

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIANA FORGATI



**RESPOSTAS METABÓLICAS DE BRÂNQUIAS DE PEIXES  
ANTÁRTICOS FRENTE AO ESTRESSE TÉRMICO**

CURITIBA

2016

MARIANA FORGATI

**RESPOSTAS METABÓLICAS DE BRÂNQUIAS DE PEIXES  
ANTÁRTICOS FRENTE AO ESTRESSE TÉRMICO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, no curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Forgati, Mariana

Respostas metabólicas de brânquias de peixes antárticos frente ao estresse térmico. / Mariana Forgati. – Curitiba, 2016.

152 f. : il. ; 30cm.

Orientadora: Lucélia Donatti

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

1. Carboidrato - Metabolismo. 2. Estresse oxidativo. 3. Temperatura. 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.) 574.87

## Programa de Pós-graduação Biologia Celular e Molecular

Departamento de Biologia Celular  
Setor de Ciências Biológicas  
Universidade Federal do Paraná



### PARECER

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

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

Favorável Doath

**Profa. Dra. Tatiana Herrerias**  
Sem vínculo empregatício no momento

Favorável Tatiana H.

**Profa. Dra. Flávia Sant' Anna Rios**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Favorável Flávia Rios

**Profa. Dra. Maritana Mela Prodocimo**  
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Favorável Maritana Mela Prodocimo

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

Favorável Ribeiro

#### Suplentes:

**Prof. Dr. Luis Fernando Fávaro**  
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Após arguir a candidata **Mariana Forqati**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Respostas metabólicas de brânquias de peixes antárticos frente ao estresse térmico", são de parecer favorável à ~~apresentação~~ <sup>defesa</sup> da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutor em Biologia Celular e Molecular. A obtenção do título está 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.

Curitiba, 30 de Novembro de 2016.



Dedico esta Tese ao meu avô Luiz Zanin (*in memoriam*), que, dentre tantos outros ensinamentos, despertou em mim o amor pela vida e me ensinou a pescar

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à minha família, por todo o amor, por estar sempre ao meu lado e terem me dado todo o suporte necessário para que eu pudesse me dedicar integralmente aos estudos e chegar até aqui.

À minha orientadora, professora Lucélia Donatti, por ter acreditado no meu potencial e ter me dado todo o apoio e liberdade para conduzir o trabalho da maneira que acreditava ser a melhor.

Às meninas do laboratório, Tânia, Cíntia, Pri, Gabi, Alana, Thay, Maria Rosa, Letícia e Ângela, por toda a ajuda, seja na bancada, coletas, com as louças, com os cálculos e textos, mas principalmente por terem tornado o ambiente de trabalho muito agradável e divertido!

À minha querida amiga Tânia, companheira de Antártica e irmã que a vida me deu de presente! Sem você essa Tese jamais teria ficado pronta. Obrigada pelo incentivo, pelos conselhos, por aguentar meus desabafos e pela companhia, sempre leve e descontraída. Obrigada também pela ajuda com as análises estatísticas e com a análise e discussão dos dados!

Às minhas amigas Fran e Banana por todo o apoio e amizade. Tenho um carinho enorme por vocês, que estarão sempre em meus pensamentos e no meu coração!

Ao Dyener, essa surpresa boa que chegou só para somar!! Obrigada pelo companheirismo e por tudo de bom que sua presença traz para os meus dias!

Às professoras Flavia Sant'Anna Rios e Tatiana Herrerias, por terem aceitado participar do meu exame de qualificação, contribuindo com sugestões bastante pertinentes, que ajudaram na elaboração dessa Tese e de artigos recentemente submetidos.

Aos professores Ciro, Maritana e Francisco, do Departamento de Biologia Celular, pelas avaliações dos relatórios anuais e pelas contribuições e sugestões sempre pertinentes.

À Professora Viviane Prodóscimo, do Departamento de Fisiologia, pela ajuda com o protocolo de determinação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

À Marlene, secretária do Programa de Pós graduação em Biologia Celular e Molecular, por sua solicitude.

Ao Programa Antártico Brasileiro, Marinha do Brasil e Força Aérea Brasileira, por todo apoio logístico durante as coletas, experimentos e transporte entre o Brasil e a Antártica.

À CAPES pela concessão de bolsa.

Ao INCT-APA pelo apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Por fim, agradeço aos componentes da banca examinadora por, primeiramente, aceitarem o convite, e pelas preciosas contribuições para a correção da Tese.

## RESUMO

Os peixes antárticos são considerados animais extremamente estenotérmicos. Porém, estudos têm apontado que algumas espécies são capazes de compensar sua taxa metabólica para lidar com o aquecimento. As brânquias são estruturas multifuncionais e bastante sensíveis a variações térmicas, podendo apresentar alterações compensatórias nos níveis das enzimas glicolíticas e mitocondriais em resposta à elevação térmica. O estresse térmico pode gerar, também, em excesso, espécies reativas de oxigênio, altamente deletérias e capazes de promover estresse oxidativo. Considerando as tendências de aquecimento na região da Península Antártica e com intuito de verificar a plasticidade térmica de duas das espécies mais abundantes da Baía do Almirantado, Ilha do Rei George, foram avaliados os efeitos do estresse térmico de curto prazo (8°C), por 2, 6, 12, 24, 72 e 144 horas, e de longo prazo (4 e 8°C), por 1, 4, 15 e 30 dias, no potencial osmorregulatório, metabolismo de carboidratos e sistema de defesa antioxidante em brânquias de *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*. As alterações observadas foram dependentes da espécie e dos tempos de exposição às temperaturas avaliadas. *N. rossii* apresentou maior tolerância térmica que *N. coriiceps*, já que indivíduos dessa espécie morreram após 6 dias de exposição a 8°C. Com relação ao potencial osmorregulatório, os níveis de atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) aumentaram em resposta à elevação térmica apenas em *N. rossii*, provavelmente devido a um maior *turnover* enzimático ou como consequência de alteração na fluidez de membrana em decorrência da LPO. As consequências de maiores níveis de atividade da NKA seria uma redução da osmolalidade sérica e maior demanda energética pelos órgãos osmorregulatórios, mas que não foi verificada neste estudo. Com o estresse térmico de curto prazo, foi verificada uma situação de anaerobiose nas brânquias de *N. rossii*, através da elevação dos níveis de atividade da lactato desidrogenase (LDH) e de lactato. Porém, o metabolismo aeróbico foi recuperado, com o estresse térmico de longo prazo. Nas brânquias de *N. coriiceps*, o estresse térmico de curto prazo resultou, num primeiro momento, em anaerobiose, seguida por recuperação da aerobiose, juntamente com uma redução dos níveis de glicogênio, o que pode ser consequência de uma maior demanda energética. A longo prazo, a anaerobiose foi, mais uma vez, ativada, o que pode ter comprometido a tolerância térmica desses indivíduos. Nas brânquias de *N. rossii*, mesmo com maiores níveis de antioxidantes, verificou-se um maior índice de lipoperoxidação (LPO) e de proteínas carboniladas com o estresse térmico de curto prazo, provavelmente em resposta ao quadro de hipóxia tecidual. Com o estresse térmico de longo prazo o índice de LPO foi ainda maior, provavelmente devido a uma falha do sistema antioxidante de *N. rossii* em resposta ao estresse térmico de longo prazo. O estresse térmico de curto prazo, nas brânquias de *N. coriiceps*, não resultou em danos oxidativos, provavelmente devido à eficiência de seu sistema de defesa antioxidante. O estresse térmico de longo prazo (4°C), resultou em maior LPO, devido à condição de hipóxia observada nessa situação. Considerando os resultados deste estudo, embora as brânquias de *N. rossii* tenha sofrido com elevado índice de LPO, o que pode ter comprometido o potencial osmorregulatório nessa espécie, *N. rossii* conseguiu ser aclimatada à temperatura de 8°C após exposição de longo prazo, devido, provavelmente, à inibição do metabolismo anaeróbico. *N. coriiceps*, por sua vez, não conseguiu reverter a condição de anaerobiose, sendo essa a causa provável de sua morte.

**Palavras-chaves:** temperatura, metabolismo de carboidratos, estresse oxidativo, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, *Notothenia*, aquecimento.



## ABSTRACT

Antarctic fish are extremely stenothermal animals. However, studies have shown that some species are able to compensate their metabolic rate to deal with the higher costs of living at elevated temperature. The gills are very sensitive to temperature variations and may perform compensatory changes in the levels of glycolytic and mitochondrial enzymes. Heat stress can also increase the generation of reactive oxygen species, extremely reactive and therefore harmful molecules, capable of causing oxidative stress. In the latter half of the 20th century, the Antarctic Peninsula was among the fastest warming places on Earth. The thermal plasticity of *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*, Antarctic notothenids very abundant in Admiralty Bay, King George Island, were evaluated by short-term heat stress (8°C) for 2, 6, 12, 24, 72 and 144 hours, and long-term heat stress (4 and 8°C) for 1, 4, 15 and 30 days. The osmoregulatory potential, carbohydrates metabolism and antioxidant defense system were evaluated in the gills of both species. The results showed that heat stress effects were dependent on the species, exposure time and temperature. *N. rossii* presented higher thermal tolerance than *N. coriiceps*, which died after 6 days at 8°C. With regard to the osmoregulatory potential of the gills against heat stress, the levels of activity of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA), increased only in *N. rossii*, probably due to greater enzyme turnover, or as a consequence of altered membrane fluidity due to LPO. The consequences of increased NKA activity levels would be serum osmolality decrease and increased energy demand for osmoregulatory organs, but this was not verified in this study. The short-term thermal stress resulted in anaerobiosis on the gills of *N. rossii*; however the aerobic metabolism was recovered with the long-term thermal stress. In *N. coriiceps*, the short-term heat stress resulted, at first, in anaerobiosis, and the energy demand, characterized by glycogen consumption, increased; aerobic metabolism was activated within 144 h. In the long term, anaerobiosis was activated, which may have compromised the thermal tolerance of *N. coriiceps*. Even with the upregulation of antioxidant defence, the short-term heat stress caused increased lipid peroxidation (LPO) and protein carbonylation, probably due to tissue hypoxia in *N. rossii* gills. After long-term heat stress, the LPO levels were even higher, probably due to an inhibition of the antioxidant system of *N. rossii*. In *N. coriiceps*, the short-term heat stress did not result in oxidative damage by the efficiency of its antioxidant defense system. However, the long-term heat stress (4°C), resulted in higher LPO levels, probably due to tissue hypoxia. Although the gills of *N. rossii* showed a high LPO index, which could have compromised the osmoregulatory potential of this species, it is likely that *N. rossii* has been acclimated to 8°C after long-term heat stress, probably due to anaerobic metabolism inhibition. *N. coriiceps*, on the other hand, could not reverse the condition of anaerobiosis, which is the probable cause of the death.

**Key-words:** temperature, carbohydrate metabolism, oxidative stress, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, *Notothenia*, warming.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1.	O ESTRESSE EM PEIXES.....	13
1.2.	PEIXES ANTÁRTICOS E SUAS RESPOSTAS AO ESTRESSE TÉRMICO ..	14
1.3.	BRÂNQUIAS E O ESTRESSE TÉRMICO .....	17
1.4.	ALTERAÇÕES OSMORREGULATÓRIAS RESULTANTES DE ESTRESSE TÉRMICO .....	20
1.5.	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS BRANQUIAL.....	22
1.6.	ESTRESSE OXIDATIVO DECORRENTE DE ESTRESSE TÉRMICO.....	27
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	38
4.1	COLETA DOS PEIXES.....	38
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DAS BRÂNQUIAS.....	39
4.2.1	Experimento I - Estresse térmico de longo prazo .....	39
4.2.2	Experimento II - Estresse térmico de curto prazo .....	40
4.3	MÉTODOS ANALÍTICOS .....	41
4.3.1	Ensaio da atividade das ATPases .....	41
4.3.2	Determinação dos níveis de atividade das enzimas do metabolismo energético .....	42

4.3.3	Determinação dos intermediários metabólicos .....	43
4.3.4	Determinação dos níveis de atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante .....	43
4.3.5	Determinação de glutathiona reduzida, lipoperoxidação e carbonilação de proteínas.....	45
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
5.1	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO POTENCIAL OSMORREGULATÓRIO BRANQUIAL .....	47
5.2	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS .....	48
5.3	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS .....	50
5.4	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO NOS NÍVEIS DE INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS BRANQUIAIS .....	54
5.5	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE.....	56
5.6	NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS E DE LIPOPEROXIDAÇÃO APÓS ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO.....	58
5.7	NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE APÓS ESTRESSE TÉRMICOS DE CURTO PRAZO.....	60
5.8	NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS E DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO APÓS ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO .....	63
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>66</b>
6.1	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO POTENCIAL OSMORREGULATÓRIO BRANQUIAL .....	66

6.2 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS BRANQUIAL.....	69
6.3 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE .....	78
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>92</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO 1 - PROTOCOLO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS.....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO 2 - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA <math>Na^+/K^+</math>-ATPASE (NKA).....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO 3 - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS AVALIADAS .....</b>	<b>120</b>
<b>ANEXO 4 - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA HEXOQUINASE (HK) .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO 5 - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOQUINASE (PFK).....</b>	<b>123</b>
<b>ANEXO 6 - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE (CS) .....</b>	<b>125</b>
<b>ANEXO 7 - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA MALATO DESIDROGENASE (MDH).....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO 8 - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH).....</b>	<b>129</b>
<b>ANEXO 9 - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH).....</b>	<b>131</b>

<b>ANEXO 10</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE GLICOGÊNIO.....	133
<b>ANEXO 11</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DE LACTATO.....	135
<b>ANEXO 12</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DE PIRUVATO .....	137
<b>ANEXO 13</b> - PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DOS COMPONENTES DO SISTEMA DE DEFESAS ANTIOXIDANTES E DANOS OXIDATIVOS .....	139
<b>ANEXO 14</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) .....	140
<b>ANEXO 15</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) .....	142
<b>ANEXO 16</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) .....	143
<b>ANEXO 17</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR).....	144
<b>ANEXO 18</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx).....	145
<b>ANEXO 19</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE TIOIS NÃO PROTEICOS, INCLUSIVE GLUTATIONA (GSH) ...	147
<b>ANEXO 20</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA) INDICADORES DE LIPOPEROXIDAÇÃO .....	149
<b>ANEXO 21</b> - PROTOCOLO PADRONIZADO PARA A DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PROTEÍNAS CARBONILADAS (PC) .....	151

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O ESTRESSE EM PEIXES

Os peixes estão frequentemente expostos a fatores estressantes em seus ambientes naturais, tais como poluentes, variações físico-químicas como: concentração de gases dissolvidos na água (O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>), pH, turbidez, disponibilidade de alimento e temperatura (IWAMA et al., 1999). Quando submetidos a estas condições ambientais, os peixes precisam manter sua homeostase através de um conjunto complexo de respostas adaptativas denominadas respostas ao estresse (BARTON, 2002; YAMASHITA et al., 2010). Estas visam minimizar os efeitos negativos do estresse (IWAMA et al., 1999; BARTON, 2002) e são subdivididas em primária, secundária e terciária.

A resposta primária ao estresse inicia-se com a percepção do estado alterado das condições ambientais, seguida por uma resposta neuroendócrina/endócrina, que resulta na liberação de hormônios do estresse, catecolaminas e cortisol, na corrente sanguínea (IWAMA et al., 1999; BARTON, 2002; AFONSO et al., 2008).

A resposta secundária é caracterizada por alterações nos níveis de metabólitos e íons plasmáticos e teciduais, alterações hematológicas e síntese das proteínas de choque térmico (*Heat shock proteins* - Hsp). Estes ajustes fisiológicos visam à manutenção da homeostase através de alterações no metabolismo energético, equilíbrio ácido-básico e osmótico, entre outros (IWAMA et al., 1999; BARTON, 2002).

A resposta terciária é mais lenta, pois envolve alterações no comportamento do indivíduo submetido ao estresse, somente ocorrendo se o mesmo não for capaz de ser aclimatado à condição estressante (IWAMA et al., 1999). Dentre estas alterações sistêmicas encontram-se redução na taxa de crescimento, uma menor resistência a patologias, uma redução do sucesso reprodutivo e do desempenho natatório, podendo, inclusive, resultar em morte do animal (IWAMA et al., 1999; BARTON, 2002).

A variação na temperatura pode ser um fator estressante para os organismos ectotérmicos, uma vez que influencia os diferentes níveis de organização biológica desses animais (BASU et al., 2002; LERMEN et al., 2004; CLARKE; FRASER, 2004;

JAYASUNDARA et al., 2013). Estas alterações se iniciam com as taxas de difusão molecular e reações bioquímicas, passa pelo funcionamento de órgãos, sistemas e do organismo como um todo, refletindo nos padrões comportamentais da população (GUDERLEY-ST-PIERRE, 2002). Tem-se observado, em estudos com peixes, que o aumento da temperatura pode resultar em aumento da frequência e débito cardíacos (GOLLOCK et al., 2006), aumento na demanda energética pelos tecidos (GUDERLEY; ST PIERRE 2002), além de alterações no desempenho muscular e nos padrões de locomoção (JOHNSTON; TEMPLE, 2002). Esses resultados podem ser consequência dos efeitos térmicos diretos nas taxas dos processos fisiológicos, ou seja, maior taxa das reações bioquímicas com o aumento da temperatura (SEEBACHER et al., 2005; FRANKLIN et al., 2007). Como a elevação da temperatura pode promover uma resposta ao estresse, resultando em elevação dos níveis séricos de cortisol, além de prejudicar o transporte de oxigênio aos tecidos, algumas dessas respostas são elaboradas visando ao restabelecimento da homeostase (BONGA, 1997; SOKOLOVA et al., 2012).

A faixa de temperatura na qual uma espécie de peixe consegue sobreviver e manter suas funções fisiológicas é dependente dos mecanismos adaptativos que conseguiu selecionar ao longo da evolução (YAMASHITA et al., 2010), sendo que o maior grau de especialização térmica é observado nos animais ectotérmicos polares (SOMERO et al., 1998).

## 1.2 PEIXES ANTÁRTICOS E SUAS RESPOSTAS AO ESTRESSE TÉRMICO

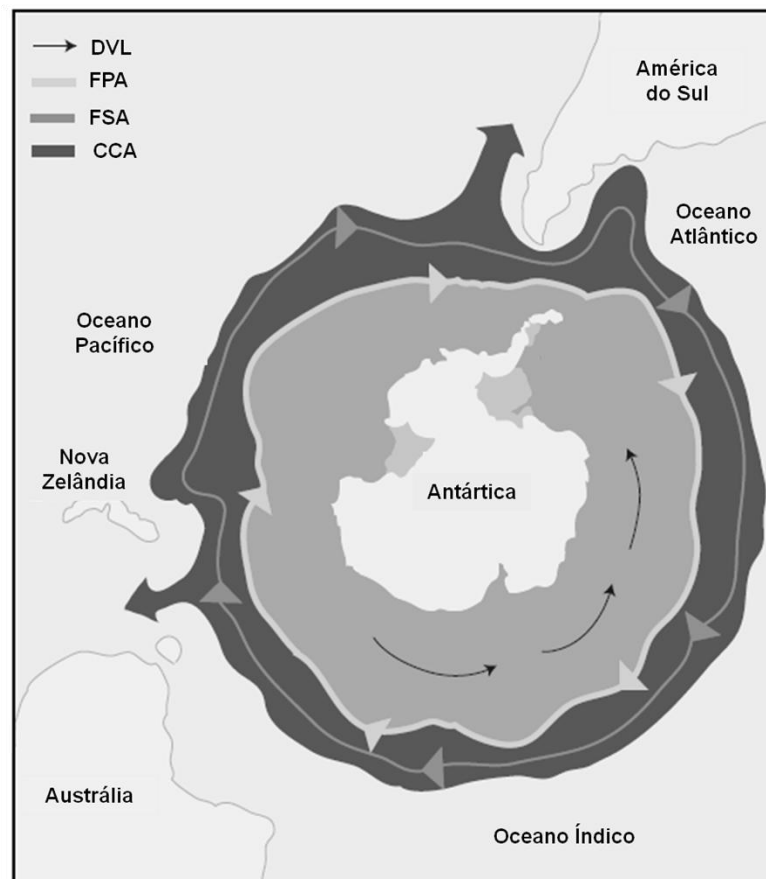
Ao longo dos últimos 55 milhões de anos, os eventos geológicos que isolaram o continente antártico dos demais continentes permitiram o estabelecimento da Corrente Circumpolar Antártica (CCA) (EASTMAN, 1993). Com a CCA, as águas do oceano Austral sofreram um intenso resfriamento, responsável pela redução da temperatura da água em aproximadamente 20°C (BARGELLONI et al., 1998), até os valores atuais, que oscilam entre -1,9 e 2,0°C, nas latitudes mais elevadas (RIGNOT et al., 2013).

Há aproximadamente 25 milhões de anos, com a abertura da passagem do Drake, foi formada uma barreira biológica natural entre o oceano Austral e os demais oceanos (Atlântico, Pacífico e Índico), conhecida como Convergência Antártica ou Frente Polar Antártica (FPA) (PFUHL et al., 2004) (Figura 1). Com esse isolamento,

o potencial de migração através da FPA passou a ser significativamente limitado, sendo que as espécies que permaneceram dentro dos limites Antárticos (ao sul do paralelo 60°S) tiveram que lidar com um ambiente com temperaturas congelantes, presença de gelo na água do mar e extrema sazonalidade na produção primária (BARGELLONI et al., 1998).

Existem evidências de que os peixes Antárticos se desenvolveram de forma independente do clado de ancestrais perciformes e se irradiaram, sob a pressão seletiva de sucessivas glaciações, para os diversos nichos que habitam até os dias de hoje (BARGELLONI et al. 1998). Das 322 espécies de peixes Antárticos que vivem ao sul da FPA, 101 espécies pertencem a uma única subordem Perciforme, a subordem Notothenioidei, e, destas, 97% é endêmica da região Antártica (EASTMAN, 2005).

FIGURA 1 - OCEANO AUSTRAL E O SISTEMA DE CORRENTES OCEÂNICAS QUE CIRCUNDAM O CONTINENTE ANTÁRTICO.



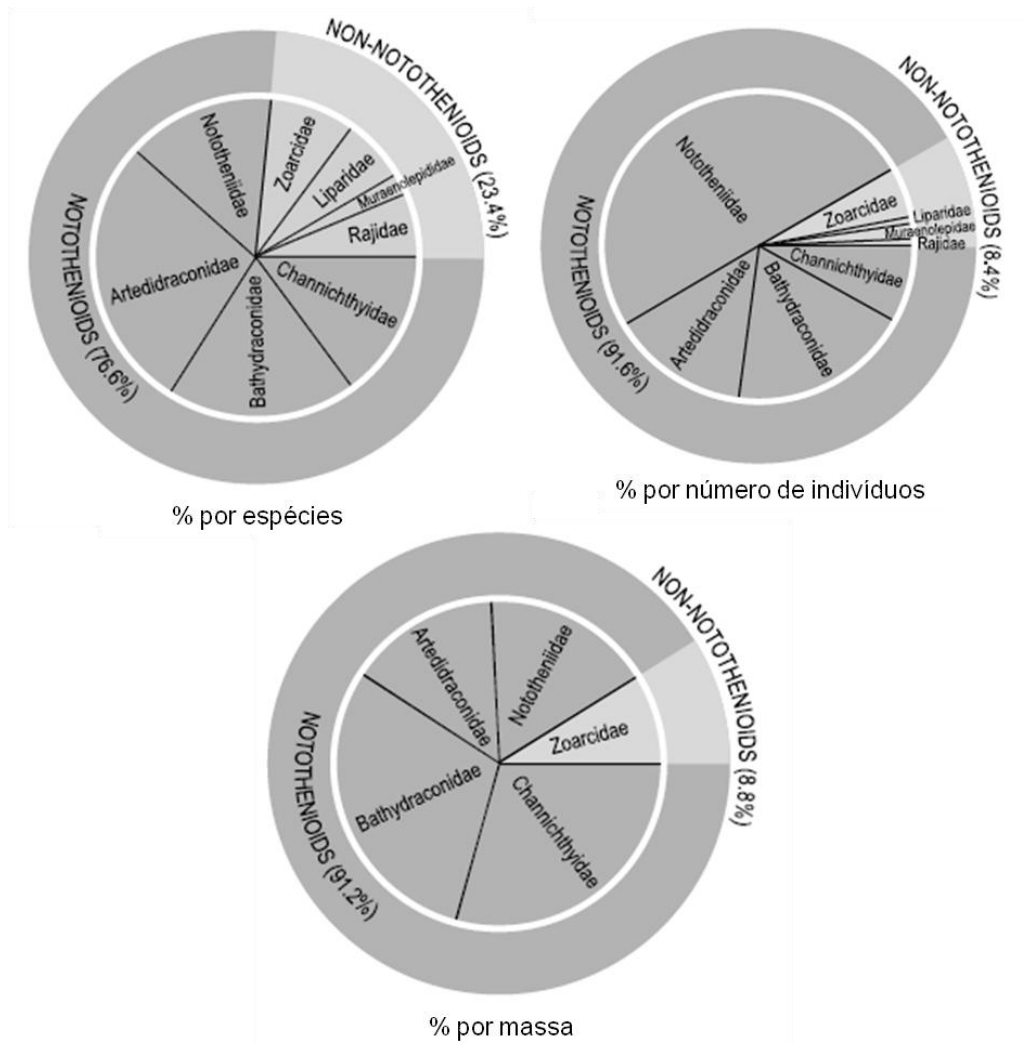
LEGENDA: DVL - Deriva do vento leste; FPA - Frente Polar Antártica; FSA- Frente Sub-Antártica; CCA - Corrente Circumpolar Antártica. FONTE: Adaptado de BEERS; JAYASUNDARA, 2015



As águas da Península Antártica podem ser consideradas um *hotspot* evolutivo, já que a abundância e a biomassa, assim como a diversidade morfológica e ecológica dos peixes nototeniídeos, ofuscam o pequeno número de espécies, em relação a outras regiões do planeta (Figura 2) (EASTMAN, 2005). O domínio dos nototeniídeos na Antártica reflete o sucesso na adaptação destes animais a um ambiente congelante (EASTMAN; EAKIN, 2000), já que são expostos a temperaturas próximas ao equilíbrio térmico entre a água do mar e o gelo marinho (-1,8 °C) (SIDEELL, 2000; CAPASSO et al., 2006). Para lidar com essas temperaturas congelantes, esses animais selecionaram vários mecanismos celulares e fisiológicos, como compensação cardiovascular (O'BRIEN; SIDEELL, 2000), presença de glicoproteínas anticongelantes (DEVRIES, 1983), aumento na concentração de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) (BRODTE et al., 2008; CROCKETT, 2011) e elevada osmolalidade sérica (DOBBS; DEVRIES, 1975; O'GRADY; DEVRIES, 1982). Além disso, por terem evoluído em um ambiente termicamente estável, os nototeniídeos alcançaram um extraordinário grau de estenotermia, apresentando a menor tolerância a variação na temperatura em relação a qualquer outro animal já estudado (SOMERO et al., 1998).

Estudos avaliaram os efeitos do estresse térmico quente de curto e longo prazo em vários parâmetros fisiológicos de peixes antárticos. Por exemplo, a exposição a 4°C por 5 semanas resultou na diminuição da osmolalidade sérica em *Trematomus bernacchii* (GUYNN et al., 2002). A exposição de *Pagothenia borchgrevinki* a 10°C por 10 minutos resultou em aumento do hematócrito (FRANKLIN et al., 1991). Devor et al. (2011) observaram uma maior LPO no tecido cardíaco de *Chaenocephalus aceratus*, *Chionodraco rastrospinosu* e *Lepidonotothen kempfi* após serem submetidos a estresse térmico quente. Em *P. borchgrevinki* exposta a 5 e 8°C por até 12h, Ryan (1995) observou um aumento nos níveis séricos de cortisol e lactato, bem como aumento dos movimentos operculares e na atividade natatória. Após 4 meses de aclimatação a 6°C, o conteúdo de lipídios e carboidratos diminuíram no fígado e músculo de *Pachycara brachycephalum* (BRODTE et al., 2008). Jayasundara e colaboradores (2013) verificaram um aumento da atividade da LDH no tecido muscular e redução da atividade da citrato sintase (CS) no coração de *T. bernacchii*, após exposição a 4,5°C por 14 dias. Entretanto, são escassos os estudos avaliando os efeitos do estresse térmico nas brânquias de peixes antárticos.

FIGURA 2 - DOMINÂNCIA DOS NOTOTENIOIDES EM DIVERSIDADE, ABUNDÂNCIA E BIOMASSA NA PLATAFORMA CONTINENTAL ANTÁRTICA



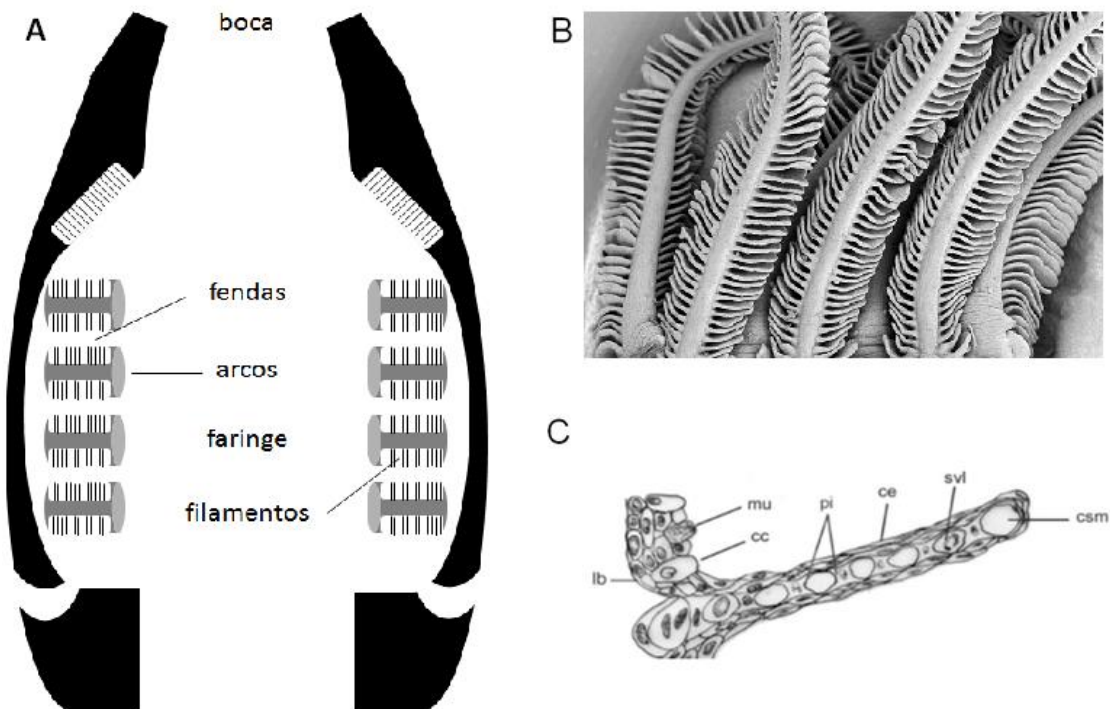
FONTE: Adaptado de EASTMAN, 2005

### 1.3 BRÂNQUIAS E O ESTRESSE TÉRMICO

Em peixes, as brânquias estão geralmente situadas em ambos os lados da faringe e são compostas por arcos, que fornecem um suporte físico cartilaginoso para os delicados filamentos branquiais (Figura 3A). Os filamentos branquiais são achatados dorsoventralmente e sua área superficial é aumentada através de um dobramento, formando as lamelas branquiais (Figura 3B) (WILSON; LAURENT, 2002). As lamelas são revestidas por tecido epitelial do tipo pavimentoso sustentado por células pilares, que definem os espaços por onde circula o sangue (MALLAT,

1985). Outros tipos celulares estão presentes nas brânquias, como células mucosas, células neuroepiteliais e células de cloreto (ionócitos, ou células rica em mitocôndrias - MRCs) (Figura 3C).

FIGURA 3 - MORFOLOGIA DAS BRÂNQUIAS DE PEIXES TELEÓSTEOS



A - Esquema geral das brânquias dos teleósteos. FONTE: adaptada de WILSON; LAURENT, 2002.

B - Eletromicrografia de varredura de filamentos branquiais. Legenda: F - filamentos; L - lamelas.

FONTE: Adaptada de: <http://www.nec-tokin.com>; acesso 17/01/2017.

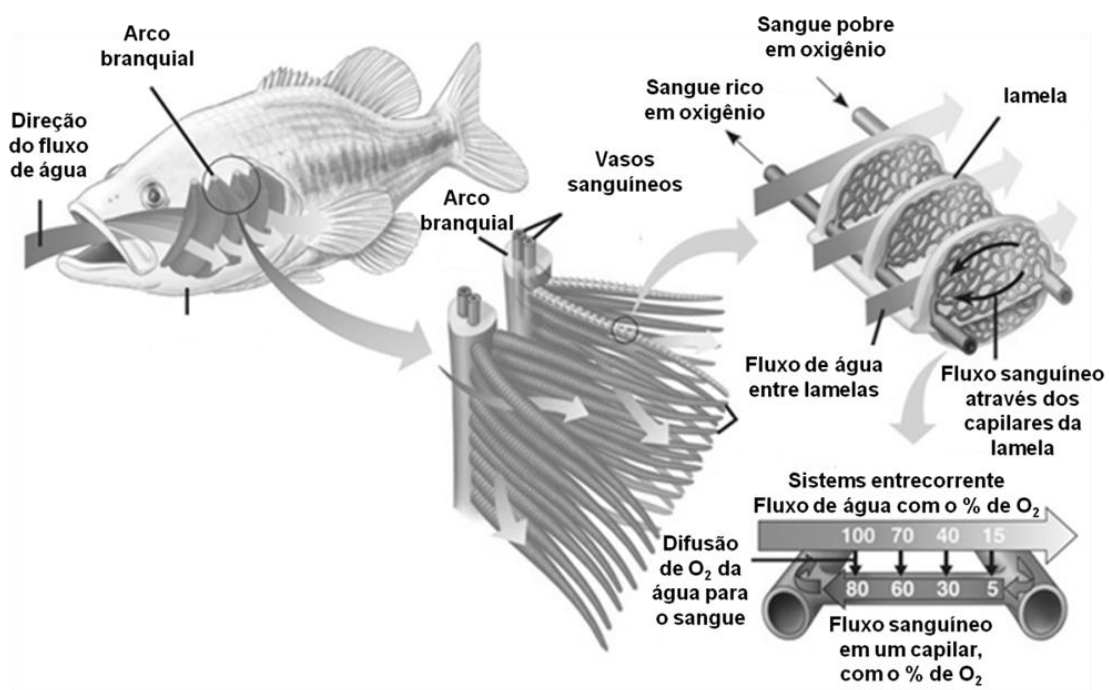
C - Tipos celulares presentes nas brânquias. (lb) lâmina basal; (cc) célula de cloreto; (mu) célula mucosa; (pi) célula pilar; (ce) célula epitelial lamelar; (svl) seio venoso lamelar; (csm) canal sanguíneo marginal. FONTE: adaptada de PAZIO et al., 2012.

A estrutura branquial de peixes é caracterizada por uma ampla área superficial, uma distância difusional bastante curta e um arranjo do tipo contracorrente entre o fluxo sanguíneo e a água (Figura 4). Estas características permitem às brânquias desempenhar uma variedade de funções, como trocas gasosas, regulação osmótica e iônica, além da excreção de compostos nitrogenados (MOMMSEN, 1984).

As brânquias estão em contato íntimo com a água, sendo, portanto, bastante sensíveis às alterações químicas e físicas do meio aquático circundante, tais como variações na temperatura, acidificação, salinidade e presença de contaminantes

(PERRY; LAURENT, 1993; SABER, 2011). Além disso, as brânquias, juntamente com fígado e intestino, são órgãos-alvo do cortisol, um hormônio corticoesteroide, cuja função é atuar no balanço hidromineral e no metabolismo energético, contribuindo com a manutenção da homeostase (MOMMSEN et al., 1999).

FIGURA 4 - FIGURA ESQUEMÁTICA DAS BRÂNQUIAS DE PEIXES: MORFOLOGIA E SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE OXIGÊNIO DO TIPO CONTRACORRENTE



FONTE: adaptada de <http://teacheratsea.wordpress.com/tag/dissolved-oxygen/>. Acesso em: 05/05/2016.

As brânquias apresentam, em condições fisiológicas normais, elevada taxa metabólica, podendo consumir, em algumas espécies, até 20% do total de oxigênio captado pelo peixe apenas para a manutenção do seu próprio metabolismo (HWANG et al., 2011). Esse elevado consumo deve-se principalmente ao processo de regulação iônica desempenhado pelas brânquias (JOHANSEN; PETTERSSON, 1981; MOMMSEN, 1984), graças a atuação de várias enzimas e transportadores, cuja síntese e operação requerem uma grande quantidade de energia (TSENG; HUANG, 2008).

## 1.4 ALTERAÇÕES OSMORREGULATÓRIAS RESULTANTES DE ESTRESSE TÉRMICO

A manutenção da homeostase iônica, ou seja, o equilíbrio entre perda e ganho de água e eletrólitos por difusão, é essencial para o funcionamento adequado dos processos celulares e fisiológicos (EVANS et al., 2005; HWANG; LEE, 2007). Os peixes teleósteos possuem mecanismos osmoregulatórios eficientes, sendo, portanto, denominados animais osmoreguladores (KÜLTZ, 2013).

Enquanto a osmolalidade média da água do mar apresenta valores próximos a  $1000 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (~35 ppt), os peixes teleósteos marinhos apresentam osmolalidade sérica entre 370 e  $480 \text{ mOsm} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{H}_2\text{O}$  (~10 ppt), ou seja, são osmorreguladores hiposmóticos (MARSHAL; GROSELL, 2005). Esses animais possuem a tendência de perder água passivamente por osmose, através da superfície do corpo e das brânquias. Essa desidratação é contrabalanceada pela intensa ingestão de água, que é absorvida no intestino. O excesso de íons divalentes,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$ , por exemplo, que são absorvidos juntamente com a água do mar, é secretado na urina altamente concentrada (DOBBS; DEVRIES, 1975). Por sua vez, os íons monovalentes (principalmente  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ), que penetram no corpo por difusão, são eliminados ativamente pelas células de cloreto, ou células ricas em mitocôndrias (*mitochondrial rich cells*, ou MRCs), localizadas nas brânquias (MCCORMICK, 1995).

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase (NKA) é uma proteína transmembrana, cuja principal função é o estabelecimento de gradientes eletroquímicos, através do bombeamento ativo, ou seja, com gasto de ATP, de  $2\text{K}^+$  para o meio intracelular e  $3\text{Na}^+$  para o meio extracelular (EVANS et al., 2005). A célula utiliza esse gradiente eletroquímico para desempenhar inúmeras funções, inclusive a secreção de NaCl nas MRCs de teleósteos marinhos (MCCORMICK, 1995).

O efluxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  ocorre através da ação combinada da NKA e do cotransportador  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$  (NKCC), situados na membrana basolateral, e de um canal de cloreto, situado na membrana apical das MRCs (KARNAKY et al., 1986). Os canais NKCC permitem o influxo do excesso de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  do plasma para o interior das MRCs, a favor do gradiente. O excesso de  $\text{Cl}^-$  extravasa para a água do mar, via canais de cloreto. O potencial elétrico transepitelial, com o plasma positivo

em relação à água do mar, é responsável pela extrusão do  $\text{Na}^+$  via paracelular, através das junções de oclusão entre as MRCs e as células acessórias (Figura 5).

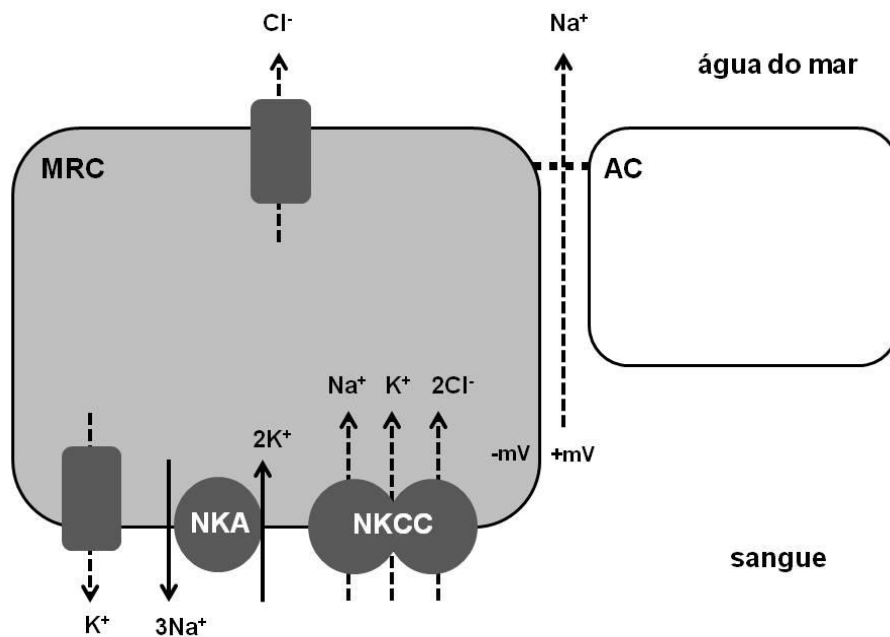
Vários estudos têm relatado os efeitos do estresse osmótico na atividade da NKA (AVELLA et al., 1993; LIN et al., 2003; SAOUD et al., 2007; TANG; LEE, 2007; KANG et al., 2008). Entretanto, além da variação na salinidade, a temperatura da água influencia a atividade da NKA em brânquias e rins de peixes teleóstos, conforme tem demonstrado alguns estudos, com peixes temperados marinhos e de água doce. Por exemplo, em *Savelinus alpinus*, houve uma redução da atividade da NKA em peixes aclimatados ao frio (5°C, em relação aos aclimatados a 10 e 12°C; STAURNES, 1993). ROBERTSON e HAZEL (1995) observaram aumento da NKA em *Oncorhynchus mykiss* aclimatados a 20°C, em relação aos aclimatados a 5°C.

Conforme visto anteriormente, os peixes antárticos apresentam várias características adaptativas para lidar com as temperaturas congelantes do oceano Austral. Dentre elas são destacadas a presença de glicoproteínas anticongelantes e elevada osmolalidade (aproximadamente 600 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ ), devido a uma maior concentração sérica de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ , que garantem uma menor temperatura de congelamento dos fluidos corporais desses animais (-2,1°C) (SOMERO; DEVRIES, 1967; DOBBS; DEVRIES, 1975)

Estudos com peixes antárticos tem avaliado a capacidade osmoregulatória após aclimatação a elevadas temperaturas verificando respostas diversas, sendo essas, geralmente diretamente proporcionais ao tempo de exposição e à temperatura testada. Por exemplo, a aclimatação de *Trematomus bernacchii* a 4°C durante 4 semanas resultou em redução da osmolalidade sérica a valores semelhantes aos de peixes temperados devido a um aumento da taxa de ingestão de água e aumento dos níveis de atividade da NKA (GONZALEZ-CABRERA et al., 1995; GUYNN et al., 2002).

Dessa forma, o estresse térmico, assim como o estresse salino, pode promover alterações no potencial osmorregulatório e, conseqüentemente, uma maior demanda energética pelas brânquias. Por exemplo, *Sparus auratus*, quando aclimatado de 38 ppt-55 ppt, apresentou maiores níveis séricos de glicose e lactato, maior atividade da HK branquial e glicogênio fosforilase (GP) hepática, indicando uma maior capacidade de exportação de glicose pelo fígado e maior captação de glicose pelas brânquias (SANGIAO-ALVARELLOS et al., 2003, 2005).

FIGURA 5 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE EFLUXO DE NaCl NAS BRÂNQUIAS DE PEIXES TELEÓSTEOS MARINHOS



NOTA:  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  plasmáticos entram na célula via transportador NKCC, localizado na membrana basolateral das células ricas em mitocôndrias (MRCs);  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  retornam ao plasma via atividade da  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  - ATPase e canais de  $\text{K}^+$ , respectivamente; o efluxo de  $\text{Cl}^-$  ocorre através dos canais de  $\text{Cl}^-$  localizados na membrana apical da MRC. O potencial elétrico transepitelial, o plasma positivo em relação à água do mar, direciona o efluxo de  $\text{Na}^+$  via transporte paracelular entre MRC e célula acessória (AC) FONTE: adaptado de EVANS et al., 2005.

### 1.5 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS BRANQUIAL

As brânquias apresentam, em condições fisiológicas normais, elevada taxa metabólica (MOMMSEN, 1984), que aumenta como consequência direta do aumento da temperatura (PECK, 2002), ou de uma maior mobilização energética promovida pelo cortisol, para recuperar sua homeostase após o estresse térmico (SOKOLOVA et al., 2012). Essa mobilização energética pode ser verificada pela hiperglicemia, depleção das reservas teciduais de glicogênio, lipólise e inibição da síntese proteica (BONGA, 1997; MOMMSEN et al., 1999), bem como por alterações na atividade de enzimas do metabolismo energético. Por exemplo, nas brânquias do peixe marinho dourada (*Sparus aurata*) foi verificada uma redução na atividade da enzima hexoquinas (HK), reduzindo a capacidade desse órgão em utilizar glicose; uma diminuição da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH),

diminuindo a capacidade da via das pentose-fosfato, e aumento da atividade da piruvato quinase (PK), aumentando o potencial glicolítico nesse órgão (LAIZ-CARRIÓN et al., 2002). O aumento do cortisol também mostrou-se relacionado com um aumento na atividade da lactato desidrogenase (LDH) nas brânquias da enguia-japonesa (*Anguilla japonica*) (WONG; CHAN, 2001), demonstrando que esse glicocorticoide pode promover alterações metabólicas passíveis de serem avaliadas através da atividade de enzimas específicas do metabolismo energético.

Metabolismo pode ser definido como o conjunto das reações bioquímicas que ocorrem nos organismos vivos, que podem ser subdivididas em reações de degradação (vias catabólicas) e de síntese (vias anabólicas) (VOET; VOET, 1995). As reações do catabolismo são geralmente exotérmicas, ou seja, são acompanhadas de liberação de energia que pode ser utilizada nas reações anabólicas ou nos processos celulares (VOET; VOET, 1995). O metabolismo tem a função de proporcionar a energia necessária para os processos vitais, e atender ao desenvolvimento e crescimento do organismo (SEIXAS FILHO, 2004).

As reações bioquímicas do metabolismo normalmente necessitam de catalisadores, ou seja, moléculas que aceleram as reações, sendo esse papel desempenhado pelas enzimas (RUIZ-AMIL et al., 1987). No interior das células, muitas das transformações moleculares ocorrem em várias etapas, sendo que o produto de uma reação torna-se o substrato da reação seguinte, num processo conhecido como via metabólica (VOET; VOET, 1995).

O metabolismo energético de peixes é semelhante ao de mamíferos e aves, apresentando diferenças no que diz respeito à manutenção da temperatura corporal, sendo que a maioria das espécies de peixes não consome energia para manter sua temperatura diferente da do ambiente, ou seja, são animais ectotérmicos. Outra diferença diz respeito ao gasto energético com a excreção de resíduos nitrogenados, que, nos peixes, ocorre com menor gasto energético que nos animais terrestres homeotérmicos (SMITH, 1980).

A energia é extraída de estruturas químicas complexas de moléculas orgânicas que são ingeridas durante a alimentação, na forma de lipídios, carboidratos e proteínas. Os peixes telósteos marinhos apresentam uma limitada capacidade de mobilização de carboidratos, já que sua dieta é composta principalmente por proteínas e lipídios (COWEY; WALTON, 19894; MOON; FOSTER, 1995). Entretanto, a glicemia precisa ser mantida, para garantir o



suprimento de glicose adequado aos tecidos e células que dependem da glicose, como o cérebro, gônadas, brânquias e eritrócitos (NELSON; COX, 2011; POLAKOF et al., 2012).

A manutenção da glicemia em peixes ocorre, principalmente através da glicogenólise (MOMMSEN; PLISETSKAYA, 1991; COLLINS; ANDERSON, 1997), sendo que ambas as vias ocorrem principalmente no fígado (COLLINS; ANDERSON, 1997). Uma vez atingindo os tecidos-alvo, a glicose é captada, via transportador GLUT, podendo ser oxidada, produzindo energia na forma de ATP, em um processo que se inicia no citosol da célula, através da glicólise. Na presença de  $O_2$ , o produto final da glicólise, o piruvato, é direcionado à mitocôndria, onde é convertido a acetil CoA, que, por sua vez, é completamente oxidada a  $CO_2$  e  $H_2O$ , numa sequência de reações que compõem o ciclo do ácido cítrico. Os elétrons liberados nessa sequência de reações são direcionados à cadeia respiratória, situadas na membrana mitocondrial interna, para a produção aeróbica de ATP (NELSON; COX, 2011).

É necessário que haja um equilíbrio entre o estoque e a produção de glicose atendendo às necessidades energéticas ou de biossíntese do organismo, sem que haja perda de energia. Esse equilíbrio é estabelecido a partir de enzimas-chave, que atuam ativando ou inibindo o fluxo da glicólise, glicogenólise, lipogênese e gliconeogênese (PILKIS; GRANNER, 1992). A ativação ou inibição da atividade dessas enzimas podem acontecer em diferentes níveis, como através da modificação da estrutura da proteína (fosforilação, acetilação), da ação de componentes na estrutura da proteína (alosterismo), da localização celular, e, finalmente, através da expressão gênica (POLAKOF et al., 2012).

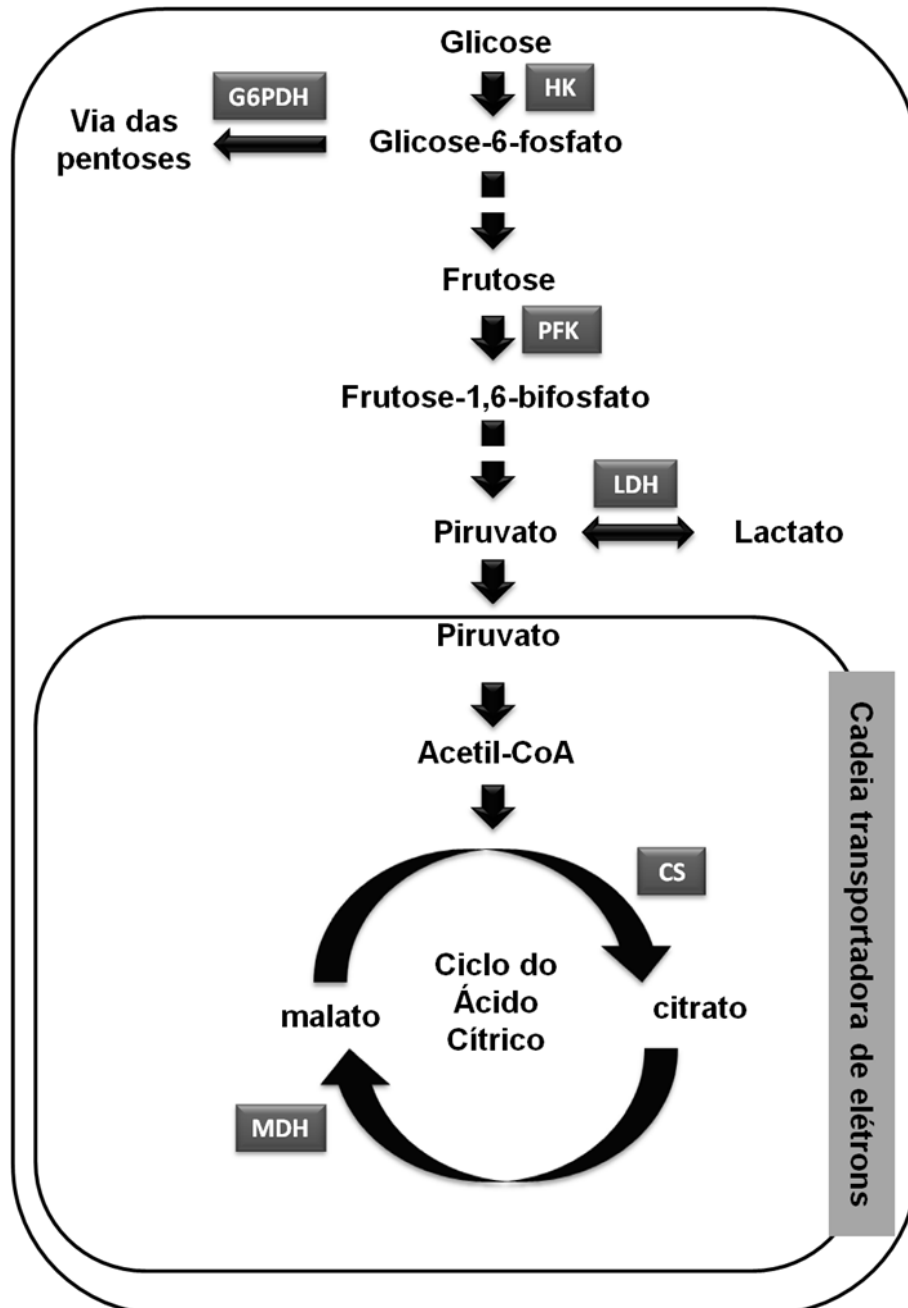
Na glicólise, por exemplo, a enzima hexoquinase (HK) atua introduzindo a glicose nessa via metabólica (CRABTREE; NEWSHOLME, 1972) e a fosfofrutoquinase (PFK), por sua vez, é considerada a enzima que limita o fluxo glicolítico (CRABTREE; NEWSHOLME, 1972). A enzima limitante do ciclo do ácido cítrico é a citrato sintase (CS), situada no interior da mitocôndria e utilizada como indicadora do metabolismo aeróbico (NELSON; COX, 2011), assim como a malato desidrogenase (MDH), também uma enzima mitocondrial que participa do ciclo do ácido cítrico, mas que também localiza-se no citosol, onde atua gerando esqueletos de carbono para a biossíntese de outras moléculas (BASAGLIA, 1989).

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima citoplasmática que catalisa a interconversão do piruvato em lactato. Em muitos tecidos os níveis de atividade dessa enzima são utilizados como marcadores do metabolismo anaeróbico, uma vez que na ausência de  $O_2$ , o piruvato produzido durante a glicólise é convertido em lactato. Entretanto, em brânquias de peixes, a LDH apresenta semelhança eletroforética com a LDH cardíaca, que é consumidora de lactato (WILLISCROFT; TSUYUKI 1970; LIM et al. 1975). Os carbonos do lactato, uma vez acumulados nas brânquias, podem ser direcionados à produção aeróbica de energia, pelo menos durante condições normóxicas, ou, ainda, serem direcionados a vias anabólicas, como a gliconeogênese (MOMMSEN, 1984).

Além das vias de produção de energia, a glicose pode ser utilizada para a biossíntese de outras moléculas. A principal via em que isso ocorre é a via das pentoses fosfato, em que ocorre a produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), que atua como equivalente redutor necessário para a biossíntese de ácidos graxos, e pentose para a íntese de nucleotídeos (NELSON; COX, 2011). Uma enzima-chave dessa via metabólica é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que catalisa a conversão da glicose-6-fosfato em 6-fosfogluconato. Outra via alternativa para a produção de NADPH é o ciclo piruvato/malato, catalisado pela enzima málica (SALWAY, 1994). Na Figura 6 estão representadas as principais vias de oxidação de carboidratos utilizadas pelas brânquias de peixes.

Nos animais ectotérmicos, a exposição a temperaturas diferentes das quais estão adaptados pode promover alterações compensatórias nos níveis das enzimas glicolíticas e mitocondriais (GUDERLEY; BLIER, 1988; VAN DJIK et al., 1999), sendo que a participação relativa das vias metabólicas pode ser alterada de forma significativa (SOMERO et al., 1968). Dessa forma, a avaliação dos níveis de atividade de enzimas-chave do metabolismo energético, bem como da concentração tecidual de intermediários do metabolismo, permite verificar de que forma o estresse térmico influencia os processos de produção de energia e de biossíntese de moléculas.

FIGURA 6 - REAÇÕES-CHAVE DA PRINCIPAL VIA DE OXIDAÇÃO DE CARBOIDRATOS UTILIZADA POR BRÂNQUIAS DE PEIXES



LEGENDA: Em vermelho estão representadas as enzimas-chave. HK - hexoquinase; PFK - fosfofrutoquinase; CS - citrato sintase; MDH - malato desidrogenase; LDH - lactato desidrogenase; G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase. FONTE: adaptado de COX;

Sabe-se que o aumento da temperatura altera vários parâmetros relacionados à fisiologia e morfologia branquial (PERRY; LAURENT, 1993; GONZALEZ-CABRERA et al., 1995; KÜLTZ; SOMERO, 1995; PARIHAR et al., 1997; CABEROY; QUINTIO, 2000; METZ et al., 2003). Entretanto, poucos estudos focaram nas mudanças nas vias de produção de energia em brânquias de peixes, frente ao

estresse térmico. A revisão de literatura aponta apenas um trabalho, publicado em 1969 por Caldwell, que relata maiores atividades das enzimas da cadeia transportadora de elétrons (citocromo oxidase, succinato citocromo-c redutase, NADH citocromo-c redutase) em *Carassius aurata* submetidos a estresse térmico quente (30°C), entre 2 e 4 semanas (CALDWEL, 1969).

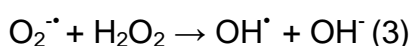
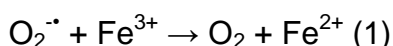
## 1.6 ESTRESSE OXIDATIVO DECORRENTE DE ESTRESSE TÉRMICO

O oxigênio é essencial para a fosforilação oxidativa, o principal processo gerador de ATP para o metabolismo celular. Porém, a molécula de oxigênio pode ser facilmente convertida em espécies reativas de oxigênio (EROs), que são extremamente prejudiciais às células e tecidos (SEMENZA, 2004).

A molécula de oxigênio (O<sub>2</sub>) é um bi-radical, ou seja, contém dois elétrons desemparelhados localizados em diferentes orbitais, e consegue receber apenas um elétron de cada vez, sendo necessárias quatro transferências sucessivas de elétrons para reduzir a molécula de oxigênio a água. Em cada etapa da redução da molécula de oxigênio podem ser formadas as seguintes EROs, ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxila (•OH) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Durante o metabolismo aeróbico das células, são geradas EROs em quantidades relativamente elevadas. Estima-se que 0,1% de todo o oxigênio que entra na mitocôndria seja convertido em EROs (FRIDOVICH, 2004), devido ao extravasamento de elétrons da cadeia respiratória, produzindo principalmente o ânion superóxido (HERMES-LIMA, 2004).

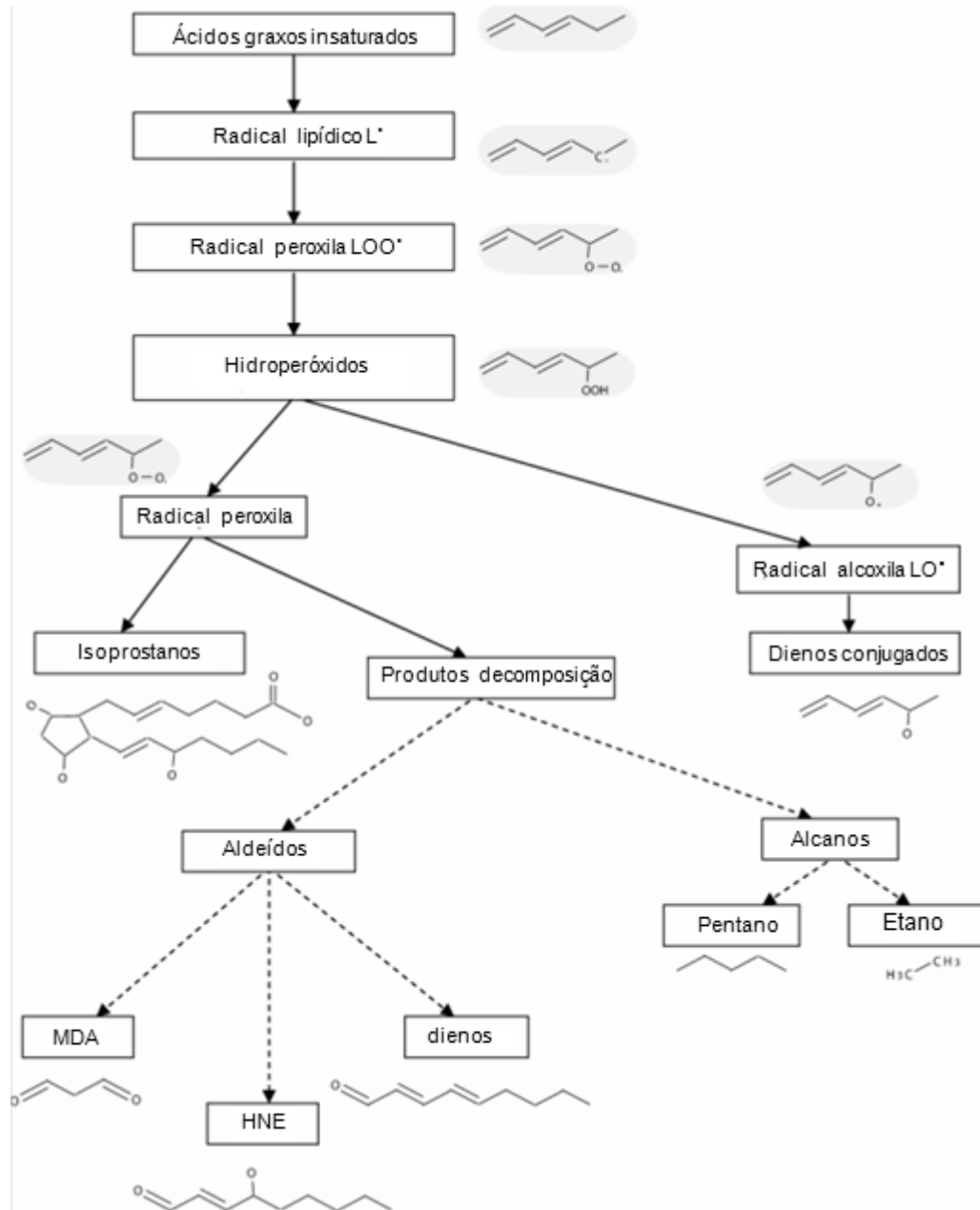
Outra fonte relevante de geração de EROs nos sistemas biológicos é a reação de redução de metais de transição (como ferro e cobre), seguida pelas reações de Fenton (equações 1 e 2) e Haber-Weiss (equação 3), reações sequenciais mas não independentes. Nesse caso, metais de transição, como o ferro (Fe), funcionam como catalisadores convertendo ânion superóxido em radical hidroxila, uma das EROs mais reativas (HEISE, 2005):



O radical hidroxila é capaz reagir com diversas moléculas, entre elas os ácidos graxos insaturados e, então, iniciar uma cascata de reações conhecidas por peroxidação lipídica, ou lipoperoxidação (LPO). Essas reações em cadeia formam intermediários extremamente prejudiciais às células, tais como radicais lipídicos, peróxilas e alcóxilas, além de vários aldeídos, alcanos, isoprostanos e dienos conjugados (Figura 7). Os efeitos da LPO são extremamente deletérios aos fosfolipídios de membranas, principalmente aos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), levando a danos severos nas propriedades das membranas celulares. Dentre os danos oriundos da LPO às membranas podem ser citados a redução da fluidez e a destruição da integridade do sistema de membranas, o que pode resultar em um colapso do gradiente iônico transmembrana, além da inativação de enzimas transmembrana, o que pode comprometer drasticamente o funcionamento celular (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2007). Dessa forma, a LPO é considerada uma das principais causas de injúria e morte celular (HERMES-LIMA, 2004). Os danos peroxidativos aos ácidos graxos insaturados, bem como a quantificação de intermediários dessa cascata de reações, têm sido utilizados com frequência como marcador de estresse oxidativo (AHMAD et al., 2004; REGOLI et al., 2005; et al., 2008; MUELLER et al., 2012).

Outro efeito deletério das EROs é a oxidação de proteínas, que envolve a modificação da cadeia lateral de aminoácidos, clivagem de peptídeos e reações com produtos formados a partir da oxidação de lipídios e carboidratos, como o malondialdeído (MDA), um produto resultante da LPO que é bastante tóxico (HEISE, 2005). A oxidação de proteínas pode levar a alterações funcionais da célula ou aumentar a suscetibilidade a ataques proteolíticos (DRÖGE, 2002). A presença de grupamentos carbonila é utilizada como um marcador de dano oxidativo (DE ZWART et al., 1999).

FIGURA 7 - FIGURA REPRESENTATIVA DAS REAÇÕES EM CADEIA DA LIPOPEROXIDAÇÃO E SEUS PRODUTOS INTERMEDIÁRIOS



FONTE: adaptado de HEISE, 2005

As células selecionaram um sistema de defesa antioxidante bastante eficiente composto por enzimas, como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona-S-transferase e glutatona redutase (GR), e por antioxidantes de baixo peso molecular, como ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenoides e glutatona (GSH) (DOTAN et al., 2004). Esses componentes podem atuar prevenindo a ação oxidante das EROs, antes de causarem alguma lesão, ou neutralizando os danos oxidativos. Por exemplo, o ânion

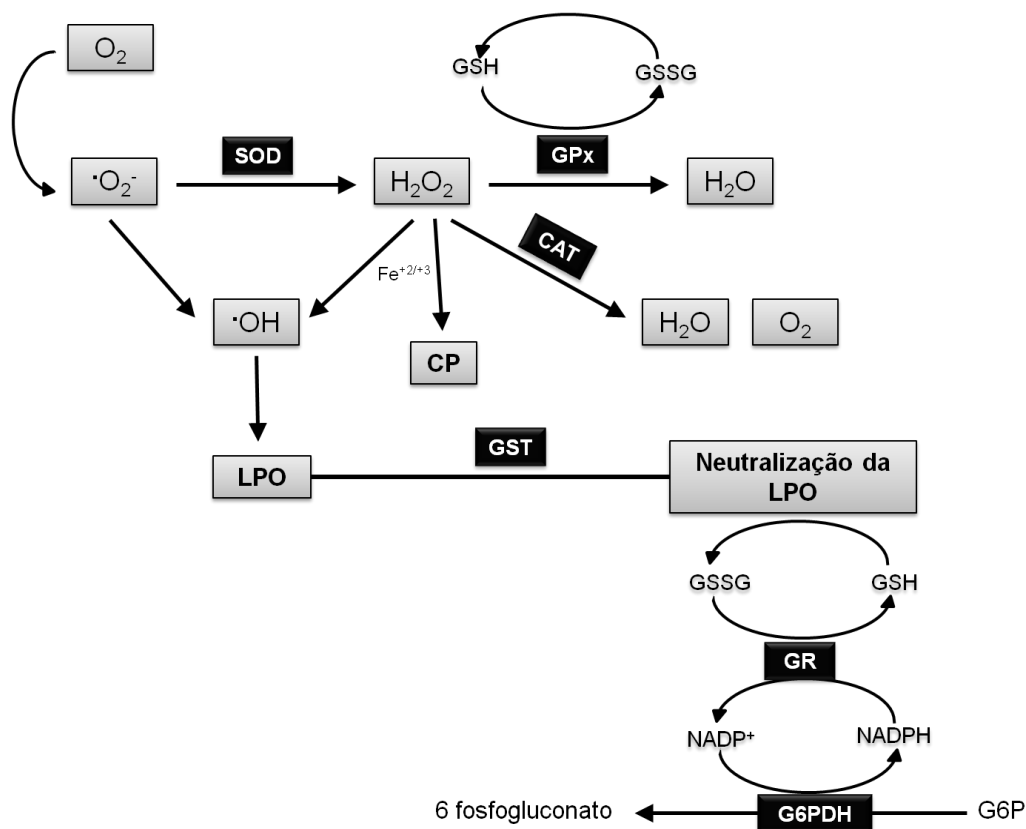
superóxido gerado pode sofrer uma reação de dismutação, catalisada pela SOD, produzindo  $O_2$  e  $H_2O_2$ , que, por sua vez, pode ser decomposto em  $H_2O$  e  $O_2$  pela CAT e GPx. Outra linha de defesa celular atua reparando as lesões causadas pelas EROs. Por exemplo, a glutathione-S-transferase (GST) pode inativar alguns produtos da LPO, tendo um papel remediador (LUSHCHAK et al., 2001; RUDNEVA et al., 2010). A GSH é um tripeptídeo (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteína-L-cisteinil-glicina) que pode atuar como um antioxidante, ou como cofator para a GPx e GST, sendo que, em ambos os casos, é gerada glutathione oxidada, ou dissulfeto (GSSG) (HERMES-LIMA, 2004). A GR é uma enzima que não atua diretamente na remoção de EROs, mas é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH), a partir de GSSG, na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) (Figura 8) (ROVER Jr et al., 2001). A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é uma enzima citosólica essencial para a manutenção do estado redox celular, já que atua mantendo os níveis de NADPH, um importante cofator para a redução da glutathione (CARVALHO; FERNANDES, 2008).

Quando ocorre um desequilíbrio entre a geração de EROs e a atividade do sistema antioxidante o estado redox celular é alterado, podendo causar estresse oxidativo (CROCKETT, 2008; DRÖGE, 2002). A quantificação dos níveis dos componentes do sistema antioxidante e dos danos às macromoléculas auxiliam na identificação do estresse oxidativo em tecidos e órgãos.

Vários agentes estressantes podem provocar o estresse oxidativo em diferentes tecidos e órgãos. A exposição de animais ectotérmicos a elevadas temperaturas acelerando a taxa metabólica estimulando a produção mitocondrial de EROs (ABELE et al., 1998; HEISE et al., 2003; KELLER et al., 2004) gerando, assim, uma resposta antioxidante. Vários estudos demonstraram uma correlação entre estresse térmico e estresse oxidativo em tecidos de peixes. Madeira e colaboradores (2013), por exemplo, verificaram, que após a exposição às respectivas temperaturas críticas máximas (*Critical Thermal Maximum*, CTmax), houve um aumento da atividade da CAT na musculatura dos peixes estuarinos tropicais *Liza ramada* e *Dicentrarchus labrax*, aumento da atividade da GST em *Diplodus vulgaris*, *Diplodus sargus*, *L. ramada* e *D. labrax*, e aumento da LPO *L. ramada*, *D. sargus* e *D. labrax*. Malek e colaboradores (2004), observaram um aumento da atividade da SOD e GPx, mas não da CAT, na musculatura esquelética do peixe zebra (*Danio rerio*) após uma redução da temperatura de 28 para 18°C por

4 semanas. Bagnyukova e colaboradores (2007) verificaram um aumento da atividade da SOD e CAT no tecido hepático de *Perccottus glenii* após um aumento da temperatura de 19 a 32°C. Devor et al. (2011) observaram uma maior LPO em tecido cardíaco de peixes antárticos (*Chaenocephalus aceratus*, *Chionodraco rastrospinosu* e *Lepidonotothen kempii*) após serem submetidos a estresse térmico quente em relação a animais do grupo controle.

FIGURA 8 - ESQUEMA DA ATUAÇÃO SIMPLIFICADA DO SISTEMA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO



LEGENDA: O ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) gerado a partir da redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ), sofre uma reação de dismutação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD), formando peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$ , por sua vez, pode ser convertido em  $H_2O$  através da enzima catalase (CAT) ou glutatona peroxidase (GPx), utilizando a glutatona (GSH) como cofator. Nesse processo é formada a glutatona oxidada (GSSG), que é reduzida pela glutatona redutase (GR), usando NADPH como equivalente redutor.  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$ , na presença de metais de transição (como o ferro), podem ser convertidos no radical hidroxila  $OH^{\cdot}$ , capaz de iniciar o processo de lipoperoxidação. A enzima glutatona-S-transferase (GST), consegue neutralizar alguns intermediários da lipoperoxidação (LPO), evitando, assim, sua propagação. As espécies reativas de oxigênio podem também resultar em carbonilação de proteínas (CP). FONTE: adaptado de GUMULEC et al., 2012.

Vários aspectos contribuem para que peixes antárticos sejam mais suscetíveis ao estresse oxidativo e aos danos gerados pelas EROs, em relação a peixes de regiões temperadas e tropicais. O primeiro deles está relacionado à



elevada solubilidade de oxigênio nas águas frias da Antártica, o que aumenta a exposição a essa molécula com consequente produção de EROs nos fluidos corporais e tecidos desses animais (ANSALDO et al., 2000; ABELE; PUNTARULO, 2004). Além disso, algumas das adaptações às temperaturas congelantes do oceano Austral também contribuem com uma maior susceptibilidade ao estresse oxidativo. Por exemplo, a elevada densidade mitocondrial, nesses animais, favorece uma maior geração de EROs (ENZOR; PLACE, 2014; WINDISCH et al., 2014). Os peixes antárticos apresentam um elevado grau de insaturação lipídica, como uma adaptação homeoviscosa para o transporte transmembrana e para facilitar a difusão de oxigênio a baixas temperaturas (SIDELL, 1998; ENZOR; PLACE, 2014), o que favorece a iniciação da LPO. Além disso, baixas temperaturas aumentam a meia-vida dos produtos intermediários da LPO, o que pode facilitar a propagação dessas reações ou estender o estresse oxidativo à tecidos adjacentes (ABELE; PUNTARULO, 2004).

Sendo assim, é esperado que o sistema de defesa antioxidante de peixes antárticos seja diferenciado e mais eficiente que o apresentado por peixes tropicais e temperados, que, apesar de lidar com uma maior variação ambiental, não são tão suscetíveis aos danos oxidativos (ABELE; PUNTARULO, 2004; GRIM et al., 2013). De fato, as espécies de peixes antárticos, *Pagothenia borchgrevinki* e *Trematomus bernachii*, apresentam de 5 a 6 vezes maiores níveis de tocoferol, em relação a espécies temperadas *Parapercis colias* e *Notolabrus fucicola* (GIESEG et al., 2000).

## 2 JUSTIFICATIVA

Os organismos ectotérmicos do oceano Austral são considerados animais estenotérmicos, uma vez que experimentam temperaturas próximas ao ponto de congelamento da água do mar (-1,9°C), com flutuações térmicas anuais menores que 1°C (CLARKE; JOHNSTON, 1996; HUNT et al., 2003).

Durante muito tempo, os peixes antárticos foram considerados incapazes de apresentar compensação fisiológica frente a um aumento da temperatura da água (SOMERO et al., 1998; PORTNER et al., 2000). Entretanto, estudos tem demonstrado que algumas espécies de peixes antárticos conseguem desenvolver uma resposta compensatória após exposição crônica a elevadas temperaturas, apresentando uma plasticidade cardiovascular e controle metabólico, exibindo,

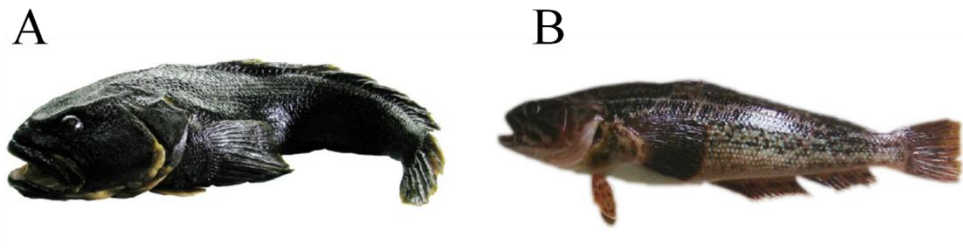
assim, uma plasticidade térmica (SEEBACHER et al., 2005; FRANKLIN et al., 2007). Entretanto, a incapacidade de algumas espécies de peixes antárticos serem aclimatadas a elevadas temperaturas, como *T. bernacchii*, *T. hansonii* e *T. penelli* a 4°C (ROBINSON, 2008), é um tanto quanto preocupante se analisarmos as tendências de aquecimento global. Segundo dados obtidos nas estações de pesquisas antárticas, entre 1949-1996, as temperaturas atmosféricas médias aumentaram mais de 3°C na região da Península Antártica (KING; HARANGOZO, 1998). O aquecimento também tem sido bastante pronunciado nas águas do oceano Austral, sendo que entre as décadas de 1950 e 1980, registrou-se um aquecimento de 0,17°C nas profundidades entre 700 a 1100 m (GILLE, 2002). Já as águas superficiais do oceano adjacente à Península Antártica aumentaram em 1°C sua temperatura média desde o início da década de 1950 (MEREDITH; KING, 2005; BEERS; SIDELL, 2011). Considerando modelos que prevêem um comprometimento dos padrões de correntes oceânicas ou mesmo a interrupção de circulações termohalinas no oceano Austral (HIRST, 1999; BI et al., 2001), é possível que as temperaturas oceânicas da região aumentem em 7°C em algumas centenas de anos (BI et al., 2001).

A exposição de peixes antárticos a temperaturas extremamente elevadas através de choque térmico pode induzir respostas exacerbadas, capazes de revelar diferenças nas respostas fisiológicas frente a elevações de temperatura. Essa abordagem já foi utilizada em alguns estudos com peixes antárticos, por exemplo, *Pagothenia borchgrevinkii* exposta às temperaturas de 4°C (ROBINSON, 2008), 5 e 8°C (RYAN, 1995), e 10°C (FRANKLIN et al., 1991). Muitas das respostas metabólicas acontecem até poucos dias de exposição a elevadas temperaturas (MOMMSEN et al., 1999; FAST et al., 2008; BUCKLEY; SOMERO, 2009). Porém, períodos de exposição a elevadas temperaturas superiores a 15 dias são necessários para caracterizar os elementos que contribuem com uma maior ou menor tolerância térmica de uma espécie (PECK et al., 2014; WINDISCH et al., 2014). Sendo assim, esse estudo pretendeu avaliar as respostas metabólicas de brânquias de duas espécies de peixes antárticos, *N. rossii* e *N. coriiceps*, expostas, através de choque térmico, às temperaturas de 4 e 8°C por 1, 4, 15 e 30 dias, e à temperatura de 8°C por 2, 6, 12, 24, 72 e 144h. A temperatura de 0°C foi utilizada como controle, pois encontra-se dentro da faixa média de variação de temperatura na Península Antártica e Ilhas Shetland do Sul, que varia entre -1,5 a 2,0°C

(WINDISCH et al., 2014). A temperatura de 4°C foi escolhida por induzir alterações metabólicas capazes de elevar, já a curto prazo, o consumo de oxigênio dos peixes antárticos (MORRIS; NORTH, 1984; ROBINSON; DAVISON, 2008). A temperatura de 8°C, embora seja muito superior à média das águas antárticas, é inferior às temperaturas críticas máximas (CT<sub>max</sub>) de ambas as espécies (16,16°C para *N. rossii* e 16,17°C para *N. coriiceps*), temperatura na qual os animais perdem o equilíbrio (BILYK; DEVRIES, 2011). Com relação aos critérios utilizados para a determinação dos tempos de exposição serem de curto ou longo prazo, levou-se em consideração estudos diversos com peixes antárticos submetidos a elevadas temperaturas (FRANKLIN et al., 1991; RYAN, 1995; GUYNN et al., 2002; LANNIG et al., 2005; FRANKLIN et al., 2005; SEEBACHER et al., 2005; BRODTE et al. 2008; ROBINSON, 2008; MARK et al., 2012; JAYASUNDARA et al., 2013; WINDISCH et al., 2014)

As espécies alvo do presente estudo são os nototenídeos congêneros *Notothenia rossii* (RICHARDSON, 1844) e *Notothenia coriiceps* (RICHARDSON, 1844) (Figura 9). Ambas as espécies, que apresentam distribuição geográfica semelhante (GON; HEMSTRA, 1990), são duas das quatro espécies mais abundantes da Baía do Almirantado (SKORA; NEYELOV, 1992), desempenhando um papel central na teia trófica da região (LA MESA et al., 2004). *N. coriiceps* é uma espécie macrófaga e onívora, de hábito sedentário e bentônico (DUNN; JOHNSTON, 1986). *N. rossii* tem seu hábito alimentar e modo de vida variáveis com o estágio de vida, sendo que os juvenis habitam águas com profundidade entre 10 e 25 metros até atingirem a maturidade sexual, quando migram para águas mais profundas (BURCHETT 1983; KNOX 1994). A biomassa de *N. coriiceps*, em algumas regiões das Ilhas Shetlands do Sul, pode chegar a 70% (SKÓRA; NEYELOV 1992), provavelmente devido a redução dos estoques de *N. rossii*, no início da década de 1980, devido a exploração comercial dessa espécie (BARRERA-ORO et al., 2000).

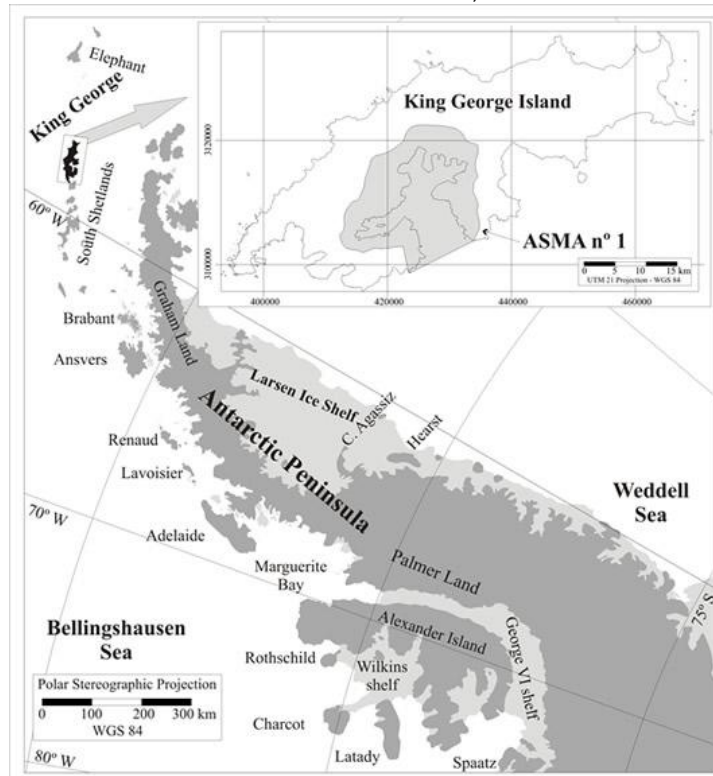
FIGURA 9 - NOTOTENÍDEOS UTILIZADOS NO PRESENTE ESTUDO



FONTE: A) *Notothenia coriiceps* (DONATTI, 2009); (B) *Notothenia rossii*. (PEDREIRO, 2011).

Com relação ao local de estudo, a Baía do Almirantado está situada na Ilha Rei George, arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica (Figura 10). A Baía do Almirantado, é uma Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA), com 362 Km<sup>2</sup> (BRAUN, et al., 2001; ARIGONY-NETO, et al., 2004), e abriga as estações de pesquisa brasileira, peruana e polonesa, além de refúgios estadunidense e equatoriano.

FIGURA 10 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DA BAÍA DO ALMIRANTADO, ILHA DO REI GEORGE, ARQUIPÉLAGO DAS SHETLANDS DO SUL, PENÍNSULA ANTÁRTICA



FONTE: <http://www.admiraltybayasma.aq/> (Acesso em 06/06/2016)

O entendimento dos mecanismos fisiológicos e da plasticidade metabólica dos peixes antárticos submetidos ao estresse térmico é de fundamental importância, pois permite contribuir com as discussões científicas a respeito desse tema. Além

disso, permite fornecer subsídios que poderão contribuir para a tomada de decisão em relação aos ecossistemas e organismos sujeitos às possíveis alterações climáticas globais, como, por exemplo, redução da emissão de gases de efeito estufa (HOEGH-GULDBERG; BRUNO, 2010).

O que motivou a escolha das brânquias como objeto de investigação dessas respostas à aclimação a altas temperaturas foi o fato de serem estruturas fundamentais aos peixes, graças à sua multifuncionalidade e por já ter sido relatado que o estresse térmico é responsável por alterar vários aspectos relacionados à fisiologia branquial (CALDWELL, 1969; PERRY; LAURENT, 1993; GONZALEZ-CABRERA et al., 1995; KÜLTZ; SOMERO, 1995; PARIHAR et al., 1997; CABEROY; QUNITIO, 2000; METZ et al., 2003)

Considerando o extremo grau de estenotermia de peixes antárticos, a elevada taxa metabólica de brânquias de peixes e que elevadas temperaturas promovem um aumento na taxa das reações bioquímicas, além de alterar o potencial osmorregulatório, essa Tese hipotetiza que a exposição às temperaturas de 4 e 8°C resulta em um aumento da demanda energética e dos níveis de atividade da NKA nas brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps* já em poucas horas de exposição a essas temperaturas. Embora elevadas temperaturas favoreçam uma maior geração de EROs, os peixes antárticos apresentam um sistema de defesa antioxidante bastante eficiente. Logo, esse estudo também hipotetiza que o estresse térmico de curto e longo prazo não seja capaz de induzir estresse oxidativo nas brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do estresse térmico de curto e longo prazo sobre o metabolismo branquial dos peixes antárticos *Notothenia rossii* (RICHARDSON, 1844) e *Notothenia coriiceps* (RICHARDSON, 1984).

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

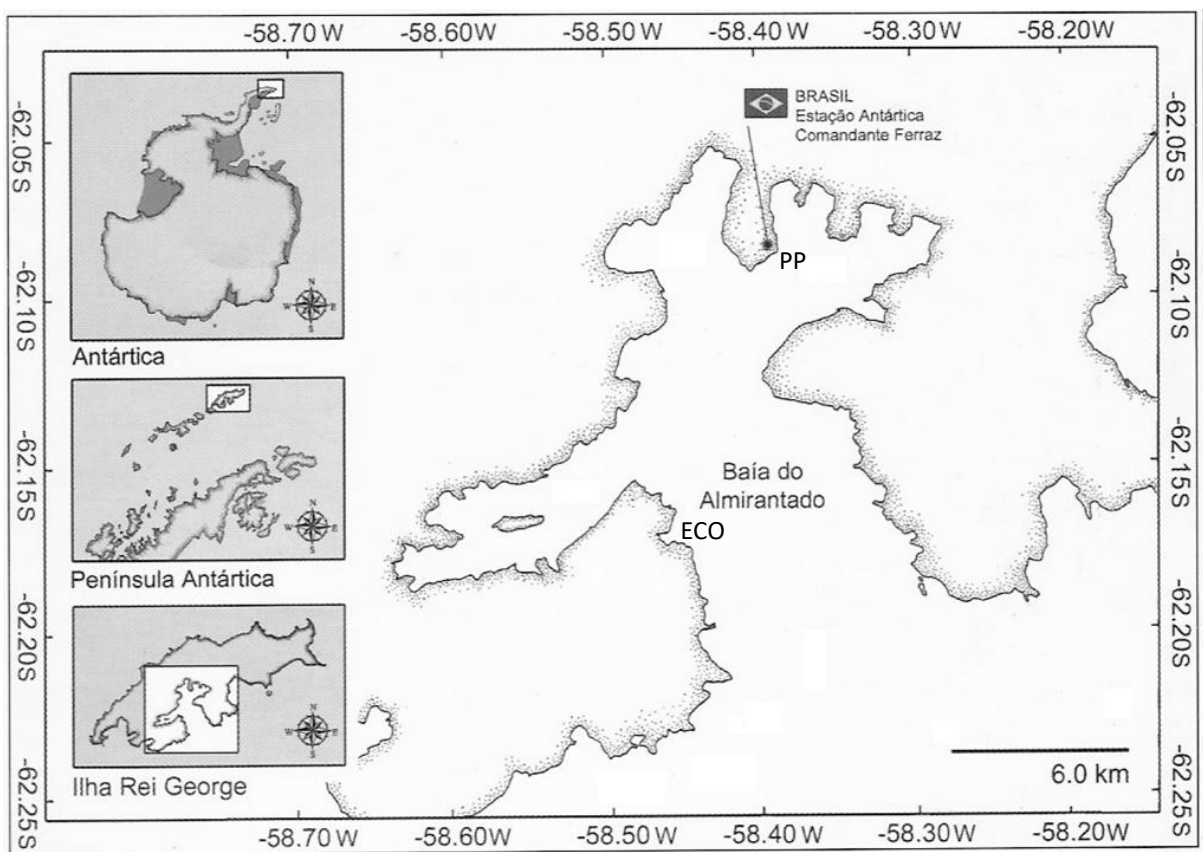
- Avaliar a influência do estresse térmico de curto e longo prazo sobre a via glicolítica, ciclo do ácido cítrico e do metabolismo anaeróbico nas brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps*, através da quantificação dos níveis de atividade de enzimas-chave e dos níveis de intermediários metabólicos.
- avaliar o potencial osmorregulatório branquial, através da quantificação dos níveis de atividade da enzima  $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase (NKA), em *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidos ao estresse térmico;
- avaliar se o estresse térmico promove estresse oxidativo nas brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps*, através da quantificação de marcadores enzimáticos e não enzimáticos do sistema de defesa antioxidante, bem como de marcadores de lipoperoxidação e de carbonilação de proteínas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA DOS PEIXES

Os peixes das espécies *N. rossii* e *N. coriiceps*, foram coletados, com linha e anzol, a profundidades de 10 a 25 metros, em dois pontos situados na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica: Punta Plaza (62°05' 64,5" S; 58° 24' 31.7" W) e Glaciar Ecology, próximo à Arctowski (62°10', 65" S; 58° 26'5 W) (Figura 11).

FIGURA 11 - PONTOS DE COLETA NA BAÍA DO ALMIRANTADO



LEGENDA: PP - Punta Plaza; ECO - Glaciar Ecology.

Após a coleta, os indivíduos foram transportados à Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF), onde foram mantidos em aclimatação. A distância de Punta Plaza à EACF é de aproximadamente 600 m (aproximadamente 5 minutos de navegação) e a distância entre o glaciar Ecology e a EACF é de aproximadamente 10 km (30 minutos de navegação). Durante o transporte, os animais foram

aconicionados em caixas plásticas (aproximadamente 250 L), contendo água do mar, constantemente renovada para garantir a manutenção da água.

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

## 4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E COLETA DAS BRÂNQUIAS

Os experimentos descritos abaixo foram realizados levando-se em consideração as condições logísticas do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR), dentre elas, a possibilidade de transporte de nitrogênio líquido em aeronaves da Força Aérea Brasileira e a duração de cada fase científica em uma expedição Antártica, além de experimentos prévios realizados pelo grupo de pesquisa de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – Universidade Federal do Paraná (UFPR).

### 4.2.1 Experimento I - Estresse térmico de longo prazo

O primeiro conjunto de experimentos teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse térmico de longo prazo no metabolismo energético de brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps*.

Após as coletas, *N. rossii* (n= 120; comprimento total - CT =  $36 \pm 3$  cm; massa=  $477 \pm 116$  g) e *N. coriiceps* (n= 120; CT =  $35 \pm 3$  cm; massa =  $747 \pm 260$  g), foram aclimatados por 5 dias, em tanques de 1000L com salinidade de  $35 \pm 1,0$  psu, temperatura de  $0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , fotoperíodo de 12h luz/12h escuro e aeração constante. *N. rossii* e *N. coriiceps* com CT menor que 44 cm e 24 cm, respectivamente, foram considerados juvenis (BURCHET 1983; SAPOTA 1999). O período de 48h é o tempo ótimo para a aclimação de peixes antárticos às condições de cativeiro, sendo que, a partir desse tempo, os animais já estão recuperados do estresse da captura (WELLS et al., 1984; DAVISON et al, 1988).



Após a aclimação, os espécimes foram aleatoriamente selecionados e distribuídos aos tanques experimentais (1000 L), às temperaturas de  $0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (controle),  $4 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  ou  $8 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  por 1, 4, 15 ou 30 dias, totalizando 10 indivíduos de cada espécie por tratamento. Foi fornecida, a cada um dos peixes, uma porção (aproximadamente 2 g) de musculatura de peixes antárticos a cada 48h durante os bioensaios. A renovação de 50% da água dos tanques foi feita a cada 48 horas com água do mar, captada a uma profundidade de 4 metros em frente à EACF, aquecida a 4 ou  $8^{\circ}\text{C}$  (termostatos Aquaterm 08 - Full Gauge®) antes de ser bombeada aos tanques com as respectivas temperaturas.

Após a realização dos bioensaios, os animais foram anestesiados com benzocaína à  $20 \text{ mg. L}^{-1}$ , a partir de uma solução estoque de 0,1% ( $\text{m v}^{-1}$ ) em etanol 95%, por, aproximadamente 120 segundos, até que houvesse ausência de reação a qualquer estímulo (escala IV, segundo WOODY et al., 2002). A benzocaína é considerada um anestésico ideal para peixes (ROSS; ROSS, 1999; FABIANI et al., 2013), sendo utilizada, inclusive, em procedimentos cirúrgicos em peixes antárticos (BASTOS-RAMOS et al, 1998). Os animais foram, então, sacrificados através de secção medular, sendo as brânquias (2º arco branquial esquerdo) removidas, congeladas a  $-30^{\circ}\text{C}$ , armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e destinadas para os seguintes ensaios enzimáticos, cujas metodologias são descritas detalhadamente na seção 3.3., citrato sintase (CS); malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), níveis de glutathione reduzida (GSH) e de malondialdeído (MDA), indicador de LPO.

#### 4.2.2 Experimento II - Estresse térmico de curto prazo

O segundo conjunto de experimentos, delineado levando-se em consideração os resultados obtidos no Experimento I, teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse térmico de curto prazo no metabolismo energético e potencial osmorregulatório em brânquias de *N. rossii*.

Após as coletas, *N. rossii* ( $n= 109$ ; CT =  $34 \pm 3 \text{ cm}$ ; massa=  $443 \pm 134 \text{ g}$ ) e *N. coriiceps* ( $n= 109$ ; CT =  $38 \pm 4 \text{ cm}$ ; massa =  $778 \pm 243 \text{ g}$ ), foram aclimatados por 3 dias, em tanques de 1000L, com condições controladas de temperatura ( $0^{\circ} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ), salinidade ( $35 \pm 1,5 \text{ psu}$ ), oxigenação constante através de aeradores, fotoperíodo de 12h luz/12h escuro. Após a aclimação, os peixes foram selecionados

aleatoriamente e transferidos diretamente de 0 para 8°C por 2, 6, 12, 24, 72 ou 144h, totalizando 9 animais por grupo experimental. O protocolo de alimentação e manutenção dos tanques foi realizado conforme descrito em 3.2.1.

Após a realização dos bioensaios, os animais foram anestesiados com benzocaína 0,1% (m.v<sup>-1</sup>) e, então, sacrificados através de secção medular, sendo as brânquias removidas (2 e 3º arco branquial esquerdo), congeladas em nitrogênio líquido (-196°C), armazenadas em ultrafreezer (-80°C) e destinadas para os seguintes procedimentos analíticos, descritos detalhadamente na seção 3.3: quantificação dos níveis de atividades das enzimas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA), hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), lactato desidrogenase (LDH), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), quantificação do conteúdo de glicogênio, lactato e piruvato, quantificação dos níveis de atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-S-transferase (GST), glutathion redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), e quantificação de glutathiona reduzida (GSH), bem como dos marcadores de danos oxidativos, lipoperoxidação (LPO) e proteínas carboniladas (CP). A descrição detalhada das técnicas utilizadas pode ser encontrada na Seção Anexos.

### 4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 4.3.1 Ensaio da atividade das ATPases

A determinação dos níveis de atividade das ATPases totais foi realizada através do método descrito por Gibbs e Somero (1989) modificado para microplaca e para determinação simultânea dos níveis de atividade da NKA e H<sup>+</sup>-ATPase (modificações descritas por Kultz e Somero, 1995), após normalização das amostras para a concentração de 1 mg.ml<sup>-1</sup> (Anexo 1). O método é baseado na oxidação do NADH acoplada à defosforilação do ATP, que é monitorada durante 15 minutos a 340 nm. Devido ao fato de a H<sup>+</sup>-ATPase estar envolvida com a captação de Na<sup>+</sup> em peixes de água doce (EVANS et al., 2005) e não ter uma função conhecida em peixes marinhos, os resultados dos níveis de atividade dessa enzima não serão aqui discutidos. Todos os ensaios foram conduzidos a 20°C e os níveis de atividade da NKA foram expressos como µmol de ATP/h/mg de proteína (Anexo 2).

#### 4.3.2 Determinação dos níveis de atividade das enzimas do metabolismo energético

Amostras de filamentos branquiais foram pesadas, homogeneizadas (homogeneizador Potter-Elvehjem) em tampão Tris-HCl 50mM (pH 7,4) (proporção de 1:5) sob banho de gelo, seguida por sonicação (15 segundos) para ruptura de estruturas subcelulares. A seguir, o homogenado foi centrifugado a 14.000g a 4°C durante 10 minutos e o sobrenadante foi utilizado para as determinações das atividades enzimáticas, em triplicata (Anexo 3). Os ensaios enzimáticos foram realizados a 20°C, uma temperatura não-desnaturante (enzimas de peixes antárticos desnaturam próximo a 40° C; ROBINSON, 2008), que permite a avaliação da cinética enzimática em suas condições ótimas de pH e concentração de substrato, sendo previamente utilizada em outros estudos (SUAREZ et al. 1986; JAYASUNDARA et al. 2013; ALMROTH et al. 2015; RODRIGUES Jr et al., 2015).

Os níveis de atividade das enzimas avaliadas foram expressos como  $\mu\text{mol}$  de substrato convertido em produto por minuto ( $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ ). As atividades específicas foram expressas conforme a concentração de proteínas das amostras ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), após normalização para  $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ . A concentração de proteínas na amostra foi determinada através do método descrito por Bradford (1976), utilizando Coomassie Brilliant Blue G-250 e albumina de soro bovina (BSA) como padrão. A leitura foi realizada a 545 nm em leitora de microplaca EPOCH (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA), mesmo equipamento utilizado para os ensaios enzimáticos.

Os níveis de atividade da hexoquinase (HK) foram determinados a partir do método descrito por Baldwin e cols. (2007), sendo que a glicose-6-fosfato formada é medida a 340 nm após a adição de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e  $\text{NADP}^+$ , seguida pela formação de NADPH (Anexo 4).

A atividade da fosfofructoquinase (PFK) foi determinada em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,2), contendo  $\text{MgCl}_2$  10 mM, ATP 1,0 mM, NADH 0,15 mM, AMP 2,0 mM, KCl 250 mM, glicerolfosfato desidrogenase 1 U/mL, aldolase 1,2 U/mL, triose fosfato isomerase 10 U/mL e frutose-6-fosfato 5,0 mM. A variação de absorbância foi acompanhada de forma contínua a 340 nm (BALDWIN, et al., 2007) (Anexo 5).

A atividade da citrato sintase (CS) foi determinada segundo o método descrito por Saborowski e Buchholz (2002), a partir da quantificação do complexo formado

entre CoA liberada com o DTNB do meio. Sendo que a reação se inicia pela adição de oxaloacetato. A leitura foi realizada a 412 nm (Anexo 6).

A atividade da malato desidrogenase (MDH) foi determinada segundo o método proposto por Childress e Somero (1979). O sistema de reação é composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), oxaloacetato 0,4 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, NADH 0,155 mM. A reação foi medida a em 340 nm (Anexo 7).

A lactato desidrogenase (LDH) foi determinada a partir de um sistema de reação composto de tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), piruvato de sódio 1 mM, KCl 100 mM, β-NADH a 0,254 mM. A reação foi medida espectrofotometricamente a 340 nm (THUESEN et al., 2005) (Anexo 8).

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) foi avaliada através do aumento de absorbância provocada pela redução do NADP<sup>+</sup> a NADPH, a 340 nm pela G6PDH (CIARDELLO et al., 1995) (Anexo 9).

#### 4.3.3 Determinação dos intermediários metabólicos

Para a quantificação do conteúdo de glicogênio, foi utilizada a técnica descrita por Dubois et al. (1956) e adaptada por Bidinoto et al. (1997), padronizada para brânquias. Os dados foram expressos como μmoles de glicosil-glicose/g de tecido (Anexo 10).

A concentração de lactato nas brânquias foi determinada segundo método descrito por Harrower e Brown (1972), utilizando solução padrão de ácido láctico 100nM. Os dados foram expressos em μmol de lactato/g de tecido (Anexo 11)

O piruvato foi determinado segundo Lu (1939), utilizando solução padrão de piruvato de sódio 100nM. Os valores foram expressos em μmol de piruvato/g de tecido (Anexo 12).

#### 4.3.4 Determinação dos níveis de atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante

As amostras de brânquias de *N. coriiceps* e *N. rossii* foram homogeneizadas (homogeneizador Potter-Elvehjem) em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2 (Anexo 13) e, em seguida centrifugadas a 12.000 x g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante

foi destinado para a determinação da concentração de proteínas, da atividade das enzimas antioxidantes e dos níveis dos marcadores não enzimáticos, a 20°C.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em leitor de microplacas Epoch (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA). A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com método de Bradford (1976) (Anexo 1), utilizando BSA para o estabelecimento de uma curva padrão; a absorbância das amostras foi verificada a 545 nm. Previamente às análises enzimáticas, as amostras foram normalizadas para a concentração de proteínas de 1mg.mL<sup>-1</sup>.

A determinação dos níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD) foi baseada no princípio de inibição da redução do NBT para azul formazan pelo ânion superóxido, produzido pela hidroxilamina em solução alcalina (CROUCH et al., 1981). A redução do NBT foi medida a 560nm (Anexo 14).

Os níveis de atividade da catalase (CAT) foram avaliados através do consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> medido espectrofotometricamente a 240nm em cubetas de quartzo. A composição do sistema de reação foi tampão Tris-EDTA (Tris HCl 1,0M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0) e peróxido de hidrogênio 30mM (AEBI, 1984) (Anexo 15).

Os níveis de atividade da glutathione peroxidase (GPx) foram determinados a partir da redução de um peróxido orgânico através da glutathione em sua forma reduzida (GSH), originando a glutathione dissulfeto (GSSG). Esta última é reduzida pela enzima glutathione redutase (GR) utilizando elétrons doados pelo NADPH (WENDEL, 1981). A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 340nm (Anexo 16).

A atividade da glutathione S-transferase (GST) foi determinada de acordo com metodologia descrita por Keen e colaboradores (1976) utilizando o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A glutathionação do CDNB foi medida espectrofotometricamente em 340nm (Anexo 17).

A atividade da glutathione redutase (GR) foi avaliada através da oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathione dissulfeto (GSSG), sendo que a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 340nm. O meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio (100mM, pH 7,0), EDTA 1mM, NADPH 0,1mM e GSSG a 1mM (CARLBERG; MANNERVIK, 1985) (Anexo 18).

#### 4.3.5 Determinação de glutathiona reduzida, lipoperoxidação e carbonilação de proteínas

A concentração GSH e outros tióis não proteicos foram determinados através do método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). O método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com o DTNB gerando produto que absorve luz a 415 nm (Anexo 19).

O índice de peroxidação lipídica (LPO) foi avaliado através da quantificação dos produtos finais da peroxidação lipídica, incluindo o MDA, através da reação de TBARS, adaptado de Federici et al. (2007), em que a reação do MDA com o ácido tiobarbitúrico (TBA) produz um cromóforo que pode ser medido a 532nm (Anexo 20).

O índice de carbonilação de proteínas (CP) foi determinado por método descrito por Levine e colaboradores (1994), baseado na reação das proteínas carboniladas com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) formando dinitrofenil hidrazonas, detectáveis a 370 nm (Anexo 21).

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Em *N. rossii* submetida a estresse térmico de longo prazo, o efeitos das variáveis independentes, temperatura (0, 4 e 8°C) e tempo de exposição (1, 4, 15 e 30 dias), e as possíveis interações entre eles foram avaliadas através da análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*). Em *N. coriiceps*, devido à mortalidade dos grupos expostos a 8°C por 15 e 30 dias, foi aplicada uma ANOVA de duas vias parcial, sendo que as temperaturas e tempos de exposição considerados foram 0, 4, e 8°C para 1 e 4 dias, 0 e 4°C para 1, 4, 15, e 30 dias. Em ambos os casos, o pós-teste de Tukey foi utilizado para a comparação posterior das médias e o teste de Levene *a priori* para testar a homogeneidade das variâncias. O nível de significância utilizado foi de 5% e os dados apresentados em média e erro padrão da média (SEM).

Os dados obtidos com *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidas a estresse térmico de curto prazo, foram, num primeiro momento, submetidos ao teste de Levene para verificar a homogeneidade das amostras. Em seguida, foi realizada uma análise de variância de duas vias (ANOVA *two-way*), comparando o efeitos das variáveis independentes, temperatura (0 e 8°C) e tempo de exposição (2, 4, 6, 12, 24, 72 e

144h), seguida por pós-teste de Tukey. O nível de significância utilizado foi de 5% e os dados apresentados em média e SEM.

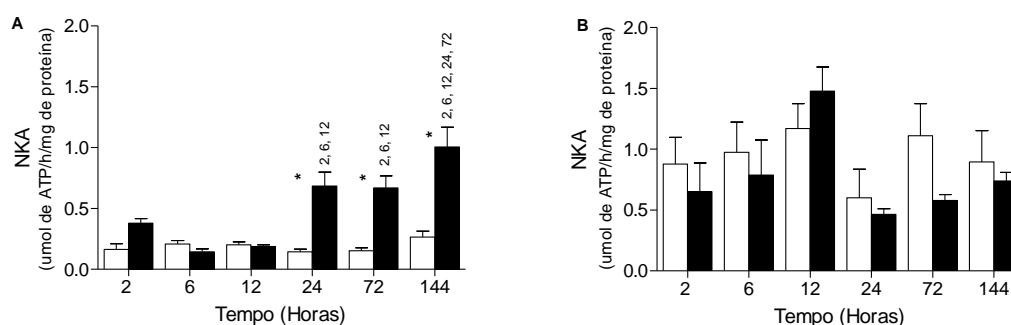
## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO POTENCIAL OSMORREGULATÓRIO BRANQUIAL

Em *N. rossii*, os níveis de atividade da NKA mantiveram-se constantes nos peixes mantidos a 0°C por até 144h. A temperatura de 8°C e o tempo de exposição, a partir de 24h, modularam positivamente a NKA, sendo que os níveis de atividade foram significativamente maiores ( $P < 0,05$ ) que os apresentados pelo grupo controle. Além disso, os animais mantidos a 8°C por 144h apresentaram os maiores valores ( $P < 0,05$ ) para os níveis de atividade da NKA (Figura 12A; Tabela 1).

Nem a temperatura, nem o tempo de exposição alteraram os níveis de atividade da NKA em *N. coriiceps* (Figura 12B; Tabela 1).

FIGURA 12 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASE (NKA) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

TABELA 1 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS VIAS) REALIZADO OS NÍVEIS DE ATIVIDADE DA ENZIMA  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPASE (NKA) NAS BRANQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*.

	<i>Notothenia rossii</i>			<i>Notothenia coriiceps</i>		
	Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti
F	73,88	13,60	12,25	2,14	2,28	0,57
P	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,15	0,06	0,72

FATORES: temperatura (TE) (0° E 8°C) e tempo de exposição (TI) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). \* indica diferenças significativas.

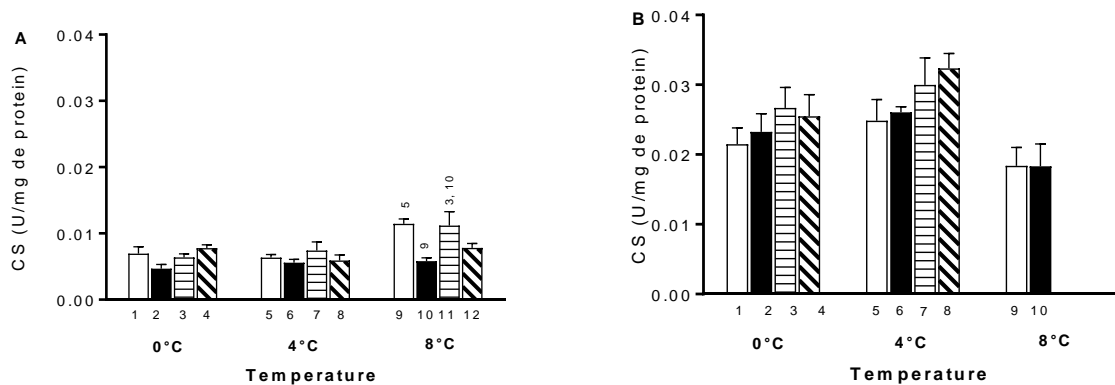


## 5.2 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

Ambas as espécies sobreviveram aos experimentos de choque térmico a 4°C em todos os tempos de exposição. Nos experimentos de 8°C somente *N. rossii* sobreviveu até 30 dias de exposição e *N. coriiceps* somente até 4 dias.

A exposição de *N. rossii* a 4°C não alterou os níveis de atividade da CS branquial. Os níveis de atividade da CS, a 8°C, apresentaram aumentos transientes em 1 dia de exposição, em relação a 4°C, e em 15 dias de exposição, em relação ao controle (Figura 13A; Tabela 2). Em *N. coriiceps*, o aumento da temperatura e o tempo de exposição não alteraram os níveis de atividade da CS branquial (Figura 13B; Tabela 2)

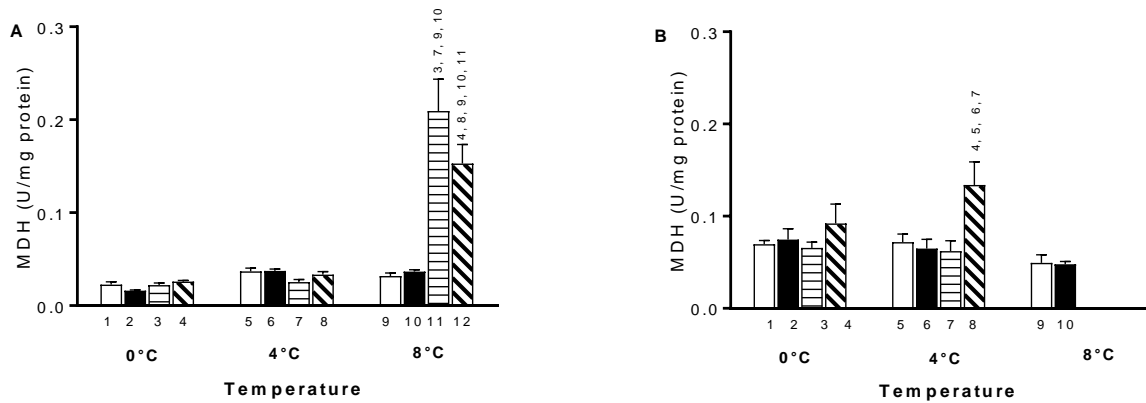
FIGURA 13 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DE CITRATO SINTASE (CS) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; 1, 5 e 9 - 1 dia; 2, 6 e 10 - 4 dias; 3, 7 e 11 - 15 dias; 4, 8 e 12 - 30 dias. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tempos correspondentes de exposição ou diferenças encontradas dentro de um grupo térmico. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da MDH nas brânquias de *N. rossii* aumentaram de maneira significativa, somente em 8°C a partir de 15 dias de exposição, sendo que, em 30 dias a essa temperatura, os níveis de atividade da MDH diminuem, em relação a 15 dias (Figura 14A; Tabela 2). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da MDH foram maiores apenas em 30 dias à 4°C (Figura 14B; Tabelas 2).

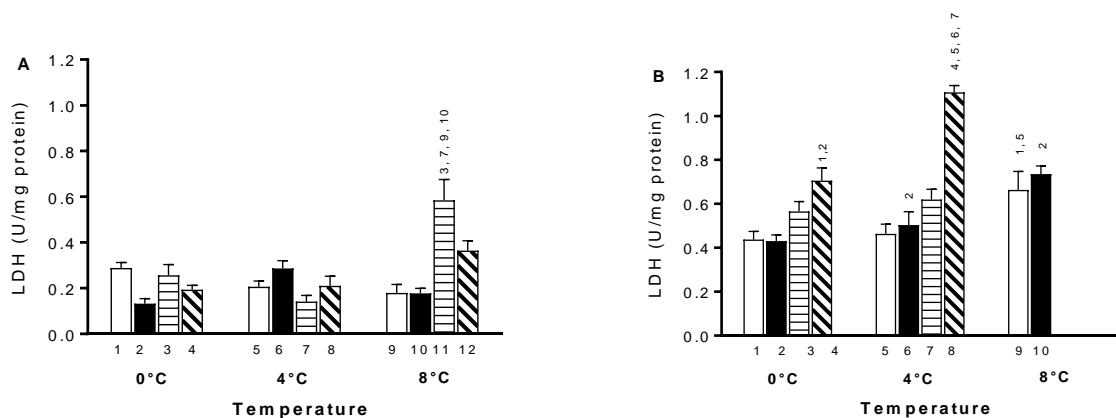
FIGURA 14 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DE MALATO DESIDROGENASE (MDH) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; 1, 5 e 9 - 1 dia; 2, 6 e 10 - 4 dias; 3, 7 e 11 - 15 dias; 4, 8 e 12 - 30 dias. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tempos correspondentes de exposição ou diferenças encontradas dentro de um grupo térmico. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da LDH nas brânquias de *N. rossii* foram maiores apenas em 15 dias a 8°C (Figura 15A; Tabela 2). Em *N. coriiceps*, a exposição a 4°C elevou os níveis de atividade da LDH após 15 e 30 dias de exposição; os níveis de atividade da LDH foram maiores em 1 dia a 8°C, em relação a 0 e 4°C, e 15 dias a 8°C, em relação ao controle (Figura 15B; Tabela 2).

FIGURA 15 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DE LACTATO DESIDROGENASE (LDH) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; 1, 5 e 9 - 1 dia; 2, 6 e 10 - 4 dias; 3, 7 e 11 - 15 dias; 4, 8 e 12 - 30 dias. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tempos correspondentes de exposição ou diferenças encontradas dentro de um grupo térmico. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

TABELA 2 - RESULTADOS DA ANOVA (DUAS VIAS) PARA OS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS CS (CITRATO SINTASE), MDH (MALATO DESIDROGENASE) E LDH (LACTATO DESIDROGENASE) EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*.

		<i>N. rossii</i>			<i>N. coriiceps</i>		
		Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti
CS	F	9.13	10.93	3.21	1.69	2.61	0.10
	p	<0.01*	<0.01*	0.007*	0.19	0.06	0.98
MDH	F	62.13	18.29	20.86	2.28	13.69	0.07
	p	<0.01*	<0.01*	<0.01*	0.11	<0.01*	0.99
LDH	F	10.36	6.16	9.15	8.96	15.22	2.07
	p	<0.01*	<0.01*	<0.01*	<0.01*	<0.01*	0.09

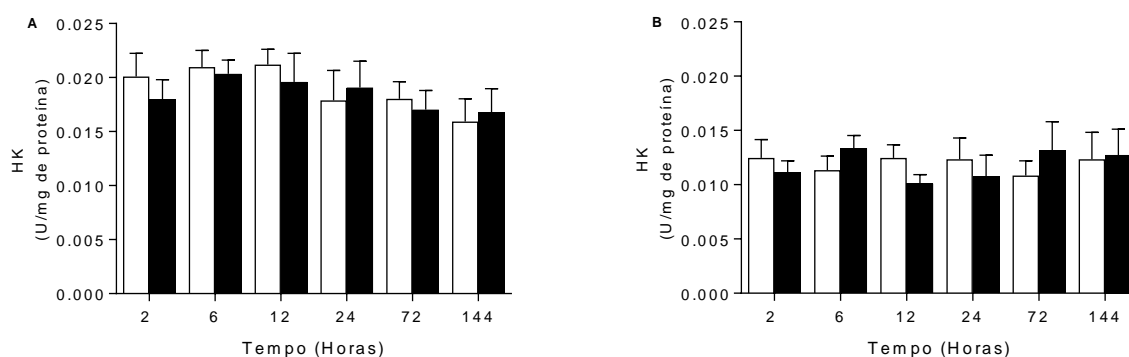
FATORES: Temperatura (TE) (0° 4°e 8°C) e tempo de exposição (TI) (1, 4, 15 e 30 dias). \* Indica diferenças significativas.

### 5.3 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

*Notothenia rossii* e *N. coriiceps* toleraram a transferência abrupta de 0 para 8°C, já que nenhum animal morreu durante os bioensaios.

O tempo de exposição e a temperatura não alteraram os níveis de atividade da HK nas brânquias de *N. rossii* (Figura 16A; Tabela 3) e *N. coriiceps* (Figura 16B; Tabela 3).

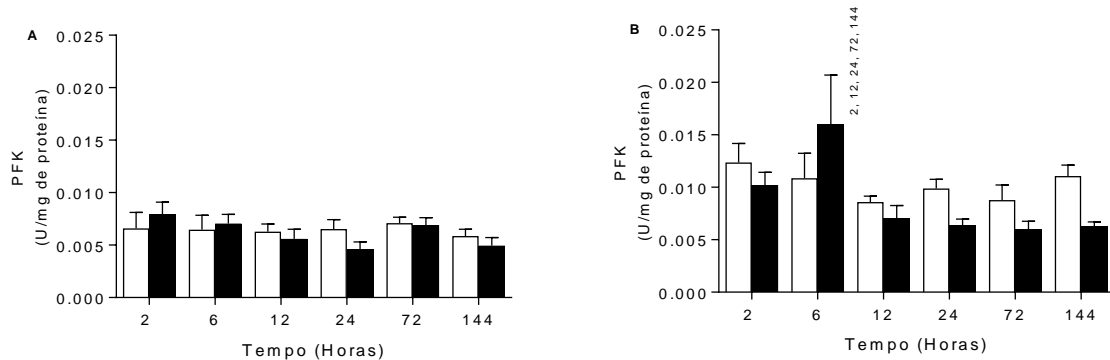
FIGURA 16 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA HEXOQUINASE (HK) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Em *N. rossii*, os níveis de atividade da PFK não se alteraram em resposta à temperatura (Figura 17A; Tabela 3). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da PFK não se alteraram com a elevação da temperatura (Figura 17B; Tabela 3).

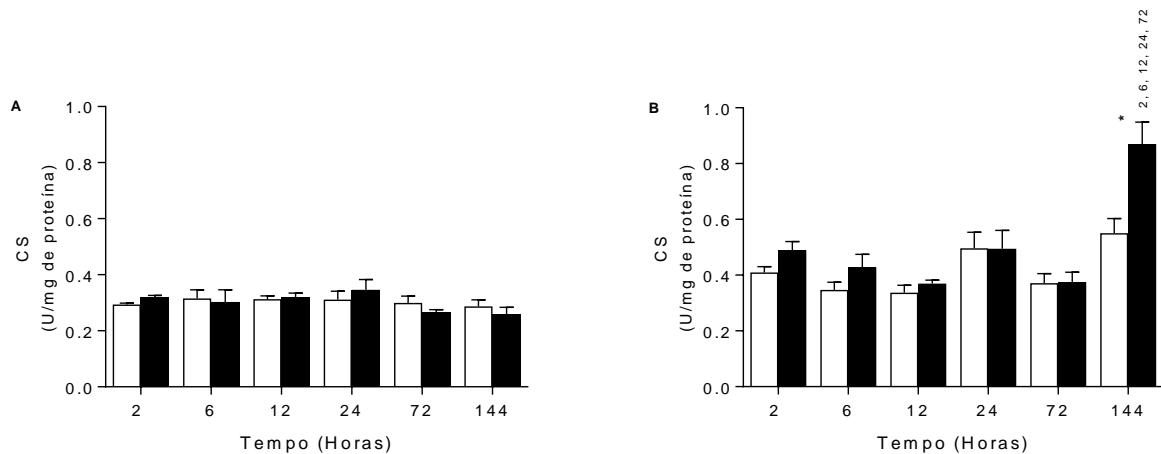
FIGURA 17 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA FOSFOFRUTOQUINASE (PFK) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da CS branquial de *N. rossii* não se alteraram com a elevação da temperatura (Figura 18A; Tabela 3). Em *N. coriiceps*, os níveis de CS aumentaram após 144h de exposição a 8°C (Figura 18B; Tabela 3).

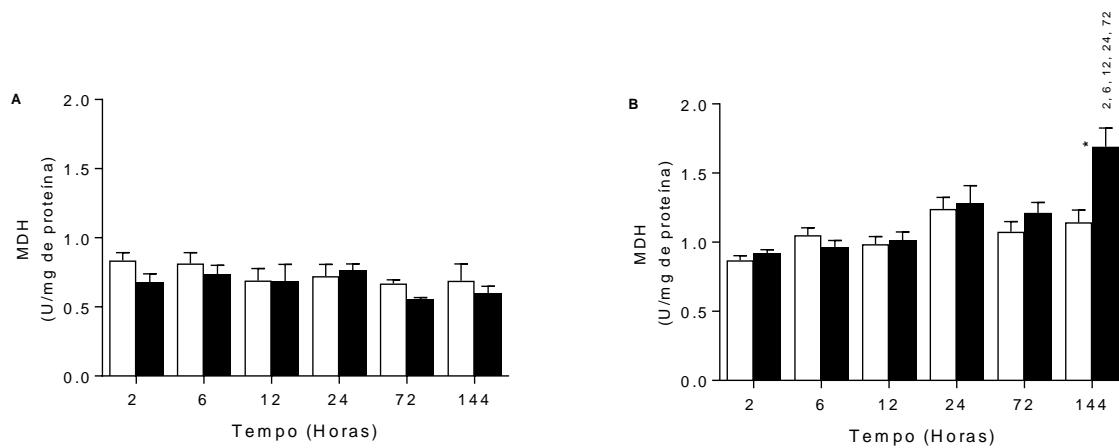
FIGURA 18 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CITRATO SINTASE (C) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da MDH não foram alterados pela exposição a 8°C em *N. rossii* (Figura 19A; Tabela 3). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da MDH aumentaram em 144h a 8°C (Figura 19B; Tabela 3).

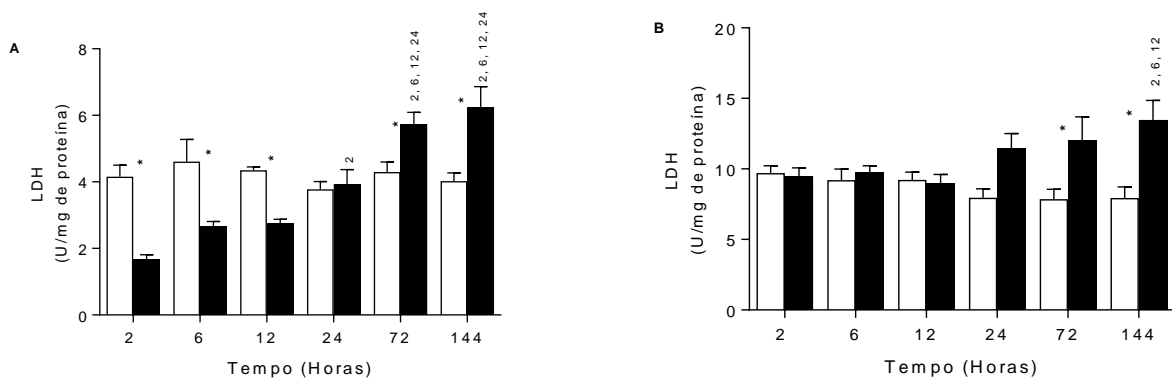
FIGURA 19 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA MALATO DESIDROGENASE (MDH) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Em *N. rossii*, os níveis de atividade da LDH foram significativamente menores nos animais submetidos a 8°C, de 2 a 12h; em 24h, foram semelhantes ao controle; a partir de 72h, foram significativamente maiores a 8°C (Figura 20A; Tabela 3). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da LDH aumentaram a partir de 72h a 8°C (Figura 20B; Tabela 3).

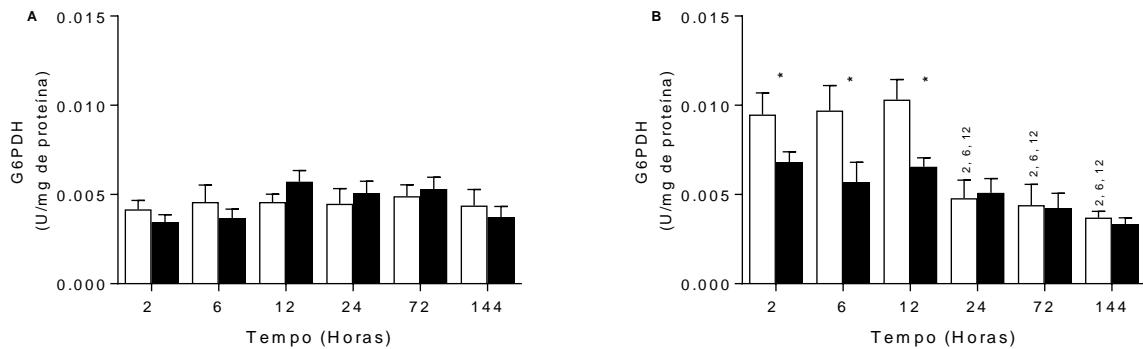
FIGURA 20 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA LACTATO DESIDROGENASE (LDH) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Em *N. rossii*, os níveis de atividade da G6PDH não variaram com a temperatura (Figura 35A Tabela 7). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade de G6PDH foram significativamente menores a 8°C até 12h. A partir de 24h, foram semelhantes ao grupo controle (Figura 35B; Tabela 7).

FIGURA 21 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH) NAS BRÂNCUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

FATORES: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (TI) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). \* Indica diferenças significativas.

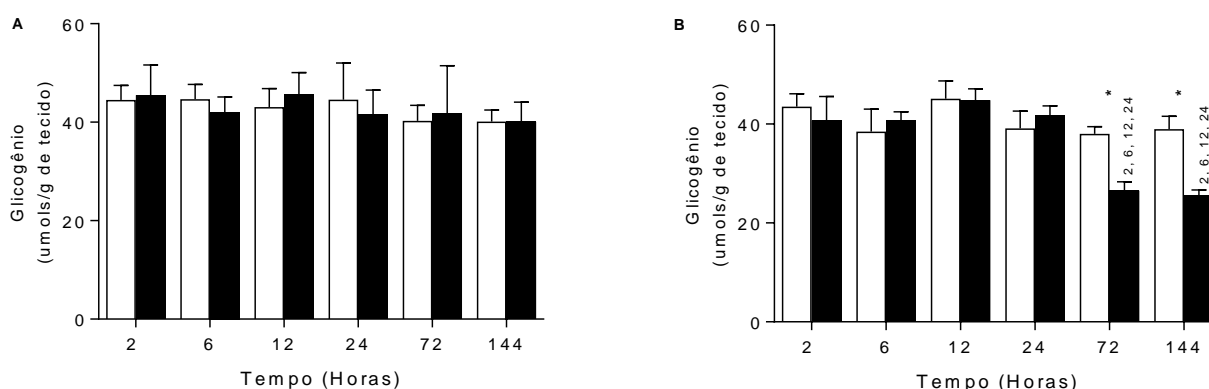
**TABELA 3:** RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS VIAS) PARA AS ENZIMAS HK (HEXOQUINASE), PFK (FOSFOFRUTOQUINASE), CS (CITRATO SINTASE), MDH (MALATO DESIDROGENASE), LDH (LACTATO DESIDROGENASE) E G6PDH (GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE) EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*.

		<i>Notothenia rossii</i>			<i>Notothenia coriiceps</i>		
		Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti
HK	F	0,19	1,42	0,20	0,01	0,14	0,59
	p	0,67	0,22	0,96	0,92	0,98	0,71
PFK	F	0,28	1,34	0,72	2,05	3,11	1,70
	p	0,59	0,25	0,61	0,16	0,01*	0,14
CS	F	0,004	1,53	0,69	10,67	18,05	3,70
	p	0,95	0,19	0,63	<0,01*	<0,01*	<0,01*
MDH	F	2,43	1,47	0,41	6,80	12,47	4,16
	p	0,12	0,21	0,84	0,01*	<0,01*	<0,01*
LDH	F	3,11	12,24	14,89	17,38	0,73	3,83
	p	0,08	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,60	<0,01*
G6PDH	F	0,007	1,53	0,81	10,27	10,98	2,07
	p	0,93	0,19	0,55	0,01*	<0,01*	0,08

#### 5.4 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO NOS NÍVEIS DE INTERMEDIÁRIOS METABÓLICOS BRANQUIAIS

Os níveis de glicogênio, nas brânquias de *N. rossii*, mantiveram-se constantes, ao longo de todo o período de exposição a 8°C. (Figura 22A; Tabela 4). Em *N. coriiceps* foi observada uma redução nos níveis de glicogênio a partir de 72h de exposição a 8°C (Figura 22B; Tabela 4).

FIGURA 22 - NÍVEIS DE GLICOGÊNIO NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO

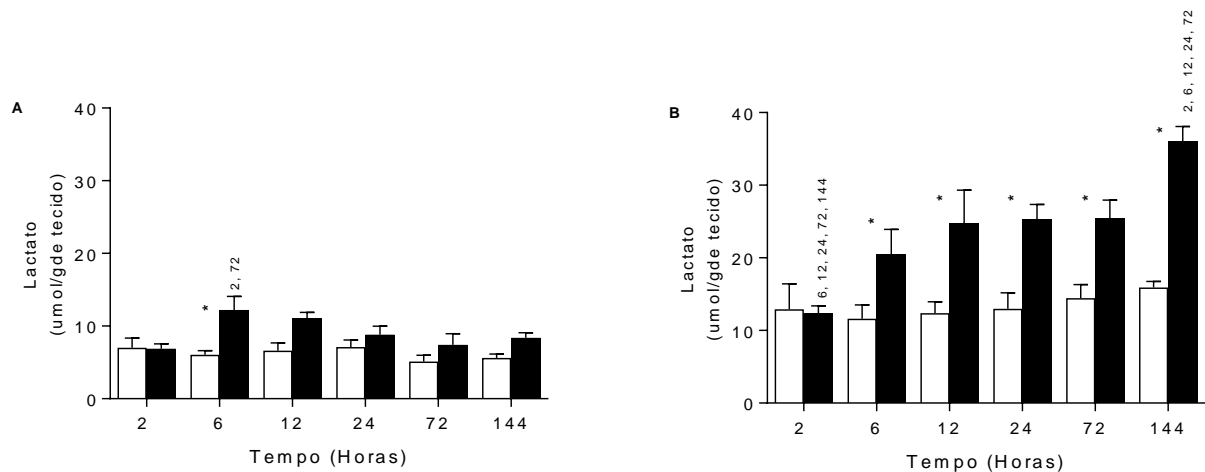


LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de lactato, nas brânquias de *N. rossii* a 8°C permaneceram constantes, e semelhantes ao apresentado pelo controle, exceto após 6h, em que se

observou um aumento significativo desses níveis (Figura 23A; Tabela 4). Em *N. coriiceps*, nos animais submetidos a 8°C, os níveis de lactato aumentaram a partir de 6h de exposição, sendo que, após 144h, os níveis de lactato atingiram os maiores valores (Figura 23B; Tabela 4).

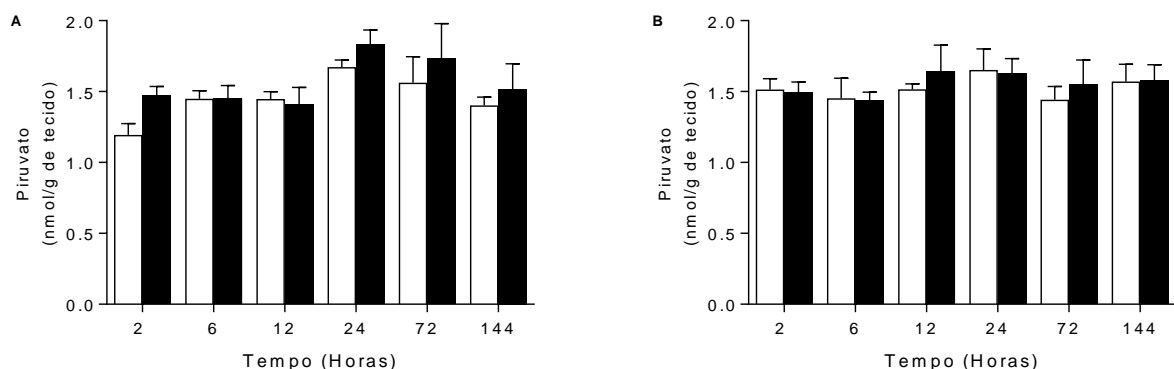
FIGURA 23 - NÍVEIS DE LACTATO NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de piruvato nas brânquias de *N. rossii* permaneceram constantes ao longo de todo o período de exposição a 0 e a 8°C (Figura 24A; Tabela 4), sendo o mesmo observado nas brânquias de *N. coriiceps* (Figura 24B; Tabela 4).

FIGURA 24 - NÍVEIS DE PIRIVATO NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).



TABELA 4 - RESULTADOS DO TESTE DE ANOVA (DUAS VIAS) PARA NÍVEIS DE GLICOGÊNIO, LACTATO E PIRUVATO NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*.

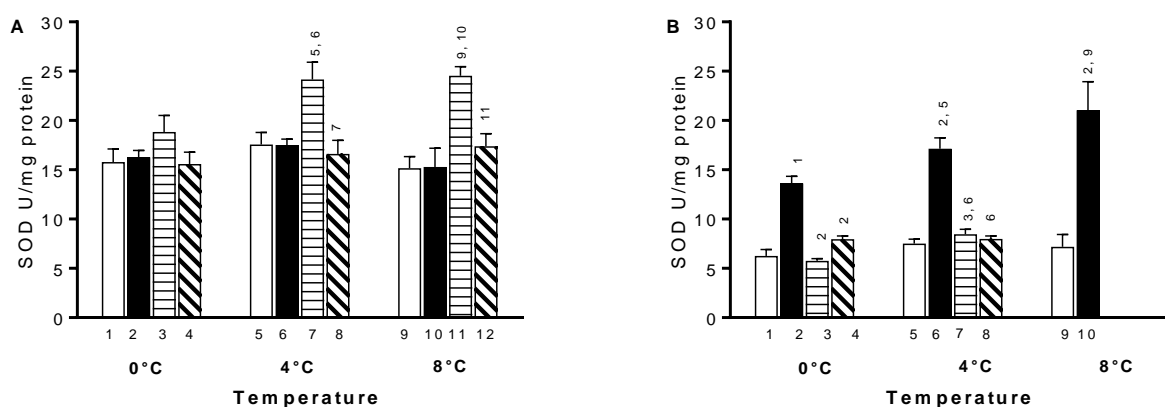
		<i>Notothenia rossii</i>			<i>Notothenia coriiceps</i>		
		Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti
Glicogênio	F	0,03	0,34	0,16	3,93	6,80	2,36
	p	0,97	0,89	0,86	0,51	<0,01*	0,04*
Lactato	F	23,51	1,91	1,93	52,84	6,01	3,35
	p	<0,01*	0,10	0,09	<0,01*	<0,01*	<0,01*
Piruvato	F	2,59	3,14	0,44	0,18	0,59	0,16
	p	0,11	0,01*	0,82	0,67	0,71	0,98

FATORES: Temperatura (TE) (0° e 8°C) e tempo de exposição (TI) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). \* Indica diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ).

## 5.5 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO NOS NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

A temperatura não alterou os níveis de atividade da SOD nas brânquias de *N. rossii* (Figura 25A; Tabela 5). Em *N. coriiceps*, 4 dias de exposição a 4°C e 8°C elevou os níveis de atividade da SOD (Figura 25B; Tabela 5).

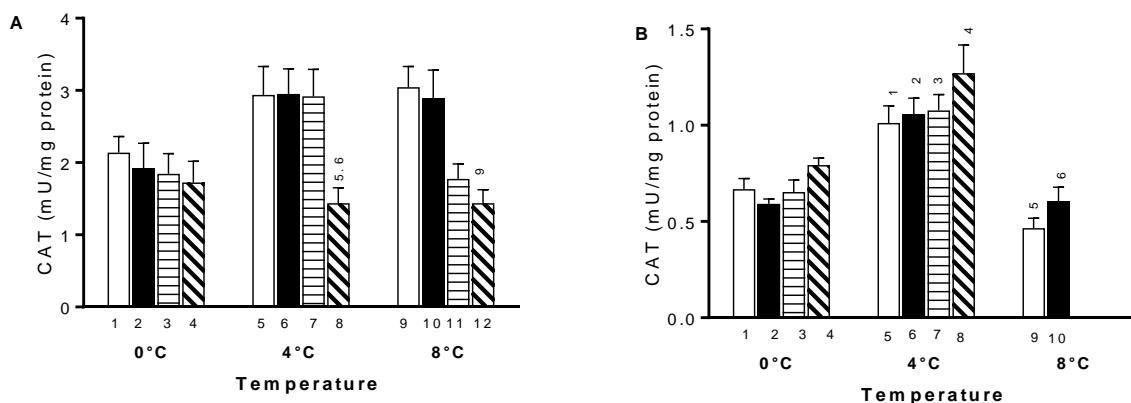
FIGURA 25 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; 1, 5 e 9 - 1 dia; 2, 6 e 10 - 4 dias; 3, 7 e 11 - 15 dias; 4, 8 e 12 - 30 dias. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tempos correspondentes de exposição ou diferenças encontradas dentro de um grupo térmico. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da CAT não se alteraram em resposta a elevação da temperatura em *N. rossii* (Figura 26A; Tabela 5). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da CAT foram maiores 4°C (Figura 26B; Tabela 5).

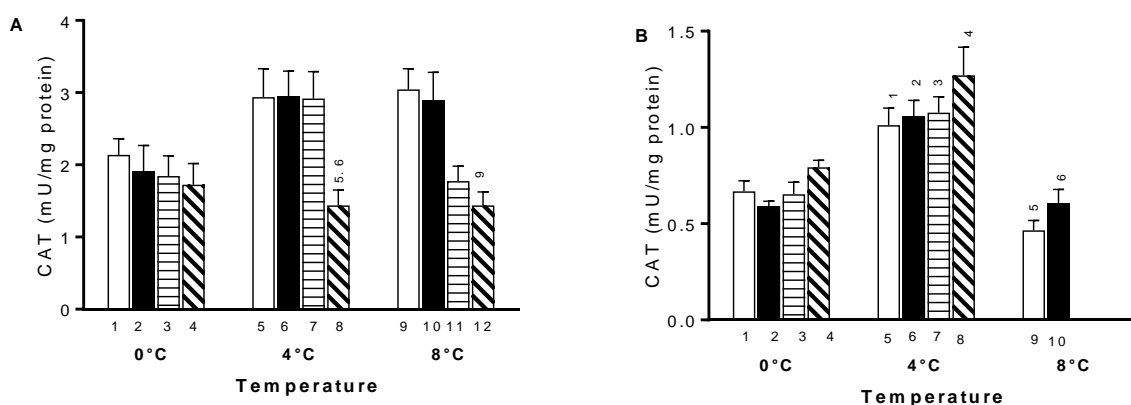
FIGURA 26 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; 1, 5 e 9 - 1 dia; 2, 6 e 10 - 4 dias; 3, 7 e 11 - 15 dias; 4, 8 e 12 - 30 dias. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tempos correspondentes de exposição ou diferenças encontradas dentro de um grupo térmico. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

O aumento da temperatura alterou dos níveis de atividade da GST branquial em *N. rossii* (Figura 27A; Tabela 5). Em *N. coriiceps*, observou-se um aumento dos níveis de atividade da GST no tempo de exposição de 4 dias a 8°C (Figura 27B; Tabela 5).

FIGURA 27 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; 1, 5 e 9 - 1 dia; 2, 6 e 10 - 4 dias; 3, 7 e 11 - 15 dias; 4, 8 e 12 - 30 dias. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tempos correspondentes de exposição ou diferenças encontradas dentro de um grupo térmico. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

TABELA 5 - RESULTADOS DO TESTE ANOVA (DUAS VIAS) PARA OS NÍVEIS DE ATIVIDADE DAS ENZIMAS SOD (SUPERÓXIDO DISMUTASE), CAT (CATALASE), GST (GLUTATIONA-S-TRANSFERASE) EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*.

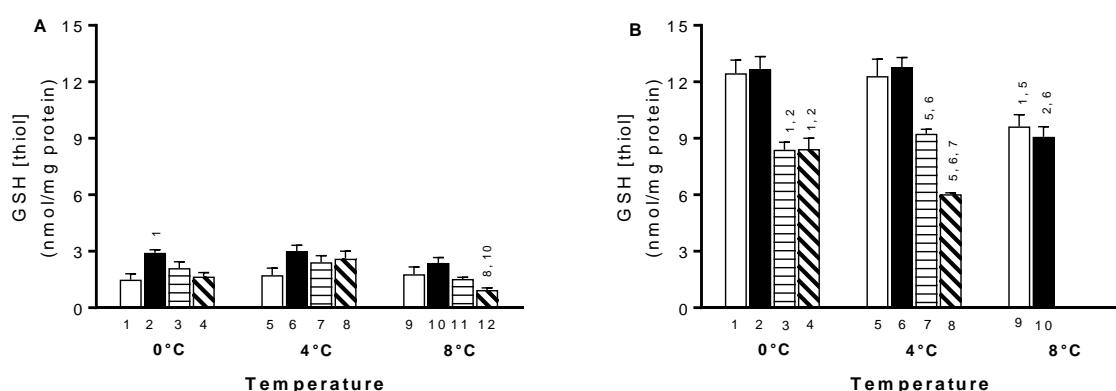
	Temperatura			Tempo			TE x Ti	Temperatura			Tempo			TE x Ti
	<i>N. rossii</i>							<i>N. coriiceps</i>						
SOD	F	3.31		16.20	1.43			7.26		44.68	2.39			
	p	0.04*		<0.01*	0.21			<0.01*		<0.01*	0.05*			
CAT	F	4.72		11.13	2.64			46.28		3.46	0.76			
	p	0.01*		<0.01*	0.02*			<0.01*		0.02	0.55			
GST	F	3.23		102.96	2.91			1.05		16.56	1.16			
	P	0.04*		<0.01*	0.01*			0.36		<0.01*	0.33			

FATORES: temperatura (TE) (0° 4°e 8°C) e tempo de exposição (TI) (1, 4, 15 e 30 dias). \* Indica diferenças significativas

## 5.6 NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS E DE LIPOPEROXIDAÇÃO APÓS ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO

Os níveis de tióis não proteicos (GSH), em *N. rossii*, diminuíram em 30 dias de exposição a 8°C, em relação à 4°C (Figura 28A; Tabela 6). Em *N. coriiceps*, os níveis de GSH diminuíram com a exposição a 8°C, em 1 e 4 dias de exposição (Figura 28B; Tabela 6).

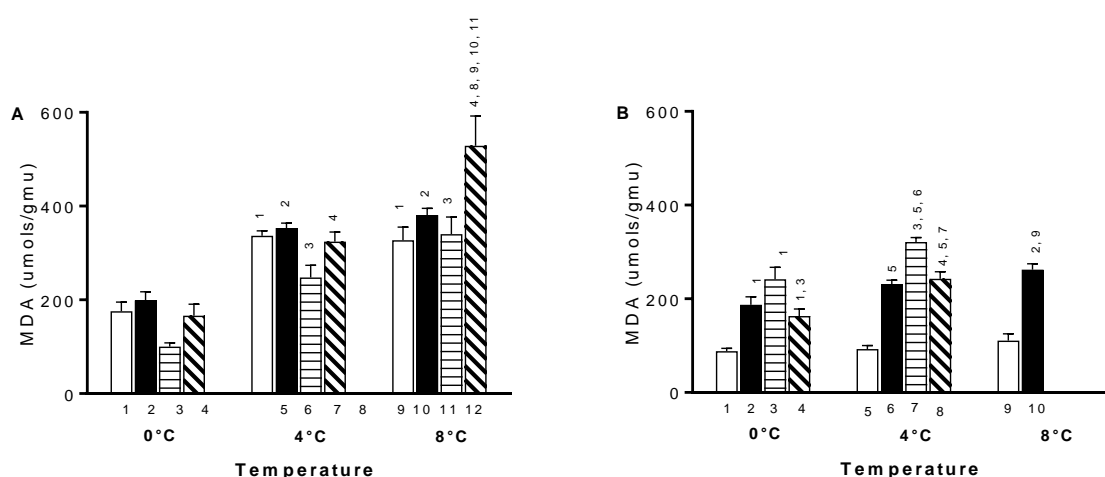
FIGURA 28 - NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; 1, 5 e 9 - 1 dia; 2, 6 e 10 - 4 dias; 3, 7 e 11 - 15 dias; 4, 8 e 12 - 30 dias. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tempos correspondentes de exposição ou diferenças encontradas dentro de um grupo térmico. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

O aumento da temperatura elevou os níveis de MDA, indicador de LPO, nas brânquias de *N. rossii* em todos os tempos de exposição. Em 30 dias a 8°C, os níveis de MDA foram, inclusive, maiores em relação aos demais grupos experimentais (Figura 29A; Tabela 6). Nas brânquias de *N. coriiceps*, os níveis de MDA aumentaram após 15 dias de exposição a 4°C. Nos animais expostos a 8°C por 4 dias, os níveis de MDA foram significativamente maiores que os apresentados pelo controle (Figura 29B; Tabela 6).

FIGURA 29 - NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; 1, 5 e 9 - 1 dia; 2, 6 e 10 - 4 dias; 3, 7 e 11 - 15 dias; 4, 8 e 12 - 30 dias. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $P \leq 0,05$ ) entre os tempos correspondentes de exposição ou diferenças encontradas dentro de um grupo térmico. Atividades expressas em U/mg de proteína. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

TABELA 6 - RESULTADOS DO TESTE ANOVA (DUAS VIAS) PARA OS NÍVEIS DE GSH (GLUTATIONA REDUZIDA) E MDA (MALONDIALDEÍDO) EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*.

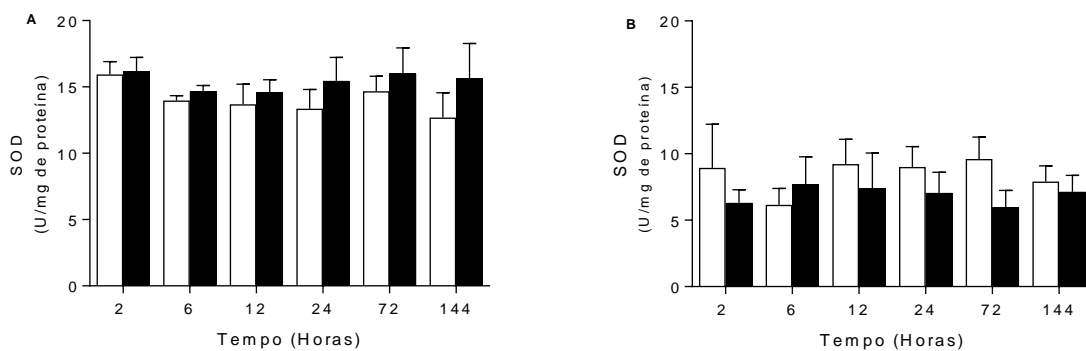
		Temperatura			Tempo			TE x Ti
		<i>N. rossii</i>			<i>N. coriiceps</i>			
GSH	F	6.99	9.02	1.55	19.95	35.37	1.98	
	p	<0.01*	<0.01*	0.17	<0.01*	<0.01*	0.11	
MDA	F	62.31	7.07	3.60	16.50	86.09	2.95	
	p	<0.01*	<0.01*	<0.01*	<0.01*	<0.01*	0.02*	

FATORES: temperatura (TE) (0° 4° e 8°C) e tempo de exposição (TI) (1, 4, 15 e 30 dias). \* Indica diferenças significativas

## 5.7 NÍVEIS DE ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA ANTIOXIDANTE APÓS ESTRESSE TÉRMICOS DE CURTO PRAZO

Os níveis de atividade da SOD não variaram em resposta ao aquecimento ao longo das 144h de exposição, tanto nas brânquias de *N. rossii* (Figura 30A; Tabela 7), quanto de *N. coriiceps* (Figura 30B; Tabela 7).

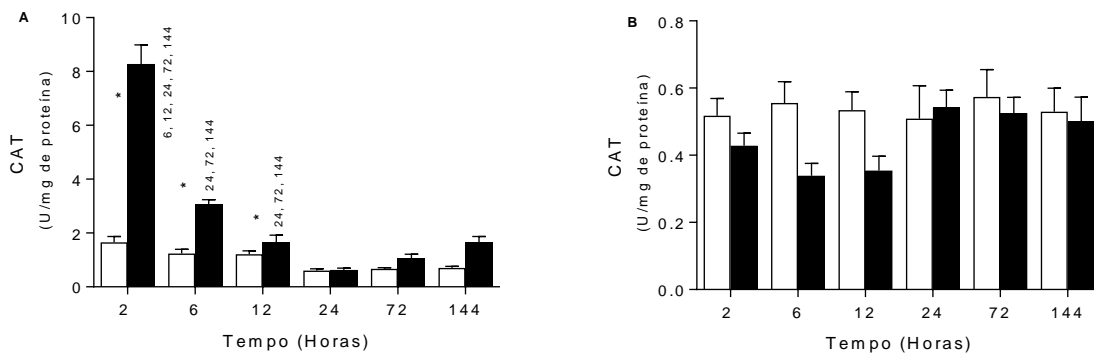
FIGURA 30 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Em *N. rossii*, de 2 a 12 h de exposição a 8°C, os níveis de atividade da CAT foram significativamente maiores. A partir de 24h, os níveis de atividade da CAT apresentaram valores semelhantes aos do grupo controle (Figura 31A; Tabela 7). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da CAT não variaram com a elevação da temperatura (Figura 31B; Tabela 7).

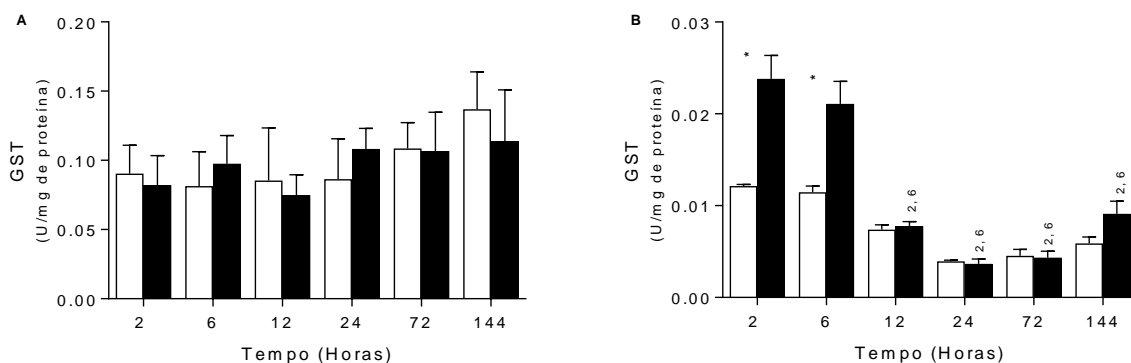
FIGURA 31 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da GST nas brânquias de *N. rossii* não variaram com a temperatura (Figura 32A; Tabela 7). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da GST aumentaram nas primeiras 6h de exposição. A partir de 12h, os níveis de atividade da GST passam a ser semelhantes ao do grupo controle (Figura 32B; Tabela 7).

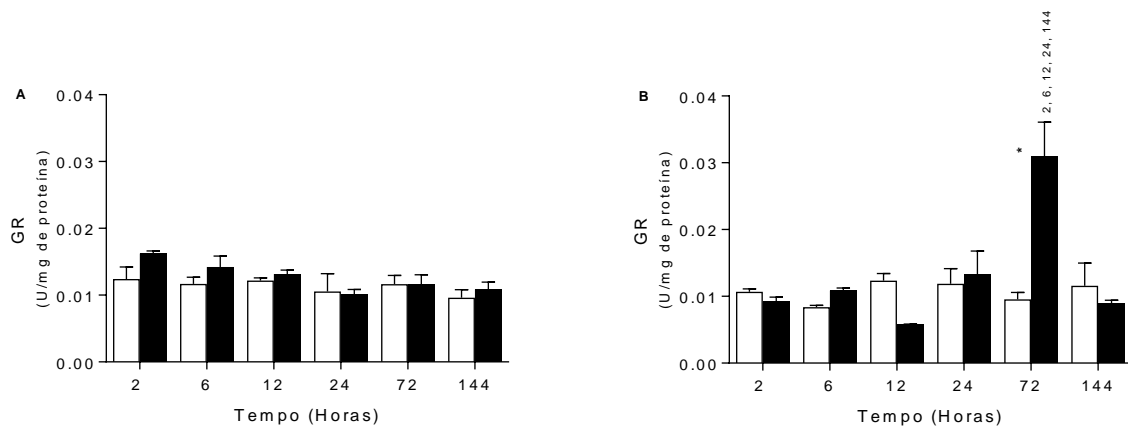
FIGURA 32 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Em *N. rossii*, os níveis de atividade da GR não variaram com a temperatura (Figura 33A; Tabela 7). Em *N. coriiceps*, os níveis de atividade da GR aumentaram apenas em 72h de exposição a 8°C (Figura 33B; Tabela 7).

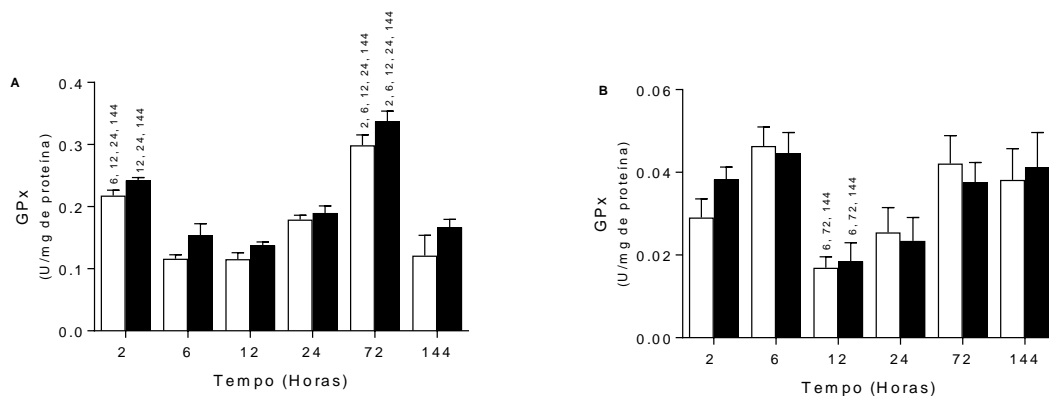
FIGURA 33 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE (GR) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de atividade da GPx não variaram com o aumento da temperatura em *N. rossii* (Figura 34A; Tabela 7) e em *N. coriiceps* (Figura 34B; Tabela 7).

FIGURA 34 - NÍVEIS DE ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPx) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

TABELA 7 - RESULTADOS DO TESTE ANOVA (DUAS VIAS) PARA AS ENZIMAS SOD (SUPERÓXIDO DISMUTASE), CAT (CATALASE), GST (GLUTATIONA-S-TRANSFERASE), GR (GLUATIONA REDUTASE), GPx (GLUTATIONA PEROXIDASE) E G6PDH (GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE) EM BRÂNQUIAIS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*.

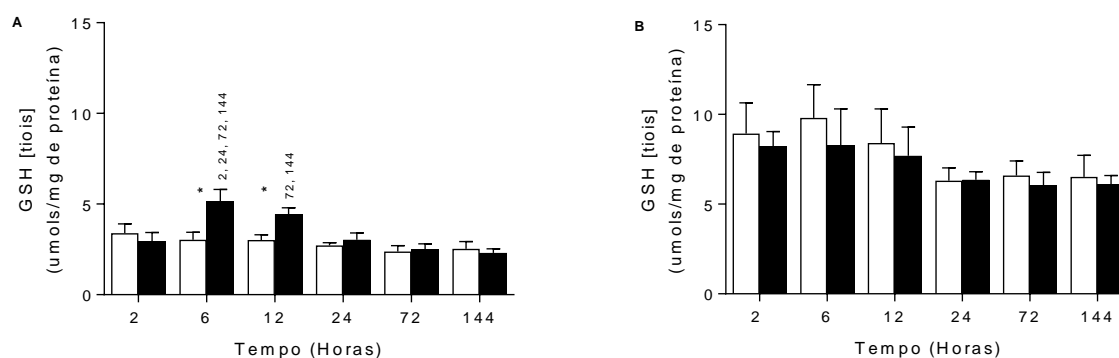
		<i>Notothenia rossii</i>			<i>Notothenia coriiceps</i>		
		Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti
SOD	F	1,11	1,25	0,04	1,26	0,51	0,70
	p	0,29	0,29	0,99	0,26	0,77	0,62
CAT	F	180,27	74,35	42,70	6,63	1,52	1,52
	p	<0,01*	<0,01*	<0,01*	0,01*	0,19	0,19*
GST	F	0,03	1,13	0,32	25,64	37,67	7,78
	p	0,86	0,35	0,90	<0,01*	<0,01*	<0,01*
GR	F	3,36	3,22	0,77	3,38	7,72	10,37
	p	0,07	0,01*	0,58	0,07	<0,01*	<0,01*
GPx	F	0,58	23,62	2,52	0,08	7,08	0,42
	p	0,44	<0,01*	0,03*	0,78	<0,01*	0,84

Fatores: temperatura (TE) (0°e 8°C) e tempo de exposição (TI) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). \* Indica diferenças significativas

## 5.8 NÍVEIS DE TIÓIS NÃO PROTEICOS E DE MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO APÓS ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO

Os níveis de GSH nas brânquias de *N. rossii* foram significativamente maiores nos animais submetidos por 6 e 12h a 8°C; a partir de 24h a 8°C, os níveis de GSH apresentam valores semelhantes aos apresentados pelo grupo controle (Figura 35A; Tabela 8). Em *N. coriiceps*, os níveis e GSH não variaram em resposta ao aumento da temperatura (Figura 35B; Tabela 8).

FIGURA 35 - NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO

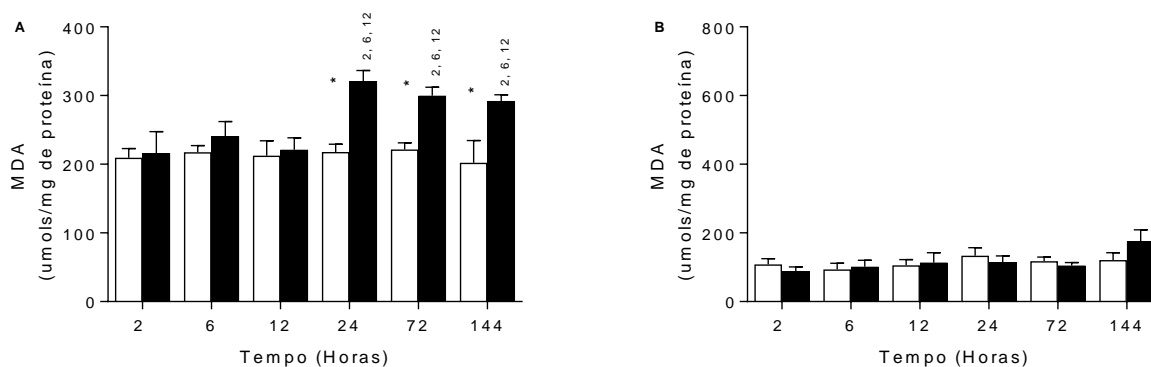


LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).



Os níveis de MDA nas brânquias de *N. rossii* foram significativamente maiores de 24 a 144h a 8°C (Figura 36A; Tabela 8). Em *N. coriiceps*, os níveis de MDA mantiveram-se constantes por todo o período de exposição (Figura 36B Tabela 8).

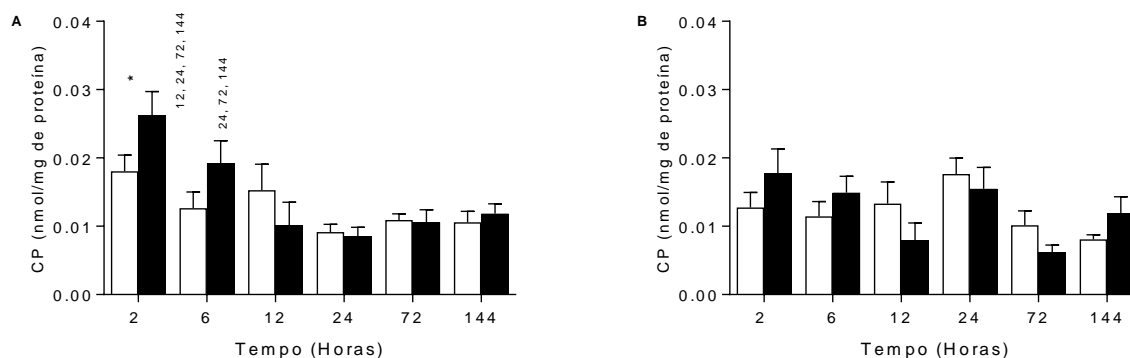
FIGURA 36 - NÍVEIS DE MALONDIALDEÍDO (MDA) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

Os níveis de CP, em *N. rossii*, foram significativamente maiores nas primeiras 2h a 8°C; a partir de 12h de exposição, foram semelhantes aos do grupo controle (Figura 37A; Tabela 8). Nas brânquias de *N. coriiceps*, os níveis de CP não variaram com o tempo de exposição nem com a temperatura (Figura 37B; Tabela 8).

FIGURA 37 - NÍVEIS DE PROTEÍNAS CARBONILADAS (CP) NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: A) *Notothenia rossii*; B) *Notothenia coriiceps*; barras brancas - 0°C; barras pretas - 8°C. Os números sobre as barras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição. Os asteriscos indicam diferenças entre as temperaturas. Os dados estão expressos como média + SEM (erro padrão da média).

TABELA 8: RESULTADOS DO TESTE ANOVA (DUAS VIAS) PARA OS NÍVEIS DE GSH (GLUTATIONA REDUZIDA), MDA (MALONDIALDEÍDO) E CP (PROTEÍNAS CARBONILADAS) EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps*.

		Temperatura	Tempo	TE x Ti	Temperatura	Tempo	TE x Ti
		<i>N. rossii</i>			<i>N. coriiceps</i>		
GSH	F	5,65	5,94	3,26	1,73	2,74	0,25
	p	0,02*	<0,01*	0,01*	0,94	0,02*	0,94
MDA	F	21,03	2,79	2,52	0,07	1,77	0,99
	p	<0,01*	0,02*	0,03*	0,79	0,13	0,42
CP	F	1,37	7,12	2,01	0,008	3,62	1,78
	p	0,25	<0,01*	0,85	0,93	<0,01*	0,12

FATORES: Temperatura (TE) (0°e 8°C) e tempo de exposição (TI) (2, 6, 12, 24, 72, 144 horas). \* Indica diferenças significativas

## 6. DISCUSSÃO

A compreensão dos efeitos da elevação da temperatura sobre o metabolismo de organismos marinhos antárticos é fundamental para estudos ecológicos e de biologia adaptativa, principalmente considerando as alterações nas temperaturas oceânicas na região da Península Antártica, registradas nas últimas décadas. Foram realizados dois conjuntos de experimentos para avaliar os efeitos do estresse térmico no potencial osmorregulatório, metabolismo energético e sistema de defesa antioxidante em brânquias de dois nototenídeos antárticos congêneros, *N. rossii* e *N. coriiceps*. O primeiro conjunto de experimentos pretendeu verificar se ambas as espécies conseguiriam tolerar longos períodos de exposição (até 30 dias), após choque térmico, a temperaturas muito superiores à média das águas da Antártica, mas utilizadas em outros trabalhos que pretenderam avaliar a plasticidade térmica de peixes antárticos (BRODTE et al., 2008; BUCKLEY; SOMERO; 2009; THORNE et al., 2010; WINDISCH et al., 2011; MACHADO et al., 2014; WINDISCH et al., 2014). As espécies estudadas no presente estudo não responderam de forma semelhante, já que *N. coriiceps* não conseguiu sobreviver por mais de 6 dias a 8°C, enquanto *N. rossii* sobreviveu até 30 dias a 8°C. Por isso, foram planejados experimentos de menor duração (até 144h, ou seja, 6 dias) com o objetivo de verificar se alterações no potencial osmorregulatório, metabolismo de carboidratos ou no sistema de defesa antioxidante contribuiriam com uma maior ou menor tolerância térmica em ambas as espécies.

### 6.1 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO POTENCIAL OSMORREGULATÓRIO BRANQUIAL

Com relação ao potencial osmorregulatório de *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidas a estresse térmico de curto prazo, foi observado que, enquanto os níveis de atividade da NKA branquial, em *N. coriiceps*, não foram alterados pela temperatura e pelo tempo de exposição, em *N. rossii* a temperatura de 8°C modulou positivamente a atividade da NKA. Ou seja, ambas as espécies apresentaram um potencial osmorregulatório diferente após exposição aguda a elevadas temperaturas.

O aumento dos níveis de atividade da NKA pode ser correlacionado com uma redução da osmolalidade sérica, já que essa enzima atua gerando o gradiente eletroquímico que direciona o efluxo de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  em peixes marinhos. Ou seja, em *N. rossii*, a exposição aguda a 8°C pode ter levado a uma redução na osmolalidade. Resultados obtidos em nosso grupo de pesquisa (dados não publicados) sugerem uma diminuição significativa da osmolalidade de *N. rossii* submetida a aquecimento de 8°C, já que foram observados níveis extremamente baixos das concentrações plasmáticas de  $\text{Cl}^-$ , principalmente no tempo de exposição de 30 dias, sugerindo que os níveis de atividade da NKA permanecem elevados, podendo aumentar, inclusive, em exposição crônica ao aquecimento.

A alteração na osmolalidade é considerada uma resposta secundária ao estresse, sendo uma das consequências do aumento dos níveis séricos de cortisol (BARTON, 2002). Em peixes, o cortisol, além de mediar as respostas ao estresse, atua secundariamente na regulação iônica, função essa desempenhada pela aldosterona em vertebrados superiores (ABO HEGAB; HANKE 1984; LAIZ-CARRION et al. 2003). Alguns estudos verificaram uma correlação positiva entre aumento nos níveis de cortisol, proliferação das células de cloreto e aumento nos níveis de atividade da NKA (FOSKETT et al. 1983; MCCORMICK 1995; DANG et al. 2000), além de uma maior expressão das subunidades  $\alpha$  da NKA (MADSEN et al., 1995; DEANE, et al., 2000), responsável pela atividade catalítica da enzima. Entretanto, isso parece não ser uma regra, já que, em *T. bernacchii* aclimatados a 4°C por 4 semanas, a osmolalidade sérica diminuiu, mas os níveis de cortisol mantiveram-se constantes (HUDSON et al., 2008).

Os níveis de atividade aumentados de NKA poderiam ser consequência, também, do aumento da fluidez de membrana, resultado de uma alteração na composição dos ácidos graxos, o que favoreceria a atividade de alguns transportadores de membrana, como a NKA (GIBBS, 1995). Essa alteração na fluidez de membrana é dependente da temperatura, mas pode ocorrer tanto em animais aclimatados ao calor quanto ao frio. Na truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, aclimatada a elevadas temperaturas, por exemplo, houve uma alteração na composição lipídica das membranas, devido a um aumento dos níveis de colesterol e diminuição dos ácidos graxos poliinsaturados (ROBERTSON; HAZEL, 1995). Já em *Rutilus rutilus* e *Salvelinus alpinus*, ambos peixes de água doce, a atividade da NKA, em brânquias e rins, aumentou com a aclimatação ao frio (SCHWARZBAUM et

al., 1991), como consequência de alterações na composição lipídica, principalmente aumento da proporção de ácidos graxos insaturados e aumento das cadeias lipídicas, para garantir a fluidez das membranas em temperaturas mais frias (HAZEL, 1984).

Conforme será discutido adiante (seção 6.3), o elevado índice de LPO em *N. rossii* submetida a estresse térmico pode indicar que houve uma alteração na fluidez das membranas, em decorrência dos elevados níveis de MDA, que, por sua vez, pode ter estimulado os níveis de atividade da NKA nessa espécie. Entretanto, o aumento dos níveis de atividade da NKA nem sempre são correlacionados à variação da composição lipídica e fluidez das membranas. Por exemplo, no peixe antártico *Trematomus bernacchii*, o aquecimento promoveu um aumento nos níveis de atividade da NKA, sem, no entanto, alterar a composição de ácidos graxos e, consequentemente, a fluidez (GONZALEZ-CABRERA et al., 1995).

A elevação da atividade da NKA após aclimação ao calor parece ser resultado de outros fatores, além da elevação sérica do cortisol e alteração na composição lipídica das membranas. De fato, os maiores níveis de atividade da NKA, em resposta ao aquecimento, muito provavelmente ocorre devido a um maior *turnover* enzimático, ou seja, maior conversão de moléculas de substrato em produto por segundo. Isso foi demonstrado por Guynn e colaboradores (2002) em *T. bernacchii* aclimatados a 4°C por 5 semanas, sugerindo que esse maior *turnover* é devido a uma alteração da NKA pelos seus substratos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Mg}^{+2}$  e ATP), que, por sua vez, ocorre devido a uma alteração na composição de aminoácidos da subunidade  $\alpha$  da NKA (GONZALEZ-CABRERA et al, 1995; GUYNN et al., 2002).

Se para *N. rossii* a exposição aguda resultou em aumento dos níveis de atividade da NKA, em *N. coriiceps*, os níveis de atividade dessa enzima não variaram com o tempo de exposição, nem com o aquecimento. Em um estudo com *T. bernacchii*, submetidos a 4°C por 6 dias, também não se observou redução da osmolalidade, como consequência de uma maior atividade da NKA (ROBINSON, 2008). Provavelmente, nessa espécie, o período agudo de exposição não foi suficiente para promover as alterações moleculares necessárias para o aumento do *turnover* da NKA. Conforme dados do nosso grupo de pesquisa, as concentrações plasmáticas de  $\text{Cl}^-$  diminuem de forma significativa após 30 dias a 4°C. É provável que longos períodos de exposição a 8°C também resultem em uma diminuição da osmolalidade, como consequência do aumento dos níveis de atividade da NKA.

A manutenção da tonicidade demanda energia, na ordem de 2-4% do consumo de oxigênio em repouso (MORGAN; IWAMA, 1999). Além disso, um dos processos que mais consomem energia é a síntese e manutenção da atividade da NKA (JOBILING, 1993). Ou seja, as consequências de um maior turnover da NKA, além da diminuição da osmolalidade, seria um aumento do consumo energético pelas brânquias. Entretanto, como será discutido na seção 6.2, o aumento dos níveis de atividade da NKA, com o estresse térmico de curto prazo, parece não ter aumentado a necessidade energéticas das brânquias de *N. rossii*. Também não houve correspondência entre a elevação da demanda energética pelas brânquias de *N. coriiceps* com aumento dos níveis de atividade da NKA, já que os níveis de atividade dessa enzima permaneceram constantes durante exposição de curto prazo a 8°C. Provavelmente, outros eventos, além da manutenção da tonicidade, estão demandando grande quantidade de energia nas brânquias dessa espécie. Um dos efeitos do cortisol sob as brânquias é estimular a proliferação das MRC (SLOMAN et al., 2000), o que resulta em uma barreira de difusão mais espessa entre o sangue a água, dificultando as trocas gasosas através das brânquias (BINDON et al., 1994). Com essa barreira mais espessa, o peixe precisa aumentar a ventilação, o que requer maior gasto energético pelas brânquias (PERRY, 1997; SLOMAN et al., 2000).

## 6.2 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS BRANQUIAL

As alterações nos níveis de atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos estudadas, após exposição a elevadas temperaturas, a curto e a longo prazo, não ocorreram da mesma maneira para os nototenídeos antárticos *N. rossii* e *N. coriiceps*.

Com relação ao metabolismo de carboidratos branquial de *N. rossii*, em resposta ao estresse térmico de curto prazo, os níveis de atividade das enzimas HK, PFK, CS e MDH não se alteraram, quando comparados com o controle, sugerindo uma manutenção do fluxo glicolítico e do ciclo do ácido cítrico. Nas primeiras horas (6h), houve aumento nos níveis de lactato, com inibição da LDH branquial, possivelmente por mecanismo de retroalimentação. A partir de 12h, os níveis de lactato retornam aos valores apresentados pelo grupo controle, seguido por um

aumento da LDH, após 72h. A exposição de curto prazo a 8°C parece, então, ter ativado o metabolismo anaeróbico branquial em *N. rossii*, devido, provavelmente a uma redução da disponibilidade de oxigênio.

A manutenção dos níveis de atividade da G6PDH com o aquecimento em *N. rossii*, sugere que a glicose não está sendo direcionada às vias biossintéticas, mas como substrato energético. Em peixes, a via das pentoses fosfato é usualmente considerada no contexto de uma menor adaptação ao frio (WALSH et al., 1985). Na carpa, *Cyprinus carpio*, por exemplo, a diminuição da temperatura da água (27 para 17°C), levou a uma ativação das pentoses fosfato desidrogenases, levando a um aumento da síntese de ácidos graxos e da deposição de gordura (SHIMENO; SHIKATA, 1993).

A quantificação do conteúdo de glicogênio é uma ferramenta interessante para o monitoramento do metabolismo energético de um tecido (CHANG et al., 2007; TSENG; HUANG, 2008). O fígado é o principal sítio envolvido no *turnover* da glicose em peixes e outros vertebrados (TSENG; HUANG, 2008). Entretanto, foram identificados depósitos de glicogênio localizados em um grupo de células nas brânquias de tilápia (*Oreochromis niloticus*), denominadas células ricas em glicogênio (*glycogen-rich cells* - GRCs). Essas células expressam isoformas branquiais tanto da glicogênio fosforilase (GP), quanto da glicogênio sintase (GS), indicando uma atividade glicogenolítica e glicogênica nas brânquias (TSENG et al., 2007). Portanto, as brânquias podem contar com a mobilização de suas reservas glicogênicas em situações que demandam grande quantidade de energia, como por exemplo, durante o estresse térmico (CHANG et al., 2007).

Em *N. rossii*, observou-se uma manutenção das reservas de glicogênio branquiais, após 144h de exposição a 8°C. A manutenção dos fluxos glicolítico e, bem como a manutenção das reservas branquiais de glicogênio sugerem que o estresse térmico, pelo menos num curto período de exposição (até 144h), não promoveu uma maior mobilização das reservas energéticas branquiais em *N. rossii*. A exposição a 4°C, mesmo por um longo período de exposição, também não alterou os níveis de atividade das enzimas avaliadas. A manutenção dos níveis de piruvato, ao longo de todo o período de exposição a 8°C, sugere um equilíbrio entre a produção e o consumo desse intermediário metabólico.

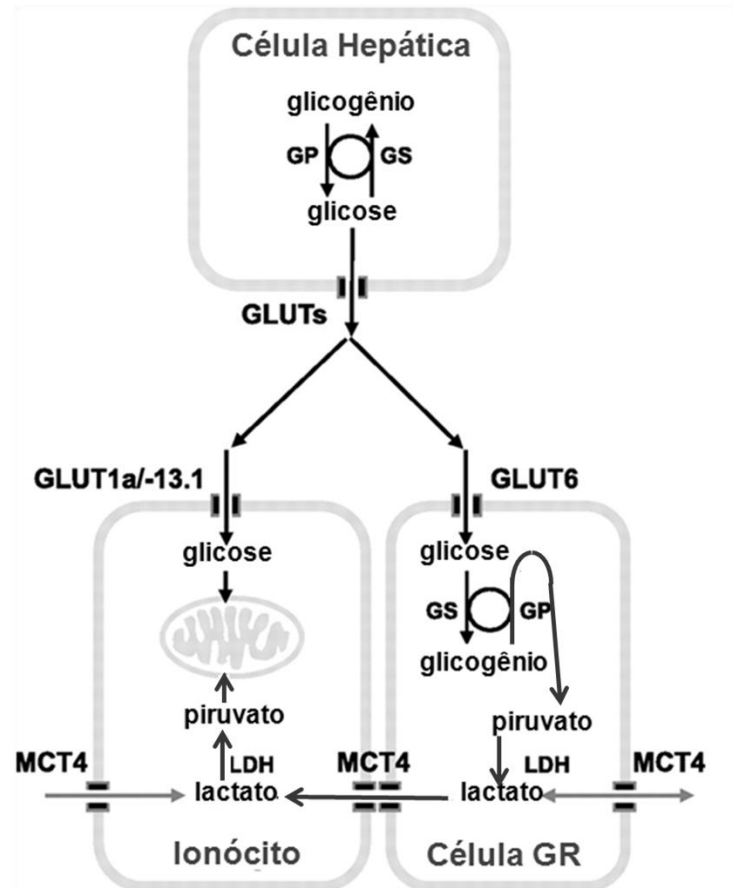
Observou-se que os níveis de atividade de MDH e LDH nas brânquias de *N. rossii* aumentaram apenas após 15 dias de exposição a 8°C, diminuindo novamente

em 30 dias a 8°C. Como os níveis de atividade da CS aumentaram ou apresentaram valores semelhantes ao controle, dependendo do tempo de exposição, é provável que o metabolismo aeróbico branquial em *N. rossii* tenha sido recuperado com a exposição a longo prazo a 8°C. Uma possível justificativa para a elevação da LDH, normalmente utilizada como marcador de metabolismo anaeróbico, juntamente com MDH e CS, marcadores do metabolismo aeróbico, seria a atuação de isoformas de LDH consumidoras de lactato, abundantes em brânquias de peixes (LOW et al., 1993; TSENG; HWANG, 2008). Essas isoformas da LDH convertem o lactato, gerado por outros tecidos em anaerobiose ou produzidos pelas próprias brânquias a partir da glicogenólise nas GRCs (Figura 38), em piruvato, que, por sua vez, pode ser convertido em acetil-CoA e completamente oxidado no ciclo do ácido cítrico (TSENG et al., 2008).

Com o aquecimento, a disponibilidade de oxigênio diminui, devido à solubilidade do oxigênio ser inversamente proporcional à temperatura. Ao mesmo tempo, o metabolismo dos organismos ectotérmicos aumenta, criando uma incompatibilidade entre o suprimento e a demanda por oxigênio (BEERS; SIDELL, 2011). Ou seja, em organismos ectotérmicos, a elevação da temperatura pode promover hipóxia (PÖRTNER et al., 2005), o que parece ter acontecido nas brânquias de *N. rossii* após exposição de curto prazo a 8°C, sendo que, após 15 dias, o metabolismo aeróbico foi ativado novamente. No invertebrado *Arenicola marina* (SOMMER et al., 1997) e no coração e musculatura do peixe temperado *Zoarces viviparus*, o metabolismo aeróbico também foi ativado após um período de anaerobiose com o estresse térmico quente (24°C) (VAN DJIK et al., 1999). Esse processo é fundamental, pois o acúmulo de intermediários da anaerobiose pode causar acidose metabólica (BARTON et al., 2002), limitando a performance e podendo levar à morte do organismo (PECK et al., 2002; PÖRTNER; FARREL, 2008). Sommer e colaboradores (1997) afirmam que a estabilização da demanda por oxigênio, em resposta a estabilização da demanda energética, pode ser reflexo de uma aclimação às temperaturas elevadas e, conseqüentemente, aumenta a temperatura crítica superior (temperatura em que se observa ativação do metabolismo anaeróbico). Portanto, é provável que *N. rossii* tenha conseguido aclimatar-se à temperatura de 8°C após exposição de longo prazo, devido, provavelmente, à inibição do metabolismo anaeróbico.



FIGURA 38 - MODELO REPRESENTATIVO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DAS CÉLULAS BRANQUIAIS



NOTA: O fígado desempenha um papel central no metabolismo de carboidratos, a principal fonte de energia utilizada pelas brânquias. Através da via glicogenolítica, o fígado libera glicose na corrente sanguínea, que pode ser captada pelas brânquias, tanto pelos ionócitos (células ricas em mitocôndrias), quanto pelas células ricas em glicogênio (GRCs). Sob condições fisiológicas normais, as GRCs armazenam a glicose captada na forma de glicogênio e os ionócitos oxidam completamente a glicose para o fornecimento de ATP para o seu metabolismo normal. Sob condições em que as brânquias demandam muita energia (em vermelho), o glicogênio branquial pode ser mobilizado, produzindo lactato, ao final do processo. O lactato, por sua vez, pode ser transportado ao ionócito, onde poderá ser utilizado como substrato energético, de forma adicional à glicose captada da corrente sanguínea. Nessas condições, o lactato circulante também poderá ser utilizado como substrato energético.. Legenda: célula GR - célula rica em glicogênio; GS - glicogênio sintase; GP - glicogênio fosforilase; LDH - lactato desidrogenase; MCT4 - transportador monocarboxilato; GLUT - transportador de glicose (cada tipo celular apresenta uma isoforma de GLUT diferente). FONTE: adaptado de HWANG et al., 2011.

Nas brânquias de *N. coriiceps*, as alterações nas vias do metabolismo de carboidratos durante a exposição a 8°C foram distintas de acordo com o tempo de exposição ao estresse térmico. Em 6h, observou-se uma elevação dos níveis de lactato branquial, sugerindo uma ativação no metabolismo anaeróbico com o estresse térmico inicial. Um aumento na concentração de produtos finais do metabolismo anaeróbico após exposição a temperaturas elevadas já foi observado nas espécies de peixes antárticos *P. borchegevinki* (RYAN, 1995), *Pachycara brachycephalum* e no peixe temperado *Zoarcetes viviparus* (VAN DJIK et al., 1999). O

acúmulo de succinato e lactato também foi observado em tecidos de peixes, tanto em situações de hipóxia, como de anóxia (LOW et al., 1993; OMLIN; WEBER, 2010; O'CONNOR et al., 2011). Ou seja, a presença desses metabólitos indica uma deficiência de oxigênio nos tecidos, sendo uma resposta comum dos organismos ectotérmicos expostos a temperaturas elevadas (VAN DJIK et al., 1999). Uma situação diferenciada foi observada, nas brânquias de *N. coriiceps*, a partir de 72h, pois apesar da elevação na LDH e lactato, indicativos de metabolismo anaeróbio, também houve elevação nos níveis de atividade de enzimas chave da respiração celular, CS e MDH. Além disso, percebeu-se uma redução na concentração de glicogênio, indicativo de glicogenólise, sugerindo um aumento na demanda energética das brânquias de *N. coriiceps*.

Os níveis de atividade da G6PDH reduziram nas primeiras 12h de exposição a 8°C, sendo que essa resposta parece estar mais relacionada com o estresse oxidativo que com o metabolismo energético, portanto, será melhor discutido na seção 6.3.

A exposição de *N. coriiceps* a 4°C resultou em maiores níveis de atividade da LDH branquial após 30 dias de exposição, sugerindo uma ativação do metabolismo anaeróbico. A elevação dos níveis de atividade da MDH pode ser justificada pelo fato dessa enzima também atuar em outros processos, tais como gliconeogênese, síntese de aminoácidos, manutenção do estado redox, e transporte de metabólitos entre o citoplasma e organelas (GIETL, 1992; MUSRATI et al., 1998; NELSON; COX, 2011), que podem ter sido estimulados frente à elevação térmica.

Portanto, apesar de na exposição a curto prazo a 8°C, as brânquias de *N. coriiceps* terem mantido o metabolismo aeróbico, a exposição a longo prazo a 4°C parece ter induzido o metabolismo anaeróbico nessa espécie. Em temperaturas elevadas, a concentração de oxigênio dissolvido na água é reduzida, entretanto as taxas de absorção de oxigênio são aumentadas devido a sua alta taxa metabólica (DAS et al., 2004). Nesse contexto, apesar das brânquias apresentarem metabolismo altamente aeróbico, possivelmente o fornecimento de oxigênio a órgãos vitais, como coração e cérebro, esteja sendo priorizado e devido a isso, observou-se sinais metabólicos de hipóxia nesse tecido. Evans e colaboradores (2005) demonstraram que em caso de depleção de oxigênio, as brânquias, são o primeiro tecido a ser sensibilizado.

*Notothernia coriiceps* não conseguiu sobreviver por mais de 6 dias a temperatura de 8°C, apresentando menor tolerância térmica que *N. rossii*. MARK e colaboradores (2012) verificaram uma redução no desempenho de mitocôndrias de *N. rossii* a uma temperatura superior (9°C) que de *N. coriiceps* (6°C), sugerindo, também, uma menor tolerância térmica nessa espécie.

A indução da anaerobiose nas brânquias de *N. coriiceps* pode ter contribuído com a morte dos indivíduos dessa espécie após exposição de curto prazo a 8°C. Sendo assim, é provável que a exposição aguda ao aquecimento comprometa os processos de entrega de oxigênio aos tecidos de *N. coriiceps*, promovendo uma hipóxia induzida pela temperatura. Outras espécies de peixes antárticos (*T. bernacchii*, *Trematomus hansonii* e *Trematomus penelli*) também não conseguiram sobreviver após exposição aguda a elevadas temperaturas (4°C) (ROBINSON, 2008). A morte desses animais, assim como observado no presente estudo e por Podrabsky e Somero (2006), foi precedida por desorientação na coluna d'água e incapacidade de manutenção do equilíbrio, o que sugere uma deficiência de oxigênio nos tecidos. Windisch e colaboradores (2014) também observaram mortalidade do peixe antártico *Pachycara brachycephalum* submetido a estresse térmico de 7 (morte de um indivíduo) e 9°C (mortalidade de 50% dos indivíduos) durante o período de 2 meses de exposição. Os autores apontam que essas temperaturas encontram-se além do limite de tolerância térmica superior a longo-prazo dessa espécie.

Apesar dos dados sugerirem uma ativação da anaerobiose, é necessário considerar outros fatores que podem ter contribuído com a morte de *N. coriiceps* após exposição a 8°C. Beers e Sidell (2011) verificaram um aumento nos níveis de mRNA do fator indutor de hipóxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) no coração de *N. coriiceps* submetida à respectiva CT<sub>max</sub>. Já foi demonstrado que a função cardíaca pode diminuir drasticamente após exposição aguda a elevadas temperaturas, podendo causar a morte (SOMERO, 2010). Além disso, devido à sensibilidade das membranas celulares a variações térmicas, essas estruturas podem ser desestabilizadas após exposição a temperaturas elevadas, o que poderia resultar em alterações no gradiente de pH através das membranas e alcalinização do meio intracelular (VAN DIJK et al., 1999).

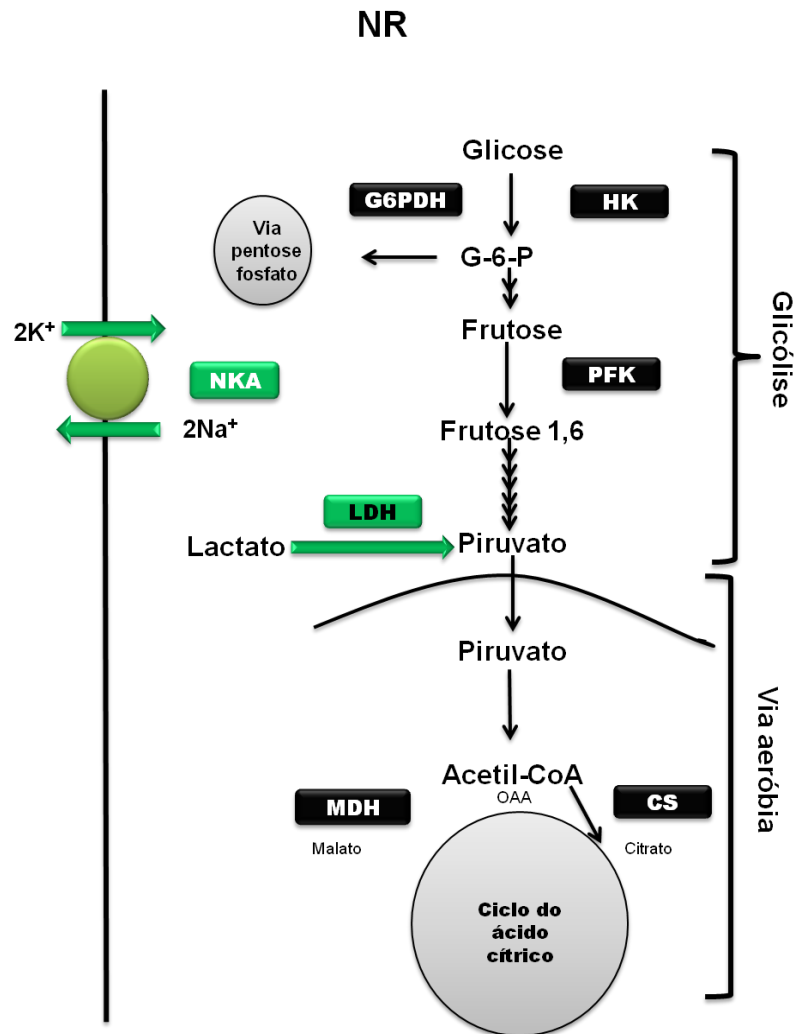
Poderia-se pensar que o choque térmico teria sido responsável pela morte de *N. coriiceps* à curta exposição a 8°C. Porém, experimentos recentes realizados por

nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados), em que exemplares de *N. rossii* e *N. coriiceps* foram submetidos a aumento gradativo da temperatura da água (0,5°C a cada 24h), observou-se morte de *N. coriiceps* após a temperatura da água atingir 6°C.

As respostas diferentes apresentadas por *N. rossii* e *N. coriiceps*, após exposição a elevadas temperaturas podem estar relacionadas ao estado ontogenético das duas espécies. O método de coleta utilizado neste trabalho permitiu a captura de indivíduos juvenis de *N. rossii* e adultos de *N. coriiceps*, segundo Burchet (1983) e Sapota (1999). Sandesfeld e colaboradores (2015) apontaram que a tolerância térmica está intimamente associada ao estágio ontogenético. Enquanto os estágios iniciais do desenvolvimento são altamente sensíveis a variações térmicas, os indivíduos juvenis e adultos em crescimento conseguem explorar ambientes com maior variação térmica. Por outro lado, nos animais adultos, sexualmente maduros, a tolerância térmica diminui novamente, uma vez que grande parte do oxigênio é direcionado aos gametas em desenvolvimento (PÖRTNER; FARRELL, 2008; PÖRTNER; PECK, 2010, PECK et al., 2013).

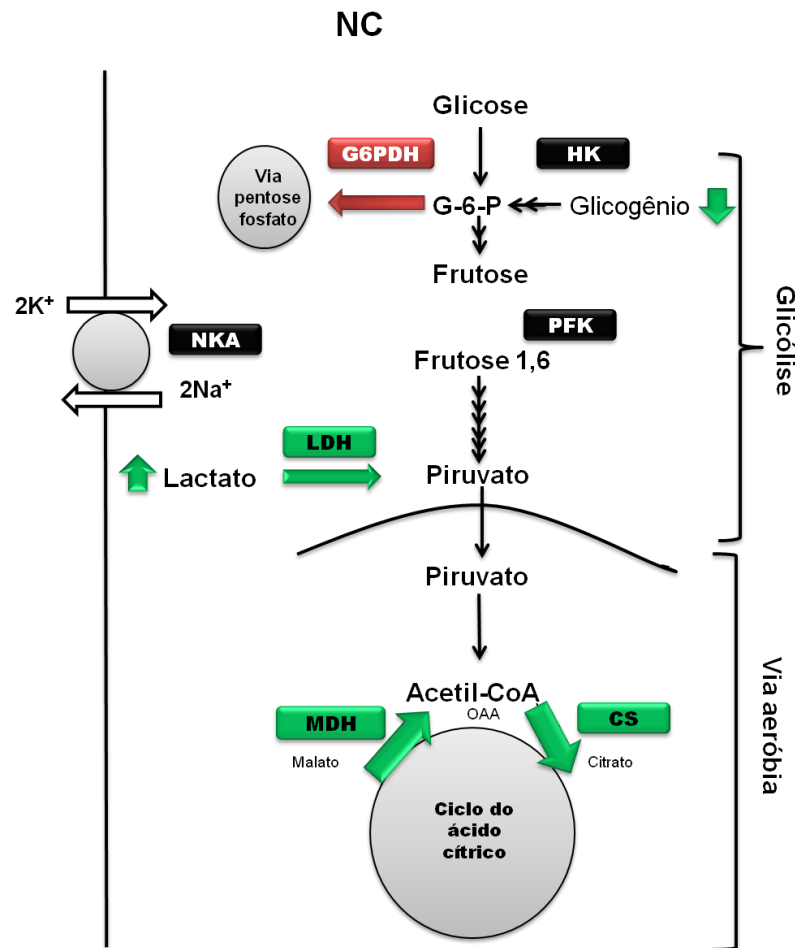
Diante do que foi exposto, os resultados obtidos para *N. coriiceps* corroboram a hipótese inicial, sendo que se observou um aumento da demanda energética pelas brânquias dessa espécie e morte após 6 dias de exposição a 8°C, devido, provavelmente a uma falha nos processos de entrega de oxigênio aos tecidos ou por danos mitocondriais. *N. rossii*, entretanto, parece ter conseguido reverter a condição de hipóxia frente a exposição prolongada ao aquecimento, conseguindo tolerar, além do choque térmico, a exposição prolongada a 8°C. Nas figuras 39 a 41, encontram-se resumidos, sob a forma de esquema, os efeitos da elevação da temperatura no potencial osmorregulatório e metabolismo de carboidratos nas brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps*.

FIGURA 39 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E ATIVIDADE DA Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossi* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); LDH (lactato desidrogenase); CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OOA (oxaloacetato). Preto: atividade não variou; verde: atividade aumentou

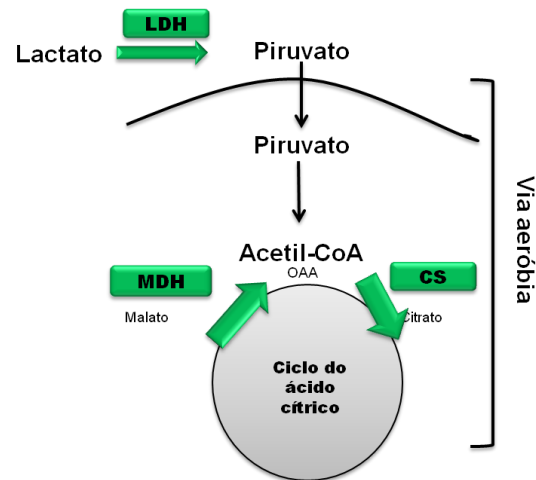
FIGURA 40 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E ATIVIDADE DA Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



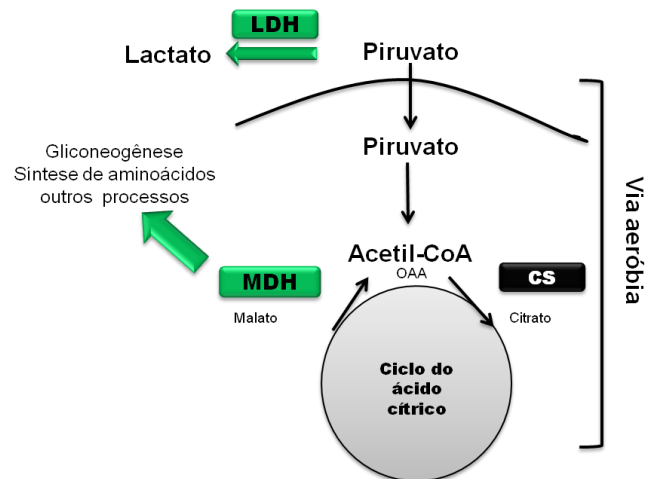
LEGENDA: HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); LDH (lactato desidrogenase); CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OAA (oxaloacetato). Preto: atividade não variou; verde escuro: atividade aumentou; verde claro: atividade apresentou tendência de aumento; vermelho: atividade reduziu

FIGURA 41 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO METABOLISMO ENERGÉTICO EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii* E *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE 8°C POR ATÉ 30 DIAS

**A – *Notothenia rossii***



**B – *Notothenia coriiceps***



LEGENDA: LDH (lactato desidrogenase; CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OAA (oxaloacetato). Preto: atividade não variou; verde: atividade aumentou.

### 6.3 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E NOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO

Considerando que o estresse térmico pode promover estresse oxidativo, foram investigadas as respostas do sistema de defesa antioxidante e em marcadores de danos oxidativos nas brânquias de dois nototenídeos antárticos submetidos a choque térmico seguido por exposição de curto e longo prazo a elevadas temperaturas.

Nas primeiras horas de exposição de *N. rossii* a 8°C, observou-se que os níveis de atividade da SOD, GST, GR, GPx e G6PDH mantiveram-se constantes, enquanto que os níveis de atividade da CAT e níveis de GSH, MDA e PCO aumentaram de forma transiente. Uma manutenção da atividade da SOD e da GPx e um aumento dos níveis de GSH foram observados no peixe temperado *Zoarces viviparus* após 2h de exposição ao estresse térmico frio (1°C) (HEISE et al., 2006). A elevação da CAT branquial de *N. rossii* pode estar relacionada com o aumento da produção de peróxido de hidrogênio, pois um aumento de níveis de atividade de enzimas antioxidantes primárias, como a CAT, está associado a um maior potencial antioxidante de um tecido (TORT et al., 2005; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006b; VINAGRE et al., 2012). Porém, apesar da elevação de CAT com o estresse térmico, juntamente com o aumento da concentração de GSH, houve um aumento dos marcadores de danos oxidativos, LPO em 24h 72 e 144h, e PC após 2h, nas brânquias de *N. rossii*. Esses resultados estão de acordo com o observado em outros estudos, que demonstraram um aumento da LPO promovido por estresse térmico de curto prazo (até 144h a 8°C) no fígado de *N. rossii* (MACHADO et al., 2014) e no rim, fígado e encéfalo de *Carassius auratus* submetidos a 35°C por até 12h (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006a; 2006b). Vinagre e colaboradores (2012) também constataram aumento da LPO e da atividade da CAT em *Dicentrarchus labrax* expostos a 28°C.

O *status* da GSH parece estar diretamente relacionado a resistência aos estressores oxidativos nos peixes (LEGGATT et al., 2006). Apesar do aumento do conteúdo de GSH em brânquias de *N. rossii*, não houve variação nos níveis de atividade da GR, GPx e GST. Heise e colaboradores (2007) relataram um perfil semelhante de resultados no fígado do peixe temperado *Zoarces viviparus*, após 2h de exposição ao estresse térmico frio (1°C), sendo que não houve alteração na atividade das enzimas SOD e GPx e houve um aumento dos níveis de GSH. Portanto, o aumento dos níveis de GSH, um componente importante do sistema de defesa antioxidante parece estar relacionado com a resposta ao estresse térmico.

O aumento da LPO observado nas brânquias de *N. rossii* também ser decorrente da ação de radicais hidroxila, gerados durante a hipóxia tecidual verificada nesses tempos de exposição. A hipóxia tecidual pode ativar a óxido nítrico sintase (NOS) levando à formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS), como os radicais de óxido nítrico (NO), que, por sua vez, podem se combinar com o O<sub>2</sub><sup>-</sup>



gerando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), um agente oxidante que pode gerar o radical hidroxila, extremamente reativo e capaz de induzir LPO (HOCHACKA; LUTZ, 2001; SUBUDHI et al., 2001).

Com a exposição prolongada de *N. rossii*, tanto a 4 quanto a 8°C, os níveis de atividade da SOD, CAT, GST e GSH mantiveram-se semelhantes ao controle, enquanto os níveis de MDA aumentaram de forma significativa a 8°C, após 30 dias de exposição. Resultados semelhantes foram obtidos com o peixe antártico *Pachycara brachycephalum*, exposto a 5°C por 11 semanas (HEISE et al., 2005). Nessa espécie, a manutenção ou o aumento da atividade de alguns antioxidantes enzimáticos, sugere que essa temperatura não é crítica para a homeostase redox nesses animais, mesmo tendo apresentado maiores índices de LPO hepática.

As brânquias de *N. rossii*, já num curto período de exposição a exposição a 8°C sofreu estresse oxidativo, devido à ocorrência de CP e LPO (Figura 42). Com o estresse térmico de longo prazo (30 dias a 8°C) (Figura 43), os índices de LPO aumentaram ainda mais. Esse elevado índice de LPO é esperado para peixes antárticos sob estresse oxidativo, tendo em vista o elevado nível de ácidos graxos mono e poliinsaturados nesses animais (SIDEELL, 1998), alvos do processo de LPO.

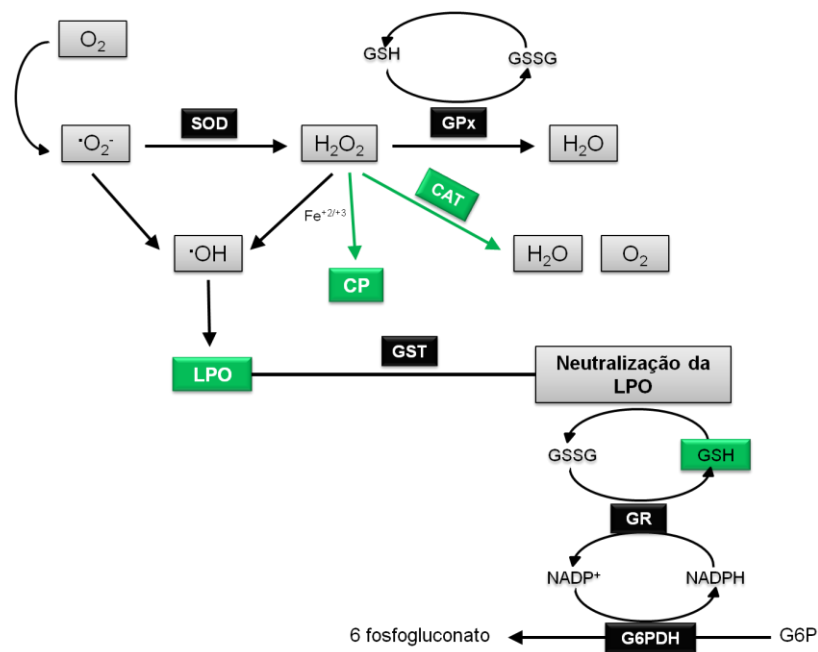
O estresse térmico de curto prazo, em *N. rossii*, resultou em aumento nos níveis de atividade da NKA, conforme apresentado e discutido anteriormente. É possível que o elevado índice de LPO, nessa condição experimental, tenha sido, ao menos parcialmente, responsável pelos maiores níveis de atividade dessa enzima. Como a NKA é uma enzima transmembrana, seus níveis de atividade são altamente dependentes da fluidez de membrana, que acaba sendo alterada pelo processo de LPO (REITER et al., 2014).

Com relação à resposta do sistema antioxidante das brânquias de *N. coriiceps*, observou-se que os níveis de atividade da SOD, CAT, GPx, e níveis de GSH, MDA e PCO mantiveram-se constantes, e os níveis de atividade da GST e GR aumentaram, enquanto os níveis de atividade da G6PDH diminuíram com o estresse térmico de curto prazo a 8°C (Figura 44). A literatura já relatou manutenção dos níveis de CAT e SOD em *N. coriiceps* (MUELLER et al., 2012; MACHADO et al., 2014) e em outras espécies de peixes antárticos (*T. bernacchii*, *T. newnesi* e *P. borchgrevinkii*; ENZOR; PLACE, 2014) após exposição a elevadas temperaturas.

A GST apresenta função preponderante na defesa oxidativa e na eliminação de produtos peroxidativos do DNA e lipídios (OLIVA et al., 2012). Portanto, o

aumento da GST com o estresse térmico pode ter contribuído com a proteção das brânquias de *N. coriiceps* contra a LPO, como observado por Mueller e colaboradores (2012), em que os níveis de MDA e de proteínas oxidadas em coração de nototenídeos não variou após exposição às CTMax.

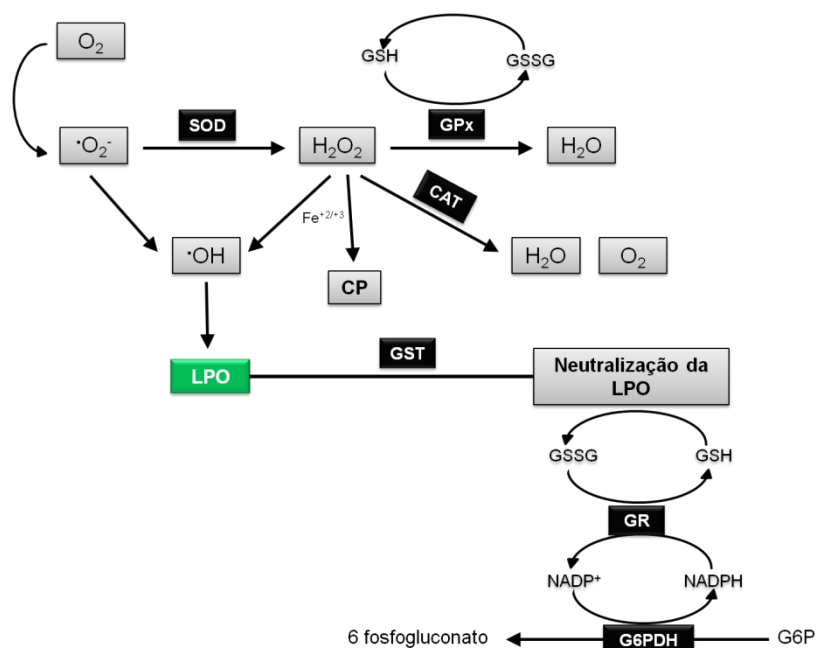
FIGURA 42 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS EM BRÂNQUIAS DE *Notothernia rossii* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); oxigênio molecular ( $O_2$ ); superóxido dismutase (SOD); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); água ( $H_2O$ ); catalase (CAT); glutaciona peroxidase (GPx); glutaciona reduzida (GSH); glutaciona dissulfeto (GSSG); glutaciona redutase (GR); glutaciona-S-transferase (GST); lipoperoxidação (LPO); carbonilação de proteínas (CP). Em verde: atividade ou níveis aumentaram.

A enzima G6PDH é fundamental para a síntese de NADPH e 5-fosforibosil pirofosfato, sendo que a coenzima reduzida é essencial na proteção da célula contra o estresse oxidativo (CARVALHO; FERNANDES, 2008). Logo, era esperado que a redução nos níveis de atividade da G6PDH resultasse em um prejuízo para o sistema de defesa antioxidante. Porém, os resultados sugerem que a exposição de curto prazo promoveu uma resposta do sistema antioxidante eficiente nas brânquias de *N. coriiceps*, tendo em vista a ausência de danos oxidativos.

FIGURA 43 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS EM BRÂNCUIAS DE *Notothenia rossii* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



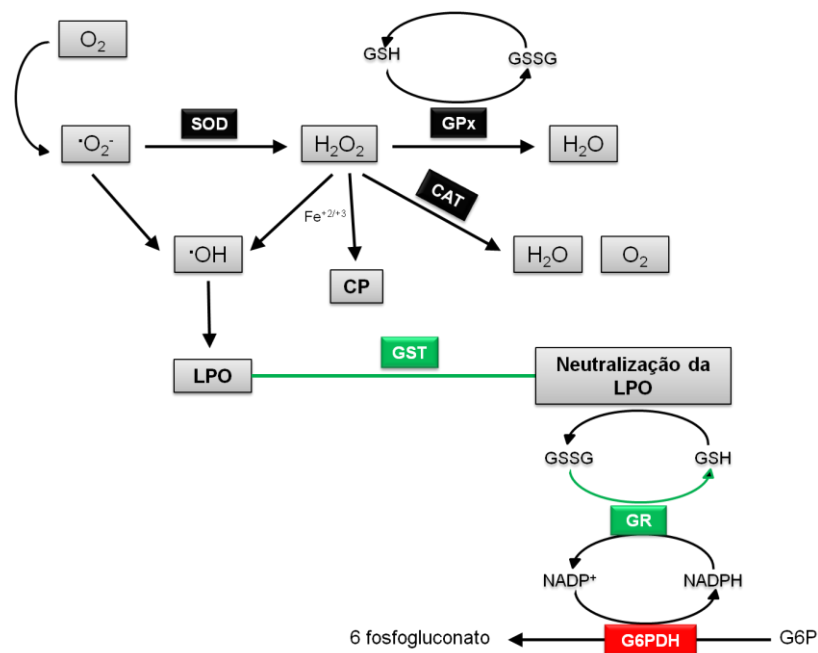
LEGENDA: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); oxigênio molecular ( $O_2$ ); superóxido dismutase (SOD); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); água ( $H_2O$ ); catalase (CAT); glutaciona peroxidase (GPx); glutaciona reduzida (GSH); glutaciona dissulfeto (GSSG); glutaciona redutase (GR); glutaciona-S-transferase (GST); lipoperoxidação (LPO); carbonilação de proteínas (CP). Em verde: atividade ou níveis aumentaram; em vermelho: diminuíram.

A exposição prolongada de *N. coriiceps* a 4°C resultou em aumento nos níveis de atividade da SOD, e CAT e nos níveis de MDA, manutenção dos níveis de atividade de GST e GSH (Figura 45). Esses resultados sugerem que o sistema antioxidante de *N. coriiceps* foi estimulado com a exposição a elevadas temperaturas e que a exposição prolongada a 4°C resultou em estresse oxidativo, ou seja, uma produção desequilibrada de EROs, que culminou em LPO. Da mesma forma que em *N. rossii* submetidas a estresse térmico de curto prazo, o aumento de LPO, observada nas brânquias de *N. coriiceps* sob exposição prolongada a 4°C, pode ter sido decorrente, além da deficiência em seu sistema de defesa antioxidante, da hipóxia tecidual, que pode promover ativação da NOS e, conseqüentemente, geração de RNS (HOCHACKA; LUTZ, 2001; SUBUDHI et al., 2001).

As diferenças nas respostas apresentadas por *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidas a estresse térmico de curto e longo prazo podem ser justificadas por diferenças fenotípicas específicas para cada espécie, já identificadas em estudos

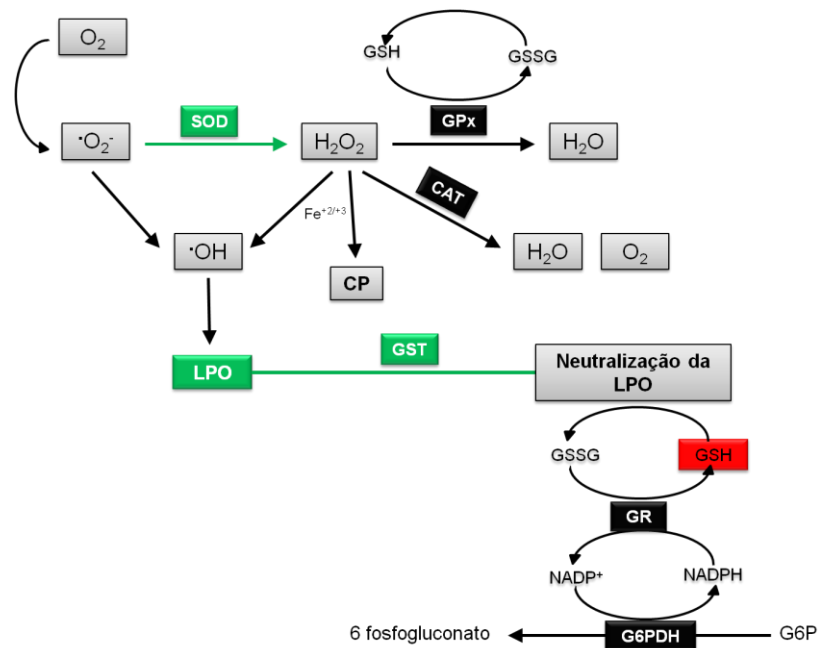
comparativos com peixes teleósteos filogeneticamente aparentados (MARTÍNEZ-ALVAREZ et al, 2005; GRIM et al., 2011; MULLER et al., 2012; VINAGRE et al , 2012; GRIM et al., 2013; MADEIRA et al., 2013). Por exemplo, Aksnes e Njaa (1981), analisaram nove espécies de peixes da costa norueguesa e verificaram que a atividade de SOD, CAT e GPx variaram entre as espécies, sendo que a variação dos níveis da CAT foi de até quatro vezes dentro de uma mesma família. Essas diferenças foram observadas em um estudo comparativo entre diferentes espécies de peixes antárticos, sendo que *T. newnesi* necessitou de maiores períodos de exposição, em relação a *T. bernacchii*, para compensar os danos oxidativos (ENZOR; PLACE, 2014).

FIGURA 44 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO



LEGENDA: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); oxigênio molecular ( $O_2$ ); superóxido dismutase (SOD); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); água ( $H_2O$ ); catalase (CAT); glutaciona peroxidase (GPx); glutaciona reduzida (GSH); glutaciona dissulfeto (GSSG); glutaciona redutase (GR); glutaciona-S-transferase (GST); lipoperoxidação (LPO); carbonilação de proteínas (CP). Em verde: atividade ou níveis aumentaram; em vermelho: diminuíram

FIGURA 45 - FIGURA ESQUEMÁTICA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS EM BRÂNQUIAS DE *Notothenia coriiceps* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO



LEGENDA: ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ); oxigênio molecular ( $O_2$ ); superóxido dismutase (SOD); peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ); água ( $H_2O$ ); catalase (CAT); glutationa peroxidase (GPx); glutationa reduzida (GSH); glutationa dissulfeto (GSSG); glutationa redutase (GR); glutationa-S-transferase (GST); lipoperoxidação (LPO); carbonilação de proteínas (CP). Em verde: atividade ou níveis aumentaram; em vermelho: diminuição.

As diferenças nas respostas do sistema antioxidante ocorrem, também, ao comparar tecidos e órgãos. Por exemplo, a exposição de curto prazo a  $8^\circ C$  não alterou os níveis de atividade da CAT e SOD no fígado de *N. rossii* e *N. coriiceps* (MACHADO et al., 2014). No rim de *N. rossii* e *N. coriiceps* a atividade das enzimas antioxidantes não variou o aumento da temperatura, após 1, 4, 15 e 30 dias (KREBSBACH, 2014). Diferentemente do fígado e do rim, o aumento da temperatura estimulou a atividade dos antioxidantes nas brânquias de ambas as espécies. É possível que, devido a sua própria função fisiológica e contato íntimo com a água, as brânquias sejam diretamente afetadas pelas flutuações ambientais tendo, conseqüentemente, que apresentar um sistema de defesa antioxidante mais eficiente (VINAGRE et al., 2014).

*Notothenia rossii* apresentou um elevado índice de LPO, um forte indicativo de estresse oxidativo, que pode comprometer severamente a fisiologia do animal (HEISE et al., 2006). Além de comprometer a integridade das macromoléculas, o estresse oxidativo pode alterar o estado redox celular, e conseqüentemente, os

processos de sinalização celular que dependem de um estado redox específico (MUELLER et al., 2012). Entretanto disso, como os níveis de MDA diminuíram nas brânquias de *N. rossii* após 90 dias a 8°C (dados não publicados), seu sistema antioxidante parece necessitar de um tempo maior para neutralizar os danos resultantes do estresse oxidativo. Os peixes antárticos *T. bernacchii*, *T. newnesi* e *P. borchgrevinki*, apesar de, num primeiro momento terem sofrido com elevação da PCO após estresse térmico e hipercapnia, conseguiram reverter esses danos após longos períodos de exposição a essas condições estressantes (ENZOR; PLACE, 2014).

Com relação à origem das EROs, sob estresse térmico, o aumento da taxa metabólica pode estar diretamente relacionado com a formação de EROs, conforme demonstrado em estudo *in vivo* com invertebrados marinhos (ABELE et al. 2002, HEISE et al., 2003, KELLER et al. 2004). A formação de EROs aumenta em resposta ao aquecimento também devido a indução da expressão de proteínas de desacoplamento (MARK et al., 2006). As proteínas de desacoplamento estão situadas na membrana mitocondrial interna e podem dissipar o gradiente protoiônico antes dele ser utilizado para direcionar a fosforilação oxidativa. Sob condições de hipóxia induzida por elevadas temperaturas, as proteínas de desacoplamento podem compensar uma transferência de elétrons prejudicada e elevado potencial de membrana causados por uma entrada insuficiente de oxigênio na cadeia respiratória. Mark e colaboradores (2006) identificaram proteínas de desacoplamento mitocondriais, como parte de uma resposta de estresse a longo prazo a elevadas temperaturas, possivelmente indicando uma diminuição na formação de energia sob elevadas temperaturas.

Outras vias, que não o extravasamento de elétrons da cadeia respiratória, podem estar contribuindo para a maior geração de EROs. Por exemplo, os íons  $Fe^{2+}$  liberados por grupos heme danificados poderiam também ser uma fonte de ROS, uma vez que esses íons participam da reação de Fenton, produzindo radicais hidroxila, que são altamente reativos e podem dar início à LPO (GIROTTI, 1998). Além disso, as células fagocíticas são abundantes nas brânquias e, sob altas temperaturas, exibem elevada atividade, podendo produzir de maneira exacerbada EROs (PRAKASH et al., 1998). No entanto, são necessários mais estudos para elucidar as fontes de EROs durante o estresse térmico.

Por muito tempo, acreditou-se que se uma espécie estava adaptada a habitar águas extremamente frias, como as do oceano Austral, ela não seria tolerante a variações térmicas (PORTNER et al, 2000), uma vez que a teoria evolutiva afirma que a especialização a um conjunto restrito de condições ambientais resultaria em uma diminuição da capacidade de alteração do fenótipo em resposta à mudanças ambientais (HUEY; HERTZ, 1984). Portanto, essa plasticidade fenotípica, exibida por *N. rossii* após exposição a elevadas temperaturas, não era esperada para animais estenotérmicos, uma vez que é característica de animais que habitam águas com ampla variação térmica sazonal (HUEY; HERTZ, 1984; GUDERLEY; ST-PIERRE, 2002). Porém, outras espécies de peixes antárticos também apresentaram essa compensação metabólica, após exposição a elevadas temperaturas. *Pagothenia borchgrevinki*, por exemplo, quando aclimatada à 4°C por longos períodos de exposição, conseguiu manter a função cardíaca, como resultado de uma compensação metabólica e uma correspondente redução na demanda por oxigênio (FRANKLIN et al., 2007). *Pachychara brachycephalum* conseguiu ser aclimatada a 5°C por até 10 meses, sem apresentar alterações na taxa de crescimento ou qualquer alteração em condições fisiológicas, apresentando uma compensação metabólica (LANNIG et al., 2005). O peixe estenotérmico temperado *Lota lota* consegue sobreviver às elevadas temperaturas do verão devido a uma redução na taxa metabólica (HARDEWIG et al., 2004). Portanto, como apontado por Pörtner e Knust (2007), é provável que o comprometimento do desempenho aeróbio seja o fator mais importante para determinar o destino de organismos marinhos em resposta ao aquecimento oceânico.

Esses resultados podem, então contribuir com as discussões sobre a especialização térmica dos peixes Antárticos (SEEBACHER et al., 2005; FRANKLIN et al., 2007; BEERS; SIDELL, 2011; FARREL; FRANKLIN, 2016), sendo que, pelo menos algumas espécies, conseguem apresentar uma plasticidade térmica. Franklin e colaboradores (2007) levantam a hipótese de que, apesar das temperaturas frias e termicamente estáveis do oceano Austral, os peixes das águas antárticas tem sido expostos a períodos de aquecimento e resfriamento ao longo de todo o período geológico (CLARKE; JOHNSTON, 1996), sendo que essa variação térmica poderia garantir a plasticidade térmica. Outros estudos também sugerem que peixes que habitam latitudes mais elevadas retiveram algum nível de plasticidade térmica, semelhante a apresentada por peixes temperados, apesar de habitarem águas

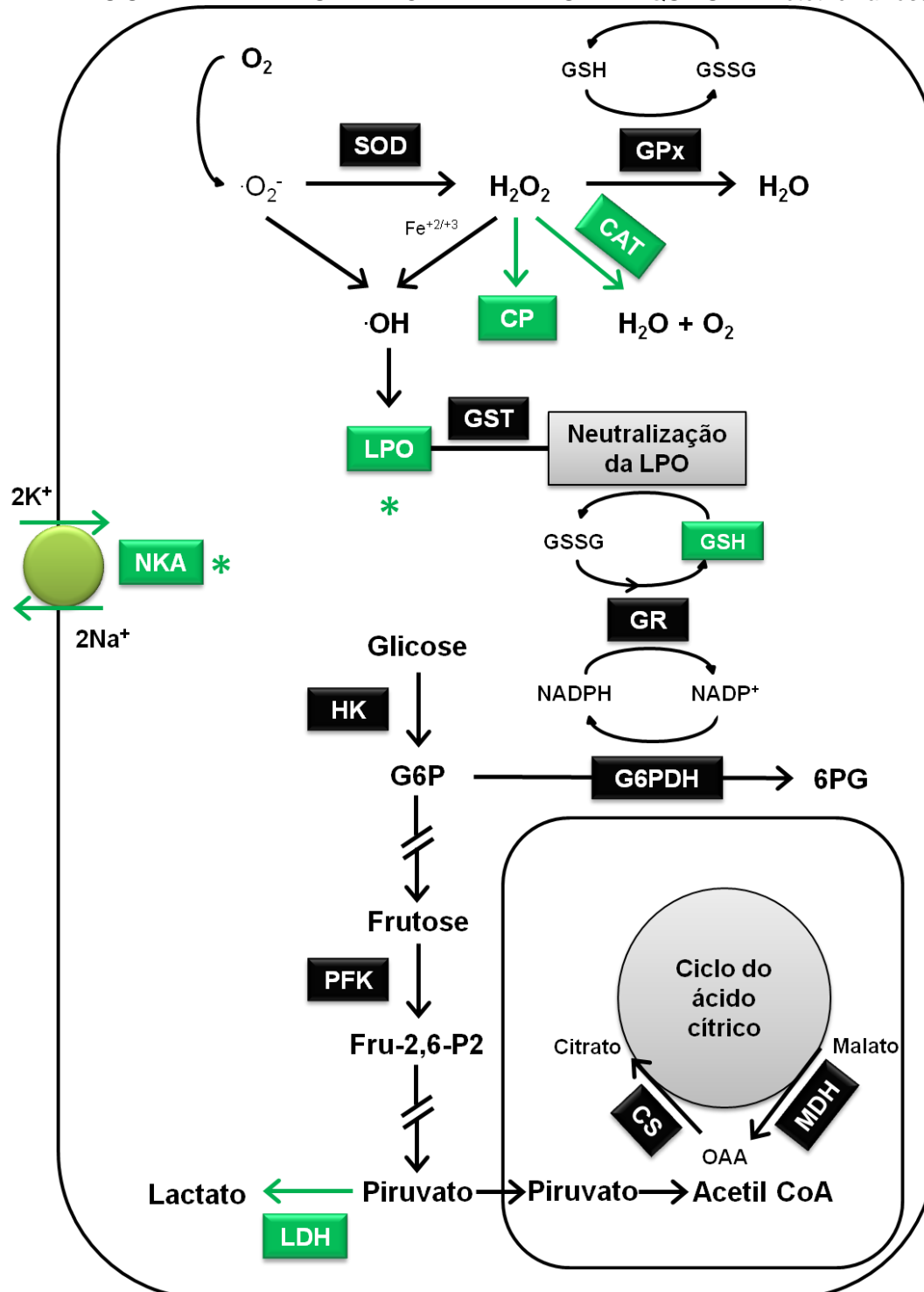
termicamente estáveis. Entretanto, as respostas das espécies adaptadas ao frio são relativamente mais lentas e incapazes de serem detectadas após um curto período de exposição (BILYK; DEVRIES, 2011; BILYK et al., 2012).

Diante desses resultados, foi possível verificar, também, que dentre os parâmetros avaliados, as respostas das enzimas do metabolismo energético foram mais conclusivas de serem avaliadas no sentido de buscar informações sobre as diferenças na tolerância térmica entre *N. rossii* e *N. coriiceps*. Além disso, além das respostas terem sido espécie-específicas, elas foram dependentes, também, do tempo de exposição. Ao considerar apenas as respostas após estresse térmico de curto prazo, foi possível perceber algumas alterações importantes, mas que não foram sustentadas com os tempos de exposição maiores. Além disso, o estresse térmico de longo prazo exacerbou as diferenças nas respostas apresentadas entre essas espécies intimamente relacionadas, sugerindo que, de uma forma geral, *N. rossii* necessitou de maiores períodos de exposição, em relação a *N. coriiceps*, para compensar as perturbações metabólicas.

Nas figuras 46 a 49 estão representadas, de forma resumida, os efeitos do estresse térmico de curto e longo prazo no potencial osmorregulatório, metabolismo de carboidratos e sistema de defesa antioxidante de brânquias de *N. rossii* e *N. coriiceps*.

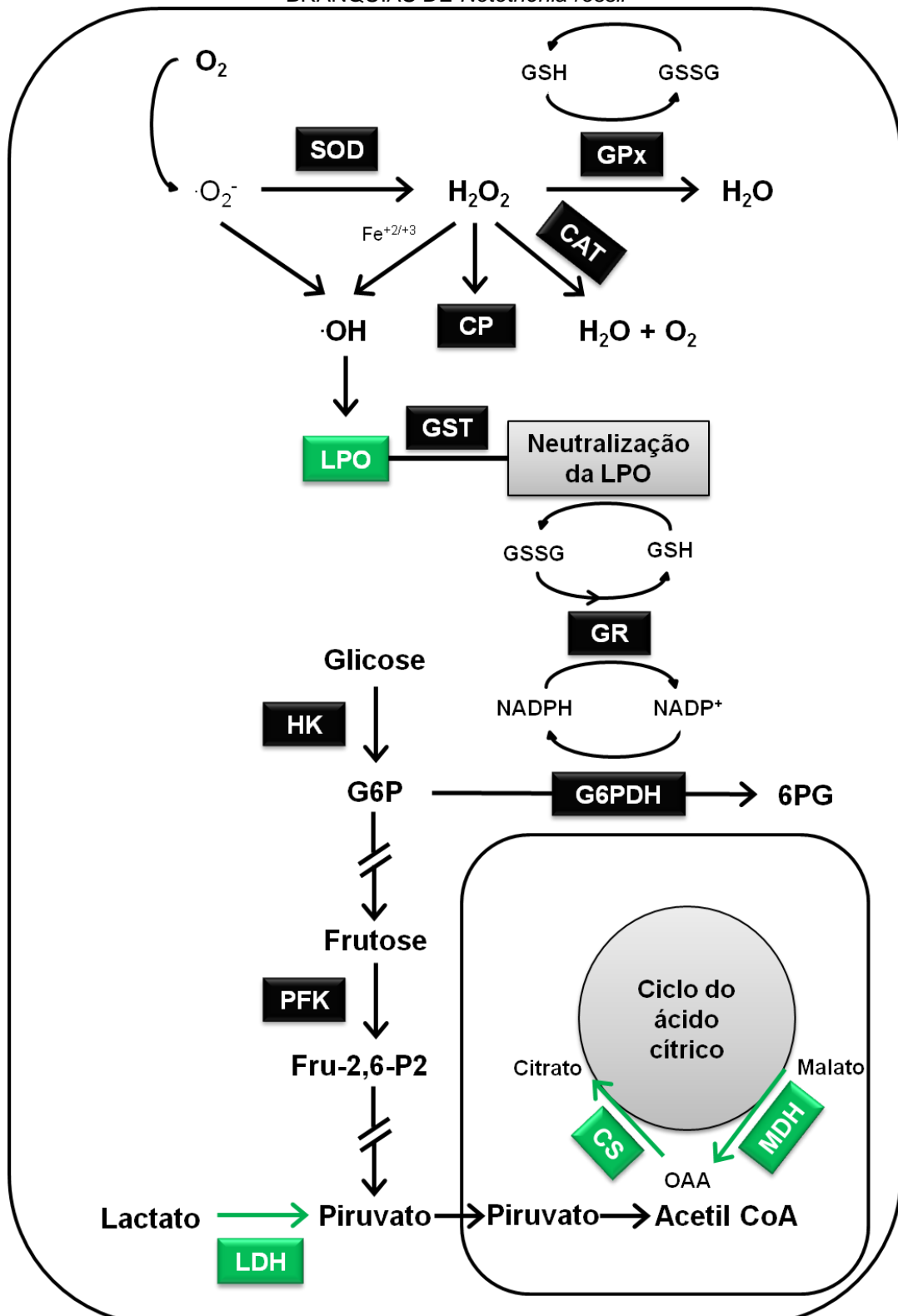


FIGURA 46 - FIGURA ESQUEMÁTICA DOS EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, POTENCIAL OSMORREGULATÓRIO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii*.



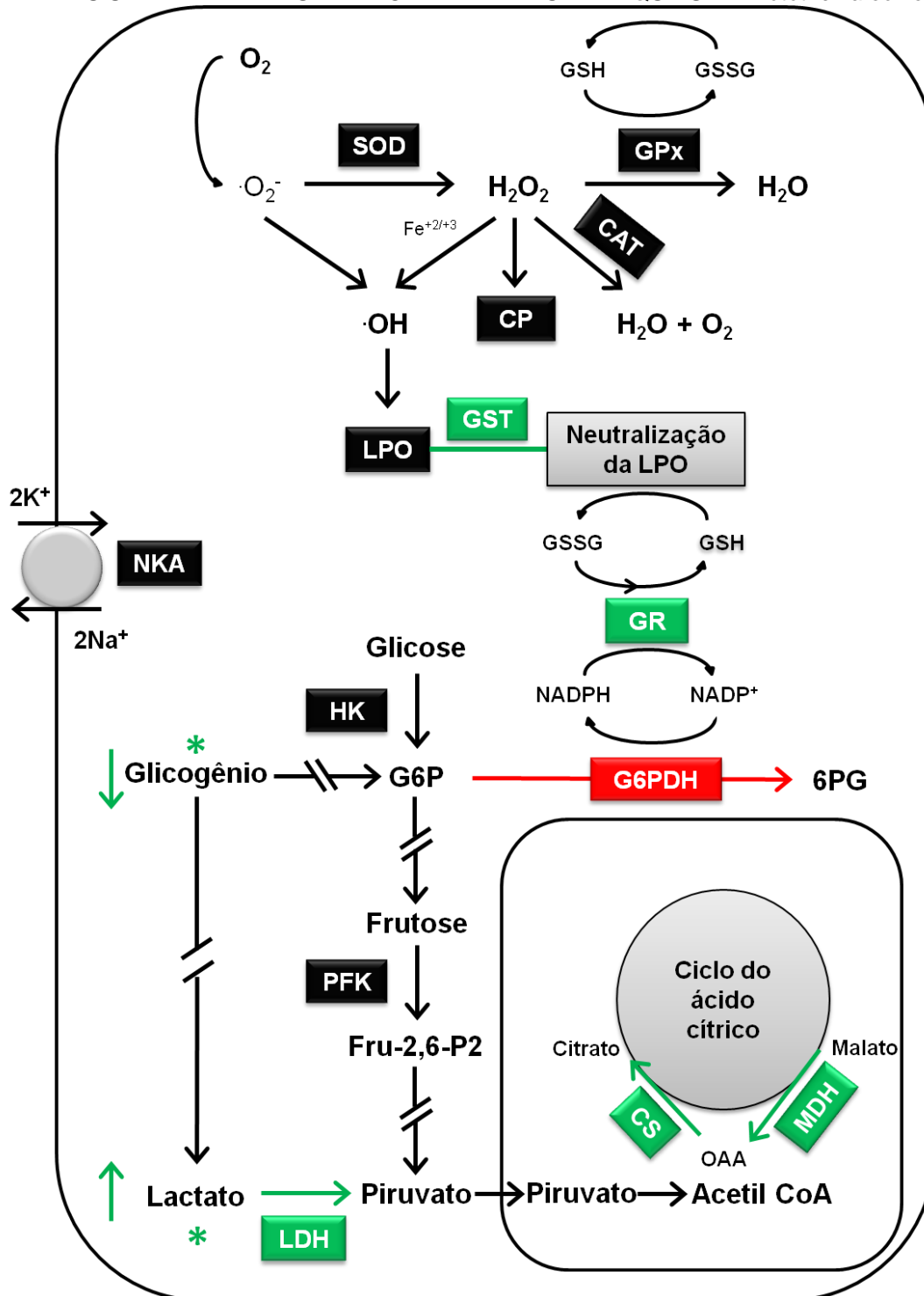
LEGENDA: NKA ( $Na^+ / K^+$ -ATPase); HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); LDH (lactato desidrogenase); CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OAA (oxaloacetato);  $O_2^-$  (ânion superóxido);  $O_2$  (oxigênio molecular); SOD (superóxido dismutase);  $(H_2O_2)$  peróxido de hidrogênio;  $H_2O$  (água); CAT (catalase); GPx (glutathiona peroxidase); GHS (glutathiona reduzida); GSSG (glutathiona dissulfeto); GR (glutathiona redutase); GST (glutathiona-S-transferase); LPO (lipoperoxidação); CP (carbonilação de proteínas). Em verde: atividade ou níveis aumentaram; em preto: não se alteraram.

FIGURA 47 - FIGURA ESQUEMÁTICA DOS EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia rossii*



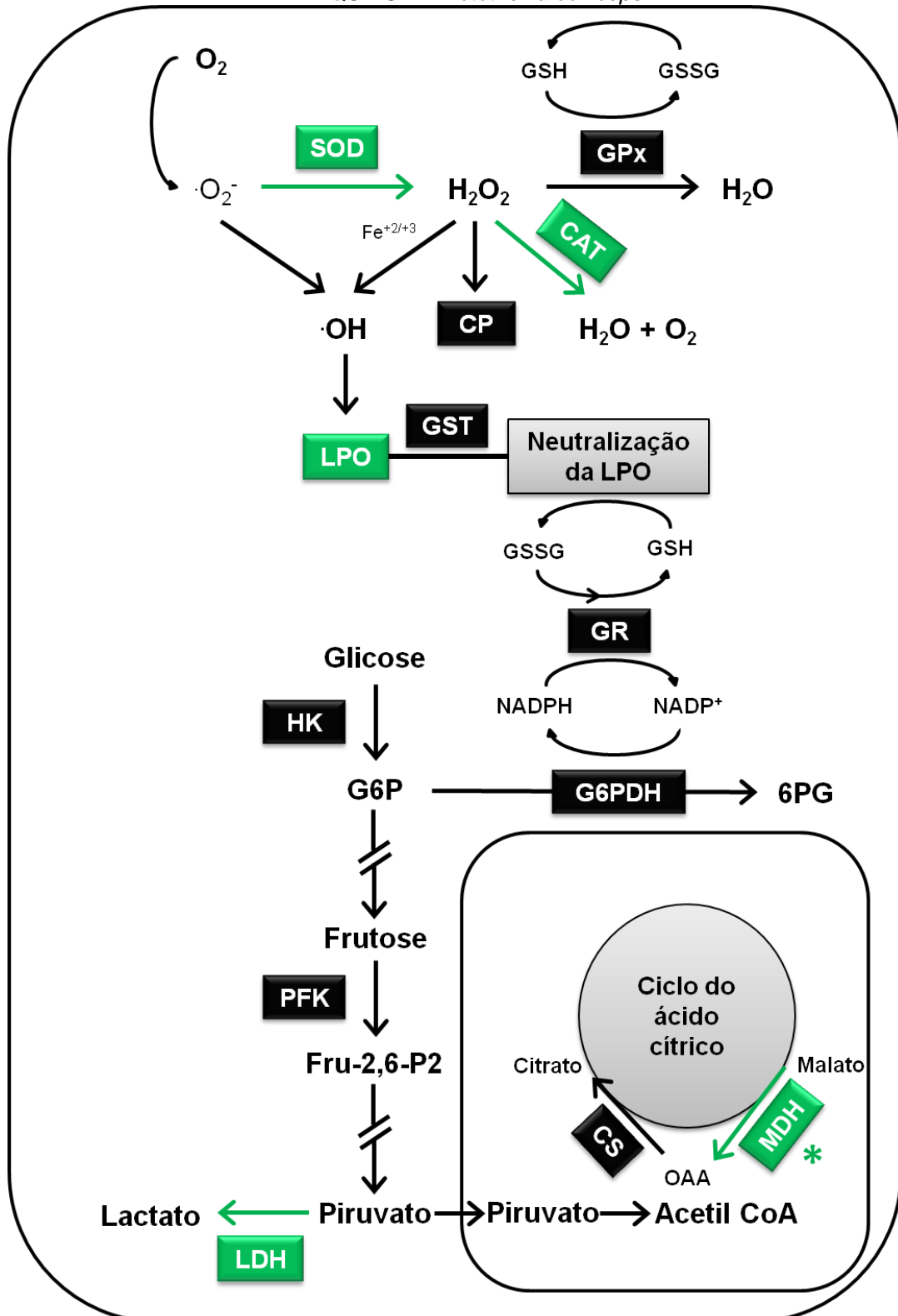
LEGENDA: HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); LDH (lactato desidrogenase); CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OAA (oxaloacetato);  $O_2^-$  (ânion superóxido);  $O_2$  (oxigênio molecular); SOD (superóxido dismutase); ( $H_2O_2$ ) peróxido de hidrogênio;  $H_2O$  (água); CAT (catalase); GPx (glutaciona peroxidase); GSH (glutaciona reduzida); GSSG (glutaciona dissulfeto); GR (glutaciona redutase); GST (glutaciona-S-transferase); LPO (lipoperoxidação); CP (carbonilação de proteínas). Em verde: atividade ou níveis aumentaram; em preto: não se alteraram.

FIGURA 48 - FIGURA ESQUEMÁTICA DOS EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE CURTO PRAZO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, POTENCIAL OSMORREGULATÓRIO E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NAS BRÂNQUIAS DE *Notothenia coriiceps*



LEGENDA: NKA ( $Na^+/K^+$ -ATPase); HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); LDH (lactato desidrogenase); CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OAA (oxaloacetato);  $O_2^-$  (ânion superóxido);  $O_2$  (oxigênio molecular); SOD (superóxido dismutase); ( $H_2O_2$ ) peróxido de hidrogênio;  $H_2O$  (água); CAT (catalase); GPx (glutathiona peroxidase); GHS (glutathiona reduzida); GSSG (glutathiona dissulfeto); GR (glutathiona redutase); GST (glutathiona-S-transferase); LPO (lipoperoxidação); CP (carbonilação de proteínas). Em verde: atividade ou níveis aumentaram; em preto: não se alteraram; em vermelho: diminuíram.

FIGURA 49 - FIGURA ESQUEMÁTICA DOS EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE LONGO PRAZO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NAS BRÂNCUIAS DE *Notothenia coriiceps*



LEGENDA: HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); LDH (lactato desidrogenase); CS (citrato sintase); MDH (malato desidrogenase); OAA (oxaloacetato);  $O_2^-$  (ânion superóxido);  $O_2$  (oxigênio molecular); SOD (superóxido dismutase); ( $H_2O_2$ ) peróxido de hidrogênio;  $H_2O$  (água); CAT (catalase); GPx (glutaciona peroxidase); GSH (glutaciona reduzida); GSSG (glutaciona dissulfeto); GR (glutaciona redutase); GST (glutaciona-S-transferase); LPO (lipoperoxidação); CP (carbonilação de proteínas). Em verde: atividade ou níveis aumentaram; em preto: não se alteraram

## 7. CONCLUSÕES

*Notothenia rossii* e *N. coriiceps*, ao contrário do que foi hipotetizado inicialmente, apresentaram diferentes respostas frente ao estresse térmico de curto e longo prazo. *N. rossii* conseguiu tolerar a elevação abrupta de temperatura (8°C) seguida por 30 dias de exposição, enquanto *N. coriiceps* não conseguiu sobreviver por mais de 6 dias a essa temperatura.

Com relação ao potencial osmoregulatório, o aquecimento resultou em um aumento dos níveis de NKA em *N. rossii*, provavelmente devido a um maior turnover enzimático. Os maiores níveis de atividade dessa enzima também podem ter sido decorrentes de um elevado índice de LPO, que altera a fluidez de membrana e, conseqüentemente, o funcionamento de enzimas transmembrana. As conseqüências dessa maior atividade da NKA, além de redução da osmolalidade, seria uma maior demanda energética pelas brânquias para a manutenção da tonicidade, que não foi corroborada com os dados desse estudo. A atividade da NKA em *N. coriiceps* não variou com a temperatura nos tempos de exposição avaliados.

Através da análise de componentes enzimáticos do metabolismo de carboidratos, dos níveis de glicogênio e de intermediários metabólicos, foi possível verificar que, em *N. coriiceps*, a exposição de curto prazo a elevadas temperaturas resultou em uma maior demanda energética e manutenção do metabolismo aeróbico. É provável que essa espécie não tenha conseguido tolerar longos períodos de exposição a elevadas temperaturas devido a problemas sistêmicos, como falha na distribuição de oxigênio entre os tecidos. *N. rossii*, por outro lado, parece ter conseguido ser aclimatada à temperatura de 8°C, sendo que, nas brânquias dessa espécie, observou-se recuperação do metabolismo aeróbico após longos períodos de exposição a 8°C.

Em *N. rossii*, observou-se um elevado índice de LPO já no estresse térmico de curto prazo, provavelmente em resposta à hipóxia induzida pela temperatura nesse órgão. A longo prazo, os índices de LPO foram ainda maiores, mesmo com uma ativação do sistema de defesa antioxidante, sendo essa uma resposta comum a peixes antárticos, devido a abundância de MUFA e PUFA, alvos da LPO.

Em *N. coriiceps*, embora o estresse térmico de curto prazo não tenha resultado em danos oxidativos nas brânquias, o estresse térmico de longo prazo resultou em aumento nos níveis de LPO, provavelmente em decorrência da

condição de hipóxia induzida pela temperatura, ou falha de seu sistema de defesa antioxidante.

## REFERÊNCIAS

- ABELE, D.; BURLANDO, B.; VIARENGO, A.; PÖRTNER, H. O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v.120, p. 425–435, 1998.
- ABELE, D.; HEISE, K.; PÖRTNER, H. O.; PUNTARULO, S. Temperature-dependence of mitochondrial function and production of reactive oxygen species in the intertidal mud clam *Mya arenaria*. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, p. 1831-1841, 2002.
- ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 138, p. 405-415, 2004.
- ABO HEGAB, S.; HANKE, W. The significance of cortisol for osmoregulation in carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Sarotherodon mossambicus*). **General and Comparative Endocrinology**. v. 54, p. 409–417, 1984.
- ACKER, T.; ACKER, H. Cellular oxygen sensing need in CNS function: physiological and pathological implications. **The Journal of Experimental Biology**. v. 207, p. 3171–3188, 2004.
- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.
- AFONSO, L. O. B.; HOSOYA, S.; OSBORNE, J.; GAMPERL, A.K; JOHNSON, S. Lack of glucose and hsp70 responses in haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) subjected to handling and heat shock. **Journal of Fish Biology**. v. 72, p. 157-167, 2008.
- AHMAD, I.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 57, p. 290–302, 2004.
- AKSNES, A.; NJAA, L. R. Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v. 69, p. 893-896, 1981.
- ALMROTH, B. C.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGRE, M.; JUTFELE, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. 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, 2015.
- ANSALDO, M.; LUQUET, C. M.; EVELSON, P. A.; POLO, J. M.; LLESUY, S. Antioxidant levels from different Antarctic fish caught around South Georgia Island and Shag Rocks. **Polar Biology**. v. 23, p. 160-165, 2000.
- ARIGONY-NETO J.; SIMÕES, J. C.; BREMER, U. F. Implementation of the Admiralty Bay Geographic Information System, King George Island, Antarctica. **Pesquisa Antártica Brasileira**. v. 4, p. 187-190. 2004.

AVELLA, M.; BERHAUT, J.; BORNANCIN, M. Salinity tolerance of two tropical fishes, *Oreochromis aureus* and *O. niloticus*. I. Biochemical and morphological changes in the gill epithelium. **Journal of Fish Biology**. v. 42, n. 2, p. 243-254, 1993.

BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 C. **Journal of Thermal Biology**. v. 32, n. 4, 227-234, 2007.

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

BARGELLONI, L.; MARCATO, S.; PATARNELLO, T. Antarctic fish hemoglobins: Evidence for adaptive evolution at subzero temperature. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 95, p. 8670-8675, 1998.

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

BARRERA-ORO, E. R.; MARCSCHOFF, E. R.; CASAUX, R. J. Trends in relative abundance of fjord *Notothenia rossii*, *Ggobionotothen gibberifrons* and *Notothenia coriiceps* at Potter Cove, South Shetland Islands, after commercial fishing in the area. **CCAMLR Science**. v. 7 p. 43-52, 2000.

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

BASAGLIA, F. Some aspects of isozymes of lactate dehydrogenase, malate dehydrogenase and glucosephosphate isomerase in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 92, n. 2, p. 213-226, 1989.

BASTOS-RAMOS, W. P.; GONÇALVES, N. M. F. M.; BACILA, M. Anesthesia and analgesia in Antarctic fish: An experimental approach. **Archives of Veterinary Science**. v. 3, n. 1, p. 95-100, 1998.

BASU, N.; TODGHAM, A. E.; ACKERMAN, P. A.; BIBEAU, M. R.; NAKANO, K.; SCHULTE, P. M.; IWAMA, K. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. **Gene**. v. 295, p. 173-183, 2002.

BEERS, J. M.; JAYASUNDARA, N. Antarctic notothenioid fish: what are the future consequences of 'losses' and 'gains' acquired during long-term evolution at cold and stable temperatures? **The Journal of Experimental Biology**. v. 218, p. 1834-1845, 2015.



BIDINOTTO, P. M.; SOUZA, R. H. S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: Procedure for field determinations of microsamples. **Boletim Técnico do CEPTA-Pirassununga**. v. 10, p. 53-60, 1997.

BILYK, K. T.; DEVRIES, A. L. Heat tolerance and its plasticity in Antarctic fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 158, p. 382–390, 2011.

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

BI, D. H.; BUDD, W. F.; HIRST, A. C.; WU, X. R. Collapse and reorganisation of the Southern Ocean overturning under global warming in a coupled model. **Geophysical Research Letters**. v. 28, n. 20, 3927–3930, 2001.

BINDON, S. D., GILMOUR, K. M., FENWICK, J. C.; PERRY, S. F. The effects of branchial chloride cell proliferation on respiratory function in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Journal of Experimental Biology**. v. 197, p. 47–63, 1994.

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

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

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

BRODTE, E., GRAEVE, M., JACOB, U., KNUST, R.,; PÖRTNER, H.-O. Temperature-dependent lipid levels and components in polar and temperate eelpout (Zoarcidae). **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 34, n. 3, p. 261-74, 2008.

BUCKLEY, B. A.; SOMERO, G. N. cDNA microarray analysis reveals the capacity of the cold-adapted Antarctic fish *Trematomus bernacchii* alter gene expression in response to heat stress. **Polar Biology**. v. 32, p. 403-415, 2009.

BURCHETT, M. S. Food, feeding and behaviour of *Notothenia rossii* nearshore at South Georgia. **British Antarctic Survey Bulletin**. n. 61, p. 45-51, 1983.

CABEROY, N. B.; QUINTIO, G. F. Changes in Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity and gill chloride cell morphology in the grouper *Epinephelus coioides* larvae and juveniles in response to salinity and temperature. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 23, p. 83-94, 2000.

CALDWELL, R. S. Thermal compensation of respiratory enzymes in tissues of the goldfish (*Carassius auratus* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 31, p. 79-93, 1969.

CAPASSO, C.; CARGINALE, V.; RIGGIO, M.; SCUDIERO, R.; TEMUSSI, P. A.; TRINCHELLA, F.; PARISI, E. Metal detoxification and homeostasis in Antarctic Notothenioids. A comparative survey on evolution, expression and functional properties of fish and mammal metallothioneins. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**. v. 5, p. 253-267, 2006.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 250, p. 5475–5480, 1975.

CARVALHO, C. D.; FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 151, p. 437-442, 2008.

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

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

CHIEN, L. T.; HWANG, D. F. Effects of thermal stress and vitamin C on lipid peroxidation and fatty acid composition in the liver of thornfish *Terapon jarbua*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 128, p. 91-7, 2001.

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

CIARDELLO, M., CAMARDELLA, L., DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1250, p. 76–82, 1995.

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

CLARKE, A.; FRASER, K. P. P. Why does metabolism scale with temperature? **Functional Ecology**. v. 18, p. 243-251, 2004.

COLLINS, A. L.; ANDERSON, T. A. The influence of changes in food availability on the activities of key degradative and metabolic enzymes in the liver and epaxial muscle of the golden perch. **Journal of Fish Biology**. v. 50, n. 6, p. 1158–1165, 1997.

COWEY, C. B.; WALTON, M. Intermediary metabolism. In: HALVER, J. E. (ed.) **Fish Nutrition**. New-York: Academic Press, 1989. pp. 259–329.

CRABTREE B.; NEWSHOLME, E. A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and glycerol-3-P dehydrogenase in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochemical Journal**. v. 136, p. 49-58, 1972.

CROCKETT, E. L. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. **Journal of Comparative Physiology, Part B**. v. 178, p. 795–809, 2008.

CROCKETT, E. L. 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, 2011.

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

DANG, Z.; BALM, P. H.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E.; LOCK, R. A. Cortisol increases Na(+)/K(+)-ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. **The Journal of Experimental Biology**. v. 203, p. 2349–2355, 2000.

DAVISON, W., FORSTER, M. E.; FRANKLIN, C. E.; TAYLOR, H. H. Recovery from exhausting exercise in an Antarctic Fish, *Pagothenia borchgrevinki*. **Polar Biology**. v. 8, p. 167-172, 1988.

DE ZWART, L.; MEERMAN, J.; COMMANDEUR, J.; VERMEULEN, N. Biomarkers of free radical damage. Applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biology; Medicine**. v. 26, p. 202-226, 1999.

DEANE, E. E.; KELLY, S. P.; WOO, N. Y. Hypercortisolemia does not affect the branchial osmoregulatory responses of the marine teleost *Sparus sarba*. **Life Sciences**. v. 66, p. 1435–1444, 2000.

DEVOR, D.P.; GRIM, J.M.; CROCKETT, E.L. Elevated temperatures induce lipid peroxidation in cardiac muscle but not other tissues from Antarctic notothenioid fishes. **Integrative and Comparative Biology**. Ohio University, Athens. 2011.

DOBBS, G.; DEVRIES, A. L. Renal function in Antarctic teleost fishes, serum and urine compositions. **Marine Biology**. v. 29, p. 59-70, 1975.

DONATTI, L. Imagem do peixe antártico *Notothenia coriiceps* fotografada no laboratório da EACF, 2009.

DOTAN, Y.; LICHTENBERG, D.; PINCHUK, I. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. **Progress in Lipid Research**. v. 43, p. 200-227, 2004.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 421-431, 1990.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. v. 28: p.350-358, 1956

DUNN, J. F.; JOHNSTON, I. A. Metabolic constraints on burst swimming in the Antarctic teleost *Notothenia neglecta*. **Marine Biology**. v. 91, p. 433-440, 1986.

EASTMAN, J. T. **Antarctic Fish Biology**. Evolution in a unique environment. Academic Press, San Diego, 1993.

EASTMAN, J. T.; HUBOLD, G. The fish fauna of the Ross Sea, Antarctica. **Antarctic Science**, v. 11, p. 293–304, 1999.

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

ENZOR, L. A.; ZIPPAY, M. L.; PLACE, S. P. High latitude fish in a high CO<sub>2</sub> world: Synergistic effects of elevated temperature and carbon dioxide on the metabolic rates of Antarctic notothenioids. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 164, p. 154–161, 2013

ENZOR, L. A.; PLACE, S. P. Is warmer better? Decreased oxidative damage in notothenioid fish after long-term acclimation to multiple stressors. **The Journal of Experimental Biology**. v. 217, p. 3301-3310, 2014.

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

FARREL, A. P.; FRANKLIN, C. E. Recognizing thermal plasticity in fish. **Science**. v. 351, n. 6269, p. 132, 2016.

FAST, M. D.; HOSOYA, S.; JOHNSON, S. C.; AFONSO, L. O. B. Cortisol response an immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short and long-term stress. **Fish and Shellfish Immunology**. v. 24, p. 194-204, 2008.

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

FOSKETT, J. K.; BERN, H. A.; MACHEN, T. E.; CONNER, M. Chloride cells and the hormonal control of teleost fish osmoregulation. **The Journal of Experimental Biology**. v. 106, p. 255–281, 1983.

FRANKLIN, C. E.; DAVISON, W.; CAREY, P. W. The stress response of an Antarctic teleost to an acute increase in temperature. **Journal of Thermal Biology**. v. 16, n. 3., p. 173-177, 1991.

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

FRIDOVICH, I. Mitochondria: are they the seat of senescence? **Aging Cell**. v. 3.; p. 13-16, 2004.

GIBBS, A.; SOMERO, G. N. Pressure adaptations of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills of marine teleosts. **The Journal of Experimental Biology**. v. 143, p. 475-492, 1989.

GIBBS, A. Temperature, pressure and the sodium pump: the role of homeoviscous adaption. In: HOCHACHKA, P.W., MOMMSEN, T. (Eds.). **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Vol. 5. London: Elsevier, pp. 197-212. 1995.

GIETL, C. Malate dehydrogenase isoenzymes: cellular locations and role in the flow of metabolites between the cytoplasm and cell organelles. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**. v. 1100, n. 3, p. 217-234, 1992.

GIESEG, S. P.; CUDDIHY, S.; HILL, J. V.; DAVISON, W. A comparison of plasma vitamin C and E levels in two Antarctic and two temperate water fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 125, p. 371-378, 2000.

GILLE, S. T. Warming of the Southern Ocean since the 1950s. **Science**. v. 295, p. 1275-1277, 2002.

GIROTTI, A. W. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. **Journal of Lipid Research**. v. 39, p. 1529-1542. 1998.

GOLLOCK, M. J.; CURRIE, S.; PETERSEN, L. H.; GAMPERL, A. K. Cardiovascular and haematological responses of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to acute temperature increase. **The Journal of Experimental Biology**. v. 209, p. 2961-2970. 2006.

GON, O.; HEEMSTRA, P.C. **Fishes of the Southern Ocean**. Grahamstown: J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, 1980.

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

GRIESHABER, M. K.; HARDEWIG, I.; KREUTZER, U.; PÖRTNER, H. O. Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. v. 125, p. 43-147, 1994.

GRIM, J. M.; MILES, D. R. B.; CROCKETT, E. L. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. 3, p. 445-452, 2010.

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

GRIM, J. M.; SIMONIK, E. A.; SEMONES, M. C.; KUHN, D. E.; CROCKETT, E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 164, n. 2, p. 383-390, 2013.

GUDERLEY, H.; BLIER, P. Thermal acclimation in fish: conservative and labile properties of swimming muscle. **Canadian Journal of Zoology**. v. 60, p. 3153 -3164, 1988.

GUDERLEY, H.; ST-PIERRE, J. Going with the flow in the fast lane: contrasting mitochondrial responses to thermal change. **The Journal of Experimental Biology**. v. 205, p. 2237-2249, 2002.

GUMULEC, J.; RAUDENSKA, M.; HLAVNA, M.; STRACINA, T.; SZTALMACHOVA, M.; TANHAUSEROVA, V.; PACAL, L.; RUTTKAY-NEDECKY, B.; SOCHOR, J.; ZITKA, O.; BABULA, P.; ADAM, V.; KIZEK, R.; NOVAKOVA, M.; MASARIK, M. Determination of oxidative stress and activities of antioxidant enzymes in guinea pigs treated with haloperidol. **Experimental and Therapeutic Medicine**. v. 5, n. 2, p. 479-484, 2013.

GUYNN, S.; DOWD, F.; PETZEL, D. Characterization of gill Na/K-ATPase activity and ouabain binding in Antarctic and New Zealand nototheniid fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology A**. v. 131, p. 363-374, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford: Clarendon; 2007.

HARDEWIG, I.; PECK, L. S.; PÖRTNER, H. O. Thermal sensitivity of mitochondrial function in the Antarctic Nototheniid *Lepidonotothen nudifrons*. **Journal of Comparative Physiology B**. v. 169, p. 597-604, 1999.

HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O.; VAN DJIK, P. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? **Journal of Comparative Physiology Part B**. v. 174, p. 149-156, 2004.

HARROWER J. R; BROWN, C. H. BLOOD lactic acid. A micromethod adaptes to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**. v. 32, p. 224-228, 1972.

HAZEL, J. R. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. **American Journal of Physiology**. v. 246, p. R460–R470, 1984.

HEISE, K.; PUNTARULO, S.; PÖRTNER, H. O.; ABELE, D. (2003). Production of reactive oxygen species by isolated mitochondria of the Antarctic bivalve *Laternula*

*elliptica* (King and Broderip) under heat stress. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.** v. 134, p. 79-90, 2003.

HEISE, K. **Interaction of oxygen supply, oxidative stress, and molecular defence systems during temperature stress in fishes.** 223 p (PhD Thesis) - Universität Bremen, Bremen, 2005

HEISE, K.; PUNTARULO, S.; NIKINMAA, M.; ABELE, D.; PORTNER, H. O. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. **The Journal of Experimental Biology.**v. 209, p. 353-363, 2006.

HEISE, K., ESTEVEZ, M. S., PUNTARULO, S., GALLEANO, M., NIKINMAA, M., PORTNER, H. O.; ABELE, D. Effects of seasonal and latitudinal cold on oxidative stress parameters and activation of hypoxia inducible factor (HIF-1) in zoarcid fish. **Journal of Comparative Physiology, Part B.** v. 177, p. 765-777, 2007.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. **Functional metabolism: Regulation and adaptation**, v. 1, p. 319-66, 2004.

HIRST, A. C. The Southern Ocean response to global warming in the CSIRO coupled ocean-atmosphere model, **Environmental Modeling Software.** v. 14, p. b227–242, 1999.

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

HOCHACHKA, P. W.; LUTZ, P. L. Mechanism, origin and evolution of anoxia tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B.** v. 130, p. 435-459, 2001.

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

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

HUEY, R. B.; HERTZ, P. E. Is a jack-of-all-temperatures a master of none? **Evolution.** v. 38, p. 441-444, 1984.

HUNT, B. M.; HOEFLING, K.; CHENG, C. H. C. Annual warming episodes in seawater temperatures in McMurdo Sound in relationship to endogenous ice in notothenioid fish. **Antarctic Science.** v. 15, n. 3, p. 333-338, 2003.

HWANG, P. P.; LEE, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology.** v. 148, p. 479–497, 2007.

HWANG, P.-P.; LEE, T.-H.; LIN, L. Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **American Journal of Physiology** -

**Regulatory, Integrative and Comparative and Physiology.** v. 301, p. R28–R47, 2011.

IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; FORSYTH, R. B.; ACKERMAN, P. A. Heat shock proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist.** v. 39, p. 901-909, 1999.

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

JOBLING, M. Bioenergetics: Feed Intake and Body Partitioning. In: RANKIN, J.C.; JENSEN, F. B. (eds.) **Fish Ecophysiology.** New York: Chapman; Hall, 1993. p.1-44.  
JOHANSEN, K.; PETTERSSON, K. Gill O<sub>2</sub> consumption in a teleost fish, *Gadus morhua*. **Respiration Physiology.** v. 44, p. 277-284, 1981.

JOHNSTON, I. A.; TEMPLE, G. K. Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. **The Journal of Experimental Biology.** v. 205, p. 2305-2322, 2002.

KANG, C.-K.; TSAI, S.-C.; LEE, T.-H.; HWANG, P.-P. Differential expression of branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of two medaka species, *Oryzias latipes* and *Oryzias dancena*, with different salinity tolerances acclimated to fresh water, brackish water and seawater. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A.** v. 151, n. 4, p. 566-575.

KARNAKY, K. J. Jr. Structure and function of the chloride cell of *Fundulus heteroclitus* and other teleosts. **American Zoologist.** v. 26, p. 209–224, 1986.

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

KELLER, M.; SOMMER, A. M.; PÖRTNER, H. O.; ABELE, D. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. **The Journal of Experimental Biology.** v. 207, p. 2529-2538, 2004.

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

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

KREBSBACH, P. **Respostas bioquímicas e fisiológicas ao metabolismo renal de dois teleosteos antárticos, *Notothenia coriiceps* (Richardson, 1844) e *Notothenia rossii* (Richardson, 1844), submetidos ao estresse térmico.** 78 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2014.



KÜLTZ, D.; SOMERO, G. N. Osmotic and thermal effects on in situ ATPase activity in permeabilized gill epithelial cells of the fish *Gillichthys mirabilis*. *The Journal of Experimental Biology*. v. 198, p. 1883-1894, 1995.

KÜLTZ, D. Osmosensing. In: MCCORMICK, S. D.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J (eds). **Fish Physiology**. Euryhaline Fishes. Oxford: Academic Press, 2013. p. 45-68.

LA MESA, M.; EASTMAN, J. T.; VACCHI, M. The role of notothenioid fish in the food web of the Ross Sea shelf waters: a review. **Polar Biology**. v. 27, p. 321–338. 2004.

LAIZ-CARRIÓN, R.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J. M.; DEL RÍO, M. P. M.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L.; MANCERA, J. M. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 27, p. 197-188, 2002.

LAIZ-CARRION, R.; MARTIN DEL RIO, M. P.; MIGUEZ, J. M; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. Influence of cortisol on osmoregulation and energy metabolism in gilthead seabream *Sparus aurata*. **Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology**. v. 298, p. 105–118, 2003.

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

LEGGATT, R. A. **Glutathione in fish: transport, influence of temperature and growth rate, and interactions with the stress response**. 141 p. (PhD Thesis - Animal Science Program) - University of British Columbia, Vancouver, 2006.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSEROTTO, B.; MORAES, G.; MORSCH, V. M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameter of *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 239, p. 497-507, 2004.

LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. **Annual Review of Physiology**. v. 68, p.2 53–278, 2006.

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

LEVINS R. **Evolution in changing environments**: some theoretical explorations. Princeton: Princeton University Press, 1968.

LIM, S. T.; KAY, R. M.; BAILEY, G. S. Lactate dehydrogenase isoenzymes of salmonid fish. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 250, p. 1790-1800, 1975.

LIN, Y.M.; CHEN, C. N.; LEE, T. H. The expression of gill Na, K-ATPase in milkfish, *Chanos chanos*, acclimated to seawater, brackish water and fresh water. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 135, n. 3, p. 489-497, 2003.

LOW, W. P.; PENG, K. W.; PHUAN, S. K.; LEE, C. Y.; IP, Y. K. A comparative study on the responses of the gills of two mudskippers to hypoxia and anoxia. **Journal of Comparative Physiology Part B**. v. 163, p. 487-494, 1993.

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

LU, G. D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochemical Journal**. v. 33, p. 249-254. 1939.

LUSHCHAK, V. I.; LUSHCHAK, L. P.; MOTA, A. A.; HERMES-LIMA, M. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 280, n. 1, p. R100-R107, 2001.

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

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

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

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

MADSEN, S. S.; JENSEN, M. K.; NHR, J.; KRISTIANSEN, K. Expression of Na(+)-K(+)-ATPase in the brown trout, *Salmo trutta*: in vivo modulation by hormones and seawater. **American Journal of Physiology**. v. 269, p. R1339–1345, 1995.

MALEK, R. L.; SAJADI, H.; ABRAHAM, J.; GRUNDY, M. A.; GERHARD, G. S. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v, 138, p. 363–373, 2004.

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

MARK, F. C.; LUCASSEN, M.; PÖRTNER, H. O. Thermal sensitivity of uncoupling protein expression in polar and temperate fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part D**. v. 1, p. 365–374, 2006.

MARK, F. C.; LUCASSEN, M.; STROBEL, A.; BARRERA-ORO, E.; KOSCHNICK, N.; ZANE, L.; PATARNELLO, T.; PÖRTNER, H. O.; PAPETTI, I. Mitochondrial Function in Antarctic Nototheniids with ND6 Translocation. **PLoS One**. v. 7, n. 2, p. e31860, 2012.

MARSHALL, W. S.; GROSELL, M. Ion transport, osmoregulation and acid-base balance. In: EVANS, D.; CLAIRBONE, J. B. (eds.). **Physiology of Fishes**. Vol. 3. Boca Raton: CRC Press Claiborne, 2005. pp. 177-230.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v. 15, p. 75-88, 2005.

MCCORMICK, S. D. In: WOOD, C. M.; SHUTTLEWORTH, T. J. (eds.). **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**. San Diego: Academic Press, 1995. pp. 285-316.

MEREDITH, M. P.; KING, J. C. Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. **Geophysical Research Letters**. v. 32, L19604, 2005.

METZ, J. R.; VAN DER BURG, E. H.; BONGA, S. E. W.; FLIK, G. Regulation of branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in common carp *Cyprinus carpio* L. acclimated to different temperatures. **The Journal of Experimental Biology**. v. 206, p. 2273-2280, 2003.

MINTENBECK, K.; BARRERA-ORO, E. R.; BREY, T.; JACOB, U.; KNUST, R.; MARK, F. C.; MOREIRA, E.; STROBEL, A.; ARNTZ, W. E. Impact of Climate Change on Fishes in Complex Antarctic Ecosystems. **Advances in Ecological Research**. v. 46, p. 351-426, 2012.

MOMMSEN, T. P. Metabolism of the Fish Gill. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (eds.) **Fish Physiology**. Vol. XB. Orlando: Academic Press, 1984. p. 203-237.

MOMMSEN, T. P.; PLISETSKAYA, E. M. Insulin in fishes and agnathans: history, structure, and metabolic regulation. **Reviews in Aquatic Science**. v. 4, p. 225-259, 1991.

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

MOON, T. W.; FOSTER, G. D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: HOCHACHKA, P. W.; MOMMSEN, T. P. (eds.) **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. Amsterdam: Elsevier Science, 1995, p. 65–100.

MORGAN, J. D.; IWAMA, G. K. Energy cost of NaCl transport in isolated gills of cutthroat trout. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 277, p. R631–R639, 1999.

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

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

MUSRATI, R. A.; KOLLAROVA, M.; MERNIK, N.; MIKULASOVA, D. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. **General Physiology and Biophysics**. v. 17, p. 193-210, 1998.

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

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

O'CONNOR, E. A.; POTTINGER, T. G.; SNEDDON, L. U. The effects of acute and chronic hypoxia on cortisol, glucose and lactate concentrations in different populations of three-spined stickleback. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 37, p. 461–469, 2011.

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

OLIVA, M.; VICENTE, J. J.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L.; GALINDO-RIAÑO, M. D. Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial variation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 75, p. 151–162. 2012.

OMLIN, T.; WEBER, J.-M. Hypoxia stimulates lactate disposal in rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**. v. 213, p. 3802-3809, 2010.

PARIHAR, M. S.; JAVERI, T.; HEMNANI, T.; DUBEY, K.; PRAKASH, P. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. **Journal of Thermal Biology**. v. 22, n. 2, p. 151-156, 1997.

PAZIO, D.; GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; PRIOLI, A. J. Histopatologias em tecidos branquiais de *Astyanax* aff. *paranae* (pisces) como indicadores de contaminação aquática no centro-noroeste do Paraná. **Anais do III Simpósio Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná**. 2012.

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

PECK, L. S., SOUSTER, T. AND CLARK, M. S. Juveniles are more resistant to warming than adults in 4 species of Antarctic marine invertebrates. **PloS one**. v. 8, e66033, 2013.

PECK, L. S.; MORLEY, S. A.; RICHARD, J.; CLARK, M. S. Acclimation and thermal tolerance in Antarctic marine ectotherms. **The Journal of Experimental Biology**. v. 217, p. 16-22, 2014.

PEDREIRO, M. R. D. Imagem do peixe antártico *Notothenia rossii* fotografada no laboratório da EACF, 2011.

PERRY, S. F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**. v. 59, p. 325-347, 1997.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (eds.). **Fish Ecophysiology**. London: Chapman; Hall, 1993. p. 231-264.

PERRY, S. F.; LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (eds.). **Fish Ecophysiology**. London: Chapman; Hall, 1993. p. 231-264.

PERRY, S. F.; WALSH, P. J. Metabolism of isolated fish gill cells: contribution of epithelial chloride cells. **Journal of Experimental Biology**. v. 144, p. 507-520, 1989.

PFUHL, H. A.; MCCAVE, N.; SCHELLENBERG, S. A.; FERRETTI, P. (2004) Changes in the Southern Ocean circulation in late Oligocene to early Miocene time. In: EXON, N. F.; KENNETT, J. P.; MALONE, M. J. (eds.) **The Cenozoic Southern Ocean: tectonics, sedimentation and climate change between Australia and Antarctica**. Washington D.C: American Geophysical Union, 2004, p 173-189.

PILKIS, S. J.; GRANNER, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. **Annual Review of Physiology**. v. 54, p. 885–909, 1992.

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

POLAKOF S.; PANSERAT, S.; SOENGAS, J. L.; MOON, T. W. Glucose metabolism in fish: a review. **Journal of Comparative Physiology B**. v. 182, p. 1015-1045, 2012.

PÖRTNER, H. O., VAN DIJK, P., HARDEWIG, I.; SOMMER, A. Levels of metabolic cold adaptation: tradeoffs in eurythermal and stenothermal ectotherms. In DAVISON, W.; WILLIAMS, C. H. (eds.) **Antarctic Ecosystems: Models for Wider Ecological Understanding**. Christchurch, New Zealand: Caxton Press, 2000. p. 109-122.

PÖRTNER, H. O.; LANGENBUCH, M.; MICHAELIDIS, B. Synergistic effects of temperature extremes, hypoxia and increases in CO<sub>2</sub> on marine animals: from Earth history to global change. **Journal of Geophysical Research**. v. 110, p. C09S10, 2005.

PÖRTNER, H. O.; KNUST, R. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 95-97, 2007.

PÖRTNER, H. O.; FARRELL, A. P. Physiology and climate change. **Science**. v. 322, p. 690–692, 2008.

PÖRTNER, H. O.; PECK, M. A. Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. **Journal of Fish Biology**. v. 77, p. 1745–1779, 2010.

PRAKASH, P.; KUMAR, G. P.; LALORAYA, M.; HEMNANI, T.; PARIHAR, M. S. Superoxide Anion Radical Generation as a Temperature Stress Response in the Gills of Freshwater Catfish *Heteropneustes fossilis*: Role in Mucus Exudation Under Elevated Temperature. **Comparative Biochemistry and Physiology C**. v. 119, n. 2, p. 211-216, 1998.

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

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. **Frontiers in Physiology**. v. 5, p. 1-4, 2014.

ROBERTSON, J.C.; HAZEL, J.R., Cholesterol content of trout plasma membranes varies with acclimation temperature. **American Journal of Physiology**. v. 269, p. R1113-R1119, 1995.

ROBINSON, E. **Antarctic Fish: Thermal Specialists or Adaptable Generalists?**, PhD. Christchurch, New Zealand: University of Canterbury. 2008.

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

ROSS, L. G.; ROSS, B. **Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals**. 2nd. Oxford: Blackwell Science, 1999. 159 pp.

RODRIGUES Jr E.; FEIJÓ-OLIVEIRA, M. SUDA, C. N. K.; VANI, G. S.; DONATTI, L. RODRIGUES, E.; LAVRADO, H. P. Metabolic responses of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* to sewage pollution. **Fish Physiology and Biochemistry**. v. 41, n. 5, p. 1205-1220, 2015.

ROVER JR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos

eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**. v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

RUDNEVA I. I.; SKURATOVSKAYA, E. N.; KUZMINOVA, N. S., KOVYRSHINA, T. B. Age composition and antioxidant enzyme activities in blood of Black Sea teleosts. **Comparative Biochemistry Physiology, Part C**. v. 151, p. 229 – 239, 2010.

RUIZ-AMIL, M., SOLER-GRAU, G. Y.; GARRIDO, A. P. Metabolismo glucídico y lipídico en especies acuáticas In: DE LOS MONTEROS, J. E.; LASARTE, U. (eds.) **Nutrición en Acuicultura: Plan de formación de técnicos superiores en acuicultura (PEUGA)**. Vol. I. Madrid: Industrias Gráficas España, 1987. p. 197-224.

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

SABER, T. H. Histological adaptation to thermal changes in gills of common carp fishes *Cyprinus carpio* L. **Rafidain Journal of Science**. v. 22, p. 1-16, 2011.

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

SALWAY, J. G. **Metabolism at a glance**. Londres: Blackwell Science, 1994. 95p.

SANDERSFELD, T.; DAVISON, W.; LAMARE, M. D.; KNUST, R.; RICHTER, C. Elevated temperature causes metabolic trade-offs at the whole-organism level in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **The Journal of Experimental Biology** v. 218, n. 15, p. 2373-2381, 2015.

SANGIAO-ALVARELLOS, S.; LAIZ-CARRIÓN, R.; GUZMÁN, J. M.; MARTIN DEL RÍO, M. P.; MIGUEZ, J. M.; MANCERA, J. M.; SOENGAS, J. L. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 285, p. R897–R907, 2003.

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

SAOUD, P.; KREYDIYYEH, S.; CHALFOUN, A.; FAKIH, M. Influence of salinity on survival, growth, plasma osmolality and gill  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  activity in the rabbitfish *Siganus rivulatus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 348, n. 1-2, p. 183-190, 2007.

SAPOTA, M. R. Gonad development and embryogenesis of *Notothenia coriiceps* from South Shetlands, Antarctica. **Polar Biology**. v. 22, p. 164-168, 1999.

SCHWARZBAUM, P. J.; WIESER, W.; NIEDERSTÄTTER, H. Constrating effects of temperature acclimation on mechanisms of ionic regulation in a eurythermic and a

stenothermic species of freshwater fish (*Rutilus rutilus* and *Salvelinus alpinus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 98, p. 483-489, 1991.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, p. 192–205, 1968.

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

SEIBEL, B. A. Critical oxygen levels and metabolic suppression in oceanic oxygen minimum zones. **The Journal of Experimental Biology**. v. 214, p. 326–336, 2011.

SEIXAS FILHO, J. T. Uma revisão sobre o papel do carboidrato e da proteína no metabolismo de peixes com hábitos alimentar carnívoro e onívoro. **Augustus**. v. 09, n. 18, p.32-51, 2004.

SEMENZA, G., L. Hydroxylation of HIF-1: Oxygen Sensing at the Molecular Level. **Physiology**. v. 19, n. 4, p. 176-182, 2004.

SHIMENO, S.; SHIKATA, T. Regulation of carbohydrate metabolism in fish. XIII. Seasonal changes in carbohydrate-metabolizing enzyme activity and lipid content of carp reared outdoors. **Bulletin of the Japanese Society for the Science of Fish**. v. 59, p. 653-659, 1993.

SIDELL, B. D. Intracellular oxygen diffusion: the roles of myoglobin and lipid at cold body temperature. **The Journal of Experimental Biology**. v. 201, p. 1118–1127, 1998.

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

SK U. H.; BHATTACHARYA, S. Prevention of cadmium induced lipid peroxidation, depletion of some antioxidative enzymes and glutathione by series of novel organoselenocyanates **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 22, p. 298–308, 2006.

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

SLOMAN, K. A.; GILMOUR, K. M.; METCALFE, N. B.; TAYLOR, A. C. Does socially induced stress in rainbow trout cause chloride cell proliferation? **Journal of Fish Biology**. v. 56, p. 725-738, 2000.

SMITH, R. R. Nutritional bionergetics in fish. In: PILLAY, T. V. R. (ed.) **Fish feed techonology**. ADCP/REP/80/11, Aquaculture Development and Coordination Programme. Rome: FAO, 1980. p.22-27.

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



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

SOMERO, G. N., DEVRIES, A. L. Temperature tolerance of some Antarctic fishes. **Science**. v. 156, p. 257–258, 1967.

SOMERO, G. N.; GIESE, A. C.; WOHLSCHLAG, D. E. Cold adaptation of the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 26, p. 223-233, 1968.

SOMERO, G. N.; FIELDS, P. A.; HOFMANN, G. E.; WEINSTEIN, R. B.; KAWALL, H. Cold adaptation Stenothermy in Antarctic Nothothenioid Fishes: What has been gained and what has been lost? In: diPrisco, G.; Pisano, E ; Clark, A. (eds) **Fishes of Antarctica: a biological overview**; Milão: Springer, 1998. pp. 97 – 107.

SOMMER, A.; KLEIN, B.; PÖRTNER, H. O. Temperature induced anaerobiosis in two populations of the polychaete worm *Arenicola marina* (L.). **Journal of Comparative Physiology B**. v. 167, p. 25-35, 1997.

STAURNES, M. Difference between summer and winter gill Na/K-ATPase activity and hypoosmoregulatory ability of seafarmed anadromous arctic char (*Salvelinus alpinus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 105, p. 475-477, 1993.

STROBEL, A.; LEO, E.; PÖRTNER, H.-O.; MARK, F.C. Elevated temperature and PCO<sub>2</sub> shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 166, p. 48-57, 2013.

SUAREZ, R. K.; MALLET, M. D.; DAXBOECK, C.; HOCHACHKA, P. W. Enzymes of energy metabolism and gluconeogenesis in the Pacific blue marlin, *Makaira nigricans*. **Canadian Journal of Zoology**. v. 64, p. 694-697, 1986.

SUBUDHI A. W. D. S. L.; KIPP, R. W.; ASKEW, E. W. Antioxidant status and oxidative stress in elite alpine ski racers. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**. v.11, n.1, p.32-41. 2001

TANG, C. H.; LEE, T. H. The effect of environmental salinity on the protein expression of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, anion exchanger 1, and chloride channel 3 in gills of a euryhaline teleost, *Tetraodon nigroviridis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**. v. 147, n. 2, p. 521-528, 2007.

THORNE, M. A. S.; BURNS, G.; FRASER, K. P. P.; HILLYARD, G.; CLARKE, M. S. Transcription profiling of acute temperature stress in the Antarctic plunderfish *Harpagifer antarcticus*. **Marine Genomics**. v. 3, p. 35-44, 2010.

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

TORT, M. J.; HURLEY, D.; FERNANDEZ-COBAS, C.; WOOSTER, G. A.; BOWSER, P. R.. Effects of hydrogen peroxide treatments on catalase and glutathione activity in Walleye *Sander vitreus*. **Journal of the World Aquaculture Society**. v. 36, p. 577-586, 2005.

TSENG, Y.-C.; HUANG, C.-J.; CHANG, J. C.-H.; TENG, W.-Y.; BABA, O.; FANN, M.-J.; HWANG, P.-P. et al., 200 Glycogen phosphorylase in glycogen-rich cells is involved in the energy supply for ion regulation in fish gill epithelia. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 293, p. R482-R491, 2007.

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

TSENG, Y.-C.; LEE, J.-R.; CHANG, J. C.-H.; KUO, C.-H.; LEE, S.-J.; HWANG, P.-P. Regulation of Lactate Dehydrogenase in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) Gills during Acclimation to Salinity Challenge. **Zoological Studies**. v. 47, n. 4, p. 473-480, 2008.

TSENG, Y.-C.; CHEN, R.-D.; LUCASSEN, M.; SCHMIDT, M. M.; DRINGEN, R.; ABELE, R. ; HWANG, P.-P. Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish. **PLoS One**. v. 6, n. 3, e18180. 2011.

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

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; MENDONÇA, V.; DIAS, M.; ROMA, J.; DINIZ, M. S. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. **Marine Environmental Research**, v. 97, p. 10-14, 2014.

VOET, D.; VOET, J. **Bioquímica**. 3ªEd. Porto Alegre:Artmed. 2006. 1616p.  
WALSH, P. J.; MOON, T. W.; MOMMSEN, T. P. Interactive effects of acute changes in temperature and pH on metabolism in hepatocytes from the sea raven *Hemitripterus americanus*. **Physiological Zoology**. v. 58, p. 727-735, 1985.

WELLS, R. M. C.; TETENS, V.; DEVRIES, A. L. Recovery from stress following capture and anaesthesia of Antarctic fish: haematology and blood chemistry. **Journal of Fish Biology**. v. 25, p. 567-576, 1984.

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

WILHELM FILHO, D.; GONZÁLEZ-FLECHA, B.; BREDESTON, L.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**. v. 27, p. 2879-2882, 1994.

WILLISCROFT, S. N.; TSUYUKI, H. Lactate dehydrogenase systems in rainbow trout - evidence for polymorphism in liver and additional subunits in gills. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**. v. 27, p. 1563-1567, 1970.

WILSON, J. M.; LAURENT, P. Fish Gill Morphology: Inside Out. **Journal of Experimental Zoology**. v. 293, p. 192-213, 2002.

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

WINDISCH, H. S.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O.; LUCASSEN, M. Stress response or beneficial temperature acclimation: transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum*). **Molecular Ecology**. v. 23, p. 3469-3482, 2014.

WONG, C. K. C.; CHAN, D. K. O. Effects of cortisol on chloride cells in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Journal of Endocrinology**. v. 168, p. 185-192, 2001.

WOODY, C. A.; NELSON, J.; RAMSTAD, K. Clove oil as an anaesthetic for adult sockeye salmon: field trials. **Journal of Fish Biology**. v. 60, p. 340–347, 2002.  
YAMASHITA, M.; YABU, T.; OJIMA, N. Stress protein Hsp70 in fish. **Aqua-BioScience Monographs**. v. 3, n. 4, p. 111-141, 2010.

## ANEXO 1 - Protocolo para determinação da concentração de proteínas

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

**Princípio do método:** O método baseia-se na interação entre o corante Coomassie Brilliant Blue BG-250, uma substância ácida, e proteínas com aminoácidos cujas cadeias laterais possuem propriedade básica ou aromática. No pH da reação, a interação entre a proteína e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, causando uma mudança de coloração inicialmente castanha para tons de azul, absorvendo luz no comprimento de onda de 595 nm.

### Procedimento

	Extrato (µL)	Padrão de BSA (µL)	TAMPÃO (µL)	Reativo de Bradford (µL)
Amostra	10	---	---	250
Padrão	---	10	---	250
Branco	---	---	10	250

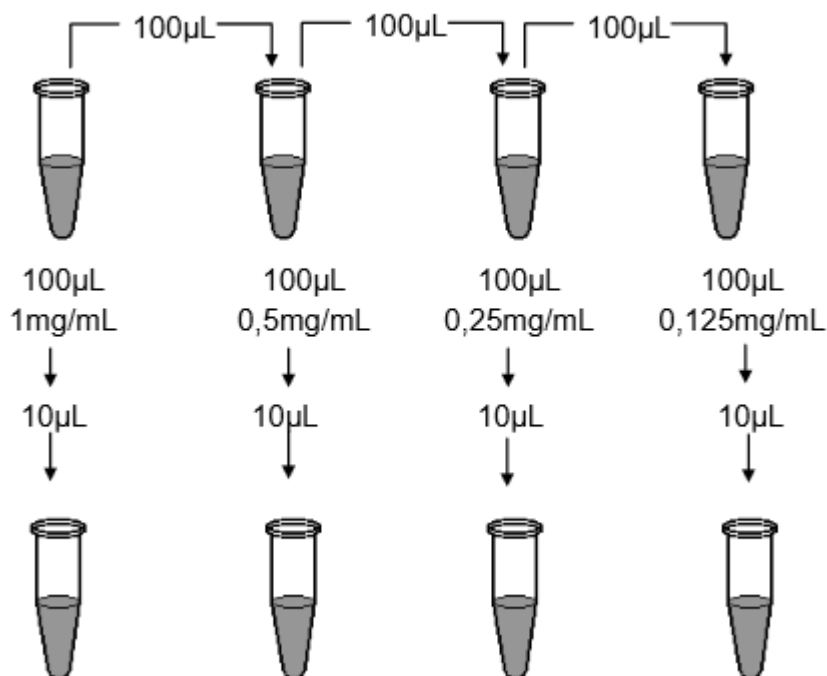
595 nm

### Observações:

- utilizar microplacas de 96 poços
- pipetar em triplicata (inclusive branco e padrão)
- aguardar 5 minutos após as pipetagens (proteger da luz) - estável por até 1h
- Verificar TODOS os valores de absorbância para averiguar se alguma das amostras precisa ser diluída novamente (caso o valor da ABS fique acima do valor correspondente a 1,0 mg BSA.ml<sup>-1</sup>), ou se a curva-padrão precisa ser refeita (caso o  $r^2 < 0,95$ ).
- Calcular a concentração de proteínas

### Curva-padrão de albumina de soro bovino (BSA)

Preparar 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de BSA a 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e, a partir dessa solução, proceder as diluições seriadas em  $\text{H}_2\text{O}$  (Milli-Q) para a obtenção das demais concentrações (0,5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 0,25  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  e 0,125  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Pipetar conforme o esquema abaixo



## **ANEXO 2** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA)

### **Princípio do Método:**

Os ensaios são baseados na defosforilação do ATP para a oxidação do NADH, sendo a atividade da NKA determinada na fração sensível a ouabaína, enquanto a fração sensível ao NEM (inibidor da  $\text{H}^+$ -ATPase) é utilizada para avaliar a atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase.

### **Tampões:**

- 1) Tampão SEI (Calcular o volume necessário para o número de amostras)

Pesar de acordo com o volume final da solução:

- 150mM Sacarose (S1)
- 50mM Imidazol (I1)
- 10mM EDTA (A4)

Preparação do tampão:

- Diluir num becker com água destilada e agitador magnético
- Completar o volume final em uma proveta
- Ajustar o pH da solução para 7,5 com HCL (se estiver acima) ou NaOH (se estiver abaixo). Armazenar em frasco limpo devidamente etiquetado e guardar na geladeira. Esse tampão pode ser preparado com antecedência e não deve ser armazenado mais que um mês.

- 2) Tampão de homogenização SEID 0,5%

Pesar 0,01g de sodium deoxycholate (S8) e acrescentar a cada 10mL de tampão SEI que deve ser medido previamente em uma proveta. Colocar num Becker e dissolver com agitador magnético (**Estável a temperatura ambiente por 1 semana**). **Obs.:** O volume de 10 mL é o suficiente para cada 25 amostras.

### **Preparação do homogenado:**

- Descongelar as brânquias em gelo e retirar todos os arcos branquiais.
- Pesar aproximadamente 40mg de tecido e homogenizar no gelo em 400  $\mu\text{L}$  de tampão de homogeneização.

- Centrifugar o homogenado por 7min a 3200 g (4°C) – Remover o sobrenatante e manter no gelo.
- O Sobrenadante pode ser congelado à -80 °C

### **Preparação dos Sistemas de Reação**

#### **- Solução de mistura**

	2 placas	3 placas	4 placas	5 placas	6 placas	7 placas
Sol. Mistura	40mL	60mL	80mL	100mL	120mL	140mL
30mM Imidazol (I1)	0,0817g	0,1225g	0,1677g	0,2096g	0,245g	0,2913g
45mM NaCL (C13)	0,01051g	0,1577g	0,2102g	0,2628g	0,3154g	0,3679g
15mM KCL (C12)	0,0447g	0,0671g	0,0894g	0,1118g	0,1342g	0,1565g
3mM MgCL <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O (C11)	0,0243g	0,0365g	0,0486g	0,0608g	0,073g	0,0851g
0,4mM KCN (C5)	0,001g	0,0015g	0,002g	0,0025g	0,003g	0,0035g

Pesar os reagentes colocar num Becker e acrescentar água destilada. Colocar a barra magnética e levar ao agitador magnético até completa dissolução. Acertar o volume final em uma proveta. Ajustar o pH para 9,0 com NaOH.

#### **- Solução de reação (Diluir na solução de mistura)**

	2 placas	3 placas	4 placas	5 placas	6 placas	7 placas
Sol. reação	40mL	60mL	78mL	97mL	117mL	138mL
1,0mM ATP (freezer)	0,022g	0,033g	0,043g	0,053g	0,064g	0,076g
0,2mM NADH (freezer <b>N8129</b> )	0,0056g	0,0084g	0,011g	0,014g	0,016g	0,019g
3 U/mL PK* (geladeira)	24μL	36μL	48μL	60μL	72μL	84μL
2 U/mL LDH* (geladeira)	6,4μL	9,58μL	12,5,4μL	15,48μL	18,67μL	18,6μL
0,1mM Frutose1,6 Difosfato (freezer)	0,0029g	0,0044g	0,0056g	0,007g	0,0085g	0,0100g
2mM PEP (Freezer)	0,0372g	0,0558g	0,0725g	0,0902g	0,1088g	0,1283g

#### **Procedimento:**

- Separar 3 frascos Falcon limpos e embrulhar com papel alumínio. Identificar com etiqueta:

Frasco 1: NKA total

Frasco 2: Ouabaína (inibidor)

Frasco 3: NEM (inibidor).

- Pesar os inibidores (ver tabela abaixo).

	2 placas	3 placas	4 placas	5 placas	6 placas	7 placas
Inibidores	13mL	20mL	26mL	32mL	39mL	46mL
2mM ouabaína	0,0189g	0,0291g	0,0378g	0,0465g	0,0567g	0,0669g
2mM NEM	0,0032g	0,0050g	0,0065g	0,008g	0,0097g	0,0115g

- Calcular o volume da solução de reação para 3 alíquotas. Dividir em 3 partes (1 sem inibidores, 1 com 2mM ouabaína<sup>1</sup> e 1 com 2mM NEM).
- Agitar vigorosamente para permitir a completa dissolução da ouabaína na solução de reação.. Para o falcon contendo a solução de NEM agitar na mão por tombamento com movimentos suaves.
- após determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford (ANexo 2), normalizar as amostras para a concentração de 1mg.mL<sup>-1+</sup>
- Pipetar 5µL do homogenado
- Pipetar 5µL do homogenado<sup>2</sup> rapidamente (mantenha sempre no gelo) e 200µL da solução de reação. (microplaca de 96 poços).
- a Leitora irá fazer 31 leituras a 340nm em intervalos de 30 segundos para cada poço de cada amostra até atingir o tempo máximo de 15 minutos (os valores de absorbância deverá decrescer).

<sup>1</sup> Frascos com ouabaína devem ser protegidos da luz

<sup>2</sup> Em cada microplaca são feitas 8 amostras (uma em cada linha da microplaca que contém 12 poços). As amostras são divididas em quadruplicatas: 4 réplicas para a solução de reação, 4 réplicas para sol. reação mais ouabaína (inibidor da NKA), e 4 réplicas para a sol. reação mais NEM (inibidor da H<sup>+</sup>-ATPase).



### **ANEXO 3 - Preparação das amostras para a determinação dos níveis de atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos avaliadas**

#### **Procedimento**

1. Homogeneizar aproximadamente 150 mg de brânquias em aproximadamente 750  $\mu$ L de Tampão Tris-HCl pH 7,4 (manter a proporção de 1:5 no caso de porção menor ou maior de tecido);
2. Sonicar as amostras por 15 segundos para o rompimento das membranas subcelulares;
3. Centrifugar a 10.260g por 10 minutos a 4°C
4. Aliquotar o sobrenadante (100  $\mu$ L) e congelar em -20°C. Manter nessa condição até dar continuidade as análises
5. Quantificar as proteínas pelo método de Bradford (Anexo 2).

#### **Tampão Tris-HCl 400mM pH 7,4**

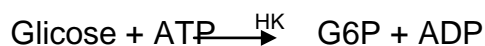
MM = 121,14

- 12,114 g em 200 mL de H<sub>2</sub>O miliQ
- ajustar o pH com HCl ou NaOH
- completar o volume para 250 mL com H<sub>2</sub>O miliQ

**ANEXO 4** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da hexoquinase (HK)

BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.342, n.2, p.213-225. 2007. (Obs: adaptado para microplaca de 384 poços)

**Princípio do Método:** A HK catalisa a fosforilação da glicose formando glicose-6-fosfato (G6P) com o gasto de ATP. A G6P produzida é reduzida à 6-fosfogluconato na presença de G6PDH, com redução paralela de  $\text{NAD}^+$  a NADH.



A glicose-6-fosfato formada a partir reação da hexoquinase é medida a 340 nm após a adição de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e  $\text{NADP}^+$ , seguida pela formação de NADPH.  $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**Procedimento:**

- Esse procedimento deve ser feito com amostra recém-homogeneizada, antes do seu congelamento (sem normalização).
- Logo após a homogeneização das amostras, preparar o sistema de reação (3 mL para aproximadamente 10 amostras + branco, em triplicata)

Reagentes	Concentração Cubeta	[Uso]	SR
Tampão Imidazol pH 7,4	50 mM	200 mM	750 $\mu\text{L}$

Glucose	2,0 mM	20 mM	300 $\mu$ L
ATP	2,0 mM	10 mM	600 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	100 mM	300 $\mu$ L
NADP <sup>+</sup>	0,4 mM	8 mM	150 $\mu$ L
Dithiothreitol (DTT)	1,0 mM	20 mM	150 $\mu$ L
KCl	2,0 mM	20 mM	300 $\mu$ L
G6PDH	0,6 U	60 U/mL	30 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p. 2625 $\mu$ L			270 $\mu$ L

- Pipetar, em triplicata, 10  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 50 mM (Branco), 10  $\mu$ L da amostra mais 70  $\mu$ L do sistema de reação com a micropipeta multicanal.
- Efetuar a leitura da cinética enzimática em 340 nm. O tempo total da leitura será de 6 min, em intervalos de 40 segundos. Os valores de absorbância deverão aumentar com o tempo.

#### **Preparação dos reagentes:**

- Glucose (pode ser armazenado em 4°C): MM = 180,16  
0,036032g em 10 ml de H<sub>2</sub>O (mQ)
- NADP<sup>+</sup> (instável – preparar na hora): MM = 743,41  
0,00596g em 1 ml de H<sub>2</sub>O (mQ)
- KCl (pode ser armazenado em 4°C): MM = 74,6  
0,05968g em 40 ml de H<sub>2</sub>O (mQ)
- ATP (instável – preparar na hora): MM = 551,14  
0,0110228g em 2 ml de H<sub>2</sub>O (mQ)
- DTT (Dithiothreitol) – (fotosensível): MM = 154,25  
0,03085g em 10 ml de H<sub>2</sub>O (mQ)
- G-6-PDH (Glucose-6-phosphate dehydrogenase) (estável por 3 semanas no freezer -20°C)  
3,9  $\mu$ l para diluir em 235  $\mu$ l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>; pH 7,9
- MgCl<sub>2</sub> (pode ser armazenado em 4°C):MM = 95,3  
0,03812g em 40 ml de H<sub>2</sub>O (mQ)

## **ANEXO 5** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da fosfofrutoquinase (PFK)

BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.342, n.2, p.213-225. 2007. (Obs: adaptado para microplaca de 384 poços)

### **Princípio do Método:**

A PFK catalisa a fosforilação da frutose-6-fosfato em frutose-1,6-bisfosfato. O método baseia-se na reação acoplada entre PFK, aldolase (ALD), triose fosfato isomerase (TPI) e glicerolfosfato desidrogenase (GPDG). A frutose-1,6-bisfosfato, produzida pela PFK, é clivada em gliceraldeído-3-fosfato (GAP) pela ALD. A TPI converte GAP em diidroxiacetona-fosfato (DHAP), que atua como substrato da GPDH, que então utiliza NADH para reduzir DHAP em glicerol-3-fosfato.

### **Procedimento:**

- Esse procedimento deve ser feito com amostra recém-homogeneizada, antes do seu congelamento (sem normalização).
- Logo após a homogeneização das amostras preparar o sistema de reação (3 mL para aproximadamente 10 amostras + branco, em triplicata)

Reagentes	Concentração Cubeta	[Uso]	SR
Tampão Tris-HCl pH 8,2	50 mM	200mM	750 $\mu$ L
MgCl <sub>2</sub>	10 mM	100 mM	300 $\mu$ L
ATP	1,0 mM	10 mM	300 $\mu$ L
NADHx	0,15 mM	14,1 mM	33 $\mu$ L
AMP	2,0 mM	20 mM	300 $\mu$ L
KCl	250 mM	2 M	375 $\mu$ L
GDH	1 U/mL	200 U/mL	15 $\mu$ L
ALD	1,2 U/mL	413,22 U/mL	9 $\mu$ L
TPI	10 U/mL	2015 U/mL	15 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p. 2325 $\mu$ L			550 $\mu$ L
Frutose-6-fosfato (START)	5,0mM	50 mM	8 $\mu$ L

- Preparação do reagentes enzimáticos (preparar na hora):

- Triose Fosfato Isomerase (TPI)

- 5  $\mu$ l da TPI (11900 U) + 77  $\mu$ l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 3,2 M pH= 6,0;

Estoque: V= 380  $\mu$ l; 5,2 mg proteína. ml<sup>-1</sup>; 11900 U

- Glicerofosfato Desirogenase ( $\alpha$ -GDH)

-: 5  $\mu$ l de  $\alpha$ -GDH (1KU) + 84  $\mu$ l de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub> 32 M pH=6,0; Estoque:

V= 280 ml; 14,1 mg

- Aldolase (Ald)

- 3  $\mu$ l de (Ald) no sistema de reação (1 ml); Estoque: v=2,42ml; 1000 U;

23 mg proteína. ml<sup>-1</sup>.

- Em microplaca de 384 poços, pipetar, em triplicata, 10  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 50 mM (Branco), 10  $\mu$ L da amostra mais 62  $\mu$ L do sistema de reação com a micropipeta multicanal; pipetar, em cada poço, 8  $\mu$ L da solução de F-6-P (START).

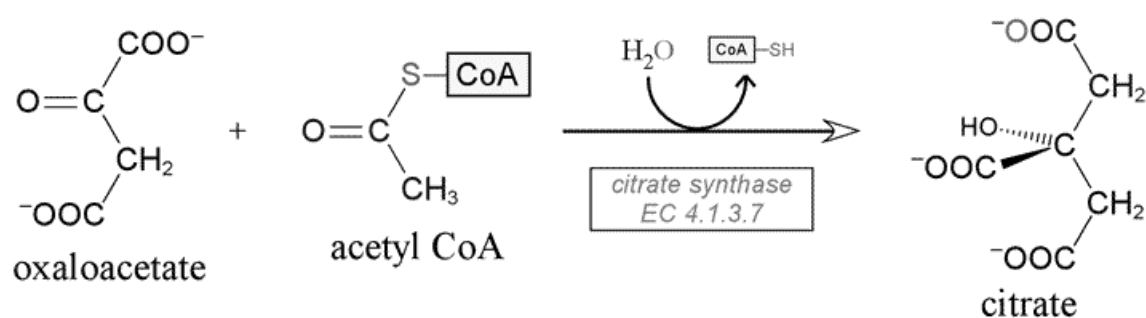
9. Efetuar a leitura da cinética enzimática em 340 nm. O tempo total da leitura será de 8 min, em intervalos de 21 segundos. Os valores de absorbância deverão aumentar com o tempo.

**ANEXO 6** - - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da citrato sintase (CS)

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

**Princípio do Método:**

A CS é catalisa a primeira reação do Ciclo do Ácido Cítrico, a reação de condensação do oxaloacetato com o acetato, proveniente da acetil coenzima A, produzindo citrato e coenzima A. A reação entre o DTNB e grupamento tiol da coenzima A (CoA-SH) produz um complexo que absorve luz a 412 nm.



**Procedimento:**

- Normalizar as amostras para a concentração de proteína de 1 mg. ml<sup>-1</sup>
- realizar teste de diluição das amostras, caso necessário.
- Preparar o sistema de reação (3 mL para aproximadamente 10 amostras + branco, em triplicata)

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração Cubeta</b>	<b>[Uso]</b>	<b>SR</b>
Tampão Tris-HCl pH 7,4	50 mM	200mM	862,5 µL
KCL	100 mM	2 M	172 µL
EDTA	1,0 mM	6 mM	114 µL
DTNB	200 mM	3 mM	231 µL
Acetil-CoA	200 mM	6 mM	114 µL
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p. 2626 µL			1131,5 µL
Oxaloacetato (START)	500 mM	8 mM	5 µL

- Pipetar, em triplicata, 5 µL de tampão Tris-HCl 50 mM (Branco), 5 µL da amostra normalizada mais 70 µL do sistema de reação com a micropipeta multicanal, aguardar 5 minutos (proteger da luz); adicionar 5 µl da solução de oxaloacetato para iniciar a reação;
9. Efetuar a leitura da cinética enzimática em 412 nm. O tempo total da leitura será de 8 min, em intervalos de 21 segundos. Os valores de absorbância deverão aumentar com o tempo.

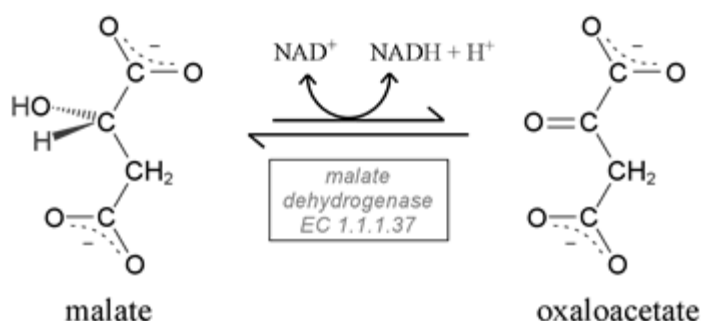
## ANEXO 7 - - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da malato desidrogenase (MDH)

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

### Princípio do Método:

A MDH catalisa a última reação do Ciclo do Ácido Cítrico, regenerando o oxaloacetato. O método baseia-se na avaliação de sua reação reversa, ou seja, redução do oxaloacetato em malato, com a oxidação de NADH a NAD<sup>+</sup>, quantificando o NADH consumido durante a reação.

( $\epsilon$  NADH = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>).





**Procedimento:**

- Normalizar as amostras para a concentração de proteína de 1 mg. ml<sup>-1</sup>
- realizar teste de diluição das amostras, caso necessário.
- Preparar o sistema de reação (3 mL para aproximadamente 10 amostras + branco, em triplicata)

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração Cubeta</b>	<b>[Uso]</b>	<b>SR</b>
Tampão Tris-HCl pH 7,4	50 mM	200mM	862,5 µL
Oxaloacetato	0,4 mM	8 mM	172 µL
MgCl <sub>2</sub>	20 mM	100 mM	690 µL
NADH	0,254 mM	14,1 mM	37,95 µL
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p. 2626 µL			1255,8,5 µL

- Pipetar, em triplicata, 10 µL de tampão Tris-HCl 50 mM (Branco), 10 µL da amostra normalizada mais 70 µL do sistema de reação com a micropipeta multicanal;

9. Efetuar a leitura da cinética enzimática em 340 nm. O tempo total da leitura será de 8 min, em intervalos de 21 segundos. Os valores de absorbância deverão diminuir com o tempo.

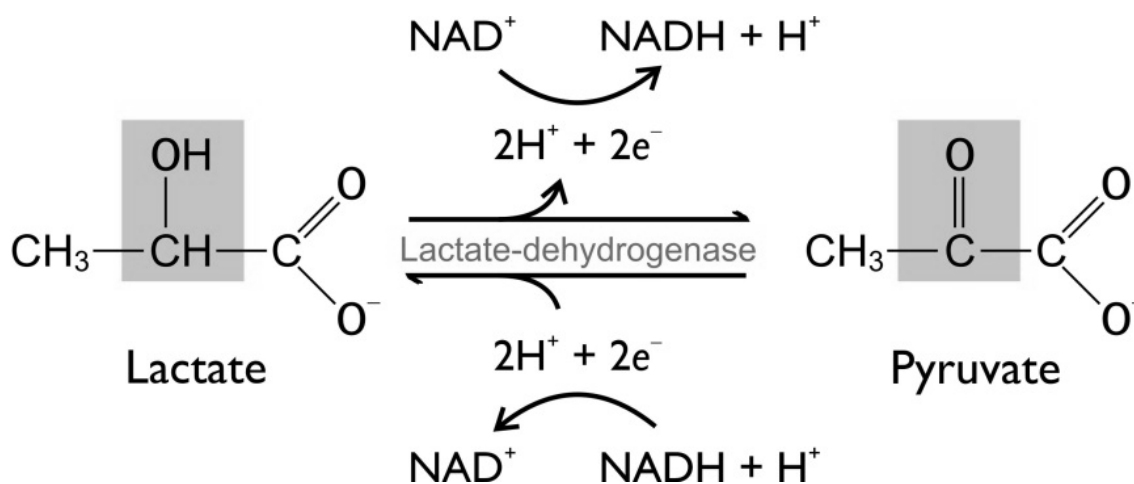
**ANEXO 8** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da lactato desidrogenase (LDH)

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

**Princípio do Método:**

A LDH catalisa a conversão do piruvato em lactato, com a concomitante redução do NADH a NAD<sup>+</sup>, como parte do metabolismo anaeróbico. Em alguns tecidos, essa enzima catalisa a reação inversa, conversão do lactato em piruvato. O método quantifica o NADH consumido na reação.

( $\epsilon$  NADH = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)



**Procedimento:**

- Normalizar as amostras para a concentração de proteína de 1 mg. ml<sup>-1</sup>
- realizar teste de diluição das amostras, caso necessário.
- Preparar o sistema de reação (3 mL para aproximadamente 10 amostras + branco, em triplicata)

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração Cubeta</b>	<b>[Uso]</b>	<b>SR</b>
Tampão Tris-HCl pH 7,4	50 mM	200mM	862,5 $\mu$ L
Piruvato de sódio	1 mM	10 mM	345 $\mu$ L
KCL	100 mM	2 M	172,5 $\mu$ L
NADH	0,254 mM	14,1 mM	62,1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O miliQ q.s.p. 2626 $\mu$ L			3153,3 $\mu$ L

- Pipetar, em triplicata, 10  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 50 mM (Branco), 10  $\mu$ L da amostra normalizada mais 70  $\mu$ L do sistema de reação com a micropipeta multicanal;

9. Efetuar a leitura da cinética enzimática em 340 nm. O tempo total da leitura será de 8 min, em intervalos de 21 segundos. Os valores de absorbância deverão diminuir com o tempo.

**ANEXO 9** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L. DI PRISCO, G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: Correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, 1250:76-82, 1995. (Obs: adaptado para microplaca de 384 poços)

**Princípio:** aumento de absorvância provocada pela redução do NADP<sup>+</sup> a NADPH, a 340 nm pela G6PDH.

( $\epsilon$  NADH = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>)

**Obs.** Todas as etapas devem ser realizadas sobre gelo

1. Homogeneizar aproximadamente 150 mg de brânquias em aproximadamente 750  $\mu$ L de Tampão Tris-HCl pH 7,4 (manter a proporção no caso de porção menor ou maior de tecido);
2. Sonicar as amostras por 15 segundos para o rompimento das membranas subcelulares;
3. Centrifugar a 10.260g por 10 minutos a 4°C
4. Aliquotar o sobrenadante (100  $\mu$ L) e congelar em -20°C. Manter nessa condição até dar continuidade as análises
5. Quantificar as proteínas pelo método de Bradford.
6. Normalizar as amostras para que as mesmas contenha a concentração de proteína de 1 mg/mL
7. Preparar o sistema de reação

<b>Reagentes</b>	<b>Concentração Cubeta</b>	<b>Uso</b>	<b>SR 1ml</b>
Tampão Tris-HCl pH 7,4	100 mM	200 mM	500 $\mu$ L
Glicose-6-fosfato (Sigma G7772)	1 mM	100 mM	10 $\mu$ L
NADP <sup>+</sup>	0,2 mM	8 mM	25 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O q.s.q. 875 $\mu$ L			340 $\mu$ L

8. Pipetar, em triplicata, 10  $\mu$ L de tampão (Branco), 10  $\mu$ L da amostra normalizada mais 70  $\mu$ L do sistema de reação com a pipeta multicanal.

9. Efetuar a leitura da cinética enzimática em 340 nm. O tempo total da leitura será de 6 min, em intervalos de 40 segundos. Os valores de absorbância deverão aumentar com o tempo.

**ANEXO 10** - Protocolo padronizado para a quantificação de glicogênio

BIDINOTTO, P. M.; SOUZA, R. H. S.; MORAES, G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: Procedure for field determinations of microsamples.

**Boletim Técnico do CEPTA-Pirassununga.** v. 10, p. 53-60, 1997.

**Reagentes:**

- KOH 6,0 N
- Etanol
- K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%)
- H<sub>2</sub>O destilada
- Fenol 3,0% (0,7 mL) ou 4,1(0,5 mL)
- Solução padrão de glicose 100 mM

**Procedimento:**

- Dissolver 100 mg de brânquias em 1mL de KOH 6,0 N em banho-maria fervente por 3 a 5 minutos (até que o tecido tenha sido totalmente dissolvido).
- Passar 250 µL desta suspensão para um tubo de ensaio adicionando 3 mL de Etanol. Agitar para homogeneizar a mistura.
- Adicionar 100 µL de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (10%) e agitar.
- Centrifugar a 3000 g por 3 minutos.
- Descartar o sobrenadante invertendo o tubo.
- Adicionar ao precipitado 2,5 mL de H<sub>2</sub>O destilada, agitando para a dissolução total.

**Solução Padrão Estoque (SPE) de Glicose (0,1M):**

- diluir SPE 100 vezes → 100 µL do padrão em 10 mL de H<sub>2</sub>O destilada
- concentração do padrão será de 1 mM

1 mM → 1 mMol → 1 L (SPE)

1 µMol → 1 mL

1 nMol → 1 µL

obs: considerando que serão utilizados 100 µL de padrão para medir sua absorvância, a quantidade de glicose neste é de 100 n mols

**Marcha Analítica**

TUBO	Extrato ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>2</sub> O d (q.s.p. 500 $\mu\text{L}$ )	Padrão ( $\mu\text{L}$ )	Fenol (ml)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado (mL)
Amostra	500	----	----	0,5	2
Padrão	---	400	100	0,5	2
Branco	---	500	---	0,5	2

Leitura: 480 nm

**ANEXO 11 - Protocolo padronizado para a determinação de lactato nas brânquias****Reagentes:****TCA 20%**

- 20 g de ácido tricloroacético
- 100 mL de água destilada

**CuSO<sub>4</sub> 4%**

- 2g de CuSO<sub>4</sub>
- 50 mL de água destilada

**NaOH 2%**

- 1g de NaOH
- 50 mL de água destilada

**p-fenilfenol**

- 0,75 g de p-fenilfenol (PM=170,21)
- 50 mL de água destilada

**Preparação do tecido:**

- pesar aproximadamente 100mg de tecido (brânquias)
- homogeneizar em 1mL de TCA 20%
- centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos (4°C)

**Curva padrão de [lactato]**

- preparar Solução Padrão de Lactato (SPL) a 0,1 mM (100 µM)
  - 2 µL de ácido láctico concentrado
  - 1998 µL de TCA 20%
- a partir da SPL, preparar as seguintes soluções



	[lactato] ( $\mu\text{M}$ )	Volume SPL ( $\mu\text{L}$ )	Volume TCA 20% ( $\mu\text{L}$ )
A	0	0	2000
B	0,05	1	1999
C	0,1	2	1998
D	0,2	4	1996
E	0,4	8	1992
F	0,8	16	1984
G	1,6	32	1968

### **Teste de diluição da amostra**

10X: 50  $\mu\text{L}$  de amostra/450  $\mu\text{L}$  de água destilada<sup>3</sup>

25X: 20  $\mu\text{L}$  de amostra/480  $\mu\text{L}$  de água destilada

50X: 10  $\mu\text{L}$  de amostra/490  $\mu\text{L}$  de água destilada

### **Procedimento Analítico:**

- adicionar aos 500  $\mu\text{L}$  de amostra diluída, padrão ou branco (50  $\mu\text{L}$  de TCA20%/450  $\mu\text{L}$  de água destilada)

20  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  4%

2,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado

- levar a banho-maria fervente por 5 minutos
- resfriar em temperatura ambiente
- adicionar 80  $\mu\text{L}$  de p-fenilfenol
- agitar em vortex
- manter solução em repouso por 15 minutos
- levar a banho-maria fervente por 90 segundos
- pipetar em microplaca de 96 poços, em triplicata (200  $\mu\text{L}$ / poço)
- ler a 570 nm

<sup>3</sup> Diluição utilizada para brânquias de peixes

**ANEXO 12 - Protocolo padronizado para a determinação de piruvato****Reagentes:****TCA 20%**

- 20 g de ácido tricloroacético
- 100 mL de água destilada

**DNPH (1% em HCl 2,0 N)**

- 0,05g de Dinitrofenilhidrazina
- 50 mL de HCl 2,0 N

**NaOH 1,3 N**

- 13 g de NaOH
- 250 mL de água destilada

**Preparação do tecido:**

- pesar aproximadamente 100mg de tecido (brânquias)
- homogeneizar em 1mL de TCA 20%
- centrifugar a 3000 rpm por 3 minutos (4°C)

**Curva padrão de [piruvato]**

- preparar Solução Padrão de Piruvato (SPP) a 7,2 mM
  - 1,6 mg de piruvato de sódio (PM= 110,04)
  - 2 mL de TCA 20%
- a partir da SPP, preparar as seguintes soluções

	[lactato] (mM)	Volume SPP ( $\mu$ L)	Volume TCA 20% ( $\mu$ L)
A	0	0	2000
B	0,05	14	1986
C	0,1	28	1972
D	0,2	56	1944

E	0,4	112	1888
F	0,8	224	1776
G	1,6	448	1552

**Teste de diluição da amostra**

1X: 500  $\mu$ L de amostra<sup>4</sup>

1,25X: 400  $\mu$ L de amostra: 100  $\mu$ L de água destilada

**Procedimento Analítico:**

- adicionar 250  $\mu$ L de DNPH aos 500  $\mu$ L de amostra diluída, padrão ou branco (500  $\mu$ L de TCA20%)
- manter a 37°C por 30 minutos (banho-maria ou estufa)
- adicional 3 mL de NaOH 1,3 N
- ler a 440 nm

---

<sup>4</sup> Diluição utilizada para brânquias de peixes

**ANEXO 13 - Preparação das amostras para a determinação dos componentes do sistema de defesa antioxidante e marcadores de danos oxidativos**

1. Homogeneizar aproximadamente 0,15 g de filamentos braquiais em 0,5 ml de PBS, pH 7,2
2. Completar para 2 ml
3. Centrifugar a 12.000 g durante 20 min a 4 °C
4. Separar alíquotas do sobrenadante em tubos de 2 ml. Congelar os tubos a -20°C e armazená-los em freezer -80°C

**PBS (tampão fosfato salina), pH 7,2 (1000 ml)**

1. Dissolver em 950 ml c/ água desionizada:  
7,98 g de NaCl (MM = 58,44 g.mol<sup>-1</sup>)  
0,20 g de KCl (MM = 74,56 g.mol<sup>-1</sup>)  
1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (7H<sub>2</sub>O) fosfato de sódio dibásico (MM = 268,07 g.mol<sup>-1</sup>)  
0,24 g de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (fosfato de potássio monobásico (MM = 136,09 g.mol<sup>-1</sup>))
2. Acertar para pH 7,2
3. Completar para 1000 mL com água desionizada

**ANEXO 14** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD)

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

**Princípio do método:**

O princípio da reação tem como base a geração de superóxido pela hidroxilamina em meio alcalino, que reduz NBT em formazan. Nesse caso, a SOD inibe a redução de NBT em formazan, medida espectrofotometricamente a 560 nm.

**Reagentes:**

- Água desionizada
- PBS, pH 7,2
- Tampão carbonato de sódio (182 mM, pH 10,2)
- Solução de EDTA (0,05 mM),
- etanol
- Azul de nitrotetrazólio (NBT)
- Cloreto ou sulfato de hidroxilamina

**Procedimento**

- 1 - Normalizar todas as amostras para  $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$  (diluir em PBS).
- 2 - Separar 600  $\mu\text{L}$  de amostra, acrescentar 200  $\mu\text{L}$  de etanol e centrifugar a 12.000 g (4 °C) durante 20 min.
- 3 - Pipetar 30  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços.
- 4 - Pipetar 30  $\mu\text{L}$  de etanol a 25% em PBS (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços.
- 5 - Pipetar 70  $\mu\text{L}$  da solução de NBT
- 6 - Pipetar 100  $\mu\text{L}$  de solução de hidroxilamina para iniciar a reação
- 7 - Medir a absorbância a 560 nm (tempo zero) e após 4 h de incubação (em microplacas tampadas e protegidas da luz, a temperatura ambiente)

**Sistema de reação** (para 100 poços - 1 placa)

## 1. Solução de NBT (7,5 mL)

Preparar solução de EDTA 1,0 mM (10 ml) (MM = 372,24 g.mol<sup>-1</sup>)

- 0,0037 g de EDTA sal dissódico em 10 mL de água desionizada.

Em outro recipiente, adicionar 375 µl da solução de EDTA a 1,0 mM em 7,125 mL de água desionizada e dissolver 0,0018 g de NBT (MM = 817.64 g.mol<sup>-1</sup>)

2. Solução de hidroxilamina (12 mL) (MM = 69.49 g.mol<sup>-1</sup>)

0 0,0615 g de cloreto de hidroxilamina em 12 ml de tampão carbonato de sódio a 182 mM, pH 10,2

**Análise:**

1. Calcular o valor da variação ( $\Delta$ ) da absorbância no intervalo de leitura.

**ANEXO 15** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da catalase (CAT)

AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121-126, 1984.

**Princípio do método:**

Decréscimo de absorvância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água.  $\epsilon \text{ H}_2\text{O}_2 = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

**Reagentes:**

- Peróxido de hidrogênio
- Água ultrapura
- Tampão Tris-EDTA
- PBS, pH 7,2

**Procedimento:**

- 1 - Normalizar todas as amostras para  $1,0 \text{ mg.ml}^{-1}$  (diluir em PBS)
- 2 - Pipetar  $990 \mu\text{L}$  de meio de reação em cubeta de quartzo (em triplicata)
- 3 - Pipetar  $10 \mu\text{L}$  da amostra
- 4 - Misturar por inversão
- 5 - Medir imediatamente a absorvância a 240 nm (tempo total = 60 s, intervalos = 1 s) em espectrofotômetro de cubeta (os valores de ABS deverão diminuir com o tempo)

**Sistema de reação** (50 ml)<sup>5</sup>

- 2,5 ml de Tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0 (pode ser estocado)
- 47,32 ml de água desionizada
- 180  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%,  $d=1,1 \text{ g.ml}^{-1}$ ,  $MM = 34 \text{ g.mol}^{-1}$ )

---

<sup>5</sup> manter protegido da luz

**ANEXO 16** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da glutathiona-S-transferase (GST)

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

**Princípio do Método:**

O método baseia-se na conjugação entre CDNB e GSH, uma reação catalisada pela GST. O produto formado nessa reação é um tioéter que absorve luz a 340 nm.

**Reagentes:**

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

**Procedimento:**

- 1 - Normalizar todas as amostras para 1,0 mg/ml (diluir em PBS)
- 2 - Pipetar 20 µL de tampão fosfato de potássio (branco) em microplaca de 96 poços (em triplicata)
- 3 - Pipetar 20 µL da amostra em microplaca de 96 poços (em triplicata)
- 4 - Pipetar 180 µL de meio de reação (com micropipeta multicanal)
- 5 - Medir imediatamente a absorbância a 340 nm (tempo total = 300 s, intervalos = 20-50 s; os valores de ABS deverão aumentar com o tempo)

**Sistema de reação** (para 100 poços = 20 ml)

- 0,0093 g de GSH
- 0,0122 g de CDNB (diluir inicialmente em 1 ml de etanol PA)
- 19 ml de tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 6,5)



**ANEXO 17** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da glutathiona redutase (GR)

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**. v. 82, p. 291-295, 1997

**Princípio do Método:**

O método baseia-se na redução da glutathiona dissulfeto (GSSG) pela GR, formando glutathiona reduzida (GSH), com o consumo de NADPH. A redução da absorbância foi acompanhada em  $\lambda = 340 \text{ nm}$ .  $\epsilon \text{ NADH} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

**Reagentes:**

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

**Procedimento:**

- 1 - Normalizar todas as amostras para 4,0 mg/ml (diluir em PBS)
- 2 - Pipetar 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 3 - Pipetar 50  $\mu\text{L}$  de PBS (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 4 - Pipetar 150  $\mu\text{L}$  de meio de reação (com micropipeta multicanal) 7
- 5 - Medir o decréscimo na absorbância imediatamente a 340 nm (tempo total = 10 min, intervalos = 40 s) em espectrofotômetro de microplaca.

**Meio de reação** (para 100 poços, 16 ml)

- 0,0089 g de NADPH (MM = 833,4 g.mol<sup>-1</sup>)
- 0,0653 g de GSSG (MM = 612,63 g.mol<sup>-1</sup>)
- 16 ml de tampão fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5,0 mM, pH 7,6

## **ANEXO 18** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de atividade da glutathiona peroxidase (GPx)

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

### **Princípio do Método:**

O método baseia-se na medida do decréscimo de absorbância a 340 nm, promovido durante a redução da GSSG, catalisada pela GR, em presença de NADPH. A velocidade de oxidação do NADPH é proporcional à velocidade de produção de GSSG a partir de GSH, em presença de peróxido, catalisada pela GPx ( $\epsilon_{\text{NADH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **Reagentes:**

- Tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0)
- Solução de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (5 mM) – preparar no dia
- PBS, pH 7,2
- Glutathiona reduzida (GSH)
- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH)
- Glutathiona redutase (GR)

### **Procedimento:**

- 1 - normalizar todas as amostras para  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  (diluir em PBS)
- 2 - Pipetar 20  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra (em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 3 - Pipetar 20  $\mu\text{L}$  de PBS (branco, em triplicata) em microplaca de 96 poços
- 4 - Pipetar 140  $\mu\text{L}$  de meio de reação 1 (com micropipeta multicanal) e aguardar 2 min
- 5 - Pipetar 40  $\mu\text{L}$  de solução com peróxido de hidrogênio (com micropipeta multicanal)
- 6 - Medir o decréscimo na absorbância imediatamente a 340 nm (tempo total = 180 s, intervalos = 10-20 s) em espectrofotômetro de microplaca

**Sistema de reação** (para 100 poços)

Meio 1 (14,5 ml)

- 0,0027 g de azida sódica (MM = 65,01 g.mol<sup>-1</sup>)
- 0,0035 g de NADPH (MM = 833,4 g.mol<sup>-1</sup>)
- 0,0127 g de GSH (MM = 307,32 g.mol<sup>-1</sup>)
- 45 µL de glutathiona redutase (GR, 2,7 mg prot.ml<sup>-1</sup>, 168 U.mg prot<sup>-1</sup>)
- 14,45 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0)

Meio 2 (10 mL - manter protegido da luz)

- Preparar uma solução contendo 26 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (~30%, d=1,1 g.mL<sup>-1</sup>, MM = 34 g.mol<sup>-1</sup>) em 10 mL de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0).
- Pipetar 1 mL desta solução + 9 ml de tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0)

**ANEXO 19** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de tióis não proteicos, inclusive glutatona (GSH)

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, p. 192–205, 1968

**Princípio do método:**

O método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não protéicos com o DTNB gerando um produto que absorve luz a 415 nm.

**Reagentes:**

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

**Procedimento:**

- 1 – Adicionar 50  $\mu$ L da solução de ácido tricloroacético a 50% aos 200  $\mu$ l do sobrenadante ainda congelado do tecido ([proteínas] > 5 mg.ml<sup>-1</sup>). Para o branco, pipetar 50  $\mu$ L da solução de ácido tricloroacético a 50% em 200  $\mu$ L de PBS
- 2 – Misturar bem
- 3 - Centrifugar a 5000 g por 10 min e 4 °C
- 4 – Pipetar 50  $\mu$ L do branco em microplaca em triplicata
- 5 – Pipetar 50  $\mu$ L da curva-padrão em microplaca em triplicata (preparada em separado)
- 6 – Pipetar 50  $\mu$ L do sobrenadante das amostras em microplaca em triplicata
- 7 – Adicionar em todos os poços utilizados 230  $\mu$ L do tampão Tris-base 0,4 M, pH 8,9
- 8 – Adicionar em todos os poços utilizados 20  $\mu$ L de solução de DTNB
- 9 – Aguardar 5-10 min a temperatura ambiente
- 10 – Mediar a absorbância a 415 nm

**Soluções necessárias** (para 100 amostras + 2 brancos + curva-padrão)

1. Solução de ácido tricloroacético a 50% (10 mL)

- 5 g de ácido tricloroacético em 10 mL de água desionizada

2. Solução de DTNB (8 mL)

- 0,0079 g de ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, MM=396,3 g.mol<sup>-1</sup>) em 500 µL de metanol PA. Então, adicionar 7,5 mL de tampão Tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ([DTNB] = 2,5 mM).

3. Curva-padrão de GSH (fazer uma curva para cada análise realizada)

- 0,0012 g GSH (MM = 307,32 g.mol<sup>-1</sup>) em 976 µL de tampão tris-base a 0,4 M, pH 8,9 ([GSH] = 4 mM). A partir desta solução, preparar as demais conforme a tabela a seguir.

[GSH] desejada	Volume de tampão trisbase a 0,4 M, pH 8,9	Volume das soluções de GSH	Volume final
160 µM	1440 µL	60 µL de GSH a 4 mM	1500 µL
80 µM	750 µL	750 µL de GSH a 160 µM	1500 µL
40 µM	750 µL	750 µL de GSH a 80 µM	1500 µL
20 µM	750 µL	750 µL de GSH a 40 µM	1500 µL
10 µM	750 µL	750 µL de GSH a 20 µM	1500 µL
5 µM	750 µL	750 µL de GSH a 10 µM	1500 µL
0 µM	1500 µL	0 µL	1500 µL

**ANEXO 20** - Protocolo padronizado para a determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) indicadores de lipoperoxidação

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

**Procedimentos:**

1) Trate 60 µl de amostra com 120 µL TCA 10%

2) Mantenha em banho de gelo por 5 min;

3) Centrifugue a 12000 g por 5 minutos 4°C

4) Prepare os reagentes:

- BHT em etanol 95% (Fazer na hora do uso)

0,0022g BHT-10mL etanol 95%

- TBA 1,3% em NaOH 0,3% (Útil por 1 semana em T°C ambiente)

NaOH 0,3%

0,03g –10mL água

TBA 1,3%

0,13g TBA – 10mL de NaOH 0,3%

- PBS (pH = 7,4)

- TCA 50%

50g TCA – 100 mL água

5) Prepare a curva de calibração (padrão):

- Solução estoque 60mM de MDA (Freezer –20°C)

10 µL Sol.estoque + 1990 µL de água = solução 0,3mM de MDA

Em microtubos, prepare:

[ ] final do padrao ( $\mu\text{M}$ )	A partir da solução de MDA 0,3 mM ( $\mu\text{L}$ )	Volume de $\text{H}_2\text{O}$
0,3	1	999
0,6	2	998
1,5	5	995
3	10	990
6	20	980
15	50	950
30	100	900

6) Pipete em cada poço (em triplicata):

40  $\mu\text{L}$  do branco (PBS)/padrão/amostra

10  $\mu\text{L}$  BHT

140  $\mu\text{L}$  PBS (pipeta multicanal)

50  $\mu\text{L}$  de TCA 50% (pipeta multicanal)

7) Pipete 75  $\mu\text{L}$  de TBA 1,3% em NaOH 0,3% em todos os poços (pipeta multicanal).

8) Mantenha a placa a 60°C por 1 hora.

9) Espere esfriar e leia a 535 nm.

## **ANEXO 21** - Protocolo padronizado para a determinação do índice de proteínas carboniladas (PC)

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

### **Princípio do Método:**

A 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) reage com as cadeias laterais de aminoácidos (aldeídos e cetonas) de proteínas carboniladas, formando dinitrofenilhidrazonas, detectáveis a 370 nm.

( $\epsilon$  de hidrazonas =  $2,1 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ).

### **Reagentes:**

- PBS 7,2
- Água destilada
- Ácido tricloroacético (TCA)
- 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)
- etanol
- acetato de etila
- hidrocloreto de guanidina

### **Procedimento:**

- Normalizar as amostras para a concentração de proteínas de  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
- Separar a amostra em dois tubos de 2mL (pipetar 100  $\mu\text{L}$  em cada um dos tubos) - um tubo para o teste e outro para a amostra
- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de HCl 2M aos "brancos"
- Adicionar 500  $\mu\text{L}$  do sistema de reação aos tubos "teste"
- Incubar a 30-37°C por 90 min
- Colocar os tubos em gelo
- Adicionar 700  $\mu\text{L}$  de TCA 28%
- Misturar bem em *vortex*
- Centrifugar a 9.000 *g*, 4 °C por 10 min e descartar sobrenadante
- Ressuspender o *pellet* em 1.0 ml de solução de etanol/acetato de etila gelado



- Misturar bem em *vortex*
- Centrifugar a 9.000 *g*, 4 °C por 10 min e descartar sobrenadante<sup>6</sup>
- Repetir os procedimentos 10, 11 e 12 mais duas a três vezes (até a solução de acetato de etila-etanol removida estar transparente)
- Ressuspender o precipitado em 500 µL de solução de hidrocloreto de guanidina
- Misturar bem em *vortex*
- Centrifugar a 9.000 *g*, 4 °C por 3 min para eliminar eventual “material não solúvel”
- Pipetar 200 µL das amostras em microplaca (em duplicata)
- Medir a absorbância a 370 nm

**Soluções necessárias** (para 50 amostras e seus respectivos brancos)

1. Solução de HCl 2 M (65 mL)

- 10,77 mL de HCl concentrado (~12,07 M) em 54,23 mL de água desionizada

2. Sistema de reação (28 ml)

- 0,0555 g de 2,4-Dinitrofenil-hidrazina (MM = 198,14 g.mol<sup>-1</sup>) em 28 ml de HCl 2 M

3. Solução de ácido tricloroacético a 28% (75 mL)

- 21 g de ácido tricloroacético (MM = 163,39 g.mol<sup>-1</sup>) em 60 mL de água desionizada e completar para o volume final de 75 mL.

4. Solução de etanol/acetato de etila 1:1 (500 mL)

- 250 mL de etanol com 250 mL de acetato de etila

5. Solução de hidrocloreto de guanidina (55 mL)

- 31,525 g de hidrocloreto de guanidina (MM = 95,53 g.mol<sup>-1</sup>) em 30 mL de água desionizada e completar para o volume final de 55 mL.

---

<sup>6</sup> cuidar para não eliminar parte do precipitado nesse processo