L.; SERENDERO, I.; SARTORIS, F. J.; FISCHER, T.; KNUST, R.; JOHANSEN, T.; PÖRTNER, H. O. Temperature adaptation in eurythermal cod (*Gadus morhua*): comparison of mitochondrial enzyme capacities in Boreal & Arctic populations. **Marine Biology**, v.142, p.589-599, 2003.

LANNIG, G., STORCH, D., PÖRTNER, H.O. Aerobic mitochondrial capacities in Antarctic and temperate eelpout (Zoarcidae) subjected to warm versus cold acclimation. **Polar Biology**, v.28, p.575-584, 2005.

LAWS, R. M. **Antarctic Ecology**. v.2. London: Academic Press, 1984.

LEARY, S.C.; ANTONOV, J.I.; WANG, J.; DELWORTH, T.L.; DIXON, K.W.; BROCCOLI, A.J. Inter-tissue differences in mitochondrial enzyme activity, RNA and DNA in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **The Journal of Experimental Biology**, v.201, p.3377-3384, 1998.

LEVITUS, S.; ANTONOV, J.I.; WANG, J.; DELWORTH, T.L.; DIXON KW, BROCCOLI, A.J. Anthropogenic warming of Earth's climate system. **Science**, v.292, p.267-270, 2001.

LEVITUS, S.; ANTONOV, J.; BOYER, T. Warming of the world ocean 1955-2003. **Geophysical Research Letters**, v. 32, 2005.

LIMA, L.C.; RIBEIRO, L.P.; LEITE, R.C.; MELO, D.C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p. 113-117, 2006.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulates reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Marine Pollution Bulletin**, v.42, p.656-666, 2001.

LOWE, D.T. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of pré-eclâmpsia. **Nitric Oxide** v.4, p.441-458, 2000.

LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**, v.67, n.3, p.752-766, 2005.

LUCASSEN, M.; KOSCHNICK, N.; ECKERLE, L.G.; PÖRTNER, H.O. Mitochondrial mechanisms of cold adaptation in cod (*Gadus morhua* L.) populations from different climatic zones. **The Journal of Experimental Biology**, v.209, p.2462-2471, 2006.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.143, p.30–35, 2006a.

LUSHCHAK, V.I.; BAGNYUKOVA, T.V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.143, p.36–41, 2006b.

MACHADO, Cordélia S.; BRITO, Tânia. **Coleção Explorando o Ensino. Antártica**. v.9. Brasília. Ministério da Educação, Secretaria de Educação Básica, 2006.

MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H.N.; VINAGRE C.; DINIZ, M.S. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.166, p.237–243, 2013.

MAGNONI, L.J.; SCARLATO, N.A.; OJEDA, F.P.; WÖHLER, O.C. Gluconeogenic pathway does not display metabolic cold adaptation in liver of Antarctic notothenioid fish. **Polar Biology**, v.36, p.661-671, 2013.

MARAN, E.; FERNÁNDEZ, M.; BARBIERI, P.; FONT, G.; RUIZ, M.J. Effects of four carbamate compounds on antioxidante parameters. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p.922-930, 2009.

MARIANO, W.S.; OBA, E.T.; ASSIS, H.C.S. Biomarcadores de estresse oxidativo em peixes. In: Saran Neto, A.; Mariano, W.S.; Sória, S.F.P. (Org.) **Tópicos Especiais em Saúde e Produção Animal**. Embrapa. 2009.

MARK, F.C.; BOCK, C.; PÖRTNER, H.O. Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and ³¹P-MRS. **American Journal of Physiology**, v.283, p.1254-1262, 2002.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.106, n.3, p.201-212, 1977.

MCCORMICK, S.D.; MOYES, C.D.; BALLANTYNE, J.S. Influence of salinity on the energetics of gill and kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v.6, p.243-254, 1989.

MEREDITH, M.P.; KING, J.C. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. **Geophysical Research Letters**, v.32, p.1-5, 2005.

MITHIEUX, G.; M.; RAJAS, F.; GAUTIER-STEIN, A. A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.44231-44234, 2004.

MODESTO, K.A.; MARTINEZ, C.B.R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in musche and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v.78, p.294-299, 2010.

MOERLAND, T.S. Chapter 4: Temperature: Enzyme and organelle. In: Hochachka and Mommsen (eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v.5. Elsevier Science, 1995.

MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.9, p.211-268, 1999.

MORGUNOV, I.; SRERE, P.A. Interaction between Citrate Synthase and Malate Dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.29540-29544, 1998.

MUELLER, I.A.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K.M. (2011). Inter-relationship between mitochondrial function and susceptibility to oxidative stress in red- and white-blooded Antarctic notothenioid fishes. **The Journal of Experimental Biology**, v.214, p.3732-3741, 2011.

MUELLER, I.A.; DEVOR, D.P.; GRIM, J.M.; BEERS, J.M.; CROCKETT, E.L.; O'BRIEN, K.M. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative. **The Journal of Experimental Biology**, v.215, p.3655-3664, 2012.

MUSRATI, R.A.; KOLLÁROVA, M.; MERNIK, N.; MIKULÁSOVÁ, D. Malate dehydrogenase: Distribution, Function and Properties. **General Physiology and Biophysics**, v.17, p.193-210, 1998.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Lehninger **Princípios de Bioquímica**. 3ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2002.

NILSSON, G.; ÖSTLUND-NILSSON, S.; MUNDAY, P. Effects of elevated temperature on coral reef fishes: Loss of hypoxia tolerance and inability to acclimate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.156, p.389-393, 2010.

NORDLIE, R.C.; FOSTER, J.D. A retrospective review of the roles of multifunctional glucose-6-phosphatase in blood glucose homeostasis: Genesis of the tuning/retuning hypothesis. **Life Sciences**, v.87, p.339-349, 2010.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: Tavares-Dias, M. (Org.) **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Embrapa Amapá, Macapá, AP, 226-247, 2009.

O'BRIEN, K. M.; MUELLER, I. A. The unique mitochondrial form and function of Antarctic channichthyid icefishes. **Integrative and Comparative Biology**, v.50, p.993-1008, 2010.

O'GRADY, S.M.; DE VRIES, A.L. Osmotic and ionic regulation in polar fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.57, p.219-228, 1982.

PANKHURST, N.W. Review: The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, v.170, p.265-275, 2011.

PECK, L.S. Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. **Polar Biology**, v.25, 31-40, 2002.

PECK, L.S.; WEBB, K.E.; BAILEY, D.M. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. **Functional Ecology**, v.18, p.625-630, 2004.

PÉREZ, A.F.; CALVO, J.; TRESGUERRES, M.; LUQUET, C. Agglomerularism in *Harpagifer bispinis*: a subantarctic notothenioid fish living at reduced salinity. **Polar Biology**, v.26, n.12, p.800-805, 2003.

PETRICORENA, Z.L.C.; SOMERO, G.N. Biochemical adaptations of notothenioid fishes: Comparisons between cold temperate South American and New Zealand species and Antarctic species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.147, p.799–807, 2007.

PIERCE, D.W.; BARNETT, T.P.; ACHUTA RAO, K.M.; GLECKLER, P.J. Anthropogenic warming of the oceans: observations and model results. **Journal of Climate**, v.19, n.10, p.1873-1900, 2006.

PODRABSKY, J. E.; SOMERO, G. N. Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biology**, v.30, n.1, p.39-43, 2006.

PÖRTNER, H.O. Climate change and temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchies of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.132, p.739-761, 2002.

PÖRTNER, H.O., MARK, F.C., BOCK, C. Oxygen limited thermal tolerance in fish: Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v.141, p.243-260, 2004.

PÖRTNER, H.O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science**, v.315, p.95-97, 2007.

QIU, J. Climate Change. Winds of Change. **Science**, v.338, p.879-881, 2012.

RAGA, G. **Dieta e metabolismo de *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) na baía do Almirantado – Ilha Rei George – Península Antártica**. 2012. Dissertação. Universidade Federal do Paraná.

REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; GORBI, S. Antioxidant efficiency in early life stages of the Antarctic silverfish, *Pleuragramma antarcticum*: Responsiveness to pro-oxidant conditions of platelet ice and chemical exposure. **Aquatic Toxicology**, v.75, p.43-52, 2005.

REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.120, p.1-27, 1998.

ROBINSON, E. **Antarctic Fish: Thermal Specialists or Adaptable Generalists?** 2008. Tese (Doutorado em Zoologia). Universidade de Canterbury Christchurch, New Zealand.

ROBINSON, E.; DAVISON, W. Antarctic fish can survive prolonged exposure to elevated temperatures. **Journal of Fish Biology**, v.73, p.1676-1689, 2008.

ROMÃO, S.; FREIRE, C.A.; FANTA, E. Ionic regulation and Na, K-ATPase activity in gills and kidney of the aglomerular Antarctic fish *Notothenia neglecta* upon exposure to seawater dilution. **Journal of Fish Biology**, v.59, p.463-468, 2001.

RYAN, S.N. The effect of chronic heat stress on cortisol levels in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. **Experientia**, v.51, p.768-774, 1995.

SABOROWSKI, I.R.; 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.

SCHAFTINGEN, E.V.; GERIN, I. Review Article: The glucose-6-phosphatase system. **Biochemical Journal**, v.362, p.513-532, 2002.

SCHLENK, D.; DAVIS, K.B.; GRIFFIN, B.R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquaculture**, v.177, p.367-379, 1999.

SCHRECK, C.B. Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. **General and Comparative Endocrinology**, v.165, p.549-556, 2010.

SEEBACHER, F.; DAVISON, W.; LOWE, C.J.; FRANKLIN, C.E. A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. **Biology Letters**, v.1, p.151-154, 2005.

SICINSKI, J.; JAZDZEWSKI, K.; DE BROYER, C.; PRESLER, P.; LIGOWSKI, R.; NONATO, E.; CORBISIER, T.; PETTI, M.; BRITO, T.; LA AVRADO, H.; BLAZE WICZ-PASZKOWYCS, M.; PABIS, K.; JAZDZEWSKA, A.; CAMPOS, L. Admiralty Bay Benthos Diversity - A census of a complex polar ecosystem. **Deep-Sea Research II**, v.58, p.30-48, 2011.

SIGMA – Esquema das enzimas do estresse oxidativo. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/superoxide-dismutase.html>>. Acesso em março de 2013.

SILVEIRA, U.S.; LOGATO, P.V.R.; Pontes, E.C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n.4, p.1001-1017, 2009.

SKORA, K. E.; NEYELOV, A. V. Fish of Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica). **Polar Biology**, v.12, p.469-479, 1992.

SMITH, R.N. The freezing resistance of antarcti fish: I Serum composition and its relation to freezing resistance. **British Antarctic Survey Bulletin**, p.1-10, 1972.

SMITH, W.O.; AILEY, D.G.; CATTANEO-VIETTI, R. Trophic interactions within the Ross Sea continental shelf ecosystem. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.362, p.95-111, 2007.

SOENGAS, J.L.; FUENTES, J; ANDRES, M.D.; ALDEGUNDE, M. Direct transfer of rainbow trout to seawater induces several changes in kidney carbohydrate metabolism. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v.50, p.219-228, 1994.

SOKOLOVA, I.M.; FREDERICH, M.; BAGWE, R.; LANNIG, G.; SUKHOTIN, A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental

stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, v.79, p.1-15, 2012.

SOKOLOVA, I.M., PÖRTNER, H.O. Metabolic plasticity and critical temperatures for aerobic scope in a eurythermal marine invertebrate (*Littorina saxatilis*, Gastropoda: Littorinidae) from different latitudes. **Journal of Experimental Biology**, v.206, p.195-207, 2003.

SOMERO, G. N.; DE VRIES, A. L. Temperature tolerance of some antarctic fishes. **Science**, v.156, n.3772, p.257, 1967.

SOMERO, G. N. Proteins and Temperature. **Annual Review of Physiology**, v.57, p.43-68, 1995.

SOMERO, G. N. Adaptation of enzymes to temperature: searching for basic "strategies". **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v.139, n.3, p.321-333, 2004.

SOMERO, G.N. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine "winners" and "losers". **The Journal of Experimental Biology**, v.213, p.912-920, 2010.

SOMMER, A.M.; PÖRTNER, H.O. Metabolic cold adaptation in the lugworm *Arenicola marina*: comparison of a North Sea and a White Sea population. **Marine Ecology Progress Series**, v.240, p.171-182, 2002.

SPEERS-ROESCH, B.; BALLANTYNE, J.S. Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of Arctic and temperate teleosts. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.140, p.487- 494, 2005.

STEIG, E.J.; SCHNEIDER, D.P.; RUTHERFORD, S.D.; MANN, M.E.; COMISO, J. C.; SHINDELL, D.T. Warming of the Antarctic ice-sheet surface since the 1957. International Geophysical Year, **Nature**, 457, 459-462, 2009.

STROBEL, A.; BENNECKE, S.; LEO, E.; MINTENBECK, K.; PÖRTNER, H.O., MARK, F.C. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and PCO₂. **Frontiers in Zoology**, v.9, p.1-15, 2012.

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. Elevated temperature and PCO₂ shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 10p, 2013.

SUAREZ, R.K.; MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. **Canadian Journal of Zoology**, v.65, p.1869-1882, 1987.

TARGETT, T. E. Trophic ecology and structure of coastal antarctic fish communities. **Marine Ecology-Progress Series**, v.4, p.243-263, 1981.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; 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 United Kingdom**, v.85, n.3, p.603-611, 2005.

TORRES, J. J.; AARSET, A. V.; DONNELLY, J.; HOPKINS, T. L.; LANCRAFT, T. M.; AINLEY, D. Metabolism of Antarctic micronektonic crustacea as a function of depth of occurrence and season. **Marine Ecology-Progress Series**, v.113, p.207-219, 1994.

TORRES, J.; GRIGSBY, M.; CLARKE, E. Aerobic and anaerobic metabolism in oxygen minimum layer fishes: the role of alcohol dehydrogenase. **The Journal of Experimental Biology**, v.215, p.1905-1914, 2012.

TULLIS, A.; BAILLIE, M. The metabolic and biochemical responses of tropical whitespotted bamboo shark *Chiloscyllium plagiosum* to alterations in environmental temperature. **Journal of Fish Biology**, v.67, n.4, p.950-968, 2005.

TURNER, J.; COLWELL, S.R.; MARSHALL, G.J.; LACHLAN-COPE, T.A.; CARLETON, A.M.; JONES, P.D.; LAGUN, V.; REID, P.A.; IAGOVKINA, A, S. Antarctic climate change during the last 50 years. **International Journal of Climatology**, v.25, p.279-294, 2005.

TURNER, J.; OVERLAND, J.E.; WALSH, J.E. An Arctic and Antarctic perspective on recent climate change. **International Journal of Climatology**, v.27, p.277-293, 2007.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.64, p.178-189, 2006.

VAN DIJK, P. L. M.; TESCH, C.; HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O. Physiological disturbances at critically high temperatures: A comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). **Journal of Experimental Biology**, v.202, n.24, p.3611-3621, 1999.

VARGAS-CHACOFF, L.; ARJONA, F.J.; POLAKOF, S.; MARTÍN DEL RÍO, M.P.; SOENGAS, J.L.; MANCERA, J.M. Interactive effects of environmental salinity and temperature on metabolic responses of gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.154, p.417-424, 2009.

VAUGHAN, D.G. Implications of the break-up of Wordie Ice Shelf, Antarctic for sea level. **Antarctic Science**, v.5, p.403-408, 1993.

VERDE, C.; GIORDANO, D.; RUSSO, R.; RICCIO, A.; COPPOLA, D.; DI PRISCO, G. Evolutionary adaptations in antarctic fish: the oxygen-transport system. **Oecologia Australis**, v.15, n.1, p.40-50, 2011.

VIJAYAN, M.M.; BALLANTYNE, J.S.; LEATHERLAND, J.F. High stocking density alters the energy metabolism of brook charr, *Salvelinus fontinalis*. **Aquaculture**, v.88, p.371-381, 1990.

VOET, D.; VOET, J. **Bioquímica**. 3ªEd. Porto Alegre : Artmed. 1616p, 2006.

VOSLOO, D.; VOSLOO, A.; MORILLION, E.J.; SAMUELS, J.N.; SOMMER, P. Metabolic readjustment in juvenile South African abalone (*Haliotis midae*) acclimated to combinations of temperature and dissolved oxygen levels. **Journal of Thermal Biology**, v.38, p.458-466, 2013.

ZAKHARTSEV, M.; JOHANSEN, T.; PÖRTNER, H.O.; BLUST, R. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. **The Journal of Experimental Biology**, v.207, p.95-112, 2004.

WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B.A.; MCLEAY, D.K. Stress and acclimation. In C. B. Schreck and P. B. Moyle (eds.), **Methods for fish biology**, p.451-489. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 1990.

WENDELAAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v.77, p.591-625, 1997.

WILSON, R.S.; KUCHEL, L.J.; FRANKLIN, C.E.; DAVISON, W. Turning up the heat on subzero fish: thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. **Journal of Thermal Biology**, v.27, p.381-386, 2002.

WINDISCH, H.S.; KATHÖVER, R.; PÖRTNER, H.O., FRICKNHAUS, S., LUCASSEN, M. Thermal acclimation in antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v.301, p.1453-1466, 2011.

WITAS, H.; GABRYELAK, T.; MATKOVICS, B. Comparative studies on superoxide dismutase and catalase activities in livers of fish and other Antarctic vertebrates. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.2, p.409-411, 1984.

ANEXOS

Processamento enzimático:

I. GLICOSE-6-FOSFATASE (G6Pase – FATHI *et al.*, 2002)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 96 poços, pipetar 20 µl do sobrenadante da amostra em quadruplicata;
3. Pipetar 20 µl do sistema de reação em duplicata para cada amostra;
4. Pipetar 20 µl de H₂O_{mq} em duplicata para cada amostra;
5. Pipetar em triplicata 40 µl de tampão imidazol (branco);
6. Fazer a curva padrão de fosfato inorgânico (40 µl por poço);
7. Incubar por 60 min, 20°C, 750 rpm (no *thermo shaker* para microplacas);
8. Parar a reação com 200 µL da solução 2 - RVO Mgu (10 mL RVO MG + 100 µL Tween 20 1% v/v);
9. Incubar por 15 min, 20°C, 250 rpm (no *thermo shaker* para microplacas);
10. Medir a absorbância a 600 nm.

Sistema de reação

GLICOSE-6-FOSFATASE			
Sistema de Reação	Conc. cubeta	Conc. estoque	SR
Solução 1			
Tampão Imidazol pH 7,4	100 mM	400 mM	250 µL
EDTA	1,8 mM	20 mM	90 µL
Glicose-6-fosfato	26,5 mM	500 mM	53 µL
NaOH	70 mM	1 M	35 µL
H ₂ O _{desionizada}			572 µL
Solução 2			
RVO MG			10 ml
Tween 20			100 µL

Para solução 1:

1. Diluir 0,1213 g de EDTA (MM: 404,45 g.mol⁻¹) em 15ml de água desionizada.
2. Diluir 2 g de NaOH (MM: 40g.mol⁻¹) em 50 ml de água desionizada.

Para solução 2:

3. Solução 2A: Molibdato de amônia 4,2%

Pesar 4,2 g de molibdato de amônia e dissolver em 100 ml de ácido clorídrico 4 M.

4. Solução 2B: Verde de Malachita 0,045%

Pesar 135 mg de verde de malachita e dissolver em água desionizada para volume final de 300 ml.

5. Solução 2C: Tween 20 diluído 1:100

Pipetar 100 µl de Tween 20 + 9,9 ml de água desionizada.

6. Solução de Rvo MG: Misturar 300 ml da solução B com 100 ml da solução A. Agitar por 30 minutos e filtrar. Estável por 6 meses.

II. CITRATO SINTASE (CS – SABOROWSKI E BUCHHOLZ, 2002)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 384 poços, pipetar 5 µl do sobrenadante da amostra em triplicata;
3. Pipetar 5 µl de tampão Tris-HCl 200 mM, em triplicata (branco);
4. Pipetar 70 µl do sistema de reação com micropipeta multicanal, aguardar por 5 min;
5. Adicionar 5 µl da solução de oxaloacetato para iniciar a reação;
6. Medir imediatamente a absorbância a 412 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos.

Sistema de reação

CITRATO SINTASE			
Sistema de Reação	Conc. cubeta	Conc. estoque	SR
Solução 1			
Tampão Tris-HCl pH 7,4	50 mM	200 mM	250 µL
KCl	100 mM	2 mM	50 µL
EDTA	1,0 mM	10 mM	100 µL
DTNB (em Tris)	200 µM	3 mM	67 µL
Acetil-SCoA (H ₂ O desionizada)	200 µM	6 mM	33 µL
H ₂ O desionizada			375 µL
Solução 2			
Oxaloacetato (Start)	500 µM	8 mM	5 µL

Para a solução 1:

1. Pesar 1,4912 g de KCl (MM: 74,56 g.mol⁻¹), diluir em 10 ml de água desionizada.
2. Diluir 5 ml de EDTA 20 mM em 5 ml de água desionizada.
3. Pesar 10 mg de DTNB (MM: 396,3 g. mol⁻¹), diluir em 8,46 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e acrescentar 60 µl de NaOH 1M.

Para a solução 2:

4. Pesar 10 mg de oxaloacetato (MM: 132,07 g.mol⁻¹), diluir em 9,328 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e acrescentar 172 µl de NaOH 1M, para pH 7,4.

III. MALATO DESIDROGENASE (MDH – CHILDRESS E SOMERO, 1979)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 384 poços, pipetar 10 µl do sobrenadante da amostra em triplicata;
3. Pipetar 10 µl de tampão Tris-HCl 200 mM, em triplicata (branco);
4. Pipetar 70 µl do sistema de reação com micropipeta multicanal;
6. Medir imediatamente a absorbância a 340 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos.

Sistema de reação

MALATO DESIDROGENASE			
Sistema de Reação	Conc. cubeta	Conc. estoque	SR
Tampão Tris-HCl pH 7,4	50 mM	200 mM	250 µL
Oxaloacetato	0,4 mM	8 mM	50 µL
MgCl ₂	20 mM	100 mM	200 µL
NADH	150 µM	14,1 mM	11 µL
H ₂ O desionizada			364 µL

1. Pesar 10 mg de oxaloacetato (MM: 132,07 g.mol⁻¹), diluir em 9,328 ml de Tris-HCl 50 mM pH 7,4 e acrescentar 172 µl de NaOH 1M, para pH 7,4.
2. Pesar 0,2033 g de MgCl₂ (MM: 203,3 g.mol⁻¹), diluir em 10 ml de água desionizada.
3. Pesar 10 mg de NADH (MM: 709,4 g.mol⁻¹), diluir em 1 ml de água desionizada.

IV. LACTATO DESIDROGENASE (LDH – THUESEN *et al.*, 2005)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 384 poços, pipetar 10 µl do sobrenadante da amostra em triplicata;
3. Pipetar 10 µl de tampão Tris-HCl 200 mM, em triplicata (branco);
4. Pipetar 70 µl do sistema de reação com micropipeta multicanal;
6. Medir imediatamente a absorbância a 340 nm, por 8 minutos em intervalos de 21 segundos.

Sistema de reação

LACTATO DESIDROGENASE			
Sistema de Reação	Conc. cubeta	Conc. estoque	SR
Tampão Tris-HCl pH 7,4	50 mM	200 mM	250 µL
Piruvato de sódio	1,0 mM	10 mM	100 µL
KCl	100 mM	2 M	50 µL
NADH	0,25 mM	14,1 mM	18 µL
H ₂ O desionizada			457 µL

1. Pesar 0,0055 g de piruvato de sódio (MM: 110,04 g.mol⁻¹), diluir em 5 ml de água desionizada.
2. Pesar 1,4912 g de KCl (MM: 74,56 g.mol⁻¹), diluir em 10 ml de água desionizada.
3. Pesar 10 mg de NADH (MM: 709,4 g.mol⁻¹), diluir em 1 ml de água desionizada.

V. SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD - CROUCH *et al.*, 1981)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Aliquotar 300 μ l da amostra, adicionar 100 μ l de etanol, centrifugar a 12 000g (4°C) por 10 minutos;
3. Em microplaca de 96 poços, pipetar 30 μ l do sobrenadante da amostra em triplicata;
4. Pipetar 30 μ l de etanol 25% em tampão Tris-HCl 200 mM, em triplicata (branco);
5. Pipetar 70 μ l da solução de NBT com micropipeta multicanal;
6. Pipetar 100 μ l da solução de hidroxilamina para iniciar a reação
7. Medir imediatamente a absorbância a 560 nm, no tempo zero e pelas 4 horas seguintes, em intervalos de 1 hora. Manter a microplaca no escuro em temperatura ambiente.

Sistema de reação

SUPERÓXIDO DISMUTASE			
Sistema de Reação	Conc. cubeta	Conc. estoque	SR
EDTA	0,05 mM	1 mM	-
H ₂ O desionizada			-
NBT	100 μ M	-	-
Solução 1			70 μ l
Tampão carbonato de sódio pH 10,2		182 mM	-
Cloreto de hidroxilamina	36,85 mM		-
Solução 2			100 μ l

1. Solução 1: Pesar 0,0037 g de EDTA sal dissódico (MM: 372,24 g.mol⁻¹), dissolver em 10 ml de água desionizada. Pesar 0,0018 g de NBT (MM: 817,64 g.mol⁻¹). Diluir 375 μ l da solução de EDTA a 1 mM em 7,125 ml de água desionizada. Misturar com o NBT.
2. Solução 2: Pesar 0,0615 g de cloreto de hidroxilamina (MM: 69,49 g.mol⁻¹) e dissolver em 12 ml de tampão carbonato de sódio a 182 mM, pH 10,2

VI. CATALASE (CAT – AEBI, *et al.*, 1984)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em cubeta de quartzo; pipetar 10 μ l do sobrenadante da amostra;
3. Adicionar 990 μ l do sistema de reação;
4. Misturar por inversão;
5. Medir imediatamente a absorbância a 240 nm, por 60 segundos em intervalos de 21 segundos.

Sistema de reação para 50 testes

2,5 ml de Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0

47,32 ml de água desionizada

180 μ l de H₂O₂ (MM = 34 g.mol⁻¹; concentração final no ensaio = 30 mM)

VII. GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST – KEEN *et al.*, 1976 com modificações)

Procedimento

1. Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml;
2. Em microplaca de 96 poços, pipetar 20 μ l do sobrenadante da amostra em triplicata;
3. Pipetar 20 μ l de tampão fosfato de potássio, em triplicata (branco);
4. Pipetar 180 μ l do sistema de reação (mantido a 25°C) com pipeta multicanal;
5. Medir imediatamente a absorbância a 340 nm, por 5 minutos em intervalos de 30 segundos.

Sistema de reação

1. Pesar 0,0093 g de GSH (MM: 307,32 g.mol⁻¹).
2. Pesar 0,0122 g de CDNB (MM: 74,56 g.mol⁻¹), diluir em 1 ml de água etanol PA
3. Diluir em 19 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5.

VIII. TBARS (Federici *et al.*, 2007, com modificações)

Procedimento

1. Em microplaca de 96 poços, pipetar 10 μl de BHT, com micropipeta multicanal;
2. Pipetar 140 μl de tampão PBS;
3. Pipetar 40 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{mq}}$, em triplicata (branco);
4. Pipetar 40 μl de padrão MDA em triplicata (curva padrão);
5. Pipetar 40 μl do sobrenadante da amostra;
6. Pipetar 50 μl de TCA 50%, com micropipeta multicanal;
7. Pipetar 75 μl de TBA 1,3% em NaOH 0,3% com micropipeta multicanal;
8. Incubar a microplaca (no *thermo shaker* para microplacas) por 1 hora a 60°C, 250 rpm;
9. Resfriar a placa para temperatura ambiente;
10. Medir a absorbância a 535 nm.

Sistema de reação

1. Pesar 0,0022 g de BHT (MM: 220,35 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), diluir em 10 ml de etanol 95%.
2. Pesar 0,03 g de NaOH e dissolver em 10 ml de água desionizada (NaOH 0,3%).
3. Pesar 0,13 g de TBA (MM: 144,14 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e diluir em 10 ml de NaOH 0,3%.
4. Pesar 50 g de TCA (MM: 163,4 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) e diluir em 100 ml de água desionizada.