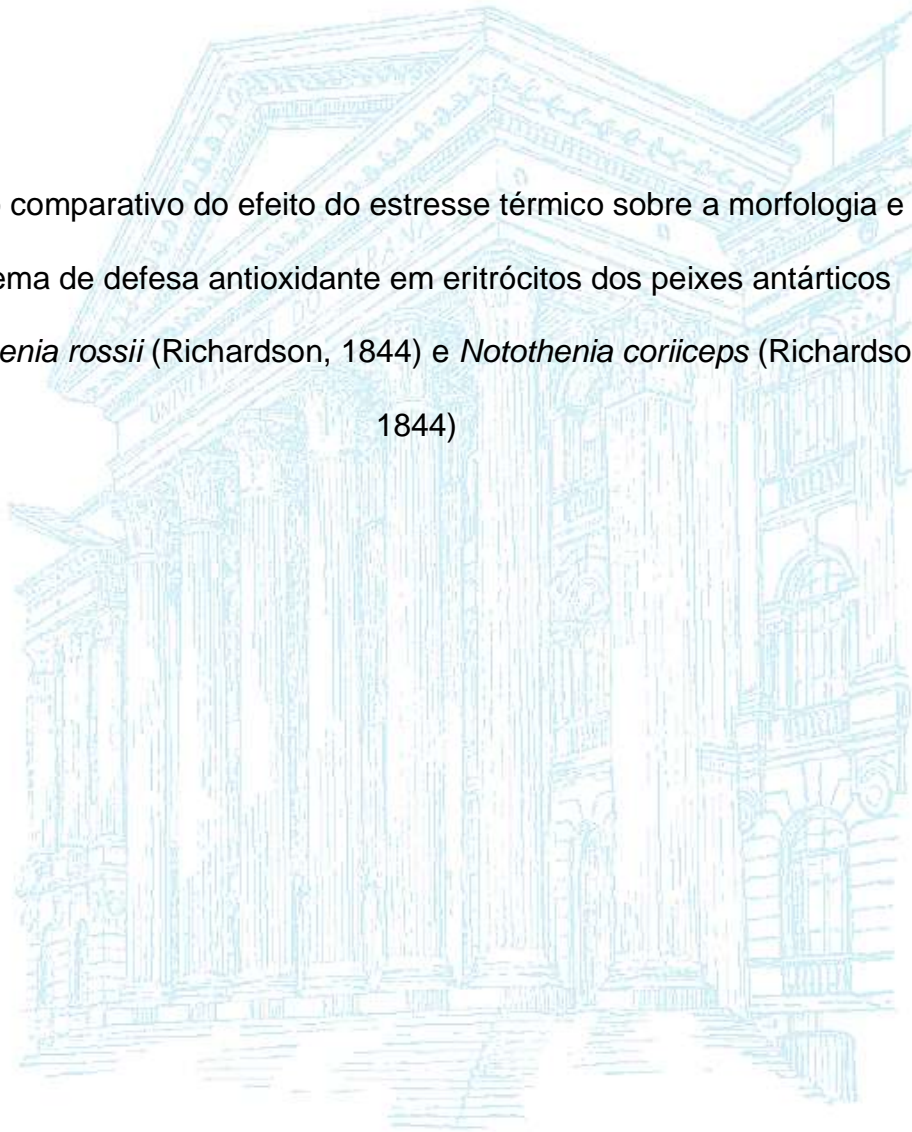


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA ROSA DMENGEON PEDREIRO

Estudo comparativo do efeito do estresse térmico sobre a morfologia e o sistema de defesa antioxidante em eritrócitos dos peixes antárticos *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) e *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844)



CURITIBA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Estudo comparativo do efeito do estresse térmico sobre a morfologia e o sistema de defesa antioxidante em eritrócitos dos peixes antárticos : *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) e *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Dr^a Lucélia Donatti

CURITIBA
2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Pedreiro, Maria Rosa Dmengeon

Estudo comparativo do efeito do estresse térmico sobre a morfologia e o sistema de defesa antioxidante em eritrócitos dos peixes antárticos *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) e *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844). / Maria Rosa Dmengeon Pedreiro. – Curitiba, 2014.
96 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. Eritrócitos 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

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

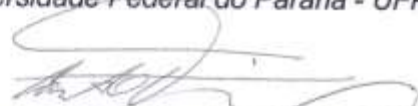
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



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



Profa. Dra. Marisa Fernandes de Castilho
Universidade Federal do Paraná - UFPR



Profa. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire
Universidade Federal do Paraná - UFPR

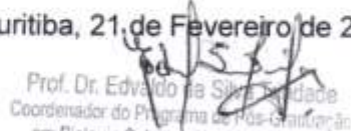
Suplente:

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

Após arguir a mestrandia **Maria Rosa Dmengen Pedreiro**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Estudo comparativo do efeito do estresse térmico sobre a morfologia e o sistema de defesa antioxidante em eritrócitos dos peixes antárticos *Notothenia rossii* (Richardson, 1844) e *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844)", são de parecer favorável à ~~aprovação~~ 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, 21 de Fevereiro de 2014



Prof. Dr. Edvaldo da Silva
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente a Deus, pois me possibilitou chegar até aqui.

Aos meus pais Américo e Terezinha que sempre acreditaram que o estudo é o único caminho para o crescimento e a independência pessoal.

Ao meu amado Adriano que com todo o seu apoio, carinho e paciência, me faz crer que eu seria capaz de enfrentar todos os obstáculos.

Nada eu teria conseguido sem o amor de vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus, pelo dom de minha vida, e por minha profissão pela qual sou apaixonada.

Aos meus pais, Américo e Terezinha, pois nunca mediram esforços para me apoiar, e sempre me ajudaram e me encorajaram a enfrentar as dificuldades.

Ao meu noivo Adriano, que esteve sempre ao meu lado, por me ajudar sempre a ver o lado bom das coisas, mesmo nos momentos mais difíceis. Sem seu amor e carinho eu não teria conseguido.

Aos meus irmãos Filipe, Fernanda e Camila, que com sua amizade me dão a certeza de que nunca estarei só.

À Lucélia Donatti, pela orientação, amizade e pelos conselhos valiosos. Devo muito a você!

Ao Sr. Nino e aos técnicos Alessandra e Israel pela ajuda com o material de microscopia.

Às amigas do laboratório de Biologia Adaptativa. À Alana pelo incentivo de que mesmo nos momentos difíceis, tudo se resolverá, à Cintia, pela paciência ao me ensinar as técnicas utilizadas, à Mariana por ser sempre tão prestativa, à Pri pelas inúmeras aventuras, à Tânia pela ajuda com a estatística, e que ajuda! A TODAS pela amizade e por todos os bons momentos! Tenho vocês em meu coração!

Às agências de fomento, CAPES, CNPq, FAPERJ, INCT-APA, sem as quais não seria possível todo o deslocamento logístico necessários neste trabalho.

À marinha do Brasil, por apoio na Expedição Antártica XXIX, na qual os bioensaios deste trabalho foram desenvolvidos.

RESUMO

Peixes antárticos são espécies adaptadas ao frio, consideradas estenotérmicas, sendo seu metabolismo eficiente em baixas temperaturas. Estudos recentes sobre alterações climáticas relatam que a Península Antártica apresenta aquecimento acelerado, é extremamente importante entender a plasticidade metabólica e os mecanismos bioquímicos envolvidos na aclimação a altas temperaturas de peixes antárticos para a conservação destas espécies e do ecossistema Antártico. O presente trabalho teve o objetivo de analisar o efeito do estresse térmico sobre a morfologia e o sistema de defesa antioxidante em eritrócitos de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*, expostos durante 1, 3 e 6 dias a $8\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ e a $0\pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Variações morfológicas nos eritrócitos e nos níveis de atividade de alguns constituintes enzimáticos como a glutathiona peroxidase (GPx); superóxido dismutase (SOD); glutathiona S-transferase (GST); catalase (CAT); glutathiona redutase (GR) e quantificação do constituinte não enzimático, glutathiona reduzida (GSH) e lipoperoxidação lipídica (LPO), por dosagem de malonaldeído (MDA) foram analisados. Em *N. coriiceps* o aumento da temperatura a 8°C não modulou os níveis de SOD e GPx. Mas modulou negativamente os níveis de CAT em 1 (87% menor em 8°C quando comparado a 0°C) e 3 dias (90% menor em 8°C quando comparado a 0°C). A GST foi modulada positivamente em 3 dias (57,9% maior em 8°C quando comparado a 0°C) e negativamente em 6 dias (81,9% menor em 8°C quando comparados a 0°C). A GR foi modulada positivamente em 1 dia (69,9% maior em 8°C quando comparado a 0°C) e 3 dias (81% maior em 8°C quando comparado a 0°C). Em *Notothenia rossii* o aumento da temperatura não modulou os níveis de GPx e GR. Mas, a SOD foi modulada positivamente em 6 dias (68% maiores em 8°C quando comparados a 0°C) e a CAT foi modulada positivamente em 3 dias (97% maiores em 8°C quando comparados a 0°C) e negativamente em 6 dias (86% menores em 8°C quando comparados a 0°C). A GST também foi modulada negativamente em 6 dias (81,9% menor em 8°C quando comparados a 0°C). Os níveis de GSH não foram modulados pela temperatura em ambas as espécies. O níveis de MDA foram modulado negativamente em 3 dias a 8°C em ambas as espécies e houve modulação positiva em 1 dia para *N. coriiceps* pelo aumento da temperatura. Análises morfológicas dos eritrócitos indicaram que em *N. coriiceps* o aquecimento a 8°C determinou o aumento da frequência de alterações no formato celular, presença de vesículas na membrana plasmática, núcleo em *Blebbbed* e fissura nuclear. Em *N. rossii* o estresse térmico influenciou o aumento da frequência de alterações no formato celular e a presença de núcleos em *Blebbbed*. A proporção de eritrócitos maduros e imaturos, a frequência de micronúcleo, o deslocamento celular, volume celular e nuclear não foram influenciados pelo estresse térmico em ambas as espécies. Foi possível concluir que, nos nototenideos antárticos, *N. rossii* e *N.*

coriiceps, espécies filogeneticamente muito próximas, os padrões de resposta frente ao aumento da temperatura ambiental foram diferentes.

Palavras-chaves: eritrócitos, temperatura, estresse oxidativo, anormalidades celulares.

ABSTRACT

Antarctic fish are cold-adapted species, considered stenothermal; the metabolism of these fishes is very efficient at low temperatures. Recent studies about climatic changes report accelerated warming in the Antarctic Peninsula. For the conservation of Antarctic ecosystem and species is extremely important to understand the metabolic plasticity and biochemical mechanisms involved in high temperatures acclimation of Antarctic fishes. This study aimed to verify the effect of heat stress on the morphology and the antioxidant defense system in erythrocytes of *Notothernia coriiceps* and *Notothernia rossii*, exposed for 1, 3 and 6 days to 8 ± 0.5 ° C and 0 ° C. Morphological changes in erythrocytes and activity levels of some enzymatic constituents like glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), glutathione S - transferase (GST), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and quantification of non-enzymatic constituent, reduced glutathione (GSH) and lipid peroxidation (LPO), by measurement of malondialdehyde (MDA) were analyzed. The temperature increase to 8°C in *N. coriiceps* do not modulated levels of SOD and GPx, although, negatively modulates the levels of CAT 1 (87 % less than 8 ° C as compared to 0 ° C) and 3 days (90 % less than 8 ° C as compared to 0 ° C). GST was positively modulated in 3 days (57.9% 8 ° C higher in comparison to 0 ° C) and negatively within 6 days (81.9 % less than 8 ° C as compared to 0 ° C). The GR was positively modulated at 1 day (69.9% 8 ° C higher in comparison to 0 ° C) and 3 days (81 % increase at 8 ° C as compared to 0 ° C). The temperature increase in *N. rossii* do not modulate GPx levels of GR . However, SOD was positively modulated in 6 days (68 % higher when compared to 8C 0 ° C) and CAT was positively modulated in 3 days (97% at 8 ° C higher in comparison to 0 ° C) and negatively 6 days (86 % lower at 8 ° C as compared to 0 ° C). GST was also negatively modulated in 6 days (81.9 % less than 8 ° C as compared to 0 ° C). Morphological analysis of erythrocytes indicated that in *N. coriiceps* heating at 8 ° C determined the increase frequency of changes in cell format, presence of vesicles in plasma membrane and Blebbed nucleus. Heat stress at 6 days in *N. rossii* influenced an increase frequency of changes in cell shape and presence of Blebbed nucleus. The proportion of mature and immature erythrocytes, frequency of micronucleus and cell displacement, cell and nuclear volume were not affected by heat stress in both species. In conclusion, *N. rossii* and *N. coriiceps*, phylogenetically close Antarctic nototenideos, have different patterns of response due to increased environmental temperature.

Keywords: erythrocytes, temperature, oxidative stress, cellular abnormalities.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1- Continente Antártico e Oceano Austral..... | 15 |
| Figura 2: Espécies estudadas..... | 18 |
| Figura 3: Local de estudo..... | 20 |
| Figura 4: Geração de espécies reativas de oxigênio e danos celulares..... | 23 |
| Figura 5: Representação esquemática dos sistemas de defesa antioxidantes..... | 24 |
| Figura 6: Locais de coleta na Baía do Almirantado – Ilha Rei George..... | 27 |
| Figura 7: Coleta dos exemplares de <i>N. coriiceps</i> e <i>N. rossii</i> | 28 |
| Figura 8: Módulo de aquário da Estação Antártica Comandante Ferraz..... | 28 |
| Figura 9: Desenho esquemático do protocolo experimental..... | 29 |
| Figura 10: Coleta de sangue..... | 30 |
| Figura 11: Níveis de Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT)..... | 37 |
| Figura 12: Níveis de Atividade da glutathione S-transferase (GST), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx)..... | 39 |
| Figura 13: Concentração de Glutathione reduzida (GSH) e (MDA)..... | 41 |
| Figura 14: Morfologia de eritrócitos maduros e alterações morfológicas observadas em <i>N. coriiceps</i> e <i>N. rossii</i> em microscopia de luz..... | 46 |
| Figura 15: Alterações morfológicas em eritrócitos de <i>N. coriiceps</i> e <i>N. rossii</i> observadas em microscopia de luz..... | 47 |
| Figura 16: Alterações morfológicas em eritrócitos de <i>N. coriiceps</i> e <i>N. rossii</i> observadas em microscopia eletrônica de varredura..... | 48 |
| Figura 17: Alterações morfológicas em eritrócitos de <i>N. coriiceps</i> e <i>N. rossii</i> observadas em microscopia eletrônica de transmissão..... | 49 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Efeito da temperatura na atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos de <i>Notothenia coriiceps</i> | 42 |
| Tabela 2: Efeito da temperatura na atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos de <i>Notothenia rossii</i> | 42 |
| Tabela 3: Efeito da temperatura nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e malonaldeído (MDA). | 43 |
| Tabela 4: Alterações morfológicas nos eritrócitos de <i>Notothenia coriiceps</i> , submetidos às temperaturas de 0° e 8°C por 1,3 e 6 dias. | 50 |
| Tabela 5: Alterações morfológicas de eritrócitos de <i>Notothenia rossii</i> , submetidos às temperaturas de 0° e 8°C por 1, 3 e 6 dias. | 51 |
| Tabela 6: Maior eixo, menor eixo e volume celular e nuclear de eritrócitos de <i>Notothenia coriiceps</i> , submetidos às temperaturas de 0° e 8°C por 1,3 e 6 dias. | 52 |
| Tabela 7: Maior eixo, menor eixo e volume celular e nuclear de eritrócitos de <i>Notothenia rossii</i> , submetidos às temperaturas de 0° e 8°C por 1,3 e 6 dias. | 53 |

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS

AFGPs – Glicoproteínas anticongelantes (do inglês AntiFreeze GlicoProteins)

AR – Glaciar Ecology

BSA – Albumina bovina

CAT – Catalase(s)

CDNB – (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno)

CME-UFPR – Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná

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

DTNB - Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico

EACF – Estação Antártica Comandante Ferraz

EBN – Eritrócito(s) com bolha(s) nucleare(s)

EDN – Eritrócito(s) com deslocamento nuclear

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

EFC – Eritrócito(s) com alteração de formato celular

EFN – Eritrócito(s) com fissura nuclear

EI – Eritrócito imaturo

EM – Eritrócito maduro

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

EVM – Eritrócito(s) com formação de vesículas na membrana celular

E μ - Eritrócito com micronúcleo

GPx – Glutathione Peroxidase

GR – Glutathione Redutase

GSH – Glutathione Reduzida

GSSG – Glutathione dissulfeto (glutathione oxidada)

GST – Glutathione S-transferase(s)

H₂ O₂ – Peróxido de hidrogênio

LPO – Peroxidação lipídica (do inglês lipid peroxidation)

MET – Microscopia eletrônica de varredura

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MO – Microscopia de Luz

MDA – Malondialdeído

Mg – Miligramas

NADH –Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (do inglês Reduced nicotinamide adenine dinucleotide)

NBT – Azul de nitrotetrazólio

O_2^- - Radical ânion superóxido

OH – Radical hidroxila

SOD – Superóxido dismutase(s)

PP- Punta Plaza

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

TCA - Ácido tricloroacético

U – Unidade Internacional de Enzimas

μ M – Micrómetro

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| 1..... | INTRODUÇÃO |
| | 15 |
| 2- OBJETIVOS | 26 |
| 2. 1 - Objetivo Geral | 26 |
| 2. 2 - Objetivos específicos | 26 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 3.1 Coletas..... | 27 |
| 3. 3 Procedimentos Analíticos..... | 31 |
| 3.3.1 Determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo | 31 |
| 3.3.2 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida..... | 33 |
| 3.3.3 Determinação do índice da Peroxidação Lipídica (LPO) | 33 |
| 3.3.4 Análises morfológicas | 33 |
| 3.4 Análises estatísticas..... | 35 |
| 4. RESULTADOS | 36 |
| 4.1 Atividade das enzimas antioxidantes..... | 36 |
| 4.2 Determinação de GSH e LPO | 40 |
| 4.3 Alterações Morfológicas | 43 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 54 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 66 |
| ANEXOS: | 88 |

1. INTRODUÇÃO

O ambiente marinho antártico, representado pelo Oceano Austral ou Oceano Antártico (SIDELL, 2000), ocupa aproximadamente 35 milhões de Km² e apresenta uma variedade de características físicas e flutuações sazonais relativas à sua posição geográfica (CLARK, 1983; EASTMAN, 1993). É constituído pela porção sul dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, com 3.000 a 5.000 metros de profundidade (EKAU, 1991) (Figura 1). Possui como característica um sistema circumpolar de correntes e frentes hidrográficas, incluindo a Convergência Antártica, uma das maiores e mais velozes correntes marítimas, que isola e separa o Oceano Austral dos oceanos que o formam e afeta diretamente as condições locais de clima (DI PRISCO *et al.*, 1991; FELICIO, 2007).

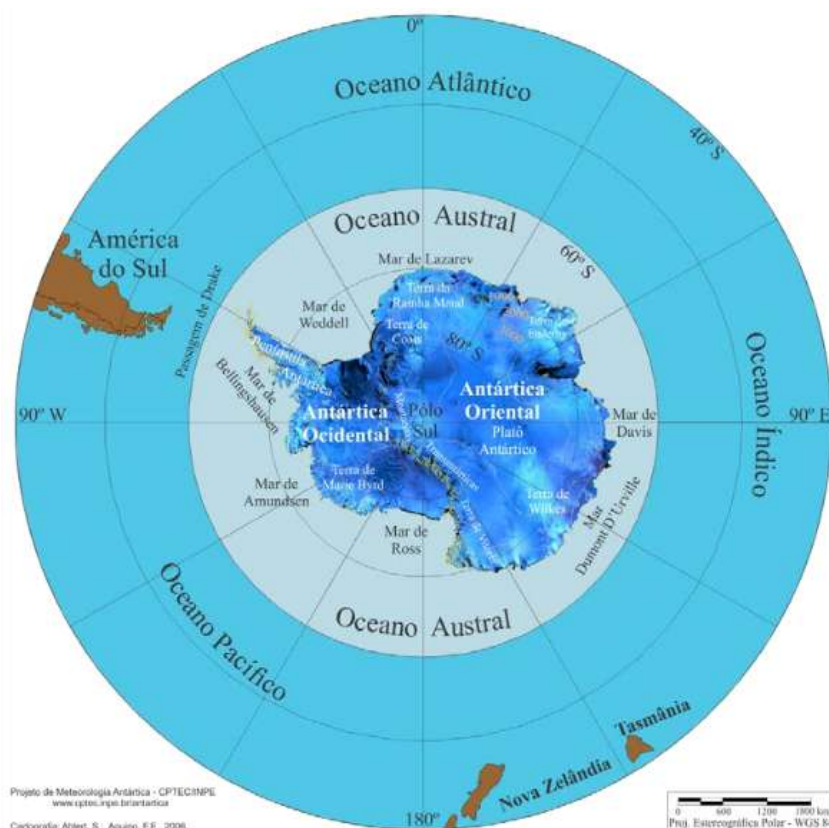


Figura 1- Continente Antártico e Oceano Austral. Fonte: Modificado de Ahlert; Aquino, 2009.

O estabelecimento da Convergência Antártica tornou o ambiente antártico isolado climática e biologicamente (JOHNSTON *et al.*, 1991), assim os animais que vivem nesta região sofreram pressões adaptativas, que selecionaram características singulares para a vida (KAWALL e SOMERO 1996; KAWALL, 1998; SOMERO *et al.* 1998; SOMERO, 2004) em um ambiente extremamente frio e estável (SIDEELL, 2000). A temperatura da água do mar permanece estável em torno de $-1,9^{\circ}\text{C}$ nas regiões nordeste e em áreas próximas à Península e ilhas pode variar de $+1,5^{\circ}\text{C}$ (no verão) a $-1,8^{\circ}\text{C}$ (no inverno) (SIDEELL, 2000). O regime de luz na Antártica é bem característico de regiões polares. No inverno há longos períodos sem luz enquanto que no verão a luz é praticamente constante. Já, na primavera e no outono as condições são intermediárias (RIVKIN e PUTT, 1987).

A ictiofauna antártica concentra apenas 1,9% das espécies de peixes, exclusivamente marinhos, do planeta, algo em torno de 322 espécies distribuídas em 50 famílias (EASTMAN, 2005). A Subordem Notothenoidei, da ordem Perciformes, predominante na região, está representada por 8 famílias, 44 gêneros e 129 espécies, destas, 101 são exclusivamente antárticas, sendo a família Notothenidae a mais abundante (EASTMAN, 2005). Estudos sugerem que esse grupo é monofilético, surgindo de um “vácuo ecológico”, e que a fauna anterior teria sido totalmente extinta (EASTMAN, 1993). A grande maioria das espécies da família Notothenidae é sedentária demersal, mas algumas espécies teriam se adaptado a viver no ambiente pelágico, e outras associadas ao gelo na superfície (EASTMAN, 1989; EKAU, 1991).

As espécies analisadas neste trabalho, *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii*, pertencem a família Notothenidae. Ambas as espécies são endêmicas e representam duas das quatro espécies mais abundantes na Baía do Almirantado (CASAUX *et al.*, 1990; BARNES *et al.*, 2006), sendo encontradas normalmente em profundidades em torno de 200 metros (FISHBASE, 2013), nas regiões Antárticas e Subantárticas, assim como nas águas costeiras da Nova Zelândia e América do Sul (EASTMAN, 1993).

A coloração do corpo de adultos de *N. coriiceps* aproxima-se do marrom escuro e pode apresentar manchas marrom claras, pretas ou esverdeadas enquanto que o abdome pode variar de amarelo claro a amarelo-esverdeado,

dependendo da idade (FISHER e HUREAU, 1985). O corpo é largo com cabeça grande levemente deprimida (Figura 2A). A espécie é caracterizada como onívora, e sua dieta pode variar de acordo com disponibilidade de alimento (CASAUX *et al.*, 2003) e com a profundidade (KNOX, 1994). A ingestão consiste de animais bentônicos como anfípodos, gastrópodes e bivalves (principalmente em profundidades de até 20 metros) (KNOX, 1994), e animais pelágicos como pequenos peixes e *krill* antártico (principalmente em profundidades superiores a 170 metros) (PERMITIN e TARDIYERA, 1978; KNOX, 1994).

A coloração do corpo de *N. rossii* pode variar de acordo com a idade. Os juvenis podem variar de amarelo a marrom ou laranja, e os adultos marrom clara com o dorso mais escuro apresentando pontos negros ao longo do corpo. A cabeça e o corpo são levemente comprimidos com a boca disposta de forma oblíqua (FISHER e HUREAU, 1985) (Figura 2B). A dieta de *N. rossii* é classificada como ontogenética, são classificados como carnívoros e a ingestão pode ser de anfípodos, gastrópodes, decápodes, organismos bentônicos e *krill* antártico (HUREAU, 1970; TARVERDIYEVA, 1972; KNOX, 1994).

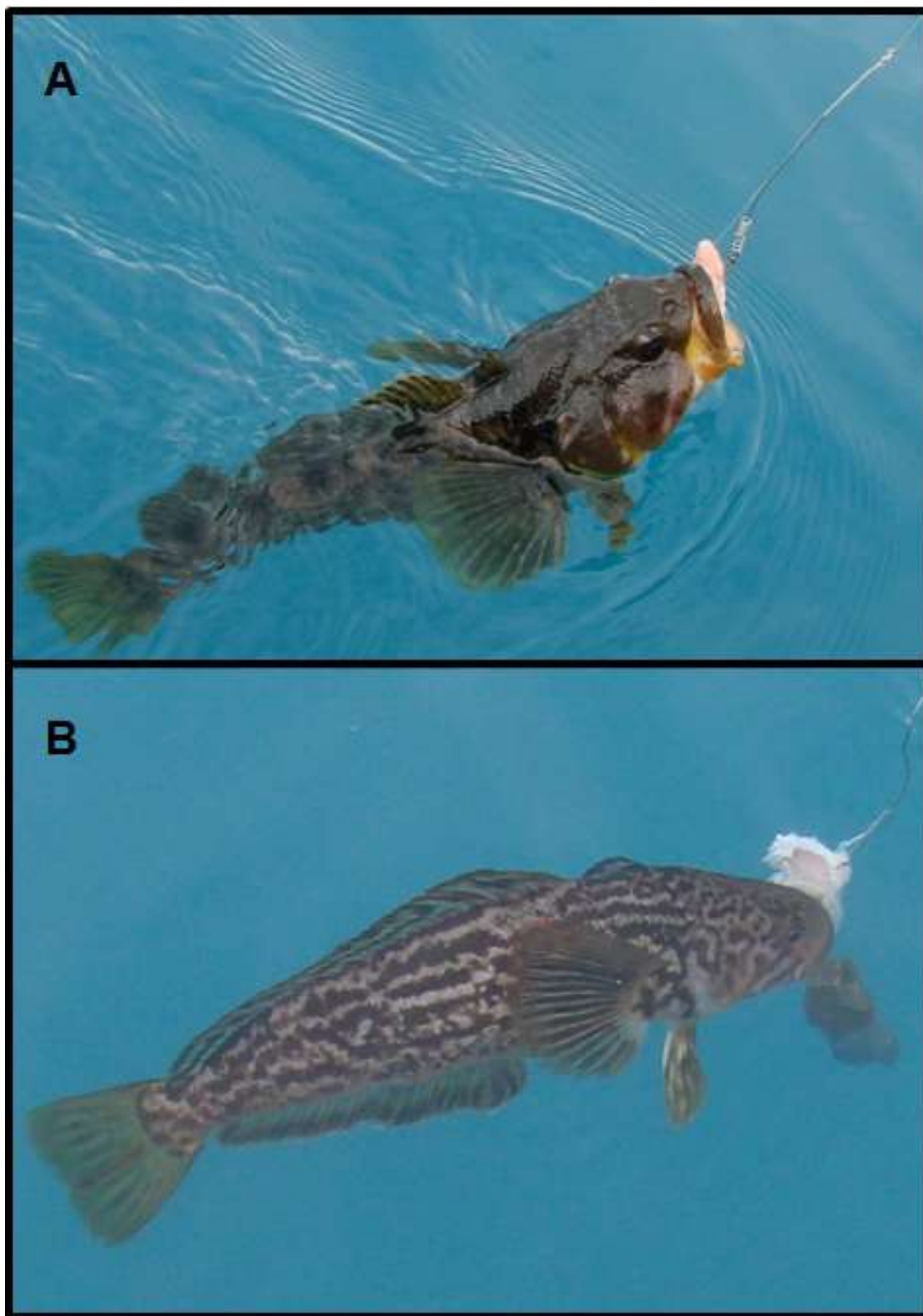


Figura 2: Espécies estudadas. Indivíduo adulto de *Notothenia coriiceps* (A). Indivíduo adulto de *Notothenia rossii* (B). Fonte: Beatriz Bouchinhas.

As baixas temperaturas dos mares antárticos não foram o único fator seletivo e determinante da biodiversidade, mas o confinamento ecológico e a oscilação sazonal do suprimento alimentar também são apontados como fatores importantes para explicar a baixa diversidade de peixes antárticos (EASTMAN, 1993). Outro aspecto importante reside na estabilidade térmica do meio, em especial das zonas de gelo marinho permanente, a qual pode ter sido de extrema importância para o processo de seleção e adaptação molecular dos organismos antárticos (EASTMAN, 1991; HUBOLD, 1991; MONTGOMERY e CLEMENTS, 2000).

Entre as adaptações conhecidas, os peixes antárticos possuem um comportamento conhecido como adaptação metabólica ao frio (JOHNSTON *et al.*, 1991), isto é, apresentam metabolismo relativamente baixo, mas as taxas metabólicas são mais altas do que o esperado caso fosse feita uma projeção do metabolismo de peixes temperados em temperaturas próximas a 0°C (JOHNSTON *et al.*, 1991). Estudos indicam que algumas enzimas de peixes antárticos são mais ativas em temperaturas baixas quando comparadas às enzimas de peixes de águas mais quentes (MACDONALD *et al.*, 1987). Outro exemplo da influência das baixas temperaturas foi o surgimento, no sangue dos nototenídeos antárticos, de proteínas anticongelantes (AFGPs- *AntiFreeze GlicoProteins*) (CHEN *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 2003; HARDING *et al.*, 2003; JIN e DEVRIES, 2006; CHENG e DETRICH, 2007; CULLINS *et al.*, 2011) e a escassez de hemoglobina, sendo que em algumas espécies ela não é expressa (DI PRISCO *et al.*, 2007). JIN e DEVRIES (2006) aclimataram o nototenídeo antártico, *Pagothenia borchgrevinki*, coletados na região de McMurdo, à temperatura de 4°C durante 4 a 16 semanas. Foi observado que após 16 semanas os níveis de AFGP no plasma diminuíram 60% na concentração de pequenas AFGP e 20% na concentração de grandes AFGP.

Nos últimos 60 anos a temperatura da água do Oceano Austral aumentou cerca de 0.2°C em profundidades entre 700 a 1100 metros (entre 35 e 65°S), e recentemente este aumento está sendo registrado em águas superficiais (RENEWICK, 2002; TURNER *et al.*, 2005). A água dos lagos da região está aquecendo mais rapidamente do que o ar, em consequência da diminuição da camada de gelo (KING, 1994; KING e HARANGOZO, 1998;

QUAYALE *et al.*; 2002, 2003), causada pelas pressões ambientais sobre o continente antártico (CLARKE *et al.*, 2007, HELLMER *et al.*, 2012, ROSS *et al.*, 2012).

A Península Antártica, onde se localiza a Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF) - Baía do Almirantado, ilha Rei George, arquipélago das Shetlands do Sul, local onde o presente estudo foi realizado, é uma das três regiões do planeta, que apresenta aquecimento acelerado (CLARKE *et al.*, 2007; TURNER, 2007) (Figura 3). O aquecimento da Península Antártica, tem provocando degelo intenso tanto de geleiras, como de neve acumulada durante o inverno e do gelo marinho, acarretando alterações na salinidade e na densidade da água do mar, diminuindo a salinidade do mar em regiões costeiras (DI PRISCO, 2000; CLARKE *et al.*, 2007).

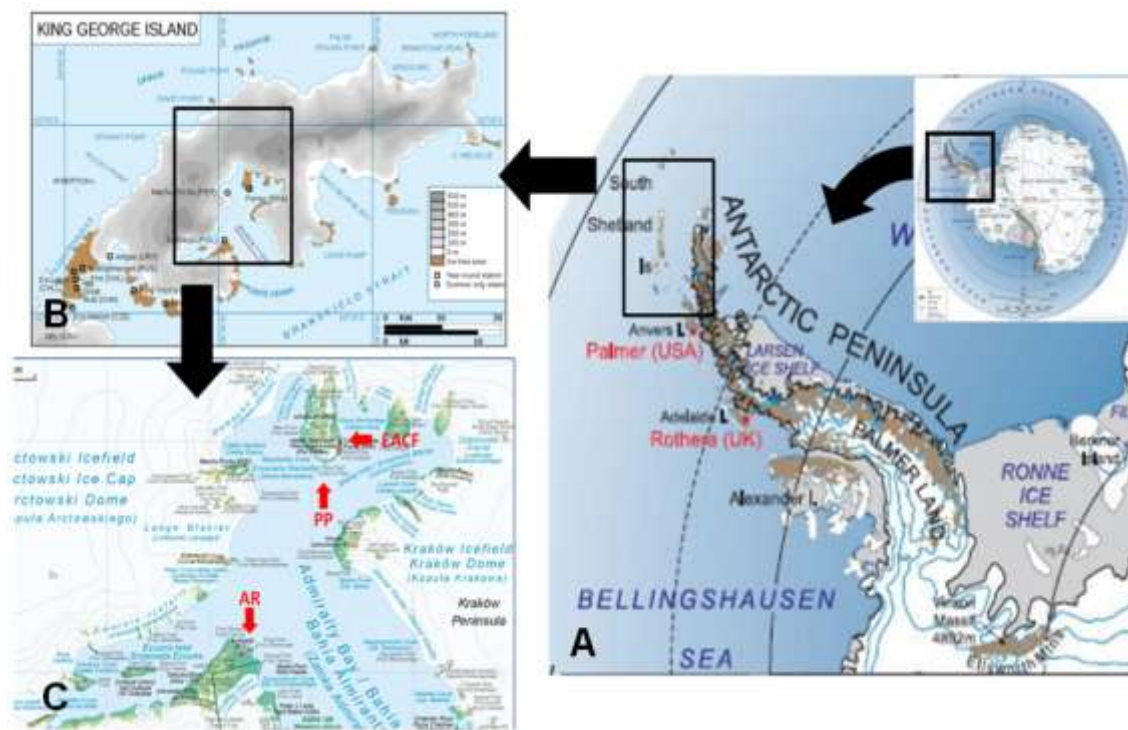


Figura 3: Local de estudo. Na Península Antártica (A) encontra-se a Ilha Rei George (B), onde localiza-se a Baía do Almirantado(C), local onde o presente estudo foi realizado. Fonte: Modificado de Simões *et al.*, (2004).

A temperatura é um fator abiótico que influencia diretamente a fisiologia e a taxa metabólica de organismos ectotérmicos, pois limita reações enzimáticas e afeta a estabilidade de macromoléculas (WEDEMEYER *et al.*, 1990; WEINSTEIN e SOMERO, 1998). No caso de ectotérmicos antárticos, devido a estabilidade térmica do ambiente, essas variações podem ser letais (WEINSTEIN e SOMERO, 1998).

Organismos antárticos possuem menor tolerância aguda ao calor, quando comparados a espécies tropicais, mas podem suportar o aumento de temperatura se aclimatados a temperaturas superiores, como por exemplo, *Trematomus bernacchii* e *Trematomus pennellii* que após aclimação a 4°C, suportaram até 14°C (PODRABSKY e SOMERO, 2006). BILYK e DEVRIES (2011) determinaram a temperatura crítica máxima (CTMax ambiental) de 11 espécies de peixes antárticos, dentre eles *N. coriiceps* e *N. rossii*, e para ambas a CTMax encontrada foi em torno de 16.2°C (SEEBACHER *et al.*, 2005; PODRABSKI e SOMERO, 2006; HUDSON *et al.*, 2008). PÖRTNER (2002) verificou que a fase inicial de aclimação ao calor em peixes antárticos pode prejudicar o aporte de oxigênio aos órgãos centrais. LOWE e DAVISON (2005) ao submeter os nototenídeos *Pagothenia borchgrevinki* e *T. bernacchii* à estresse térmico observaram que houve hiperglicemia associada à lenta liberação de cortisol no plasma, e aumento do hematócrito em *P. Borchgrevinki*, devido ao aumento da temperatura. Acredita-se que há aumento no hematócrito, no início da aclimação ao calor, para melhorar a capacidade respiratória (HEISE e ABELE, 2008). O estresse térmico analisado em fígado e músculo do peixe antártico *Pachycara brachycephalum*, causou diminuição do conteúdo lipídico, redução de carboidratos e alteração nos níveis de proteínas dos dois tecidos (BRODTE *et al.*, 2006). THORNE *et al.* (2010), expuseram o nototenídeo *Harpagifer antarcticus* a estresse térmico agudo (6°C por 48 horas) e como resposta registraram repostas inflamatórias no tecido hepático.

Organismos vivos devem possuir sistemas que regulem e mantenham a homeostase, já que estão sujeitos a mudanças rápidas nas condições bióticas e abióticas do meio em que habitam que podem ou não ser estressoras (MARIANO *et al.*, 2009; COGO *et al.*, 2009). São exemplos dessas alterações, além da temperatura, as mudanças de pH e salinidade, poluentes orgânicos e

inorgânicos, aumento na concentração de amônia e nitrito e redução de O_2 dissolvido (COGO *et al.*, 2009).

Ao longo do processo evolutivo a sobrevivência dos organismos esteve relacionada a capacidade de se ajustar aos agentes estressores e recuperar a homeostase. A tolerância térmica, por exemplo, está estritamente relacionada à capacidade do organismo em metabolizar o oxigênio, já que o equilíbrio de O_2 nos tecidos pode ser alterado com o aumento ou o declínio da temperatura do ambiente, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (ABELE *et al.*, 1998).

A partir do momento que o gás oxigênio passou a ser incorporado no processo de respiração celular as EROs fazem parte do metabolismo dos organismos aeróbicos (STADTMAN e LEVINE, 2000). As EROS são moléculas ou íons provenientes das reações de ativação ou redução do oxigênio molecular, ou produtos da reação de redução do O_2 (MONTEIRO *et al.*, 2006). A produção destes compostos na célula é natural e pode ter origens diferentes, dentre elas, a utilização de O_2 na cadeia respiratória pela mitocôndria a fim obter energia através de reações de oxidação, em processos de defesa antimicrobiana por células fagocitárias em reações de auto-oxidação de O_2 e por microsossomos do retículo endoplasmático (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). São exemplos de EROs, o ânion radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o radical hidroxila (OH) e o oxigênio livre (O) (STADTMAN e LEVINE, 2000; MONTEIRO *et al.*, 2006). Entretanto caso haja um desequilíbrio, esses radicais podem ser prejudiciais e/ou letais as células pois reagem com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (STADTMAN e LEVINE, 2000) (Figura 4).

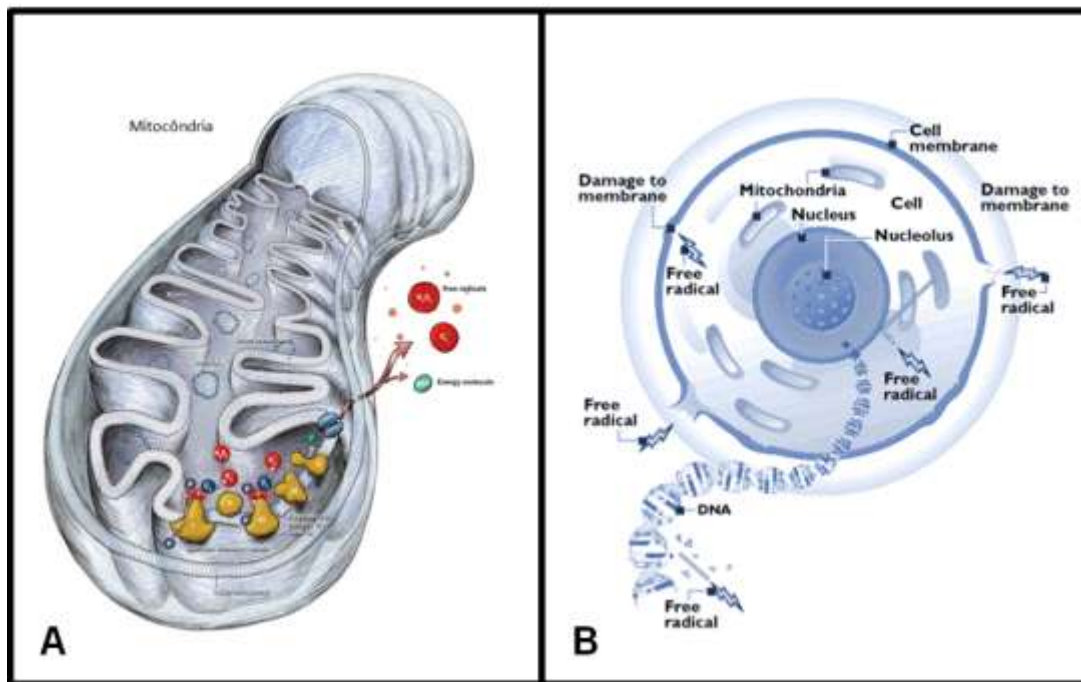


Figura 4: Geração de EROs e danos celulares. O metabolismo aeróbico pode resultar em espécies reativas de oxigênio (EROs) (A). A ação dos radicais livres sobre estruturas celulares pode causar danos à célula (B). Fonte: Modificado de [http://medicinaturale.pro/antioxidanti-vitamine-minerali-alimentazione-spor/-\(A\)](http://medicinaturale.pro/antioxidanti-vitamine-minerali-alimentazione-spor/-(A)); <http://pierre.senellart.com/travaux/divers/freer.gif> (B).

A fim de proteger a célula dos danos causados pelas EROs, houve a seleção de um sistema de defesa antioxidante (DROGE, 2002; HALLIWELL, 2007), formado por enzimas capazes de anular os radicais resultantes do metabolismo aeróbico (Figura 5), dentre elas, catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutatona-S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR) (LEHNINGER, *et al.*, 2007). Já os compostos antioxidantes não enzimáticos atuam impedindo reações de auto-oxidação e podem reduzir radicais livres (SAYEED *et al.*, 2003), sendo representados pelo ácido ascórbico e tióis não proteicos, dentre eles a glutatona reduzida (GSH) (AHMAD *et al.*, 2000; ORUÇ *et al.*, 2004).

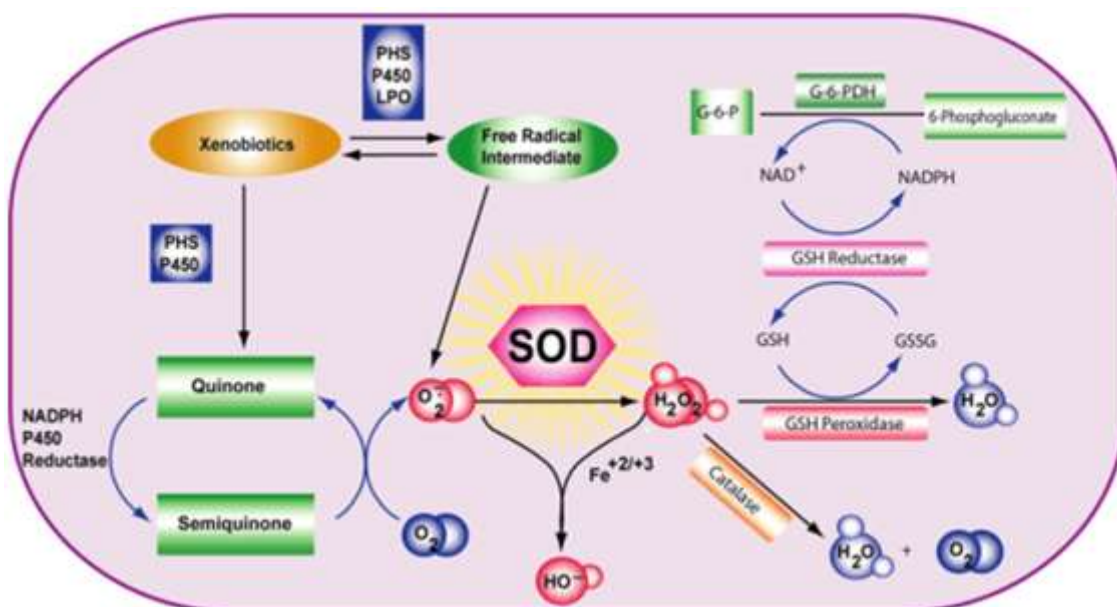


Figura 5: Representação esquemática dos sistemas de defesa antioxidantes. Enzimas, SOD, CAT, GPx e GR e suas vias de ação. Fonte: Modificado de <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/cell-signaling-enzymes/superoxide-dismutase.html>

O estresse oxidativo se dá quando o sistema de defesa antioxidante não é capaz de remover as EROs o que causará danos às moléculas orgânicas (HAGERMAN, 2006). O estresse oxidativo pode ser desencadeado por temperaturas extremas. Com o choque térmico há alteração no transporte de elétrons e pode haver a formação de EROs, ocasionando modificações na estrutura de moléculas importantes para a célula (COGO *et al.*, 2009).

Os eritrócitos de peixes diferem dos mamíferos pois são células nucleadas, ovais ou elípticas (CAMPBELL, 1991; DE CARVALHO *et al.*, 2009), entretanto sua origem é similar pois acredita-se que derivam de uma célula fonte, que ao proliferar-se gera outras células, são classificados de acordo com o grau de maturação, entretanto são considerados eritrócitos maduros as células que após a diferenciação são capazes de desempenharem suas funções específicas (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Embora o tecido da origem hematopoiética possa variar de entre as diferentes famílias de peixes (FORERO, 1995; PIMPÃO, 2006), os principais tecidos que dão origem aos eritrócitos e outras células sanguíneas são o baço e o rim cefálico, sendo que, nestes tecidos a atividade eritropoiética pode sofrer influência de fatores

ambientais como aumento da temperatura e estresse (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004).

Estudos indicam que o número e o tamanho dos eritrócitos na circulação estão relacionados à posição na escala evolutiva, habilidade natatória, demanda respiratória e taxa metabólica das espécies, ou seja, maior número de eritrócitos é encontrado em espécies mais ativas, eritrócitos de menor tamanho e em menor número são encontrados em espécies mais sedentárias (TANDON e JOSHI, 1976; RAMBHASKAR e SRINIVASA-RAO, 1987).

Os eritrócitos desempenham a função de transporte dos gases oxigênio e carbônico (FRIEDMAN *et al.*, 2004) e são células com alto teor de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas (CLEMENS e WALLER, 1987). Assim os eritrócitos estão expostos ao ataque de EROs e por esse motivo devem possuir múltiplos sistemas antioxidantes, para defender-se das EROs (TIANO *et al.*, 2000; 2003; FRIEDMAN *et al.*, 2004). O estresse oxidativo em eritrócitos pode ser avaliado por diversas abordagens experimentais e há diferentes maneiras da célula responder a este estresse, seja por aumento nas concentrações de antioxidantes não enzimáticos, alteração na atividade das enzimas de defesa, e em casos mais graves a lise celular (BAINNY *et al.*, 1996), que pode ser causada por peroxidação lipídica (LPO) (GUTTERIDGE, 1995; LACKNER, 1998; DUTRA *et al.*, 2008). Morfologicamente o estresse oxidativo em eritrócitos pode causar acúmulo de danos e lesões celulares (NAGASAKA, 2004), como perda de formato e até lise celular (BAINNY *et al.*, 1996).

Há pouca literatura sobre a aclimação de peixes antárticos em temperaturas diferentes da subzero (-1,96 a 0°C) (SOMERO e DEVRIES, 1967; LOWE e DAVISON, 2005; JIN e DEVRIES 2006; CLARKE *et al.*, 2007; CLARK e PECK, 2009; BILYK e DEVRIES, 2011). Neste contexto, entender o metabolismo oxidativo e suas defesas em eritrócitos, é importante, já que pode fornecer informações básicas sobre aspectos fisiológicos e ecológicos de duas espécies de peixes predominantes na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica. Os dados gerados neste trabalho podem servir de subsídios para a tomada de decisão visando à conservação destas espécies frente às mudanças climáticas globais.

2- OBJETIVOS

2.1 - Objetivo Geral

Avaliar comparativamente aspectos do metabolismo oxidativo e suas defesas antioxidantes, bem como as alterações morfológicas, em eritrócitos dos peixes antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* frente ao aumento da temperatura (8°C).

2.2 - Objetivos específicos

- Investigar as possíveis variações na atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona S-transferase (GST) e glutaciona redutase (GR), influenciado pelo estresse térmico, nos eritrócitos dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.
- Investigar as possíveis variações nas concentrações de glutaciona reduzida (GSH) influenciado pelo estresse térmico, nos eritrócitos dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.
- Avaliar a peroxidação lipídica (LPO) frente ao estresse térmico nos eritrócitos dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.
- Avaliar as possíveis alterações morfológicas causadas pelo estresse térmico nos eritrócitos dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.
- Comparar a atividade das enzimas antioxidantes, a concentração de GSH e a LPO, bem como as alterações morfológicas, frente ao estresse térmico nos eritrócitos dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coletas

Na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, as coletas foram realizadas em Ponta Plaza (PP - 62° 05' 64,5" S; 58° 24' 31.7" W) e Arctowski, em frente ao glaciér Ecology (AR - 62°10'.65" S; 58°26.5' W), locais de maior abundância de *N. rossii* e *N. coriiceps* na Baía do Almirantado (Figura 6).

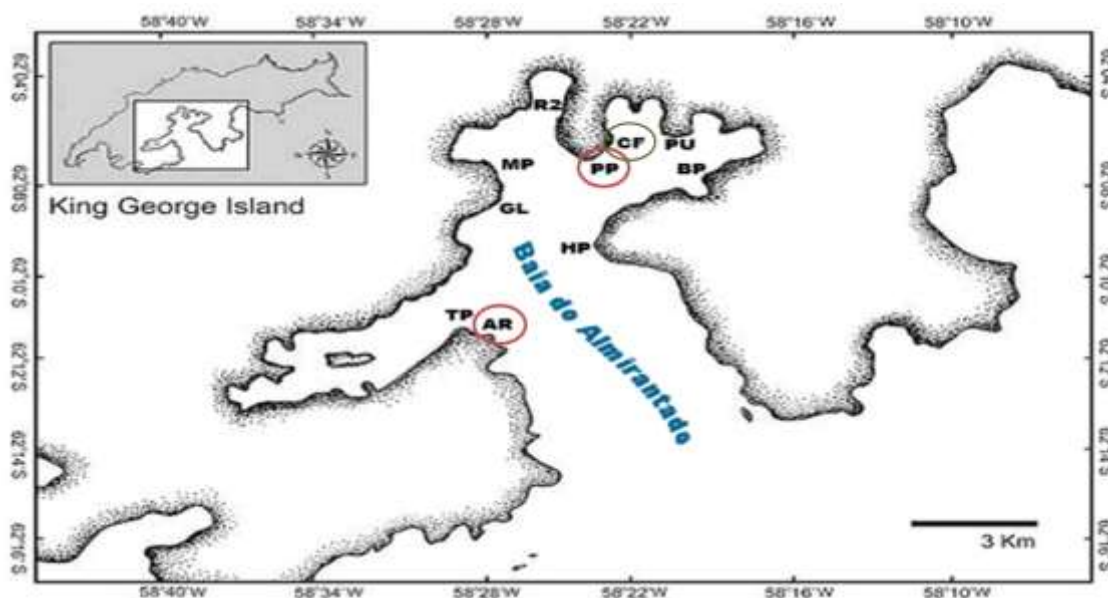


Figura 6: Locais de coleta na Baía do Almirantado – Ilha Rei George. Os espécimes de *Nothenia coriiceps* e *Notothenia rossii* foram coletados na Ponta Plaza (PP) e no Glaciér Ecology (AR). A EACF está representada no mapa como CF (62°05'0"S/ 58°23'28"W). (Fonte: Edson Rodrigues Júnior)

Exemplares de *N. rossii* (n= 60) e de *N. coriiceps* (n=60), foram capturados com linha e anzol. A profundidade de coleta variou entre 10 a 25 metros e a pesca foi realizada com o auxílio de botes pneumáticos do tipo “Zodiac” ou a bordo da lancha oceanográfica “Skua” (Figura 7). Os peixes foram transportados dos locais de coleta para os módulos de aquários (laboratórios) da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) (62°05'0"S/58°23'28"W) e mantidos sob condições controladas de temperatura ($0^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$), salinidade ($35 \pm 1,0$ psu), fotoperíodo (12 horas luz/12 horas escuro) e aeração durante 3 dias (Figura 8).



Figura 7: Coleta dos exemplares de *N. coriiceps* e *N. rossii*. Utilizando-se vara e anzol (A) a bordo de botes pneumáticos (B) ou a bordo da lancha oceanográfica "Skua"(C). (Fotos: Beatriz Bove da Costa Boucinhas (A e C); O autor (B)).

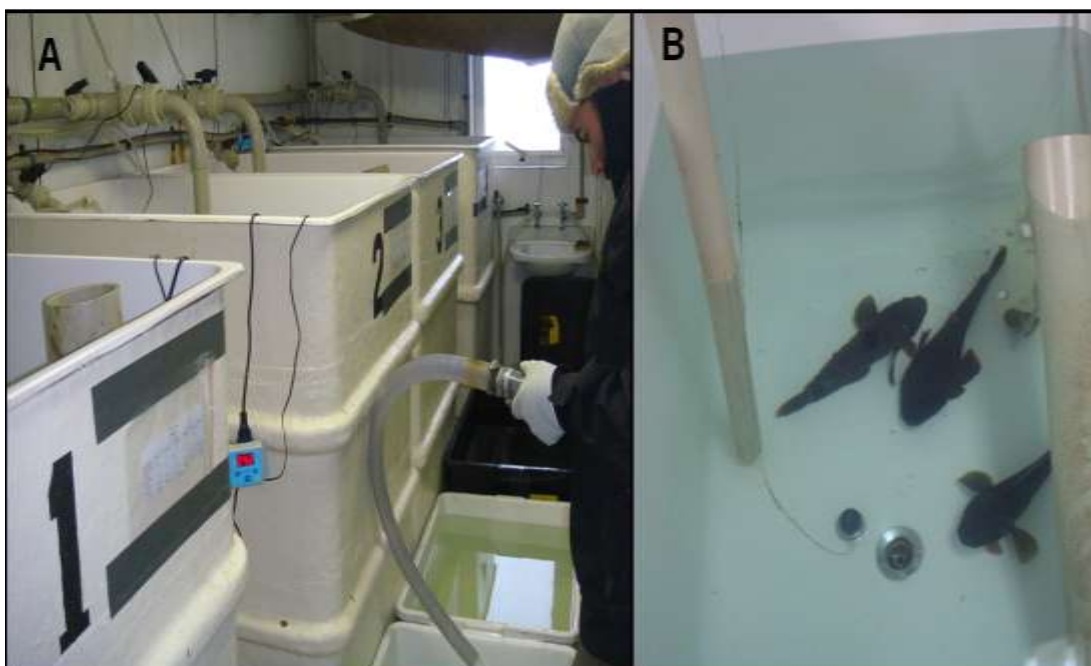


Figura 8: Módulo de aquário da Estação Antártica Comandante Ferraz. Preparo dos tanques com termostato (A). Espécimes de *N. coriiceps* acondicionados em tanque (B). (Fotos: O autor (A); Edson Rodrigues Júnior (B)).

3.2 - Protocolo experimental

N. rossii e *N. coriiceps* foram randomicamente selecionadas e transferidas para tanques de 1000 L contendo água do mar à temperatura de $8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas (1 dia), 72 horas (3 dias) e 144 horas (6 dias), caracterizando os animais experimentais (Figura 9 A). Os animais controles foram mantidos nas mesmas condições e tempos dos experimentais, com exceção da temperatura que foi de $0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Figura 9 B). A salinidade foi de $35 \text{ psu} \pm 1,0$ e o fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. O número de peixes para cada situação experimental foi de 10 indivíduos.

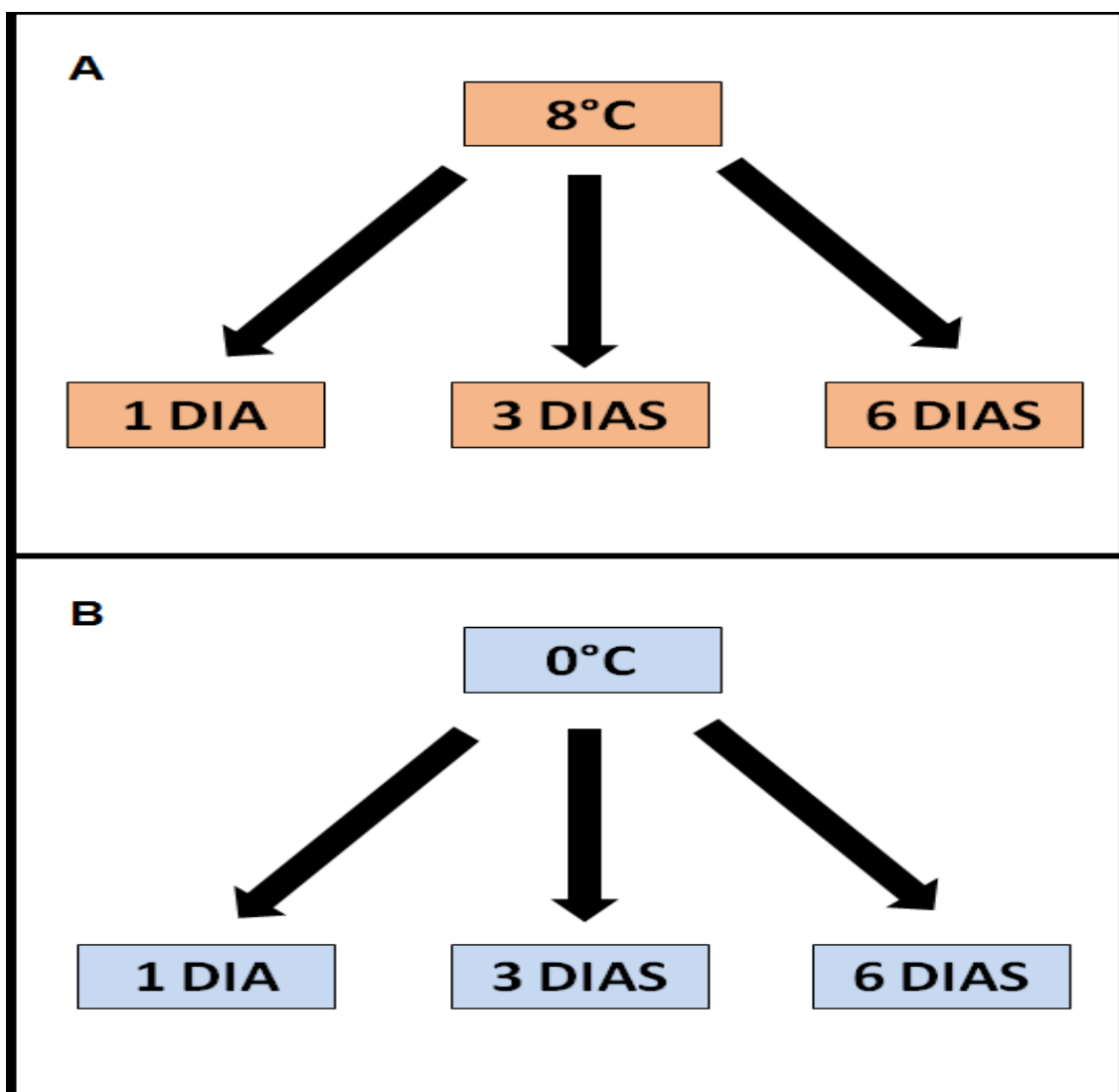


Figura 9: Desenho esquemático do protocolo experimental. (A) Grupo experimental, animais submetidos à temperatura de 8°C . (B) Grupo controle, animais mantidos à temperatura de 0°C . Fonte: O autor, 2013.

A temperatura da água dos tanques foi rigorosamente mantida com termostatos Aquaterm 09-01T-11457 (Full Cauge) acoplados a aquecedores (Altman). A água do mar foi captada a uma profundidade de 4 metros, em frente da EACF, e bombeada para os tanques. Os tanques foram limpos a cada dois dias e 50% da água trocada.

A alimentação foi a base de músculo epaxial de peixes Antárticos, oferecida a cada dois dias na quantidade correspondente a 1% da sua massa corpórea.

Após a realização dos bioensaios, os animais foram anestesiados com benzocaína 1% ($p v^{-1}$), o sangue coletado com seringa heparinizada mediante punção da veia caudal (Figura 10). Em seguida os animais foram mortos via secção medular e medidas biométricas (comprimento e peso) foram realizadas.



Figura 10: Coleta de sangue. Obtenção de sangue por meio da punção da veia caudal (A). Coleta de sangue realizada com seringa heparinizada (B). Fotos: Gabriela Raga.

Os eritrócitos foram obtidos mediante centrifugação do sangue total a 2000 rpm por 10 minutos a 4°C. Após a retirada do plasma, parte dos eritrócitos foi fixada em fixador Karnovsky com adaptações (paraformaldeído 2%, glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C) (KARNOVSKY, 1965) durante 2 horas e posteriormente transferida para tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 a 4°C para as análises morfológicas. Parte dos eritrócitos foi lavada em NaCl 0,9%, centrifugada a 5000 x g durante 10 min a 4°C e em seguida foi adicionado tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0 (3:1 v/v) para obtenção do hemolizado que foi centrifugado a 12000 x g durante 15 min a 4°C e o sobrenadante congelado em nitrogênio líquido visando as análises enzimáticas.

O material foi transportado da EACF para o Laboratório de Biologia Adaptativa do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, onde foram realizadas as análises enzimáticas e morfológicas.

3. 3 Procedimentos Analíticos

Maiores detalhes das metodologias utilizadas neste trabalho constam no Anexo I.

3.3.1 Determinação da atividade das enzimas do estresse oxidativo

Os hemolizados das amostras foram tratados com clorofórmio e etanol na proporção de 1:2 (ROCHE e BOGE, 1993), e centrifugados a 5000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi separado para as análises bioquímicas.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas Epoch (Bio-Tech) com exceção da CAT que foi lida no espectrofotometro Shimadzu UV-2600 em cubeta de quartzo.

A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se soro de albumina bovina (BSA) para o estabelecimento da curva padrão e a absorbância das amostras foi verificada a 595nm. As amostras não foram normalizadas, pois continham concentração de

proteínas inferior a 1mg/mL. Os valores obtidos com a dosagem de proteínas totais foram diretamente utilizados no cálculo das enzimas.

Os níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD) foram avaliados pela inibição da redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) para azul formazan pelo O_2^- gerado pela hidroxilamina em solução alcalina (CROUCH *et al.*, 1981). A leitura foi realizada em 560nm.

Os níveis de atividade da catalase (CAT) foram avaliados pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espectrofotometricamente a 240nm. O meio de reação conteve tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 10mM (BEUTLER, 1975).

Os níveis de atividade da glutathione peroxidase (GPx) foram determinados através da oxidação de NADPH a 340nm. A enzima utiliza glutathione reduzida (GSH) para reduzir peróxido orgânico originando glutathione dissulfídica (GSSG). Esta última é reduzida pela enzima glutathione redutase (GR) utilizando elétrons doados pelo NADPH (WENDEL, 1981).

Os níveis de atividade da glutathione-S-transferase (GST) foram determinados de acordo com a metodologia de KEEN *et al.* (1976) utilizando o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A glutathionação do CDNB foi medida espectrofotometricamente em 340nm.

Os níveis de atividade da glutathione redutase (GR) foram avaliados espectrofotometricamente através da oxidação do NADPH com a concomitante redução da GSSG com absorvância em 340nm. O meio de reação conteve tampão fosfato de potássio (100mM, pH 7,0), EDTA 1mM, NADPH 0,1mM e glutathione oxidada 1mM (CARLBERG e MANNERVIK, 1985).

Os valores da atividade das enzimas antioxidantes foram expressos em U/mg de proteína. Uma unidade de actividade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a reação de oxidação de NBT em 50% da inibição máxima. Uma unidade de atividade de CAT, GPx, GST e GR é definida como a quantidade de enzima que consome 1 mmol de substrato ou a geração de um μ mol de produto por minuto.

3.3.2 Determinação da concentração de Glutathiona Reduzida

A concentração de glutathiona (GSH) e outros tióis foram determinados através do método descrito por SEDILAK e LINDSAY (1968). Foi adicionado ao material 200 uL de TCA a 30% à 50 uL de amostra, centrifugado a 9000 rpm/10min/4°C. Ao sobrenadante foi acrescentado 0,25 mM DTNB. O método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o DTNB gerando produto que absorve luz a 415 nm. Os Valores de GSH foram expressos em nmols de tióis por mg de proteínas.

3.3.3 Determinação do índice da Peroxidação Lipídica (LPO)

O índice de peroxidação lipídica (LPO) foi avaliado pelos níveis dos produtos finais da peroxidação lipídica, o malonaldeído (MDA), pela reação de TBARS. Os níveis de MDA foram determinados espectrofotometricamente em 535 nm, utilizando MDA (Merck, Darmstadt, Germany) como padrão (UCHIYAMA e MIHARA, 1978). Os valores de TBARS foram expressos em nmols de MDA por grama de massa úmida.

3.3.4 Análises morfológicas

Para as análises de microscopia de luz (ML) após a fixação, realizou-se o esfregão das amostras em lâminas de vidro que foram coradas com May-Grunwald (RIOS, 2010). As imagens foram obtidas utilizando o microscópio com scanner Zeiss - Imager.Z2, através do programa MetaSystems/VSViewer. Para as análises das alterações celulares, 1000 eritrócitos foram tipificados por indivíduo em: eritrócitos maduros (EM), eritrócitos imaturos ou eritroblastos (EI); eritrócito com alteração de formato celular (EFC); eritrócito com formação de vesículas na membrana plasmática (EVM); eritrócito com deslocamento de núcleo (EDN); eritrócito com presença de micronúcleo (E μ); eritrócito com

bolha nuclear ou “*Blebbed*” (EBN) e eritrócito com fissura nuclear ou “*Notched*”- (EFN), conforme metodologia adaptada de GRISOLIA *et al.* (2009) e SOUZA e FONTANETTI (2006). Para as análises de volume celular, 250 eritrócitos foram mensurados por indivíduo, onde obteve-se o eixo maior (μm) e o eixo menor (μm) da célula e do núcleo. Em seguida aplicou-se a fórmula $V=4/3\pi(a/2)(b^2/2)$ para cálculo dos volumes celular e nuclear, onde V = volume; $\pi=3,14$; a =eixo maior; b = eixo menor (FELIP *et al.*, 2009). Dados de volume foram expressos em μm^3 .

Para as análises em microscopia eletrônica de transmissão (MET), após fixação, os eritrócitos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 2% em tampão cacodilato 0,1M pH 7.2 por 1 hora. A contrastação em blocos foi feita com acetato de uranila 2% durante 2 horas. O material foi desidratado em série alcoólica crescente e em seguida colocado em acetona. A impregnação e inclusão ocorreram em resina Epon-812 (LUFT, 1961). Os cortes foram obtidos em ultramicrotomo Sorval Porter Blum MT-2 com utilização de navalhas de vidro e de diamante. Os cortes ultra-finos foram contrastados em solução aquosa de acetato de uranila 2% (WATSON, 1958) e nitrato de chumbo (REYNOLDS, 1963). A visualização e documentação do material foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200EX II do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (C.M.E.-UFPR).

Nas análises em microscopia eletrônica de varredura (MEV) após fixação, os eritrócitos foram submetidos ao ponto crítico, obtido em um Bal-Tec CPD – 030 com gás carbônico e em seguida metalizados em ouro em um Balzers SCD – 030. As análises e a documentação do material foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL-JSM 6360 LV do C.M.E – UFPR.

3.4 Análises estatísticas

Para a análise dos níveis das enzimas do estresse oxidativo (SOD, CAT, GPX, GST e GR) e dos parâmetros não enzimáticos (GSH e MDA) os dados foram tratados estatisticamente através da análise de variância bi – fatorial (ANOVA bi-fatorial) visando verificar o efeito das duas variáveis independentes (temperatura e tempo de exposição) e a possível interação entre ambos. Em caso significativo foi realizado o pós-teste de Tukey para a comparação das médias. A homogeneidade das variâncias foi testada *a priori* pelo teste de Levene e em caso significativo os dados foram log-transformados.

Os dados morfométricos referente as alterações morfológicas, foram previamente testados para a normalidade através do teste Kolmogorov-Smirnov e homogeneidade das variâncias através do teste de Levene. Caso os dados fossem homogêneos eram submetidos à análise de variância bi-fatorial (ANOVA duas-vias) (F), no qual o tempo de exposição (1, 3 e 6 dias) e a temperatura (0 e 8°C) foram as variáveis categóricas. Em caso dos dados serem não-paramétricos foi utilizada a análise não-paramétrica de Kruskal-Wallis (H), através do software R 2.5.1. Em caso de variação significativa ($p < 0,05$) foram submetidos ao pós teste de Tukey e comparações múltiplas respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade das enzimas antioxidantes

Em *N. coriiceps* os níveis de SOD não foram modulados pelo aumento da temperatura a 8°C e ao longo do tempo (Figura 11A). Já em *N. rossii*, o aquecimento em 8°C modulou positivamente os níveis de SOD em relação a 0°C, em 6 dias de exposição, sendo que a 8°C os níveis de SOD foram 68% maiores quando comparados a 0°C. Ao longo dos tempos de exposição em 0°C os níveis de SOD em *N. rossii* aumentaram em 3 dias quando comparados a 1 e 6 dias. Já em 8°C houve aumento nos níveis de SOD em 3 e 6 dias quando comparados a 1 dia (Figura 11 B).

O aquecimento em 8°C modulou os níveis de CAT em relação a 0°C nas duas espécies analisadas (Figuras 11 C - D). Em *N. coriiceps* os níveis de CAT em 1 dia a 0°C foram 87% maiores quando comparados a 8°C, e em 3 dias a 0°C foram 90% maiores quando comparados a 8°C. Em *N. rossii* o aquecimento em 8°C modulou os níveis de CAT em relação a 0°C em 3 e 6 dias. Em 3 dias os níveis de CAT em 8°C foram 97% maiores quando comparados a 0°C e em 6 dias foram 86% menores em 8°C quando comparados a 0°C. Ao longo do tempo, em *N. coriiceps* o tempo de exposição não influenciou os níveis de CAT em 8°C, já em 0°C houve diminuição de 51% entre 1 e 3 dias, e de 91% entre 3 e 6 dias (Figura 11 C) . Em *N. rossii* a 8°C houve aumento de 88% nos níveis de CAT em 3 dias de exposição quando comparado a 1 e 6 dias enquanto que em 0°C os níveis de CAT foram 86% maiores em 1 dia quando comparado a 3 dias, e 79% maiores em 3 dias quando comparado a 6 dias (Figura 11 D).

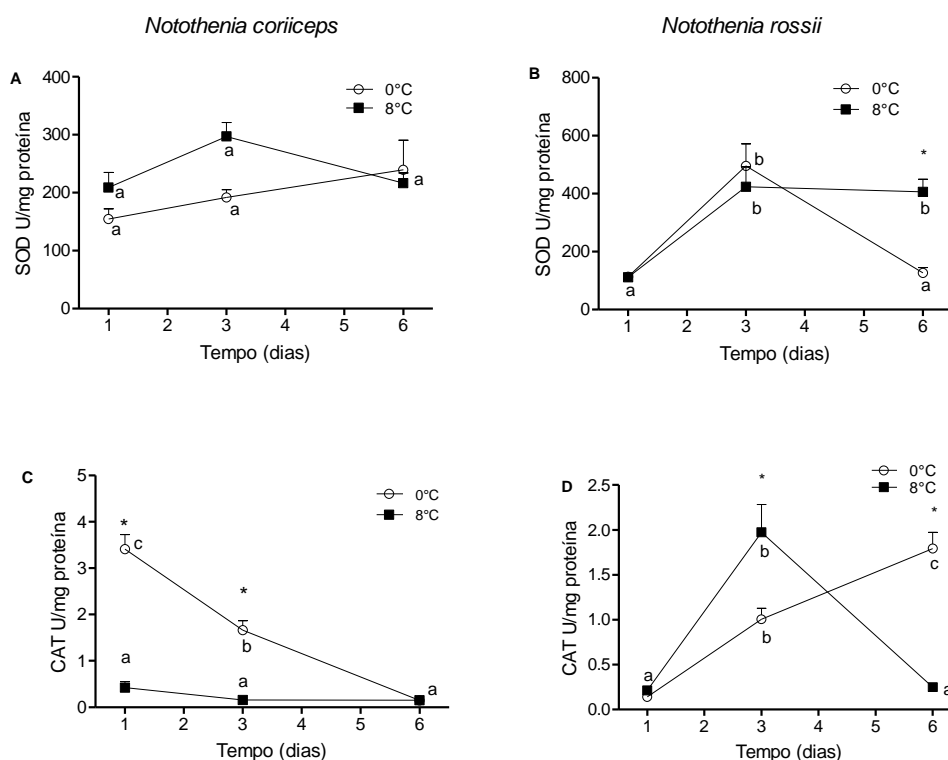


Figura 11: Níveis de Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Eritrócitos de *Notothenia coriiceps* (A e C) e *Notothenia rossii* (B e D), expostos a 0°C e 8°C (círculo vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. As linhas verticais indicam médias \pm EP. As letras minúsculas diferentes indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em cada temperatura (0°C e 8°C). Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as temperaturas (0°C e 8°C).

O aquecimento em 8°C não modulou os níveis de GPx em relação a 0°C em ambas as espécies analisadas (Figura 12 A-B). Em *N. coriiceps* ao longo do tempo, os níveis de GPx apresentaram variações, sendo que em 0°C foram 51% e 66% maiores em 1 dia quando comparados a 3 e 6 dias respectivamente. Em 8°C os níveis de GPx foram 56% menores em 6 dias quando comparados aos níveis de 1 dia. Em *N. rossii*, em 0°C os níveis de GPx diminuiriam 50% em 3 dias em relação a 1 dia e estes níveis mantiveram-se constantes em 6 dias quando comparamos com 1 dia. Já, em 8°C houve diminuição dos níveis de GPx entre 1 e 3 dias, sendo 46,4% menor em 3 dias.

O aquecimento em 8°C modulou os níveis de GST em relação a 0°C em ambas as espécies analisadas. Em *N. coriiceps* a modulação positiva dos níveis de GST ocorreu em 3 dias, sendo 57,9% maior em 8°C quando comparada a 0°C (Figura 12 C), enquanto que em *N. rossii* a modulação

negativa ocorreu em 6 dias, sendo 81,9% menor em 8°C quando comparada a 0°C (Figura 12 D). Em ambas as espécies analisadas houve diferença nos níveis de GST ao longo dos tempos de exposição. Em *N. coriiceps*, a 0°C, em 1 e 3 dias os níveis de GST foram 66% menores quando comparados a 6 dias enquanto que em 8°C foram 52% e 57% menores em 1 dia quando comparados a 3 e 6 dias respectivamente. Já em *N. rossii* a 8°C os níveis de GST foram 85% menores em 6 dias quando comparados a 1 e 3 dias enquanto que a 0°C os níveis de GST não foram alterados ao longo do tempo.

O aquecimento em 8°C modulou os níveis de GR em relação a 0°C em *N. coriiceps* enquanto que em *N. rossii* não foi observado esta modulação (Figuras 12 E-F). Em *N. coriiceps* em 8°C houve modulação positiva nos níveis de GR em 1 e 3 dias quando comparados a 0°C, sendo respectivamente 69,9% e 81% maiores em 8°C. Ao longo do tempo em *N. coriiceps* em 8°C os níveis de GR foram 68% e 76% maiores em 1 dia quando comparados a 3 e 6 dias respectivamente. Já em 0°C os níveis de GR em 3 dias foram 80% menores, quando comparados a 1 dia e 70% menor quando comparado a 6 dias (Figura 12E). Ao longo do tempo em *N. rossii* a 0°C houve aumento de 79% e 73%, nos níveis de GR respectivamente em 3 e 6 dias quando comparados a 1 dia. Em 8°C houve aumento de 48% e 55% nos níveis GR respectivamente em 3 e 6 dias quando comparados a 1 dia (Figura 12F).

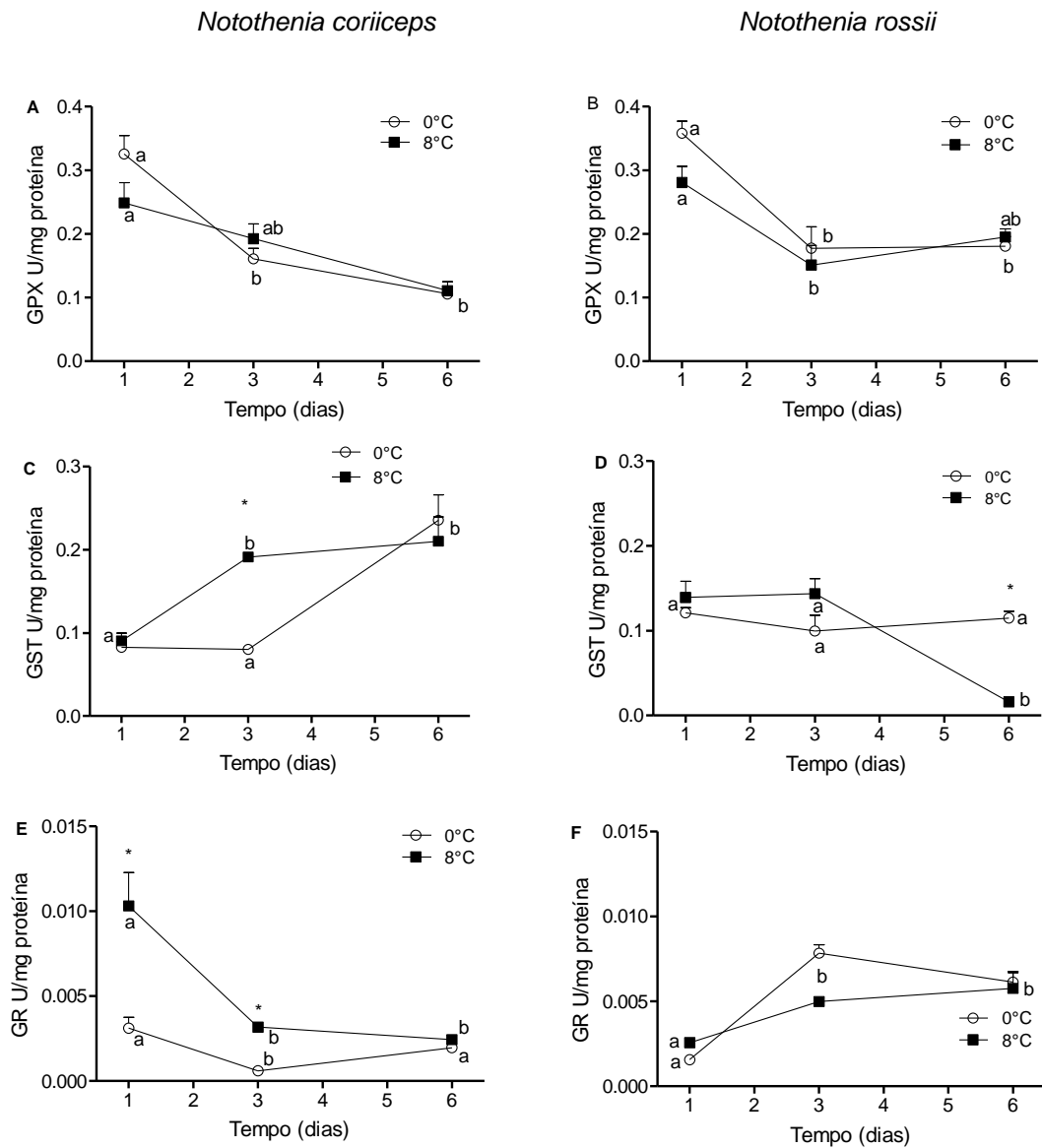


Figura 12: Níveis de Atividade da glutatona S-transferase (GST), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx). Eritrócitos de *Notothenia coriiceps* (A, C e E) e *Notothenia rossii* (B, D e F), expostos a 0°C e 8°C (círculo vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. As linhas verticais indicam médias \pm EP. As letras minúsculas diferentes indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em cada temperatura (0°C e 8°C). Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as temperaturas (0°C e 8°C).

4.2 Determinação de GSH e LPO

O aquecimento em 8°C não modulou a concentração de GSH em relação a 0°C em ambas as espécies analisadas (Figuras 13 A-B). Em *N. coriiceps* ao longo do tempo os níveis de GSH em 0°C em 3 e 6 dias foram respectivamente 59,38% e 56,66% menores quando comparados a 1 dia. Em 8°C a concentração de GSH em 6 dias foi 53,68% menor quando comparado a 1 dia (Figura 13 A). Em *N. rossii* não houve diferença significativa o longo dos tempos de exposição (Figura 13 B).

O aquecimento em 8°C modulou o conteúdo de MDA em relação a 0°C em ambas as espécies analisadas (Figuras 13 C-D). Em *N. coriiceps* ocorreu modulação negativa em 3 dias, sendo 44, 3% menor em 8°C quando comparado a 0°C (Figura 13 C). Em *N. rossii* ocorreu modulação positiva em 1 dia, sendo 54,47% maior em 8°C quando comparado a 0°C, em 3 dias foi observada modulação negativa, sendo 61,94% menor em 8°C quando comparado a 0°C (Figura 13 C). Houve diferenças no conteúdo de MDA ao longo dos tempos de exposição em ambas as espécies. Em *N. coriiceps* a 0°C o conteúdo de MDA em 1 dia foi 62,34% e 54,44% menor quando comparado a 3 e 6 dias, respectivamente. Em 8°C o conteúdo de MDA em 6 dias foi 52,6% e 22,7% maior quando comparado a 1 e 3 dias, respectivamente. Em *N. rossii* a 0°C houve aumento de 49,39% e 67,75% no conteúdo de MDA respectivamente em 3 e 6 dias quando comparados a 1 dia, e em 3 dias a 8°C houve diminuição de 65,77% e 83,18% no conteúdo de MDA respectivamente quando comparado a 1 e 6 dias. (Figura 13 C-D)

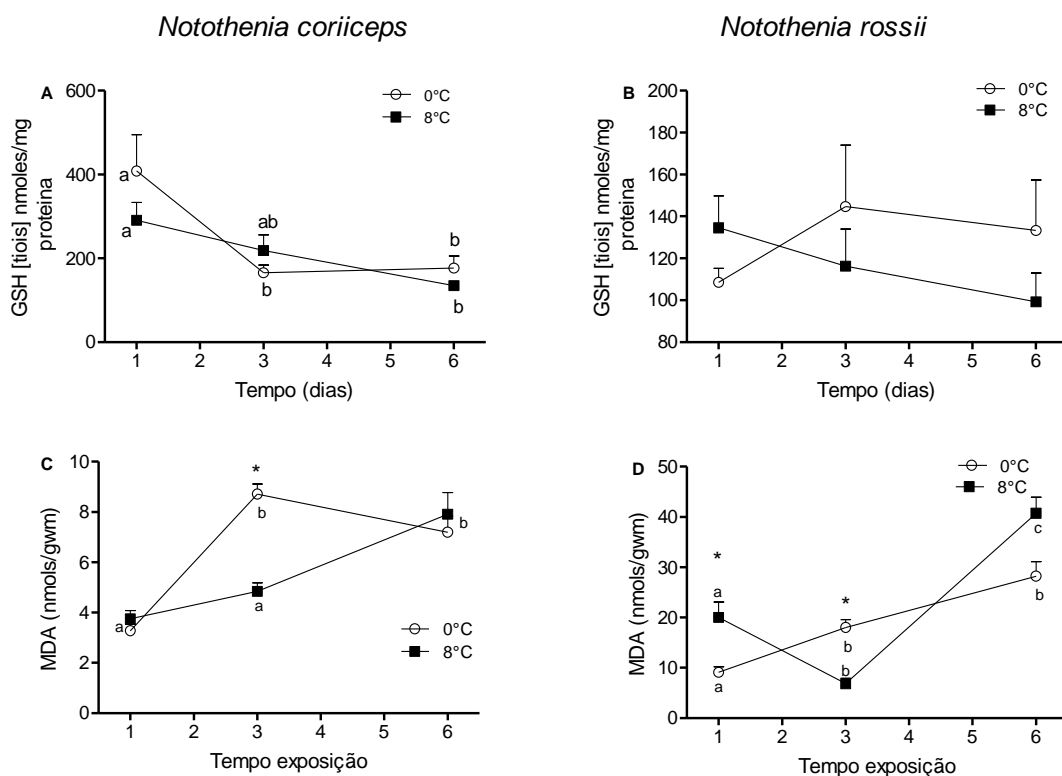


Figura 13: Concentração de Glutaciona reduzida (GSH) e (MDA). Eritrócitos de *Notothenia coriiceps* (A e C) e *Notothenia rossii* (B e D), expostos a 0°C e 8°C (círculo vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. As linhas verticais indicam médias \pm EP. As letras minúsculas diferentes indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em cada temperatura (0°C e 8°C).

Os valores médio \pm erro padrão (EP) da determinação da atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GST, GPx, GR e CAT) e da concentração do antioxidante não enzimático da GSH e da LPO estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3 respectivamente:

Tabela 1: Efeito da temperatura na atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos de *Notothenia coriiceps*. Valores médios \pm EP. da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR) nos eritrócitos de *Notothenia coriiceps*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por 1,3 e 6 dias. O número de amostras para cada análise está indicado entre parênteses. Valores expressos em U/mg proteína.

| | SOD | CAT | GPX | GST | GR |
|---------------------|-------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--------------------------|
| 0°C – 1 dia | 154,59 \pm 17,27 (9) | 3,41 \pm 0,31 (10) | 0,33 \pm 0,03 (9) | 0,08 \pm 0,01 (8) | 0,0031 \pm 0,0006 (8) |
| 0°C – 3 dias | 191,65 \pm 13,06 (10) | 1,67 \pm 0,20 (10) | 0,16 \pm 0,02 (9) | 0,08 \pm 0,01 (10) | 0,0006 \pm 0,0001 (9) |
| 0°C – 6 dias | 239,15 \pm 51,18 (8) | 0,15 \pm 0,02 (10) | 0,11 \pm 0,01 (9) | 0,24 \pm 0,03 (9) | 0,0020 \pm 0,0003 (8) |
| 8°C – 1 dia | 208,83 \pm 26,05 (9) | 0,42 \pm 0,13 (9) | 0,25 \pm 0,03 (10) | 0,09 \pm 0,01 (9) | 0,0103 \pm 0,0020 (10) |
| 8°C – 3 dias | 296,76 \pm 24,12 (8) | 0,16 \pm 0,02 (9) | 0,19 \pm 0,02 (10) | 0,19 \pm 0,00 (9) | 0,0032 \pm 0,0002 (10) |
| 8°C – 6 dias | 216,24 \pm 17,74 (10) | 0,15 \pm 0,02 (9) | 0,11 \pm 0,01 (10) | 0,21 \pm 0,03 (9) | 0,0024 \pm 0,0002 (9) |

Tabela 2: Efeito da temperatura na atividade das enzimas antioxidantes nos eritrócitos de *Notothenia rossii*. Valores médios \pm EP da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-S-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa redutase (GR) nos eritrócitos de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por 1,3 e 6 dias. O número de amostras para cada análise está indicado entre parênteses. Valores expressos em U/mg proteína.

| | SOD | CAT | GPX | GST | GR |
|---------------------|------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|
| 0°C – 1 dia | 113,05 \pm 9,15 (8) | 0,14 \pm 0,01 (8) | 0,36 \pm 0,02 (9) | 0,12 \pm 0,01 (9) | 0,0016 \pm 0,0002 (8) |
| 0°C – 3 dias | 495,30 \pm 76,58 (8) | 1,00 \pm 0,12 (8) | 0,18 \pm 0,03 (7) | 0,10 \pm 0,02 (9) | 0,0078 \pm 0,0005 (8) |
| 0°C – 6 dias | 126,58 \pm 18,52 (8) | 1,79 \pm 0,18 (9) | 0,18 \pm 0,02 (8) | 0,11 \pm 0,01 (8) | 0,0061 \pm 0,0006 (8) |
| 8°C – 1 dia | 110,97 \pm 13,61 (8) | 0,21 \pm 0,02 (9) | 0,28 \pm 0,03 (8) | 0,14 \pm 0,02 (9) | 0,0026 \pm 0,0002 (8) |
| 8°C – 3 dias | 422,68 \pm 69,31 (7) | 1,97 \pm 0,31 (8) | 0,15 \pm 0,03 (8) | 0,14 \pm 0,02 (10) | 0,0050 \pm 0,0002 (8) |
| 8°C – 6 dias | 406,00 \pm 43,00 (9) | 0,25 \pm 0,03 (8) | 0,20 \pm 0,01 (9) | 0,02 \pm 0,00 (7) | 0,0058 \pm 0,0010 (9) |

Tabela 3: Efeito da temperatura nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) e malonaldeído (MDA). Valores médios \pm EP da atividade da enzima glutathiona reduzida (U/mg proteína ou [tiois] nmoles. mg proteína⁻¹) e malonaldeído ([MDA] μ mols . gwm⁻¹) nos eritrócitos de *Notothenia coriiceps* (NC) *Notothenia rossii* (NR) expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por 1,3 e 6 dias.

| | <i>N. coriiceps</i> | | <i>N. rossii</i> | |
|---------------------|-------------------------|----------------------|---------------------------|-----------------------|
| | GSH | MDA | GSH | MDA |
| 0°C – 1 dia | 408,15 \pm 86,37 (8) | 3,28 \pm 0,26 (10) | 108,59 \pm 6,65 (10) | 9,11 \pm 1,13 (9) |
| 0°C – 3 dias | 165,78 \pm 17,91 (10) | 8,71 \pm 0,40 (8) | 144,6508 \pm 29,42 (10) | 18,00 \pm 1,60 (10) |
| 0°C – 6 dias | 176,87 \pm 28,83 (9) | 7,20 \pm 0,64 (10) | 133,26 \pm 24,10 (10) | 28,25 \pm 2,85 (8) |
| 8°C – 1 dia | 290,78 \pm 42,40 (10) | 3,75 \pm 0,33 (5) | 134,53 \pm 15,17 (10) | 20,01 \pm 3,08 (8) |
| 8°C – 3 dias | 219,00 \pm 37,37 (9) | 4,85 \pm 0,33 (7) | 116,20 \pm 17,79 (10) | 6,85 \pm 1,08 (10) |
| 8°C – 6 dias | 134,67 \pm 6,20 (10) | 7,91 \pm 0,86 (10) | 99,23 \pm 13,85 (10) | 40,74 \pm 3,21 (8) |

4.3 Alterações Morfológicas

As alterações morfológicas encontradas em eritrócitos de *N.coriiceps* e *N.rossii* podem ser visualizadas nas figuras 14 (ML), 15 (ML), 16 (MEV) e 17 (MET).

Em ambas as espécies, eritrócitos normais considerados como controle, possuem formato oval a elipsoidal com núcleo central acompanhando o formato da célula e elétron denso devido ao predomínio de heterocromatina (Figuras 14A-B e 16A-B). O citoplasma é homogêneo em ML (Figuras 14A-B), mas, contendo compartimentos limitados por membranas quando visualizados em MET (Figura 17C). Eritrócitos maduros (Figura 14A-B) e eritrócitos imaturos ou eritroblastos com formatos celular e nuclear arredondados e cromatina menos densa (Figura 14C) foram observados tanto em *N. coriiceps* quanto em *N.rossii*, sendo que a proporção entre células maduras e eritroblastos estão representadas respectivamente nas tabelas 4 e 5.

Qualitativamente, as análises de ML, MET e MEV para ambas as espécies, tanto para os animais controle (0°C) quanto para os experimentais (8°C) indicaram a presença de alterações na morfologia celular, onde os eritrócitos perderam a forma oval original adquirindo formato irregular (Figuras

14D; 16E-F; 17D-E-F). Lise celular foi observada, havendo rompimento de membranas e extravasamento do citoplasma celular (Figuras 16G-H). Membranas plasmáticas foram alteradas, com ondulações ou saliências (Figuras 16C; 17G), havendo formação de vesículas (Figuras 14D; 16D; 17H-I) e deslocamento nuclear para a periferia da célula (Figuras 15A; 17J). Alterações nucleares, como a presença de micronúcleos (Figura 15B), bolhas nucleares ou “*Blebbled*”, caracterizado pela perda no formato elipsoidal da membrana do núcleo, podendo apresentar protuberâncias no núcleo contendo cromatina (Figura 15C) e núcleo com fissura ou “*Notched*”, caracterizado por corte ou invaginação do envelope nuclear (Figuras 15D; 17K) foram observadas.

Os valores médios e o erro padrão (EP) das alterações morfológicas observadas neste trabalho estão representados na Tabela 4 para *N. coriiceps* e Tabela 5 para *N. rossii*.

O aquecimento em 8°C não influenciou na proporção de células maduras e eritroblastos, em ambas as espécies analisadas, mas ao longo do tempo esta proporção variou somente em *N. rossii* a 0°C. (Tabelas 4 e 5). A frequência de eritrócitos apresentando alterações de formato celular (EFC) foi influenciada pelo aumento da temperatura (8°C) em ambas as espécies analisadas (Tabelas 4 e 5). Em *N. coriiceps* em 1 dia a 8°C ($16,30 \pm 4,63$) a frequência de EFC foi 9,3 vezes maior quando comparada a 0°C ($1,75 \pm 0,94$) enquanto que em 3 dias a 8°C ($14,56 \pm 2,01$) a frequência de EFC foi 2,4 vezes maior quando comparada a 0°C ($6,11 \pm 1,55$) (Tabela 4). Em *N. rossii* em 6 dias a 8°C ($3,11 \pm 0,68$) houve aumento de 9,4 vezes na frequência de EFC quando comparados a 0°C ($0,33 \pm 0,24$). Ao longo dos tempos, apenas em *N. rossii* a 0°C foi observada diferença na frequência de EFC entre 1 e 6 dias (Tabela 5).

O aquecimento em 8°C influenciou na frequência de eritrócitos com formação de vesículas na membrana plasmática (EVM) somente em *N. coriiceps* (Tabelas 4 e 5). Em 1 dia a 8°C ($63,20 \pm 7,38$) a frequência de EVM foi 3,3 vezes maior comparado a 1 dia a 0°C ($19,38 \pm 3,35$). Em ambas as espécies, ao longo dos tempos de exposição não foram observadas diferenças nas frequências de EVM (Tabelas 4 e 5).

Em *N.coriiceps* e *N. rossii* a frequência de deslocamento nuclear (EDN) e micronúcleo ($E\mu$) não foram influenciados pelo aumento da temperatura nem ao longo do tempo (Tabelas 4 e 5).

A frequência de alterações na morfologia nuclear com bolhas nucleares ou *Blebbled* (EBN) foram influenciadas pelo aquecimento em 8°C em ambas as espécies analisadas (Tabelas 4 e 5). Em *N. coriiceps* em 3 dias a 8°C ($27,78 \pm 5,49$) a frequência (EBN) foi 3,8 vezes maior quando comparada a 0°C ($7,22 \pm 1,27$) enquanto que em 6 dias a 8°C ($29,78 \pm 5,02$) a frequência de EBN foi 3 vezes maior quando comparada a 0°C ($9,90 \pm 1,79$) (Tabela 4). Em *N. rossii* a frequência de EBN em 6 dias a 8°C ($27,22 \pm 1,85$) foi 2,2 vezes maior quando comparada a 0°C ($12,33 \pm 1,55$) (Tabela 5). Em ambas as espécies, ao longo dos tempos de exposição não foram observadas diferenças nas frequências de EBN (Tabelas 4 e 5).

A frequência de alterações na morfologia nuclear do tipo fissura nuclear ou "*Notched*" (EFN) foi influenciada pelo aquecimento em 8°C somente em *N. coriiceps* (Tabelas 4 e 5). Em 6 dias a 8°C ($8,78 \pm 1,66$) a frequência de EFN foi 3,6 vezes maior quando comparada a 0°C ($2,40 \pm 0,62$). Em ambas as espécies, ao longo dos tempos de exposição não foram observadas diferenças nas frequências de EFN (Tabelas 4 e 5).

Para ambas as espécies obtiveram-se as medidas do maior eixo celular e nuclear (μm), menor eixo celular e nuclear (μm) e volume celular e nuclear (μm^3). Em ambas as espécies *N. coriiceps* (Tabela 6) e *N. rossii* (Tabela 7) o aumento da temperatura não influenciou na medida dos eixos e volume celular e nuclear dos eritrócitos e não houve diferença entre os grupos experimentais (8°C) e os grupos controles (0°C). Em *N. coriiceps* 0°C em 1 dia registrou-se que o menor eixo do eritrócito foi em média 12,53% e 11,47% maior quando comparado a 3 e 6 dias, respectivamente. E o volume do eritrócito em 1 dia 0°C foi 25,3% e 19,35% maior quando comparado a 3 e 6 dias, respectivamente. Em *N.rossii* o tempo não influenciou na alteração dos parâmetros analisados.

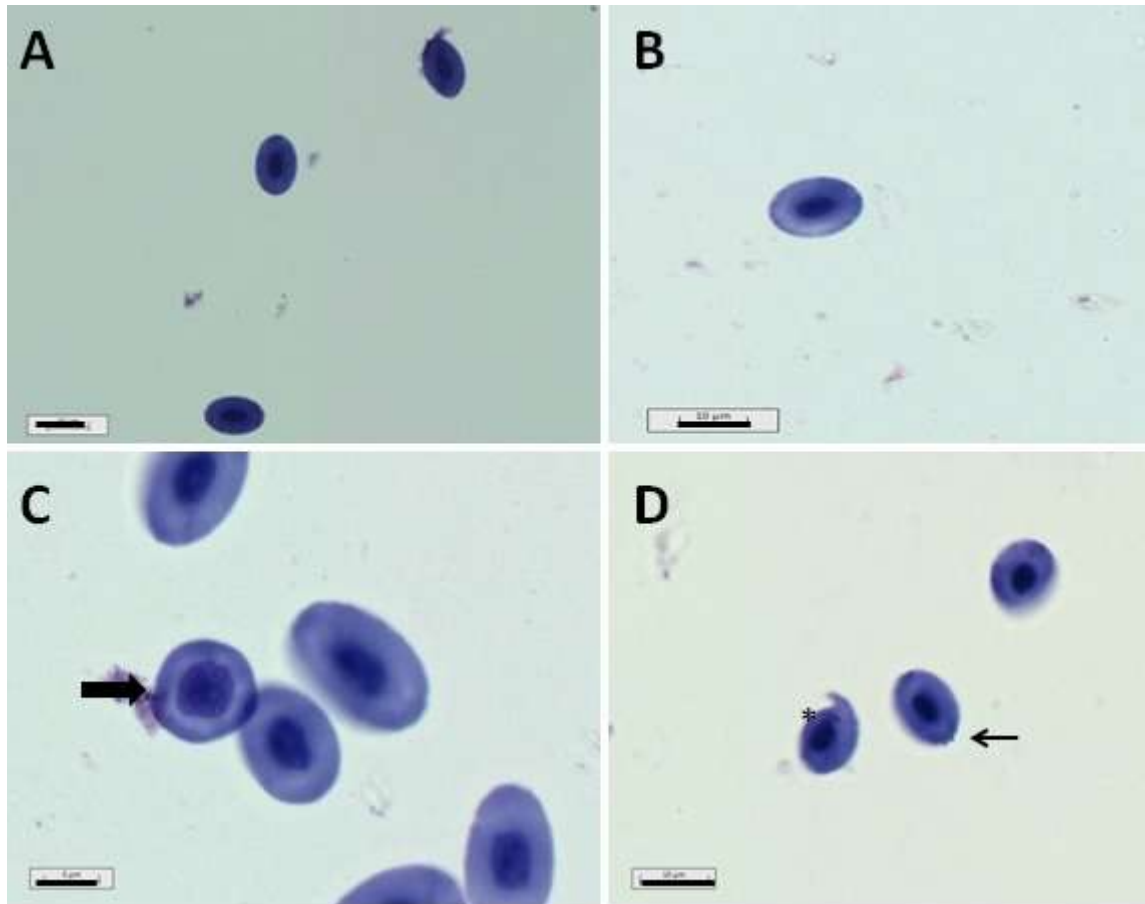


Figura 14: Morfologia de eritrócitos maduros e alterações morfológicas observadas em *N. coriiceps* e *N. rossii* em microscopia de luz. A e B Eritrócitos de *N. coriiceps* e *N. rossii*, respectivamente, a 0°C - 6 dias (considerados controle) (barra = 10 µm). C: Eritroblasto de *N. rossii* a 8°C - 1 dia (seta larga preta)(barra = 5 µm). D: Eritrócitos de *N. rossii* a 8°C - 6 dias com alteração na morfologia celular (asteristo) e formação de vesículas de membrana. Vesículas em formação (seta estreita preta) (barra = 10 µm).

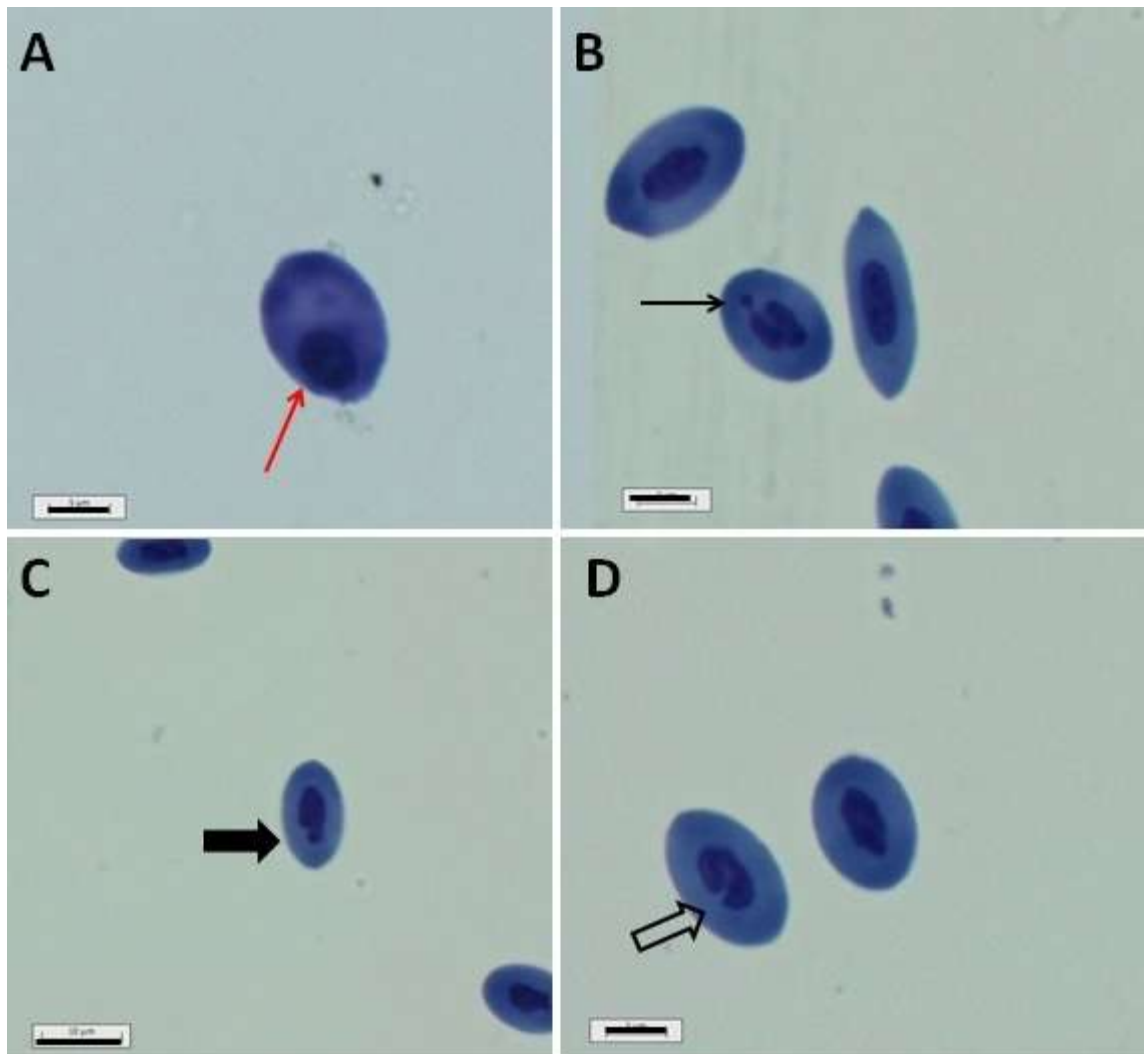


Figura 15: Alterações morfológicas em eritrócitos de *N. coriiceps* e *N. rossii* observadas em microscopia de luz. A: Eritrócito de *N. coriiceps* a 0°C – 6 dias com deslocamento de núcleo (seta vermelha) (barra = 5 μ m) B: Eritrócito de *N. coriiceps* a 8°C - 3 dias com presença de micronúcleo (seta preta fina) (barra = 5 μ m). C: Eritrócito de *N. coriiceps* a 8°C - 3 dias apresentando alteração na morfologia nuclear, em *bledd* (seta larga). (barra = 10 μ m) D: Eritrócito de *N. coriiceps* a 8°C - 3 dias com fissura nuclear (seta vazada) (barra = 5 μ m).

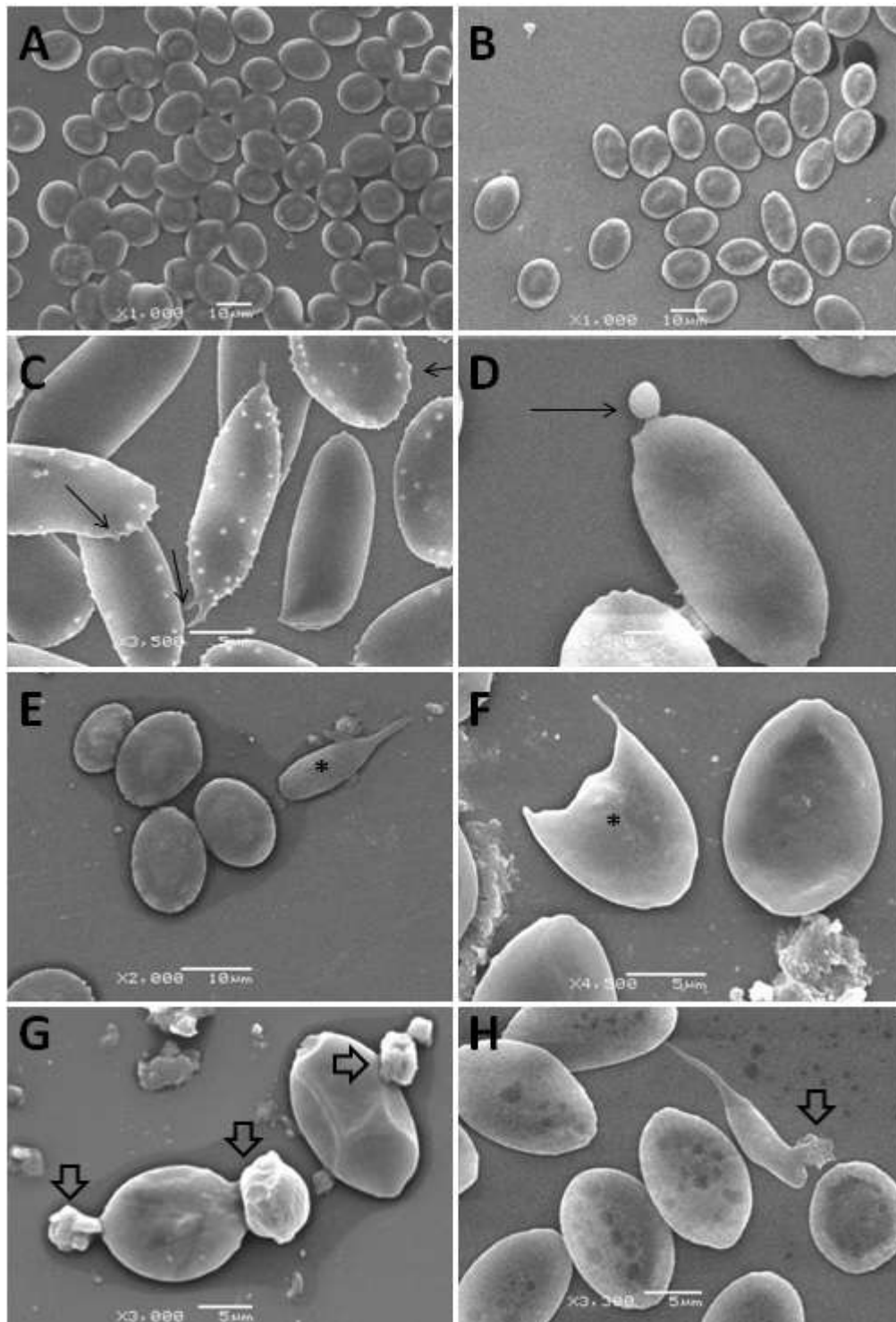


Figura 16: Alterações morfológicas em eritrócitos de *N. coriiceps* e *N. rossii* observadas em microscopia eletrônica de varredura. A e B- Eritrócitos de *N. coriiceps* e *N. rossii*, respectivamente, a 0°C por 6 dias (considerados controle). C- *Notothenia rossii* 0°C – 6 dias: Eritrócito com ondulações ou saliências na membrana (setas finas pretas). D- *N. coriiceps* 8°C – 6 dias: Eritrócito com formação de vesícula de membrana. Vesículas em formação (seta fina preta). E- *N. rossii* 8°C – 1 dia e F- *N. coriiceps* 8°C – 3 dias: Eritrócitos com alteração na morfologia celular (asteristo), com perda do formato elipsoidal. G- *N. rossii* 8°C – 6 dias e H- *N. coriiceps* 8°C – 6 dias: Eritrócitos com extravazamento citoplasmático (setas vazadas).

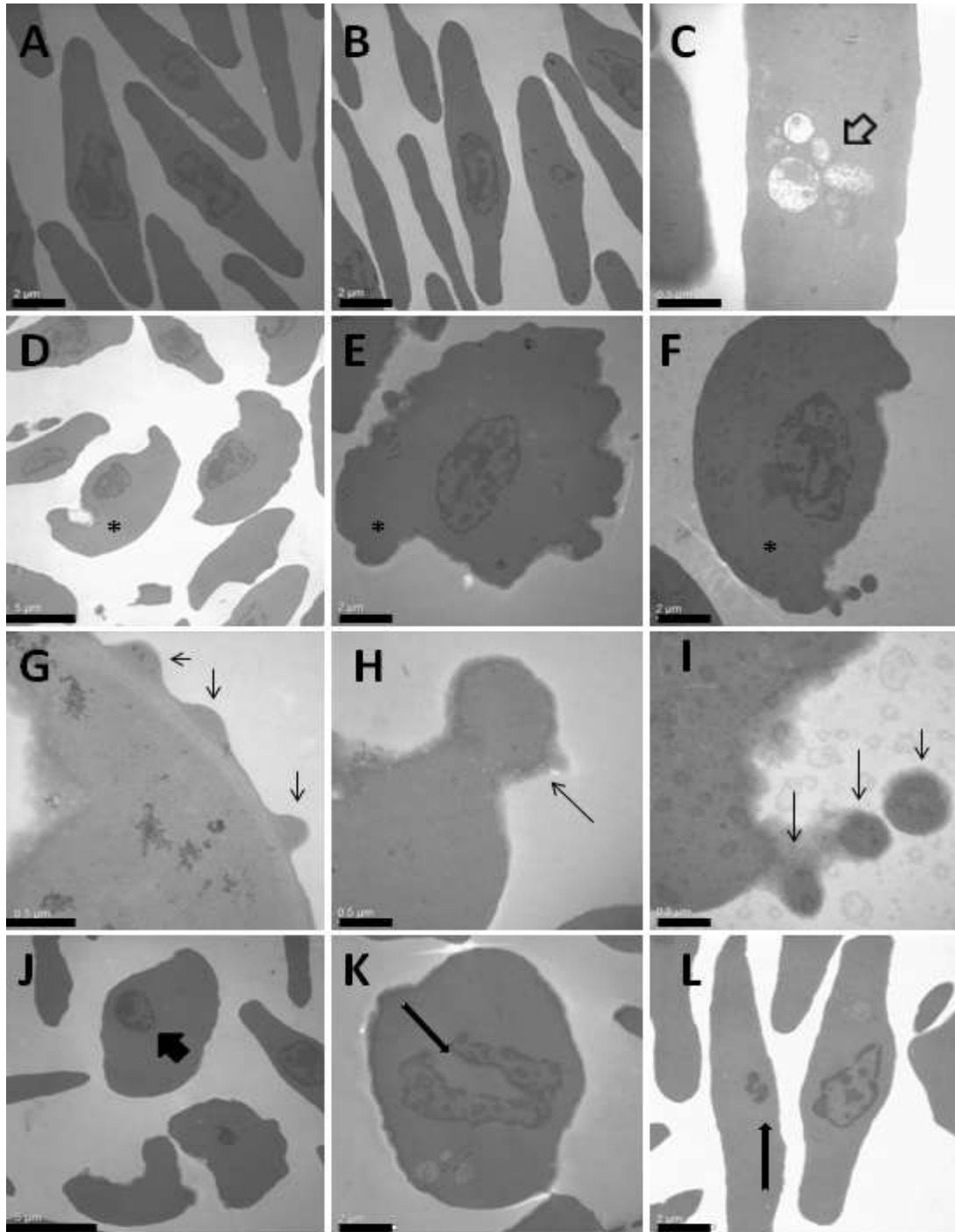


Figura 17: Alterações morfológicas em eritrócitos de *N. coriiceps* e *N. rossii* observadas em microscopia eletrônica de transmissão. A- *N. coriiceps* 0°C – 6 dias e B- *N. rossii* 0°C – 3 dias: Eritrócitos com morfologia celular e nuclear regulares, considerados controle (barra = 2 µm). C- *N. coriiceps* 0°C – 1 dia: Citoplasma de eritrócito apresentando compartimentos limitados por membrana (seta vazada) (barra = 0,5 µm). D- *N. coriiceps* 8°C – 3 dias (barra = 5 µm). E- *N. rossii* 8°C – 3 dias (barra = 2 µm) e F- *N. rossii* 8°C – 6 dias (barra = 2 µm): Eritrócito com alterações na morfologia celular (asterisco). G- *N. rossii* 0°C – 1 dia: Eritrócito com ondulações ou saliências na membrana (seta fina) (barra = 0,5 µm). H- *N. rossii* 8°C – 3 dias e I- *N. rossii* 8°C – 6 dias: Eritrócito com formação de vesículas na membrana celular, sendo Vesículas em formação ou sendo liberadas (seta fina) (barra = 0,5 µm). J- *N. coriiceps* 8°C – 1 dia: Eritrócito apresentando deslocamento nuclear (seta entalhada) (barra = 5 µm).. K- *N. coriiceps* 8°C – 6 dias: Eritrócito com fissura nuclear (seta entalhada) (barra = 2 µm). L- *N. coriiceps* 8°C 1 dia: Eritrócito com núcleo apresentando intensa heterocromatinização (seta entalhada) (barra = 2 µm).

Tabela 4: Frequência das alterações morfológicas nos eritrócitos de *Notothenia coriiceps*, submetidos às temperaturas de 0° e 8°C por 1,3 e 6 dias. Média (\pm EP) da proporção entre células maduras e eritroblastos, no número de células maduras, número de células com alteração na forma celular e da membrana plasmática e alterações nucleares (núcleo deslocado, micronúcleo alterado, em forma de fenda ou disforme) observados em 1000 eritrócitos. O resultado da ANOVA não paramétrica comparando os grupos experimentais é apresentado, os asteriscos sobre o p indicam interações significativas. As letras sobrescritas indicam os resultados do pós-teste entre os tempos para cada temperatura investigada e os asteriscos indicam a diferença entre as temperaturas para cada um dos tempos.

| | | 0°C | | | 8°C | | | Kruskal-Wallis | p |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------|---------|
| | | 1 dia | 3 dias | 6 dias | 1 dia | 3 dias | 6 dias | | |
| Proporção células maduras (EM) /eritroblastos (EB) | | 3,22 \pm 0,30 | 2,45 \pm 0,24 | 3,12 \pm 0,28 | 4,11 \pm 0,64 | 3,24 \pm 0,66 | 3,07 \pm 0,25 | 5,72 | 0,33 |
| Células em maturação (EB) | | 31,13 \pm 2,81 | 23,89 \pm 2,26 | 30,20 \pm 2,62 | 39,20 \pm 5,90 | 31,11 \pm 6,03 | 29,78 \pm 2,32 | 5,83 | 0,32 |
| Alteração celular | Formato (EFC) | 1,75 \pm 0,94* | 6,11 \pm 1,55* | 4,90 \pm 0,57 | 16,30 \pm 4,63 | 14,56 \pm 2,01 | 5,89 \pm 0,56 | 28,02 | <0,001* |
| | Formação de vesículas (EVM) | 19,38 \pm 3,35* | 14,56 \pm 2,05 | 27,80 \pm 3,14 | 63,20 \pm 7,38 | 28,44 \pm 5,31 | 25,56 \pm 1,93 | 30,89 | <0,001* |
| | Deslocamento (EDN) | 7,13 \pm 1,73 | 9,00 \pm 2,07 | 12,70 \pm 3,79 | 5,20 \pm 0,70 | 5,44 \pm 1,92 | 7,44 \pm 1,96 | 4,97 | 0,42 |
| Alteração Nuclear | Micronúcleo (E μ) | 1,00 \pm 0,38 | 0,67 \pm 0,29 | 0,20 \pm 0,13 | 1,10 \pm 0,43 | 0,75 \pm 0,30 | 0,63 \pm 0,35 | 4,51 | 0,48 |
| | Bolha nuclear ou <i>Blebbed</i> (EBN) | 20,63 \pm 2,85 | 7,22 \pm 1,27* | 9,90 \pm 1,79* | 21,70 \pm 2,44 | 27,78 \pm 5,49 | 29,78 \pm 5,02 | 27,36 | <0,001* |
| | Fissura nuclear (EFN) | 5,38 \pm 0,53 | 2,67 \pm 0,87 | 2,40 \pm 0,62* | 5,80 \pm 1,12 | 7,67 \pm 1,86 | 8,78 \pm 1,66 | 17,10 | <0,001* |

Tabela 5: Frequência das alterações morfológicas de eritrócitos de *Notothenia rossii*, submetidos às temperaturas de 0° e 8°C por 1, 3 e 6 dias. Média (\pm EP) da proporção entre células maduras e eritroblastos, no número de células maduras, número de células com alteração na forma celular e da membrana plasmática e alterações nucleares (núcleo deslocado, micronúcleo alterado, em forma de fenda ou disforme) observados em 1000 eritrócitos. O resultado da ANOVA não paramétrica comparando os grupos experimentais é apresentado, os asteriscos sobre o p indicam interações significativas. As letras sobrescritas indicam os resultados do pós-teste entre os tempos para cada temperatura investigada e os asteriscos indicam a diferença entre as temperaturas para cada um dos tempos.

| | | 0°C | | | 8°C | | | Kruskal -Wallis | p |
|--------------------------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------|
| | | 1 dia | 3 dias | 6 dias | 1 dia | 3 dias | 6 dias | | |
| Proporção células maduras (EM)/eritroblastos(EB) | | 3,55 \pm 0,40 ^a | 2,09 \pm 0,19 ^b | 1,74 \pm 0,12 ^b | 3,19 \pm 0,40 | 2,79 \pm 0,13 | 2,75 \pm 0,38 | 24,95 | <0,001* |
| Células em maturação | | 34,17 \pm 3,74 ^a | 20,44 \pm 1,77 ^b | 17,11 \pm 1,17 ^b | 30,78 \pm 3,72 | 27,10 \pm 1,24 | 26,67 \pm 3,58 | 24,95 | <0,001* |
| Alteração celular | Formato(EFC) | 4,17 \pm 0,48 ^a | 0,89 \pm 0,20 ^{ab} | 0,33 \pm 0,24 ^{b*} | 5,11 \pm 1,65 | 3,40 \pm 0,79 | 3,11 \pm 0,68 | 26,62 | <0,001* |
| | Formação de vesículas (EVM) | 28,83 \pm 3,96 | 22,56 \pm 2,76 | 18,89 \pm 1,79 | 35,78 \pm 3,90 | 26,10 \pm 0,98 | 43,33 \pm 4,11 | 26,71 | <0,001* |
| | Deslocamento | 6,00 \pm 2,97 | 4,44 \pm 1,28 | 5,00 \pm 2,19 | 7,33 \pm 2,12 | 5,80 \pm 0,94 | 2,78 \pm 0,55 | 6,79 | 0,24 |
| Alteração Nuclear | Micronúcleo | 0,33 \pm 0,21 | 0,00 | 0,22 \pm 0,22 | 1,22 \pm 0,43 | 0,40 \pm 0,16 | 1,44 \pm 0,85 | 12,98 | 0,02* |
| | Bolha nuclear ou <i>Blebbed</i> (EBN) | 13,17 \pm 3,66 | 10,67 \pm 1,24 | 12,33 \pm 1,55 [*] | 18,33 \pm 2,40 | 15,40 \pm 1,84 | 27,22 \pm ,85 | 23,66 | <0,001* |
| | Fissura nuclear (EFN) | 2,83 \pm 0,95 | 2,44 \pm 0,77 | 2,67 \pm 0,83 | 7,22 \pm 2,40 | 4,00 \pm 0,67 | 2,44 \pm 1,43 | 13,12 | 0,02* |

Tabela 6: Medida de maior eixo, menor eixo e volume celular e nuclear de eritrócitos de *Notothenia coriiceps*, submetidos às temperaturas de 0° e 8°C por 1,3 e 6 dias. São apresentados a média \pm EP (mínimo-máximo) e número de indivíduos dos eixos maior e menor da célula e do núcleo do eritrócito e volume celular e nuclear. O resultado da ANOVA duas vias (co-fatores utilizados tempo (t) e temperatura (te)) comparando os grupos experimentais são apresentados, os asteriscos indicam interações significativas e as letras sobrescritas indicam os resultados do pós-teste Tukey entre os tempos para cada temperatura e os asterisco indicam a diferença entre as temperaturas para cada um dos tempos investigados.

| | | 0°C | | | 8°C | | | ANOVA | |
|----------------------|------------|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------|
| | | 1 dia | 3 dias | 6 dias | 1 dia | 3 dias | 6 dias | F | P |
| Eritrócito | Maior eixo | 12,42 \pm 0,04 (8,01-19,05) 1785 | 12,11 \pm 0,03 (6,96-17,56) 2482 | 12,84 \pm 0,03 (6,52-18,20) 2239 | 12,82 \pm 0,03 (7,19-19,30) 2250 | 12,40 \pm 0,03 (7,54-17,94) 2233 | 12,14 \pm 0,03 (7,12-19,06) 2225 | T: 0,00 TE: 1,10 TXTE: 2,80 | 0,98 0,34 0,07 |
| | Menor eixo | 9,41 \pm 0,03 ^A (6,06-13,52) 1785 | 8,23 \pm 0,02 ^B (4,30-11,75) 2500 | 8,33 \pm 0,02 ^B (4,45-11,78) 2250 | 8,72 \pm 0,02 (5,48-12,40) 2250 | 8,64 \pm 0,02 (4,23-12,16) 2250 | 8,21 \pm 0,03 (4,08-11,97) 2250 | T: 0,52 TE: 6,56 TXTE: 2,89 | 0,47 0,00* 0,06 |
| | Volume | 589,4 \pm 4,1 ^A (168,7- 1307,2) 1777 | 440,2 \pm 2,9 ^B (99,2- 1120,0) 2482 | 475,4 \pm 3,0 ^{AB} (110,0- 1106,0) 2239 | 521,0 \pm 3,3 (169,7- 1391,4) 2250 | 490,6 \pm 2,7 (116,2- 1074,8) 2233 | 438,1 \pm 3,0 (97,7-1021,7) 2225 | T: 0,56 TE: 6,64 TXTE: 2,28 | 0,46 0,03* 0,11 |
| Núcleo do eritrócito | Maior eixo | 5,88 \pm 0,02 (3,48-12,87) 1793 | 5,48 \pm 0,02 (2,73-10,95) 2500 | 5,90 \pm 0,02 (3,40-8,88) 2250 | 5,93 \pm 0,02 (2,27-8,98) 2250 | 5,83 \pm 0,02 (3,34-13,53) 2248 | 5,46 \pm 0,02 (3,02-9,23) 2250 | T: 0,00 TE: 2,11 TXTE: 5,00 | 0,95 0,13 0,01* |
| | Menor eixo | 3,43 \pm 0,02 (1,09-11,41) 1790 | 3,07 \pm 0,01 (1,00-5,87) 2495 | 3,17 \pm 0,02 (0,91-6,06) 2245 | 3,37 \pm 0,01 (0,98-5,83) 2250 | 3,30 \pm 0,02 (1,37-8,91) 2250 | 3,08 \pm 0,02 (1,00-6,08) 2248 | T: 0,19 TE: 4,79 TXTE: 2,01 | 0,67 0,01* 0,14 |
| | Volume | 38,62 \pm 0,54 (6,16-378,83) 1785 | 29,05 \pm 0,31 (3,26-97,43) 2488 | 33,60 \pm 0,40 (3,96-141,25) 2239 | 37,45 \pm 0,37 (4,63-114,87) 2243 | 34,67 \pm 0,35 (4,73-217,99) 2245 | 29,03 \pm 0,33 (2,55-116,85) 2246 | T: 0,00 TE: 4,43 TXTE: 2,44 | 0,98 0,02* 0,10 |

Tabela 7: Medida de maior eixo, menor eixo e volume celular e nuclear de eritrócitos de *Notothenia rossii*, submetidos às temperaturas de 0° e 8°c por 1,3 e 6 dias. São apresentados a média \pm ep (mínimo-máximo) e número de indivíduos dos eixos maior e menor da célula e do núcleo do eritrócito e volume celular e nuclear. O resultado da ANOVA não paramétrica comparando os grupos experimentais são apresentados, os asteriscos indicam interações significativas e as letras sobrescritas indicam os resultados do pós-teste entre os tempos para cada temperatura e os asteriscos indicam a diferença entre as temperaturas para cada um dos tempos investigados.

| | | 0°C | | | 8°C | | | Kruskal -Wallis | P |
|-------------------------|------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------|---------|
| | | 1 dia | 3 dias | 6 dias | 1 dia | 3 dias | 6 dias | | |
| Eritrócito | Maior eixo | 14,72 \pm 0,04 (10,67-21,79) 1363 | 15,14 \pm 0,13 (1,83-72,33) 2095 | 14,06 \pm 0,03 (9,18-18,54) 2398 | 13,96 \pm 0,07 (1,20-20,30) 991 | 13,75 \pm 0,03 (8,57-18,63) 2250 | 13,00 \pm 0,06 (8,43-20,39) 1065 | 21,80 | <0,001* |
| | Menor eixo | 9,66 \pm 0,04 (4,11-13,26) 1357 | 9,18 \pm 0,03 (1,31-14,39) 2100 | 9,43 \pm 0,02 (1,96-13,47) 2396 | 9,16 \pm 0,05 (4,48-13,28) 990 | 8,71 \pm 0,02 (5,28-12,85) 2247 | 9,40 \pm 0,05 (5,12-13,77) 1069 | 12,29 | 0,03* |
| | Volume | 734,1 \pm 5,9 (121,3-1833,9) 1357 | 688,2 \pm 8,3 (19,5- 5074,7) 2094 | 670,0 \pm 3,9 (35,4-1480,5) 2393 | 640,53 \pm 8,3 (190,3- 1465,1) 989 | 554,7 \pm 3,3 (172,4- 1276,3) 2247 | 630,6 \pm 8,2 (115,6- 1846,7) 1064 | 13,57 | 0,02* |
| Núcleo do eritrócito | Maior eixo | 5,75 \pm 0,03 (2,01-8,88) 1363 | 5,78 \pm 0,02 (1,01-13,02) 2099 | 5,72 \pm 0,02 (3,25-8,66) 2400 | 5,96 \pm 0,03 (3,13-9,27) 991 | 5,83 \pm 0,02 (3,18-10,02) 2249 | 5,40 \pm 0,04 (2,86-12,13) 1070 | 3,28 | 0,66 |
| | Menor eixo | 3,18 \pm 0,02 (0,93-6,38) 1363 | 3,08 \pm 0,02 (0,91-5,67) 2100 | 3,12 \pm 0,01 (0,92-5,40) 2400 | 3,18 \pm 0,02 (1,46-5,66) 991 | 3,37 \pm 0,02 (0,81-8,96) 2249 | 3,22 \pm 0,03 (1,5-11,2) 1070 | 7,38 | 0,19 |
| | Volume | 32,10 \pm 0,41 (3,05-107,97) 1363 | 30,38 \pm 0,34 (2,41- 114,57) 2099 | 30,70 \pm 0,28 (1,99-85,24) 2399 | 33,90 \pm 0,56 (6,72-116,31) 991 | 38,47 \pm 0,62 (1,94-333,17) 2248 | 33,06 \pm 0,75 (4,97-204,85) 1069 | 7,53 | 0,18 |

5. DISCUSSÃO

Os eritrócitos são células sensíveis ao estresse oxidativo (CIMEM, 2008; HUA-TAO LI *et al.*, 2013), por desempenharem papel central no transporte de O₂ e CO₂. O citoplasma dos eritrócitos apresenta concentrações elevadas de ferro e oxigênio, que em combinação podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) (HUA-TAO LI *et al.*, 2013). Estudos indicam que os eritrócitos possuem mecanismos responsáveis pela defesa frente à formação de ânion superóxido, em consequência das altas concentrações de oxigênio que é transportado por essas células (HOLETON, 1970; CASSINI *et al.* 1993). Embora a geração de EROs seja parte integrante do metabolismo, pois atuam em várias vias de sinalização celular (IMAI e NAKAGAWA, 2002, GRIM *et al.*, 2013), fatores abióticos externos podem alterar a homeostase redox do organismo gerando o estresse oxidativo (BAGNYUKOVA, 2006), que pode ocasionar danos às moléculas biológicas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; GRIM *et al.*, 2013). Estudos com peixes e invertebrados marinhos demonstraram que a aclimação a temperaturas mais elevadas, principalmente de maneira aguda, resulta em danos oxidativos (PARIHA e DUBEY, 1995; ESTEVEZ *et al.*, 2002;. LUSHCHAK e BAGNYUJOVA, 2006, MUELLER *et al.*, 2012; GRIM *et al.*, 2013). Quando isso acontece, é necessária a rápida remoção das EROs, pelos componentes enzimáticos e não enzimáticos do sistema de defesa antioxidante (JOS *et al.*, 2005; HUA-TAO LI *et al.*, 2013).

Neste trabalho, investigamos se eritrócitos de *N. coriiceps* e *N. rossii*, duas espécies endêmicas da Antártica, sofrem alterações na morfologia celular e possuem a capacidade de passar por ajustes no metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes frente ao aumento da temperatura ambiental. A temperatura de 0°C foi escolhida como controle por estar dentro da faixa média de variação térmica do Oceano Austral (SIDELL, 2000) e da Baía do Almirantado, local de coletas das espécies utilizados neste trabalho. A temperatura de 8°C é uma condição próxima à máxima térmica tolerada pelos

peixes antárticos (SOMERO e DEVRIES, 1967; PÖRTNER *et al.* 2004; LOWE e DAVISON, 2005).

Os padrões de resposta e os perfis ao longo do tempo dos níveis de atividade das enzimas antioxidantes de eritrócitos ao aumento da temperatura ambiental foram diferentes entre *N. coriiceps* e *N. rossii*. Isto pode ser explicado por diferenças fenotípicas espécie – específicas descritas para peixes teleósteos, (MARTÍNEZ- ALVAREZ *et al.*, 2005; GRIM *et al.*, 2011; VINAGRE *et al.*, 2012; GRIM *et al.*, 2013; MADEIRA *et al.*, 2013). AKSNES e LEIF (1981), ao analisarem, nove espécies de peixes da costa norueguesa, verificaram que a atividade de SOD, CAT e GPx pode variar de acordo com a espécie e o tecido analisado, sendo que os níveis de CAT variaram até quatro vezes na mesma família de peixes. WDZIECZAK *et al.*(1981), obtiveram valores significativamente diferentes das atividades de SOD e CAT em eritrócitos de sete espécies de peixes de água doce e quatro marinhas coletados diretamente da natureza.

Há poucos estudos avaliando o efeito da temperatura no sistema de defesa antioxidante de organismos marinhos, sendo que as informações disponíveis envolvem geralmente invertebrados (WISTON *et al.*, 1990; ABELE *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2008; KELLER *et al.*, 2004; BROUWER *et al.*, 2003). Para peixes ainda são escassas as referências disponíveis (VINAGRE *et al.*, 2012), e não há relato do comportamento do metabolismo oxidativo e seus marcadores, analisados neste trabalho, frente ao aumento da temperatura em eritrócitos de peixes antárticos. No entanto, outros marcadores foram utilizados e a aclimação e a tolerância térmica de organismos antárticos a temperaturas elevadas têm sido estudadas (SOMERO e DEVRIES, 1967; BRAUER *et al.*, 2005; LOWE *et al.*, 2005; LANNIG *et al.*, 2005; BRODTE *et al.*, 2006; JIN e DEVRIES 2006; CLARKE *et al.*, 2007; FRANKLIN *et al.*, 2007; CLARK e PECK, 2009; BILYK e DEVRIES, 2011; WINDISCH *et al.*, 2011, JAYASUNDARA, 2013).

SOD e CAT são enzimas importantes no combate à EROs em organismos aquáticos (WINSTON e GIULIOZ, 1991; HUA-TAO LI *et al.*, 2013). A SOD catalisa a dismutação de O_2^{\bullet} em H_2O_2 , sendo este último decomposto pela CAT em O_2 e H_2O (VASCONCELOS *et al.*, 2007), assim as duas enzimas

atuam associadas metabolicamente (AEBI, 1984). A SOD é uma metaloenzima e algumas isoformas estão bem estabelecidas em peixes antárticos (CASSINI *et al.*, 1997; KEN *et al.*, 2002; SANTOVITO *et al.*, 2006). Acredita-se que essa família de metaloenzimas evoluiu para manter-se cataliticamente ativa, mesmo frente aos desafios de pressão térmica (CASSINI *et al.*, 1997; ABELE e PUNTARULO, 2004; LESSER, 2006).

Os níveis de SOD em eritrócitos de *N. rossii*, coletados da natureza, são aproximadamente de 240 U/mg proteína (ANSALDO *et al.*, 2000) enquanto que no presente estudo variaram de $113,05 \pm 9,15$ a $495,30 \pm 76,58$ U/mg proteínas, não possibilitando comparação devido as condições experimentais envolvidas. Para *N. coriiceps* os níveis basais encontrados na natureza não são documentados. O aquecimento em 8°C não alterou os níveis de atividade da SOD em eritrócitos de *N. coriiceps* enquanto que em *N. rossii* modulou positivamente. Apesar, de trabalharem com outros tipos celulares e tecidos, MULLER *et al.* (2012) ao analisarem tecidos cardíaco e muscular de *N. coriiceps* e outras espécies de peixes antárticos também não encontraram alteração nos níveis de SOD ao expor os animais a sua temperatura crítica máxima (CTMax). Em peixes não antárticos, a não modulação da SOD foi observada por BAGNYKOVA (2007) em cérebro, fígado e rins do peixe de água doce *Carassius auratus* transferidos de 3°C para 23°C por até 5 dias e por GRIM *et al.* (2010) no músculo cardíaco das espécies marinhas *Fundulus heteroclitus macrolepidotus* e *Lepomis macrochirus* mantidos em 25°C durante dois meses. A modulação positiva da SOD em peixes de água doce foi verificada por PARIHAR *et al.* (1997) nas brânquias de *Heteropneustes fossilis* transferidos de 25°C para 32°C ou 37°C por até 4 horas e por LUSHCHAK (2006) nos rins, cérebro e músculo de *C. auratus*, exposto a 35°C durante 1-12 horas. Estes estudos, como os resultados encontrados por nós, sugerem que a modulação da SOD frente ao aumento da temperatura pode estar relacionada ao tempo de exposição. Neste trabalho, não analisamos os níveis de SOD nas horas iniciais do aquecimento a 8°C, isto é, antes de 24 horas, no entanto, nossos resultados indicam que, para *N.rossii* seis dias é tempo suficiente para que ocorra a modulação positiva da SOD frente ao aquecimento a 8°C enquanto que para *N.coriiceps* não, o que pode indicar que os eritrócitos

desta espécie não foram capazes de aumentar a expressão de SOD frente ao desafio térmico, ou que o aumento da temperatura pode ter prejudicado a atividade da enzima, levando ao maior acúmulo de radicais O_2^\bullet na célula.

Os níveis de CAT em *N. coriiceps* foram modulados negativamente frente ao estresse térmico, enquanto que em *N. rossii* houve inicialmente aumento (modulação positiva) seguido de queda (modulação negativa) na atividade da CAT. Resultados semelhantes foram encontrados por VINAGRE *et al.* (2012) em músculo do peixe marinho *Dicentrarchus labrax* exposto a 18°C (controle), 24°C e 28°C (experimentais) por até 30 dias. A resposta ao estresse oxidativo, para a CAT pode ser dependente do tempo de exposição à temperaturas elevadas, sendo menor fora do ótimo de temperatura para a espécie (VINAGRE *et al.* 2012), como o observado neste trabalho para *N. coriiceps* em todos os tempos analisados. Estes dados sugerem que *N. coriiceps* é mais susceptível ao aumento da temperatura quando comparado a *N. rossii* que apresentou níveis menores de CAT somente em 6 dias. Já, trabalhos com peixes aclimatados a altas temperaturas e a curto período de tempo (inferior a 24 horas) os resultados encontrados são diferentes. MUELLER *et al.* (2012), não verificaram modulação dos níveis de CAT no coração e músculo em *N. coriiceps* exposta a sua CTMax que foi de $17,1 \pm 0,2$ °C durante 4,5 horas e por LUSHCHAK (2006) em fígado de *C. auratus*, onde houve diminuição de 40% nos níveis de CAT após 1 hora de choque térmico retornando aos níveis iniciais após 6 horas. BAGNYKOVA (2006) verificou em *C. auratus*, coletados na natureza, que a atividade da CAT não foi alterada ao longo do inverno e verão, sugerindo que talvez as EROs geradas pelo aumento da temperatura possam ter sido neutralizadas pelas defesas antioxidantes não enzimáticas e que a não modulação da CAT esteja associada à sua localização intracelular em peroxissomas. BENEDETTI (2010) analisou o efeito da sazonalidade sobre os níveis da CAT no fígado de três nototenídeos antárticos do gênero *Trematomus* e verificou que a atividade da CAT nos peixes antárticos é menor do que em peixes de clima temperado e que a capacidade de decompor peróxido de hidrogênio via CAT não é reforçada em peixes antárticos. FRIDOVICH (1974), sugeriu que a CAT não é regulada de acordo

com a necessidade da célula, ou seja, não haveria aumento na expressão da enzima, mesmo com o aumento intracelular de peróxidos.

GPx, GST e GR são enzimas antioxidantes dependentes de GSH e estão relacionadas principalmente a biomarcadores para poluição ambiental, exposição a xenobiontes e metais pesados em peixes tropicais (BAINY *et al.*, 1996; STEGEMAN *et al.*, 1992, LACKNER, 1998) e antárticos (BENETTI *et al.*, 2007; GHOSH *et al.*, 2013). Porém esses marcadores já foram utilizados para avaliar estresse oxidativo induzido pelo estresse térmico em peixes tropicais e temperados (HEISE *et al.*, 2006; BAGNYUKOVA *et al.*, 2007; LEGGATT *et al.*, 2007; GRIM *et al.*, 2013).

A GPx é uma selenoproteína que reduz hidroperóxidos (H_2O_2) a água (H_2O) e oxigênio (O_2) convertendo GSH em GSSG (BRIGELIUS-FLOHE, 1999). A GST catalisa a conjugação de GSH a metabólitos tóxicos facilitando a excreção destas substâncias (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), além de serem importantes para a desintoxicação dos peróxidos lipídicos (RUDNEVA *et al.*, 2010). A GR é uma flavoproteína dependente de NADPH, importante no metabolismo oxidativo pois recupera glutathiona oxidada para a forma reduzida (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), sendo esta recuperação importante pois mantém ativo e íntegro o sistema celular de proteção antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Em *N. coriiceps* e *N. rossii*, o aquecimento em 8°C não influenciou a atividade de GPx. Resultados semelhantes foram obtidos por GRIM *et al.* (2013) em músculos cardíaco e esquelético de robalo (*Morone saxatilis*) aclimatados a 25°C por seis semanas. LEGGATT (2007) submeteu linhagens de células hepáticas (RTH-149) do peixe de água doce *Oncorhynchus mykiss* a alterações de temperatura e verificou que a atividade da GPx não é modulada pela temperatura. Brânquias e glândula digestiva do molusco antártico *Lanternula elliptica* aumentaram sua atividade de GPx após doze horas de estresse térmico (PARK *et al.*, 2008). Estudos indicam que peixes antárticos apresentam níveis mais elevados de defesas antioxidantes quando comparados a peixes tropicais (GRIM *et al.*, 2013) e análises de microarranjo revelaram que a GPx é up-regulada em tecidos de notothenídeos antárticos quando comparados à peixes de clima temperado (CHEN *et al.*, 2008). O que

pode explicar a não modulação da enzima sob estresse oxidativo, em *N. coriiceps* e *N. rossii*, no presente estudo.

Nos eritrócitos de *N. coriiceps* a temperatura de 8°C modulou positivamente a atividade de GST em 3 dias enquanto que em *N. rossii* modulou negativamente em 6 dias. RUDNEVA *et al.* (2010), ao analisarem espécies de peixes teleósteos e elasmobrânquios descreveram que a atividade de GST em eritrócitos é inferior aos valores encontrados no fígado e que há diferenças interespecíficas na atividade da GST nos eritrócitos. Ao induzirem o estresse térmico, em peixes marinhos, MADEIRA *et al.* (2013) verificaram aumento na atividade de GST muscular, após exposição a sua CTMáx e concluíram que embora o aumento tenha sido registrado, é possível observar a depleção da atividade do antioxidante devido à desnaturação da proteína, sendo a hipertermia capaz de reduzir as defesas antioxidantes. O aumento leve de estresse oxidativo é capaz de induzir o aumento da atividade de GST, mas em casos de forte estresse oxidativo a enzima pode ter sua atividade suprimida (LI *et al.*, 2010), o que pode ter ocorrido em *N.rossii* especificamente neste caso, onde houve redução da GST frente ao estresse térmico quando comparada ao controle.

O aumento da temperatura (8°C) modulou positivamente os níveis de GR somente em *N. coriiceps* em 1 e 3 dias. Estes resultados podem estar diretamente ligados a não modulação de GSH, em *N. coriiceps*, pois o aumento da atividade da GR seria capaz de manter os níveis de GSH. Entretanto, são necessários estudos complementares, pois mesmo sem a modulação da GR em *N. rossii* não se observou queda nos níveis de GSH. Estes resultados podem estar relacionados à ação de múltiplos sistemas alternativos presentes no citosol do eritrócito capazes de reduzir GSSG e manter os níveis de GSH suficientemente altos frente ao estresse oxidativo (MORGAN *et al.*, 2012). A GSH é um antioxidante não enzimático de baixo peso molecular, importante por neutralizar EROs e servir de cofator para várias enzimas GSH - dependentes (HALLIWELL e GUTTERIGDE, 2007; GRIM *et al.*, 2013). Assim a GSH é utilizada como biomarcador para estresse oxidativo induzido principalmente por contaminação ambiental (ATLI e CANLI, 2008; ZANG *et al.*, 2008), sendo que a diminuição na concentração de GSH indicaria estresse

agudo e o aumento da adaptação à detoxificação (VAN DER OOST *et al.*, 2003). Em eritrócitos uma das funções de GSH é proteger a célula contra a formação espontânea de metahemoglobina (CIMEN, 2008). Se esgotados de GSH os eritrócitos tornam-se muito sensíveis ao estresse oxidativo (LI *et al.*, 2006).

Os eritrócitos de peixes, assim como de outros vertebrados, são células susceptíveis à peroxidação lipídica (LPO), pois apresentam alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados em sua membrana e à presença de hemoglobina. Acredita-se que a maior causa de hemólise seja a desnaturação oxidativa da membrana de eritrócitos por LPO (LACKNER, 1998). A LPO pode ser explicada como uma reação em cadeia iniciada pela reação de um radical livre (um oxigênio molecular) com um ácido graxo insaturado, resultando em radicais peróxilas (BENZIE, 1996; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; LIMA e ABDALLA, 2001), que podem reagir com o DNA, e outras moléculas biológicas (GUTTERIDGE, 1995). A LPO pode ainda afetar membranas biológicas, diminuindo a fluidez, alterando potencial de membrana e permeabilidade, ocasionando eventualmente a ruptura da estrutura (GUTTERIDGE, 1995; DUTRA *et al.*, 2008). O presente estudo avaliou através dos níveis de malonaldeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica, os indices de LPO. O aumento dos níveis de MDA foi detectado nos peixe antártico *Pleuragramma antarcticum*, no início da primavera austral, quando as condições pró-oxidativas aumentam (REGOLI *et al.*, 2005). Em um estudo comparativo entre *icefishes* e notothenídeos submetidos a CTMax, o aumento nos níveis de MDA no músculo cardíaco, só foi verificado no primeiro grupo (MUELLER *et al.*, 2012). Em ambas as espécies deste trabalho, houve modulação negativa dos níveis de MDA em 8°C a 3 dias, e em *N. coriiceps* este resultado pode estar associado, de forma positiva com os níveis de GST, já que esta enzima é responsável pela remoção dos produtos da lipoperoxidação (HERMES-LIMA, 2004; BAGNYUKOVA *et al.* 2006), assim o aumento nos níveis de GST a 8°C em 3 dias pode ter influenciado na modulação negativa de MDA. Já em *N. rossii* a modulação positiva dos níveis de MDA a 8°C em 1 dia, pode indicar estado de estresse oxidativo devido ao aumento da temperatura por choque térmico. Pode haver associação entre os

níveis de MDA e GST ao longo dos tempos de exposição em 8°C, já que os níveis de MDA aumentaram quando comparamos 3 e 6 dias, e os níveis de GST diminuíram quando comparamos os mesmos tempos, o que pode indicar que sob a temperatura de 8°C a enzima não foi capaz de metabolizar o excesso de MDA.

Alterações na morfologia celular e nuclear dos eritrócitos estão relacionadas a distúrbios que alteram sua homeostase (TAVARES-DIAS e MORAES, 2004). Os radicais livres em excesso são capazes de promover, nos eritrócitos de peixes, degradações no DNA e LPO que danificam membranas celulares, causando danos irreversíveis que podem levar à apoptose (CIMEN, 2008).

Alterações nos parâmetros hematológicos podem variar de acordo com a capacidade que a espécie possui de enfrentar os desafios térmicos (QIANG *et al.*, 2013). Estudos indicam que a elevação da temperatura é capaz de aumentar o número de eritrócitos na circulação de peixes (GUIJARRO *et al.*, 2003; DE PEDRO *et al.*, 2005). O aumento do número de eritroblastos (eritrócitos imaturos) na circulação indica maior atividade eritropoiética que pode ser estimulada diretamente pela carência de oxigênio (HOUSTON e MURRAD, 1992). O aumento da temperatura diminui a concentração de O₂ na água e causa hipóxia, e conseqüentemente ocorre aumento da atividade eritropoiética em peixes visando melhorar o aporte de oxigênio aos tecidos (HOUSTON e MURRAD, 1992; VALENZUELA *et al.*, 2002; WELLS *et al.*, 2005). HOUSTON e MURRAD (1991) verificaram que o estresse térmico por aclimação lenta ou choque térmico em *C. auratus* aumentou o número de eritroblastos na circulação, indicando maturação acelerada. Neste trabalho, o aquecimento em 8°C, em ambas as espécies não alterou a frequência de eritroblastos e a proporção de células maduras e eritroblastos, indicando que *N. coriiceps* e *N. rossii*, foram capazes de enfrentar o estresse térmico sem aumento da atividade eritropoiética.

A alteração de forma dos eritrócitos foi influenciada pelo aumento da temperatura (8°C) em ambas as espécies, ocorrendo alterações do formato celular com maior frequência nos tempos iniciais (1 e 3 dias) em *N. coriiceps* e em 6 dias em *N. rossii*. Alterações no formato de eritrócitos estão relacionadas a

macromoléculas celulares constituintes do citoesqueleto, dentre elas, filamentos de actina, abundantes nestas células (CIMA e BALLARIN, 1999, OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006). ANBUMANI e MOHANKUMAR (2012) sugerem que essas alterações no formato celular acarretam perda de conteúdo citoplasmático e antecedem eventos apoptóticos.

A frequência de eritrócitos com formação de vesículas na membrana plasmática (EVM) foi influenciada pelo aumento da temperatura (8°C) e foi observada somente em *N. coriiceps*. A formação de vesículas na membrana plasmática de eritrócitos é muito estudada em humanos (GREENWALT, 2006). Em peixes WONG *et al.* (2012) foram os primeiros a descrever essa alteração em eritrócitos de *Sparus sarba*, e embora os marcadores de fragmentação nuclear e ativação de caspases tenham indicado processos de morte celular, corpos apoptóticos não foram visualizados. A formação de vesículas ocorreria pelo enfraquecimento do citoesqueleto em determinadas áreas (WONG *et al.*, 2012), e o fluxo citoplasmático nestas regiões formaria as saliências (TAYLOR *et al.*, 2008) vistas em microscopia, como o observado neste trabalho.

As análises do volume celular têm por objetivo avaliar a perda de conteúdo citoplasmático ou nuclear. O aumento do volume celular pode sugerir a perda de hemoglobina, ou alterações do grupo heme, assim o aumento da área de trocas gasosas, ocasionada pelo aumento do volume, compensaria essa perda (CIMA e BALLARIN, 1999; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006). Em mamíferos há estudos que relacionam a alteração de volume celular com hipertermia, já que o aumento da temperatura estimularia a entrada de Ca^{2+} e o aumento deste íon no citosol, induz a formação de vesículas (FOLLER *et al.*, 2010). A entrada de Ca^{2+} , provoca ainda a perda citosólica de K^+ e Cl^- o que leva a célula a perder água e diminuir seu volume (FOLLER *et al.*, 2010; MOORE *et al.*, 2013). Mas, em peixes, estudos indicam que alterações de volume podem estar relacionadas a contaminantes, como por exemplo, os metais pesados (OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2006). Para as espécies analisadas o aumento da temperatura não acarretou em alterações nos volumes celular e nuclear. Entretanto estudos complementares são necessários, para melhor compreender as alterações de volume e suas

relações com formação de vesículas, observadas neste trabalho, frente ao estresse térmico.

As alterações na morfologia nuclear de eritrócitos podem indicar impactos ambientais sobre os organismos (CARRASCO *et al.*, 1990; TALYKINA *et al.*, 2003; SOUZA e FONTANETTI, 2006; DA SILVA *et al.*, 2012). O deslocamento de núcleo para a periferia da célula (EDN), por exemplo, é um tipo de alteração citoplasmática, que está envolvida com o processo de denucleação e conseqüentemente à formação de células anucleadas (ANBUMANI e MOHANKUMAR, 2012). Embora essa alteração tenha sido registrada no presente estudo, não houve diferenças nas frequências de EDN por influência do aumento da temperatura em *N. coriiceps* e *N. rossii*.

Estudos recentes ressaltam a importância da análise de outras alterações nucleares além da presença de micronúcleo (BOLOGNESI *et al.*, 2006; OSMAN *et al.*, 2011; ANBUMANI e MOHANKUMAR, 2012), indicando correlação entre elas (OSMAN e HARABAWY, 2010). Embora os processos que levam à formação de tais alterações não estejam bem estabelecidos (ANBUMANI e MOHANKUMAR, 2012), acredita-se que mutações na lâmina nuclear (filamento intermediário, constituinte estrutural do envoltório nuclear) sejam responsáveis pela perda do formato oval e estabilidade do envelope nuclear (ALBERTS *et al.*, 1997; STRUNJAK-PEROVIC *et al.*, 2009; ANBUMANI e MOHANKUMAR, 2012). Os processos celulares intrínsecos que levam à formação de micronúcleos são conhecidos e resultam da fragmentação do material genético (efeito clastogênico) ou de falhas na formação do fuso mitótico levando à eliminação de cromossomos inteiros (efeito aneugênico) (LAU *et al.*, 2007). Agentes químicos, físicos ou biológicos induzem a formação de micronúcleos (SOUZA e FONTANETTI, 2006; DA SILVA *et al.*, 2012). Estudos indicam que as demais alterações nucleares registradas no presente estudo possuem origem semelhante ao micronúcleo (FENECH *et al.*, 1999; FENECH, 2000; SERRANO e GARCIA, 2001; ÇAVAS e ERGENE-GOZUKARA, 2003), e a formação destas alterações nucleares possibilitariam a eliminação e inativação do material genético danificado da célula (SOUZA e FONTANETTI, 2006). A temperatura de 8°C não influenciou a presença de micronúcleos, mas aumentou a frequência de bolhas nucleares ou *Blebbled*

(EBN) em *N. coriiceps* (3 e 6 dias) e *N. rossii* (6 dias). NORMANN *et al.*, (2010) verificaram maior frequência de alterações nucleares, como bolhas e fissuras, do que presença de micronúcleo, em eritrócitos de peixes de água doce e sugeriram que tais resultados estariam relacionados à exposição aguda ao contaminante. Assim, o aumento na frequência de alterações nucleares estaria relacionado à exposição aguda ao agente estressor, indicando células apoptóticas (ANBUMANI e MOHANKUMAR, 2012). Exposições prolongadas ao agente estressor permitiriam substituições celulares (MURANLI e GUNER, 2011) ou reparos aos danos celulares (ANBUMANI e MOHANKUMAR, 2012).

6. CONCLUSÃO

- Em ambas as espécies *N. rossii* e *N. coriiceps*, espécies filogeneticamente muito próximas (NEAR e CHENG, 2008), os padrões de resposta frente ao aumento da temperatura ambiental foram diferentes;
 - Em *N. coriiceps* o aumento da temperatura a 8°C modulou a atividade de CAT, GST, GR e LPO;
 - Em *N. rossii* o aumento da temperatura a 8°C modulou a atividade de SOD, CAT, GST e LPO;
 - Para *N. coriiceps* os marcadores: SOD, GPX e GSH podem não ser indicados para avaliar estresse oxidativo por aumento da temperatura;
 - Para *N. rossii* os marcadores: GPX, GR e GSH podem não ser indicados para avaliar estresse oxidativo por aumento da temperatura;
 - Em *N. coriiceps* o aumento da temperatura a 8°C influenciou na frequência das seguintes alterações celulares: alteração de formato celular, formação de vesículas, bolha nuclear e fissura nuclear;
 - Em *N. rossii* o aumento da temperatura a 8°C influenciou na frequência das seguintes alterações celulares: alteração de formato celular e bolha nuclear;
 - Embora sejam necessários estudos complementares, os eritrócitos podem fornecer material para monitoramento do impacto do aquecimento global, sem que haja prejuízo para a espécie estudada, visto que não há necessidade de sacrifício do animal;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELE, D.; BURLANDO, B.; VIARENGO, A.; PORTNER, H. O.. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemistry and Physiology** Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 120, n. 2, p. 425-435, 1998.

ABELE, E. M., PUNTARULO, D.: Lipid radical generation in polar (*Laternula elliptica*) and temperate (*Mya arenaria*) bivalves. **Comp. Biochem. Physiol**, B v.132, p. 729–737, 2002.

ABELE, D., PUNTARULO, S.: Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol**. A, v. 138, p. 405–415, 2004.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v.105, p.121-126, 1984.

AHLERT, S.; AQUINO, F. Mapa da Antártica. Climanálise, **Boletim de Monitoramento e Análise Climática** – CPTEC/INPE. Disponível em: <http://www6.cptec.inpe.br/revclima/boletim/>. Acesso em: 10/06/2013.

AHMAD, I.,HAMID T, FATIMA M, CHAND HS, JAIN SK, ATHAR M, RAISUDDIN S.: Induction of hepatic antioxidantes in freshwater catfish (*Channa punctatus*, Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1519, p.37-48, 2000.

ALBERTS, B; BRAY, D; LEWIS, J. et al.: **Biologia Molecular da Célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 1294, 1997.

AKSNES A. and REIN. L., Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. **Comp. Biochem, Physiol B**, Vol. 69, p. 893-896, 1981.

ANSALDO M, LUQUET CM, EVELSON PA, POLO JAM, LLESUY S.: Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biol**, v. 23, p.160 – 165, 2000.

ANBUMANI, S. E MOHANKUMAR MARY N.: Gamma radiation induced micronuclei and erythrocyte cellular abnormalities in the fish *Catla catla*. **Aquatic Toxicology**, v.122– 123 , p. 125– 132, 2012.

ATLI, G. E CANLI, M.: Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.25, p. 33–38, 2008.

BAGNYUKOVA T.V., CHAHRAK, O. I., LUSHCHAK, V. I.: Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, v. 78, p. 325–331, 2006.

BAGNYUKOVA, T.V., LUZHNA, L.I., POGRIBNY, I.P., LUSHCHAK, V.I.,. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish liver in response to short-term exposure to arsenite. **Environ. Mol. Mutagen**, v. 48, p.658–665, 2007.

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. **J. Therm. Biol.**, v. 32, p. 227–234, 2007.

BAINY, A.C.D.; SAITO, E.; CARVALHO, P.S.M.; JUNQUEIRA, V.B.C. Oxidative stress in gills, erythrocytes, liver and kidney of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) from a polluted site. **Aquat. Toxicol.**, v.34, p. 151-162, 1996.

BARNES, D.K.A., FUENTES, V., CLARKE, A., SCHLOSS, I.R., WALLACE, M.I.. Spatial andtemporal variation in shallow seawater temperatures around Antarctica. Deep-Sea Research Part II: **Topical Studieis in Oceanography**, v.53, p. 853-865, 2006.

BENEDETTI, M., MARTUCCIO, G., FATTORINI, D., CANAPA, A., BARUCCA, M., NIGRO, M., REGOLI, F.. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*, **Aquat. Toxicol**, v. 85, p. 167–175, 2007.

BENEDETTI M., NIGRO M., REGOLI F.,: Characterisation of antioxidant defences in three Antarctic notothenioid species from Terra Nova Bay (Ross Sea). **Chemistry and Ecology**, v. 26:4, p.305-314, 2010.

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

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v.47, p. 233-261, 1996.

BILYK KT, DEVRIES AL.: Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comp Biochem Physiol**, v.158A, p.382–390, 2011.

BOLOGNESI, C., PERRONE, E., ROGGIERI, P., PAMPANIN, D.M., SCIUTTO, A.: Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**, p.78S, S93–S98, 2006.

BRADFORD M.M.. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v.72(1), p. 248 – 254, 1976.

BRAUER PR, SANMANN JN, PETZEL DH. Effects of warm acclimation on Na⁺, K⁺-ATPase-subunit expression in chloride cells of Antarctic fish. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v.285, p.600–609, 2005.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R.: Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. **Free Radic. Biol. Med**, v.27, p.951–965, 1999.

BRODTE, E.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.. Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (Zoarcidae). **Polar Biology**, v. 30, p. 95–107, 2006.

BROUWER, M., BROUWER, T.H., GRATER, W., BROWN-PETERSON, N.: Replacement of a cytosolic copper/zinc superoxide dismutase by a novel cytosolic manganese superoxide dismutase in crustaceans that use copper (haemocyanin) for oxygen transport. **Biochem. J.**, v.374, p.219–228, 2003.

CAMPBELL, T. W. Hematology of exotic animals. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 13, n. 6, p. 950-957, 1991.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione-Reductase. **Methods Enzymol**, v.113, p.484-490, 1985.

CARRASCO, K.R., TILBURY, K.L., MAYERS, M.S.: Assessment of the piscine micronuclei test as in situ biological indicator of chemical contaminants effects, **Can. J. Fish. Aquat. Sci**, v.47, 1990.

CASAUX, R. J., MAZZOTTA, A. S. E BERRERA-ORO, E. R. Seasonal aspects of the biology and diet of nearshore nototheniid fish at Potter Cove, South Shetland Islands, Antarctica. **Polar Biology**, v. 11, n.1, p. 63-72. 1990.

CASAUX, R.; BARRERA-ORO, E.; BARONI, A.; RAMÓN, A. Ecology of inshore nototheniid fish from the Danco Coast, Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v.26, p.157-165. 2003.

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*. **Camp. Biochem. Physiol.** v. 106C, n. 2, p. 333-336, 1993.

CASSINI, A., FAVERO, M., DE LAURETO, P., ALBERGON, V.: Cu–Zn superoxide dismutase from *Pagothenia bernacchii*: catalytic and molecular properties. In: Battaglia, B., Valencia, J., Walton, D.W.H. (Eds.), Antarctic Communities, Species, Structure, and Survival. **Cambridge University Press**, p. 266–271, 1997.

CAVAS, T., ERGENE-GOZUKARA, S.: Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cytogenotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. **Mutation Research**, v.538, p. 81–91, 2003.

CIMA F., BALLARIN L.: TBT-induced apoptosis in tunicate haemocytes. **Appl. Organometal. Chem.**, v.13, p. 697-703, 1999.

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. **Mol. Biol. Evol**, v.20(11), p.1897–1908, 2003.

CHENG, C.H.; Detrich III, H.W. Molecular ecophysiology of Antarctic nototheniid fishes. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v.362, p. 2215–2232. 2007.

CHEN, L.; DE VRIES, A. L. E CHENG, C. C. Convergent evolution of antifreeze glycoproteins in Antarctic notothenioid fish and Arctic cod. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Evolution, v. 94, p. 3817–3822. 1997.

CHEN, Z., CHENG, C.H., ZHANG, J., CAO, L., CHEN, L., ZHOU, L., JIN, Y., YA, H., DENG, C., DAI, Z., XU, Q., HU, P., SUN, S., SHEN, Y.: Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioids fish. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.105, p.12944–12949, 2008.

CIMEN MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clin Chim Acta**, v.390, p.1-11, 2008.

CLARKE, A.. Oceanogr. Mar. Biol. **Annu. Rev**, v.21, p.341–453, 1983.

CLARK, 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.

CLARK, M.S.; PECK, L.S. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: a mini-review. **Marine Genomics**, v.2, p.11-18, 2009.

CLEMENS, M.R., WALLER, H.D. Lipid peroxidation in erythrocytes. **Chem Phys Lipids**, v.45, p.251– 68, 1987.

COGO AJD, SIQUEIRA AF, RAMOS AC, CRUZ ZMA e SILVA AG. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v.7(1), p.37-42, 2009. [on line] <http://www.naturezaonline.com.br>

CROUCH, R.K.; GANDY, S.C.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-41, 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.

DA SILVA, A.S.E., DE LIMA, J.T.A.X., BLANCO, B.S.. Hematologia em peixes (Revisão Bibliográfica) - **Revista Centauro**, v.3, n.1, p. 24 - 32, 2012. Versão On-line ISSN 178-7573.

DE CARVALHO, ELIANORA GOMES; SEIBERT, CARLA SIMONE; COELHO, MICHELLA SOARES; MARQUES, ELINEIDE EUGEN. Hematological parameters of native fish species of the Tocantins river, *Auchenipterus nuchalis*, *Psectrogaster amazonica* and *Squaliforma emarginata* (Teleostei, Ostariophysi)/Parametros hematologicos de especies nativas do rio Tocantins, *Auchenipterus nuchalis*, *Psectrogaster amazonica* e *Squaliforma emarginata* (Teleostei, Ostariophysi) **The Free Library** (April, 1), 2009. Disponível em: [http://www.thefreelibrary.com/Hematological parameters of native fish species of the Tocantins...-a0230483658](http://www.thefreelibrary.com/Hematological+parameters+of+native+fish+species+of+the+Tocantins...-a0230483658). Acesso em: 28/11/2013.

DE PEDRO, N.; GUIJARRO, A.I.; LÓPEZ-PATIÑO, M.A; MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R.; DELGADO, M.J. Daily and seasonal variations in hematological and biochemical parameters in the tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. **Aquaculture Research**, v. 36, n. 12, p. 1185-1196, 2005.

DI PRISCO, G.; MARESCA, B.; TOTA, B. Biology of antarctic fish. **Springer-Verlag**, Berlin, 1991.

DI PRISCO, G. Life style and biochemical adaptation in Antarctic fishes. **J. Mar. Sys.**, v.27, p.253-265, 2000.

DI PRISCO, G.; EASTMAN, J. T.; GIORDANO, D.; PARISI, E.; VERDE, C. Biogeography and adaptation of Notothenioid fish: Hemoglobin function and globin-gene evolution. **Gene.**, v.398, p.143–155, 2007.

DRÖGE, J.A. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, p. 47-95, 2002.

DUTRA, B. K., SANTOS, R. B., BUENO, A A P., OLIVEIRA, G. T. Seasonal variations in the biochemical composition and lipoperoxidation of *Hyalella curvispina* (Crustacea, Amphipoda). **Comparative biochemistry and physiology**. Part A, Molecular & integrative physiology, v.151 (3), p. 322, 2008.

EASTMAN, J.T. The fossil and modern fish faunas of Antarctica: Evolution and Diversity. In *Biology of Antarctic Fish* (ed. G. di Prisco, B. Maresca e B. Tota). New York: **Springer-Verlag**, p. 116-130, 1991.

EASTMAN, J.T. Zoogeographic origins and evolution of the modern fauna. Antarctic Fish Biology. Evolution in a Unique Environment. San Diego, **Academic Press**, 1993.

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

EASTMAN, J.T., GRANDE, L. Evolution of the Antarctica fish fauna with emphasis on the recent notothenioids. In: CRAME, J.A. Origins and evolution of the Antarctica biota. **Geol. Soc. Spec. Publ.**, v. 47, p. 241-252, 1989.

EKAU, W. Morphological Adaptations and Mode of Life in High Antarctic Fish. In: DI PRISCO, G., Maresca, B., Tota, B. Biology of Antarctic Fish. Berlin: **Springer- Verlag**, p.23-29, 1991.

ESTEVEZ, S.M., ABELE, D., PUNTAROLO, S.. Lipid radical generation in polar (*Laternula elliptica*) and temperate (*Mya arenaria*) bivalves. **Comp. Biochem. Physiol.**, B 132, 729– 737, 2002.

FELÍCIO, R.. Antártida: A geografia do continente gelado e as operações brasileiras. Disponível em: <http://confins.revues.org/index122.html>. Acesso em: 24/10/2014.

FELIP A., CARRILLO M., HERRÁEZ M.P., ZANUY S., BASURCO B., Protocol K - Erythrocyte measurements [Practical guide of protocols: methods of verification of the ploidy]. Advances in fish reproduction and their application to broodstock management: a practical manual for sea bass *Zaragoza* : CIHEAM / CSIC-IATS. **Options Méditerranéennes** : Série B. Etudes et Recherches, n. 63, p.71-74, 2009.

FENECH, M.; CROTT, J.; TURNER, J.; BROWN, S. Necrosis, apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, p. 605-612, 1999.

FENECH, M.: The in vitro micronucleus technique, **Mutat. Res.**, v.455, p.81–95, 2000.

FISHBASE. Disponível em: <http://www.fishbase.org/summary/Notothenia-rossii.html> e <http://www.fishbase.org/summary/Notothenia-coriiceps.html>. Acesso em 01/08/2014.

FISHER, W., HUREAU, J.C. (Eds) FAO Species identification sheets for fishery purposes: Southern Ocean. **Food and Agriculture Organization of United Nations**. Rome, v. 2, 1985.

FOLLER, M., BRAUN, M., QADRI, S.M., LANG, E., MAHMUD, H., LANG, F. Temperature sensitivity of suicidal erythrocyte death. **Eur J Clin Invest**, v.40, p. 534-540, 2010.

FORERO, A.R. Determinacion de algunos aspectos hematologicos de *Oncorhynchus mikiss* (Salmoniformes :Salmonidae). **Rev. Biol. Trop.**, v.43,p.283-288,1995.

FRANKLIN C.E., DAVISON W., SEEBACHER F., Antarctic fish can compensate for rising temperatures: thermal acclimation of cardiac performance in *Pagothenia borchgrevinki*. **J Exp Biol**, v. 210, p. 3068–3074, 2007.

FRIDOVICH I. Superoxide dismutases. **Adv. Enzymol.**, v.41, p.35-97, 1974.

FRIEDMAN, J.S. et al. SOD2-deficiency anemia: protein oxidation and altered protein expression reveal targets of damage, stress response, and antioxidant responsiveness. **Blood**, v.104, p. 2565-2573, 2004.

GHOSH R, LOKMAN PM, LAMARE MD, METCALF VJ, BURRITT DJ, DAVISON W, HAGEMAN KJ.: Changes in physiological responses of an Antarctic fish, the emerald rock cod (*Trematomus bernacchii*), following exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). **Aquat Toxicol. Mar.**, v.15, p.128-129, 2013.

GRIM, J.M., MILES, D.R.B., CROCKETT, E.L.: Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. **J. Exp. Biol.**, v. 213, p.445–452, 2010.

GRIM, J.M., HYNDMAN, K.A., KRISKA, T., GIROTTI, A., CROCKETT, E.L.: Relationship between oxidizable fatty acid content and level of antioxidant glutathione peroxidases in marine fishes. **J. Exp. Biol.**, v.214, p.3751–3759, 2011.

GRIM, J.M., SIMONIK E. A., SEMONES, M.C., KUHN, D.E., CROCKETT, E.L.: The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*-**Comparative Biochemistry and Physiology**, Part A, v.164, p. 383–390, 2013.

GREENWALT, T.J.. The how and why of exocytic vesicles. **Transfusion**, v.46, p.143–152, 2006.

GRISOLIA, C. K.; RIVERO, C. L. G.; STARLING, F. L. R. M.; SILVA, I. C. R.; BARBOSA, A. C.; DOREA, J. G. Profile of micronucleus frequencies and DNA 67 damage in different species of fish in a eutrophic tropical lake. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, p. 138-143, 2009.

GUIJARRO, A.I.; LOPEZ-PATIÑO, M.A., PINILLOS, M.L. ISORNA, E., DE PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L., ALONSOBEDATE, M.; DELGADO, M.J. Seasonal changes in haematology and metabolic resources in the tench. **Journal of Fish Biology**, v. 62, n. 4, p. 803-815, 2003.

GUTTERIDGE, JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin. Chem.**, v.41, p.1819–1828, 1995.

HAGERMAN, H. M. A. Oxidative Stress. **Exercise and Aging**, v. 1, p.184, 2006.

HALLIWELL, B. AND GUTTERIDGE, J. M. C.: Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford: **Oxford University Press**, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. **Oxford University Press**, p. 936, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.: Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, Oxford, London, 2007.

HARDING, M. M.; ANDERBERG, P. I.; HAYMET, A. D. J. "Antifreeze" glycoproteins from polar fish. *Eur. J. Biochem*, v. 270, n.7, p.1381-1392, 2003.
 HEISE, K., PUNTARULO S., NIKINMAA M., ABELE, D., PÖRTNER, HANS-O.: Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. **The Journal of Experimental Biology**, v.209, p.353-363, 2006.

HEISE K, ABELE D.. Responde of blood parameters of the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) to warming and hypoxia. The Potter Cove coastal ecosystem, Antarctica. Synopsis of reasearcj performes 1999-2006 at the Dallmann Laboratory and Jubany Station, King George Island (Isla 25 de Mayo). Wiencke C, Ferreyra G, Abele D, Marensi S (Eds.) **Berichte zur Polarforschung**, 2008. Disponível em: hdl:10013/epic.30247.

HELLMER, H.H., KAUKER, F., TIMMERMANN, R., DETERMANN, J., RAE, J.. Twenty-first-century warming of a large Antarctic ice-shelf cavity by a redirected coastal current. **Nature**, v. 485, p. 225–228, 2012.

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

HOLETON G. F.. Oxygen uptake and circulation by a haemoglobinless antarctic fish compared with three redblooded antarctic fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.34, p.457- 465, 1970.

HUA-TAO LI, LIN FENGA, WEI-DAN JIANGA, YANG LIUA, JUN JIANGA, SHU-HONG LI, XIAO-QIU ZHOUA,: Oxidative stress parameters and anti-apoptotic response to hydroxyl radicals in fish erythrocytes: Protective effects of glutamine, alanine, citrulline and proline. **Aquatic Toxicology**, v.126, p. 169–179, 2013.

HUREAU, J.C. Biologie comparée de quelques poissons antarctiques (Nototheniidae), **Bull. Inst. Océanogr.**, Monaco, v. 68, p. 1-244, 1970.

HUBOLD, G. Ecology of notothenioid fish in the Weddell Sea. In: (Ed.). *Biology of Antarctic fishes*. **Springer-Verlag**, New York, p.3-22. 1991.

HUDSON HA, BRAURER PR, SCOWELD MA, PETZEL DH.: Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Polar Biol.**, v.31, p. 991-997. 2008.

HOUSTON, A. H. and MURADA, A.: Hematological characterization of goldfish, *Carassius auratus* L., by image analysis: effects of thermal acclimation and heat shock. **Can. J. Zool.**, v.69, p. 2041-2047, 1991.

HOUSTON, A.H., MURRAD, A.: Erythrodynamic in goldfish, *Carassius auratus* L.: temperature effects. **Physiology Zoology**, v.65 (1), p.55– 76, 1992.

IMAI, H., NAKAGAWA, Y.: Biological Significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, p.145–169, 2002.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T.M.; SOMERO, G.N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, v. 36, p. 1047-1057, 2013.

JIN, Y., DEVRIES, A. L. Antifreeze glycoprotein levels in Antarctic notothenioid fishes inhabiting different thermal environments and the effect of warm acclimation. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 144, n. 3, p. 290-300. 2006.

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

JOS, Á., PICHARDO, S., PRIETO, A.I., REPETTO, G., VÁZQUEZ, C.M., MORENO, I., CAMEÁN, A.M.: Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v.72, p. 261–271, 2005.

KAWALL H.G., SOMERO G.N.. Temperature compensation of enzymatic activities in brain of Antarctic fishes: evidence for metabolic cold adaptation. **Antarctic Journal of United States**, v. 1996, p. 115-117, 1996.

KAWALL H.G.. Metabolic responses of Antarctic organisms: responses to the ice-edge bloom and cold adaptation. **Tese de doutorado em “Marine Science”**. Department of Marine Science. College of Arts and Science. University of South Florida, p. 101, 1998.

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

KEEN, J.H.; HABIG, W.H.; JAKOBY, W.B. Mechanism for several activities of the glutathione Stransferases. **J. Biol. Chem.**, v.251, p.6183–6188, 1976.

KEN, C.F., WENG, D.F., DUAN, K.J., LIN, C.T.: Characterization of copper/zinc-superoxide dismutase from *Pagrus major* cDNA and enzyme stability. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 784–789, 2002.

KING, J.C.. Recent climate variability in the vicinity of the Antarctic Peninsula. **Int. J. Climatol.**, v. 14, p. 357-369, 1994.

KING, J.C.; HARANGOZO, S.A. Climate change in the western Antarctic Peninsula since 1945: observations and possible causes. **Annals of Glaciology**. 27: 571-575.1998.

KELLER, M., SOMMER, A.M., PORTNER, H.O., ABELE, D.: Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. **J. Exp. Biol.**, v. 207, p. 2529–2538, 2004.

KNOX, G. A. The biology of the Southern Ocean. **Cambridge University Press**, p.444, 1994.

LACKNER, R. "Oxidative stress" in fish by environmental pollutants. In: BRAUNBECK, T, HINTON, D.E., STREIT, B; **Fish Ecotoxicology**. Birkhauser Verl., Basel, pp.203-224. 1998.

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

LAU, A.H.; KNAKIEVICZ, T.; PRÁ, D.; ERDTMANN, B. FRESHWATER PLANARIANS AS NOVEL ORGANISMS FOR GENOTOXICITY TESTING: Analysis of chromosome aberrations. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, p. 475-482, 2007.

LEGGATT, R.A., BRAUNER, C.J., SCHULTE, P.M., IWAMA, G.K.: Effects of acclimation and incubation temperature on the glutathione antioxidant system in killifish and RTH-149 cells. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v.146, p.322–328, 2007.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, 4a. Edição, Editora Sarvier, 2007.

LESSER, M.P. Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology. **Annu. Rev. Physiol.**, v.68, p. 253–278, 2006.

LI, S.-D., SU, Y.-D., LI, M. AND ZOU, CH.-G.: Hemin-mediated hemolysis in erythrocytes: effects of ascorbic acid and glutathione. **Acta Biochem. Biophys. Sinica.**, v. 38(1), p. 63-69, 2006.

LI Z.H., ZLABEK V., GRABIC R., LI P., RANDAK T.: Modulation of glutathione-related antioxidant defense system of fish chronically treated by the fungicide propiconazole. **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 152, p. 392–398, 2010.

LIMA, ÉMERSON SILVA; ABDALLA, DULCINEIA SAES PARRA. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Revista **Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

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.

LUFT, J. A. Improvements in an epoxy resin embedding methods. Journal of Biophysics, **Biochemistry and Cytology**, v. 9, p. 409-414, 1961.

LUSHCHAK, V.I., BAGNYUJOVA, T.: Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. I. Indices of oxidative stress. **Comp. Biochem. Physiol. C**, v.143, p.30–35, 2006.

MACDONALD J.A, MONTGOMERY J.C, WELLS R.M.G Comparative physiology of Antarctic fishes. **Adv Mar Biol**, v. 24, p. 321-388, 1987.

MADEIRA, D., NARCISO, L.S, 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.

MARIANO, W.S.; OBA, E.T.; SANTOS, L.R.B.; FERNANDES, M.N. Respostas fisiológicas de jeju, *Hoplerthrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) expostos ao ar atmosférico. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.**, v. 10 (1), p. 210-223, 2009.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R., MORALES, A., SANZ, A.: Antioxidant defences in fish: biotic and abiotic factors. **Rev. Fish Biol. Fish.**, v.15, p.75–88, 2005.

MONTEIRO, D.A.; ALMEIDA, J.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comp Biochem Physiol Part C**, v. 143, p. 141-149, 2006.

MONTGOMERY, J.; CLEMENTS, K. Disaptation and recovery in the evolution of Antarctic fishes. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 15, n. 7, p. 267-271, 2000.

MOORE, T., SOROKULOVA, I., PUSTOVYY, O., GLOBAL, L., VODYANOY, V.. Microscopic evaluation of vesicles shed by rat erythrocytes at elevated temperatures, **Journal of Thermal Biology**. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio>. Acesso em: 01/08/2013.

MORGAN, B., EZERIÑA, D., AMOAKO T. N E., RIEMER, J., SEEDORF, M. e DICK, T.P.: Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. **Nature America**, Inc. All rights reserved doi:10.1038/nchembio.1142, 2012.

MUELLER, I.A., DEVOR, D.P., GRIM, J.M., BEERS, J.M., CROCKETT, E.L., O'BRIEN, .M.: Exposure to critical thermal maxima causes oxidative stress in hearts of white- but not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **J. Exp. Biol.**, v. 215, p. 3655–3664, 2012.

MURANLI, F.D.G., GUNER, U.: Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. **Mutation Research**, v. 726, p. 104– 108, 2011.

NAGASAKA, R.; OKAMOTO, N.; USHIO, H. Partial oxidative-stress perturbs membrane permeability and fluidity of fish nucleated red blood cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 139, p. 259-266, 2004.

NEAR, T. J. & CHENG, C.H.C. Phylogenetics of notothenioid fishes (Teleostei: Acanthomorpha): Inferences from mitochondrial and nuclear gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.47, p. 832–840, 2008.

NORMANN, C.A.B.M; Correa, L., PINTO, M. S.: **Dano Ambiental em trecho do Rio dos Sinos** – Relatório- 2010.

OLIVEIRA-RIBEIRO, C.A., FILIPACK NETO, F., MELA, M., SILVA, P.H., RANDI, M.A.F., COSTA, J.R.A., PELLETIER, E.: Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead and tributyltin chloride. **Environ. Res.**, v.101, p. 74–80, 2006.

ORUÇ, E. Ö, SEVGILER, Y., ÜNER, N. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. **Comp Biochem Physiol Part C**, v.137,p. 43-51, 2004.

OSMAN, A.G.M., HARABAWY, A.: Hematotoxic and genotoxic potential of ultraviolet A radiation on the African cat fish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Journal of Fisheries International**, v. 5, p.44–53, 2010.

OSMAN, A.G.M., ABD EL REHEEM, A.M., MOUSTAFA, M.A., MAHMOUD, U.M., ABUEL-FADL, K.Y., KLOAS, W.:In situ evaluation of the genotoxic potential of the river Nile: I. Micronucleus and nuclear lesions tests of erythrocytes of *Oreochromis niloticus niloticus* (Linnaeus, 1758) and *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 93, p.1002–1017, 2011.

PARIHAR, M.S., DUBEY, A.K.: Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. **Comp. Biochem. Physiol. C.**, v.112, p.309–313, 1995.

PARIHAR, M. S., TARANGINI, J., HEMNANI, T., DUBEY A. K and PRAKASH, P.. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish

(*heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature - **J. rhcrm. Eiol.**, v.22, n. 2, p. 151-156, 1997.

PARK H, AHN IY, PARK KI, Hyun S. Response of antioxidant defence system to thermal stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. **Antarctic Sci**, v. 20(6), p. 521-526, 2008.

PERMITIN, Y. Y., TARVERDIYEVA, M. I. The feeding of fish of the family Nototheniidae and Chaenichthyidae of the South Orkneys. **Biol. Morya** (Vladivost), Vladivostok, v. 2, p. 75-81, 1978.

PIMPÃO, C.T. Avaliação da estimulação de LPS na migração celular em *Rhamdia quelen* expostos à deltametrina. **Rev. Acad.**, Curitiba, v.3, n.4, p. 11-17, out/dez. 2005.

PODRABSKI JE, SOMERO GN: Inducible heat tolerance in Antarctic notothenioid fishes. **Polar Biol.**, v.30, p.39-43, 2006.

PÖRTNER H.O.: Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comp Biochem Physiol.**, v.132A, p.739-761, 2002.

PORTNER, H. O., MARK, F. C. e BOCK, C.: Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. **Resp. Physiol. Neurobiol.**, v.141, p.243–260, 2004.

QIANG, J., YANG H., WANG, H., KPUNDEH, M.D., PAO XU, P.: Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (L.) and mortality under *Streptococcus iniae* infection. **Fish & Shellfish Immunology**, v.34, p. 8-16, 2013.

QUAYALE, W.C., PECK, L.S., ELLIS-EVANS, C.J., PEAT, H.J., HARRIGAN, P.R..Extreme responses to climate change in Antarctic lakes. **Science**, v. 295, p. 645, 2002.

QUAYALE, W.C., CONVEY, P., PECK, L.S., ELLIS-EVANS, C.J., BUTLER, H.G., PEAT, H.G.. Ecological responses of maritime Antarctic lakes to regional climate change. **Antarct. Res. Ser**, v. 76, p.335–347, 2003.

RAMBHASKAR, B.; SRINIVASA-RAO, K. Comparative haematological of ten species of marine fish from Visakhapatnam coast. **J. Fish Biol**, v.30, p. 59-66, 1987.

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.

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

RENWICK, J.A.. Southern Hemisphere Circulation and Relations with Sea Ice and Sea Surface Temperature. **J. Climate**, v.15, p. 3058-3068, 2002.

RIOS, F. S. . HEMATOLOGIA. In: CIRO ALBERTO DE OLIVEIRA RIBEIRO; HERCULANO S. REIS FILHO; SONIA R. GROTZNER. (Org.). **Técnicas e métodos para utilização prática de microscopia**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010.

RIVKIN, R. B., PUTT, M. Diel periodicity of photosynthesis in polar phytoplankton: influence on primary production. **Science** (Washington DC), v.238, p. 1285 -1288. 1987.

ROCHE, H., BOGÉ, G.,. Effects of Cu, Zn and Cr salts on antioxidant enzyme activities in vitro of red blood cells of a marine fish *Dicentrarchus labrax*. **Toxicol. In Vitro**, v. 7, p.623-629, 1993.

ROSS, N., BINGHAM, R.G., CORR, H.F.J., FERRACCIOLI, F., JORDAN, T.A., BROCCQ, A.L., RIPPIN, D.M., YOUNG, D., BLANKENSHIP, D.D., SIEGERT, M.J.. Steep reverse bed slope at the grounding line of the Weddell Sea sector in West Antarctica. **Nature Geoscience**, v.5, p. 393–396, 2012.

RUDNEVA, IRINA I., KUZMINOVA, NATALYA S., SKURATOVSKAYA, EKATERINA N.: Glutathione-S-Transferase Activity in Tissues of Black Sea Fish Species Asian. **J. Exp. Biol. SCI.**, v.1 (1), p.141-150, 2010.

SANTOVITO G., CASSINI A., PICCINNI, E.: Cu,Zn superoxide dismutase from *Trematomus bernacchii*: Functional conservation and erratic molecular evolution in Antarctic teleosts - **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v.143, p. 444–454, 2006.

SAYEED, I.; PARVEZ, S.; PANDEY, S.; BIN-HAFEEZ, B.; HANQUE, R.; RAISUDDIN, S. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotox. Env. Saf**, v.56, p. 295-301, 2003.

SEEBACHER F, DAVISON W, LOWE CJ, FRANKLIN CE.: A falsification of the thermal specialization paradigm: compensation for elevated temperatures in Antarctic fishes. **Biol Lett**, v. 1(2), p.151-154, 2005.

SERRANO-GARCIA,L., MONTERO-MONTAYA, R.: Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events, *Environ. Mol. Mutagen*, v. 38, p.38–45, 2001.

SIDELL, B. D. Life at Body Temperatures below 0°C: The Physiology and Biochemistry of Antarctic Fishes. **Gravitational and Space Biology Bulletin**, v.13(2), 2000.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SIES, H.; KOCH, O.R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v.103, p.287-290, 1979.

SIMÕES, J.C.; ARIGONY-NETO, J.; BREMER, U.F. O uso de mapas antárticos em publicações. **Pesquisa Antártica Brasileira**, v.4, p.191-197, 2004.

SOMERO GN, DEVRIES AL.: Temperature tolerance of some Antarctic fishes. **Science**, v.156 (772), p. 257, 1967.

SOMERO G.N., FIELDS P.A., HOFMANN G.E., WEINSTEIN R.B., KAWALL H.. Cold adaptation and stenothermy in Antarctic Notothenioids fishes: what has

been gained and what has been lost? Fishes of Antarctica- A **Biological Overview**. Springer -Verlag, Milano, p. 363, 1998.

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

SOUZA, T. S.; FONTANETTI, C. S.: Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent. **Mutation Research**, v.605, p.87–93, 2006.

STRUNJAK-PEROVIC, I., POPOVIC, N.T., COZ-RAKOVAC, R., JADAN, M.: Nuclear abnormalities of marine fish erythrocytes. **Journal of Fish Biology**, v.74, p. 2239–2249, 2009.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. **Ann NY Acad Sci**, v.899, p. 191–208, 2000.

STEGEMAN, J.J.; BROUWER, M.; DI GIULIO, R.T.; FÖRLIN, L.; FOWLER, B.A.; SANDERS, B.M.; VAN VELD, P.A. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: HUGGET, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE JR, P.M.; BERGMAN, H.L. (eds.) Biomarkers. **Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton, Lewis Publishers, p. 235-335, 1992.

TANDON, R.S.; JOSHI, B.D. Total red and white blood cell count of 33 species of fresh water teleosts. **Z. Tierphysiol. Tierernahrg. Futtermittelkde**, v.37, p. 293-297, 1976.

TARVERDYIEVA, M.I. Daily food consumption and feeding pattern of the South Georgian cod (*Notothenia rossii marmorata*) and the Patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*) in the South Georgia area. **J. Ichthyol.**, Bethesda, v. 12, n.4, p. 684-692, 1972.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. Hematologia de peixes teleósteos. Ribeirão Preto. **Villimpress**, p.144, 2004.

TAYLOR, R.C., CULLEN, S.P., MARTIN, S.J.: Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 231–241, 2008.

TALYKINA MG, PAPOULIAS DM, ALLERT JA, IZYUOV YU, VILLALOBOS SA, GIESY JP, TILLITT DE: The effect of polychlorinated naphthalenes and tributyltin on the occurrence of aberrant nuclei in erythroid cells of medaka. *Environ. Sciences*, v.10(6), p. 337–348, 2003.

TIANO, L., BALLARINI, P., SANTONI, G., WOZNIAK, M., FALCIONI, G.. Morphological and functional changes of mitochondria from density separated trout erythrocytes. **Biochim. Biophys. Acta** , v.1457, p.118–128, 2000.

TIANO, L., FEDELIA, D., SANTONIB, G., DAVIES, I., WAKABAYASHID, T., FALCIONIA, G..Ebselen prevents mitochondrial ageing due to oxidative stress: in vitro study of fish erythrocytes. **Mitochondrion**, v. 2, p. 428–436, 2003.

THORNE MAS, BURNS G, FRASER KPP, HILLYARD G, CLARK MS. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. **Mar Genomics**, v. 3(1), p. 35-44, 2010.

TURNER, J.; COLWELL, S.R; MARSHALL, G.J.; LACHALAN-COPE, T.A.; CARLETON, A.M.; JONES, P.D.; LAGUN, V.; REID, P.A.; IAGOVIKINA, 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.

UCHIYAMA, M., & MIHARA, M.. Determination of malondialdehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid method. **Analytical Biochemistry**, v. 86, p.271–278, 1978.

VALENZUELA, A.; ALVEAL, K.; TARIFÑO, E. Respuestas hematológicas de truchas (*Oncorhynchus mykiss* walbaum 1792) a estrés hipoxico agudo: serie roja. 2002. **Proceeding of the IV Symposium-Workshop of Chilean Association of Ichthyology**. Gayana, v. 66, n. 2, p. 255-261, 2002.

VINAGRE, C., MADEIRA, D., NARCISO, L.S, CABRAL, H.N., DINIZ, M.S.: Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecol. Indic.**, v.23, p. 274–279, 2012.

VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E.: Fish bioaccumulation and biomarkers risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p.57-149, 2003.

VASCONCELOS, R.P., REIS-SANTOS, P., FONSECA, V., MAIA, A., RUANO, M., FRANÇA, S., VINAGRE, C., COSTA, M.J., CABRAL, H.: Assessing anthropogenic pressures on estuarine fish nurseries along the Portuguese coast: a multi-metric index and conceptual approach. **Science of the Total Environment**, v. 374, p.199-215, 2007.

ZHANG X., YANG F., ZHANG X., XU Y., LIAO T., SONG S., WANG H.: Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). **Aquatic Toxicology**, v. 86, p. 4–11, 2008.

WATSON, M. L. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysics, Biochemistry and Cytology**, v. 4, p. 75-478, 1958.

WDZIECZAK, J., ZALENA, G., BARTKOWIAK, A., WITAS H., and LEYKO, W.; Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes of different fish species. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.68B, 1981.

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

WEINSTEIN RB, SOMERO GN. .Effects of temperature on mitochondrial function in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Comp Physiol B**, v.168, p. 190-196, 1998.

WELLS, R.M.G.; BALDWINS, J.; SEYMOUR, R.S.; CHRISTIAN, K.; BRITTAIN, T. Red blood cell function and haematology in two tropical freshwater fishes from Australia. **Comparative Physiology and Biochemistry**, v. 141, p. 87-93, 2005.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v.77, p.325-333, 1981.

WINDISCH, S.H., KATHÖVER, R., PÖRTNER, H-O., Frickenhaus, S., Lucassen, M.. Thermal acclimation in Antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol**, v.301, p.1453-1466, 2011.

WINSTON, G.W., LIVINGSTONE, D.R., LIPS, F.: Oxygen reduction metabolism by the digestive gland of the common marine mussel, *Mytilus edulis* L. **J. Exp. Zool.**, v. 255, p.296–308, 1990.

WINSTON, G.W., GIULIOZ, R.T.D.;Prooxidant and Antioxidant in aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v.19, p.137–161,1991.

WONG, S.K., ZHANG, X.H., WOO, N.Y.S.. *Vibrio alginolyticus* thermolabile hemolysin (TLH) induces apoptosis, membrane vesiculation and necrosis in sea bream erythrocytes.- **Aquaculture**, v.330–333, p. 29–36, 2012.

ANEXOS

| | |
|--------------|----|
| Anexo 1..... | 89 |
| Anexo 2..... | 94 |

Anexo 1 – Processamento Enzimático

1.1 Superóxido dismutase (SOD) (CROUCH *et al.*, 1981)

MEIO DE REAÇÃO

1. Solução de NBT (7,5 ml)

Preparar solução de EDTA 1,0 mM (10 ml) - dissolver 0,0037 g de EDTA sal dissódico (MM = 372,24 g.mol⁻¹) em 10 ml de água desionizada.

Em outro recipiente, adicionar 375 µl da solução de EDTA a 1,0 mM em 7,125 ml de água desionizada e dissolver 0,0018 g de NBT (MM = 817.64 g.mol⁻¹; [NBT] final na microplaca = 100 µM) nesta solução de EDTA ([final] = 0,05 mM).

2. Solução de hidroxilamina (12 ml) Dissolver 0,0615 g de cloreto de hidroxilamina (MM = 69.49 g.mol⁻¹) em 12 ml de tampão carbonato de sódio a 182 mM, pH 10,2 ([hidroxilamina] final na microplaca = 36,85 mM)

MONTAR A PLACA

- Pipetar em triplicata 30 µl do sobrenadante da amostra;
- Pipetar branco - 30 µl de etanol a 25% em PBS (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços;
- Pipetar 70 µl da amostra de solução de NBT
- Pipetar 100 µl de solução de hidroxilamina para iniciar a reação
- Leitura em: 560 nm (tempo zero) e após 4 h de incubação. Proteger da luz durante a incubação.

PARA CÁLCULO DA ATIVIDADE: $[(\text{ABS}/\text{h do branco} / \text{ABS}/\text{h da amostra}) - 1] \times 20/3$. Os resultados serão expressos em: Unidades x mg proteína⁻¹ (1 unidade de SOD equivale a atividade capaz de inibir a redução do NBT em 50%).

REAGENTES:

- PBS, pH 7,2; Água desionizada; Tampão carbonato de sódio (182 mM, pH 10,2); Solução de EDTA (0,05 mM); etanol; Azul de nitrotetrazólio (NBT); Cloreto ou sulfato de hidroxilamina; 30 µl de amostra tratada com etanol e clorofórmio;

1.2 Catalase (CAT) (baseado em AEBI, 1984)

MEIO DE REAÇÃO (50 ml)

- 2,5 ml de Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0 (pode ser estocado)
- 47,32 ml de água desionizada
- 180 µl de H₂O₂ (30%, d=1,1 g.ml⁻¹, MM = 34 g.mol⁻¹; concentração final no ensaio = 30 mM)

CUBETA:

- Pipetar 990 µl de meio de reação em cubeta de quartzo;
- Pipetar 10 µl da amostra
- Misturar por inversão
- Leitura em 240 nm (tempo total = 60 s, intervalos = 1 s) em espectrofotômetro de cubeta.

PARA CÁLCULO DA ATIVIDADE:

Selecionar o primeiro intervalo de 30 s cujo $r^2 > 0,99$ e calcular delta ABS no intervalo de 1 min ((ABS inicial – ABS final) x2).

REAGENTES:

- Peróxido de hidrogênio; Água ultrapura; Tampão Tris-EDTA; PBS, pH 7,2;
- Utilizar cubeta de quartzo.
- 10 µl da amostra

1.3 Glutathione S-Transferase (GST) (KEEN *et al.*, 1976 modificado)

MEIO DE REAÇÃO (20 ml)

- 0,0093 g de GSH ([GSH] final = 1,5 mM)
- 0,0122 g de CDNB ([CDNB] final = 2 mM; diluir inicialmente em 1 ml de etanol PA)
- 19 ml de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,5)

MONTAR A PLACA

- Branco: 20 µl de tampão fosfato de potássio;
- 20 µl da amostra em microplaca de 96 poços (em triplicata)
- 180 µl de meio de reação (com micropipeta multicanal)

→ Leitura em: 340 nm (tempo total = 300 s, intervalos = 20-50 s)

PARA CÁLCULO DA ATIVIDADE:

Para calcular a atividade da GST empregar a fórmula: $(\Delta\text{ABS}/\text{min} \times 10)/5,76$.
Os resultados serão expressos em: $\mu\text{moles de tioéter formado} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg de proteína}^{-1}$.

REAGENTES:

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,5; PBS, pH 7,2; Glutathione (GSH); 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB);

1. 4 Glutathione Peroxidase (GPx)

MEIO DE REAÇÃO (para 100 poços)

- 0,0027 g de azida sódica (MM = 65,01 g.mol⁻¹; [azida] final na microplaca = 2 mM)
- 0,0035 g de NADPH (MM = 833,4 g.mol⁻¹; [NADPH] final na microplaca = 0,2 mM)
- 0,0127 g de GSH (MM = 307,32 g.mol⁻¹; [GSH] final na microplaca = 2 mM)
- 45 µl de glutathione redutase (GR, 2,7 mg prot.ml⁻¹, 168 U.mg prot⁻¹; [GR] final na microplaca = 1 U.ml⁻¹)
- 14,45 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0).

SOLUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (10 ml)

Preparar uma solução contendo 26 µl de H₂O₂ (~30%, d=1,1 g.ml⁻¹, MM = 34 g.mol⁻¹) em 10 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). Então, pipetar 1 ml desta solução + 9 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0) ([H₂O₂] final na microplaca = 0,5 mM).

MONTAR A PLACA:

- 20 µl do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços
- Branco: 20 µl de PBS;
- 140 µl de meio de reação 1 (com micropipeta multicanal) e aguardar 2 min
- 40 µl de solução com peróxido de hidrogênio (com micropipeta multicanal)
- Leitura em: 340 nm (tempo total = 180 s, intervalos = 10-20 s);

CÁLCULO DA ATIVIDADE;

Para calcular a atividade da GPx empregar a fórmula: $(\Delta\text{ABS}/\text{min} \times 10)/3,732$.

Os resultados serão expressos em: µmoles de NADPH oxidado x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹.

REAGENTES:

- Tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0); Solução de H₂O₂ (5 mM); PBS, pH 7,2; Glutathione reduzida (GSH); Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH); Glutathione redutase (GR).

1.5 Glutathione Redutase (GR) (SIES *et al.*, 1979)

MEIO DE REAÇÃO (16 ml)

- 0,0089 g de NADPH (MM = 833,4 g.mol⁻¹; [NADPH] final na microplaca = 0,5 mM)
- 0,0653 g de GSSG (MM = 612,63 g.mol⁻¹; [GSSG] final na microplaca = 5,0 mM)
- 16 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5,0 mM, pH 7,6

MONTAR A PLACA:

- 50 µl do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 50 µl de PBS (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 150 µl de meio de reação (com micropipeta multicanal) 7
- Leitura em 340 nm (tempo total = 10 min, intervalos = 40 s)

CÁLCULO DA ATIVIDADE

Para calcular a atividade da GPx empregar a fórmula: $(\Delta\text{ABS}/\text{min} \times 3)/14,928$.

Os resultados serão expressos em: µmoles de NADPH oxidado x min⁻¹ x mg de proteína⁻¹.

REAGENTES:

- Tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5,0 mM, pH 7,6; PBS, pH 7,2; Glutathione dissulfeto (GSS); Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH);

ANEXO 2 – Processamento – Defesa antioxidante

2.1 Glutathiona Reduzida (GSH) e outros tióis (baseado em SEDLAK e LINDSAY, 1968)

Soluções:

1. Solução de ácido tricloroacético a 50% (10 ml)
Dissolver 5 g de ácido tricloroacético em 10 ml de água desionizada
2. Solução de DTNB (8 ml)
Dissolver 0,0079 g de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, MM=396,3 g.mol⁻¹) em 500 µl de metanol PA. Então, adicionar 7,5 ml de tampão Tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ([DTNB] = 2,5 mM).
3. Curva-padrão de GSH (fazer uma curva para cada análise realizada)
Dissolver 0,0012 g GSH (MM = 307,32 g.mol⁻¹) em 976 µl de tampão tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ([GSH] = 4 mM).

PREPARAR AMOSTRA:

- Adicionar 50 µl da solução de ácido tricloroacético a 50% aos 200 µl do sobrenadante ainda congelado do tecido ([proteínas] > 5 mg.ml⁻¹).
- Branco: 50 µl da solução de ácido tricloroacético a 50% em 200 µl de PBS
- Misturar bem
- Centrifugar a 5000 g por 10 min e 4 °C

MONTAR PLACA:

- Pipetar 50 µl do branco;
- Pipetar 50 µl da curva-padrão;
- Pipetar 50 µl do sobrenadante das amostras;
- 230 µl do tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9 – em todos os poços;
- Adicionar em todos os poços utilizados 20 µl de solução de DTNB
- encubar por 5-10 min a temperatura ambiente
- Leitura em 415 nm;

PARA CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE GSH:

Com a curva padrão encontrar a equação da reta ($y = a x + b$), calcular a concentração de tióis através da fórmula $[\text{Tióis}] = ((\text{Média ABS} - \text{branco}) \times 1,25) / (a \times [\text{proteínas}])$. A concentração de tióis será expressa em nanomoles de tióis x mg de proteínas⁻¹

REAGENTES:

- Água desionizada; PBS, pH 7,2; Tampão tris-base a 0,4 M, pH 8,9; Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB); Ácido tricloroacético (TCA); Metanol.

2.2 Determinação da concentração de Malonaldeído (MDA)

QuantiChrom™ TBARS Assay Kit (DTBA-100)

CONTEÚDO DO KIT:

TBA Reagente : 25 ml de padrão: MDA 50 μ l de 15 mM
10 % de ácido tricloroacético (TCA) a 25 mL.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA:

1 . Para soro e plasma , transferir 100 μ l de cada amostra para um tubo de 1,5 ml marcado. Para as amostras de tecido , pesar ~ 20 mg em 200 μ l de fosfato arrefecida com gelo de solução salina tamponada (PBS) . Homogeneizar o tecido por breve sonicação (por exemplo, 20 segundos) sobre o gelo . Se desejado , remover 20 mL alíquota para análise de proteínas . Colocar 100 mL de lisado de tecido num tubo rotulado 1,5 mL de micro - centrífuga . Para as células , de colheita 5×10^6 células em 200 μ l de PBS gelado e sonicado a romper as células . Se desejado , remover 20 mL alíquota para análise de proteínas . Colocar 100 mL de lisado celular num tubo de 1,5 mL de micro - centrífuga rotulado

2 . Adicionar 200 mL de 10 % de TCA a 100 μ L de cada amostra . Incubar por 5 minutos em gelo.

3 . Centrifugar 5 min a 14.000 rpm em centrífuga de microtubos (Centrifugador Eppendorf). Transferir 200 mL de cada sobrenadante límpido para um novo tubo marcado . Factor de diluição para estas amostras pré-tratadas é $n = 3$.

PROCEDIMENTO ensaio colorimétrico:

Configure banho-maria ou bloco de aquecimento e ajustar a temperatura para 100 ° C. Equilibrar todos os componentes à temperatura ambiente. Adicionar 450 mL dH₂O a 15 mm tubo padrão e misture (MDA final de 1,5 mM).

1 . Padrões . Misturar 15 μ L de MDA a 1,5 mM, com 735 mL dH₂O (final de 30 μ M MDA) . Dilui-se os padrões , como mostrado na Tabela .

| No | 30 μ M MDA + H ₂ O | Vol (μ L) | MDA (μ M) |
|----|-----------------------------------|----------------|----------------|
| 1 | 300 μ L + 0 μ L | 300 | 30.0 |
| 2 | 180 μ L + 120 μ L | 300 | 18.0 |
| 3 | 90 μ L + 210 μ L | 300 | 9.0 |
| 4 | 0 μ L + 300 μ L | 300 | 0.0 |

Amostras. Transferir 200 μ L de cada amostra para tubos separados .

2 . Reação de cor . Para cada um dos padrões e amostras , adicionar 200 mL de reagente TBA . Tubos Vortex para misturar e incubar a 100 ° C durante 60 min . Esfriar os tubos à temperatura ambiente. Vortex e brevemente centrífuga tubos.

3 . Pipetar 100 ul em duplicata a partir de cada tubo para poços de uma placa de 96 poços de fundo plano clara . Ler em 535nm (525 a 545nm) .

CÁLCULO.

Para calcular a concentração de TBARS da amostra, aplica-se a fórmula:

$$[\text{TBARS}] = \frac{R_{\text{Sample}} - R_{\text{Blank}}}{\text{Slope } (\mu\text{M}^{-1})} \times n \quad (\mu\text{M MDA equivalents})$$

n é o factor de diluição da amostra (n = 3 para amostras desproteinizadas).