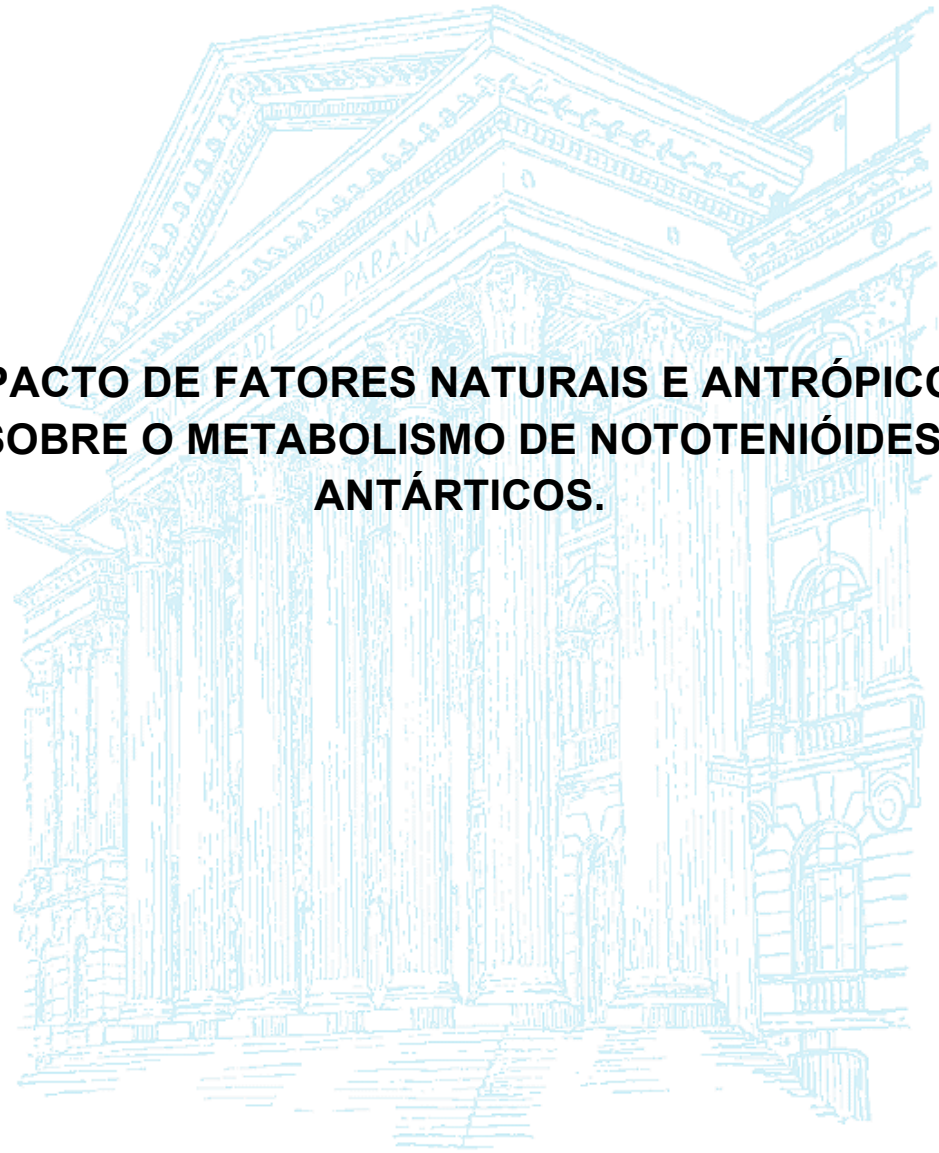
Universidade Federal do Paraná

Édson Rodrigues Júnior



IMPACTO DE FATORES NATURAIS E ANTRÓPICOS SOBRE O METABOLISMO DE NOTOTENIÓIDES ANTÁRTICOS.

Curitiba
2015

ÉDSON RODRIGUES JÚNIOR

IMPACTO DE FATORES NATURAIS E ANTRÓPICOS SOBRE O METABOLISMO DE NOTOTENIÓIDES ANTÁRTICOS.

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

Curitiba – 2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Rodrigues Júnior, Édson
Impacto de fatores naturais e antrópicos sobre o metabolismo de nototenióides antárticos. / Édson Rodrigues Júnior. – Curitiba, 2015.
144 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Lucélia Donatti

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

1. Ictiologia 2. Antártida 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)

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que ***Edson Rodrigues Júnior***, no dia 31 de Março de 2015, no Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (UFPR) defendeu sua Tese de Doutorado em Biologia Celular e Molecular, intitulada: intitulada: "Impactos de fatores naturais e antrópicos sobre o metabolismo de Nototenióides Antárticos", com a banca examinadora composta pelos Profs. Drs. Vicente Gomes (Universidade de São Paulo - USP), Silvia Maria Suter Correia Cadena (Universidade Federal do Paraná - UFPR), Maritana Mela Prodocimo (Universidade Federal do Paraná - UFPR), Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro (Universidade Federal do Paraná - UFPR), e Lucelia Donatti (Orientadora e presidente da banca examinadora da Universidade Federal do Paraná), e foi Aprovado.

A solicitação de emissão do Diploma de Doutor em Biologia Celular e Molecular ficará condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora, bem como ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Esta declaração tem validade de 30 (trinta) dias.

Curitiba, 31 de Março de 2015

Prof. Dr.Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro
Coord. do Programa de Pós-Graduação
Em Biologia Celular e Molecular
Matr./UFPR 104132

CENTRO POLITÉCNICO – CEP 81.531-990-JARDIM DAS AMÉRICAS-Caixa Postal 19031-
FONE: (41) 3361-1676 FAX 3266-2042 – E-Mail- pgbiocel@ufpr.br – www.pgbiocel.ufpr.br CURITIBA -PR

Dedico

A **Deus** por se fazer presente, mostrando o melhor caminho para que os obstáculos fossem transpostos com calma e serenidade.

Aos familiares **Pais, Irmãos e espécies de estimação** que ao longo desta caminhada sempre estiveram ao meu lado, apoiando, alegrando e confortando com o mais nobre sentimento do ser.

A minha noiva **Marianni** pelo companheirismo, dedicação, compreensão, incentivo e Amor.. incondicional. Sempre ao meu lado, me impulsionando e apoiando em todas decisões, acadêmicas e pessoais, buscando respostas nos mais nobres caminhos da ciência e mistério dos seres.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schweitzer

Agradeço

A Professora Dr[a]. Lucélia Donatti, pela orientação, oportunidade e incentivo durante todos estes anos de formação acadêmica.

Ao Professor Dr. Edson Rodrigues, pela orientação em todos os caminhos da ciência e da vida, sendo como um pai, demonstrando e incentivando a percorrer os mais nobres e fascinantes caminhos da ciência.

A mãe Maria de Fátima por sempre me apoiar, compreendendo e ajudando a superar os mais diversos obstáculos, através da busca pelo conhecimento.

Aos irmãos Aline e César, por se fazerem presentes em todos os momentos, me incentivando e alegrando durante todo o caminho profissional e pessoal.

A noiva Marianni, pela paciência, dedicação e amor.. sempre me apoiando nas mais diversas escolhas, juntos transpondo os obstáculos, e se fazendo essencial durante todas as etapas deste trabalho.

As primas Ana Cristina, Camila e Izabela, por sempre estarem me apoiando e dando suporte durante minha estada em Curitiba.

A amiga Mariana Feijó pelo apoio e parceria durante toda a coleta, experimentação e análise deste estudo, tendo papel fundamental para que o mesmo fosse cumprido com rigor e excelência.

A Professora Dr[a] Gannabathula Sree Vani, pelo exemplo e apoio durante toda minha formação pessoal e profissional.

A técnica de laboratório Kelly, pelos 8 anos de parceria e convívio no laboratório de Bioquímica da Universidade de Taubaté, sempre apoiando, e dando o suporte necessário para que todas etapas deste trabalho fossem cumpridas com sucesso e tranquilidade.

Aos doutorandos (as) Maria Rosa, Claudio Piechnik, Gabriela Raga e a Dr[a] Tânia Zaleski da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio e convívio

durante as coletas e obtenção dos dados desta Tese realizadas no continente Antártico.

Ao estudante de iniciação científica Gustavo Salles, pelo apoio e auxílio na obtenção dos dados, para que esta Tese fosse concluída com sucesso.

Aos Grupos Base presente nas Operações Antártica XXIX e XXXII comandadas pelos Chefes Daros e Muthz, respectivamente, pelo apoio e auxílio descomunal, à frente as respectivas equipes, executando um trabalho de excelência diante de todas as dificuldades encontradas na Antártica. Sem duvidas, a execução do projeto e conclusão desta Tese, deve-se ao empenho e compromisso de todo o grupo.

Aos professores Drs. Ciro Alberto de Oliveira e Francisco Filipak, do laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná, que sempre se fizeram presentes e prestativos, incentivando e orientando, nos mais diversos ramos da ciência, durante todo meu período de formação.

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

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais (INCT-APA), pelo fomento, incentivo e apoio durante todo o percurso entre elaboração, execução e conclusão deste trabalho.

A Prof^{a}. Dr^{a}. Yocie Yoneshigue Valentin na competência de coordenadora do INCT-APA, pelo incentivo, competência e liderança a frente do Instituto.

A Prof^{a}. Dr^{a}. Helena P. Lavrado, pelo apoio e instrução nas questões estatísticas que competem este trabalho. Bem como pela liderança a frente do Módulo 3 do INCT-APA.

À Marinha do Brasil, a qual forneceu apoio logístico indispensável para a execução e conclusão deste estudo.

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

À SECIRM pelo apoio logístico e incentivo durante todas as Operações Antártica.

A CAPES, REUNI e CNPq pelo apoio financeiro durante o período que cursei a pós-graduação.

RESUMO

A ictiofauna antártica evoluiu ao longo dos últimos milhões de anos isolada e sob a pressão seletiva de temperaturas baixas e estáveis. Os níveis elevados de fluoreto da carapaça do krill antártico não exerce efeito tóxico sobre os organismos que se alimentam desse crustáceo. Contudo, não existem estudos mostrando o efeito desse halogênio sobre o metabolismo de peixes antárticos, principalmente, sob condições de estresse térmico e hiposalino. A presença humana na Antártica motivou a elaboração de um amplo protocolo de proteção ambiental, o qual recomenda o desenvolvimento de pesquisas científicas voltadas ao monitoramento ambiental. O descarte de esgotos tem gerado preocupações quanto ao seu possível impacto sobre os ecossistemas marinhos. O presente estudo avaliou os efeitos do: a) fluoreto sobre o metabolismo hepático de *N. rossii*; b) efluente do esgoto da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) sobre o metabolismo do fígado, rins, brânquias e músculo, bem como sobre os níveis de constituintes plasmáticos de *N. rossii* e *N. coriiceps*. Os níveis teciduais de enzimas do metabolismo energético, defesa antioxidante e do catabolismo de L-arginina foram utilizadas como indicadores metabólicos. A capacidade hepática de metabolizar xenobióticos foi avaliada pelos níveis da enzima etoxiresorufin-o-dietilase (EROD). Os experimentos com fluoreto trófico combinaram duas temperaturas (0 e 4 ^{o}C), duas salinidades (35 e 20 psu) e duas condições tróficas (com e sem fluoreto). Os experimentos com efluente foram conduzidos: a) no curto prazo (96 h), com ambas espécies e com o efluente do esgoto diluído à 0,5% (v/v); b) no longo prazo (25 dias), apenas com *N. rossii*, mas com o efluente do esgoto diluído à 0,05% e 0,5% (v/v). O metabolismo hepático de *N. rossii* não foi modulado pelo fluoreto trófico em nenhuma das condições termo-salinas experimentais, diferente de peixes não antárticos, em que o fluoreto trófico é capaz de causar lesões histopatológicas e provocar alterações metabólicas. Nos experimentos com esgoto, com *N. rossii* e *N. coriiceps*, ficou evidente que: a) brânquias e rins modularam positivamente os níveis de enzimas do metabolismo energético, embora, no curto prazo, ocorreu redução dos níveis de hexoquinase; b) fígado elevou o potencial gliconeogênico e glicogenolítico, e manteve os níveis glicêmicos de *N. rossii*, mas não de *N. coriiceps*, que evoluiu para hipoglicemia; c) o marcador do potencial energético de osmorregulação branquial não foi alterado; d) *N. rossii* manteve níveis plasmáticos mais elevados de substratos energéticos e eletrólitos não proteicos do que *N. coriiceps*; e) o tecido muscular reduziu o potencial ativador de glicose, mas elevou o seu potencial aeróbio gerador de ATP; f) o aumento dos níveis de enzimas da defesa antioxidante ficou mais evidente nos rins e fígado; g) brânquias e rins modularam positivamente o metabolismo argininolítico no curto prazo; h) os níveis de EROD hepática não foram modulados em *N. coriiceps*, mas sofreram redução em *N. rossii*, tanto no curto como no longo prazo. Em ambas as espécies, o efluente do esgoto diluído foi capaz de alterar os níveis de enzimas do metabolismo energético, principalmente nas brânquias e rins, sugerindo um profundo aumento na demanda energética desses tecidos. Embora próximas na escala filogenética, *N. rossii* e *N. coriiceps* apresentaram respostas metabólicas distintas frente ao efluente do esgoto da EACF. O estudo mostrou que os níveis de enzimas do metabolismo energético dessas duas espécies de peixes são potenciais biomarcadores de poluição por esgoto na Antártica.

ABSTRACT

The Antarctic ichthyofauna evolved in isolation under the selective pressure of low and stable temperature during the last few million years. The elevated levels of fluoride present in the carapace of Antarctic krill do not appear to have any toxic effects on the organisms that feed on it. However, as far as we are aware there are no studies about the effect of this halogen on Antarctic fish metabolism particularly when subjected to thermal and hypo-saline stress. The increased human activity in this region has resulted in the Antarctic protection protocol that calls for increased research for monitoring the environment. The discharge of sewage in the region has raised questions about its possible effects on the marine ecosystems. The present study investigates the effects of a) fluoride on the hepatic metabolism on *N. rossii*; b) sewage from the Antarctic station Commandant Ferraz (EACF) on the hepatic, renal, gill and muscle metabolism as well as on the plasma constituents in the fishes *N. rossii* and *N. coriiceps*. The activity of the enzymes involved in the energy metabolism, anti-oxidant defense and the catabolism of L-arginine were used as metabolic indicators. The hepatic capacity to metabolize xenobiotics was evaluated by the enzyme ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD). Experiments involving tropic fluoride were conducted using a combination of two temperatures (0 and 4^{o}C), two salinities (35 and 20 psu) and two trophic fluoride (with and without) conditions. Experiments involving sewage were conducted for a) short term (96 hours) with both the species with sewage diluted to 0.5% (v/v); b) long term (25 days) with only *N. rossii,* but with the sewage diluted to 0.05% (v/v) and 0.5% (v/v). The hepatic metabolism of *N.rossii*, was not modulated by trophic fluoride in any of the experimental conditions. This is in contrast to non-Antarctic fishes were elevated trophic fluoride cause histo-pathologic lesions and altered the hepatic metabolism. In experiments with sewage, with both species a) the enzymes involved in the energy metabolism of both gills and kidneys were positively modulated, though for a short term there was a reduction in hexokinase; b) the liver elevated the glyconeogenic and glycogenolitic potential and retained the glycemic levels in *N. rossii*, but not in *N. coriiceps* which developed hypoglycemia; c) the gill osmoregulation energy potential marker was not altered in either species; d) *N. rossii* had higher plasma levels of energy substrates and non-protein electrolytes compared to *N. coriiceps*; e) muscle tissue reduced the glucose potential activator, but elevated the ATP aerobic generation potential in both species; f) the elevation of anti oxidant defense enzymes was most evident in the kidneys and liver; g) the gills and kidneys positively modulated the arginine metabolism for the short term; h) Hepatic EROD were not modulated in *N. coriiceps*, but was reduced in *N. rossii* for both the long and short term. In both species, diluted sewage altered the energy metabolism enzymes, particularly in the gills and kidneys, indicating a large increase in the energy demands in tissues of these two organs. Even though the two species *N. rossii* and *N. coriiceps*, are philogenetically close, they have distinct response on exposure to sewage from EACF. The study shows that the enzymes involved in the energy metabolism of these two fish species can be candidate biomarkers of sewage pollution in the Antarctic.

Lista de Figuras

Figuras ***Páginas***

Figura 1. Produtividade primária do ambiente marinho da Ilha Adelaide, Antártida 23

Figura 2. Fluxograma com esquema trófico do oceano austral..... 25

Figura 3. Mapa de localização da Baia do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica 30

Figura 4. Visão geral do presente estudo..... 48

Figura 5. Locais de coleta de espécimes de *N. rossii* e *N. coriiceps* na zona marítima da Baia do Almirantado, Ilha Rei George 49

Figura 6.Módulo de aquários da Estação Antártica Comandante Ferraz..... 50

Figura 7. Desenho experimental dos bioensaios com fluoreto trófico 52

Figura 8. Desenho experimental dos bioensaios com efluente da ETE 55

Figura 9. Esquema das enzimas do metabolismo energético acessadas no presente estudo..... 64

Figura 10. Esquema das enzimas da defesa antioxidante acessadas no presente estudo..... 65

Figura 11. Gráficos ilustrando a relativização dos resultados em função do controle experimental 68

Figura 12. Níveis das enzimáticas marcadoras do metabolismo energético, no tecido hepático de *Notothenia rossii*, aclimatada sob diferentes condições de estresse térmico, salino e fluoreto trófico 71

Figura 13. Níveis das enzimas marcadoras da defesa antioxidante, no tecido hepático de *Notothenia rossii*, aclimatada sob diferentes condições de estresse térmico, salino e fluoreto trófico..... 74

Figura 14. Nível da enzima marcadora do metabolismo argininolítico, no tecido hepático de *Notothenia rossii*, aclimatada sob diferentes condições de estresse térmico, salino e fluoreto trófico.....76

Figura 15. Níveis relativos dos constituintes plasmáticos de Nototenióides antárticos expostos, por 96 horas e 25 dias, as condições de bioensaio com efluente da ETE.....79

Figura 16. Níveis relativos das enzimas branquiais de Nototenióides antárticos expostos, por 96 horas e 25 dias, as condições de bioensaio com efluente da ETE.....82

Figura 17. Níveis relativos das enzimas renais de Nototenióides antárticos expostos, por 96 horas e 25 dias, as condições de bioensaio com efluente da ETE.....85

Figura 18. Níveis relativos das enzimas musculares de Nototenióides antárticos expostos, por 96 horas e 25 dias, as condições de bioensaio com efluente da ETE.....87

Figura 19. Níveis relativos das enzimas hepáticas de nototenióides antárticos expostos, por 96 horas e 25 dias, as condições de bioensaio com efluente da ETE.....89

Figura 20. Níveis hepáticos da EROD, determinados em nototenióides antárticos expostos as condições de bioensaio com efluente da ETE.....92

Figura 21. Efeito do efluente do esgoto da ETE sobre o metabolismo interórgãos de *Notothenia rossii*.....119

Figura 22. Efeito do efluente do esgoto da ETE sobre o metabolismo interórgãos de *Notothenia coriiceps*.....123

Lista de Tabelas

Tabelas ***Páginas***

Tabela 1. Comparação estatística dos níveis enzimáticos do metabolismo energético no tecido hepático dos bioensaios com fluoreto trófico 70

Tabela 2. Comparação estatística dos níveis enzimáticos da defesa antioxidante no tecido hepático dos bioensaios com fluoreto trófico 73

Tabela 3. Comparação estatística dos níveis enzimáticos do metabolismo argininolítico no tecido hepático dos bioensaios com fluoreto trófico..... 75

Lista de Abreviaturas

020F ..... 0 ^{o}C, 20 psu, com fluoreto.
020S ..... 0 ^{o}C, 20 psu, sem fluoreto.
035F ..... 0 ^{o}C, 35 psu, com fluoreto.
035S ..... 0 ^{o}C, 35 psu, sem fluoreto.
420F ..... 4 ^{o}C, 20 psu, com fluoreto.
420S ..... 4 ^{o}C, 20 psu, sem fluoreto.
435F ..... 4 ^{o}C, 35 psu, com fluoreto.
435S ..... 4 ^{o}C, 35 psu, sem fluoreto.
ACC ..... Corrente Circumpolar Antártica.
AFGP ..... Glicoproteína anticongelante.
Alb ..... Albumina.
AMP ..... Adenosina monofosfato.
ANOVA ..... Teste de análise de variância.
AR ..... Estação científica de Arctcowski.
ARG ..... Arginase.
ASMA ..... Área Antártica Especialmente Gerenciada
ATP ..... Adenosina trifosfato.
BCA ..... Ácido bicinconínico.
BHT ..... Hidroxitolueno butilado.
Ca ..... Cálcio.
Ca^{2+} ..... Íon cálcio.
$CaCO_3$ ..... Carbonato de cálcio.
CAT ..... Catalase.
CF ..... Comandante Ferraz.
Cl ..... Cloreto.
Cl^{-} ..... Íon cloreto.
CO_2 ..... Dióxido de carbono.
Col ..... Colesterol.
CP ..... Célula perisinusoidal.
CS ..... Citrato sintase.
Da ..... Dalton.

DNPH ..... 2,4-dinitrofenil-hidrazina.
DTNB..... 5’5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido).
EACF ..... Estação Antártica Comandante Ferraz.
ECO..... Glaciar Ecology.
EDTA ..... Ácido etilenodiaminotetracético.
EROD ..... Etoxiresorufin-o-dietilase.
EROS ..... Espécies reativas de oxigênio.
ETE..... Estação de tratamento de esgoto.
$FeSO_4.NH_4$ ..... Sulfato ferroso amoniacal.
g..... Aceleração da gravidade
g/L..... Gramas por litro.
G6Pase..... Glicose-6-fosfatase.
G6PDH ..... Glicose-6-fosfato desidrogenase.
Gli ..... Glicose.
GPase..... Glicogênio fosforilase.
GR ..... Glutationa redutase.
GTP ..... Guanidina trifosfato.
h..... Horas.
HCl..... Ácido clorídrico.
HCO_3^- ..... Íon bicarbonato.
HDL ..... Lipoproteína de alta densidade.
HK..... Hexoquinase.
INCT-APA..... Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Antártico de Pesquisas Ambientais.
K^+ ..... Íon potássio.
Kcat ..... Constante catalítica.
KCl..... Cloreto de potássio.
kg..... Quilograma.
K_M ..... Constante de Michaelis.
km^2 ..... Quilômetros quadrados.
L..... Litro.
LDH ..... Lactato desidrogenase.
LPO ..... Peroxidação lipídica.

m..... Metros.

M..... Molar.

MDH ..... Malato desidrogenase.

mg..... Miligrama.

Mg..... Magnésio.

Mg^{2+} ..... Íon magnésio.

mL..... Mililitro.

mM..... Milimolar.

$mmol.L^{-1}$ ou mmol/L ..... Milimol por Litro.

$mOsm.kg^{-1}$ ..... Miliosmolar por quilo.

n..... Número de espécimes por experimento.

Na/K-ATPase..... Sódio e potássio adenosina trifosfatase.

Na^{+} ..... Íon sódio.

NAD^{+} ..... Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada.

$NADH+H^{+}$ ..... Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida.

$NADP^{+}$ ..... Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada.

$NADPH+H^{+}$ ..... Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida.

NBT ..... Azul de nitrotetrazólio.

nm..... Nanometro.

NOS..... Espécies reativas de nitrogênio.

^{o}C..... Graus Celsius.

p/v..... Proporção peso por volume.

PCO..... Carbonilação de proteínas.

PFK..... Fosfofrutoquinase.

pH ..... Potencial hidrogeniônico

P*i* ..... Fosfato inorgânico.

PP..... Punta Plaza.

psu..... Unidade prática de salinidade.

PT ..... Proteínas totais.

RE..... Retículo endoplasmático.

rpm ..... Rotações por minuto.

SEID ..... Tampão para extração de Na/K-ATPase.
SO_4^{2-} ..... Íon sulfato.
SOD ..... Superóxido dismutase.
SSSI ..... Sitio Especial de Interesse Científico.
TCA ..... Ciclo dos ácidos tricarboxílicos.
TG ..... Triglicerídeos.
U ..... Unidade internacional.
v/v ..... Proporção volume por volume.
β-NF ..... Beta-naftoflavona.
λ ..... Comprimento de onda.
µL ..... Microlitro.
µm ..... Micrometro.
µM ..... Micromolar.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 20
1.1. Paleoclimatologia Antártica 20
1.2. Evolução, biodiversidade e adaptações moleculares da ictiofauna 20
1.3. Malha trófica do ecossistema antártico 22
1.4. Impactos antropogênicos na antártica 26
1.4. Ilha Rei George 29
1.5. Fisiologia metabólica de peixes antárticos 31
1.5.1. Sangue 33
1.5.2. Brânquias 35
1.5.3. Rim 37
1.5.4. Músculos 40
1.5.5. Fígado 42
2. JUSTIFICATIVA 43
3. OBJETIVOS 46
2.1. Objetivos gerais 46
2.2. Objetivos específicos 46
4. MATERIAL E MÉTODOS 47
4.1. Coleta do material biológico 47
4.2. Protocolo experimental 50
4.2.1. Bioensaios com fluoreto 51
4.2.2. Bioensaios com efluente da ETE 53
4.3. Obtenção de homogeneizados teciduais 55
4.4. Procedimentos analíticos 56
4.4.1. Constituintes plasmáticos 57
4.4.1.1. Metabólitos não proteicos 57
4.4.1.2. Proteínas 58
4.4.1.3. Eletrólitos não proteicos 58
4.4.2. Determinação da atividade enzimática 58
4.4.2.1. Vias metabólicas acessadas 63
4.4.3. Conteúdo proteico dos homogeneizados 66
4.5. Tratamento de dados 66

4.6. Tratamento estatístico 66
5. RESULTADOS 69
5.1. Efeito do fluoreto sobre o metabolismo hepático 69
5.1.1. Metabolismo energético 69
5.1.2. Defesa antioxidante 72
5.1.3. Metabolismo da L-arginina 75
5.2. Efeito do efluente da ETE sobre o metabolismo de nototenióides antárticos 77
5.2.1. Constituintes plasmáticos 77
5.2.1.1. Metabólitos não proteicos 77
5.2.1.2. Proteínas plasmáticas 78
5.2.1.3. Eletrólitos não proteicos 78
5.2.2. Metabolismo branquial 80
5.2.2.1. Metabolismo energético 80
5.2.2.2. Defesa antioxidante 80
5.2.2.3. Metabolismo da L-arginina 81
5.2.2.4. Potencial energético de osmorregulação 81
5.2.3. Metabolismo renal 83
5.2.3.1. Metabolismo energético 83
5.2.3.2. Defesa antioxidante 83
5.2.3.3. Metabolismo da L-arginina 84
5.2.4 Metabolismo muscular 86
5.2.4.1. Metabolismo energético 86
5.2.4.2. Defesa antioxidante 86
5.2.5 Metabolismo hepático 88
5.2.5.1. Metabolismo energético 88
5.2.5.2. Defesa antioxidante 90
5.2.5.3. Metabolismo da L-arginina 90
5.2.5.4. Marcadores de lesão tecidual 90
5.2.5.5. Metabolismo de xenobióticos 91
6. DISCUSSÃO 93
6.1. Impacto do fluoreto sobre o metabolismo hepático de peixes antárticos 93

6.2. Efeito do efluente da ETE sobre o metabolismo de peixes antárticos 96
6.2.1. Constituintes plasmáticos 97
6.2.2. Metabolismo branquial 100
6.2.3. Metabolismo renal 104
6.2.4. Metabolismo muscular 106
6.2.5. Metabolismo hepático 108
6.2.6. Metabolismo interórgãos 115
7. CONCLUSÕES 124
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 126

1. INTRODUÇÃO

Cobrindo mais de 70% da superfície do planeta, os oceanos desempenham um papel fundamental na nutrição da vida e exercem papel na regulação do clima terrestre. As mudanças climáticas globais, bem como a poluição de ambientes marinhos ao redor do planeta, têm motivado a comunidade científica a propor novas metodologias para o monitoramento ambiental e remediação de áreas impactadas (TIN et al., 2009; HOEGH-GULDBERG & BRUNO, 2010; SCHOFIELD et al., 2010). O oceano Austral representa cerca de 10 % da área superficial total dos oceanos e, embora seja considerado a região mais preservada do planeta, tem sido impactado pela presença humana e por alterações climáticas globais (EASTMAN, 2005; ARONSON et al., 2011).

1.1. Paleoclimatologia Antártica

Com a abertura da Passagem de Drake e o estabelecimento da Corrente Circumpolar Antártica (ACC), há cerca de 35 a 22 milhões de anos, o continente Antártico passou a existir fisicamente isolado dos demais continentes (PFUHL & MCCAVE, 2005) e experimentou uma ampla reorganização climática-geológica (BARKER & THOMAS, 2004). Os principais eventos climáticos foram marcados por glaciações, declínio do CO_2 atmosférico e extinção em massa de várias espécies terrestres e marinhas (DECONTO & POLLARD, 2003; CLARKE, MURPHY, et al., 2007). Ao longo desse período, a temperatura superficial da água do mar declinou lentamente e gradualmente, de aproximadamente 20 ^{o}C até os valores atuais, que oscilam entre -1,8 ^{o}C, na interface da água do mar com o gelo marinho, e aproximadamente +2,0 ^{o}C, nas latitudes mais elevadas (CLARKE & JOHNSTON, 1996; BARNES et al., 2006).

1.2. Evolução, biodiversidade e adaptações moleculares da ictiofauna Antártica

As condições extremas de temperatura baixas e estáveis, bem como a sazonalidade do fotoperíodo, reduziram sobremaneira a biodiversidade dos mares antárticos. Comparada com a ictiofauna global, representada por aproximadamente 25.000 espécies, o ambiente marinho antártico contempla

apenas 322 espécies bem descritas (EASTMAN, 2005), distribuídas em uma área oceânica correspondente a 10% da superfície total dos oceanos. Isso significa que apenas 1,9% das espécies marinhas de peixes estão representadas nos mares antárticos (ESCHMEYER et al., 2010). A baixa diversidade e o elevado endemismo, estimado em 88%, tem sido atribuídos à pressão seletiva das sucessivas glaciações, a produtividade primária sazonal e ao isolamento físico imposto pela ACC (EASTMAN, 1993, 2005).

O sucesso adaptativo dos ectotérmicos as condições extremas da Antártica, tem sido atribuído, em parte, à seleção de mecanismos moleculares, que compensam o efeito negativo das baixas temperaturas sobre a velocidade das reações químicas. A seleção de enzimas com propriedades cinéticas adaptadas às baixas temperaturas viabilizou o metabolismo desses organismos à temperaturas subzero, minimizando o efeito negativo das baixas temperaturas sobre a velocidade das reações químicas (SOMERO, G. N., 2004).

Contudo, o evento molecular de maior relevância foi, provavelmente, o surgimento de glicoproteínas anticongelantes (AFGP) no sangue dos nototenióides antárticos, há cerca de 5 a 14 milhões de anos. A origem evolutiva dessa classe de proteínas, provavelmente, residiu na mutação de um dos genes da proteína digestiva tripsinogênio. As AFGP têm sido apontadas como as principais responsáveis pela manutenção da fluidez dos fluídos biológicos de peixes antárticos em temperaturas subzero. Essas glicoproteínas dificultam o crescimento dos cristais de gelo e evitam o congelamento completo do sangue, independente dos efeitos coligativos de solutos (HARRISON et al., 1987). A secreção de AFGP na luz intestinal também evita o congelamento da água do mar no trato digestório e viabiliza os processos de digestão e absorção. Embora o fígado tenha capacidade de sintetizar AFGP, os principais sítios de síntese são o pâncreas e a parte anterior do estômago (CHENG & DETRICH III, 2007).

1.3. Malha trófica do ecossistema antártico

Concomitante ao regime extremo de baixas temperaturas, os ectotérmicos antárticos também se adaptaram a produtividade sazonal do oceano Austral (RODRIGUES et al., 2007), a qual é baixa durante o inverno e elevada durante o verão. No período que se estende do mês de abril até novembro, a baixa incidência solar e o aumento da cobertura de gelo sobre a superfície dos mares antárticos limitam a produção fitoplanctônica, especialmente nos ambientes marinhos próximos do litoral (BROCKINGTON, 2001). A figura 1 apresenta a produção primária, com base em estudo realizado pelo Programa Antártico Britânico, na Estação de Rothera.

A dormência metabólica de invertebrados antárticos (ex. *Laternula elliptica*) durante o inverno Austral é estrategicamente importante, pois reduz o esforço energético com alimentação ao longo de um período de restrições alimentares (RODRIGUES et al., 2009). Durante o inverno, o peixe antártico *Notothenia coriiceps* reduz o consumo de oxigênio, a frequência cardíaca e vive um quadro de hipometabolismo, que limita o seu crescimento e a sua capacidade sensorial/locomotora. O provável gatilho desse processo de dormência recai sobre a oferta alimentar e/ou a variação do fotoperíodo, considerando que a janela térmica dos mares antárticos é, normalmente, muito estreita. (CAMPBELL et al., 2008).

Os peixes antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* são endêmicos da Antártica e são espécies abundantes do infralitoral das Ilhas Shetlands do Sul, embora a população de *N. rossii* tenha sofrido redução na década de 60, em função da pesca comercial (CASAUX et al., 1990). A dieta dessas duas espécies é muito diversificada e inclui peixes, krill antártico, gastrópodes, poliquetas e fragmentos de algas (CASAUX & BARRERA-ORO, 2013; RAGA et al., 2015), sendo comum a predação das formas juvenis por pinguins e dos adultos por focas (AINLEY & BLIGHT, 2009).

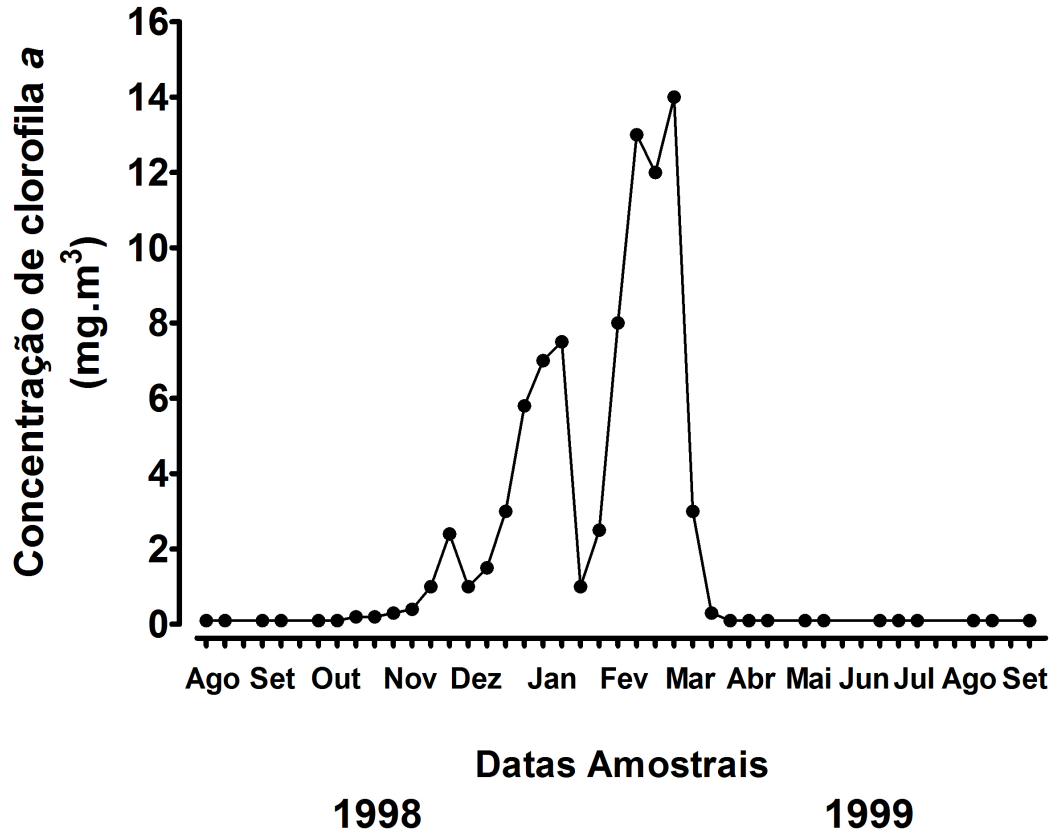


Figura 1. Produção primária do ambiente marinho da Ilha Adelaide, Antártica, próximo à Estação Científica de Rothera, em profundidade de 15m. A concentração total de clorofila *a* foi determinada entre os meses de agosto de 1998 e setembro de 1999. Durante o longo inverno antártico, a produtividade foi extremamente baixa em comparação aos meses de verão. Adaptado de BRONCKINGTON (2001).

A capacidade de migrar verticalmente, em especial de *N. rossii*, viabiliza a captura de organismos pelágicos, tornando o krill antártico um dos principais itens da sua dieta (CASAUX et al., 1990). Os níveis elevados de fluoreto no exoesqueleto desse crustáceo sofrem normalmente bioacumulação nos tecidos ósseos dos organismos antárticos que se alimentam de krill antártico, sem que os mesmos apresentem sinais de fluorose (CAMARGO, 2003; YIN et al., 2010).

A distribuição sazonal da biomassa de krill antártico na coluna d'água também é marcante, com pico de maior produtividade entre os meses

de novembro a abril (SIEGEL, 2005). Esse pequeno crustáceo zooplanctônico é um importante elo da cadeia alimentar dos ecossistemas antárticos e, direta ou indiretamente, serve de alimento para todos os vertebrados antárticos (ROSS & QUETIN, 1986; NICOL & DE LA MARE, 1993). A figura 2 apresenta as principais inter-relações tróficas envolvendo o krill antártico.

A bioacumulação de fluoreto no exoesqueleto do krill e a sua biomagnificação nos vertebrados que se alimentam de krill antártico (peixes, pinguins e focas), deixa claro que o fluoreto do krill antártico fica disponível no processo de digestão desse crustáceo (ADELUNG et al., 1985; SANDS et al., 1998; CAMARGO, 2003). Os sinais clássicos da fluorose, que precedem a morte de peixes, como hipoexcitabilidade, velocidade respiratória reduzida, letargia e comportamento apático (SIGLER & NEUHOLD, 1972; CAMARGO & TARAZONA, 1991) não tem sido observados em peixes antárticos.

Embora a base molecular da fluorose ainda seja pouco conhecida, o efeito primário reside na inibição enzimática. Enzimas como as enolases, arginases, succinato desidrogenases, dentre outras (CAMARGO, 2003; RODRIGUES et al., 2009) são inibidas diretamente por fluoreto. Estudo cinético conduzido com enolases de organismos antárticos e de levedura, mostrou que as enolases de organismos antárticos são mais resistentes à inibição por fluoreto (BACILA et al., 1989).

O fluoreto também acelera a formação de radicais livres, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (EROS e NOS) e peroxidação de lipídeos, bem como promove o aumento da atividade de enzimas do sistema antioxidante (ZHANG et al., 2007; LU et al., 2010), causando deformações morfológicas ósseas e neoplásicas (TSUTSUI et al., 1984), colapsando o funcionamento do retículo endoplasmático, ocasionando inibição da síntese e secreção proteica (SHARMA et al., 2008), e, consequentemente, dependendo da dose/concentração, acarretando severo risco a saúde de organismos aquáticos e terrestres (CAMARGO, 2003).

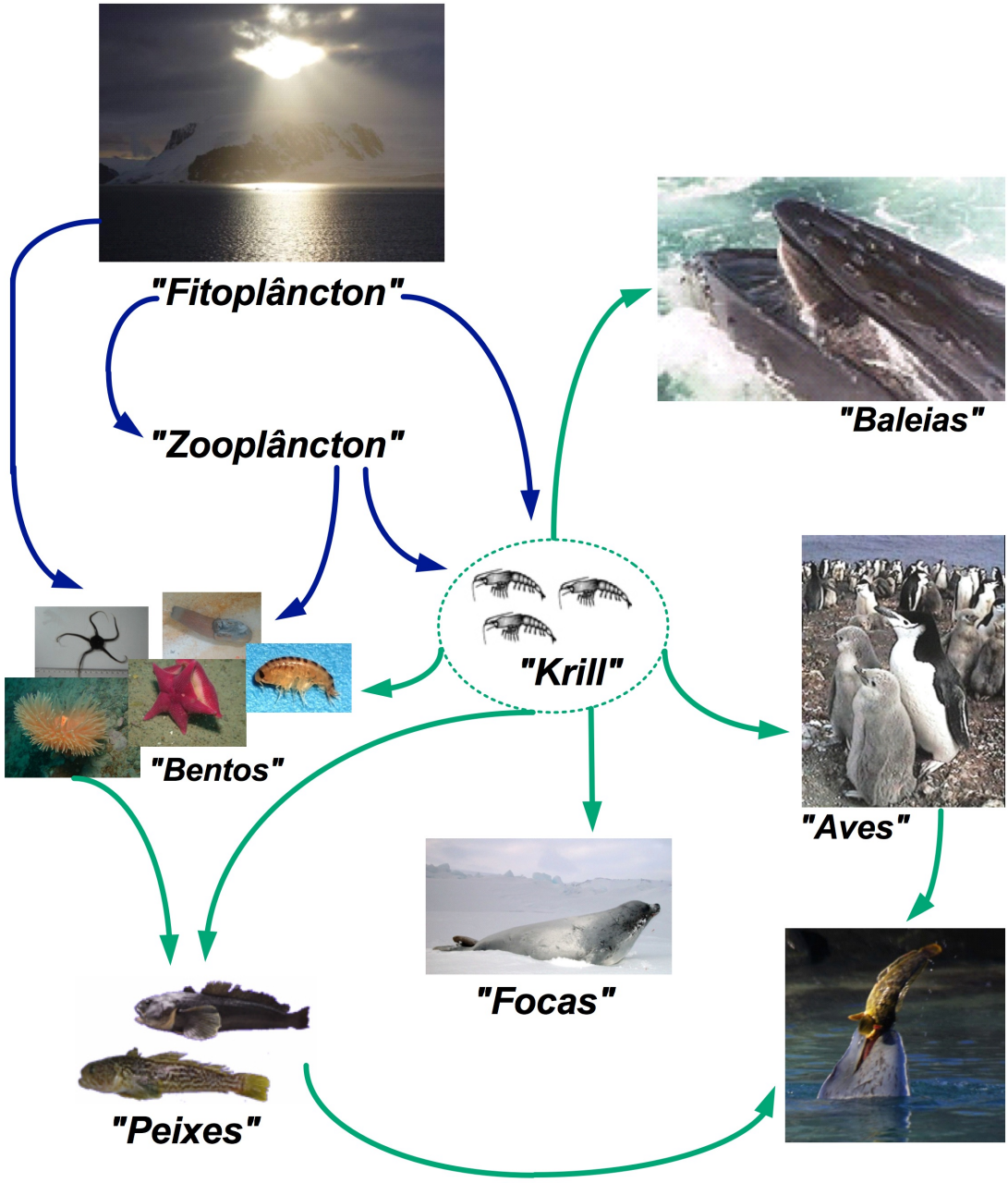


Figura 2. Fluxograma trófico do oceano austral, mostrando o krill como elo da malha trófica do ecossistema antártico. Direta ou indiretamente todos os vertebrados antárticos se alimentam de krill, o qual apresentam níveis elevados de fluoreto no seu exoesqueleto (Fonte: O autor).

1.4. Impactos antropogênicos na Antártica

A preocupação com a preservação do ambiente Antártica começou a ficar evidente em 1970, quando as partes consultivas do Tratado da Antártica reconheceram a necessidade de proteger essa região da interferência humana (COMNAP-AEON, 2006). A contaminação química do solo e sedimentos marinhos no entorno das estações científicas é decorrente principalmente da queima e vazamento de combustível fóssil, bem como do descarte de esgoto e águas cinzas (ARONSON et al., 2011). Em 1991, os membros consultivos do Tratado da Antártica aprovaram um amplo protocolo de proteção ambiental, que recomenda o gerenciamento de resíduos e ressaltando a importância de pesquisa científica direcionada para o monitoramento ambiental (MADRID-PROTOCOL, 1991).

Além da preocupação com a poluição localizada no entorno das estações científicas, a Península Antártica é uma das três regiões do planeta que sofre aquecimento acelerado, estimado em 1,5 ^{o}C no período entre 1950 e 2006, contra 0,6 ^{o}C do restante do planeta (CLARKE, MURPHY, et al., 2007). Ao longo dos últimos 50 milhões de anos a Antártica resfriou lentamente e a temperatura da água do mar declinou, em média, de 0,03 ^{o}C para cada 100.000 anos (EASTMAN, 1993). O aquecimento rápido dessa região preocupa os cientistas, considerando que a baixa tolerância térmica pode comprometer a vida de ectotérmicos marinhos antárticos.

Apesar das recomendações feitas pelas partes consultivas do Tratado da Antártica, até o ano de 2005, aproximadamente 37% das estações científicas permanentes e 69% das estações de verão, não tinham implementado algum tipo de tratamento para o esgoto e águas cinzas (GRÖNDAHL et al., 2009). A Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF) entrou em operação em 1984 e, até o ano de 2012, operava com capacidade de alojamento para 60 pessoas. O efluente do esgoto e águas cinzas, após tratamento secundário na estação de tratamento de esgoto (ETE) da EACF, tem sido descartado, historicamente, na Enseada de Martel, logo abaixo da linha da maré baixa. O resíduo sólido é removido periodicamente da ETE e incinerado nas dependências da EACF (COMNAP-AEON, 2006).

A dispersão de poluentes no entorno de estações científicas na Antártica tem sido avaliada pelo seu acúmulo em organismos e sedimentos marinhos (CURTOSI et al., 2009; LURMAN et al., 2010; MARTINS et al., 2012; CIPRO et al., 2013; CORBETT et al., 2014). Análises químicas revelaram que a poluição pontual do esgoto da EACF aumentou em mais de duas vezes no período entre 1997 e 2003, provavelmente, devido ao aumento do número de pesquisadores na EACF, mas essa poluição continua localizada no entorno da saída da ETE (MONTONE et al., 2010; MARTINS et al., 2012; MARTINS et al., 2014).

A região da Península Antártica abriga a maior concentração de estações científicas do continente e de sítios visitados frequentemente por navios de turismo (TIN et al., 2009; SCAR, 2013). Assim, a presença humana tem impactado o ambiente marinho da Península Antártica com vazamentos de óleo combustível, queima de combustível fóssil e descarga de esgoto (LYNCH et al., 2010).

Vazamentos de óleo, na transferência de combustível entre navios e estações científicas, bem como no armazenamento do combustível, tem poluído a região litorânea da Antártica. O esgoto de instalações científicas e navios que operam na Antártica, também tem como destino final o ambiente marinho. Com isso, os organismos antárticos estão expostos a diversos fatores estressantes, especialmente no entorno das estações científicas e locais de fundeio de navios.

Mensurar respostas biológicas induzidas por poluentes amplia as possibilidades de monitoramento ambiental e agrega informações biológicas ao monitoramento químico (LAM & GRAY, 2003). Por razões diversas, respostas bioquímicas de peixes, tais como os níveis teciduais de enzimas e as concentrações de constituintes plasmáticos, têm se mostrado úteis para avaliar a saúde de ambientes aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003). A ictiofauna Antártica é taxonomicamente bem conhecida e os nototenióides chegam a contribuir com 77% das espécies presentes em altas latitudes (EASTMAN, 2005). *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* são espécies endêmicas da Antártica, demersais, estenotérmicas e limitadas energeticamente para

suportar mudanças ambientais (STROBEL et al., 2012; STROBEL, LEO, et al., 2013). Essa duas espécies de peixes antárticos são abundantes na Baia do Almirantado - Ilha Rei George (KULESZ, 1999) e são um importante elo do processo de transferência de energia, do baixo para o alto nível trófico (CORBISIER et al., 2004).

O metabolismo de xenobióticos e a defesa antioxidante de peixes Antárticos tem sido objeto de diversos estudos. Os níveis das enzimas etoxiresorufin-o-dietilase (EROD) e pentoxiresorifin-o-dietilase (PROD), bem como a excreção de naftaleno e fenantreno, foram determinados no fígado e bile dos peixes antárticos *Trematomus hansoni* e *T. bernacchii*, como biomarcadores de impacto antropogênico no entorno da estação científica de McMurdo (LURMAN et al., 2010). A presença de níveis naturalmente elevados de metais pesados na coluna d'água e sedimentos marinhos, o alto teor de oxigênio dissolvido nas águas geladas, a riqueza de ácidos graxos poliinsaturados nos tecidos e a baixa tolerância a variação térmica, são alguns fatores que elevam os riscos de danos oxidativos em peixes Antárticos (BENEDETTI et al., 2009; CROCKETT, 2011).

As águas efluentes de esgoto figuram entre os principais responsáveis pela poluição do ambiente aquático, sendo muito destes, altamente complexos do ponto de vista físico e químico, bem como fonte de uma grande diversidade de poluentes (KONO, 1978). Os efluentes de esgoto são os principais responsáveis por distúrbios endócrinos em organismos aquáticos e podem causar danos fisiológicos que incluem, alteração do crescimento e desenvolvimento, inviabilização da capacidade de osmorregulação, indução de resposta ao estresse, comprometimento das funções imune e metabólicas, dentre outras (INGS et al., 2012).

A poluição do sedimento marinho com matéria orgânica e contaminantes químicos do esgoto foi capaz de reduzir a biodiversidade e alterar a estrutura de comunidades bentônicas na Antártica (STARK et al., 2014). Análises histológicas realizados no fígado e brânquias do peixe antártico *T. bernacchii*, coletados em locais próximos da desembocadura da ETE da estação australiana de Davis, mostraram que o efluente do esgoto é capaz de

promover alterações nesses tecidos (CORBETT et al., 2014). Bioensaios com água do mar coletada na saída da ETE da EACF mostraram que os poluentes do esgoto são capazes de induzir a formação de micronúcleos e provocar outras anomalias nucleares eritrocitárias em *Trematomus newnesi* (VAN NGAN et al., 2007), uma espécie da mesma família dos peixes utilizados no presente estudo.

1.4. Ilha Rei George

A Ilha Rei George (62^{o}02'S e 58^{o}21'W) está localizada no extremo norte da Península Antártica e apresenta os registros mais longos, contínuos e confiáveis de temperaturas superficiais da água do mar dos últimos 40 anos, em profundidades entre 10 e 20m (BARNES et al., 2006). Essa Ilha é a maior do Arquipélago das Shetlands do Sul e abriga instalações científicas de 9 Países (Brasil, Equador, Estados Unidos, Peru, Polônia, Chile, Argentina, Rússia e Coreia do Sul), um Sitio Especial de Interesse Científico (SSSI N^{o} 8) e uma Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA), que inclui a Baia do Almirantado, com 362 km^2, sendo que 32 km^2 dessa área, encontra-se livre de gelo (BRAUN et al., 2001; ARIGONY-NETO et al., 2004). A Baia do Almirantado abriga instalações científicas de 5 países, inclusive a Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF), como pode ser observado na figura 3.

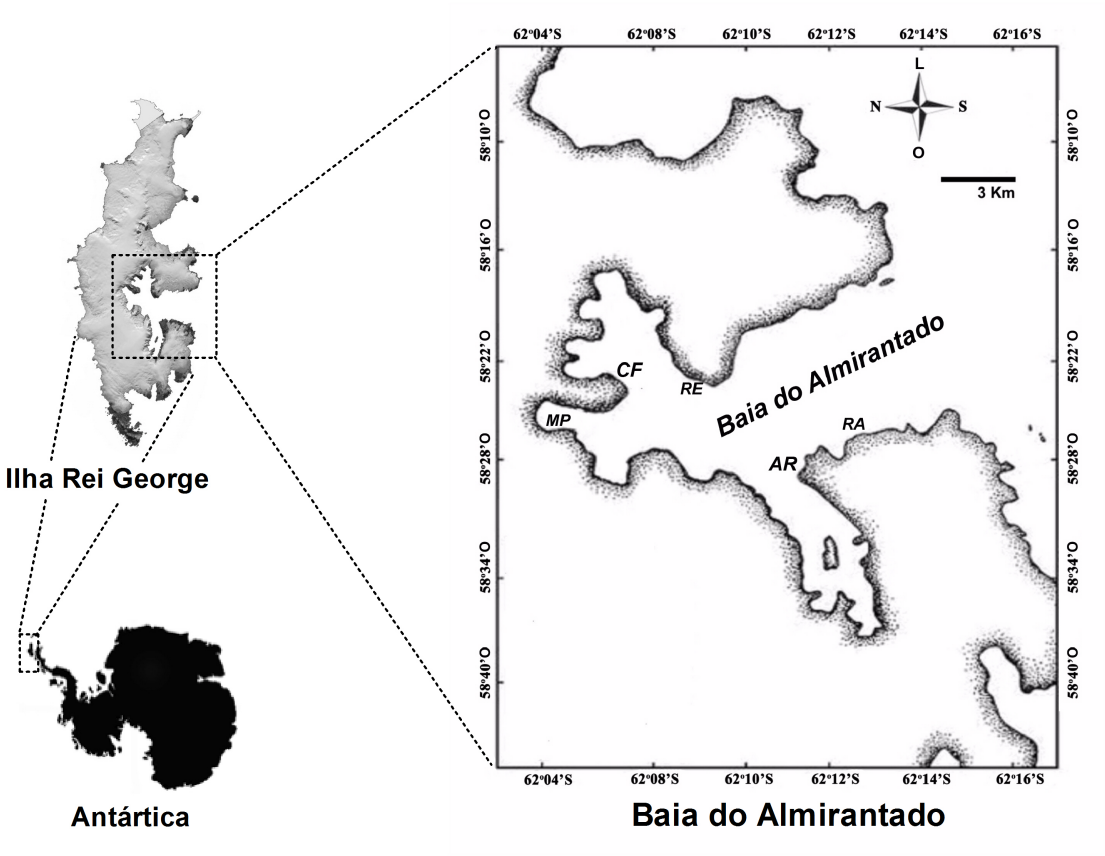


Figura 3. Localização geográfica da Ilha Rei George. A Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (CF) está localizada na Península de Keller, na Enseada de Martel. A Estação Peruana de Machu Picchu (MP) está localizada na Enseada de Mackellar. A Estação Polonesa de Henryk Arctowski (AR) e os refúgios equatoriano (RE) e americano (RA) estão localizada na entrada da Baia do Almirantado (Adaptado de RODRIGUES JR *et al*. (2013)).

1.5. Fisiologia metabólica de peixes antárticos

Após o estabelecimento da ACC há aproximadamente 30 milhões de anos, o isolamento dos organismos antárticos no oceano Austral culminou na extinção em massa de diversas espécies que habitavam aquela região. Contudo, acredita-se que os ancestrais dos nototenióides antárticos tenham escapado deste confinamento há aproximadamente 14 milhões de anos e colonizado regiões mais temperadas ao norte da ACC (DEVRIES & STEFFENSEN, 2005). Desde então, os nototenióides se isolaram em ambos os habitats, e se especializaram, evoluindo sob a pressão de temperaturas baixas e estáveis (-1,8 ^{o}C à +2,0 ^{o}C), bem como nas regiões subantárticas adjacentes a Nova Zelândia, Austrália e América do Sul, com temperaturas que variam entre +5,0 ^{o}C à +10 ^{o}C (JOHNSTON et al., 1998; NEAR et al., 2012; MAGNONI et al., 2013).

Os peixes da subordem Notothenioidei estão restritos, em sua maior parte, aos ambientes marinhos antártico e sub-antártico, onde constituem boa parte da biomassa de peixes (DI PRISCO, 2000; EASTMAN, 2005). A adaptação dos nototenióides às temperaturas baixas e estáveis dos mares antárticos demandou adaptações metabólicas, as quais foram, em parte, sustentadas pela seleção de proteínas enzimáticas com propriedades cinéticas distintas dos peixes de águas temperadas (SOMERO, G. N., 2004). Por outro lado, a evolução em um ambiente termicamente estável selecionou uma ictiofauna estenotérmica e com baixa tolerância ao aumento de temperatura (RODRIGUES et al., 2011).

Bioquímicos e fisiologistas termais tem estudado o efeito da temperatura sobre o metabolismo energético de peixes Antártico, considerando que: a) a temperatura é o principal fator ambiental responsável pela distribuição geográfica dos organismos (HOCHACHKA & SOMERO, 2002); b) a temperatura tem um efeito direto sobre as velocidades das reações químicas; c) o aquecimento pode desestabilizar as estruturas proteicas e comprometer o funcionamento de sistemas fisiológicos (SOMERO, G. N., 2004); d) os sistemas geradores de ATP do metabolismo energético são a base de todos os sistemas fisiológicos (CLARKE, 2003).

Assim, as adaptações de peixes antárticos às baixas temperaturas envolveu, em parte, a seleção de enzimas com estruturas proteicas mais flexíveis e mais susceptíveis a desnaturação por aquecimento, do que enzimas homólogas de peixes marinhos de águas temperadas. Enzimas de peixes antárticos, analisadas em temperaturas próximas de 0 ^{o}C, mostraram valores elevados de constantes catalíticas (Kcat) e baixos de constantes de Michaellis (K_M), comparadas com as enzimas homólogas de peixes de águas temperadas (SOMERO, G. N., 2004). Assim, o $K_{0,5}$ da enzima fosfofructoquinase (PFK) do músculo axial do peixe antártico *Trematomus bernacchii*, coletado em altas latitudes, é cerca de 20 vezes maior na temperatura de 5 ^{o}C do que em 20 ^{o}C, bem como a sua mais resistencia a inibição por ATP é maior na temperatura de 5 ^{o}C (RODRIGUES et al., 1994).

Em experimentos de aclimatação térmica com *N. rossii* e *N. coriiceps*, observou-se que a defesa antioxidante hepática dessas duas espécies, não foram moduladas de forma consistente, pelo aquecimento a 8 ^{o}C (MACHADO et al., 2014). A exposição de nototenióides antárticos, à temperaturas próximas da crítica máxima, mostrou que esses peixes são incapazes de modular, de forma consistente, a defesa antioxidante, o que sugere perda da habilidade de elevar os níveis da defesa antioxidante em resposta ao estresse térmico (MUELLER et al., 2012), embora o aquecimento moderado não seja suficiente para causar dano oxidativo (MUELLER et al., 2013).

O grau de especialização térmica não é uniforme e varia entre as espécies de peixes antárticos. As baixas taxas metabólicas são capazes de sustentar o crescimento desses peixes, mas dentro de uma faixa estreita de temperatura e para um conjunto reduzido de atividades (PÖRTNER, 2006; PORTNER et al., 2008). Alterações ambientais, sejam naturais ou antrópicas, podem elevar as demandas energéticas de peixes, mobilizar substratos e induzir respostas metabólicas capazes de atender as necessidades dos sistemas fisiológicos (PORTNER et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011). Estudos com *N. rossii* mostraram que a hipercapnia e o aquecimento foram capazes de modular o metabolismo energético, mas a baixa plasticidade metabólica desse espécie, pode ser fator limitante da capacidade de

aclimatação a condições ambientais adversas (STROBEL, GRAEVE, et al., 2013; STROBEL, LEO, et al., 2013).

1.5.1. Sangue

Boa parte do conhecimento sobre os elementos figurados sanguíneos e da química de proteínas, foram gerados a partir de estudos com mamíferos e, particularmente, a partir de estudo com humanos. Diferente de mamíferos, os eritrócitos de peixes são nucleados e utilizam os níveis de ATP e GTP como principais fosfatos orgânicos efetores da hemoglobina (VAL, 2000). As baixas temperaturas do oceano Austral favorecem a dissolução do oxigênio na água do mar e nos fluídos biológicos dos peixes antárticos, reduzindo a necessidade fisiológica de transportadores.

Em geral, os peixes antárticos apresentam uma baixa taxa de eritrócitos e de hemoglobina no sangue, responsáveis, em parte, pela redução de viscosidade e aumento de sua fluidez. Essa redução ficou muito evidente nos peixes da família Channichthyidae, popularmente conhecidos como “icefishes”, que perderam ao longo do processo evolutivo, a capacidade de sintetizar hemoglobina. Esses peixes mantem um número extremamente baixo de células sanguíneas, semelhantes a eritrócitos, e apresentam sangue incolor (KUZMANN, 1991).

Normalmente, o plasma de peixes antárticos transporta concentrações baixas de albumina e elevadas de lipoproteínas, quando comparado aos peixes marinhos de águas temperadas (KOMATSU et al., 1970). A ausência de albumina no plasma de *Dissostichus mawsoni*, um teleósteo da família Nototheniidae, é compensada, em parte, por níveis mais elevados de lipoproteínas plasmáticas de alta densidade (HDL), as quais são responsáveis pelo transporte de ácidos graxos livres no plasma (METCALF et al., 1999).

Os níveis de glicose no plasma de peixes antárticos varia muito entre as espécies, com registros entre 0,2 $mmol.L^{-1}$ em *Pachycara brachycephalum* à 14,4 $mmol.L^{-1}$ em *Notothenia coriiceps* (LOWE & DAVISON, 2005). Semelhante ao comportamento dos demais peixes, a glicose sanguínea

encontra-se concentrada no plasma dos peixes Antárticos, sendo que muito pouco desse carboidrato pode ser encontrado no interior de eritrócitos (RODRIGUES et al., 1999).

O plasma de peixes, normalmente, transporta níveis mais elevados de lipoproteínas e triglicerídeos do que mamíferos, bem como apresentam um “turnover” de lipídeos plasmáticos bem mais elevado. Aparentemente, isso é necessário para atender demandas energéticas do tecido muscular e sustentar longos períodos de natação, bem com disponibilizar glicerol e ácidos graxos não esterificados para síntese de carboidratos e outros lipídeos (MAGNONI et al., 2008).

Assim, o "turnover” elevado de lipídeos é capaz de sustentar as necessidades fisiológicas dos peixes durante longos períodos de natação e restrições alimentares, sem a necessidade de aumentar os níveis de lipídeos no plasma. Contudo, no estresse hiposalino, o peixe antártico *N. rossii* e o teleósteo de águas temperadas *Sparus auratus*, elevaram expressivamente os níveis de triglicerídeos no plasma, provavelmente, para atender demandas teciduais de realocação de energia (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005; RODRIGUES JR et al., 2013).

A osmolalidade do plasma sanguíneo dos nototenióides antárticos é aproximadamente o dobro de teleósteos marinhos não antárticos, a qual é mantida, principalmente, por níveis elevados de Na^+ e Cl^- (PETZEL, 2005). Juntamente com as proteínas anticongelantes (AFGP), que reduzem o ponto de congelamento do sangue através de mecanismo não coligativo, os níveis elevados de Na^+ e Cl^- contribuem para redução do ponto de congelamento, através de propriedades coligativas (EASTMAN, 1993).

A temperatura é considerada um importante fator estressor de peixes. Níveis de glicose sérica, hematócrito, cortisol, taxa de água ingerida e osmolalidade sérica, são alguns indicadores de estresse em peixes. Contudo, peixes antárticos apresentam uma resposta atípica frente ao estresse térmico, sem alterar os níveis do hematócrito e de cortisol sérico, mas reduzindo a osmolalidade plasmática mediante redução dos níveis séricos de Na^+ e Cl^-

(HUDSON et al., 2008). Esse tipo de resposta sugere que o cortisol não tem função mineralocorticoide na aclimatação térmica de peixes antárticos e que as respostas osmorregulatórias, não devem ser respostas de estresse, mas, provavelmente, uma habilidade de aclimatação associada a plasticidade fenotípica desses peixes.

Por outro lado, os níveis de constituintes plasmáticos são excelentes ferramentas biomarcadoras de poluição ambiental e podem indicar lesões teciduais específicas, no caso das aminotransferases, ou marcadores menos específicos, como níveis glicêmicos, hemoglobina, proteínas e hematócrito, que são modulados em diversas situações de estresse. Independente da especificidade do biomarcador, eles podem revelar o estado fisiológico geral e de saúde do organismo (VAN DER OOST et al., 2003).

1.5.2. Brânquias

Ao longo dos últimos 50 anos, com o auxílio de técnicas moleculares e morfológicas, o tecido branquial que era visto como sendo exclusivamente voltado para trocas gasosas, passou a ocupar o papel de principal responsável pelo controle da íon/osmorregulação, da regulação de pH dos fluidos biológicos e da excreção de compostos nitrogenados, bem como o principal responsável pelas respostas fisiológicas frente as mudanças internas e ambientais (EVANS et al., 2005).

A ampla superfície lamelar das brânquias facilita não apenas a trocas de água, íons e gases com a água do mar, mas também de substâncias tóxicas, tornando esse tecido um dos principais sítios de danos causados por poluentes ambientais em peixes (CORBETT et al., 2014). Os efluentes de esgotos são misturas complexas constituídas de metais pesados, fármacos, hormônios esteroides, dentre outros compostos químicos, os quais são capazes de desestabilizar membranas biológicas e alterar a atividade metabólica celular (GRUNG et al., 2007). A demanda energética do tecido branquial de peixes é normalmente elevada e, em algumas espécies, o consumo de oxigênio de brânquias isoladas corresponde a cerca de 20% do oxigênio total consumido pelo peixe (HWANG et al., 2011).

O sistema respiratório e a estrutura branquial dos peixes antárticos são muito semelhantes aos dos demais teleósteos marinhos (EASTMAN, 1993). O tecido branquial é considerado o principal órgão responsável pela íon osmorregulação de peixes e tem um custo energético operacional elevado (BUCKING et al., 2010). A razão atômica oxigênio/nitrogênio e os níveis de enzimas do metabolismo oxidativo têm sido utilizados para estimar a preferência metabólica por substratos energéticos. Normalmente, lipídeos, proteínas e carboidratos são utilizados pelos tecidos dos peixes como substratos energéticos, mas, sob condições de estresse, principalmente, hiposalino, e dependendo da fase de desenvolvimento, a preferência metabólica por substratos energéticos proteicos e lipídicos pode ser maior em relação a de carboidratos (TSENG & HWANG, 2008).

A preferência metabólica por substratos energéticos varia entre os tecidos de peixes. Brânquias, rins, cérebro, intestino posterior e baço da truta marrom (*Salmo trutta*), tem maior preferência por glicose do que a musculatura axial branca, isso tanto na normoglicemia como no jejum de 3 dias (BLASCO et al., 2001). O elevado potencial oxidativo para ácidos graxos monoinsaturados do fígado, músculo e coração, e a presença de um tecido adiposo expressivo e difuso, sugerem que o metabolismo energético de peixes antárticos deve ser baseado em lipídeos. Por outro lado, os níveis relativamente baixos de carnitina palmitoil-transferase sugerem que o tecido branquial de peixes antárticos apresenta reduzida capacidade β-oxidativa de ácidos graxos (CROCKETT et al., 1999).

O potencial energético gerador de ATP do tecido branquial de peixes pode ser avaliado pelo consumo de oxigênio e tem sido estimado em menos de 20% do consumo total de oxigênio, variando muito entre as espécies (TSENG & HWANG, 2008). O baixo potencial oxidativo de ácidos graxos monoinsaturados e a relação positiva entre os níveis de hexoquinase e citrato sintase sugerem que carboidratos e aminoácidos proteicos devem ser os principais substratos energéticos das brânquias de teleósteos antes do que a oxidação de ácidos graxos (CROCKETT et al., 1999).

A evolução dos peixes antártico em águas estenotermais selecionou espécies pouco tolerantes ao aumento de temperatura, sendo que o aquecimento à 4 ^{o}C, já é capaz de provocar alterações metabólicas capazes de elevar, no curto prazo, o consumo de oxigênio dos peixe antártico (MORRIS & NORTH, 1984; ROBINSON & DAVISON, 2008a). Contudo, o consumo de oxigênio e da velocidade crítica de natação do peixe antártico *Pagothenia borchgrevinki* não foram alterados na aclimatação térmica de longo prazo (ROBINSON & DAVISON, 2008b). A compensação parcial das taxas metabólicas de *N. rossii* na aclimatação térmica, sugerem que o suprimento de oxigênio dos tecidos pode limitar o metabolismo energético desse peixe. Nesse caso, a capacidade ventilatória máxima pode ser o fator determinante dos limites da janela de tolerância termal desses peixes (PÖRTNER et al., 2004; STROBEL et al., 2012).

Os estudos de aclimatação térmica também revelaram que o aumento de temperatura é capaz de elevar os níveis de Na/K-ATPase branquial de *Trematomus bernacchii*, sem alterar os níveis de cortisol e do hematócrito no plasma sanguíneo (HUDSON et al., 2008). Essa alteração foi acompanhada de redução dos níveis de Na^{+} e K^{+}, bem como da redução da osmolalidade e aumento da taxa de ingestão de água do mar (PETZEL, 2005). Por outro lado, estudo conduzido com esse peixe antártico, coletado em locais próximos da saída do esgoto da ETE da Estação de Davis, localizada no Antártica Oriental, revelou que o efluente do esgoto é capaz de alterar a estrutura histológica das brânquias (CORBETT et al., 2014), mas o estudo não avaliou o impacto do esgoto sobre o metabolismo branquial.

1.5.3. Rim

Após décadas de estudo, o tecido renal passou de órgão com função meramente excretoras para um órgão com diversas funções, como regulador do volume do fluido extracelular, mantenedor da concentração de diversas substâncias osmoticamente ativa, regulador do pH sanguíneo e excretor de produtos indesejáveis do metabolismo. Além de participar efetivamente do metabolismo de proteínas, carboidratos, lipídeos e catabolismo de peptídeos hormonais, bem como produzindo substâncias fisiologicamente

ativas que regulam a pressão sanguínea, coagulação sanguínea, equilíbrio de Ca^{2+} e moduladores do efeito hormonal (NATOCHIN, 1996).

Embora os rins não tenham a mesma relevância das brânquias nas questões envolvendo a íon/osmorregulação, pois não excretam Na^{+} e K^{+} contra um gradiente osmótico, os túbulos renais são capazes de excretar ativamente Mg^{2+}, Ca^{2+} e SO_4^{2-} (DOBBS III & DEVRIES, 1975).

A demanda energética do rim é suprida, em parte, por substratos metabólicos estocados nesse órgão, mas a mobilização de substratos energéticos também tem sido observada na aclimatação salina de teleósteos (PRODOCIMO et al., 2008). Semelhante aos demais teleósteos marinhos, os nototenióides antárticos são hipotônicos em relação a água do mar e necessitam ingerir água do mar para evitar a sua desidratação. Contudo, a osmolalidade sérica (575 mOsm kg^{-1}) dos teleósteos antárticos é quase o dobro dos de águas temperadas (330 mOsm kg^{-1}) (PETZEL, 2005).

Os rins de teleósteos podem ser classificados com base na presença de néfrons glomerulares (espécies de água doce e eurialinos), néfrons glomerulares em pequena quantidade (espécies eurialinos e marinhos) ou néfrons aglomerulares (várias espécies marinhas) (WHITTAMORE, 2012). A formação de urina, em boa parte dos teleósteos antárticos, é realizada por néfrons aglomerulares, os quais são incapazes de promover a filtração do sangue (EASTMAN, 1993).

A urina excretada pelos rins aglomerulares é formada por um processo totalmente diferente dos demais vertebrados. A região proximal dos néfrons termina como um tubo cego, sem a presença de uma capsula de Bowman. Moléculas com massa inferior a 40.000 Da são normalmente filtradas na capsula de Bowman dos rins de vertebrados e reabsorvidas nos túbulos renais e/ou excretadas na urina. O aglomerulismo em peixes antárticos evita a perda de AFGP de baixa massa molecular (<21.500 Da) pela urina, reduzindo gastos energéticos desnecessários com a reabsorção renal e/ou síntese de novas AFGP (DEVRIES et al., 1970; DOBBS III et al., 1974).

Semelhante aos demais teleósteos marinhos, os nototenióides antárticos são hipotônicos em relação a água do mar. Contudo, a sua osmolalidade sérica (575 mOsm kg^{-1}) é quase o dobro dos teleósteos de águas temperadas (330 mOsm kg^{-1}). Os principais eletrólitos não proteicos plasmáticos responsáveis pela manutenção da osmolalidade são o sódio e o cloreto. O gradiente osmótico entre a água do mar (1.024 mOsm kg^{-1}, McMurdo Sound) e o plasma dos teleósteos antárticos resulta normalmente na perda de água para o meio externo, que é compensada pela ingestão de água do mar, evitando assim a desidratação (PETZEL, 2005).

A água do mar ingerida sofre dessalinização parcial no esôfago de teleósteos, com a absorção passiva de Na^+ e Cl^-. No estômago esse fluído sofre uma pequena diluição e chega ao intestino com osmolalidade semelhante a do plasma sanguíneo. A absorção de água no intestino está, primariamente, associada com o co-transporte dos íons Na^+ e Cl^-, os quais são, subsequentemente, excretados pelas brânquias, mantendo assim o equilíbrio hidro-eletrolítico (WHITTAMORE, 2012).

Por outro lado, a água do mar contém concentrações relativamente pequenas, mas significativas, de Ca^{2+}, Mg^{2+} e SO_4^{2-}. A redução da absorção intestinal de Ca^{2+} protege os rins de uma sobrecarga de Ca^{2+}. A secreção de HCO_3^- na luz intestinal alcaliniza o meio (pH≈9,0) e é responsável por insolubilizar o Ca^{2+} (menos expressivamente o Mg^{2+}) na forma $CaCO_3$, reduzindo a osmolalidade do fluído intestinal e criando um gradiente osmótico, que promove absorção adicional de água (WHITTAMORE et al., 2010). Assim, apenas 10-11% do $Mg^{2+,}$ 9-15% de SO_4^{2-} e 1-8% do Ca^{2+} da água do mar são absorvidos no intestino e efetivamente removidos do sangue pelos rins (WHITTAMORE, 2012).

Os rins de peixes antárticos, semelhante aos demais teleósteos, são incapazes de secretar urina hiperosmótica em relação ao plasma, mas os cátions divalentes, como Mg^{2+} e Ca^{2+}, são excretados ativamente contra um gradiente de concentração, mostrando que esse tecido é um sítio de controle do metabolismo mineral. O Mg^{2+} é o principal cátion urinário, sendo a sua excreção acompanhada de Cl^-. Embora o intestino seja a principal via de

excreção de Ca^{2+}, proveniente da água do mar ingerida, os rins têm papel crítico no controle fino desse cátion. Por outro lado, os rins excretam muito pouco do Na^{+} e K^{+} absorvidos no esôfago e intestino dos peixes (DOBBS III & DEVRIES, 1975).

1.5.4. Músculos

A musculatura axial dos nototenióides antárticos é utilizada para natação. A maioria das espécies nadam em baixas velocidades e utilizam as nadadeiras peitorais como propulsores para executar, principalmente, movimentos verticais lentos. Já a nadadeira caudal é utilizada para movimentos rápidos, objetivando a captura de presas ou para fuga de predadores (JOHNSTON, IAN A., 1989; EASTMAN, 1993).

Boa parte dos peixes antárticos adultos são bentônicos, apresentam hábitos sedentários e permanecem apoiados no fundo espreitando as suas presas (EASTMAN, 1993; CLARKE & JOHNSTON, 1996). A musculatura axial dos nototenióides antárticos de sangue vermelho, pode ultrapassar 50% da sua massa corpórea, embora, em *N. coriiceps* (*N. neglecta,* Nybelin), uma espécie muito abundante no infralitoral da Península Antártica e Ilhas adjacente, a musculatura axial corresponde a apenas 30% da massa corporal (EASTMAN, 1993).

O miótomo de peixes antárticos é composto de músculos brancos (fibras brancas, de contração rápida), vermelhos (fibras vermelhas, de contração lenta) e tônicos (fibras vermelhas, de contração tônica), dispostos em camadas, semelhante à estrutura muscular dos demais teleósteos marinhos e diferente de mamíferos, que apresentam músculos híbridos compostos de fibras brancas e vermelhas intercaladas (EASTMAN, 1993).

As fibras brancas, com diâmetro entre 200 e 450 μm, predominam na musculatura axial e são responsáveis pelos movimentos rápidos presentes nas atividades de predação (JOHNSTON, IAN A., 1989). A baixa densidade capilar e o número reduzido de mitocôndrias, bem como as baixas concentrações de lipídeo e glicogênio dessas fibras, sugerem que a atividade

fisiológica desse tecido é sustentada por um metabolismo energético eminentemente anaeróbio (JOHNSTON, I. A., 1989).

Os músculos vermelhos são formados de fibras de pequeno diâmetro (cerca de 50 - 65μm), com boa vascularização (EASTMAN, 1993). A presença de mioglobina em baixas concentrações nos nototenióides de sangue vermelho favorece as trocas as gasosas com o sangue. A elevada densidade mitocondrial no entorno das fibras vermelhas e o pequeno espaço entre as mitocôndrias, sugerem que as demandas energéticas dessas fibras devem ser supridas por um metabolismo energético aeróbio.

As fibras vermelhas são mais lentas em relação às brancas e particularmente importantes na região de inserção das nadadeiras peitorais. Embora as fibras vermelhas correspondam a apenas 3% do total de fibras musculares de alguns nototenióides, boa parte da rotina natatória desses peixes bentônicos envolve movimentos lentos, sustentados pelas nadadeiras peitorais (JOHNSTON, IAN A., 1989).

A proporção entre fibras rápidas (brancas) e lentas (vermelhas) varia muito entre as espécies de peixes antárticos. Em *Pleuragramma antarcticum*, uma espécie pelágica, a maior concentração de fibras vermelhas (9,7%), foi encontrada em região próxima da nadadeira caudal. Já em *N. coriiceps*, uma espécie demersal, a proporção de fibras vermelhas ao longo da musculatura axial é homogênea e corresponde a cerca de 3% da massa muscular (JOHNSTON, I. A., 1989).

As fibras tônicas são de diâmetro ainda menor (≅ 25 μm) do que as fibras vermelhas e estão localizadas, principalmente, na região da linha lateral, onde formam uma camada na superfície das fibras vermelhas (EASTMAN, 1993).

1.5.5. Fígado

O fígado de nototenióides antárticos é uma massa proeminente, avermelhada, localizada na porção superior da cavidade abdominal, sendo que a maior parte dessa massa, está localizada na porção esquerda da linha média. A vesícula biliar está localizada na face dorsal do fígado e não se apresenta visível na perspectiva ventral da víscera. A estrutura do parênquima hepático contempla uma complexa rede de ductos biliares que convergem para um ducto biliar comum, o qual está conectado a vesícula biliar. O prolongamento desse ducto biliar comum termina no intestino médio (EASTMAN & DEVRIES, 1997).

Os hepatócitos dos nototenióides antárticos são estruturalmente semelhantes ao demais teleósteos, embora a quantidade de vacúolos contendo lipídeos seja expressivamente maior do que o encontrado em outros vertebrados (EASTMAN & DEVRIES, 1981). A presença de níveis elevados de lipídios em tecidos de peixes antárticos, armazenados em estruturas vacuolares, caracteriza a presença de um tecido adiposo difuso. A ausência de bexiga natatória e a presença conteúdos lipídicos elevados, o qual é maior nas espécies pelágicas em relação às bentônicas, tem papel fundamental na flutuação neutra desses peixes (EASTMAN, 1993).

O endotélio sinusoidal do fígado de peixes antárticos é descontínuo, embora o espaço perissinusoidal de Disse seja reduzido, comparado com os de mamíferos. Os peixes antárticos apresentam um único tipo de célula perissinusoidal (CP) no parênquima hepático, posicionadas adjacentes aos espaços perissinusoidais. Um número incomum e elevado de CP foi encontrado no fígado do peixe antártico pelágico *Dissostichus mawsoni* (uma CP para cada 7 hepatócitos). Em espécies demersais essa razão é bem menor, sendo de 1 para 13 em *Pagothenia borchgrevinki* e 1 para 15 em *Trematomus bernacchii*, sendo ainda menor no fígado de mamíferos, onde a razão é de uma CP para cada 20 hepatócitos (EASTMAN & DEVRIES, 1981).

2. JUSTIFICATIVA

O fluoreto presente no exoesqueleto do krill antártico, aparentemente, não exerce efeito tóxico sobre os organismos que se alimentam desse crustáceo. Estudos com vertebrados antárticos mostraram que o fluoreto sofre bioacumulação no tecido ósseo (ADELUNG et al., 1985; XIE & SUN, 2003). A presença de enolases mais resistentes a inibição por fluoreto em organismos que se alimentam de krill, sugerem os níveis elevados desse halogênio, presentes na dieta de pinguins e peixes antárticos, podem ter atuado seletivamente na preservação de estruturas enzimáticas mais resistentes à inibição por fluoreto (BACILA et al., 1989).

Por outro lado, faltam estudos sobre os possíveis efeitos do fluoreto no comportamento bioquímico e fisiológico desses organismos. O peixe *N. rossii* se alimenta oportunisticamente de krill antártico e, embora acumule fluoreto no tecido ósseo, os níveis de fluoreto nos tecidos moles são semelhantes ao de organismos que não se alimentam de krill antártico (OEHLENSCHLÄGER & REHBEIN, 1982; CAMARGO, 2003). Nossa primeira hipótese considera que o fluoreto trófico não deve modular os níveis de enzimas chaves do metabolismo energético, da defesa antioxidante e do catabolismo da L-arginina, na condição termo-salina de 0 ^{o}C e 35 psu, considerando que essa é uma condição termo-salina-trófica natural de *N. rossii*. Como segunda hipótese, postulamos que o fluoreto trófico em condições termo-salinas estressantes pode modular o metabolismo de *N. rossii*. O objetivo de avaliar o impacto do fluoreto sobre o metabolismo de peixes antárticos em condições de estresse termo-salino, levou em consideração o panorama climático/ambiental da Península Antártica, que é uma das três regiões do planeta que sofre aquecimento acelerado, acompanhado pelo derretimento de geleiras (CLARKE, JOHNSTON, et al., 2007).

Desde o início da exploração da Antártica, em meados do século XIX, com a instalações de estações científicas de diversos países e, posteriormente, com o aumento exponencial das atividades de turismo a partir da década de 50, o ecossistema antártico vem sendo exposto a diferentes poluentes, como aqueles provenientes da queima e vazamento de

combustíveis fósseis, efluentes de esgoto e descarte de produtos químicos, dentre outros. Dessa forma, os organismos antárticos ficaram expostos as concentrações crescentes de uma gama de poluentes, que não estiveram presentes ao longo da sua história evolutiva (ARONSON et al., 2011).

As adaptações moleculares dos nototenióides às temperaturas baixas e estáveis da Antártica (MATSCHINER et al., 2011), a expressiva biomassa dessa família de peixes nos mares antárticos, o elevado número de espécies endêmicas (EASTMAN, 2005) e a posição dos nototenióides na cadeia alimentar do ecossistema antártico, são algumas das razões que motivaram a escolha de nototenióides como organismos alvo do presente estudo.

Notothenia rossii e *Notothenia coriiceps* estão entre as quatro espécies de nototenióides mais abundantes na Baia do Almirantado (SKORA & NEYELOV, 1992), Ilha Rei George. As resposta biomarcadoras de peixes à poluentes, variam muito entre espécies e apesar da mobilidade relativamente alta de algumas espécies, essa classe de organismos tem sido considerada a mais conveniente para o monitoramento de poluentes em sistemas aquáticos (VAN DER OOST et al., 2003).

A escolha de *N. rossii* e *N. coriiceps* como espécies alvo do presente estudo levou em consideração: a) a proximidade filogenética dessas duas espécies, como forma de avaliar o impacto do efluente do esgoto sobre as respostas metabólicas de espécies que divergiram pouco ao longo do processo evolutivo; b) a restrição de movimentos dessas duas espécies em torno das suas áreas de residência (cerca de 233 m^2 para *N. coriiceps*) (CAMPBELL et al., 2008), como potenciais organismos alvo, de programas de monitoramento de impactos antrópicos, no entorno de estações científicas do litoral da Antártica e c) a abundância dessas duas espécies na Baia do Almirantado.

Considerando que o metabolismo energético é a base de todos os sistemas fisiológicos (CLARKE, 2003) e que certas condições de poluição ambiental elevam as demandas energéticas de peixes (GORBATIUK, 2013),

nossas principais hipóteses, seriam que o efeito do efluente da EACF fosse capazes de: 1) elevar os níveis de enzimas chaves do metabolismo energético, defesa antioxidante e catabolismo da L-arginina das brânquias, rins e músculos; 2) aumentar o potencial gliconeogênico e glicogenolítico hepático voltado para manutenção dos níveis plasmáticos de glicose; 3) elevar o potencial energético de osmorregulação do tecido branquial; 4) elevar os níveis de substratos energéticos plasmáticos; 5) elevar o catabolismo de L-arginina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Avaliar o efeito do fluoreto trófico sobre o metabolismo hepático de *N. rossii* em condições termo-salinas variáveis, bem como avaliar o impacto do efluente da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE), da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), sobre o metabolismo dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito do fluoreto sobre o metabolismo hepático de *N. rossii*, utilizando os níveis enzimas como “proxy” do metabolismo energético, defesa antioxidante e do catabolismo da L-arginina, do fígado de *N. rossii*.

Avaliar o efeito do efluente da ETE sobre o metabolismo branquial, renal, muscular, hepático e constituintes plasmáticos de *N. rossii*, no curto e longo prazo, e de *N. coriiceps* no curto prazo, sobre o metabolismo energético, defesa antioxidante, catabolismo da L-arginina e metabolismo de xenobióticos, utilizando os níveis de enzimas como “proxy” do metabolismo. Também objetivamos avaliar as lesões hepáticas oxidativas, determinando os níveis de carbonilação de proteínas (PCO) e peroxidação lipídica (LPO).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os bioensaios para avaliar os efeitos de fatores ambientais (salinidade, temperatura e fluoreto) foram conduzidos com espécimes de *N. rossii* durante as Operações Antárticas XXVIII e XXIX; e os bioensaios para avaliar o impacto de fatores antrópicos (efeito do efluente do esgoto da EACF), foram utilizadas espécimes de *N. rossii* e *N. coriiceps*, coletadas durante as Operações Antárticas XXX e XXXII. Os níveis de enzimas do metabolismo energético, defesa antioxidante, catabolismo da L-arginina e metabolismo de xenobióticos foram acessadas para avaliar o impacto dos fatores naturais e antrópicos sobre o metabolismo dessa duas espécies de peixes antárticos. Essas informações estão sumarizadas na figura 4.

4.1. Coleta do material biológico

Os peixes antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* foram coletados com linha e anzol, em profundidade de 10 a 20 metros, nos ambientes marinhos de Punta Plaza (PP) e “Glaciar Ecology” (ECO), Baia do Almirantado, Ilha Rei George, Antártida (figura 5), e utilizados nos experimentos com fluoreto e efluente da ETE. Os peixes foram transportados em caixas/tanques, dos locais de coleta para EACF e mantidos em tanques com água do mar, por um período de 3 dias, em condição termo-salina próxima do ambiente natural (0 ^{o}C e 35 psu), como forma de reduzir o estresse causado pela captura.

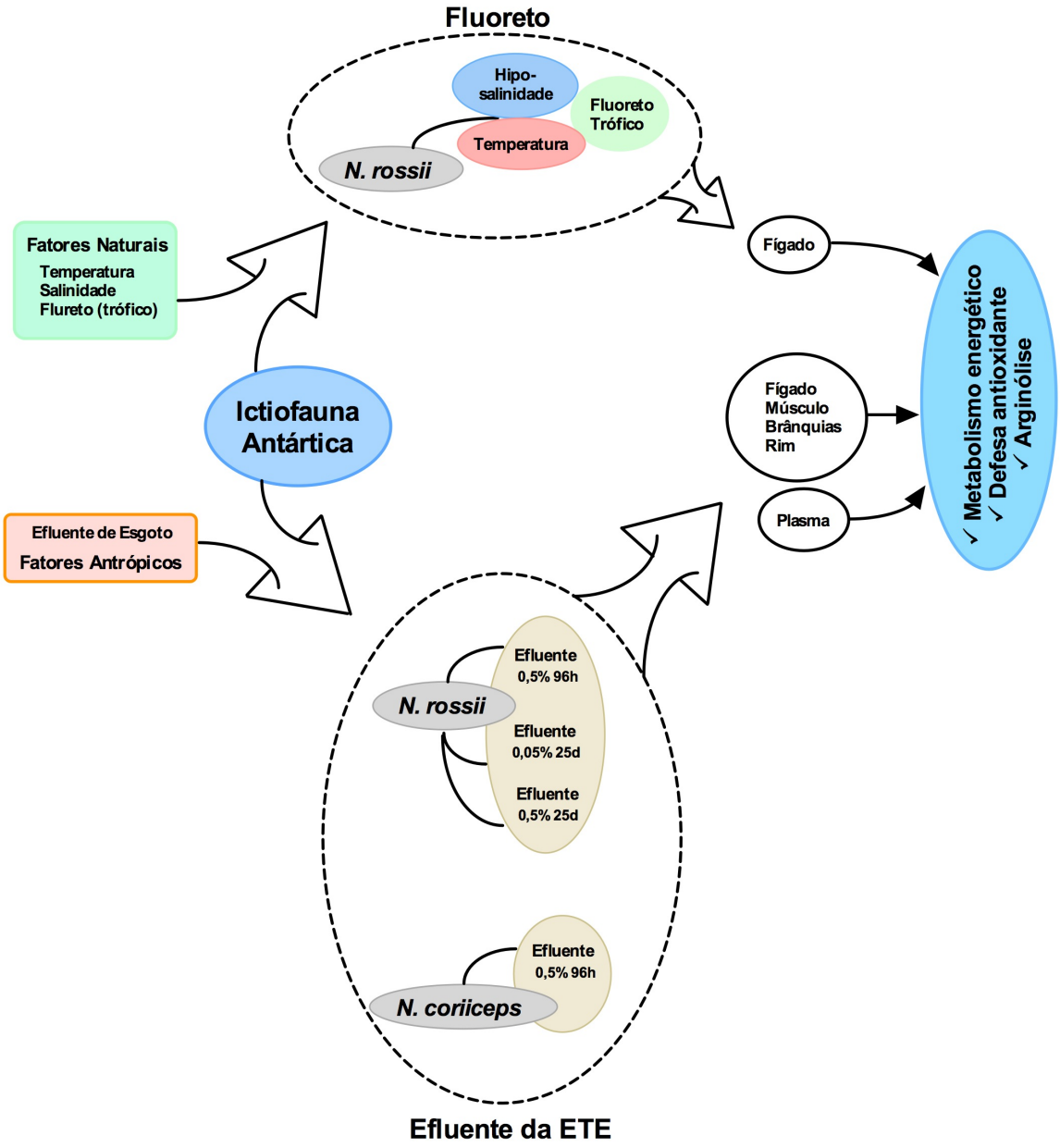


Figura 4. Visão geral do presente estudo, no qual avaliou-se o efeito do fluoreto trófico e do efluente do esgoto da EACF sobre o metabolismo dos peixes antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*. Os efeitos do fluoreto sobre o metabolismo hepático foram conduzidos em quatro condições termo-salinas, incluindo duas temperaturas (0 e 4°C) e duas salinidades (20 e 35). O efluente do esgoto diluído na água do mar foi utilizado para avaliar o seu efeito sobre o metabolismo de *N. rossii* (diluições 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v)) e *N. coriiceps* (diluição 0,5% (v/v)). Os níveis de enzimas metabólicas foram acessados nos tecidos hepático, branquial, muscular e renal. Os níveis de constituintes plasmáticos foram acessados como "proxy" de respostas metabólicas (Fonte: O autor).

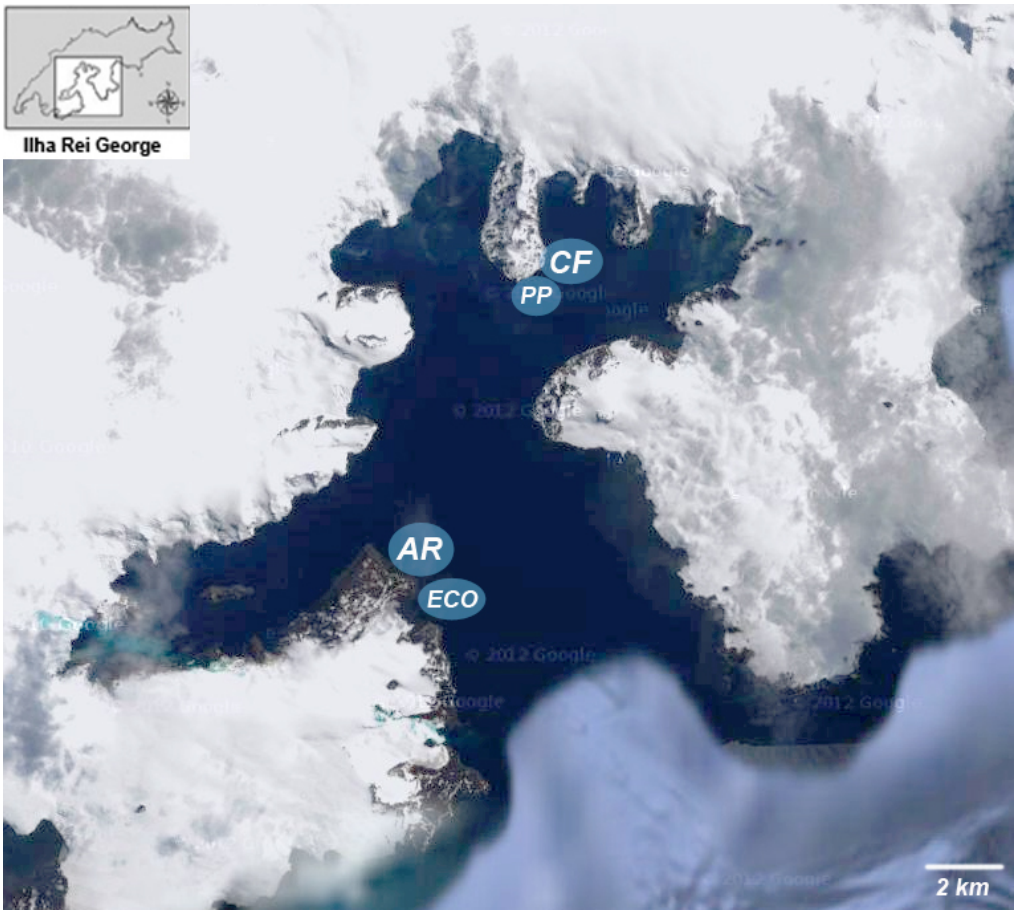


Figura 5. Sítios de coleta na Baia do Almirantado, Ilha Rei George. Os peixes antárticos *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* foram capturados em Punta Plaza (PP), há cerca de 500 m da EACF (CF, 62º05'0"S/ 58º23'28"W), e na Enseada do Glaciar "Ecology" (ECO), próximo da Estação Científica Polonesa de Arctowski (AR, 62°10'03,5''S/58°26'59,8''W) (Fonte: Adaptado de google mapas).

4.2. Protocolo experimental

Os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,1% p/v dissolvida em água do mar), pesados, marcados com linha colorida na nadadeira dorsal e transferidos para tanques aquário de 1000 L, na proporção de 1 peixe para cada 150 – 170 L de água do mar, em condições termo-salina próxima a da natureza (figura 6B). Os espécimes foram mantidos nessa condição durante 3 dias para minimizar o estresse causado pela manipulação, bem como, os animais foram condicionados a busca de alimento, o qual foi oferecida espetada em longo estilete, e direcionada até os mesmo. A aeração dos aquários foi contínua e o fotoperíodo foi de 12h, em todos os experimentos.

Figura 6. Laboratório de bioensaios da Estação Antártica Comandante Ferraz. Os peixes antárticos foram mantidos em tanques de 1000 L, vista lateral dos tanques na foto A e superior na foto B (Fonte: O Autor).

4.2.1. Bioensaios com fluoreto

Os oito experimentos foram conduzidos para avaliar o impacto de fatores ambientais sobre o metabolismo hepático de *N. rossii*, com 12 espécimes por experimento, combinando duas condições térmicas (0 e 4 ^{o}C), duas condições salinas (35 e 20 psu) e duas condições tróficas (dieta sem e com fluoreto). O desenho experimental com o número de peixes analisados, ao final de cada experimento, encontra-se resumido na figura 7.

A condição termo-salina de 0 ^{o}C e 35 psu foi definida como controle, por se tratar da condição experimental mais próxima do ambiente natural desses peixes. Os bioensaios, na salinidade de 20 psu, foram iniciados reduzindo gradativamente, a salinidade da água do mar, de 35 psu para 20 psu, ao longo de um período de 6h. Os bioensaios, na condição térmica de 4 ^{o}C, foram iniciados elevando, gradativamente, a temperatura da água do mar, de 0 ^{o}C para 4 ^{o}C, ao longo de um período de 6 horas.

Os peixes foram alimentados, diariamente, com músculo axial de peixes antárticos, correspondente a 1% da massa corpórea de cada espécime em estudo. A alimentação com fluoreto foi conduzida injetando, na parte central do alimento, um pequeno volume de solução contendo 15 mg de fluoreto de sódio por quilo do espécime em estudo, que corresponde a ingestão de 6,8 mg de fluoreto por quilo do espécime. O alimento foi espetado na ponta de um longo estilete, e direcionado para cada um dos espécimes, em função da sua massa corpórea. Os peixes que recusaram o alimento ao longo dos experimentos, foram mantidos nos tanques, mas foram excluídos da análises ao final dos experimentos.

O tempo máximo estabelecido para captura do alimento foi de 30 segundos, como forma de preservar o fluoreto contido no alimento e evitar perdas por difusão. Após oferecer o alimento por 30 segundos sem sucesso, o alimento foi substituído e oferecido novamente ao peixe. Peixes que recusaram o alimento em três tentativas consecutivas foram excluídos das análises bioquímicas ao final dos experimentos, assim, como ilustrado na figura 7,

houve uma redução do “n” experimental, em decorrência do insucesso alimentar.

Os níveis de amônia e nitrito foram monitorados diariamente e os aquários foram sifonados a cada dois dias, com a renovação de 50% da água, na mesma condição de cada experimento. Os bioensaios tiveram duração de 11 dias. Todos os experimentos foram iniciados com 12 peixes.

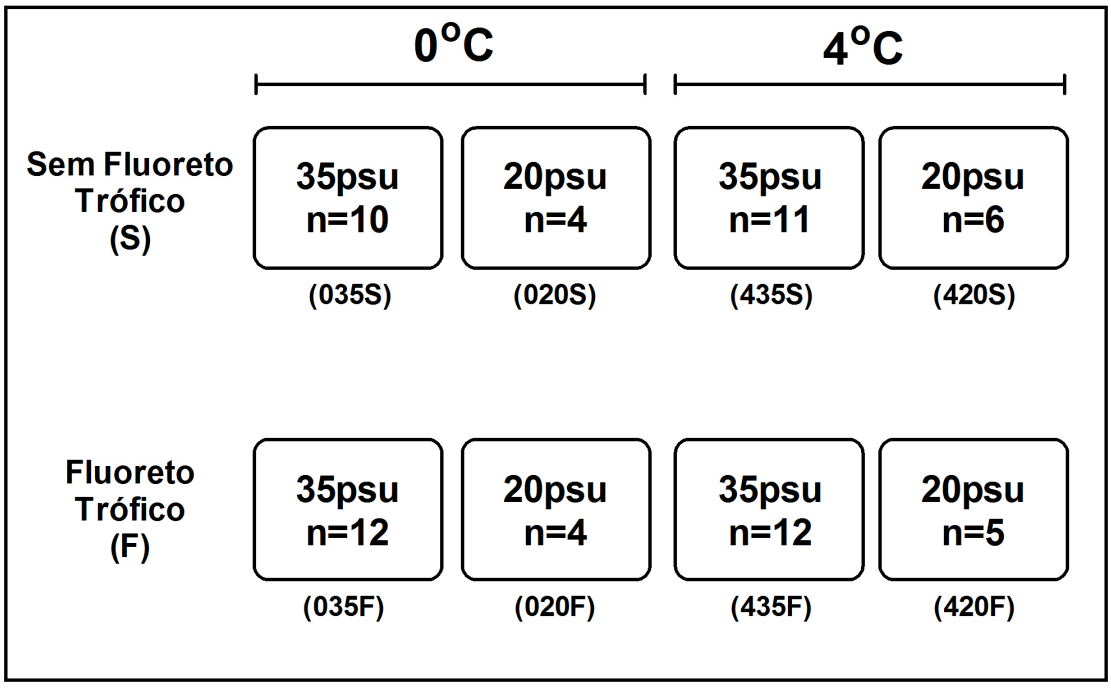


Figura 7. Desenho experimental referente ao impacto do fluoreto, temperatura e salinidade sobre o metabolismo hepático do peixe antártico *Notothenia rossii*. Os oito bioensaios foram conduzidos combinando a interação de duas temperaturas (0 ^{o}C e 4 ^{o}C), duas salinidades (35 e 20 psu) e duas condições tróficas (alimento fluoretado e não fluoretado). O número de espécimes (n) analisados, ao final de cada experimento. As siglas utilizadas para indicar as condições experimentais, foram: 035S - sem fluoreto, 0 ^{o}C, 35 psu; 035F – com fluoreto, 0 ^{o}C, 35 psu; 020S – sem fluoreto, 0 ^{o}C, 20 psu; 020F – com fluoreto, 0 ^{o}C, 20 psu; 435S – sem fluoreto, 4 ^{o}C, 35 psu; 435F – com fluoreto, 4 ^{o}C, 35 psu; 420S – sem fluoreto, 4 ^{o}C, 20 psu; 420F – com fluoreto, 4 ^{o}C, 20 psu (Fonte: O autor).

Ao final de cada experimento, os peixes foram sacrificados mediante secção da coluna vertebral, em local próximo da base do crânio, o tecido hepático foi retirado, transferido para criotubos e imediatamente congelados em nitrogênio liquido. As amostras foram transportas e mantidas

em nitrogênio líquido até o momento das análises realizadas no laboratório de bioquímica da Universidade de Taubaté (UNITAU).

4.2.2. Bioensaios com efluente da ETE

Todos os experimentos foram conduzidos com água do mar na condição termo-salina de 0 ^{o}C e 35 psu. Os peixes do controle experimental (n=10) foram mantidos em tanques com água do mar sem a adição de efluente. Os experimentos com o efluente da ETE, foram conduzidos nas diluições de 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v). Os experimentos de curto prazo (exposição de 96 horas, agudo) foram conduzidos com *N. rossii* (n=10) e *N. coriiceps* (n=10), com o efluente diluído para 0,5% (v/v). Os experimentos de longo prazo (exposição de 25 dias, sub-crônico) foram conduzidos apenas com *N. rossii* (n=12 para cada experimento), com o efluente diluído à 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v).

A água do efluente do esgoto, utilizada nos respectivos bioensaios, foram coletadas próximo a desembocadura do efluente na Enseada Martel. O efluente é proveniente do tratamento de água negra, oriunda de vasos sanitários e mictórios, que passam por tratamento primário e, após filtração anaeróbia, segue para um sistema de tratamento secundário. As águas cinzas, coletadas de chuveiros e pias passam por um sistema de retenção de material sólido e também são submetidas a filtração anaeróbia. Ao final, o efluente de ambos os tratamentos são combinados e lançados no infra-litoral próximo a EACF (GRÖNDAHL et al., 2009; TARASENKO & GILBERT, 2009).

O desenho experimental dos bioensaios com efluente da ETE esta sumarizado na figura 8. Os bioensaios com efluente foram iniciados, adicionando lentamente, ao longo de um período de 6h, o efluente da ETE na água do mar dos tanques. A água dos tanques foi trocada (50% do volume total) a cada 2 dias, na mesma condição de cada experimento, sendo que os bioensaios ocorreram sob o regime semi estático. Bem como os peixes foram alimentados, diariamente, com músculo axial de peixes antárticos, correspondente a 1% da massa corpórea de cada espécime em estudo.

Ao final dos experimentos, o sangue foi coletado mediante punção da veia caudal com seringa heparinizada. A coleta foi realizada sem anestesia e em tempo de coleta inferior a 60 segundos, minimizando o impacto do estresse da coleta sobre os níveis dos constituintes sanguíneos (PANKHURST, 2011). As amostras de sangue foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos à 2.000 x g, sendo as amostras de plasma transferidas para tubos criogênicos e, imediatamente, congeladas em nitrogênio líquido.

Os peixes foram subsequentemente sacrificados por secção da coluna vertebral, em local próximo da base do crânio. Amostras de brânquias (2^o arco branquial), fígado (lóbulo inferior), rins (parte média e posterior) e músculo (musculatura branca), foram transferidas para tubos criogênicos e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido.

O controle positivo de etoxiresorufin-0-dietilase (EROD), foi conduzido injetando uma dose única de β-naftoflavona (β-NF) na cavidade peritoneal de *N. rossii*, equivalente a 10 mg de β-NF/kg peixe, dissolvida em óleo de soja. Volumes de 100 µL foram injetados para cada 100 g de peso do espécime, como descrito por Di Bello *et al*. (2007). Os peixes foram mantidos durante 25 dias, na condição termo-salina de 0 ^oC e 35 psu. A água dos tanques foi trocada (50% do volume total) a cada 2 dias, na mesma condição termo-salina. Bem como os peixes foram alimentados, diariamente, com músculo axial de peixes antárticos, correspondente a 1% da massa corpórea de cada espécime em estudo. Imediatamente após o tempo experimental, os peixes foram sacrificados, o lóbulo inferior do fígado removido e congelado em nitrogênio líquido. Todas as amostras foram transportadas e armazenadas em nitrogênio líquido, até a sua análise no laboratório de bioquímica da UNITAU.

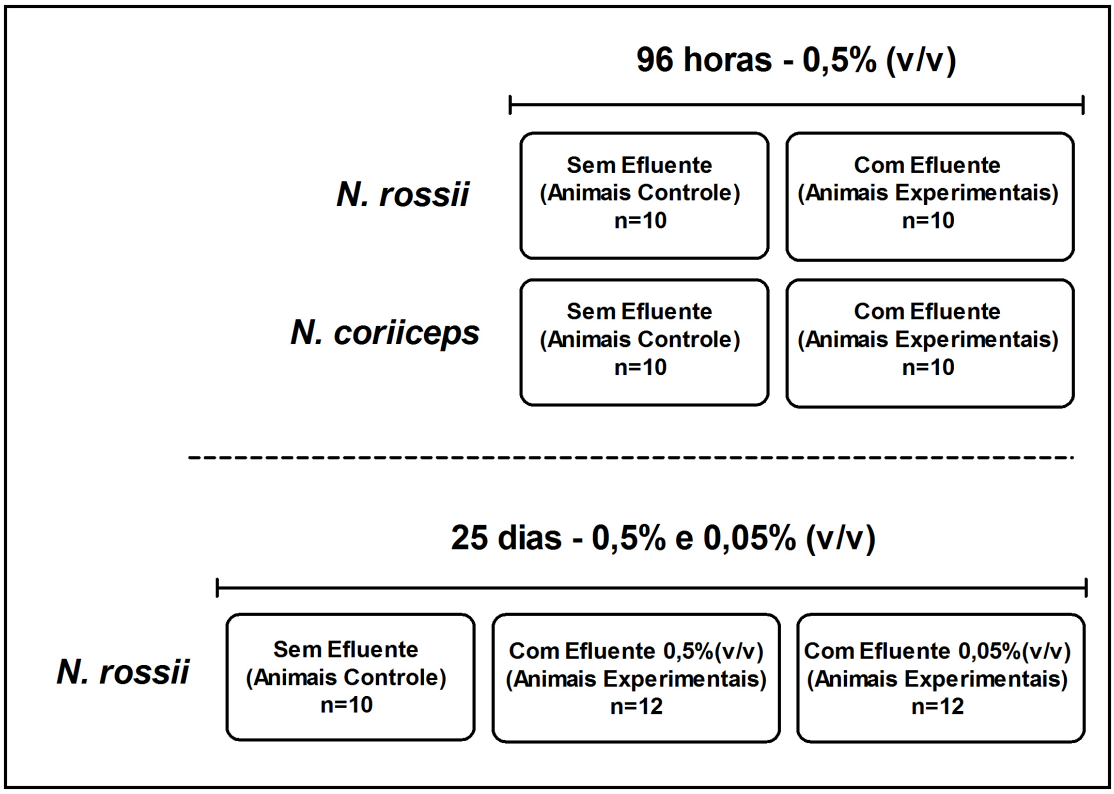


Figura 8. Desenho experimental dos bioensaios realizados com o efluente da estação de tratamento de esgoto (ETE) da Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). Os bioensaios de 96 horas (curto prazo, agudo) foram conduzidos com *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), na água do mar dos tanques. Os bioensaios de 25 dias (logo prazo, sub-crônico) foram conduzidos apenas com *N. rossii*, com o efluente diluído à 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v). O número de espécimes (n) utilizado está indicado abaixo de cada condição experimental (Fonte: O autor).

4.3. Obtenção de homogeneizados teciduais

Os tecidos foram homogeneizados em Potter-Elvehjen, na proporção de 10 mL de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) para cada grama de tecido, como descrito por Torres & Somero (1988a). Os homogeneizados foram sonicados durante 15 segundos e centrifugados a 14.000 g durante 10 minutos. Os sobrenadantes foram imediatamente utilizados para determinação da atividade das enzimas hexoquinase (HK), glicogênio fosforilase (GPase), glicose-6-fosfatase (G6Pase), fosfofructoquinase (PFK), citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH), glicose-6-fosfato

desidrogenase (G-6-PDH), glutationa redutase (GR), superóxido dismutase (SOD) e arginase (ARG).

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

O tecido hepático, utilizado para determinar a atividade da EROD, foi homogeneizado em Potter-Elvehjen na proporção de 1g de fígado para 5mL de tampão de extração, contendo tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,4, KCl 150 mM, EDTA 1mM e ditiotreitol 1mM. Os homogeneizados foram sonicados durante 15 segundos e centrifugados à 14.000xg por 30 minutos, para eliminar restos celulares e mitocôndrias. Os sobrenadantes dessa etapa foram centrifugados à 100.000xg por 1 hora para sedimentação da fração microssomal, sendo os sobrenadantes descartados e os sedimentos, constituído de microssomos, ressuspensos em 1ml de tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,4, contendo KCl 150 mM, EDTA 1mM, ditiotreitol 1mM e glicerol 20% (v/v). Os conteúdos foram sonicados para a total dispersão dos microssomos e a suspensão microssomal foi congelada em freezer a -80^{o}C e, analisada posteriormente, quanto a atividade da EROD (NILSEN et al., 1998). Todas as etapas preparativas de homogeneizados foram conduzidas em temperaturas entre 0 e 4 ^{o}C.

4.4. Procedimentos analíticos

Todas as determinações bioquímicas foram conduzidas em triplicata. Os métodos analíticos utilizados para quantificar os constituintes plasmáticos e mensurar as atividades enzimáticas teciduais, foram previamente validados no laboratório de bioquímica da UNITAU, utilizando amostras biológicas de peixes antárticos.

4.4.1. Constituintes plasmáticos

Os níveis de proteínas totais (PT), albumina (Alb), cálcio (Ca), fosfato inorgânico (P*i*), magnésio (Mg), cloreto (Cl), triglicerídeos (TG), colesterol (Col) e glicose (Gli) foram determinados no plasma de *N. rossii* e *N. coriiceps*, utilizando Kits reagentes da Labtest Diagnóstica S.A. – Vista Alegre, Minas Gerais, Brasil. Os métodos analíticos foram otimizados para microanálises, com volumes de reagentes entre 200 a 250 µL. Todas as leituras espectrofotométricas foram conduzidas no leitor de microplacas FLUOstar OPTMA.

4.4.1.1. Metabólitos não proteicos

A glicose plasmática foi determinada pelo método enzimático da hexoquinase, na qual a glicose-6-fosfato formada na reação catalisada pela hexoquinase, foi oxidada à 6-fosfogliconato na presença da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e $NADP^+$ como agente oxidante. O $NADPH+H^+$ formado na reação foi quantificado espectrofotometricamente em λ=340 nm.

O colesterol plasmático total (esterificado e não esterificado) foi determinado pelo método enzimático Trinder. O colesterol esterificado presente no plasma foi hidrolisado na presença de esterases, originando colesterol não esterificado e ácido graxo. Assim, o colesterol total foi oxidado na presença da colesterol oxidase originando água oxigenada, que na presença de 4-aminoantipirina e fenol, e sob a ação de peroxidases, originou o cromóforo antipirilquinonimina. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em λ=505 nm.

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

4.4.1.2. Proteínas

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

4.4.1.3. Eletrólitos não proteicos

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

As concentrações de proteínas totais e albumina foram expressas em g/L e as demais concentrações de constituintes plasmáticos em mmol/L. Os limites de linearidade dos métodos analíticos foram verificados previamente através de curvas de referencia. As amostras com leituras espectrofotométricas acima do limite da linearidade foram diluídas com solução salina 9 g/L e submetidas a novas análises. Todas as determinações de constituintes plasmáticos foram baseadas em reações de ponto final (BURTIS & ASHWOOD, 1994).

4.4.2. Determinação da atividade enzimática

As análises enzimáticas foram realizadas em microplacas de 384 poços, exceto a arginase que foi determinada em placas de 96 poços e a catalase determinada, em cubetas de 1 mL com caminho óptico de 1 cm. As

leituras de absorbância em microplacas foram realizadas no leitor FLUOstar OPTMA. As leituras espectrofotométricas referentes a enzima catalase foram realizadas no espectrofotômetro Beckman DU640. Todas as reações enzimáticas foram realizadas na temperatura não desnaturante de 20ºC.

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

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH, EC. 1.1.1.49) foi determinada em tampão Tris-HCl 100 mM (pH 7,4), contendo glicose-6-fosfato 1,0 mM e $NADP^+$ 0,2 mM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (CIARDIELLO et al., 1995).

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

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

A atividade da glicose-6-fosfatase (G6Pase, EC. 3.1.3.9) foi determinada por método descontínuo, em sistema de reação contendo tampão imidazol 100 mM (pH 6,5), glicose-6-fosfato 26,5 mM, EDTA 1,8 mM (ALEGRE et al., 1988). O fosfato formado na reação de hidrólise catalisada pela G6Pase,

foi quantificado pelo método do verde de malachita, como descrito por Fathi *et al*. (2002). A reação catalisada pela G6Pase foi interrompida pela adição do reativo verde de malachita (contendo molibdato de amônia, verde de malachita e ácido clorídrico) e o sistema foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos. A cor esverdeada do complexo formado entre fosfato inorgânico e malachita e molibdato, foi lida em λ=600 nm. As leituras espectrofotométricas foram convertidas em μmol de fosfato inorgânico contra uma curva de referência.

A atividade da lactato desidrogenase (LDH, EC. 1.1.1.27) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo piruvato de sódio 2,0 mM, cloreto de potássio 100 mM e NADH+H^+ 150 μM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (THUESEN et al., 2005).

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

A atividade da malato desidrogenase (MDH, EC. 1.1.1.37) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo oxaloacetato 0,4 mM, cloreto de magnésio 20 mM e NADH+H^+ 150 μM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (CHILDRESS & SOMERO, 1979).

A atividade da sódio/potássio adenosina trifosfatase (Na^+/K^+ ATPase, EC. 2.4.1.1) foi determinada em tampão Imidazol 50 mM (pH 7,4), contendo fosfoenolpiruvato 2 mM, NADH+H^+ 0,16 mM, ATP 0,5 mM, lactato desidrogenase 2,86 U/L, piruvato quinase 3,57 U/L, cloreto de magnésio 3,5 mM, cloreto de potássio 28 mM, cloreto de sódio 63 mM e ouabaína 0,5 mM. A atividade total da ATPase, foi determinada em meio de reação sem ouabaína. A variação de absorbância foi acompanhada em λ=340 nm. A atividade da

Na/K ATPase foi calculada subtraindo a atividade total da atividade da ATPase na presença de ouabaína (MCCORMICK, 1993).

A atividade da catalase (CAT EC. 1.11.1.6) foi determinada em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 7,0), contendo peróxido de hidrogênio 30 mM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=240 nm (REGOLI et al., 1997).

A atividade da superóxido dismutase (SOD EC. 1.15.1.1) foi determinada em tampão carbonato de sódio 100 mM (pH 10,2), contendo EDTA 0,0175 mM, cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT) 1mM e hidroxilamina 3,7 mM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua λ=560 nm (KONO, 1978).

A atividade da glutationa redutase (GR EC. 1.8.1.7) foi determinada em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), contendo EDTA 0,5 mM, $NADPH+H^+$ 0,25 mM e glutationa oxidada 1 mM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua em λ=340 nm (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006).

A atividade da etoxiresorufin-o-dietilase (EROD) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), contendo $NADPH+H^+$ 4 mM e etoxiresorufin 2 μM. A quantificação espectrofluorimétrica da atividade EROD foi realizada, de forma contínua, acompanhando a variação da intensidade de fluorescência, excitando o sistema de reação em λ=560nm e lendo a luz emitida em λ=590 nm (HEFFERNAN & WINSTON, 1998; RADENAC et al., 2004).

A determinação de peroxidação de lipídeos (LPO) foi realizada segundo o método *FOX*, descrito por JIANG, *et al.*(1991; 1992). A quantificação de peroxidação lipídica nas amostras foram realizadas em sistemas de reação contendo metanol (100%), xilenol laranja 0,1 mM, ácido sulfúrico 25 mM, hidroxitolueno butilado (BHT) 4 mM e sulfato ferroso amoniacal ($FeSO_4.NH_4$) 0,25 mM. Amostras dos homogeneizados foram adicionadas a esse sistema de reação e mantidas durante 20 minutos a temperatura ambiente. Após

centrifugação a 10.000xg durante 10 minutos, os sobrenadantes foram lidos em λ=550 nm.

A determinação de proteínas carboniladas (PCO) foi realizada como descrito por LEVINE, et al. (1994). Alíquotas do homogeneizado foram incubadas em sistema de reação contendo 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) 10 mM e HCl 2M, e a mistura foi incubada a 37 ^{o}C durante 90 minutos. Após adição de ácido tricloroacético para concentração final de 28% (p/v), os microtubos foram centrifugados a 10.000xg por 10 minutos e os sobrenadantes descartado. Os sedimentos foram ressuspensos em uma mistura de etanol e acetato de etila na proporção de 1:1 e posteriormente centrifugados. O processo de lavagem do sedimento com etanol e acetato de etila foi repetido por mais duas vezes. Após a última lavagem, os sedimentos foram ressuspensos em cloreto de guanidina 6 M, centrifugados a 10.000xg por 10 minutos. As leituras espectrofotométricas foram realizadas em microplacas de 96 poços, em λ=340 nm.

A atividade da arginase (ARG, EC. 4.2.1.11) foi determinada por método descontínuo, em tampão glicina 50 mM (pH 9,5), contendo L-arginina 100 mM (pH 9,5) e cloreto de manganês 1 mM. A reação enzimática foi conduzida em microtubos, adicionando de 10 a 40 µL de homogeneizado ao sistema de reação, para compor um volume final de 250 µL. A reação foi interrompida com 250 µL de HCl 0,75 M e os microtubos centrifugados à 10.000xg por 5 minutos. Alíquotas de 25 µL dos sobrenadantes foram transferidas para microtubos contendo 25 µL de água e 100 µL de ninidrina (6% (p/v) em 2-metoxietanol). Após aquecimento à 100 ^{o}C por 25 minutos, os microtubos foram arrefecidos e alíquotas de 100 µL foram transferidas para placa de 384 poços. As leituras de absorbâncias foram realizadas em λ=520 (IYAMU et al., 2008).

A atividade das enzimas HK, CS, MDH, LDH, SOD e GR foram determinadas nas brânquias, rim, músculo e fígado; G6PDH e ARG nas brânquias, rim e fígado; PFK nas brânquias e músculos, GPase no rim e fígado, a Na/K-ATPase nas brânquias, e a G6Pase no fígado.

As atividades enzimáticas foram expressas em µmol de substrato transformado em produto no tempo de um minuto (U) ou em nmol de substrato transformado em produto no tempo de um minuto (mU). As atividades enzimáticas foram normalizadas em função da concentração de proteínas dos homogeneizadas e expressas U/mg de proteínas ou mU/mg de proteínas.

4.4.2.1. Vias metabólicas acessadas

Os níveis enzimáticos foram acessados como “proxy” das vias glicolítica, glicogenolítica, gliconeogênica, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) e catabolismo da L-arginina (figura 9) bem como da defesa antioxidante celular (figura 10).

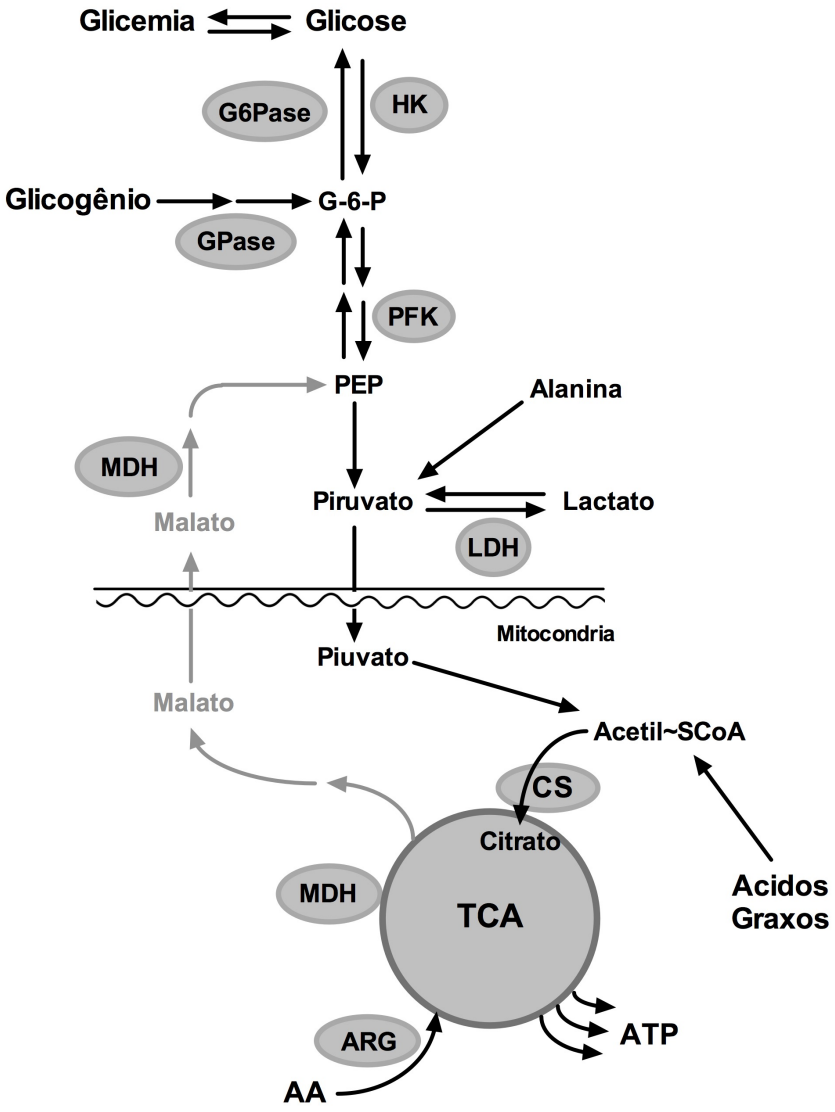


Figura 9. Enzimas do metabolismo energético acessadas no presente estudo, como "proxy" do metabolismo energético. Hexoquinase (HK), glicose-6-fosfatase (G6Pase), glicogênio fosforilase (GPase), fosfofructoquinase (PFK), lactato desidrogenase (LDH), malato desidrogenase (MDH), citrato sintase (CS) e arginase (ARG). (Fonte: O Autor).

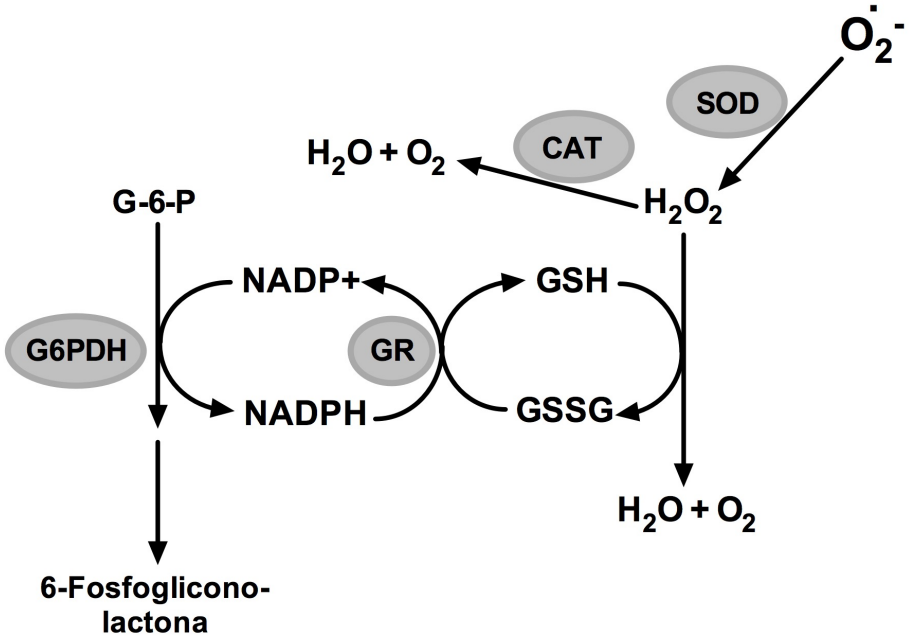


Figura 10. Enzimas da defesa antioxidante acessadas no presente estudo, como "proxy" da defesa antioxidante. Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). (Fonte: O Autor)

4.4.3. Conteúdo proteico dos homogeneizados

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

4.5. Tratamento de dados

Os valores absolutos dos níveis de constituintes plasmáticos, bem como das atividades enzimáticas, foram relativizados em função dos valores do grupo controle (0 ^{o}C, 35 psu, sem efluente), considerando que a condição termo-salina do controle é a mais próxima do ambiente natural de *N. rossii* e *N. coriiceps*. O valor 100% foi atribuído ao controle e os resultados dos demais grupos experimentais foram expressos em porcentagem relativa ao controle.

Assim, os valores relativizados expressam a diferença porcentual dos níveis de constituintes/atividades em relação ao controle. Os cálculos estatísticos, comparando os grupos controle com experimentais, foram realizados com os valores absolutos e, posteriormente, transpostos para os gráficos relativos (figura 11). A relativização de dados e a sua apresentação na forma de gráficos secundários, com valores expressos em porcentagem, ficaram restritos aos experimentos realizados com o efluente da ETE.

4.6. Tratamento Estatístico

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando os "softwares" Statistica 7.0 para Windows (ANOVA trifatorial) e GraphPad Prism 6.0 para Macintosh (teste t de student). Os resultados foram expressos como média ± EPM (erro padrão da média). Os valores médios dos grupos experimentais com efluente da ETE foram relativizados em função do valor médio do grupo controle. As comparações estatísticas, entre os tratamentos dos grupos experimentais com fluoreto, foram realizadas aplicando teste ANOVA trifatorial (temperatura, salinidade e fluoreto como fatores fixos), seguidos "a posteriori" de teste Tukey pareado para amostras com tamanhos diferentes. As comparações estatísticas entre o grupo controle e o grupo experimental com efluente, foram realizadas aplicando teste t-Student.

A homogeneidade das variâncias foi previamente verificada através do teste de Levene e a transformação logarítmica dos dados foi realizada quando necessário. As diferenças foram consideradas significativas para $p<0,05$.

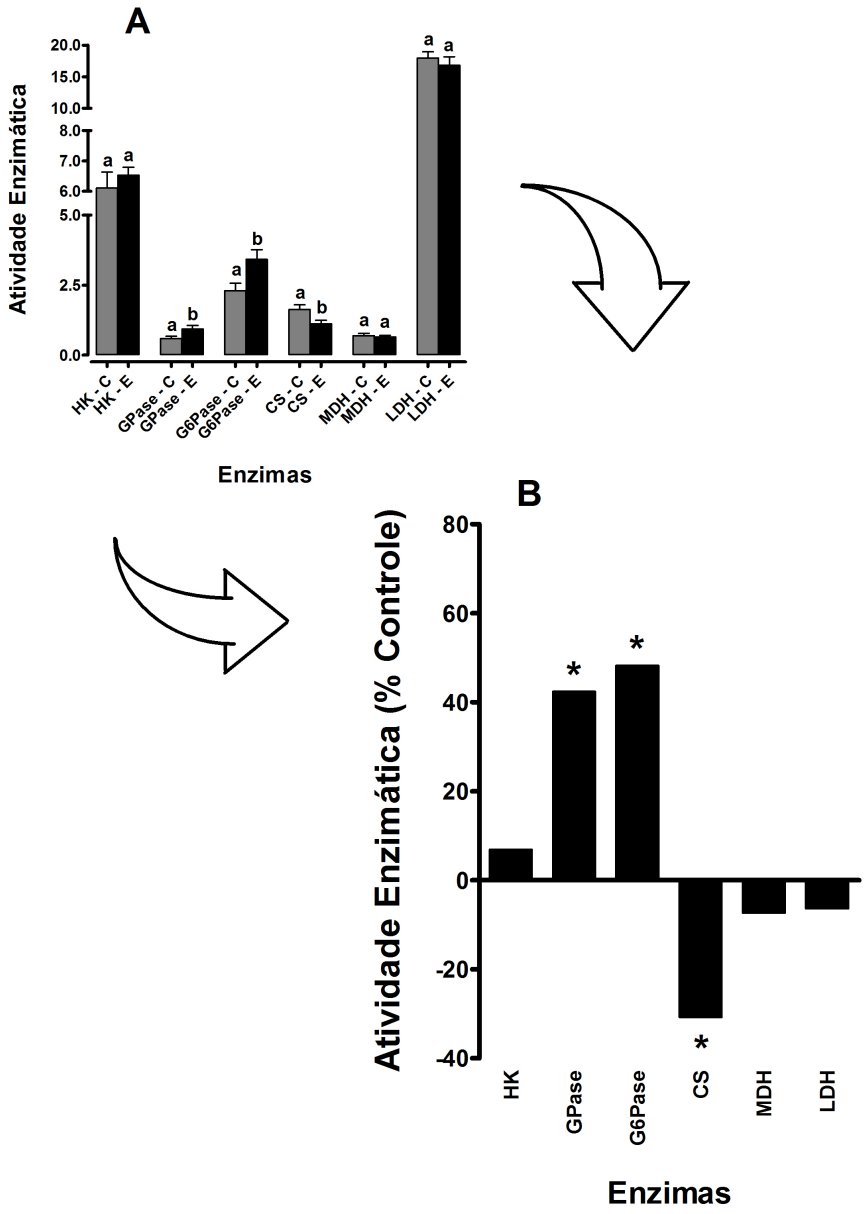


Figura 11. Relativização de dados em função do grupo controle. Os valores absolutos, obtidos a partir de análises bioquímicas, estão representados no gráfico A, onde letras minúsculas diferentes sobre as barras indicam valores estatisticamente diferentes para $p<0,05$. No gráfico secundário (B), construído com os dados relativizados e expressos em porcentagem, as diferenças estatísticas entre grupo controle e experimental, estão indicadas por asteriscos (*) sobre as barras, para $p<0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do fluoreto sob o metabolismo hepático

Ao longo dos bioensaios, os animais alimentados com músculo axial de peixes antárticos enriquecido com fluoreto, não apresentaram os sinais clássicos de intoxicação por fluoreto (SIGLER & NEUHOLD, 1972), bem como, não apresentaram diferenças comportamentais, comparado aos animais que receberam dieta não enriquecida com fluoreto.

5.1.1. Metabolismo energético

A dieta enriquecida com fluoreto, o aquecimento em 4 ^{o}C e a baixa salinidade não foram capaz de modular significativamente os níveis hepáticos das enzimas HK, G6Pase, CS, MDH e LDH de *N. rossii*. Também não foram observados efeitos de possíveis interações entre temperatura, salinidade e fluoreto sobre os níveis dessas enzimas (tabela 1).

As comparações estatísticas, entre os grupos experimentais, avaliando o efeito desses três fatores sobre o metabolismo energético do fígado de *N. rossii*, bem como os possíveis efeitos decorrentes de interações entre esses três fatores, estão sumarizadas na tabela 1. Os valores médios das atividades enzimáticas estão mostrados na figura 12.

Tabela 1. Comparação estatística dos níveis de enzimas do metabolismo energético do fígado de *N. rossii*. Hexoquinase (HK), glicose-6-fosfatase (G6Pase), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH) e lactato desidrogenase (LDH), foram comparadas entre grupos experimentais de *N. rossii*. Os valores de p e F foram obtidos a partir de análise ANOVA trifatorial, tendo temperatura (1), salinidade (2) e fluoreto (3) como fatores fixos. As possíveis interações entre os fatores temperatura - salinidade (12), temperatura - fluoreto (13), salinidade - fluoreto (23) e temperatura – salinidade – fluoreto (123) também foram estatisticamente avaliadas.

Fatores	HK		G6Pase		CS		MDH		LDH	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
1	0,6021	0,4412	0,0378	0,8465	0,3633	0,5492	1,1066	0,2975	0,8185	0,3698
2	0,8097	0,3723	2,7635	0,1023	0,2650	0,6088	0,0842	0,7726	1,0379	0,3131
3	0,5635	0,4562	1,7586	0,1904	0,0102	0,9198	1,2510	0,2683	0,2032	0,6540
12	2,2133	0,1428	0,0626	0,8033	0,0879	0,7679	0,7022	0,4058	3,8014	0,0567
13	1,3062	0,2583	0,0993	0,7539	0,0707	0,7913	0,3611	0,5504	0,2879	0,5938
23	0,7743	0,3829	0,0942	0,7601	0,0144	0,9046	0,7110	0,4028	0,6597	0,4204
123	0,0472	0,8288	0,4257	0,5169	0,0500	0,8237	0,6606	0,4199	0,0928	0,7618

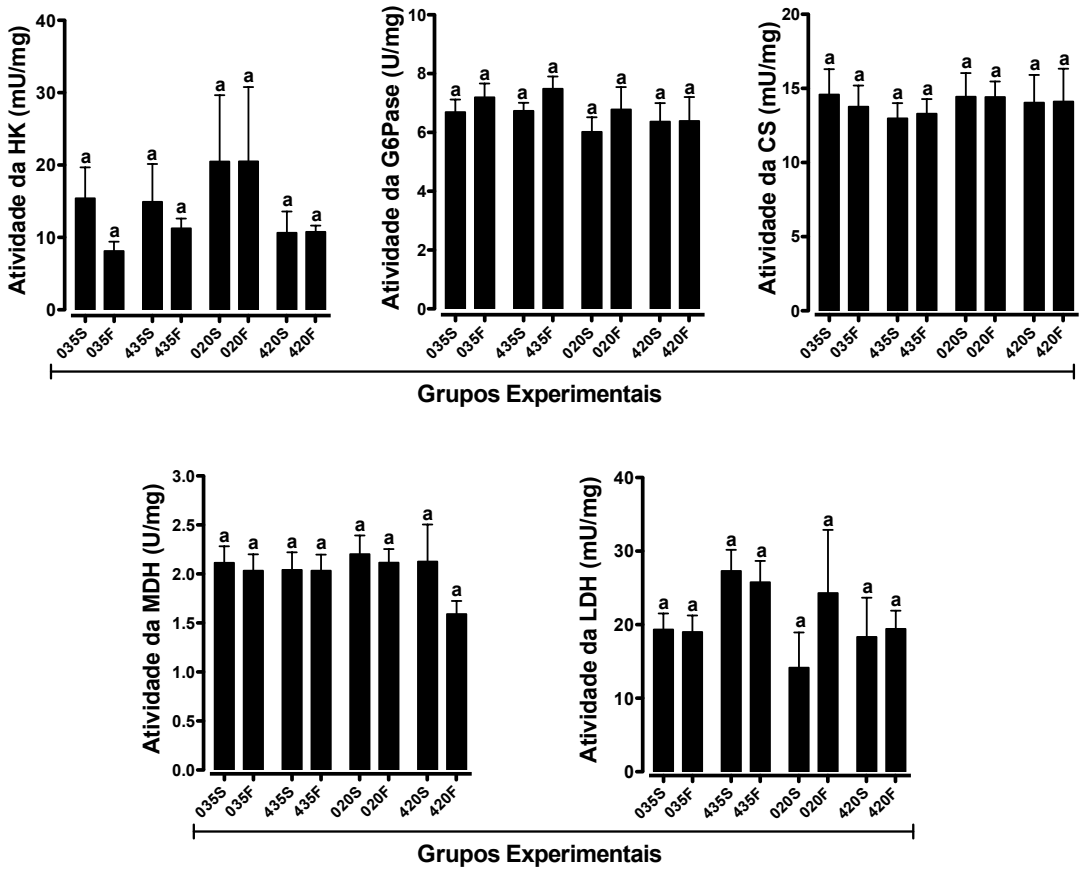


Figura 12. Níveis hepáticos de enzimas do metabolismo energético de *Notothenia rossii*. Os grupos experimentais foram aclimatados em diferentes condições termo-salino-tróficas, sendo: 035S – 0 ^{o}C, 35 psu, sem fluoreto; 035F - 0 ^{o}C, 35 psu, com fluoreto; 435S – 4 ^{o}C, 35 psu, sem fluoreto; 435F - 4 ^{o}C, 35 psu, com fluoreto; 020S – 0 ^{o}C, 20 psu, sem fluoreto; 020F - 0 ^{o}C, 20 psu, com fluoreto; 420S – 4 ^{o}C, 20 psu, sem fluoreto; 420F - 4 ^{o}C, 20 psu, com fluoreto. As atividades específicas das enzimas hexoquinase (HK), glicose-6-fosfatase (G6Pase), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH) e lactato desidrogenase (LDH) foram plotadas pela média ± erro padrão da média (EPM). Letras diferentes acima das barras indicam diferenças significativas para $p<0,05$.

5.1.2. Defesa antioxidante

As comparações estatísticas referentes aos efeitos da temperatura, salinidade e fluoreto, bem como de possíveis interações entre esses três fatores, sobre a defesa antioxidante do fígado de *N. rossii*, estão sumarizadas na tabela 2. Os valores médios das atividades enzimáticas estão mostrados nos gráficos da figura 13.

Os níveis de G6PDH não foram modulados significativamente pelo aquecimento, baixa salinidade ou fluoreto, embora, a baixa salinidade tenha provocado uma redução dos níveis de G6PDH ($p=0,0699$). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas, de interações entre temperatura, salinidade e fluoreto, capazes de modular os níveis de G6PDH.

O fluoreto trófico e a baixa salinidade não foram capazes de modular significativamente os níveis de SOD no fígado de *N. rossii*. Contudo, o aquecimento em 4 ^{o}C reduziu acentuadamente os níveis dessa enzima. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas, de interações entre temperatura, salinidade e fluoreto, capazes de modular os níveis de SOD.

Os níveis hepáticos de GR não foram modulados pelo fluoreto, aquecimento em 4 ^{o}C ou baixa salinidade. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas, de interações entre temperatura, salinidade e fluoreto, capazes de modular os níveis de GR.

Os níveis hepáticos de CAT foram modulados negativamente pelo aquecimento em 4 ^{o}C. A baixa salinidade e fluoreto não modularam os níveis dessa enzima. Não foram observadas diferenças estatísticas significativas, de interações entre temperatura, salinidade e fluoreto, capazes de modular os níveis de CAT.

Tabela 2. Comparação estatística entre os níveis de enzimas da defesa antioxidante do fígado de *N. rossii*. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR) e catalase (CAT) foram comparadas entre os diferentes grupos experimentais de *N. rossii*. Os valores de p e F foram obtidos a partir de análise ANOVA trifatorial, tendo temperatura (1), salinidade (2) e fluoreto (3) como fatores fixos. As possíveis interações entre os fatores temperatura - salinidade (12), temperatura - fluoreto (13), salinidade - fluoreto (23) e temperatura – salinidade – fluoreto (123) também foram estatisticamente avaliadas.

Fatores	G6PDH		SOD		GR		CAT	
	F	p	F	p	F	p	F	p
1	0,0555	0,8145	1,1325	0,2922	0,0353	0,8516	5,8665	0,0189
2	3,4217	0,0699	6,7305	0,0123	0,5220	0,4733	2,1401	0,1495
3	0,1520	0,6981	2,6318	0,1109	2,2753	0,1377	0,2043	0,6531
12	1,9467	0,1687	0,0274	0,8691	0,0024	0,9605	1,3118	0,2573
13	0,0014	0,9694	2,0959	0,1538	0,0671	0,7966	3,1408	0,0822
23	0,0763	0,7834	0,1728	0,6793	0,7951	0,3768	0,1437	0,7061
123	0,6009	0,4416	0,5628	0,4565	1,8094	0,1846	2,0132	0,1618

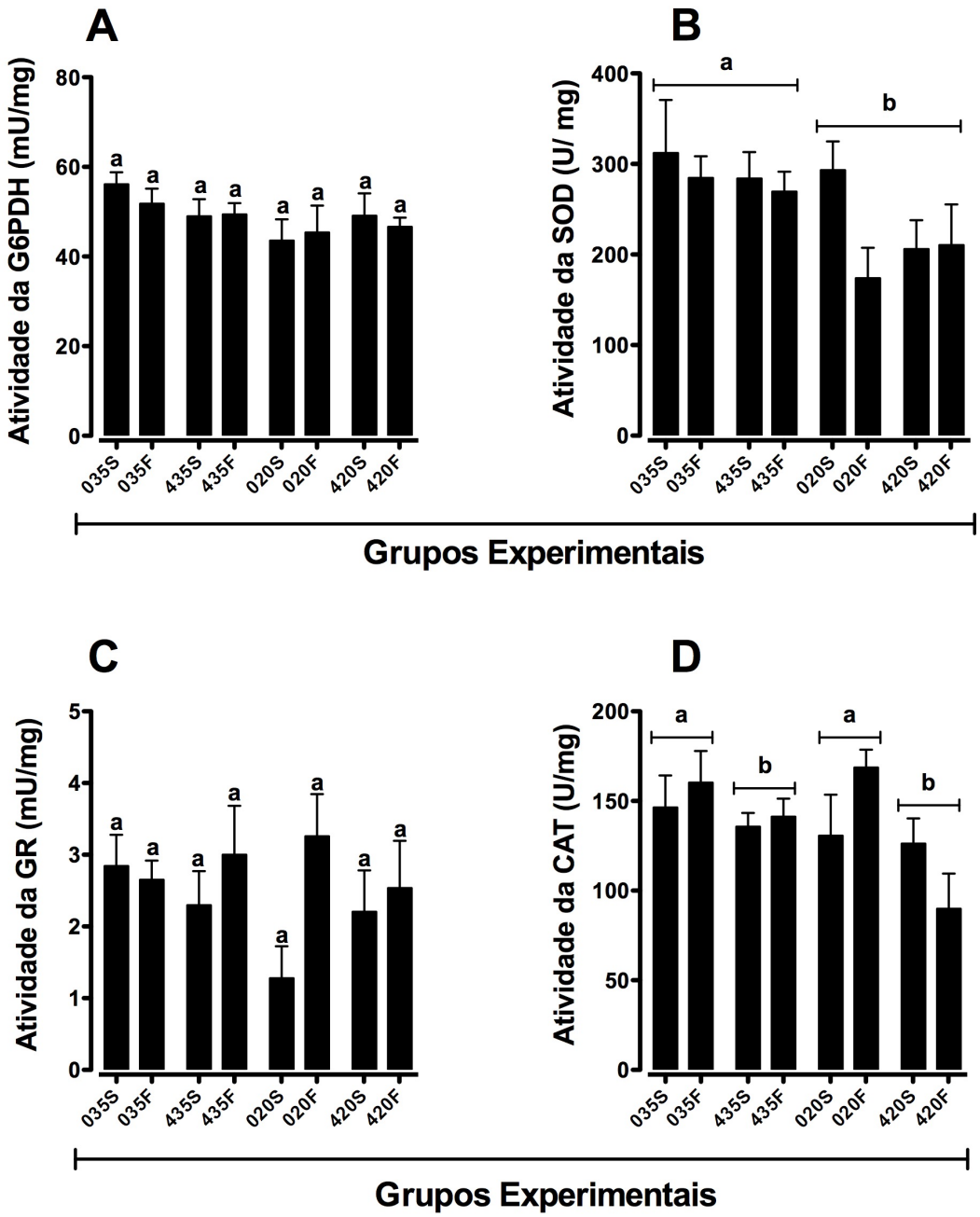


Figura 13. Níveis hepáticos de enzimas da defesa antioxidante de *Notothenia rossii*. Os grupos experimentais foram aclimatados em diferentes condições termo-salino-tróficas, sendo: 035S – 0 ^{o}C, 35 psu, sem fluoreto; 035F - 0 ^{o}C, 35 psu, com fluoreto; 435S – 4 ^{o}C, 35 psu, sem fluoreto; 435F - 4 ^{o}C, 35 psu, com fluoreto; 020S – 0 ^{o}C, 20 psu, sem fluoreto; 020F - 0 ^{o}C, 20 psu, com fluoreto; 420S – 4 ^{o}C, 20 psu, sem fluoreto; 420F - 4 ^{o}C, 20 psu, com fluoreto. As atividades específicas das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR)e catalase (CAT), foram plotadas pela média ± erro padrão da média (EPM). Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa para $p<0,05$.

5.1.3. Metabolismo da L-arginina

As comparações estatísticas referentes aos efeitos da temperatura, salinidade e fluoreto, bem como de possíveis interações entre esses três fatores, sobre os níveis de arginase hepática de *N. rossii*, estão sumarizadas na tabela 3. Os valores médios das atividades argininolíticas estão mostrados na figura 14.

A presença de níveis elevados de fluoreto na dieta, o aquecimento em 4 ^{o}C e a baixa salinidade não foram capazes de alterar significativamente os níveis de arginase no fígado de *N. rossii*. Bem como, não foram observadas diferenças estatísticas significativas, decorrentes de possíveis interações entre temperatura, salinidade e fluoreto.

Tabela 3. Comparação estatística dos níveis de arginase (ARG) hepática, entre grupos experimentais de *N. rossii*. Os valores de p e F foram obtidos a partir de análise ANOVA trifatorial, tendo temperatura (1), salinidade (2) e fluoreto (3) como fatores fixos. As possíveis interações entre os fatores temperatura - salinidade (12), temperatura - fluoreto (13), salinidade - fluoreto (23) e temperatura – salinidade – fluoreto (123) também foram estatisticamente avaliadas.

Fatores	ARG	
	F	p
1	0,5784	0,4504
2	1,0456	0,3113
3	1,0357	0,3136
12	0,0076	0,9304
13	3,3759	0,0719
23	1,4717	0,2306
123	2,3389	0,1323

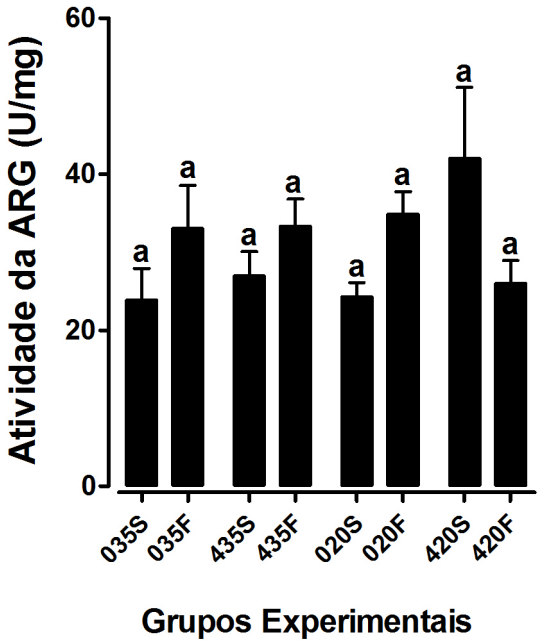


Figura 14. Níveis hepáticos de arginase (ARG) em *Notothenia rossii*. Os grupos experimentais foram aclimatados em diferentes condições termo-salino-tróficas, sendo: 035S – 0 ^{o}C, 35 psu, sem fluoreto; 035F - 0 ^{o}C, 35 psu, com fluoreto; 435S – 4 ^{o}C, 35 psu, sem fluoreto; 435F - 4 ^{o}C, 35 psu, com fluoreto; 020S – 0 ^{o}C, 20 psu, sem fluoreto; 020F - 0 ^{o}C, 20 psu, com fluoreto; 420S – 4 ^{o}C, 20 psu, sem fluoreto; 420F - 4 ^{o}C, 20 psu, com fluoreto. As atividades específicas de ARG foram plotadas pela média ± erro padrão da média (EPM). Letras diferentes acima das barras indicam diferença significativa para $p<0,05$.

5.2. Efeito do efluente da ETE sobre o metabolismo de nototenióides antárticos

Todos os peixes sobreviveram as condições experimentais com efluente da ETE. Contudo, os peixes expostos ao esgoto se mostraram mais ativos na busca por alimento, comparado aos animais do grupo controle.

5.2.1. Constituintes plasmáticos

Os níveis de constituintes plasmáticos de *N. rossii* e *N. coriiceps*, após exposição de 96 horas (curto prazo) ao efluente do esgoto da EACF, diluído para 0,5% (v/v) na água dos tanques; bem como os experimentos de longo prazo (25 dias), conduzidos apenas com *N. rossii*, nas diluições de 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v), então sumarizados nos gráficos da figura 15.

5.2.1.1. Metabólitos não proteicos

A exposição de *N. rossii* ao efluente do esgoto não alterou os níveis de glicose plasmática, tanto no curto como no longo prazo (figura 15B, C e D). Independente da diluição do efluente (0,5% (v/v) ou 0,05% (v/v)), a *N. rossii* foi capaz de manter a sua glicemia, no longo prazo, em valores próximos do controle experimental (figura 15C E D). Diferentemente, a glicemia de *N. coriiceps* sofreu redução ($p<0,007$) na exposição de curto prazo com o efluente do esgoto diluído para 0,5% (v/v) (figura 15A).

Os níveis de TG plasmático de *N. rossii* sofreram aumento ($p<0,0001$), na exposição de curto prazo, na presença do efluente diluído à 0,5% (v/v) (figura 15B). No longo prazo, os níveis de TG plasmático da *N. rossii* tenderam a aumentar tanto na diluição do esgoto para 0,5% (v/v) como em 0,05% (v/v), mas a diferença não foi significativa para $p<0,05$ (figura 15C e D). Já o nível de TG plasmático de *N. coriiceps* não sofreu alteração no curto prazo com o efluente do esgoto diluído para 0,5% (v/v) (figura 15A).

O colesterol plasmático de *N. rossii* e *N. coriiceps* sofreram elevação na exposição de curto prazo com o efluente diluído para 0,5% (v/v) (figura 15A e B). Na exposição de longo prazo, com o efluente diluído para 0,5% (v/v), o colesterol plasmático de *N. rossii* foi mantido em níveis elevados,

mas na diluição de 0,05% (v/v) essa hipercolesterolemia não ficou estatisticamente evidente (figura 15C e D).

5.2.1.2. Proteínas plasmáticas

Os níveis de proteínas totais no plasma de *N. rossii* e *N. coriiceps* não sofreram alterações significativas na exposição de curto e longo prazo, bem como em relação as diferentes diluições do efluente do esgoto, apenas no caso da *N. rossii* (figuras 15). Contudo, os níveis de albumina no plasma de *N. rossii* sofreram aumento na exposição tanto de curto como de longo prazo e na exposição ao efluente diluído para 0,5% (v/v) (curto e longo prazo) e 0,05% (v/v) (longo prazo) (figuras 15B, C e D). Esse aumento de albumina no plasma de *N. rossii* foi acompanhado pela redução dos níveis de globulinas (figuras 15B, C e D). De forma diferente, a exposição ao efluente induziu redução dos níveis de albumina e aumento de globulinas no plasma de *N. coriiceps* (figura 15A).

5.2.1.3. Eletrólitos não proteicos

Os níveis de cloreto e cálcio no plasma de *N. rossii* e *N. coriiceps* não sofreram alterações significativas em nenhuma das condições experimentais (figuras 15). Os níveis de magnésio no plasma de *N. rossii* foram modulados positivamente na exposição ao efluente diluído à 0,5% (v/v), tanto no curto como no longo prazo (figuras 15B, C e D). Essa modulação não ficou evidente no plasma de *N. rossii* expostas ao efluente diluído para 0,05% (v/v), no longo prazo (figura 15D).

De maneira oposta, os níveis de magnésio sofreram redução no plasma de *N. coriiceps* na exposição de curto prazo ao efluente diluído para 0,5% (v/v) (figura 15A). Em todas as condições experimentais, os níveis de fosfato inorgânico sofreram elevação significativa no plasma de *N. rossii* (figuras 15B, C e D). Diferente de *N. coriiceps* que não foi capaz de modular o nível desse eletrólito na exposição ao efluente diluído para 0,5% (v/v) (figura 15A).

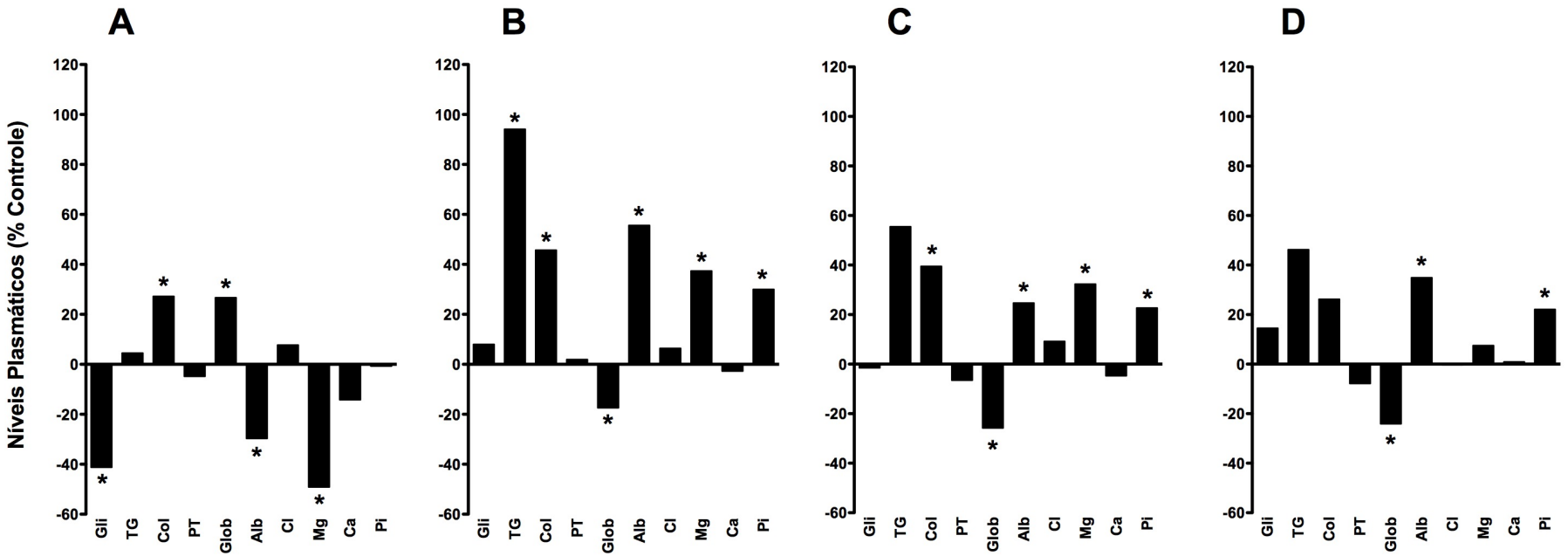


Figura 15. Níveis relativos de constituintes plasmáticos de *Notothenia coriiceps* (A) e *Notothenia rossii* (B), expostas por 96 horas ao efluente do esgoto da EACF, diluído à 0,5% (v/v); bem como, espécimes de *N. rossii* expostas por 25 dias, ao efluente da EACF, nas diluições de 0,5% (v/v) (C) e 0,05% (v/v) (D). Os valores relativizados expressam a diferença porcentual dos níveis de constituintes plasmáticos do grupo experimental em relação ao controle. As siglas correspondem aos constituintes, Gli: glicose; TG: triglicérides; Col: colesterol; PT: proteínas totais; Glob: globulinas; Alb: albumina; Cl: cloreto; Mg: magnésio; Ca: cálcio; Pi: fosfato inorgânico. O asterisco sobre as barras indica diferença significativa para $p<0,05$ em relação ao controle.

5.2.2. Metabolismo branquial

O efeito do efluente do esgoto da EACF sobre o metabolismo branquial dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*, foi avaliado com base nos níveis de enzimas do metabolismo energético, da defesa antioxidante, do catabolismo da L-arginina e do potencial energético da osmorregulação.

5.2.2.1. Metabolismo energético

A exposição de *N. rossii* ao efluente do esgoto da EACF, diluído à 0,5% (v/v) na água do mar dos tanques, foi capaz de modular negativamente os níveis de HK, MDH e LDH do tecido branquial, no curto prazo (figura 16B). Contudo, a resposta metabólica de *N. coriiceps*, nessa mesma condição experimental, não modulou os níveis de HK e MDH, mas foi capaz de modular negativamente os níveis de LDH (figura 16A). Já os níveis de PFK, uma enzima chave da via glicolítica, não foram modulados em ambas as espécies (figura 16). Os níveis de CS, enzima marcadora do metabolismo energético aeróbio, sofreram elevação, tanto em *N. rossii* como em *N. coriiceps* (figura 16).

Na exposição de longo prazo, a resposta do metabolismo energético branquial de *N. rossii*, em ambas as diluições do efluente (0,5% (v/v) e 0,05% (v/v)), foi marcada pela modulação positiva dos níveis das enzimas HK, CS e MDH, sem modulação dos níveis de PFK (figura 16B, C e D). Os níveis de LDH sofreram redução na exposição ao efluente diluído à 0,05% (v/v) (figura 16D), mas não sofreram alteração na exposição ao efluente diluído à 0,5% (v/v) (figura 16C).

5.2.2.2. Defesa antioxidante

Na exposição de curto prazo, o efluente de esgoto, diluído à 0,5% (v/v), modulou positivamente os níveis de G6PDH branquial, em ambas as espécies. Nessa mesma condição experimental ficou evidente a modulação negativa nos níveis de GR, sem alteração dos níveis de SOD, em ambas as espécies. Já os níveis de catalase branquial sofreram redução em *N. rossii* e permaneceram inalterados em *N. coriiceps*, a curto prazo (figura 16A e B).

Nos experimentos de longo prazo, a defesa antioxidante do tecido branquial apresentou resposta metabólica semelhante, nas duas diluições do efluente (0,5% (v/v) e 0,05% (v/v)). Contudo, diferente da exposição de curto prazo, os níveis de G6PDH não foram modulados pelo efluente e os níveis de GR foram modulados positivamente (figuras 16B, C e D).

5.2.2.3. Metabolismo da L-arginina

O potencial catabólico de L-arginina do tecido branquial de *N. rossii* e *N. coriiceps* foi modulado positivamente no curto prazo, na presença do efluente diluído à 0,5% (v/v) (figura 16A e B). Na exposição de longo prazo, tanto na diluição do efluente à 0,5% (v/v) como 0,05% (v/v), a atividade argininolítica não foram moduladas de forma significativa (figura 16C e D).

5.2.2.4. Potencial energético de osmorregulação

O potencial energético de osmorregulação do tecido branquial, marcado pelos níveis da enzima Na/K-ATPase, não sofreu alteração em nenhuma das condições experimentais, seja na presença do efluente diluído à 0,5% (v/v) ou 0,05% (v/v), na exposição de curto e longo prazo, em ambas as espécies (figuras 16).

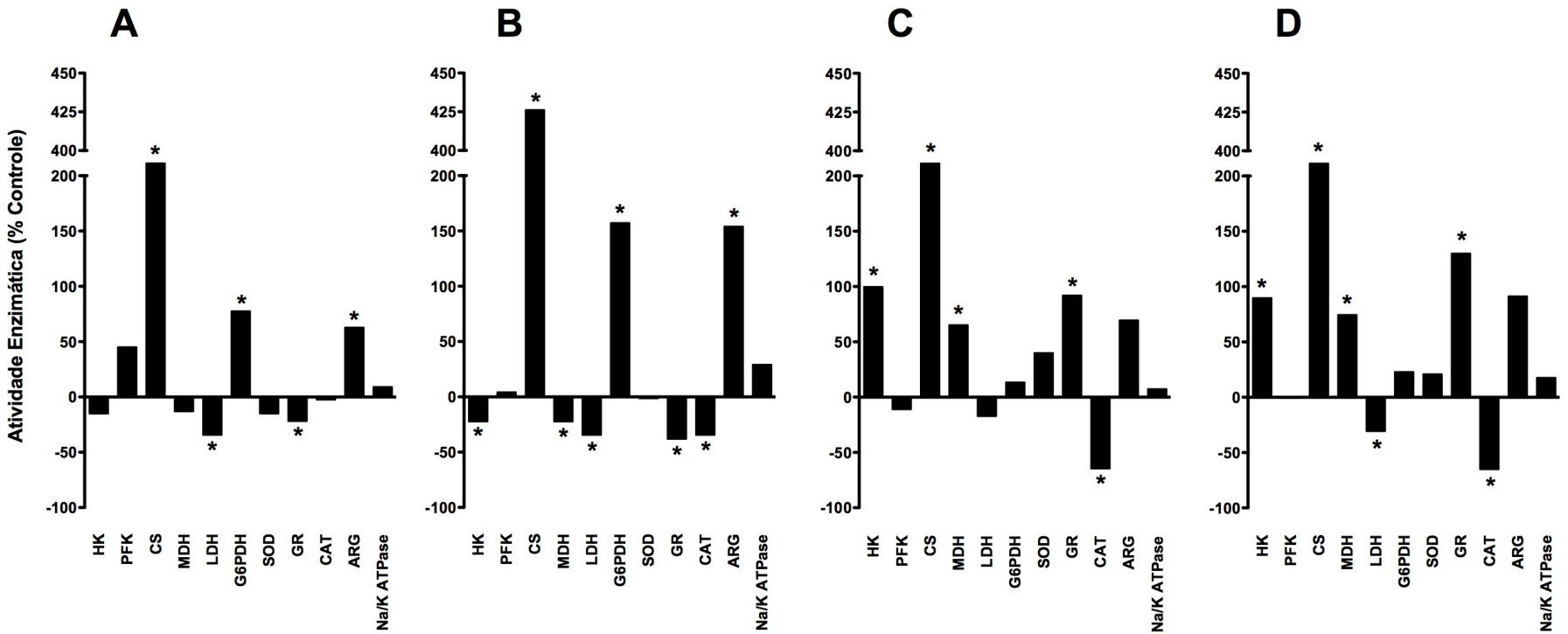


Figura 16. Níveis relativos das enzimas branquiais de *Notothenia coriiceps* (A) e *Notothenia rossii* (B), expostas ao efluente do esgoto diluído à 0,5% (v/v), durante 96 horas; bem como de espécimes de *N. rossii* expostas ao efluente durante 25 dias, nas diluições de 0,5% (v/v) (C) e 0,05% (v/v) (D). Os níveis das enzimas hexoquinase (HK), fosfofructoquinase (PFK), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR), catalase (CAT), arginase (ARG) e Na/K-ATPase foram utilizados como marcadores metabólicos. Os valores relativizados expressam a diferença porcentual dos níveis de enzimas do grupo experimental em relação ao controle. O asterisco sobre as barras indicam diferença significativa para $p<0,05$ em relação ao grupo controle.

5.2.3. Metabolismo renal

O efeito do efluente do esgoto da EACF sobre o metabolismo renal dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*, foi avaliado com base nos níveis de enzimas do metabolismo energético, da defesa antioxidante e do catabolismo da L-arginina.

5.2.3.1. Metabolismo energético

O tecido renal elevou expressivamente os níveis de todas as enzimas do metabolismo energético, tanto em *N. rossii* como *N. coriiceps*, após exposição de 96 horas ao efluente da ETE diluído à 0,5% (v/v), (figura 17A e B). Contudo, o aumento dos níveis de CS foi mais expressivo em *N. coriiceps* do que em *N. rossii*. A modulação positiva dos níveis de GPase, MDH e LDH foram semelhantes em ambas espécies (figura 17A e B).

Na exposição de longo prazo, conduzida apenas com *N. rossii*, os níveis de todas as enzimas do metabolismo energético analisadas no presente estudo, permaneceram elevadas tanto na presença do efluente da ETE diluído à 0,5% (v/v) como à 0,05% (v/v). Embora a diferença entre as duas diluições do efluente seja de uma ordem de grandeza, a intensidade da modulação positiva dos níveis de enzimas do metabolismo energético, foi mantida dentro da mesma ordem de grandeza (figura 17C e D).

5.2.3.2. Defesa antioxidante

O perfil da modulação da defesa antioxidante do tecido renal de *N. rossii* e *N. coriiceps*, expostas no curto prazo ao efluente da ETE diluído à 0,5% (v/v), foi muito semelhante. Em ambas as espécies foi observado aumento dos níveis de G6PDH, e os níveis de GR permaneceram estatisticamente inalterados. Por outro lado, os níveis de CAT sofreram redução significativa em *N. rossii* e permaneceram inalterados em *N. coriiceps* (figura 17A e B).

Na exposição de longo prazo ao efluente da ETE, os níveis de enzimas da defesa antioxidante, foram modulados com intensidade muito próximas com o efluente diluído à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v). O aumento dos

níveis de G6PDH foi de 225% e 316%, para o efluente diluído à 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v), respectivamente. O aumento dos níveis de SOD foi de 127% e 114%, efluente diluído à 0,05% (v/v) e 0,5% (v/v), respectivamente. Os níveis de CAT sofreram elevação significativa na exposição ao efluente diluído à 0,5% (v/v), mas muito pouco, no limite da significância estatística (p=0,055), com o efluente diluído à 0,05% (v/v). Em ambas as espécies, os níveis de GR não foram modulados pelo efluente diluído à 0,5% (v/v), no curto prazo, e à 0,05% (v/v), no logo prazo (figura 17).

5.2.3.3. Metabolismo da L-arginina

Os níveis de ARG foram modulados positivamente, no curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), em ambas as espécies, mas esse aumento foi bem mais acentuado em *N. coriiceps*. Nos experimentos de longo prazo, conduzidos apenas com *N. rossii*, os níveis de ARG apresentaram valores próximos do controle, tanto na presença de efluente diluído à 0,5% (v/v) como à 0,05% (v/v) (figura 17).

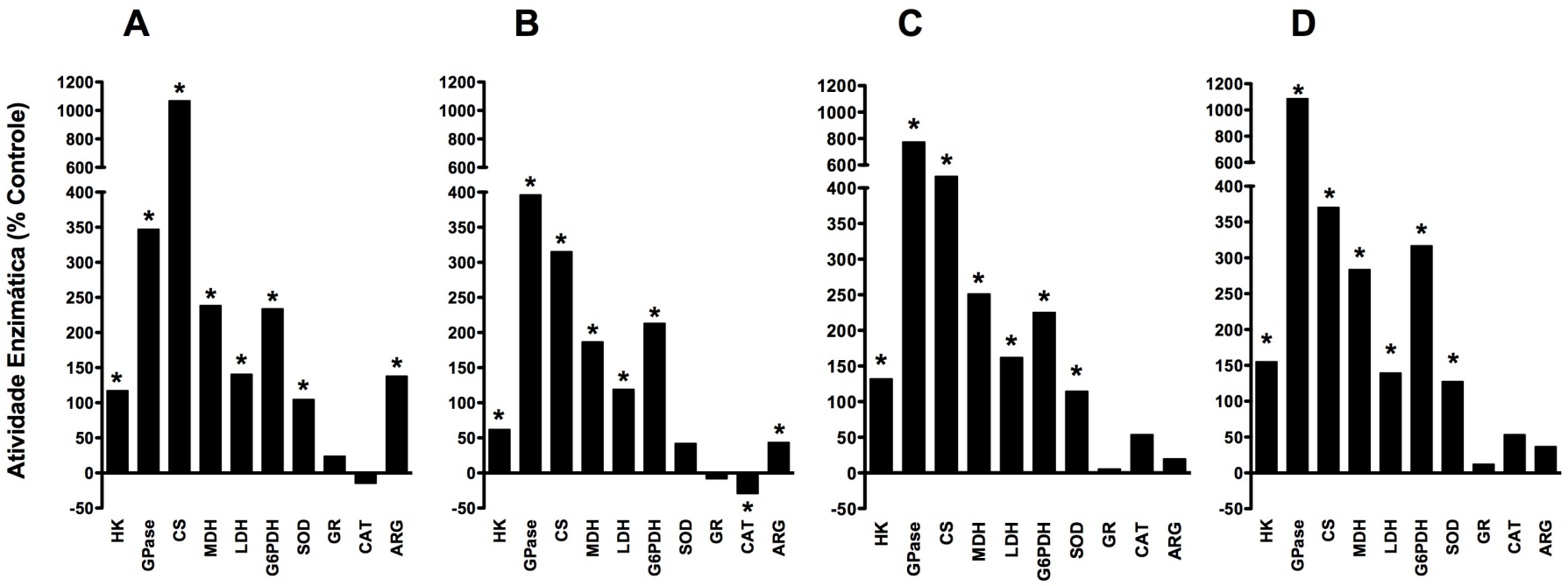


Figura 17. Níveis relativos das enzimas renais de *Notothenia coriiceps* (A) e *Notothenia rossii* (B), expostas ao efluente do esgoto diluído à 0,5% (v/v), durante 96 horas; bem como de espécimes de *N. rossii* expostas ao efluente durante 25 dias, nas diluições de 0,5% (v/v) (C) e 0,05% (v/v) (D). Os níveis das enzimas hexoquinase (HK), glicogênio fosforilase (GPase), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR), catalase (CAT) e arginase (ARG) foram utilizados como marcadores metabólicos. Os valores relativizados expressam a diferença porcentual dos níveis de enzimas do grupo experimental em relação ao controle. O asterisco sobre as barras indicam diferença significativa para $p<0,05$ em relação ao grupo controle.

5.2.4. Metabolismo muscular

O efeito do efluente do esgoto ETE sobre o metabolismo muscular dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*, foi avaliado com base nos níveis de enzimas do metabolismo energético e da defesa antioxidante.

5.2.4.1. Metabolismo energético

A exposição de curto prazo (96 horas), com o efluente diluído à 0,5% (v/v), não foi capaz de modular significativamente os níveis das enzimas PFK e CS no músculo de *N. rossii* e *N. coriiceps*. Os níveis de HK não reduziram em *N. rossii* (p=0,09) e sofreram redução significativa no músculo de *N. coriiceps*. Já os níveis de LDH e MDH foram mantidos inalterados em *N. rossii* e *N. coriiceps* (figura 18A e B).

Na exposição de longo prazo (25 dias), o tecido muscular de *N. rossii,* modulou de forma semelhante os níveis de enzimas do metabolismo energético, tanto com o efluente diluído à 0,5% (v/v) como à 0,05% (v/v) (figura 18C e D). Contudo, os níveis de HK sofreram redução na exposição ao efluente diluído à 0,05% (v/v), mas essa redução não ficou evidente na diluição à 0,5% (v/v). Os níveis de PFK não foram modulados em nenhuma das duas diluições, sendo que os níveis de CS foram modulados positivamente e os de MDH negativamente, em ambas as diluições (0,5% (v/v) e 0,05% (v/v)) do efluente (figura 18C e D).

5.2.4.2. Defesa antioxidante

Na exposição de curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), os níveis de SOD sofreram elevação no tecido muscular de *N. rossii*, mas sem alteração significativa no músculo de *N. coriiceps*. Os níveis de GR não sofreram alteração em *N. rossii*, no curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), mas *N. coriiceps*, reduziu expressivamente os níveis de GR (figura 18A e B). No longo prazo, os níveis de GR sofreram redução e os de SOD sofreram um aumento, porém com diferenças não significativas, tanto com o efluente diluído à 0,5% (v/v) como em 0,05% (v/v) (figura 18C e D).

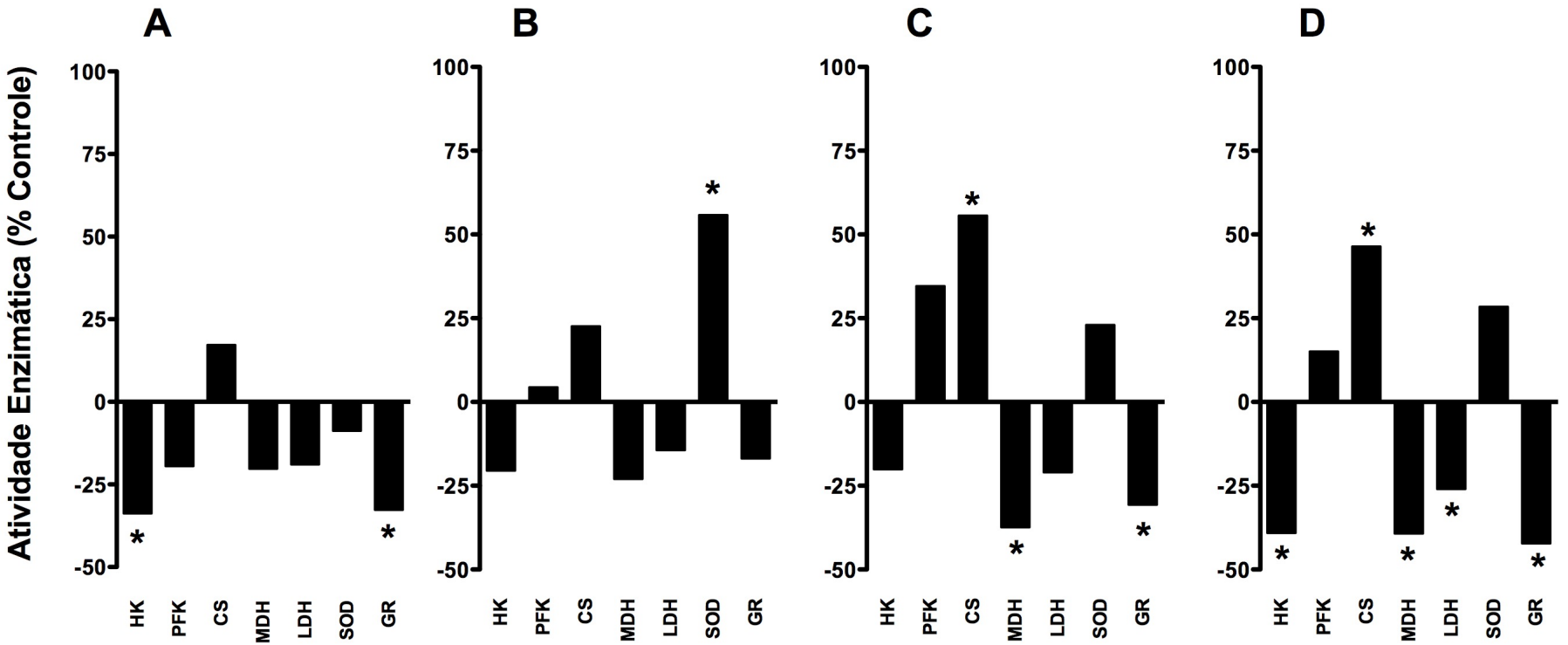


Figura 18. Níveis relativos das enzimas musculares de *Notothenia coriiceps* (A) e *Notothenia rossii* (B), expostas ao efluente do esgoto diluído à 0,5% (v/v), durante 96 horas; bem como de espécimes de *N. rossii* expostas ao efluente durante 25 dias, nas diluições de 0,5% (v/v) (C) e 0,05% (v/v) (D). Os níveis das enzimas hexoquinase (HK), fosfofructoquinase (PFK), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH), superóxido dismutase (SOD) e glutationa redutase (GR) foram utilizados como marcadores metabólicos. Os valores relativizados expressam a diferença porcentual dos níveis de enzimas do grupo experimental em relação ao controle. O asterisco sobre as barras indicam diferença significativa para $p<0,05$ em relação ao grupo controle.

5.2.5. Metabolismo hepático

O efeito do efluente do esgoto da ETE sobre o metabolismo hepático de *N. rossii* e *N. coriiceps* foi avaliado com base nos níveis de enzimas do metabolismo energético, da defesa antioxidante, do catabolismo da L-arginina e do metabolismo de xenobióticos. Os níveis de proteínas carboniladas (PCO) e peroxidação lipídica (LPO) foram acessados como marcadores de lesões oxidativas, mas ficaram abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados.

A capacidade do fígado induzir níveis de EROD, na presença de xenobióticos, foi avaliada injetando dose única de β-naftoflavona (β-NF), de 10 mg/kg, na cavidade peritoneal de *N. rossii*. Nesse caso, o fígado de *N. rossii* elevou os níveis de EROD em 23% (figura 20D).

5.2.5.1. Metabolismo energético

Na exposição de curto prazo com o efluente diluído à 0,5% (v/v), os peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps* modularam de forma distinta os níveis de enzimas do metabolismo energético do fígado. Enquanto *N. rossii* modulou positivamente os níveis de enzimas marcadoras do potencial glicogenolítico (GPase) e do potencial gliconeogênico (G6Pase), *N. coriiceps* foi capaz de elevar apenas os níveis de G6Pase. Os níveis da enzima CS, marcadora do potencial aeróbio gerador de ATP, sofreu redução no fígado de *N. rossii*, mas não sofreu alteração significativa no fígado de *N. coriiceps*. Os níveis das enzimas HK, MDH e LDH, de ambas as espécies, não foram modulados nessa condição experimental (figura 19A e B).

Na exposição de longo prazo, o fígado de *N. rossii* modulou de forma semelhante ao curto prazo, os níveis das enzimas do metabolismo energético, tanto com o efluente diluído à 0,5% (v/v) como à 0,05% (v/v). Os níveis de HK, GPase, MDH e LDH não foram significativamente modulados, embora houve um aumento dos níveis de GPase, na diluição de 0,5% (v/v). Os níveis de CS, em ambas as diluições, sofreram redução. Já a elevação dos níveis de G6Pase, ficou estatisticamente evidente apenas na diluição do efluente à 0,5% (v/v) (figura 19C e D).

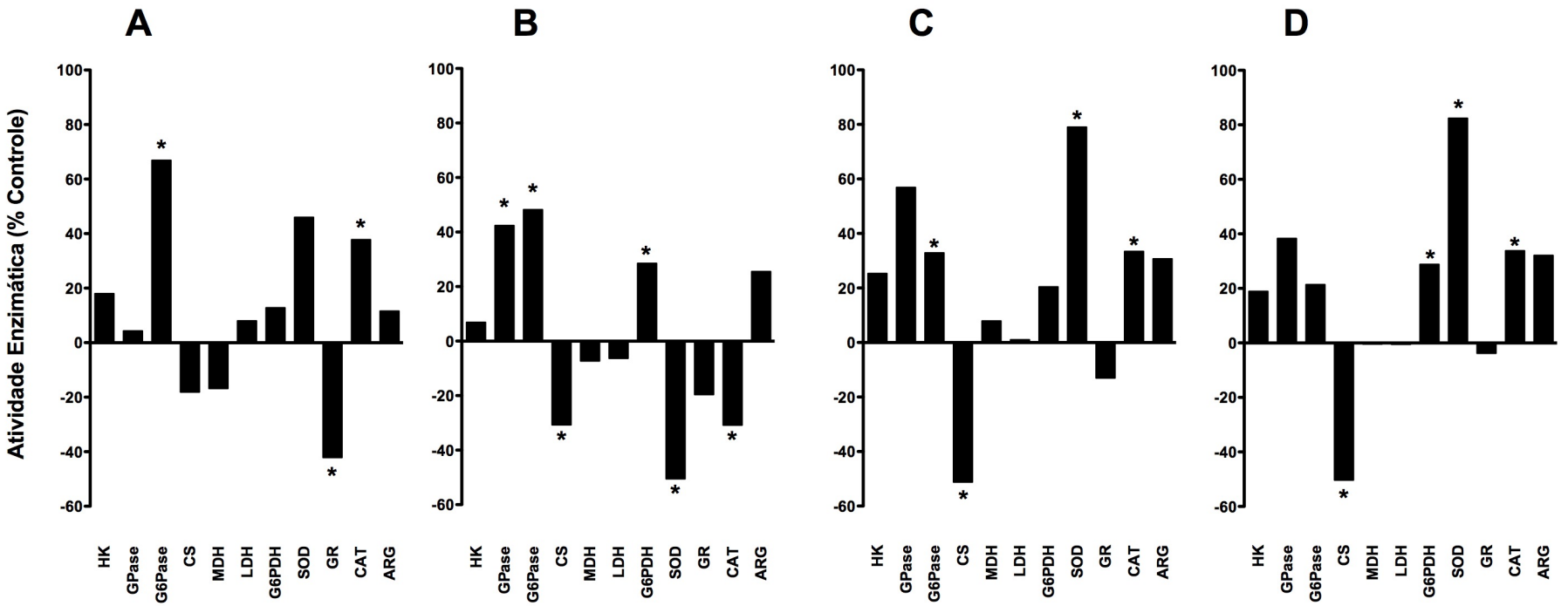


Figura 19. Níveis relativos das enzimas hepáticas de *Notothenia coriiceps* (A) e *Notothenia rossii* (B), expostas ao efluente do esgoto diluído à 0,5% (v/v), durante 96 horas; bem como de espécimes de *N. rossii* expostas ao efluente durante 25 dias, nas diluições de 0,5% (v/v) (C) e 0,05% (v/v) (D). Os níveis das enzimas hexoquinase (HK), glicogênio fosforilase (GPase), gliose-6-fosfatase (G6Pase) citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), superóxido dismutase (SOD), glutationa redutase (GR), catalase (CAT) e arginase (ARG) foram utilizados como marcadores metabólicos. Os valores relativizados expressam a diferença porcentual dos níveis de enzimas do grupo experimental em relação ao controle. O asterisco sobre as barras indicam diferença significativa para $p<0,05$ em relação ao grupo controle.

5.2.5.2. Defesa antioxidante

Na exposição de curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), os peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*, apresentaram respostas metabólicas distintas, em relação a defesa antioxidante do fígado. Os níveis de G6PDH sofreram aumento no tecido hepático de *N. rossii*, sem alterações significativas em *N. coriiceps*. Os níveis de SOD sofreram redução em *N. rossii*, com tendência de aumento em *N. coriiceps*. Já os níveis de GR, sofreram redução em *N. coriiceps* e foram mantidos em níveis próximos do controle experimental em *N. rossii*. Os níveis de CAT foram modulados de forma inversa nessas duas espécies, elevando em *N. coriiceps* e reduzindo em *N. rossii* (figura 19A e B).

Na exposição de longo prazo em *N. rossii*, os níveis de enzimas da defesa antioxidante foram modulados de forma similar, ao de curto prazo, nas diluições do efluente à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v). Os níveis de G6PDH sofreram elevação na exposição ao efluente diluído à 0,05% (v/v), mas na diluição em 0,5% (v/v) esse aumento não foi estatisticamente significativo. Na condição experimental de longo prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v), os níveis de SOD e CAT sofreram aumento e os níveis de GR não foram modulados (figura 19C e D).

5.2.5.3. Metabolismo da L-arginina

Tanto na exposição de curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), com *N. rossii* e *N. coriiceps* (figura 19A e B), bem como na exposição de longo prazo, com *N. rossii*, nas diluições de 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v) (figura 19C e D), os níveis hepáticos de arginase não sofreram elevação significativa.

5.2.5.4. Marcadores de lesão tecidual

Os níveis dos marcadores de lesão oxidativa proteica (carbonilação de proteínas, PCO) e lipídica (peroxidação lipídica, LPO), tanto na exposição de curto prazo de *N. rossii* e *N. coriiceps*, como na exposição de longo prazo de *N. rossii*, na presença do efluente diluído à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v), ficaram abaixo do limite de detecção dos métodos utilizados.

5.2.5.5. Metabolismo de xenobióticos

Os níveis de EROD foram determinados no fígado de *N. rossii* e *N. coriiceps*, como marcador de fase I do metabolismo de xenobióticos. O efluente da ETE, diluído à 0,5% (v/v), modulou negativamente os níveis de EROD no fígado de *N. rossii* e não modulou os níveis dessa enzima no fígado de *N. coriiceps*, na exposição de curto prazo (figura 20).

Na exposição de logo prazo, com o efluente da ETE diluído para 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v), em ambas as diluições, o efluente induziu redução dos níveis de EROD no fígado de *N. rossii* (figura 20).

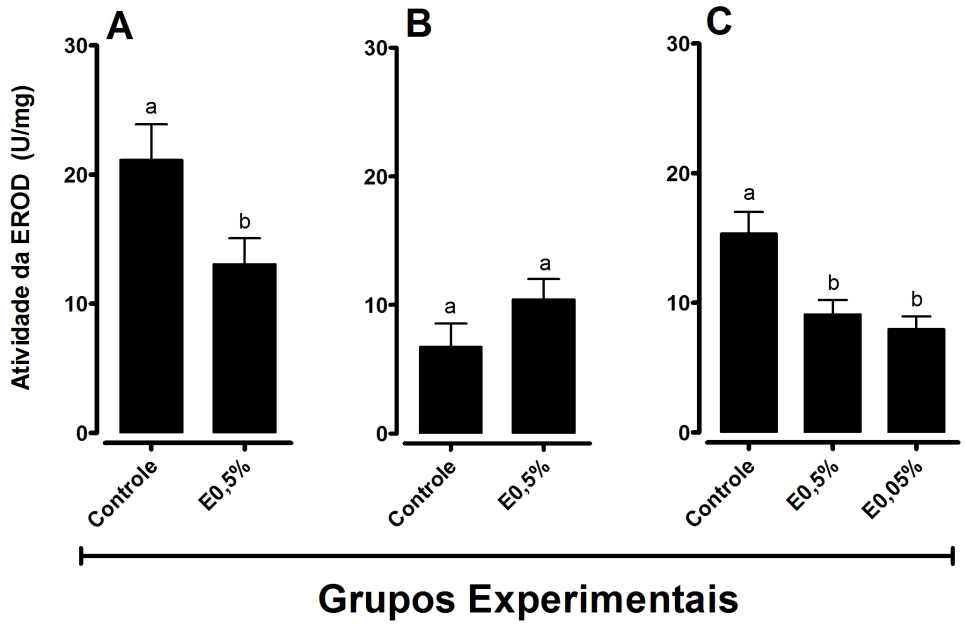


Figura 20. Níveis hepáticos de etoxiresorufin o-dietilase (EROD) em *N. rossii* e *N. coriiceps*. Os experimentos foram conduzidos na condição termo-salino de 0 ^{o}C e 35 psu. No curto prazo (96 horas), *N. rossii* (A) e *N. coriiceps* (B) foram expostas ao efluente da ETE diluído à 0,5% (v/v) (E0,5%). No longo prazo (25 dias), *N. rossii* foi exposta ao efluente da ETE diluído à 0,5% (v/v) (E0,5%) e 0,05% (v/v) (E0,05%) (C). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa para $p<0,05$.

6. DISCUSSÃO

6.1. Efeito do fluoreto no metabolismo hepático de peixes antárticos

A dose de 6,8 mg $F^-.kg^{-1}$ de peso corpóreo, utilizada no presente estudo, foi estimada a partir do consumo de krill antártico por organismos que se alimentam desse crustáceo (ADELUNG et al., 1985; KOCK, 1985). Essa dose de fluoreto não foi capaz de modular os níveis das principais enzimas do metabolismo energético, da defesa antioxidante e do catabolismo de L-arginina, mostrando que o metabolismo hepático de *N. rossii* está adaptado para suportar níveis elevados desse halogênio. O aumento de temperatura e a baixa salinidade, bem como as interações entre temperatura, salinidade e fluoreto, também não foram capazes de modular o catabolismo hepático de L-arginina em *N. rossii*. A ausência de efeitos desse halogênio sobre o metabolismo hepático de *N. rossii* confirma a nossa primeira hipótese para esse tecido, mas descarta a segunda hipótese, considerando que esse halogênio não modulou o metabolismo hepático em condições de estresse térmico e salino.

Estudos realizados com peixes não antárticos (*Labeo rohita*, *Takifugu rubripes* e *Salmo salar*), expostos a doses de fluoreto iguais ou inferiores a 6,8 mg $F^-.kg^{-1}$ de peso corpóreo, mostraram que esse halogênio é capaz de causar fluorose óssea, alterar estruturas histopatológicas hepáticas, provocar apoptose e alterar a performance de crescimento e sobrevivência dessas espécimes (BHATNAGAR et al., 2007; LU et al., 2010; HANSEN et al., 2012).

Embora doses de 4,9 mg $F^-.kg^{-1}$ tenham sido capazes de elevar os níveis de arginase no fígado de ratos e promover leve inibição da glicólise em tecidos extre-hepáticos (GRUCKA-MAMCZAR et al., 2007), isso não foi observado em *N. rossii* submetida a uma dose diária de 6,8 mg $F^-.kg^{-1}$, mostrando que o fluoreto trófico não tem efeito modulador sobre os níveis de arginase hepática desse peixes antártico. Em animais não ureotélicos, as arginases desempenham papel relevante no controle dos níveis teciduais do aminoácido proteico L-arginina, bem como no controle da síntese de

poliaminas e óxido nítrico (JENKINSON et al., 1996; WU & MORRIS, 1998; KALAČ & KRAUSOVÁ, 2005).

Em organismos não antárticos, o fluoreto trófico é capaz de reduzir a tolerância a glicose, reter transportadores do tipo 4 de glicose no meio intracelular e modular negativamente a secreção e a síntese de insulina (BARBIER et al., 2010). Contudo, a glicemia do peixe antártico *N. rossii* não foi modulada positivamente por uma dose diária de fluoreto de 6,8 mg $F^{-}.kg^{-1}$, após exposição de 11 dias (RODRIGUES JR et al., 2013). O fluoreto trófico também não foi capaz de modular os níveis de enzimas hepáticas chaves do controle glicêmico, como HK e G6Pase, mostrando que o metabolismo de carboidratos de *N. rossii* não é modulado por uma dose de fluoreto, correspondente a carga desse halogênio disponível na dieta de animais que se alimentam de krill.

A ausência de efeito do fluoreto trófico sobre os níveis de LDH, MDH e CS, na condição termo-salina de 0 ^{o}C e 35 psu, bem como do aquecimento em 4 ^{o}C, baixa salinidade e, da combinação da ação desses fatores, sugere que o metabolismo hepático de *N. rossii* deve ser suficientemente robusto para atender as necessidades gliconeogênicas e energéticas do fígado, na presença de doses elevadas de fluoreto, as quais seriam capazes de causar fluorose em mamíferos. As enzimas LDH e MDH do fígado catalisam reações que são consideradas porta de entrada do lactato na gliconeogênese (HORI et al., 2006) e uma ponte para a transferência de cadeias carbônicas entre mitosol e citosol (TORRES et al., 2012), respectivamente. Já a CS, catalisa a etapa limitante da velocidade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, após a oxidação de carboidratos e/ou lipídeos (STROBEL, LEO, et al., 2013).

O consumo de água fluoretada (25 mg $F^{-}.L^{-1}$) por ratos Wistar foi capaz de elevar os níveis de óxido nítrico, intensificar a peroxidação lipídica, e reduzir o potencial antioxidante total do soro, cérebro, rins e fígado (INKIELEWICZ-STEPNIAK & CZARNOWSKI, 2010). No presente estudo, ficou evidente que o fluoreto não foi capaz de modular os níveis hepáticos das enzimas G6PDH, SOD, GR e CAT, na condição termo-salina de 0 ^{o}C e 35 psu,

bem como nas condições adversas envolvendo aquecimento e baixa salinidade.

Os níveis de G6PDH, SOD, GRED e CAT, foram acessados como “proxies” da defesa antioxidante do fígado. Aproximadamente, 2% do oxigênio consumido pelos peixes é reduzido univalentemente à superóxido, o qual pode ser dismutado pela SOD formando peróxido de hidrogênio, que pode se difundir livremente através das membranas biológicas (ABELE & PUNTARULO, 2004). A degradação do peróxido de hidrogênio pela CAT é de vital importância para prevenir a formação de radical hidroxil.

Superóxido e peróxido de hidrogênio não são agentes oxidantes altamente reativos, mas o radical hidroxil é um oxidante notável, com constante de velocidade próxima do limite da difusão e com habilidade para remover elétrons de vários compostos biológicos (FORMAN et al., 2014). No presente estudo, a ausência de modulação dos níveis hepáticos de CS, que apresenta estreita relação com o consumo de oxigênio (TORRES & SOMERO, 1988b; TORRES et al., 2012) e de SOD e CAT, que são enzimas da defesa antioxidante, sugerem que o fluoreto trófico não deve produzir danos oxidativos a macromoléculas do fígado de *N. rossii*.

Contudo, o aquecimento em 4 ^{o}C e a hiposalinidade, independente da condição trófica, reduziram os níveis de CAT e SOD no fígado de *N. rossii*, respectivamente, no tempo experimental de 11 dias. Carney Almroth e colaboradores (2015), trabalhando com o peixes antártico *Pagothenia borchgrevinki*, observaram que no estresse térmico agudo (12 h), os níveis de SOD e CAT elevaram, mas, no longo prazo (21 dias), eles foram mantidos em níveis próximos do controle, mostrando que ocorreu perda da capacidade de modular positivamente os níveis das enzimas da defesa antioxidante, e como consequência, houve um aumento nos danos oxidativos hepáticos, em nível proteico e lipídico (PCO e LPO). A redução da salinidade é capaz de modular de forma significativa o metabolismo de diversas espécies de peixes antárticos e não antárticos, alterando níveis glicêmicos, cortisol, taxa de crescimento, capacidade digestiva, osmorregulação, dentre outros parâmetros

(TIBBLIN et al., 2011; TSUI et al., 2012; VARGAS-CHACOFF et al., 2014; VARGAS-CHACOFF et al., 2015).

Assim, o impacto das mudanças climáticas globais sobre as condições termo-salinas do litoral da Península Antártica, representam um risco para as espécies endêmicas de peixes da região, considerando que a redução dos níveis de enzimas da defesa antioxidante, pode acelerar os danos oxidativos celulares causados por espécies reativas de oxigênio.

A manutenção do potencial redox é fundamental para a manutenção da defesa antioxidante celular. A enzima GR catalisa a redução da glutationa oxidada em glutationa reduzida, utilizando $NADPH+H^+$ como agente redutor, sendo que a glutationa reduzida tem papel chave na homeostasia e manutenção do bom funcionamento das proteínas.

Nesse sentido, a enzima G6PDH, catalisa a primeira etapa de reação da via das pentoses, reduzindo o $NADP^+$ em $NADPH+H^+$, o qual tem elevado potencial redox. Ao manter a razão $NADPH+H^+/NADP^+$ elevada, a G6PDH favorece a defesa antioxidante e o balanço redox entre glutationa reduzida/glutationa oxidada (CIRCU & AW, 2010). Os níveis de G6PDH e GR não foram modulados pelo fígado de *N. rossii*, na condição experimental de fluoreto trófico, sugerindo que o fígado de *N. rossii* é naturalmente mais tolerante a ação tóxica do fluoreto.

6.2. Efeito do efluente da ETE sobre o metabolismo de peixes antárticos

Embora muito próximas na escala filogenética, os peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps* tiveram os seus constituintes plasmáticos modulados de forma distinta na exposição de curto prazo ao efluente da ETE da EACF, diluído à 0,5% (v/v). As diluições do efluente utilizadas no presente estudo foram relativamente baixas (0,5% (v/v) e 0,05% (v/v)), comparadas com as diluições do efluente (20% (v/v) e 50% (v/v)) utilizadas em estudos com peixes de água doce (MA et al., 2005; STURVE et al., 2008). A nossa escolha considerou a amplitude do ambiente marinho, que proporciona melhores condições para a dispersão e diluição de poluentes, comparado com rios e lagos.

6.2.1. Constituintes plasmáticos

No curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), *N. rossii* conseguiu manter a sua glicemia, diferente de *N. coriiceps* que evoluiu para um quadro de hipoglicemia. O fígado é o principal órgão controlador da glicemia, sendo capaz de retirar excesso e repor falta de glicose no sangue (POLAKOF et al., 2012). Embora existam algumas controvérsias quanto ao baixo "turnover" de glicose no sangue de peixes, a relevância da manutenção glicêmica reside na necessidade de tecidos como encéfalo, rins e brânquias, que são altamente dependentes de glicose (BLASCO et al., 2001).

A hipoglicemia manifestada por *N. coriiceps* pode ter sido decorrente do aumento da demanda energética de tecidos, que aceleraram a retirada e o consumo de glicose do sangue. Embora peixes sejam mais tolerantes a hipoglicemia do que mamíferos, tecidos como o encéfalo são energeticamente dependente de glicose (POLAKOF et al., 2012). As respostas glicêmicas manifestadas por *N. rossii* e *N. coriiceps*, não foram típicas de estresse em peixes, os quais, normalmente, evoluem para um quadro de hiperglicemia, ativando a glicogenólise hepática no curto prazo, a qual é mediada por catecolaminas, e, em estágios posteriores, pela gliconeogênese mediada pelo cortisol (PANKHURST, 2011). No longo prazo, *N. rossii* foi capaz de manter a sua glicemia, tanto com o efluente diluído à 0,5% (v/v) como à 0,05% (v/v), mostrando que *N. rossii* apresenta potencial metabólico para sustentar a manutenção da glicemia, no longo prazo, na poluição por esgoto.

O transporte de TG e Col no sangue de peixes são semelhantes aos de mamíferos e é baseado em lipoproteínas (alta-, baixa- e muito baixa densidade: HDL, LDL e VLDL, respectivamente). Contudo, em peixes, os ácidos graxos não esterificados são transportados ligados às lipoproteínas plasmáticas (MAGNONI & WEBER, 2007). O elevado "turnover" de lipídeos no plasma de peixes supera o de qualquer organismo endotérmico e permanece inalterado mesmo durante o esforço natatório (MAGNONI et al., 2008).

O aumento de TG no sangue de peixes sob estresse não é usual, mas tem sido observado em teleósteos marinhos submetidos a estresse hiposmótico. A explicação mais plausível reside na realocação de energia voltada a atender demandas energéticas específicas (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005; RODRIGUES JR et al., 2013). Assim, a incapacidade de *N. coriiceps* elevar o TG plasmático, na exposição ao efluente do esgoto, sugere limitações na realocação tecidual de energia, o que pode ter elevado o consumo tecidual de glicose e comprometido a manutenção da sua glicemia. Já *N. rossii*, foi capaz de elevar os níveis plasmáticos de TG, aumentando assim a disponibilidade de substratos lipídicos para realocação energética.

Tecidos como brânquias e encéfalo de peixes, aparentemente, preferem glicose como combustível energético em detrimento de outros substratos. A capacidade oxidativa de lipídeos do tecido branquial é relativamente baixa, ressaltando a importância da manutenção glicêmica, como fonte de glicose para esse tecido (CROCKETT et al., 1999; BLASCO et al., 2001). A mobilização lipídica promovida por *N. rossii*, na exposição ao efluente do esgoto da EACF, deve ser melhor estudada considerando uma possível modulação do metabolismo lipídico branquial.

O custo energético com a íon-osmorregulação de peixes tem sido estimado entre 20% e 50% do balanço energético total (BOEUF & PAYAN, 2001). Brânquias, rins e intestino participam ativamente da homeostasia de eletrólitos não proteicos, bombeando íons através de membranas biológicas (WHITTAMORE et al., 2010). A incapacidade de *N. rossii* e *N. coriiceps* manterem o equilíbrio iônico ficou evidente na exposição ao efluente do esgoto. As concentrações de fosfato inorgânico e magnésio foram moduladas positivamente no plasma de *N. rossii* e negativamente em *N. coriiceps*. Tratamentos secundários de esgoto, semelhantes ao da EACF, removem muito pouco do fósforo total dos efluentes e são fontes comuns de eutrofização em ambientes aquáticos (CAREY & MIGLIACCIO, 2009). Fosfato inorgânico e magnésio são íons prevalentes nos fluídos intracelulares e são essenciais para a síntese de nucleotídeos trifosfato, que atua na base do metabolismo energético (WILLIAMS & FRAUSTO DA SILVA, 2000).

A homeostasia do magnésio em teleósteos marinhos é basicamente realizada pelo intestino e rins, sendo que a absorção intestinal é limitada pelo baixo coeficiente osmótico de $MgSO_4$. Assim, apenas 10 – 11% do Mg^{2+} da água do mar ingerida pelos teleósteos marinhos, é absorvido no aparelho digestório, sendo, posteriormente, removido do sangue pelos rins (WHITTAMORE, 2012). A urina de peixes Antárticos e isosmótica em relação ao plasma, embora os néfrons aglomerulares desses peixes, tenham capacidade de concentrar e excretar Mg^{2+} contra um gradiente de concentração acima de 100 vezes (DOBBS III & DEVRIES, 1975).

As mudanças de magnésio, observadas no plasma de *N. rossii* e *N. coriiceps,* podem ter a sua origem na absorção intestinal e/ou excreção renal desse cátion. Como o efluente de esgoto modulou os níveis de Mg^{2+} em *N. rossii* e *N. coriiceps*, seria interessante conduzir novos estudos com o objetivo de identificar o(s) sítio(s) de ação dos poluentes do esgoto sobre a homeostasia do Mg^{2+}.

O conteúdo proteico do plasma de *N. rossii* e *N. coriiceps* foi reorganizado na exposição de curto prazo, com efluente diluído à 0,5% (v/v). O aumento de albumina e redução de globulinas no plasma de *N. rossii*, e redução de albumina e aumento de globulinas no plasma de *N. coriiceps*, mostrou que essas duas espécies modularam de forma distinta o metabolismo proteico. A albumina é a principal proteína aniônica do plasma de vertebrados, sendo que a sua concentração varia muito entre espécies de peixes e está ausente no plasma do peixe antártico *Dissosticus mawsoni* (METCALF et al., 1999). O conjunto de proteínas plasmáticas, além de participar ativamente do transporte de diversos compostos, também controla a pressão oncótica de peixes, mantendo o balanço intravascular e tecidual de fluídos (ANDREEVA, 2010). Embora a exposição à xenobióticos seja capaz de modular negativamente os níveis de proteínas totais, albumina e globulinas no plasma de alguns peixes (ADAMU & KORI-SIAKPERE, 2011; VANI et al., 2011), a reorganização do metabolismo proteico de *N. rossii* e *N. coriiceps*, observada na exposição ao efluente do esgoto, não alterou os níveis de proteínas totais, mas apenas modulou de forma inversa os níveis de globulinas e albumina.

6.2.2. Metabolismo branquial

No presente estudo, ficou evidente que o efluente do esgoto da EACF é capaz de modular os níveis de enzimas do metabolismo energético, defesa antioxidante e catabolismo da L-arginina do tecido branquial de *N. rossii* e *N. coriiceps*, tanto nas exposições de curto como de longo prazo.

Parte expressiva das demandas energéticas branquiais encontra-se direcionada para o transporte ativo de íons e a manutenção da íon/osmorregulação. A enzima transmembrana Na/K-ATPase é responsável pelo transporte ativo de Na^+ e K^+ através da membrana plasmática e, indiretamente, sustenta o potencial energético operacional de vários sistemas de transporte ativo em brânquias de peixes (HWANG & LEE, 2007).

O aumento discreto dos níveis branquiais da Na/K-ATPase nas brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps* (inferior a 30%), observado em todas as condições experimentais, sugere que os poluentes do esgoto não foram capazes de comprometer expressivamente os mecanismos osmorregulatórios sustentados pelo potencial energético gerado pela Na/K-ATPase.

Por outro lado, o aumento expressivo dos níveis de CS, em todas as condições experimentais com o efluente do esgoto, indica claramente um aumento do potencial gerador de ATP das brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps*. Essa enzima tem sido utilizada como marcadora do potencial aeróbio gerador de ATP do ciclo TCA em tecidos de peixes e apresenta estreita relação com o consumo tecidual de oxigênio (KAWALL et al., 2002).

Fármacos e compostos biogênicos, normalmente presentes em efluentes de esgotos (LI, 2014), são capazes de desacoplar processos fisiológicos e aumentar a demanda energética dos tecidos (KIRK et al., 2003; HORI et al., 2006). Assim, o efluente da ETE da EACF pode ter desacoplado mecanismos fisiológicos (ex. gradiente de prótons H^+ mitocondrial) e, consequentemente elevado a demanda energética das brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps*, modulando positivamente o metabolismo energético. Esse esforço energético aeróbio, expresso pelos níveis de CS, ficou evidente em *N. rossii*, na exposição de curto prazo com o efluente diluído à 0,5% (v/v), onde o

aumento da atividade específica de CS foi de 426%. Assim, a exposição ao efluente do esgoto da EACF deve ter elevado, substancialmente, a demanda energética branquial de *N. rossii* e *N. coriiceps*.

O aumento dos níveis de CS em relação aos da Na/K-ATPase, (razão = 0,62 do grupo controle, contra 2,55 do efluente à 0.05%), indica que o esforço metabólico do tecido branquial foi mais intenso, no sentido de elevar o potencial aeróbio gerador de ATP, em relação ao potencial energético operacional dos mecanismos osmorregulatórios do tecido branquial. O estresse em peixes (térmico, osmótico, dentre outros), normalmente, aumenta a expressão de proteínas do metabolismo energético e realocação energética (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005; DE SOUZA et al., 2014), como resultado da ativação de mecanismos alostáticos (SCHULTE, 2014). Assim, a indução de níveis elevados de CS nas brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps* sugere uma hiperatividade do metabolismo aeróbio gerador de ATP, direcionada para atender um provável aumento de demanda energética, induzido pelo efluente do esgoto.

A enzima MDH desempenha vários papeis no metabolismo energético, sendo componente do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e participando da transferência de cadeias carbônicas entre mitocôndria e citosol (CHILDRESS & SOMERO, 1979; TORRES et al., 2012). No curto prazo, os níveis branquiais de MDH de *N. rossii* reduziram em cerca de 20% e os de *N. coriiceps* não variaram, sugerindo que no curto prazo a modulação positiva dos níveis de MDH não foi necessária para atender demandas do metabolismo energético.

Contudo, na exposição de longo prazo, tanto com o efluente diluído à 0,5% (v/v) como à 0,05% (v/v), o tecido branquial de *N. rossii* modulou positivamente os níveis de MDH. Alterações ambientais, como aquecimento e aumento da pressão de CO_2, foram capazes de alterar o perfil proteômico das brânquias do peixe *Hippoglossus hippoglossus*, modulando positivamente os níveis de enzimas do metabolismo energético, em especial naquilo que diz respeito aos níveis de MDH (DE SOUZA et al., 2014). Dessa forma, a modulação positiva dos níveis de MDH em brânquias de *N. rossii*, desponta

como um biomarcador capaz de diferenciar, temporalmente, a exposição de *N. rossii* ao efluente do esgoto da EACF.

As brânquias estão entre os tecidos de peixes com elevada capacidade de captar e metabolizar a glicose do sangue, mesmo durante longos períodos de jejum (BLASCO et al., 2001). A redução dos níveis de HK no tecido branquial, principalmente, de *N. rossii*, no curto prazo e com o efluente diluído à 0,5% (v/v), sugere que o tecido branquial deve ter priorizando a utilização de outros substratos energéticos no curto prazo.

A fosforilação intracelular de glicose é catalisada pela enzima HK, a qual introduz a glicose no metabolismo intermediário, disponibilizando esse carboidrato para as vias glicolítica, das pentoses e glicogênese. Os níveis de HK, determinados *in vitro*, têm sido utilizados para estimar a velocidade máxima de utilização de glicose em tecidos de diversos organismos (KNOX et al., 1980; FRICK et al., 2008), bem como, etapa limitante do consumo tecidual de glicose (MACCORMACK & DRIEDZIC, 2007). Assim, o aumento dos níveis de HK, na exposição de longo prazo, ao efluente diluído à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v), sugere que o tecido branquial de *N. rossii* elevou a captação e utilização de glicose como substrato energético. A modulação diferenciada dos níveis de HK das brânquias de *N. rossii*, em função do tempo de exposição ao efluente do esgoto, mostrou que os níveis dessa enzima apresenta potencial biomarcador diferenciado para respostas de curto e longo prazo.

Em tecidos extra-hepáticos, os níveis de LDH têm sido utilizados como marcador do potencial anaeróbio gerador de ATP em músculos de peixes antárticos (KAWALL et al., 2002) e da capacidade oxidativa de lactato com a finalidade de gerar ATP nas brânquias (CROCKETT et al., 1999). Na exposição de curto prazo ao efluente do esgoto diluído à 0,5% (v/v) e no longo prazo com o efluente à 0,05%(v/v), os níveis da LDH branquial de *N. rossii* sofreram redução, mas permaneceram estáveis na exposição de *N. coriiceps*, no curto prazo, e de *N. rossii* no longo prazo com o efluente diluído à 0,5% (v/v), mostrando que o tecido branquial não elevou o potencial oxidativo de lactato, para sustentar as suas necessidades energéticas, na exposição aos poluentes de esgoto.

Os níveis teciduais das enzimas G6PDH, SOD, GR e CAT têm sido amplamente utilizados e reconhecidos como biomarcadores da defesa antioxidante de peixes (VAN DER OOST et al., 2003). Os níveis de G6PDH têm sido utilizados como marcador do potencial redox celular, estando envolvido com manutenção celular de uma razão $NADPH/NADP^+$ elevada, o que favorece a defesa antioxidante e o balanço redox GSH/GSSG (CIRCU & AW, 2010).

No curto prazo, *N. rossii* e *N. coriiceps* modularam positivamente os níveis de G6PDH, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), sugerindo que o efluente pode ter acelerado os processos oxidativos. Contudo, na exposição de longo prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v), os níveis de G6PDH deixaram de ser modulados, sugerindo que outros mecanismos de defesa antioxidante podem ter sido implementados. Como o substrato da G6PDH é a glicose-6-fosfato, a qual é formada na reação catalisada pela HK, os baixos níveis brânquias de HK, na exposição de curto prazo, podem ter limitado a disponibilidade de glicose-6-fosfato para manutenção do potencial redox gerado pela G6PDH, que em parte, pode ter sido compensada pelo aumento dos níveis de G6PDH. No longo prazo, os níveis de HK sofreram expressiva elevação e os de G6PDH retornaram para níveis próximos ao do controle.

No curto prazo, os níveis de GR, SOD e CAT, em ambas as espécies, na exposição ao efluente diluído à 0,5% (v/v), ou foram moduladas negativamente ou não foram moduladas pelo tecido branquial de *N. rossii* e *N. coriiceps*. As respostas da defesa antioxidante de peixes à poluentes varia muito entre espécies, sendo que em alguns casos, os níveis de enzimas da defesa antioxidante não foram modulados ou foram modulados negativamente (VAN DER OOST et al., 2003). Contudo, na exposição de longo prazo, os níveis de GR aumentaram, mostrando que a modulação positiva dos níveis de GR pelo efluente do esgoto, depende do tempo de exposição.

A L-arginina é um aminoácido indispensável para o crescimento de peixes jovens e é essencial para a síntese de proteínas, óxido nítrico e poliaminas. Assim, o controle dos níveis celulares de L-arginina em organismos

não ureotélicos tem participação ativa no controle da síntese de óxido nítrico e de poliaminas (RODRIGUES et al., 2011). As brânquias de peixes, normalmente, consomem uma mistura de lipídeos, proteínas e glicose, mas, sob condições de estresse e dependendo da fase de desenvolvimento, a preferência metabólica por substratos energéticos proteicos e lipídicos pode ser maior em relação à de carboidratos (TSENG & HWANG, 2008).

No curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), *N. rossii* e *N. coriiceps* modularam positivamente os níveis de arginase, sendo que no longo prazo houve apenas uma tendência de aumento com o efluente diluído à 0,5% (v/v) e à 0,05% (v/v), sugerindo que o catabolismo proteico e de aminoácidos, voltado para atender o provável aumento de demanda energética, deve ter sido mais intenso no curto do que no longo prazo.

6.2.3. Metabolismo renal

Em todas as condições experimentais, o metabolismo energético renal de *N. rossii* e *N. coriiceps* foi modulado positivamente pelo efluente do esgoto da EACF. O aumento expressivo dos níveis de CS e MDH sugere que o efluente do esgoto deve ter elevado drasticamente a demanda energética renal, pois essas duas enzimas tem sido utilizada como marcador do potencial aeróbio gerador de ATP (KAWALL et al., 2002; TORRES et al., 2012). O aumento dos níveis de HK e GPase sugere que o tecido renal elevou a oferta de glicose-6-fosfato para via glicolítica e, subsequentemente, de cadeias carbônicas para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos. HK e GPase são enzimas marcadoras dos potenciais de fosforilação de glicose e glicogênio, respectivamente, que em última análise, introduzem glicose-6-fosfato na via glicolítica (KNOX et al., 1980; SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005).

Em tecidos extra-hepáticos, os níveis de LDH tem sido utilizado como marcador do potencial anaeróbio gerador de ATP em músculo (KAWALL et al., 2002) e do potencial oxidativo de lactato em brânquias (CROCKETT et al., 1999). O tecido renal de peixes também utilizada lactato como substrato energético, principalmente em condições adversas de salinidade, elevando os níveis renais de LDH (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2006). Os aumentos dos

níveis de LDH nos rins de *N. rossii* e *N. coriiceps*, em todas as condições experimentais, aumentam as possibilidades oxidativas renais de substratos energéticos, para atender o aumento da demanda energética induzida pelos poluentes do esgoto.

Também ficou evidente, em todas as condições experimentais, que *N. rossii* e *N. coriiceps*, modularam positivamente os níveis de G6PDH, uma enzima marcadora do potencial redox dos tecidos e, consequentemente, da defesa antioxidante (CIRCU & AW, 2010). O potencial dismutador de superóxido, representado pelos níveis de SOD, elevou em *N. coriiceps* no curto prazo e em *N. rossii*, apenas no longo prazo, mostrando que as defesas antioxidantes renais dessas duas espécies respondem de forma diferente ao efeito de poluentes do esgoto.

Os níveis de GR não foram modulados em nenhuma das condições experimentais, sugerindo que o potencial redutor da glutationa foi, provavelmente, adequado para atender as necessidades da defesa antioxidante nessa condição adversa. Os níveis renais de CAT não variaram expressivamente em nenhuma das condições experimentais, exceto no curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v) em que os níveis de CAT renal de *N. rossii* declinaram. A redução dos níveis de CAT, na exposição de peixes à poluentes não é um achado raro e já foi observado em várias espécies (VAN DER OOST et al., 2003).

As arginases encontram-se amplamente distribuídas em tecidos de peixes, mas fígado e rins apresentam, normalmente, os níveis mais elevados (WRIGHT et al., 2004). Os níveis de arginase do rim de *N. rossii* e *N. coriiceps* somente foram modulados positivamente, no curto prazo, pelo esgoto da EACF. No longo prazo, os níveis de arginase do rim de *N. rossii* permaneceram em valores próximos do controle, sugerindo que o aumento observado no curto prazo, que atendia a uma demanda catabólica específica de L-arginina, deixou de existir no longo prazo. Essa demanda pode estar relacionada ao catabolismo de aminoácidos, considerando que o rim de peixes é capaz de utilizar as cadeias carbônicas dos aminoácidos como substratos energéticos (POLAKOF et al., 2006).

6.2.4. Metabolismo muscular

O tecido adiposo dos nototenióides antárticos é difuso e estoca grandes quantidades de TG nas fibras brancas e vermelhas, bem como no fígado. O conteúdo lipídico total é elevado e, em algumas espécies, chega a ultrapassar 50% da massa seca do peixe (CLARKE et al., 1984; HAGEN et al., 2000). Por outro lado, o elevado potencial oxidativo do fígado e músculos para ácidos graxos monoinsaturados, suporta a visão de um metabolismo energético baseado em lipídeos (SIDELL et al., 1995).

No curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), o metabolismo energético da *N. rossii* apresentou apenas uma leve tendência de redução dos níveis de HK, MDH e LDH, bem como um leve aumento nos níveis de CS. Já a redução dos níveis de HK em *N. coriiceps* foram bem mais expressivas, com uma tendência de redução dos níveis de PFK. Essas alterações sugerem que o efluente modulou o metabolismo energético, reduzindo a captação/utilização de glicose do sangue, mediante redução dos níveis de HK, uma enzima que introduz a glicose no metabolismo energético de peixes, mediante fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato (KNOX et al., 1980).

Também ficou evidente a redução dos níveis de LDH, porém não de forma significativa, reduzindo o potencial anaeróbio gerador de ATP do tecido muscular, o qual tem rendimento energético bem inferior ao do aeróbio, que apresentou tendência de elevação. Esse conjunto de modulações enzimáticas, sugere que a musculatura axial de *N. rossii* e *N. coriiceps*, rearranjaram o metabólico energético, reduzindo o potencial de captação de glicose sanguínea e elevando o potencial de consumo/oxidação de substratos energéticos no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, como por exemplo, acetil~SCoA derivado da oxidação de ácidos graxos.

A musculatura de nototenióides antárticos normalmente apresenta uma elevada densidade mitocondrial que facilita a produção de ATP e o consumo de oxigênio (JOHNSTON, 2003). O conteúdo lipídico do músculo axial de peixes antárticos é normalmente elevado e a capacidade de

regeneração de ATP a partir de substratos energéticos, indica claramente que ácidos graxos monoinsaturados são os substratos preferidos do metabolismo energético muscular, antes do que glicose (SIDELL et al., 1995).

Na exposição de longo prazo ao efluente do esgoto, esse rearranjo do metabolismo energético ficou mais evidente, na diluição do esgoto à 0,5% (v/v). Os níveis de HK, MDH e LDH foram modulados negativamente de forma mais intensa do que o observado no curto prazo. O mesmo aconteceu com a modulação positiva dos níveis de CS e a tendência de aumento dos níveis de PFK. A redução dos níveis de MDH em *N. rossii*, não, necessariamente, representa uma redução do potencial aeróbio gerador de ATP no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, pois a determinação de atividade da MDH contemplou a MDH das frações citosólica e mitosólica. Os níveis teciduais de PFK têm sido utilizados como indicador de potencial glicolítico (MILLER et al., 2009). Considerando que os níveis de HK foram modulados negativamente, a tendência de aumento dos níveis de PFK no músculo de *N. rossii*, pode estar atendendo a oxidação de glicose proveniente da glicogenólise.

No curto prazo, a defesa antioxidante de *N. coriiceps* foi modulada negativamente pelo efluente de esgoto, com a redução dos níveis de GR, enquanto o músculo de *N. rossii* elevou os níveis de SOD e reduziu, de forma não significativa os níveis de GR. Embora muito próximas filogeneticamente, essas duas espécies modularam de forma distinta as suas defesas antioxidante. Contudo, no longo prazo, a defesa antioxidante de *N. rossii* foi modulada negativamente, com a redução dos níveis de GR, tanto com o efluente diluído à 0,5% (v/v) como 0,05% (v/v).

6.2.5. Metabolismo hepático

O suprimento energético é considerado um importante fator limitante de sistemas fisiológicos (CLARKE, 2003) e pode comprometer o crescimento, a locomoção e a reprodução dos organismos (SMOLDERS et al., 2004; MAES et al., 2006). O fígado tem papel homeostático relevante, suprindo os tecidos extra-hepáticos de vertebrados com misturas equilibradas de substratos energéticos. A perfusão do fígado por sangue proveniente do intestino permite que esse tecido atue como filtro metabólico, equilibrando os níveis de constituintes da dieta e disponibilizando para os tecidos extra-hepáticos, uma mistura equilibrada de constituintes plasmáticos, essenciais para o bom funcionamento dos tecidos (HOCHACHKA & SOMERO, 2002; POLAKOF et al., 2007; OOSTERVEER & SCHOONJANS, 2014), Nesse sentido, o fígado é o principal órgão controlador da glicemia, sendo capaz de retirar o excesso de glicose do sangue e, quando necessário, repor a sua falta (POLAKOF et al., 2012).

Os experimentos com *N. rossii* e *N. coriiceps* mostraram que o efluente do esgoto da EACF é capaz de modular os níveis de enzimas do metabolismo hepático dessas duas espécies. No curto prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v), a indução de níveis elevados de GPase, em ambas as espécies, e de G6Pase apenas em *N. rossii*, mostram a dimensão do esforço metabólico hiperglicemiante do fígado, modulando positivamente o potencial glicogenolítico e gliconeogênico. Respostas de estresse têm sido interpretadas como um esforço de reestabelecimento homeostático (BARTON, 2002), que no caso de *N. rossii* e *N. coriiceps* pode estar envolvendo um aumento de captação e consumo de glicose sanguínea pelos tecidos extra-hepáticos. Nesse caso, a canalização de glicose do fígado para o sangue, passa a ser de vital importância, como forma de manter níveis glicêmicos adequados para os demais tecidos.

A G6Pase hepática é uma das enzimas chaves da gliconeogênese e tem sido utilizada como “proxy” do potencial canalizador de glicose do fígado para o sangue, com o objetivo de atender possíveis demandas energéticas de outros tecidos. Essa enzima também atende as

necessidades glicogenolítica hepáticas, considerando que a etapa final de canalização de glicose da gliconeogênese e da glicogenólise para o sangue, é catalisada pela G6Pase (NELSON & COX, 2011; POLAKOF et al., 2012). A indução de níveis elevados de GPase no fígado de *N. rossii* sugere uma resposta hiperglicemiante de curto prazo, considerando que essa enzima tem sido utilizada como um “proxy” da atividade glicogenolítica em peixes (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005).

A incapacidade de *N. coriiceps* induzir níveis hepáticos elevados de GPase, no curto prazo, limitou potencialmente a manutenção da glicemia, pois a fosforilação do glicogênio no fígado tem como principal a manutenção da glicemia (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005). Em algumas espécies de peixes, o baixo nível de glicogênio hepático tem sido apontado como fator limitante da manutenção glicêmica (PANKHURST, 2011), mas esse não deve ser o caso de *N. coriiceps*, que apresenta níveis hepáticos de glicogênio próximos ao de *N. rossii*, a qual conseguiu manter adequadamente a sua glicemia na presença do efluente do esgoto (RAGA et al., 2015).

A fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato tem sido considerada uma etapa crítica do controle do gradiente de glicose no fígado e é catalisada pela enzima HK (MACCORMACK & DRIEDZIC, 2007). A elevação dos níveis de G6Pase, sem alteração dos níveis de HK no fígado de *N. rossii*, sugere que o efluente elevou o potencial canalizador de glicose do fígado para o sangue, sem elevar o potencial de fosforilação da glicose, que introduz glicose no metabolismo intermediário do fígado de *N. rossii*.

No longo prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v), o potencial canalizador de glicose para o sangue (G6Pase) tendeu a permanecer elevado, mas esse aumento não foi significativo. O estoque de glicogênio no fígado é limitado e atende as demandas de manutenção de glicemia no curto prazo. A eficácia desse processo depende muito da quantidade de glicogênio estocado no tecido. Assim, a eficácia da glicogenólise hepática é limitada pela redução dos níveis de glicogênio ao longo de processos que demandam aumento/manutenção de glicemia (LOWE & DAVISON, 2005; NELSON & COX, 2011; PANKHURST, 2011).

A LDH hepática foi acessada como via de entrada do lactato na gliconeogênese (HORI et al., 2006) e a MDH como uma ponte de transferência de cadeias carbônicas entre mitosol e citosol (TORRES et al., 2012). O efluente do esgoto não modulou os níveis dessas duas enzimas no fígado de *N. rossii* e *N. coriiceps*, em nenhuma das condições experimentais. A elevação dos níveis de LDH e MDH no fígado do teleósteo de água doce *Brycon cephalus* exposto ao fenol, tem sido associados com a ativação da gliconeogênese (HORI et al., 2006). Contudo, isso não ficou evidente em *Oncorhynchus mykiss*, onde hidrocarbonetos policíclicos aromáticos elevaram os níveis de cortisol e ativaram a gliconeogênese, sem alterar os níveis hepáticos de LDH (TINTOS et al., 2008). Assim, a ausência de modulação sobre os níveis de MDH e LDH hepáticas de *N. rossii* e *N. coriiceps*, não representam, necessariamente, algum tipo de desvantagem para a operacionalização da gliconeogênese e/ou glicogenólise hepática.

A atividade da CS, enzima limitante da velocidade do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), reflete o potencial de entrada de acetil~SCoA no TCA, após a oxidação de carboidratos e/ou lipídeos (STROBEL, LEO, et al., 2013). No curto prazo, o efluente do esgoto modulou negativamente os níveis de CS do fígado de *N. rossii* e não os níveis de *N. coriiceps*, que permaneceram com níveis próximos do controle. A CS e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), que catalisa a primeira etapa da gliconeogênese, competem pelo oxaloacetato, que é um importante elo de ligação entre TCA, metabolismo de aminoácidos e gliconeogênese (DES ROSIERS et al., 1995). Assim, a redução dos níveis de CS em *N. rossii* favorece o direcionamento de cadeias carbônicas do TCA para gliconeogênese.

Na aclimatação térmica do peixe Antártico *Pachycara brachycephalum*, a reorganização metabólica hepática envolveu alterações na composição lipídica, redução dos níveis de CS e a elevação da razão PEPCK/CS, elevando o potencial gliconeogênico do fígado (WINDISCH et al., 2011). Na aclimatação térmica de *N. rossii*, estudada por STROBEL et al., (2013) a redução dos níveis de CS foi interpretada como parte da reorganização metabólica do fígado, que direcionou cadeias carbônicas do

TCA para gliconeogênese, para atender prováveis demandas energéticas de outros tecidos.

No longo prazo, com efluente diluído à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v), o fígado de *N. rossii* manteve baixos os níveis de CS, sugerindo que o esforço gliconeogênico foi mantido, mesmo na diluição de 0,05% (v/v). A indução de níveis elevados de CS no fígado de *N. rossii*, mesmo com o efluente muito diluído, revelou essa enzima com um possível biomarcador de esgoto na Antártica. Contudo, novos estudos devem ser conduzidos, com o efluente ainda mais diluído, como forma de avaliar a resposta dose-dependente dessa enzima hepática.

Os níveis hepáticos de G6PDH, SOD, GRED e CAT foram acessados como "proxy" da defesa antioxidante enzimática de *N. rossii* e *N. coriiceps*. A formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) é um processo natural, sendo que alguns EROS atuam na sinalização e modulação de processos fisiológicos, quando em baixas concentrações (CIRCU & AW, 2010). Cerca de 2% do oxigênio consumido pelas mitocôndrias de peixes é reduzido univalentemente para superóxido ($^{\bullet}O_2^-$) e pode ser dismutado pela SOD em H_2O_2, a qual pode se difundir livremente através das membranas biológicas (ABELE & PUNTARULO, 2004). A decomposição da H_2O_2 pela catalase é vital para prevenir a geração de radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), via reação de Fenton. Superóxido e H_2O_2 não são oxidantes altamente reativos, mas $^{\bullet}OH$ é um notável agente oxidante, com constante de velocidade próxima do limite da difusão e sendo capaz de remover elétrons de vários compostos biológicos (FORMAN et al., 2014).

No curto prazo, o efluente do esgoto modulou positivamente os níveis de CAT e tendeu a aumentar os níveis de SOD no fígado de *N. coriiceps*, elevando a sua defesa antioxidante contra H_2O_2. Já em *N. rossii*, os níveis de SOD e CAT foram modulados negativamente. Mudanças ambientais naturais ou antrópicas podem elevar a formação de EROS e gerar estresse oxidativo, sendo que os tecidos nem sempre conseguem responder adequadamente, elevando os níveis de enzimas da defesa antioxidante (VAN DER OOST et al., 2003; ABELE & PUNTARULO, 2004). Assim, no curto prazo,

a resposta antioxidante do fígado de *N. rossii* não se revelou uma resposta protetora contra a ação deletéria do $^{\bullet}O_2^-$ e H_2O_2. Contudo, no longo prazo, com o efluente diluído à 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v) foi capaz de modular positivamente os níveis de SOD e CAT, mostrando uma resposta antioxidante adequada contra as EROS.

Assim, os níveis hepáticos de CAT e SOD de *N. rossii*, na exposição ao efluente do esgoto, se mostraram biomarcadores com capacidade de diferenciar o tempo de exposição ao efluente, sendo que na exposição de curto prazo, os níveis foram modulados negativamente, e na de longo prazo, a modulação foi positiva.

A manutenção do potencial redox é de fundamental importância para a defesa antioxidante das células. A GR catalisa a redução do glutationa oxidado em reduzido (GSH), utilizando NADPH como agente redutor. A GSH ocupa papel central na homeostase redox, mantendo o bom funcionamento das proteínas. A oxidação da glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato, na via das pentoses, é catalisada pela G6PDH, utilizando $NADP^+$ como agente oxidante, que é reduzido em $NADPH+H^+$, o qual apresenta elevado potencial redox. A manutenção de uma razão $NADPH/NADP^+$ elevada favorece a defesa antioxidante e o balanço redox GSH/GSSG no interior das células (CIRCU & AW, 2010).

No curto prazo, na presença do efluente diluído à 0,5% (v/v), o fígado de *N. coriiceps* não foi capaz de modular os níveis de G6PDH e reduziu os níveis de GR, diferente do fígado de *N. rossii* que elevou a sua capacidade de manutenção do potencial redox, elevando os níveis de G6PDH. Assim, essas duas espécies divergiram na modulação da defesa antioxidante no curto prazo. No logo prazo, os níveis hepáticos de G6PDH foram mantidos elevados em *N. rossii* e os de GR foram mantidos em níveis próximos do controle.

Experimentos com traços de poluentes orgânicos revelaram que a resposta antioxidante enzimática varia muito intra e entre espécies de teleósteos, as quais são, via de regra, dose dependentes (VAN DER OOST et al., 2003). O tempo de exposição à poluentes também pode ser um fator

modulador dos níveis de enzimas da defesa antioxidante de peixes. Os níveis de CAT e GR só foram modulados positivamente no fígado de trutas (*Oncorhynchus mykiss)* após 5 dias de exposição ao efluente de uma ETE sueca, diluído à 50% (v/v) (STURVE et al., 2008).

Nesse sentido, as respostas da defesa antioxidante de *N. rossii* e *N. coriiceps* foram obtidas utilizando o efluente de esgoto bem mais diluído do que o descrito por STURVE et al. (2008), mostrando que essas duas espécies de peixes antárticos são bem sensíveis a poluição por esgoto. Com isso, novos estudos devem ser conduzidos para avaliar o efeito da exposição crônica e da diluição mínima do efluente, capaz de induzir alterações metabólicas biomarcadoras que, normalmente, são de baixo custo e precedem as alterações morfológicas (LAM, 2009).

Peixes carnívoros dependem do catabolismo de aminoácidos para atender as suas necessidades gliconeogênicas. A L-arginina é um aminoácido proteico, indispensável para o crescimento de peixes jovens e é essencial para a síntese de proteínas, óxido nítrico e poliaminas (RODRIGUES et al., 2011). Os níveis de arginase, no fígado dos peixes linguado e truta arco-íris, se elevaram em função da quantidade de L-arginina consumida, sinalizando a importância do controle tecidual dos níveis desse aminoácido (FOURNIER et al., 2003).

Assim, a arginase hepática de *N. rossii* e *N. coriiceps*, foi acessada como “proxy” do metabolismo da L-arginina, considerando a sua importância no controle dos níveis de L-arginina em animais não ureotélicos, modulando indiretamente a síntese de óxido nítrico e poliaminas, as quais são dependentes de L-arginina (WU & MORRIS, 1998). Em todas as condições experimentais, tanto com *N. rossii* quanto *N. coriiceps*, o efluente do esgoto não foi capaz de elevar os níveis de arginase, sendo observada apenas que uma tendência de aumento. Assim, os níveis hepáticos de arginase de *N. rossii* e *N. coriiceps* não se mostraram adequados para sinalizar a poluição por esgoto.

A atividade da isoenzima EROD tem sido amplamente utilizada como marcadora de poluição ambiental, principalmente como biomarcador de exposição à poluentes orgânicos. A EROD catalisa a transformação de xenobióticos orgânicos em produtos de excreção mais solúveis em água e integra a família de proteínas do citrocromo P_{450}, participando da fase I do metabolismo de xenobióticos. Embora, uma elevação dos níveis de citrocromo P_{450} tenha sido reportada em mais de 50% dos estudos laboratoriais e de campo, o seu uso como biomarcador na avaliação de riscos ambientais é limitado, desde que as respostas envolvendo isoenzimas do citrocromo P_{450} são mais específicas e sensíveis (VAN DER OOST et al., 2003).

No curto e longo prazos, o efluente do esgoto, em ambas as diluições, modularam negativamente os níveis de EROD no fígado de *N. rossii*. Apesar da sua ampla utilização como biomarcador de poluição ambiental, dependendo da dose e da natureza química dos poluentes, tais como compostos organometálicos, pode ocorrer elevada inibição da indução de EROD nos tecidos (RICE & ROSZELL, 1998; WHYTE et al., 2000). Contudo, a injeção de β-NF na cavidade peritoneal de *N. rossii* (controle positivo) foi capaz de elevar os níveis de EROD no fígado desse nototenióide após 25 dias de exposição, mostrando que o tecido hepático de *N. rossii* é capaz de modular positivamente os níveis de EROD.

A injeção de benzo-a-pireno e de policloreto de bifenila (PCB) na cavidade peritoneal foi capaz de elevar os níveis de monoxigenases de função mista, inclusive EROD, no fígado do peixe antártico *Pagothenia bernacchii* (FOCARDI et al., 1995). De forma semelhante, a injeção de β-NF na cavidade peritoneal, elevou os níveis de EROD hepática em *T. bernacchii*, após 20 dias da injeção. Estudo conduzido com *T. bernacchii* engaiolados, em sítios reconhecidamente poluídos pela estação antártica de McMurdo, mostraram que os poluentes foram capazes de modular a EROD hepática (LURMAN et al., 2010).

Por outro lado, os níveis hepáticos de EROD apresentaram tendência de aumento, após 96 h de exposição de *N. coriiceps* ao efluente do esgoto da EACF, mas esse não foi estatisticamente significativo. Contudo,

cabe salientar que na exposição de curto prazo, os níveis de EROD, no fígado de *T. bernacchii*, só elevaram, de forma significativa, após 7 dias da injeção de β-NF na cavidade peritoneal (DI BELLO et al., 2007). Assim, a capacidade do efluente do esgoto induzir níveis elevados de EROD no fígado de *N. coriiceps* deve ser avaliada com experimentos de longo prazo, considerando a tendência de aumento observada no curto prazo.

6.2.6. Metabolismo Interórgãos

A manutenção da homeostasia demanda um sistema de comunicação interórgãos, finamente ajustado para atender as necessidades fisiológicas dos tecidos. No presente estudo, os experimentos conduzidos com *N. rossii* e *N. coriiceps*, mostraram que o efluente do esgoto é capaz de impactar os níveis de enzimas do metabolismo energético, bem como os níveis de constituintes plasmáticos. Assim, os níveis enzimáticos foram utilizados como "proxies" do metabolismo energético do fígado, rins, brânquias e músculos. Os níveis de constituintes plasmáticos também foram utilizadas na presente discussão, pois são normalmente modulados pelo comportamento metabólico dos tecidos.

O metabolismo energético interórgãos de *N. rossii* foi avaliado tanto no curto como no longo prazo, com o efluente do esgoto em duas diluições, sendo 0,5% (v/v) e 0,05% (v/v). Os resultados estão sumarizados na figura 21.

Diferente do músculo, onde o potencial aeróbio gerador de ATP, expressos pelos níveis de CS, aumentou em 60%, apenas no longo prazo, nos tecidos renal e branquial os níveis dessa enzima elevaram em mais de 400% no curto e longo prazos, sugerindo que o efluente do esgoto deve ter elevado, expressivamente, as demandas energéticas renais e branquiais de *N. rossii*.

A manutenção da íon/osmorregulação de fluídos biológicos, a excreção de produtos finais do metabolismo, bem como a excreção de diversos tipos de compostos, tem sido atribuídos as brânquias e rins (NATOCHIN, 1996; EVANS et al., 2005). Essas atividades demandam uma quantidade substancial de energia para operacionalizar sistemas de transporte ativos (MARSHALL &

BRYSON, 1998; VAN DER OOST et al., 2003). A exposição de *N. rossii*, ao efluente do esgoto, expôs a extensa e delicada superfície branquial aos poluentes do esgoto, os quais podem ter desencadeado respostas de estresse. A ação direta de poluentes do esgoto sobre as brânquias e aparelho digestório, via ingestão de água do mar, tem sido utilizada para explicar respostas integradas de estresse, induzidas pelos poluentes em peixes (WENDELAAR BONGA, 1997). Normalmente, as respostas de estresse em peixes são acompanhadas de elevação da glicemia (PANKHURST, 2011). Na exposição de curto prazo ao efluente do esgoto, o fígado de *N. rossii* elevou o potencial glicogenolítico (GPase) e gliconeogênico (G6Pase), e modulou positivamente o potencial hepático de canalização de glicose para o sangue. A redução dos níveis hepáticos de CS em *N. rossii*, deve ter favorecido o deslocamento de cadeias carbônicas do TCA para gliconeogênese, semelhante ao descrito por STROBEL et al., (2013), em estudo de estresse térmico em *N. rossii*.

Por outro lado, a glicemia de *N. rossii* não sofreu elevação na presença do efluente do esgoto, se mantendo em valores próximos ao do controle experimental. Considerando que o fígado de *N. rossii* elevou o potencial canalizador de glicose para o sangue, a não elevação da glicemia, sugere que houve aumento da captação de glicose pelos tecidos extra-hepáticos. Assim, o potencial renal ativador de glicose, indicado pelos níveis de HK, sofreu elevação em *N. rossii*, sugerindo um aumento de captação de glicose do sangue para atender o aumento de demandas energéticas. O esforço renal por substratos energéticos ficou evidente com o aumento do potencial glicogenolítico (GPase), com o objetivo de mobilizar a glicose estocada na forma de glicogênio.

Músculos e brânquias de *N. rossii*, no curto prazo, reduziram o seu potencial ativador de glicose (HK) e, consequentemente, a sua capacidade de utilizar glicose como substrato energético. A redução dos níveis de LDH nas brânquias e músculos indica redução da capacidade de utilização de lactato como substrato energético, o qual deve estar sendo direcionado para os rins que elevaram os níveis de LDH, priorizando o uso de lactato como substrato energético. Embora o tecido hepático tenha modulado positivamente a gliconeogênese, a manutenção dos níveis de LDH, indicam que o potencial de

oxidação do lactato em piruvato, como substrato da gliconeogênese, não foi alterado (figura 21).

O rim de teleósteos marinhos é responsável pela manutenção dos níveis de Mg^{2+} e Ca^{2+} do plasma, excretando o excesso desses dois cátions contra um gradiente de concentração. Em teleósteos antárticos, o fator de concentração do Mg^{2+} urinário, expresso pela razão Mg-urina/Mg-sangue, varia entre 25 e 244 vezes, e no caso do Ca^{2+} essa razão varia entre 0,9 e 5,5 (DOBBS III & DEVRIES, 1975).

Embora o rim de *N. rossii* tenha elevado o seu potencial aeróbio gerador de ATP, representado pelos níveis muito elevados de CS, tanto na exposição de curto prazo como de longo prazo ao efluente do esgoto, o tecido renal não foi capaz de manter o Mg^{2+} em níveis próximos do controle experimental, sugerindo que os poluentes do esgoto comprometeram a homeostasia desse cátion divalente, que se elevou no plasma. Contudo, o impacto do efluente do esgoto não foi capaz de comprometer a manutenção da calcemia de *N. rossii*, a qual manteve em níveis adequados Ca^{2+} no plasma.

A intensa mobilização lipídica, observada tanto no curto como no longo prazo, sugere que o efluente do esgoto induziu um processo de reorganização energética. Normalmente, os níveis plasmático de TG não variam em teleósteos sob estresse, considerando que o “turnover” de lipídeos é suficientemente elevado para sustentar o aumento de demandas energéticas, mesmo sob condições de estresse. Contudo, no estresse osmótico de teleósteos, o aumento de TG tem sido observado e interpretado como um processo de reorganização energética, considerando que o tecido branquial de peixes tem baixa preferência por lipídeos como substratos energéticos (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2005; RODRIGUES JR et al., 2013).

No longo prazo, o tecido hepático modulou com menor intensidade a glicogenólise, mas manteve elevado o potencial gliconeogênico, marcado por níveis elevados de G6Pase e baixos níveis de CS. Os níveis de LDH foram mantidos próximos do controle experimental, sugerindo que o fígado de *N. rossii* continuou não priorizando o lactato como substrato

gliconeogênico, na exposição de longo prazo. O aumento dos níveis de HK nas brânquias de *N. rossii*, na exposição de longo prazo ao efluente do esgoto, elevou a capacidade desse tecido metabolizar glicose proveniente do plasma, mas, mesmo assim, *N. rossii* foi capaz de manter a glicemia em valores próximos do controle experimental.

Ainda na exposição de longo prazo ao efluente do esgoto, os rins e músculos mantiveram o mesmo perfil metabólico do curto prazo, sendo que brânquias elevaram o potencial ativador de glicose (HK) e o potencial aeróbio gerador de ATP (CS). A correlação positiva entre os níveis de HK e CS tem contribuído para sustentar a hipótese de que glicose deve ser o principal substrato energético do tecido branquial de teleósteos (CROCKETT et al., 1999). Embora as brânquias tenham elevado o potencial gerador de ATP, tanto no curto como no longo prazo, priorizando a glicose como substrato energético, no longo prazo, o potencial energético de osmorregulação (Na/K-ATPase) não foi modulado pelo efluente do esgoto, sugerindo que o aumento de demanda energética não está relacionado com a manutenção dos níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^-. Nesse sentido, *N. rossii* foi capaz de manter níveis de Cl^- plasmático, tanto no curto como no longo prazo.

O aumento dos níveis plasmáticos de albumina, tanto na exposição de curto como de longo prazo, sugerem que a *N. rossii* promoveu uma reorganização proteica, provavelmente para atender as necessidades energéticas. A mobilização de aminoácidos proteicos para o fígado é essencial para suprir a gliconeogênese com cadeias carbônicas (PÉREZ-JIMÉNEZ et al., 2012).

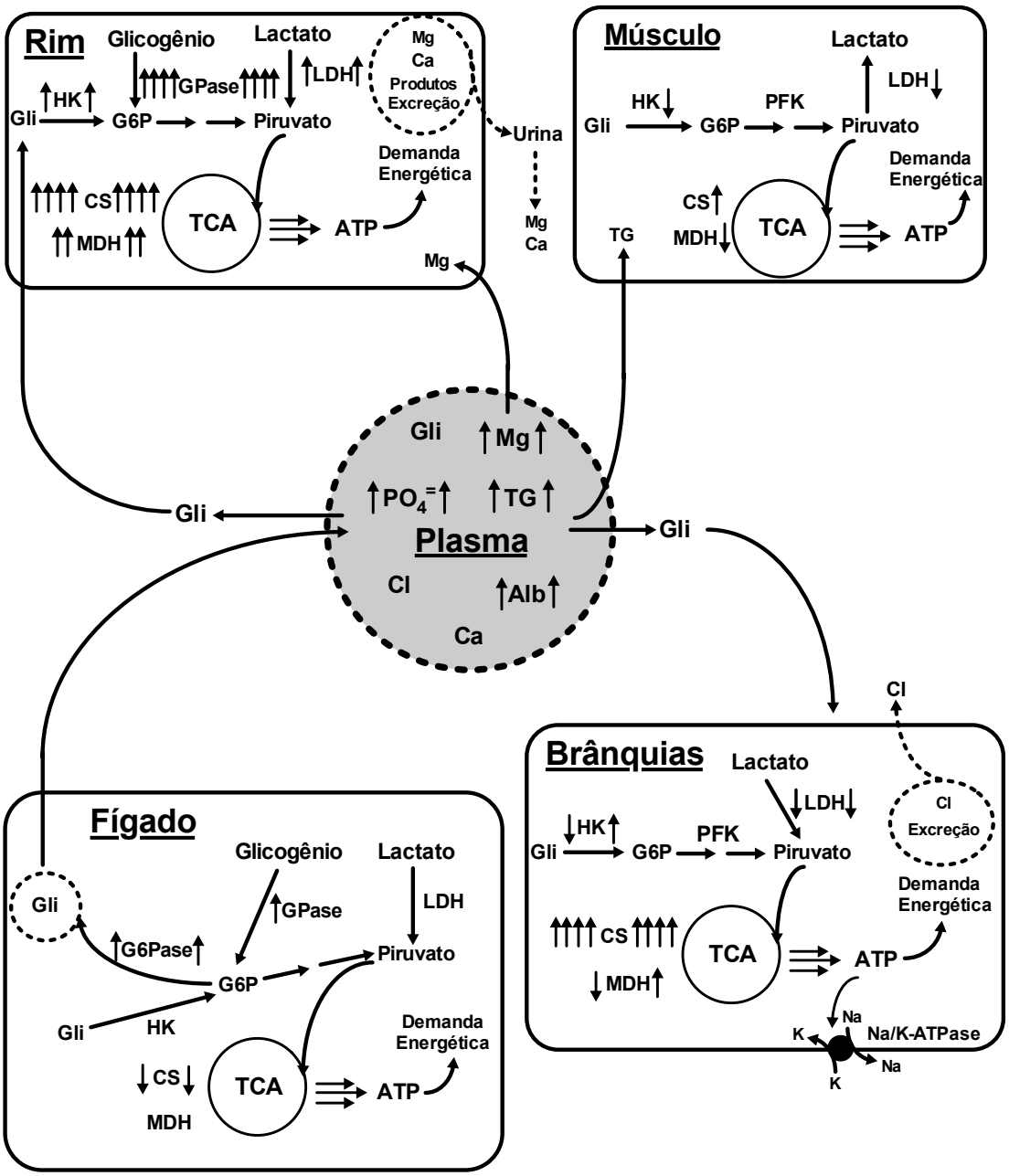


Figura 21. Metabolismo energético interórgão de *Notothenia rossii*. As setas ao lado esquerdo das siglas enzimáticas indicam as variação referentes ao efeito do esgoto, na exposição de curto prazo (96 h), e ao lado direito, na exposição de longo prazo (25 d). O número de setas ao lado das siglas enzimáticas indica a intensidade da alteração, sendo: uma seta, entre 0 e 100%; duas setas, entre 101 e 200%; três setas, entre 201 e 300%; quatro setas, entre 301 e 400%; e cinco ou mais setas valores acima de 401%. Todas as siglas utilizadas estão descritas em materiais e métodos, exceto a do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). (Fonte: O Autor).

Os experimentos com *N. coriiceps* mostraram que no curto prazo, o efluente do esgoto diluído à 0,5% (v/v), foi capaz de modular o metabolismo do fígado, rins, músculo e brânquias, de forma distinta de *N. rossii*, um nototenióide muito próximo na escala filogenética. Os resultados do efeito do efluente do esgoto sobre o metabolismo de *N. coriiceps* estão sumarizados na figura 22.

Na presença do efluente, a *N. coriiceps* evoluiu para um quadro de hipoglicemia no curto prazo, mostrando que os poluentes do esgoto foram capazes de comprometer o controle glicêmico. A taxa de glicose sanguínea representa o resultado do balanço entre vias metabólicas que retiram glicose do sangue e aquelas que introduzem glicose no sangue (PANKHURST, 2011; POLAKOF et al., 2012). Assim, a hipoglicemia apresentada pela *N. coriiceps*, sinaliza que a velocidade do conjunto de vias metabólicas que retiram glicose do sangue é maior do que a velocidade do conjunto de vias metabólicas que introduzem glicose no sangue.

Embora o potencial gliconeogênico do fígado de *N. coriiceps* tenha sido modulado positivamente na presença do efluente do esgoto, com o aumento dos níveis de G6Pase, isso não foi suficiente para sustentar a demanda dos tecidos por glicose, resultando em hipoglicemia. A gliconeogênese em peixes, semelhante a mamíferos, é uma via voltada para manutenção de glicemia no longo prazo e não costuma ser eficaz no curto prazo (LOWE & DAVISON, 2005; PANKHURST, 2011).

Contudo, o potencial glicogenolítico, indicado pelos níveis de GPase, foram mantidos em níveis próximos do controle experimental, mostrando que *N. coriiceps* foi incapaz de potencializar a fosforilação do glicogênio em glicose-6-fosfato. O aumento da glicemia de teleósteos sob estresse é um processo bifásico, que envolve a secreção de catecolaminas num primeiro momento, seguido da elevação de cortisol no longo prazo (PANKHURST, 2011). As catecolaminas agem rapidamente ativando a glicogenólise hepática e mobilizando a glicose do glicogênio para o sangue. Já a gliconeogênese, ganha força quando os estoques de glicogênio começam a

se exaurir, mantendo a glicemia no longo prazo (LOWE & DAVISON, 2005). Assim, a incapacidade de *N. coriiceps* modular positivamente os níveis hepáticos de GPase, sugere que o fígado desse peixe não conseguiu canalizar glicose para o sangue, em quantidade suficiente, para evitar a hipoglicemia.

Por outro lado, o tecido branquial de *N. coriiceps* não modulou negativamente os níveis de HK, mantendo as sua capacidade de fosforilar glicose proveniente do sangue. O tecido branquial de *N. coriiceps* também não elevou o potencial oxidativo de lactato, que introduz o lactado no metabolismo energético branquial e que poderia estar contribuindo para redução do consumo de glicose.

O aumento dos níveis branquial de CS, utilizado como “proxy” do potencial aeróbio gerador de ATP, foi modulado positivamente, sugerindo um provável aumento de demanda energética, o que pode ter acelerado o consumo de glicose e lactato. A manutenção dos níveis de Na/K-ATPase, com valores próximos do controle experimental, bem como a manutenção dos níveis plasmático de cloreto, sugere que a manutenção do potencial energético de controle da osmorregulação não foi impactado pelos poluentes do esgoto e foi mantido em níveis adequados para atender a manutenção dos níveis de cloreto.

O tecido renal de *N. coriiceps* promoveu um aumento expressivo dos níveis de HK, CS, MDH, GPase e LDH na presença do efluente do esgoto, sugerindo um forte aumento da demanda energética desse tecido. O potencial aeróbio gerador de ATP (CS) aumentou em cerca de 11 vezes comparado ao controle experimental. Provavelmente, a glicose sanguínea é proveniente do glicogênio e está sendo utilizada para atender essa demanda energética, considerando que os níveis de GPase foram modulados positivamente em 4,5 vezes e os de HK em duas vezes.

Assim, o aumento do consumo de glicose pelos tecidos branquial e renal, sugerido pelos níveis enzimáticos (“proxies”) do metabolismo energético, juntamente com a incapacidade hepática de modular positivamente os níveis de GPase, são as principais evidências que sinalizam para a redução

dos níveis glicêmicos de *N. coriiceps*, induzidos pelos poluentes do esgoto. Por outro lado, *N. coriiceps* não modulou positivamente os níveis de TG na presença do efluente do esgoto, comprometendo uma possível reorganização energética, que poderia estar contribuindo para a redução do consumo tecidual de glicose e, consequentemente, para a manutenção da glicemia. Por outro lado, os poluentes do esgoto modularam negativamente os níveis de Mg^{2+} e albumina no plasma sanguíneo, diferente do observado em *N. rossii*, mostrando que essas duas espécies, apresentam comportamentos metabólicos bem distintos, frente aos poluentes do esgoto.

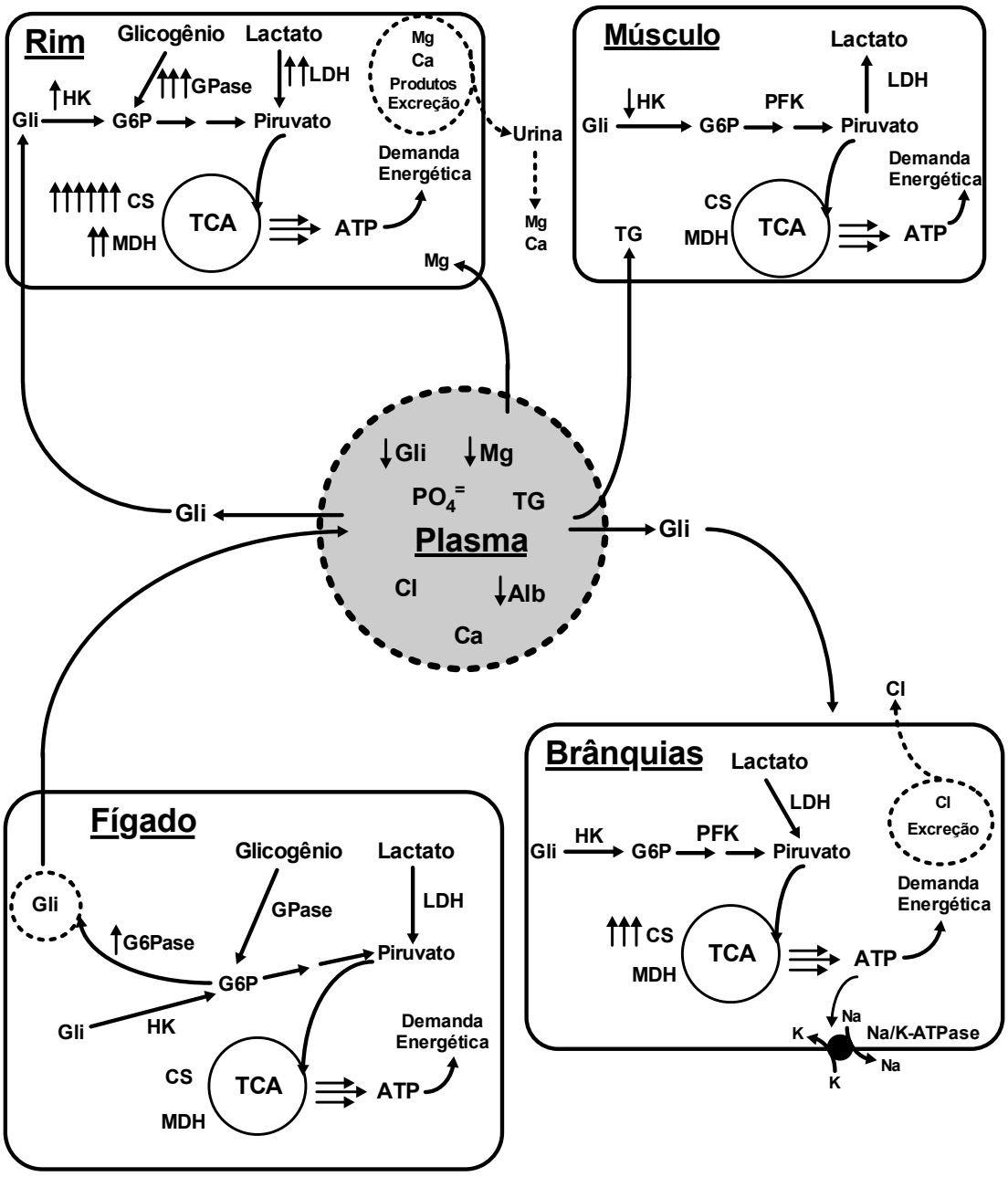


Figura 22. Metabolismo energético interórgão de *Notothenia coriiceps*. As setas ao lado esquerdo das siglas enzimáticas indicam as variação referentes ao efeito do esgoto, na exposição de curto prazo (96 h). O número de setas ao lado das siglas enzimáticas indicam a intensidade da alteração, sendo: uma seta, entre 0 e 100%; duas setas, entre 101 e 200%; três setas, entre 201 e 300%; quatro setas, entre 301 e 400%; e cinco ou mais setas valores acima de 401%. Todas as siglas utilizadas estão descritas em materiais e métodos, exceto a do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). (Fonte: O Autor).

7. CONCLUSÕES

- O metabolismo hepático de *N. rossii* se mostrou bem adaptado a presença de fluoreto na dieta, mesmo sob condições adversas de temperatura e salinidade;
- A modulação do metabolismo energético, defesa antioxidante, catabolismo da L-arginina, metabolismo de xenobióticos dos peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*, induzida pelo efluente do esgoto da ETE da EACF, sugere as respostas metabólicas dessas duas espécies de nototenióides como biomarcadores de poluição do ambiente marinho antártico por esgoto;
- As respostas metabólicas induzidas pelo efluente do esgoto da ETE, inclusive na diluição de 0,05% (v/v), sugerem que os rins de *N. rossii* e *N. coriiceps*, são muito sensíveis a esse tipo de poluição, a qual foi capaz de elevar, de forma marcante, as suas demandas energéticas;
- Os peixes antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps* apresentam potencialidades metabólicas hepáticos distintas de manutenção da glicêmica, induzidas pelo esgoto no curto prazo;
- O metabolismo energético do tecido muscular, de *N. rossii* e *N. coriiceps*, foram os menos impactados pelos poluentes do esgoto, reduzindo o potencial ativador de glicose e, consequentemente, a captação de glicose muscular, bem como elevando em 50% o potencial aeróbio gerador de ATP;
- As respostas do metabolismo energético de *N. rossii* e *N. coriiceps*, induzidas pelo efluente do esgoto, foram mais expressivas do que as respostas dos sistemas enzimáticos antioxidantes, sugerindo que as enzimas do metabolismo energético podem ser biomarcadores mais adequados para a avaliação/monitoramento de poluição por esgoto na Antártica;
- Os poluentes do esgoto foram capazes de modular, de forma distinta, os constituintes plasmáticos de *N. rossii* e *N. coriiceps*, basicamente naquilo que diz respeito aos níveis de Mg^{2+} e albumina, sendo que a modulação dos níveis de Mg^{2+} foi dose dependente do efluente de esgoto em *N. rossii*;
- As enzimas branquiais HK, MDH, G6PDH e GR de *N. rossii*, foram moduladas de forma distinta no curto e longo prazo de exposição ao

efluente do esgoto, sugerindo que essas enzimas são potenciais biomarcadores, adequados para diferenciar a exposição de curto do longo prazo de exposição aos poluentes do esgoto;

- A SOD muscular foi modulada positivamente no músculo de *N. rossii*, apenas no curto prazo, sendo adequada para diferenciar a exposição ao efluente do esgoto, no curto do longo prazo;
- As enzimas CAT e SOD do tecido hepático foram moduladas negativamente no curto prazo e moduladas positivamente no longo prazo, se mostrando adequadas para diferenciar a exposição de curto do longo prazo;
- As respostas metabólicas interórgãos de *N. rossii*, sugerem que esse peixe antártico se adaptou melhor aos desafios impostas pelos poluentes do esgoto do que *N. coriiceps*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELE, D.; PUNTARULO, S. 2004. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, v. 138, n. 4, p. 405-415

ADAMU, K. M.; KORI-SIAKPERE, O. 2011. Effects of sublethal concentrations of tobacco (*Nicotiana tobaccum*) leaf dust on some biochemical parameters of Hybrid catfish (*Clarias gariepinus* and *Heterobranchus bidorsalis*). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 54, n. 1, p. 183-196

ADELUNG, D.; BÖSSMAN, K.; RÖSSLE, D. 1985. The distribution of fluoride in some antarctic seals. *Polar Biology*, v. 5, n. 1, p. 31-34

AINLEY, D. G.; BLIGHT, L. K. 2009. Ecological repercussions of historical fish extraction from the Southern Ocean. *Fish and Fisheries*, v. 10, n. 1, p. 13-38

ALEGRE, M.; CIUDAD, C. J.; FILLAT, C.; GUINOVART, J. J. 1988. Determination of glucose-6-phosphatase activity using the glucose dehydrogenase-coupled reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 173, n. 1, p. 185-189

ANDREEVA, A. M. 2010. The role of structural organization of blood plasma proteins in the stabilization of water metabolism in bony fish (Teleostei). *Journal of Ichthyology*, v. 50, n. 7, p. 552-558

ARIGONY-NETO, J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. 2004. Implemantation of the Admiralty Bay Geographic Information System, King George Island, Antarctica. *Pesquisa Antártica Brasileira*, v. 4, p. 187-190

ARONSON, R. B.; THATJE, S.; MCCLINTOCK, J. B.; HUGHES, K. A. 2011. Anthropogenic impacts on marine ecosystems in Antarctica. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1223, p. 82-107

BACILA, M.; ROSA, R.; RODRIGUES, E. 1989. Fluoride inhibition of enolase from Antarctic organisms. *Pesquisa Antártica Brasileira*, v. 1, n. 1, p. 31-34

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

BARBIER, O.; ARREOLA-MENDOZA, L.; DEL RAZO, L. M. 2010. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, v. 188, n. 2, p. 319-333

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

BARNES, D. K. A.; FUENTES, V.; CLARKE, A.; SCHLOSS, I. R.; WALLACE, M. I. 2006. Spatial and temporal variation in shallow seawater temperatures around Antarctica. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography***,** v. 53, n. 8-10, p. 853-865

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

BENEDETTI, M.; FATTORINI, D.; MARTUCCIO, G.; NIGRO, M.; REGOLI, F. 2009. Interactions between trace metals (Cu, Hg, Ni, Pb) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the antarctic fish *Trematomus bernacchii*: oxidative effects on biotransformation pathway. *Environmental Toxicology and Chemistry***,** v. 28, n. 4, p. 818-825

BHATNAGAR, C.; BHATNAGAR, M.; REGAR, B. C. 2007. Fluoride-induced histopathological changes in gill, kidney, and intestine of fresh water teleost, *Labeo rohita*. *Fluoride***,** v. 40, n. 1, p. 55-61

BLASCO, J.; MARIMÓN, I.; VIAPLANA, I.; FERNÁNDEZ-BORRÁS, J. 2001. Fate of plasma glucose in tissues of brown trout in vivo: Effects of fasting and glucose loading. *Fish Physiology and Biochemistry***,** v. 24, n. 3, p. 247-258

BOEUF, G.; PAYAN, P. 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology***,** v. 130, n. 4, p. 411-423

BRAUN, M.; SIMÕES, J. C.; VOGT, S.; BREMER, U. F.; BLINDOW, N.; PFENDER, M.; SAURER, H.; AQUINO, F. E.; FERRON, F. A. 2001. An improved topographic database for King George Island: Compilation, application and outlook. *Antarctic Science***,** v. 13, n. 1, p. 41-52

BROCKINGTON, S. 2001. The seasonal energetics of the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* (King and Broderip) at Rothera Point, Adelaide Island. *Polar Biology***,** v. 24, n. 7, p. 523-530

BUCKING, C.; LANDMAN, M. J.; WOOD, C. M. 2010. The role of the kidney in compensating the alkaline tide, electrolyte load, and fluid balance disturbance associated with feeding in the freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology***,** v. 156, n. 1, p. 74-83

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. 1994. **Tietz Textbook of Clinical Chemistry**. Second. Philadelphia: Saunders Company, 2326

CAMARGO, J. A. 2003. Fluoride toxicity to aquatic organisms: a review. *Chemosphere*, v. 50, n. 3, p. 251-264

CAMARGO, J. A.; TARAZONA, J. V. 1991. Short-term toxicity of fluoride ion (F-) in soft water to rainbow trout and brown trout. *Chemosphere*, v. 22, n. 5-6, p. 605-611

CAMPBELL, H. A.; FRASER, K. P. P.; BISHOP, C. M.; PECK, L. S.; EGGINTON, S. 2008. Hibernation in an Antarctic fish: On ice for winter. *PLoS ONE*, v. 3, n. 3,

CAREY, R. O.; MIGLIACCIO, K. W. 2009. Contribution of wastewater treatment plant effluents to nutrient dynamics in aquatic systems. *Environmental Management*, v. 44, n. 2, p. 205-217

CARNEY ALMROTH, B.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGREN, M.; JUTFELT, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. 2015. Warmer water temperature results in oxidative damage in an antarctic fish, the bald notothen. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v. 468, p. 130-137

CASAUX, R.; BARRERA-ORO, E. 2013. Dietary overlap in inshore notothenioid fish from the Danco Coast, Western Antarctic Peninsula. *Polar Research*, v. 32, n. SUPPL., p. 21319

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

CHANG, J. C. H.; WU, S. M.; TSENG, Y. C.; LEE, Y. C.; BABA, O.; HWANG, P. P. 2007. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. *Journal of Experimental Biology*, v. 210, n. 19, p. 3494-3504

CHENG, C. H. C.; DETRICH III, H. W. 2007. Molecular ecophysiology of Antarctic notothenioid fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 362, n. 1488, p. 2215-2232

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. 1979. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. *Marine Biology*, v. 52, n. 3, p. 273-283

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

CIPRO, C. V. Z.; COLABUONO, F. I.; TANIGUCHI, S.; MONTONE, R. C. 2013. Persistent organic pollutants in bird, fish and invertebrate samples from King George Island, Antarctica. *Antarctic Science*, v. 25, n. 4, p. 545-552

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 48, n. 6, p. 749-762

CLARKE, A. 2003. Costs and consequences of evolutionary temperature adaptation. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 18, n. 11, p. 573-581

CLARKE, A.; DOHERTY, N.; DEVRIES, A. L.; EASTMAN, J. T. 1984. Lipid content and composition of three species of Antarctic fish in relation to buoyancy. *Polar Biology*, v. 3, n. 2, p. 77-83

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

CLARKE, A.; JOHNSTON, N. M.; MURPHY, E. J.; ROGERS, A. D. 2007. Introduction. Antarctic ecology from genes to ecosystems: The impact of climate change and the importance of scale. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 362, n. 1477, p. 5-9

CLARKE, A.; MURPHY, E. J.; MEREDITH, M. P.; KING, J. C.; PECK, L. S.; BARNES, D. K. A.; SMITH, R. C. 2007. Climate change and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 362, n. 1477, p. 149-166

COMNAP-AEON. Waste Management in Antarctica. **Antarctic Environmental Officers Network**, Hobart, p. 157, 2006 2006. Disponível em: < https://http://www.comnap.aq/Publications/Comnap Publications/Forms/DispForm.aspx?ID=42 >. Acesso em: 11/10.

CORBETT, P. A.; KING, C. K.; STARK, J. S.; MONDON, J. A. 2014. Direct evidence of histopathological impacts of wastewater discharge on resident Antarctic fish (*Trematomus bernacchii*) at Davis Station, East Antarctica. *Marine Pollution Bulletin*, v. 87, n. 1-2, p. 48-56

CORBISIER, T. N.; PETTI, M. A. V.; SKOWRONSKI, R. S. P.; BRITO, T. A. S. 2004. Trophic relationships in the nearshore zone of Martel Inlet (King George Island, Antarctica): d13C stable-isotope analysis. *Polar Biology*, v. 27, n. 2, p. 75-82

CROCKETT, E. L. 2011. Antioxidant potential is positively correlated with mitochondrial enzyme activity in Antarctic and non-Antarctic notothenioid fishes. *Polar Biology*, v. 34, n. 1, p. 113-118

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

CURTOSI, A.; PELLETIER, E.; VODOPIVEZ, C. L.; MAC CORMACK, W. P. 2009. Distribution of PAHs in the water column, sediments and biota of potter cove, south Shetland Islands, antarctica. *Antarctic Science***,** v. 21, n. 4, p. 329-339

DE SOUZA, K. B.; JUTFELT, F.; KLING, P.; FÖRLIN, L.; STURVE, J. 2014. Effects of increased CO_2 on fish gill and plasma proteome. *PLoS ONE***,** v. 9, n. 7, p. e102901

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

DES ROSIERS, C.; DI DONATO, L.; COMTE, B.; LAPLANTE, A.; MARCOUX, C.; DAVID, F.; FERNANDEZ, C. A.; BRUNENGRABER, H. 1995. Isotopomer analysis of citric acid cycle and gluconeogenesis in rat liver: Reversibility of isocitrate dehydrogenase and involvement of ATP-citrate lyase in gluconeogenesis. *Journal of Biological Chemistry***,** v. 270, n. 17, p. 10027-10036

DEVRIES, A. L.; KOMATSU, S. K.; FEENEY, R. E. 1970. Chemical and physical properties of freezing point-depressing glycoproteins from Antarctic fishes. *Journal of Biological Chemistry***,** v. 245, n. 11, p. 2901-2908

DEVRIES, A. L.; STEFFENSEN, J. F. **The Arctic and Antarctic Polar Marine Environments**. Fish Physiology. 22**:** 1-24 p. 2005.

DI BELLO, D.; VACCARO, E.; LONGO, V.; REGOLI, F.; NIGRO, M.; BENEDETTI, M.; GERVASI, P. G.; PRETTI, C. 2007. Presence and inducibility by β-naphthoflavone of CYP1A1, CYP1B1 and phase II enzymes in Trematomus bernacchii, an Antarctic fish. *Aquatic Toxicology***,** v. 84, n. 1, p. 19-26

DI PRISCO, G. 2000. Life style and biochemical adaptation in Antarctic fishes. *Journal of Marine Systems***,** v. 27, n. 1-3, p. 253-265

DOBBS III, G. H.; DEVRIES, A. L. 1975. Renal function in Antarctic teleost fishes: Serum and urine composition. *Marine Biology***,** v. 29, n. 1, p. 59-70

DOBBS III, G. H.; LIN, Y.; DEVRIES, A. L. 1974. Aglomerularism in antarctic fish. *Science***,** v. 185, n. 4153, p. 793-794

EASTMAN, J. T. 1993. **Antarctic Fish Biology - Evolution in a Unique Environment**. San Diego: Academic Press, Inc, 322

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

EASTMAN, J. T.; DEVRIES, A. L. 1981. Hepatic ultrastructural specialization in Antarctic fishes. *Cell and Tissue Research***,** v. 219, n. 3, p. 489-496

EASTMAN, J. T.; DEVRIES, A. L. 1997. Morphology of the digestive system of Antarctic nototheniid fishes. *Polar Biology*, v. 17, n. 1, p. 1-13

ESCHMEYER, W. N.; FRICKE, R.; FONG, J. D.; POLACK, D. A. 2010. Marine fish diversity: history of knowledge and discorery (Pisces). *Zootaxa*, v. 2525, p. 19-50

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, v. 85, n. 1, p. 97-177

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

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry*, v. 66, n. 2, p. 375-400

FOCARDI, S.; FOSSI, M. C.; LARI, L.; CASINI, S.; LEONZIO, C.; MEIDEL, S. K.; NIGRO, M. 1995. Induction of MFO activity in the antarctic fish *Pagothenia bernacchii*: Preliminary results. *Marine Environmental Research*, v. 39, n. 1-4, p. 97-100

FORMAN, H. J.; URSINI, F.; MAIORINO, M. 2014. An overview of mechanisms of redox signaling. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 73, p. 2-9

FOURNIER, V.; GOUILLOU-COUSTANS, M. F.; MÉTAILLER, R.; VACHOT, C.; MORICEAU, J.; LE DELLIOU, H.; HUELVAN, C.; DESBRUYERES, E.; KAUSHIK, S. J. 2003. Excess dietary arginine affects urea excretion but does not improve N utilisation in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* and turbot *Psetta maxima*. *Aquaculture*, v. 217, n. 1-4, p. 559-576

FRICK, N. T.; BYSTRIANSKY, J. S.; IP, Y. K.; CHEW, S. F.; BALLANTYNE, J. S. 2008. Carbohydrate and amino acid metabolism in fasting and aestivating African lungfish (Protopterus dolloi). *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, v. 151, n. 1, p. 85-92

GORBATIUK, L. O. 2013. Energy supply of the fish organism under the impact of pesticides (a review). *Hydrobiological Journal*, v. 49, n. 1, p. 79-90

GRÖNDAHL, F.; SIDENMARK, J.; THOMSEN, A. 2009. Survey of waste water disposal practices at Antarctic research stations. *Polar Research*, v. 28, n. 2, p. 298-306

GRUCKA-MAMCZAR, E.; BIRKNER, E.; ZALEJSKA-FIOLKA, J.; MACHOY, Z.; KASPERCZYK, S.; BLASZCZYK, I. 2007. Influence of extended exposure to sodium fluoride and caffeine on the activity of carbohydrate metabolism enzymes in rat blood serum and liver. *Fluoride*, v. 40, n. 1, p. 62-66

GRUNG, M.; LICHTENTHALER, R.; AHEL, M.; TOLLEFSEN, K. E.; LANGFORD, K.; THOMAS, K. V. 2007. Effects-directed analysis of organic toxicants in wastewater effluent from Zagreb, Croatia. *Chemosphere***,** v. 67, n. 1, p. 108-120

HAGEN, W.; KATTNER, G.; FRIEDRICH, C. 2000. The lipid compositions of high-Antarctic notothenioid fish species with different life strategies. *Polar Biology***,** v. 23, n. 11, p. 785-791

HANSEN, J. Ø.; PENN, M. H.; SHEARER, K. D.; STOREBAKKEN, T.; ØVERLAND, M. 2012. Tissue fluoride accumulation and kidney lesions in freshwater-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed with high dietary fluoride concentrations. *Aquaculture Nutrition***,** v. 18, n. 3, p. 304-312

HARRISON, K.; HALLETT, J.; BURCHAM, T. S.; FEENEY, R. E.; KERR, W. L.; YEH, Y. 1987. Ice growth in supercooled solutions of antifreeze glycoprotein. *Nature***,** v. 328, n. 6127, p. 241-243

HEFFERNAN, L. M.; WINSTON, G. W. 1998. Spectral analysis and catalytic activities of the microsomal mixed-function oxidase system of the sea anemone (phylum: Cnidaria). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology***,** v. 121, n. 1-3, p. 371-383

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. 2002. **Biochemical Adapatation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. New York: Oxford University Press, 466

HOEGH-GULDBERG, O.; BRUNO, J. F. 2010. The impact of climate change on the world's marine ecosystems. *Science***,** v. 328, n. 5985, p. 1523-1528

HORI, T. S. F.; AVILEZ, I. M.; INOUE, L. K.; MORAES, G. 2006. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: Characidae) juveniles. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology***,** v. 143, n. 1, p. 67-72

HUDSON, H. A.; BRAUER, P. R.; SCOFIELD, M. A.; PETZEL, D. H. 2008. Effects of warm acclimation on serum osmolality, cortisol and hematocrit levels in the Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. *Polar Biology***,** v. 31, n. 8, p. 991-997

HWANG, P.-P.; LEE, T.-H. 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology***,** v. 148, n. 3, p. 479-497

HWANG, P. P.; LEE, T. H.; LIN, L. Y. 2011. Ion regulation in fish gills: Recent progress in the cellular and molecular mechanisms. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology***,** v. 301, n. 1, p. R28-R47

INGS, J. S.; OAKES, K. D.; VIJAYAN, M. M.; SERVOS, M. R. 2012. Temporal changes in stress and tissue-specific metabolic responses to municipal wastewater effluent exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, v. 156, n. 2, p. 67-74

INKIELEWICZ-STEPNIAK, I.; CZARNOWSKI, W. 2010. Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine. *Food and Chemical Toxicology*, v. 48, n. 6, p. 1607-1611

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

JENKINSON, C. P.; GRODY, W. W.; CEDERBAUM, S. D. 1996. Comparative properties of arginases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 114, n. 1, p. 107-132

JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Analytical Biochemistry*, v. 202, n. 2, p. 384-389

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe2+ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, v. 26, n. 10, p. 853-856

JOHNSTON, I. A. 1989. Antarctic fish muscles — structure, function and physiology. *Antarctic Science*, v. 1, n. 02, p. 97-108

JOHNSTON, I. A. 1989. Muscles and activity metabolism in metabolism in Antarctic fish: a review. *Antarctic Special Topic*, p. 65-76

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

JOHNSTON, I. A.; CALVO, J.; GUDERLEY, H.; FERNANDEZ, D.; PALMER, L. 1998. Latitudinal variation in the abundance and oxidative capacities of muscle mitochondria in perciform fishes. *Journal of Experimental Biology*, v. 201, n. 1, p. 1-12

KALAČ, P.; KRAUSOVÁ, P. 2005. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry*, v. 90, n. 1-2, p. 219-230

KAWALL, H.; TORRES, J.; SIDELL, B.; SOMERO, G. 2002. Metabolic cold adaptation in Antarctic fishes: evidence from enzymatic activities of brain. *Marine Biology*, v. 140, n. 2, p. 279-286

KIRK, C. J.; BOTTOMLEY, L.; MINICAN, N.; CARPENTER, H.; SHAW, S.; KOHLI, N.; WINTER, M.; TAYLOR, E. W.; WARING, R. H.; MICHELANGELI, F.; HARRIS, R. M. 2003. Environmental endocrine disrupters dysregulate estrogen metabolism and Ca^{2+} homeostasis in fish and mammals via receptor-independent mechanisms. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology***,** v. 135, n. 1, p. 1-8

KNOX, D.; WALTON, M. J.; COWEY, C. B. 1980. Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues. *Marine Biology***,** v. 56, n. 1, p. 7-10

KOCK, K. H. 1985.Krill consumption by Antarctic notothenoiod fish. In: SIEGFRIED, W. R.;CONDY, P. R.& LAWS, R. M. (Ed.). **Antarctic nutrient cycles and food webs**. Berlin: Spring-Verlag, p.437-444.

KOMATSU, S. K.; MILLER, H. T.; DEVRIES, A. L.; OSUGA, D. T.; FEENEY, R. E. 1970. Blood plasma proteins of cold-adapted antarctic fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology***,** v. 32, n. 3, p. 519-522,IN11-IN16,523-527

KONO, Y. 1978. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Archives of Biochemistry and Biophysics***,** v. 186, n. 1, p. 189-195

KULESZ, J. 1999. Ichthyofauna of lagoons of the Admiralty Bay (King George Island, Antarctica) in 1997. *Polskie Archiwum Hydrobiologii***,** v. 46, n. 2, p. 173-184

KUZMANN, A. 1991 **Blood Physiology and Ecological Consequences in Weddell Sea Fishes (Antarctica)**. 79 PhD (PhD). Intitut für Polarökologie, Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Olshausenstrβe.

LAM, P. K. S. 2009. Use of biomarkers in environmental monitoring. *Ocean and Coastal Management***,** v. 52, n. 7, p. 348-354

LAM, P. K. S.; GRAY, J. S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin***,** v. 46, n. 2, p. 182-186

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. R.; SHACTER, E. 1994. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology***,** v. 233, p. 346-357

LI, W. C. 2014. Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil. *Environmental Pollution***,** v. 187, p. 193-201

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

LU, J.; ZHENG, J.; LIU, H.; LI, J.; XU, Q.; CHEN, K. 2010. Proteomics analysis of liver samples from puffer fish *Takifugu rubripes* exposed to excessive fluoride: An insight into molecular response to fluorosis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 24, n. 1, p. 21-28

LURMAN, G. J.; MACDONALD, J. A.; EVANS, C. W. 2010. Evaluating the impact of environmental pollution on fish in McMurdo Sound, Antarctica: A biomarker approach. *Polar Science*, v. 3, n. 4, p. 246-253

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. 2006. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 143, n. 1, p. 36-41

LYNCH, H. J.; CROSBIE, K.; FAGAN, W. F.; NAVEEN, R. 2010. Spatial patterns of tour ship traffic in the Antarctic Peninsula region. *Antarctic Science*, v. 22, n. 2, p. 123-130

MA, T.; WAN, X.; HUANG, Q.; WANG, Z.; LIU, J. 2005. Biomarker responses and reproductive toxicity of the effluent from a Chinese large sewage treatment plant in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, v. 59, n. 2, p. 281-288

MACCORMACK, T. J.; DRIEDZIC, W. R. 2007. The impact of hypoxia on in vivo glucose uptake in a hypoglycemic fish, *Myoxocephalus scorpius*. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 292, n. 2, p. R1033-42

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. S.; CADENA, S. M.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S.; DONATTI, L. 2014. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 172-173, p. 21-28

MADRID-PROTOCOL. **Protocol on Environmental Protection to the Antarctic Treaty**. http://www.antarctica.gov.au/law-and-treaty/the-madrid-protocol: Australian Antarctic Division. 2014 1991.

MAES, J.; VAN DE PUTTE, A.; HECQ, J. H.; VOLCKAERT, F. A. M. 2006. State-dependent energy allocation in the pelagic Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*: Trade-off between winter reserves and buoyancy. *Marine Ecology Progress Series*, v. 326, p. 269-282

MAGNONI, L.; VAILLANCOURT, E.; WEBER, J. M. 2008. High resting triacylglycerol turnover of rainbow trout exceeds the energy requirements of endurance swimming. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 295, n. 1, p. R309-R315

MAGNONI, L.; WEBER, J. M. 2007. Endurance swimming activates trout lipoprotein lipase: Plasma lipids as a fuel for muscle. *Journal of Experimental Biology***,** v. 210, n. 22, p. 4016-4023

MAGNONI, L. J.; SCARLATO, N. A.; PATRICIO OJEDA, F.; WÖHLER, O. C. 2013. Gluconeogenic pathway does not display metabolic cold adaptation in liver of Antarctic notothenioid fish. *Polar Biology***,** v. 36, n. 5, p. 661-671

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

MARTINS, C. C.; AGUIAR, S. N.; BÍCEGO, M. C.; MONTONE, R. C. 2012. Sewage organic markers in surface sediments around the Brazilian Antarctic station: Results from the 2009/10 austral summer and historical tendencies. *Marine Pollution Bulletin***,** v. 64, n. 12, p. 2867-2870

MARTINS, C. C.; AGUIAR, S. N.; WISNIESKI, E.; CESCHIM, L. M.; FIGUEIRA, R. C.; MONTONE, R. C. 2014. Baseline concentrations of faecal sterols and assessment of sewage input into different inlets of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Mar Pollut Bull***,** v. 78, n. 1-2, p. 218-23

MATSCHINER, M.; HANEL, R.; SALZBURGER, W. 2011. On the origin and trigger of the notothenioid adaptive radiation. *PLoS ONE***,** v. 6, n. 4, p. e18911

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

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

MILLER, K. M.; SCHULZE, A. D.; GINTHER, N.; LI, S.; PATTERSON, D. A.; FARRELL, A. P.; HINCH, S. G. 2009. Salmon spawning migration: Metabolic shifts and environmental triggers. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics***,** v. 4, n. 2, p. 75-89

MONTONE, R. C.; MARTINS, C. C.; BÍCEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; ALBUQUERQUE MOREIRA DA SILVA, D.; CAMPOS, L. S.; WEBER, R. R. 2010. Distribution of sewage input in marine sediments around a maritime Antarctic research station indicated by molecular geochemical indicators. *Science of the Total Environment***,** v. 408, n. 20, p. 4665-4671

MORRIS, D. J.; NORTH, A. W. 1984. Oxygen consumption of five species of fish from south Georgia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology***,** v. 78, n. 1-2, p. 75-86

MUELLER, I.; HOFFMAN, M.; DULLEN, K.; O'BRIEN, K. 2013. Moderate elevations in temperature do not increase oxidative stress in oxidative muscles of Antarctic notothenioid fishes. *Polar Biology***,** v. 37, n. 3, p. 311-320

MUELLER, I. A.; DEVOR, D. P.; GRIM, J. M.; BEERS, J. M.; CROCKETT, E. L.; O'BRIEN, K. M. 2012. Exposure to critical thermal maxima increases oxidative stress in hearts of whitebut not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. *Journal of Experimental Biology***,** v. 215, n. 20, p. 3655-3664

NATOCHIN, Y. V. 1996. Evolutionary aspects of renal function. *Kidney International***,** v. 49, n. 6, p. 1539-1542

NEAR, T. J.; DORNBURG, A.; KUHN, K. L.; EASTMAN, J. T.; PENNINGTON, J. N.; PATARNELLO, T.; ZANE, L.; FERNÁNDEZ, D. A.; JONES, C. D. 2012. Ancient climate change, antifreeze, and the evolutionary diversification of Antarctic fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America***,** v. 109, n. 9, p. 3434-3439

NELSON, D. L.; COX, M. M. 2011. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5th Edition. Porto Alegre: Artmed, 1273

NICOL, S.; DE LA MARE, W. 1993. Ecosystem management and the Antarctic Krill. *American Scientist***,** v. 81, p. 36-47

NILSEN, B. M.; BERG, K.; GOKSOYR, A. 1998.Introduction of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish. A biomarker for environmental pollution. In: PHILIPS, I. R.& SHEPHARD, E. A. (Ed.). **Methods in Molecular Biology - Cytochrome P450 Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press Inc., v.107, p.500.

OEHLENSCHLÄGER, J.; REHBEIN, H. 1982. Chemical composition of some tissues of the Antarctic fish *Notothenia rossii marmorata*, fischer 1885. *Food Chemistry***,** v. 8, n. 4, p. 291-297

OOSTERVEER, M. H.; SCHOONJANS, K. 2014. Hepatic glucose sensing and integrative pathways in the liver. *Cellular and Molecular Life Sciences***,** v. 71, n. 8, p. 1453-1467

PANKHURST, N. W. 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology***,** v. 170, n. 2, p. 265-275

PÉREZ-JIMÉNEZ, A.; CARDENETE, G.; HIDALGO, M. C.; GARCÍA-ALCÁZAR, A.; ABELLÁN, E.; MORALES, A. E. 2012. Metabolic adjustments of Dentex dentex to prolonged starvation and refeeding. *Fish Physiology and Biochemistry***,** v. 38, n. 4, p. 1145-1157

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

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

POLAKOF, S.; ARJONA, F. J.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; MARTÍN DEL RÍO, M. P.; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. 2006. Food deprivation alters osmoregulatory and metabolic responses to salinity acclimation in gilthead sea bream Sparus auratus. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, v. 176, n. 5, p. 441-452

POLAKOF, S.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L. 2007. Daily changes in parameters of energy metabolism in liver, white muscle, and gills of rainbow trout: Dependence on feeding. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, v. 147, n. 2 SPEC. ISS., p. 363-374

POLAKOF, S.; PANSERAT, S.; SOENGAS, J. L.; MOON, T. W. 2012. Glucose metabolism in fish: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, v. 182, n. 8, p. 1015-1045

PÖRTNER, H. O. 2006. Climate-dependent evolution of Antarctic ectotherms: An integrative analysis. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, v. 53, n. 8-10, p. 1071-1104

PORTNER, H. O.; BOCK, C.; KNUST, R.; LANNIG, G.; LUCASSEN, M.; MARK, F. C.; SARTORIS, F. J. 2008. Cod and climate in a latitudinal cline: Physiological analyses of climate effects in marine fishes. *Climate Research*, v. 37, n. 2-3, p. 253-270

PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C.; BOCK, C. 2004. Oxygen limited thermal tolerance in fish?: Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v. 141, n. 3, p. 243-260

PRODOCIMO, V.; SOUZA, C. F.; PESSINI, C.; FERNANDES, L. C.; FREIRE, C. A. 2008. Metabolie substrates are not mobilized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon short-term salinity reduction. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, n. 4, p. 613-620

RADENAC, G.; COTEUR, G.; DANIS, B.; DUBOIS, P.; WARNAU, M. 2004. Measurement of EROD Activity: Caution on Spectral Properties of Standards Used. *Marine Biotechnology*, v. 6, n. 4, p. 307-311

RAGA, G.; PICHLER, H. A.; ZALESKI, T.; DA SILVA, F. B. V.; MACHADO, C.; RODRIGUES, E.; KAWALL, H. G.; RIOS, F. S.; DONATTI, L. 2015. Ecological and physiological aspects of the antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula. *Environmental Biology of Fishes*,

REGOLI, F.; PRINCIPATO, G. B.; BERTOLI, E.; NIGRO, M.; ORLANDO, E. 1997. Biochemical characterization of the antioxidant system in the scallop *Adamussium colbecki*, a sentinel organism for monitoring the Antarctic environment. *Polar Biology***,** v. 17, n. 3, p. 251-258

RICE, C. D.; ROSZELL, L. E. 1998. Tributyltin modulates 3,3′,4,4′,5-pentachlorobiphenyl (PCB-126)-induced hepatic CYP1A activity in channel catfish, Ictalurus punctatus. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A***,** v. 55, n. 3, p. 197-212

ROBINSON, E.; DAVISON, W. 2008a. Antarctic fish can survive prolonged exposure to elevated temperatures. *Journal of Fish Biology***,** v. 73, n. 7, p. 1676-1689

ROBINSON, E.; DAVISON, W. 2008b. The Antarctic notothenioid fish *Pagothenia borchgrevinki* is thermally flexible: Acclimation changes oxygen consumption. *Polar Biology***,** v. 31, n. 3, p. 317-326

RODRIGUES, E.; MEDEIROS, A.; ROSA, R.; BACILA, M. 1999. Carbohydrate metabolism in fish erythrocytes: blood glucose compartmentalization. *Archives of Veterinary Science***,** v. 4, n. 1, p. 99-102

RODRIGUES, E.; ROSA, R.; FUKUCHI, M.; NUMANAMI, H.; BACILA, M. 1994. The effect of temperature on the kinetic properties of phosphaofructokinase and hexokinase from the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. *Proceeding NIPR Symposium Polar Biology***,** v. 7, p. 110-117

RODRIGUES, E.; SANTOS, M. R. S.; RODRIGUES JÚNIOR, E.; GANNABATHULA, S. V.; LAVRADO, H. P. 2009. Arginine metabolism of the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip, 1831): an ecophysiological approach. *Polar Biology***,** v. 32(5), p. 691-712

RODRIGUES, E.; SREE VANI, G.; LAVRADO, H. P. 2007. Nitrogen metabolism of the Antarctic Bivalve *Laternula elliptica* (King & Broderip) and its potential use as biomarker. *Oecologia Brasiliensis***,** v. 11, n. 1, p. 37 - 49

RODRIGUES, E.; SUDA, C. N. K.; RODRIGUES JR, E.; DE OLIVEIRA, M. F.; DOS SANTOS CARVALHO, C.; VANI, G. S. 2011. Antarctic fish metabolic responses as potential biomarkers of environmental impact. *Oecologia Australis***,** v. 15, n. 1, p. 124-149

RODRIGUES JR, E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; SUDA, C. N. K.; CARVALHO, C. S.; DONATTI, L.; LAVRADO, H. P.; RODRIGUES, E. 2013. Interaction of warm acclimation, low salinity, and trophic fluoride on plasmatic constituents of the Antarctic fish Notothenia rossii Richardson, 1844. *Fish Physiology and Biochemistry***,** v. 39, n. 6, p. 1591-1601

ROSS, R. M.; QUETIN, L. B. 1986. How productive are antarctic krill. *Bioscience***,** v. 36, n. 4, p. 264-269

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

SANDS, M.; NICOL, S.; MCMINN, A. 1998. Fluoride in Antarctic marine crustaceans. *Marine Biology***,** v. 132, n. 4, p. 591-598

SANGIAO-ALVARELLOS, S.; ARJONA, F. J.; MARTÍN DEL RÍO, M. P.; MÍGUEZ, J. M.; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. 2005. Time course of osmoregulatory and metabolic changes during osmotic acclimation in *Sparus auratus*. *Journal of Experimental Biology***,** v. 208, n. 22, p. 4291-4304

SANGIAO-ALVARELLOS, S.; POLAKOF, S.; ARJONA, F. J.; KLESZCZYNSKA, A.; MARTÌN DEL RÌO, M. P.; MÌGUEZ, J. S. M.; SOENGAS, J. L.; MANCERA, J. M. 2006. Osmoregulatory and metabolic changes in the gilthead sea bream Sparus auratus after arginine vasotocin (AVT) treatment. *General and Comparative Endocrinology***,** v. 148, n. 3, p. 348-358

SCAR. Scientific Committee on Antarctic Research. 2013. Acesso em: 15 agosto 2013.

SCHOFIELD, O.; DUCKLOW, H. W.; MARTINSON, D. G.; MEREDITH, M. P.; MOLINE, M. A.; FRASER, W. R. 2010. How do polar marine ecosystems respond to rapid climate change? *Science***,** v. 328, n. 5985, p. 1520-1523

SCHULTE, P. M. 2014. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *Journal of Experimental Biology***,** v. 217, n. 1, p. 23-34

SHARMA, R.; TSUCHIYA, M.; BARTLETT, J. D. 2008. Flouride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. *Environmental Health Perspectives***,** v. 116, n. 9, p. 1142-1146

SIDELL, B. D.; CROCKETT, E. L.; DRIEDZIC, W. R. 1995. Antarctic fish tissues preferentially catabolize monoenoic fatty acids. *Journal of Experimental Zoology***,** v. 271, n. 2, p. 73-81

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

SIGLER, W. F.; NEUHOLD, J. M. 1972. Fluoride intoxication in fish: a review. *Journal of Wildlife Diseases***,** v. 8, n. 3, p. 252-254

SKORA, K. E.; NEYELOV, A. V. 1992. Fish of Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, Antarctica). *Polar Biology***,** v. 12, n. 3-4, p. 469-476

SMOLDERS, R.; BERVOETS, L.; DE COEN, W.; BLUST, R. 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: Linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environmental Pollution***,** v. 129, n. 1, p. 99-112

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

STARK, J. S.; KIM, S. L.; OLIVER, J. S. 2014. Anthropogenic disturbance and biodiversity of marine benthic communities in Antarctica: A regional comparison. *PLoS ONE***,** v. 9, n. 6, p. e98802

STROBEL, A.; BENNECKE, S.; LEO, E.; MINTENBECK, K.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. 2012. Metabolic shifts in the Antarctic fish *Notothenia rossii* in response to rising temperature and PCO2. *Frontiers in Zoology***,** v. 9, n. 1, p. 28

STROBEL, A.; GRAEVE, M.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. 2013. Mitochondrial acclimation capacities to ocean warming and acidification are limited in the Antarctic nototheniid fish, *Notothenia rossii* and *Lepidonotothen squamifrons*. *PLoS ONE***,** v. 8, n. 7, p. e68865

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H. O.; MARK, F. C. 2013. Elevated temperature and pco2 shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology***,** v. 166, n. 1, p. 48-57

STURVE, J.; ALMROTH, B. C.; FÖRLIN, L. 2008. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety***,** v. 70, n. 3, p. 446-452

TARASENKO, S.; GILBERT, N. 2009. **Wastewater treatment in Antarctica**. 34

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. 2005. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? *Journal of the Marine Biological Association of the UK***,** v. 85, n. 3, p. 603-611

TIBBLIN, P.; KOCH-SCHMIDT, P.; LARSSON, P.; STENROTH, P. 2011. Effects of salinity on growth and mortality of migratory and resident forms of *Eurasian perch* in the Baltic Sea. *Ecology of Freshwater Fish*, p. no-no

TIN, T.; FLEMING, Z. L.; HUGHES, K. A.; AINLEY, D. G.; CONVEY, P.; MORENO, C. A.; PFEIFFER, S.; SCOTT, J.; SNAPE, I. 2009. Impacts of local human activities on the Antarctic environment. *Antarctic Science***,** v. 21, n. 1, p. 3-33

TINTOS, A.; GESTO, M.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L. 2008. β-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene treatment affect liver intermediary

metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety***,** v. 69, n. 2, p. 180-186

TORRES, J. J.; GRIGSBY, M. D.; ELIZABETH CLARKE, M. 2012. Aerobic and anaerobic metabolism in oxygen minimum layer fishes: The role of alcohol dehydrogenase. *Journal of Experimental Biology***,** v. 215, n. 11, p. 1905-1914

TORRES, J. J.; SOMERO, G. N. 1988a. Metabolism, enzymic activities and cold adaptation in Antarctic mesopelagic fishes. *Marine Biology***,** v. 98, n. 2, p. 169-180

TORRES, J. J.; SOMERO, G. N. 1988b. Vertical distribution and metabolism in Antarctic mesopelagic fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology***,** v. 90, n. 3, p. 521-528

TSENG, Y.-C.; HWANG, P.-P. 2008. Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology***,** v. 148, n. 4, p. 419-429

TSUI, W. C.; CHEN, J. C.; CHENG, S. Y. 2012. The effects of a sudden salinity change on cortisol, glucose, lactate, and osmolality levels in grouper *Epinephelus malabaricus*. *Fish Physiology and Biochemistry***,** v. 38, n. 5, p. 1323-1329

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

VAL, A. L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology***,** v. 125, n. 4, p. 417-435

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology***,** v. 13, n. 2, p. 57-149

VAN NGAN, P.; GOMES, V.; PASSOS, M.; USSAMI, K.; CAMPOS, D.; ROCHA, A.; PEREIRA, B. 2007. Biomonitoring of the genotoxic potential (micronucleus and erythrocyte nuclear abnormalities assay) of the Admiralty Bay water surrounding the Brazilian Antarctic Research Station “Comandante Ferraz,” King George Island. *Polar Biology***,** v. 30, n. 2, p. 209-217

VANI, T.; SAHARAN, N.; MUKHERJEE, S. C.; RANJAN, R.; KUMAR, R.; BRAHMCHARI, R. K. 2011. Deltamethrin induced alterations of hematological and biochemical parameters in fingerlings of *Catla catla* (Ham.) and their amelioration by dietary supplement of vitamin C. *Pesticide Biochemistry and Physiology***,** v. 101, n. 1, p. 16-20

VARGAS-CHACOFF, L.; MONEVA, F.; OYARZÚN, R.; MARTÍNEZ, D.; MUÑOZ, J. L. P.; BERTRÁN, C.; MANCERA, J. M. 2014. Environmental salinity-modified osmoregulatory response in the sub-Antarctic notothenioid fish Eleginops maclovinus. *Polar Biology*, v. 37, n. 9, p. 1235-1245

VARGAS-CHACOFF, L.; SAAVEDRA, E.; OYARZÚN, R.; MARTÍNEZ-MONTAÑO, E.; PONTIGO, J. P.; YÁÑEZ, A.; RUIZ-JARABO, I.; MANCERA, J. M.; ORTIZ, E.; BERTRÁN, C. 2015. Effects on the metabolism, growth, digestive capacity and osmoregulation of juvenile of Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus* acclimated at different salinities. *Fish Physiology and Biochemistry*,

WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, v. 77, n. 3, p. 591-625

WHITTAMORE, J. M. 2012. Osmoregulation and epithelial water transport: Lessons from the intestine of marine teleost fish. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, v. 182, n. 1, p. 1-39

WHITTAMORE, J. M.; COOPER, C. A.; WILSON, R. W. 2010. HCO_3^- secretion and $CaCO_3$ precipitation play major roles in intestinal water absorption in marine teleost fish in vivo. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 298, n. 4, p. R877-R886

WHYTE, J. J.; JUNG, R. E.; SCHMITT, C. J.; TILLITT, D. E. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 30, n. 4, p. 347-570

WILLIAMS, R. J. P.; FRAUSTO DA SILVA, J. J. R. 2000. The distribution of elements in cells. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 200-202, p. 247-348

WINDISCH, H. S.; KATHÖVER, R.; PÖRTNER, H. O.; FRICKENHAUS, S.; LUCASSEN, M. 2011. Thermal acclimation in antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 301, n. 5, p. R1453-R1466

WRIGHT, P. A.; CAMPBELL, A.; MORGAN, R. L.; ROSENBERGER, A. G.; MURRAY, B. W. 2004. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: Expression of arginase Type I and II genes in rainbow trout: Influence of fasting on liver enzyme activity and mRNA levels in juveniles. *Journal of Experimental Biology*, v. 207, n. 12, p. 2033-2042

WU, G.; MORRIS, S. M., JR. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, v. 336, p. 1-17

XIE, Z.; SUN, L. 2003. Fluoride content in bones of Adelie penguins and environmental media in Antarctica. *Environmental Geochemistry and Health*, v. 25, n. 4, p. 483-490

YIN, X.; CHEN, L.; SUN, L.; WANG, M.; LUO, H.; RUAN, D.; WANG, Y.; WANG, Z. 2010. Why do penguins not develop skeletal fluorosis? *Fluoride***,** v. 43, n. 2, p. 108-118

ZHANG, Y.; HUANG, D.; ZHAO, D.; LONG, J.; SONG, G.; LI, A. 2007. Long-term toxicity effects of cadmium and lead on *Bufo raddei* tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology***,** v. 79, n. 2, p. 178-183