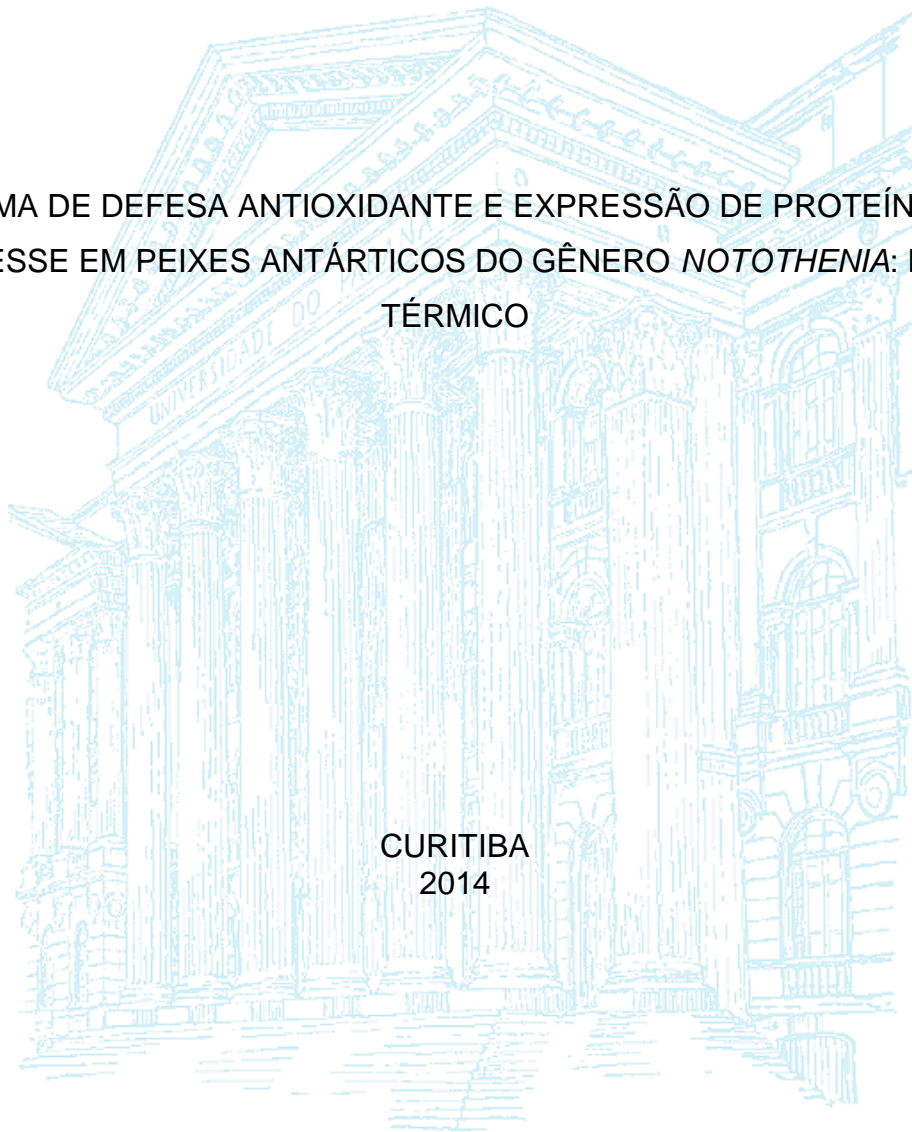


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CINTIA MACHADO

SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE
ESTRESSE EM PEIXES ANTÁRTICOS DO GÊNERO *NOTOTHENIA*: LIMITE
TÉRMICO

CURITIBA
2014



Sistema de defesa antioxidante e expressão de proteínas de estresse em peixes antárticos do gênero *Notothenia*: limite térmico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Dr^a Lucélia Donatti

CURITIBA

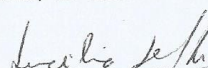
2014

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

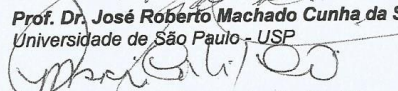
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas - Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

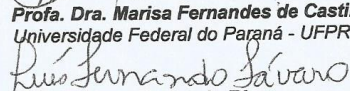
PARECER

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


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


Prof. Dr. José Roberto Machado Cunha da Silva
Universidade de São Paulo - USP


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


Prof. Dr. Luis Fernando Fávaro
Universidade Federal do Paraná - UFPR


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

E tendo como suplentes,

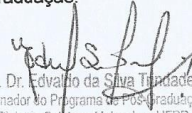
Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Profa. Dra. Andrea Senff Ribeiro
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a candidata **Cintia Machado**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Sistema de defesa antioxidante e expressão de proteínas de estresse em peixes antárticos do gênero *Notothenia*: limite térmico", são de parecer favorável à *aprovação* da acadêmica, habilitando-a ao título de Doutora em Biologia Celular e Molecular, área de concentração 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, 31 de Julho de 2014


Prof. Dr. Edvaldo da Silva Turidade
Coordenador do Programa de Pós-graduação
em: Biologia Celular e Molecular - UFPR
Ribeir 185795

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Roberto Lopes dos Santos e Carlos Alberto Vieira Figueiredo que faleceram no incêndio da Estação Antártica Comandante Ferraz e a todos os Pesquisadores Antárticos do Brasil que perderam suas pesquisas em consequência do trágico incêndio.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Dra Lucélia Donatti pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho, por compartilhar seu grande conhecimento e trabalho científico, por sua amizade e apoio constante no trabalho e na minha vida... por tudo... muito obrigada!

Às queridas amigas do Laboratório de Biologia Adaptativa: Tânia, Mari, Pri, Maria Rosa, Alana e Thay, pela indispensável ajuda, principalmente na reta final deste trabalho, pela amizade, pelos conhecimentos e experiências compartilhadas e ótimos momentos de descontração... vocês são maravilhosas! Ahhh... e ao Cláudio (bendito fruto do Laboratório) pelo apoio e amizade desde o mestrado.

Às queridas amigas Renata, Banana, Flavinha, Cléo, Pri, e Maria Rosa pela convivência antártica, nos momentos de trabalho e descontração.

Aos professores Luís Fernando Fávaro e Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro pelas valiosas contribuições dispensadas durante as avaliações dos relatórios ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Dr Stênio Fragoso pela coorientação no projeto inicial do doutorado e pela amizade e por compartilhar seus conhecimentos científicos e seu laboratório. Agradeço também aos colegas do laboratório 2 do ICC pelo apoio, amizade e conhecimentos compartilhados.

A professora Viviane Prodocimo pela indispensável ajuda no desenvolvimento do capítulo 2 deste trabalho e á Silvia Milan pela paciência e dedicação em ensinar a técnica de western blot.

Ao professor Silvio Sanches pelo apoio e valiosos conhecimentos dispensados nas aulas de Docência.

A minha família, principalmente a minha Mãe e meu maior exemplo, pelo apoio, dedicação e amor que me acompanhou por toda vida.

Ao Chafi pelo companheirismo, incentivo, apoio e carinho.

A esta banca examinadora por aceitar o convite e pelas contribuições.

Agradeço a todas as pessoas que fazem parte da minha vida profissional e pessoal, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste doutorado.

RESUMO

Os peixes que habitam o Oceano Antártico são extremamente adaptados ao frio, sendo seu metabolismo, bioquímico e fisiológico, eficiente em baixas temperaturas. Oscilações sazonais de luminosidade e do suprimento alimentar são também apontados como fatores determinantes da biodiversidade e limitantes da biomassa e da produtividade primária do Oceano Antártico. A tolerância a temperaturas mais altas dos organismos marinhos antárticos tem sido estudada devido à preocupação dos pesquisadores frente ao aquecimento global e da Península Antártica. Os poucos resultados existentes têm demonstrado que esses organismos são extremamente estenotérmicos e que alterações de temperatura podem ser letais. O sistema antioxidante representa um importante marcador de resposta dos organismos submetidos a situações de estresse e alterações de temperatura podem promover a geração de espécies reativas de oxigênio ocasionando danos celulares. Atualmente, a extrema estenotermia dos organismos marinhos antárticos também tem sido estudada através da expressão das proteínas do choque térmico (HSPs). Dentre a família das HSPs, a HSP70 apresenta síntese rápida e significativa diante de diferentes estressores, por isso é uma ferramenta útil para quantificar e prever níveis de estresse em organismos. As coletas e os bioensaios deste trabalho, foram realizados na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, no Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica, onde se localiza a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF). O presente trabalho tem como objetivo investigar variações nos níveis de HSP70, nos níveis de atividade de várias enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR e GST) e nos níveis dos marcadores não enzimáticos (GSH, PC e LPO) do estresse oxidativo nos peixes antárticos, *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* em condições naturais e de estresse térmico. Para tanto, três capítulos compõem este trabalho, onde o primeiro analisa o efeito da temperatura no metabolismo oxidativo de *N. rossii* e *N. coriiceps*; o segundo avalia os níveis de expressão de HSP70 no fígado de *N. rossii* e *N. coriiceps* submetidos a estresse térmico e o terceiro analisa ao longo do ano os níveis de atividades dos marcadores de estresse oxidativo em diferentes órgãos de *N. rossii* e *N. coriiceps* da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica.

Palavras-chaves: temperatura, sazonalidade, estresse oxidativo, peixes antárticos, proteína do choque térmico.

ABSTRACT

The fish that inhabit the Southern Ocean are highly adapted to the cold, and its metabolism, biochemical and physiological, efficient at low temperatures. Seasonal fluctuations of light and food supply are determinants of biodiversity and limiting biomass and primary productivity of the Southern Ocean. The tolerance to higher temperatures of Antarctic marine organisms have studied due to the concern of researchers against global warming and the Antarctic Peninsula. The few results have demonstrated that these organisms are extremely stenothermal and rapid temperature change can be lethal. The antioxidant system is an important response marker of organisms subjected to stress and temperature changes situations can promote the generation of reactive oxygen species causing cell damage. Currently, the extreme stenothermal of Antarctic marine organisms has studied through the expression of heat shock proteins (HSPs). Among the family of HSPs, the HSP70 has significant and rapid synthesis on different stressors, so it is a useful tool to quantify and predict stress levels in organisms. The experiments of were performed in Admiralty Bay, King George Island, in the Archipelago of the South Shetlands, Antarctic Peninsula, where is the Comandante Ferraz Antarctic Station (EACF). This study aims to investigate variations in the levels of HSP70 in the activity levels of several antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GR and GST) and the levels of non-enzymatic markers (GSH, PC and LPO) oxidative stress in Antarctic fish, *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in natural and heat stress conditions. Therefore, three chapters make this work, where the first examines the effect of temperature on the oxidative metabolism of *N. rossii* and *N. coriiceps*; the second evaluates the HSP70 expression levels in liver *N. rossii* and *N. coriiceps* submitted to thermal stress and the third analyzes throughout the year, the activity levels of oxidative stress markers in different tissues of *N. rossii* and *N. coriiceps* of Admiralty Bay, King George Island, Antarctic Peninsula.

Keywords: temperature, seasonality, oxidative stress, Antarctic fish, heat shock proteins.

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1: Região Antártica indicando o paralelo de 60° S delimitando a região, os mares de Ross e Weddel, a Península Antártica e o Pólo Sul 12

Capítulo 1

Figura 1: Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no fígado de *Notothenia coriiceps* (A e C) e *Notothenia rossii* (B e D), expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias.....28

Figura 2: Atividade da glutatona S-transferase (GST), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) no fígado de *Notothenia coriiceps* (A, C e E) e *Notothenia rossii* (B, D e F), expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias..29

Figure 3: Glutatona reduzida (GSH), peróxidos de lipídeos (LOOH), malondialdehyde (MDA) e carbonilação de proteínas (PC) no fígado de *Notothenia coriiceps* (A, C, E e G) e *Notothenia rossii* (B, D, F e H), expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias.....32

Capítulo 2

Figura 1: Representação do *Western blot* da proteína HSP70 no fígado de *Notothenia rossii* expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias.....43

Figura 2: Representação do *Western blot* da proteína HSP70 no fígado de *Notothenia coriiceps* expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias43

Figura 3: Efeito da aclimação sobre os níveis da HSP70 no fígado de *Notothenia rossii* expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias.44

Figura 4: Efeito da aclimação sobre os níveis da HSP70 no fígado de *Notothenia coriiceps* expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias.44

Capítulo 3

Figura 1: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de SOD no encéfalo (A), coração (C) e rim (E) de *Notothenia rossii* e no encéfalo (B), coração (D) e rim (F) de *Notothenia coriiceps*.....55

Figura 2: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de SOD no músculo (A), fígado (D) e brânquia (E) de <i>Notothenia rossii</i> e no músculo (B), e fígado (D) e brânquia (F) de <i>Notothenia coriiceps</i>	56
Figura 3: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de CAT no encéfalo (A), coração (C) e rim (E) de <i>Notothenia rossii</i> e no encéfalo (B), coração (D) e rim (F) de <i>Notothenia coriiceps</i>	58
Figura 4: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de CAT no músculo (A), fígado (D) e brânquia (E) de <i>Notothenia rossii</i> e no músculo (B), fígado (D) e brânquia (F) de <i>Notothenia coriiceps</i>	59
Figura 5: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de GST no encéfalo (A), coração (C) e rim (E) de <i>Notothenia rossii</i> e no encéfalo (B), coração (D) e rim (F) de <i>Notothenia coriiceps</i>	61
Figura 6: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de GST no músculo (A), fígado (D) e brânquia (E) de <i>Notothenia rossii</i> e no músculo (B), fígado (D) e brânquia (F) de <i>Notothenia coriiceps</i>	62
Figura 7: Variação mensal dos níveis de LPO (concentração de MDA em nmols/mg proteína) no encéfalo (A), coração (C) e rim (E) de <i>Notothenia rossii</i> e no encéfalo (B), coração (D) e rim (F) de <i>Notothenia coriiceps</i>	65
Figura 8: Variação mensal dos níveis de LPO (concentração de MDA em nmols/mg proteína) no músculo (A), fígado (D) e brânquia (E) de <i>Notothenia rossii</i> e no músculo (B) e fígado (D) e brânquia (F) de <i>Notothenia coriiceps</i>	65

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1: Valores médios \pm SEM da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-s-transferase (GST), glutaciona peroxidases (GPx) e glutaciona redutase (GR) no fígado de *Notothenia coriiceps*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por um, três e seis dias26

Tabela 2: Valores médios \pm SEM da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-s-transferase (GST), glutaciona peroxidases (GPx) e glutaciona redutase (GR) no fígado de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por um, três e seis dias.27

Tabela 3: Valores médios \pm SEM dos níveis de glutaciona reduzida (GSH), peróxidos de lipídeos (LOOH), malondialdehyde (MDA) e carbonilação de proteínas (PC) no fígado de *Notothenia coriiceps*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por um, três e seis dias.30

Tabela 4: Valores médios \pm SEM dos níveis de glutaciona reduzida (GSH), peróxidos de lipídeos (LOOH), malondialdehyde (MDA) e carbonilação de proteínas (PC) no fígado de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por um, três e seis dias.30

Capítulo 3

Tabela 1: Valores médios (\pm desvio padrão) mensais de peso em gramas (g), comprimento total e padrão em centímetros (cm) e sexo de *Notothenia rossii* coletados na Baía do Almirantado, Antártica.....53

Tabela 2: Valores médios (\pm desvio padrão) mensais de peso em gramas (g), comprimento total e padrão em centímetros (cm) e sexo de *Notothenia coriiceps* coletados na Baía do Almirantado, Antártica.....53

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO GERAL	12
<i>A Região Antártica</i>	12
<i>Peixes Antárticos e temperatura</i>	14
<i>Marcadores de estresse</i>	17
II. CAPÍTULO 1	20
EFEITO DA TEMPERATURA DE ACLIMATAÇÃO NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO FÍGADO DOS NOTOTHENIIDS ANTÁRTICOS <i>NOTOTHENIA CORIICEPS</i> E <i>NOTOTHENIA ROSSII</i> *	20
RESUMO	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3 RESULTADOS	26
4 DISCUSSÃO	33
III. CAPÍTULO 2	38
AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO HEPÁTICA DA PROTEÍNA DO CHOQUE TÉRMICO (HSP70) EM DUAS ESPÉCIES DE PEIXES ANTÁRTICOS (<i>NOTOTHENIA ROSSII</i> E <i>NOTOTHENIA CORIICEPS</i>) SUBMETIDOS A ESTRESSE TÉRMICO	38
RESUMO	38
1 INTRODUÇÃO	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3 RESULTADOS	43
4 DISCUSSÃO	44
IV. CAPÍTULO 3	47
NÍVEIS DE ATIVIDADE DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM DIFERENTES ÓRGÃOS DE DUAS ESPÉCIES DE PEIXES ANTÁRTICOS DO GÊNERO <i>NOTOTHENIA</i> (NOTOTHENIOIDEI: NOTOTHENIIDAE) DA BAIÁ DO ALMIRANTADO, ILHA REI GEORGE, PENÍNSULA ANTÁRTICA.	47
RESUMO	47
1 INTRODUÇÃO	47
2 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3 RESULTADOS	52
4 DISCUSSÃO	66
V. CONCLUSÃO	70
VI. REFERÊNCIAS	71

I. INTRODUÇÃO GERAL

A Região Antártica

A plataforma Continental Antártica fazia parte do supercontinente Gondwana, até o final do período Cretáceo. Quando o supercontinente Gondwana iniciou sua fragmentação (190 a 135 milhões de anos atrás), o Continente Antártico iniciou sua derivação para a posição polar atual. Foi nessa época também que a Península Antártica teve sua formação iniciada. Já as ilhas subantárticas teriam emergido de maneira gradual do oceano (EICHER,1982). O isolamento do Continente Antártico completou-se e a corrente circum-Antártica estabeleceu-se em um tempo geologicamente recente, há aproximadamente 30 milhões de anos (DI PRISCO *et al.*, 1991).

Com aproximadamente 14.000.000 km² de superfície (BELLISIO e TOMO, 1974), a área da Antártica pode chegar a 36.000.000 km² quando os mares adjacentes congelam no inverno, enquanto que, nos meses de verão, esse gelo recua praticamente até o litoral com exceção dos mares de Weddel e Ross (Figura 1). O continente Antártico possui 4.500 km de diâmetro, 32.000 km de circunferência e está quase totalmente contido no círculo polar austral, abaixo dos 60°S de latitude (CROSSLEY, 1995; BELLISIO e TOMO, 1974).



Figura 1: Região Antártica indicando o paralelo de 60° S delimitando a região, os mares de Ross e Weddel, a Península Antártica e o Pólo Sul (fonte: Wikipédia, enciclopédia eletrônica).

O Oceano Antártico ou Oceano Austral, que circunda o Continente Antártico, é formado pela porção sul dos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico. O Oceano Antártico é caracterizado por um sistema circumpolar de correntes e frentes hidrográficas, as maiores e mais velozes correntes marítimas da Terra, a Corrente Circumpolar Antártica, que percorre continuamente, de Oeste para Leste, a faixa próxima da latitude dos 60°S (FELICIO, 2007). A Corrente Circumpolar Antártica tem papel importante de troca térmica na atmosfera através das misturas de massas de águas oceânicas e proporciona uma rica cadeia alimentar através da grande quantidade de dióxido de carbono absorvido pelas águas frias, que permite gerar muito plâncton e algas, influenciando diretamente a vida dos organismos polares que ali vivem (DEWITT, 1971; FOSTER, 1984, EKAU, 1991, FELICIO, 2007).

Entre os paralelos 50° e 60°S, existe uma barreira natural, a Convergência Antártica, que isola e separa o Oceano Austral dos oceanos que o formam. Esta Zona de Convergência estabeleceu-se à 30 milhões de anos atrás e afeta diretamente as condições locais de clima (DI PRISCO *et al.*, 1991). O Oceano Antártico é o ambiente marinho mais frio e estável termicamente da Terra. A temperatura do mar nas áreas próximas ao continente permanece constante em $-1,9^{\circ}\text{C}$, e nas regiões mais ao nordeste, Península Antártica e ilhas, pode variar de $1,5^{\circ}\text{C}$ no verão até $-1,8^{\circ}\text{C}$ no inverno (SIDELL, 2000).

O Oceano Antártico é caracterizado pela combinação de baixa temperatura, porém estável, com um padrão sazonal marcante da produção primária em consequência da variação anual da luminosidade, juntamente com um grande ciclo anual de extensão de gelo do mar (ZWALLY *et al.*, 1979, CLARKE, 1988, BARGAGLI, 2005; CONVEY, 2007). O regime de luz na Antártica é bem característico de regiões polares. No inverno há longos períodos sem luz enquanto que no verão a luz é praticamente constante. Já, na primavera e no outono as condições são intermediárias (RIVKIN e PUTT, 1987). Grande parte do mar antártico congela durante o inverno e a maior parte do gelo derrete durante o verão. Estes ciclos anuais de gelo e de luminosidade têm consequências diretas sobre a produção biológica e a biologia dos organismos, tanto de plâncton quanto bentos (CLARKE, 1988, BARGAGLI, 2005; DEVRIES e STEFFENSEN, 2005, CONVEY, 2007). Variações sazonais da temperatura, embora pequenas, podem ser detectadas. Temperaturas mais altas são observadas durante o verão austral e

tendem a serem maiores em águas superficiais e em altas latitudes (CLARKE, 1988, DEVRIES e STEFFENSEN, 2005).

Registros dos últimos 60 anos relatam que a temperatura da água do Oceano Antártico aumentou cerca de 0,2°C em profundidades entre 700 a 1100 metros (entre 35 e 65°S), e estudos recentes mostram que esse aquecimento estende-se até as águas superficiais (RENEWICK, 2002; TURNER *et al.*, 2005). A água dos lagos da região está aquecendo mais rapidamente do que o ar, em consequência da diminuição da camada de gelo (KING, 1994; KING e HARANGOZO, 1998; QUAYALE *et al.*, 2002, 2003), causada pelas pressões ambientais sobre o continente antártico (CLARKE *et al.*, 2007, HELLMER *et al.*, 2012, ROSS *et al.*, 2012).

A Península Antártica, onde se localiza a Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF), Baía do Almirantado, ilha Rei George, arquipélago das Shetlands do Sul, local onde o presente estudo foi realizado, é uma das três regiões do planeta, que apresenta aquecimento acelerado. A temperatura das águas superficiais aumentou em torno de 2,5°C nos últimos 60 anos (CLARKE *et al.*, 2007; TURNER, 2007). As ilhas sub-antárticas, dentre elas a ilha Rei George, devido a seu pequeno distanciamento com a Fronteira Polar Antártica, as torna vulneráveis a eventuais elevações da temperatura (DI PRISCO, 2000). O aquecimento da Península Antártica tem provocando degelo intenso tanto de geleiras como de neve acumulada durante o inverno e do gelo marinho, acarretando alterações na salinidade, na densidade da água do mar e expondo habitats que antes ficavam cobertos de gelo (DI PRISCO, 2000; CLARKE *et al.*, 2007).

Peixes Antárticos e temperatura

A fauna de peixes existente ao sul da Convergência Antártica se caracteriza por uma escassa diversificação. Das 20.000 espécies de peixes marinhos já descritas, cerca de 200 habitam as águas do Oceano Austral (EASTMAN, 2005). O endemismo das espécies de peixes antárticos também é bem característico, isto é, está muito menos propagado entre as espécies de águas mais profundas (FISHER e HUREAU, 1988).

A subordem Notothenoidei, da ordem dos Perciformes, é endêmica nas águas geladas da Antártica (EASTMAN, 1993). Este grupo representa 45% das espécies

conhecidas na Antártica e envolve mais de 95% da biomassa de peixes ali encontrados (EASTMAN e EAKIN, 2000). Esta subordem está representada por oito famílias, 44 gêneros e 129 espécies, das quais, 101 são antárticas e 28 não são antárticas (EASTMAN, 2005).

A Família Nototheniidae é a mais diversificada considerando-se a estrutura, habitat e distribuição das espécies. Os peixes estão largamente distribuídos pelo Oceano Austral desde o norte da Convergência Antártica até o sul da África e Nova Zelândia (KOCK, 1992). A família é composta de 12 gêneros e aproximadamente 50 espécies (EASTMAN e EAKIN, 2000). Dentre as espécies de peixes existentes na Baía do Almirantado, destacam-se *Notothenia coriiceps* Richardson, 1844 (previamente conhecida como *N. neglecta*) e *N. rossii* Richardson, 1844 (syn *N. marmorata*), endêmicas da região antártica (GON e HEEMSTRA, 1990), cuja dominância de espécies altera-se periodicamente na Baía (ZUKOWSKI, 1990, SKÓRA e NEYELOV, 1992, KULESZ, 1994, ZADRÓZNY, 1996). Estudos indicam que *N. coriiceps* é um nototenídeo bentônico chave na Baía do Almirantado (SKÓRA, 1993; KULESZ, 1998, 1999; KAMLER *et al.*, 2001) representando até 70% do número e biomassa de peixes presentes nas águas rasas da Baía (SKÓRA 1992; SKÓRA e NEYELOV 1992).

Os peixes antárticos, durante suas histórias evolutivas, se adaptaram para evitar os possíveis danos gerados pelas baixas temperaturas existentes na Antártica (CROSSLEY, 1995; JIN e DEVRIES, 2006). A estenotermia (SOMERO *et al.*, 1996; VAN DIJK *et al.*, 1999; BRODTE *et al.*, 2008), a escassez de hemoglobina, ou até a ausência em algumas espécies (DI PRISCO *et al.*, 2007), a compensação cardiovascular (O'BRIEN e SIDELL, 2000), a presença de glicoproteínas com propriedades anticongelantes (AFGPs - *Antifreeze Glicoproteins*) (CHEN *et al.*, 1997; HARDING *et al.*, 2003; JIN e DEVRIES, 2006), e o aumento na concentração de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA) (BOTTINO *et al.*, 1967; GIESEG *et al.*, 2000; BRODTE *et al.*, 2008; CROCKETT, 2011) são alguns exemplos.

A tolerância a temperaturas mais altas dos organismos marinhos antárticos tem sido estudada devido à preocupação dos pesquisadores frente ao aquecimento global e da Península Antártica, e os resultados têm demonstrado que esses organismos são extremamente estenotérmicos (LOWE *et al.*, 2005; CLARKE *et al.*, 2007; CLARK e PECK, 2009; BILYK e DEVRIES, 2011). Acredita-se que o estreito

limite de tolerância térmica dos peixes antárticos, deva-se entre outros fatores, à perda da capacidade de induzir a síntese de proteínas de choque térmico (*Hot Shock Protein* - HSPs) (HOFMANN *et al.*, 2000; BUCKLEY *et al.*, 2004) e perda ou escassez de hemoglobina e mioglobina (SIDELL *et al.*, 1987; SIDELL e O'BRIEN, 2006; BEERS e SIDELL, 2011).

Em peixes antárticos, a tolerância térmica foi primeiramente estudada por Somero e DeVries (1967) que, ao submeterem nototenídeos a estresse térmico, com variação positiva de aproximadamente 4°C, verificaram perda de 30% na afinidade do oxigênio pelo pigmento sanguíneo. Jin e DeVries (2006) aclimataram *Pagothenia borchgrevinki*, coletados na região de McMurdo, à temperatura de 4°C durante 4 a 16 semanas e observaram que após 16 semanas os níveis de AFGPs no plasma diminuiriam. Mais recentemente, Bilyk e DeVries (2011) determinaram a temperatura crítica máxima (CTMax) e sua plasticidade após aclimação a 4°C, em 11 espécies de peixes antárticos de regiões de altas e baixas latitudes. Estes autores observaram significativa diferença nas CTMaxs entre os peixes de baixas e altas latitudes e um aumento das CTMaxs, em todas as espécies testadas, após aclimação prévia a 4°C. Lowe e Davison (2005) ao submeterem os nototenídeos *P. borchgrevinki* e *Trematomus bernacchii* à estresse térmico observaram que houve hiperglicemia associada à lenta liberação de cortisol no plasma, e aumento do hematócrito em *P. Borchgrevinki*, devido ao aumento da temperatura. Acredita-se que há aumento no hematócrito, no início da aclimação ao calor, visando melhorar a capacidade respiratória (HEISE e ABELE, 2008). O estresse térmico analisado em fígado e músculo de *Pachycara brachycephalum* causou diminuição do conteúdo lipídico, redução de carboidratos e alteração nos níveis de proteínas dos dois tecidos (BRODTE *et al.*, 2008). Thorne *et al.* (2010) expuseram o nototenídeo *Harpagifer antarcticus* a estresse térmico agudo (6°C por 48 h) e como resposta registraram processos inflamatórios no tecido hepático.

Outro mecanismo que tem ajudado a entender a extrema estenotermia dos organismos marinhos antárticos é a expressão das proteínas de choque térmico (HSPs) (HOFMANN *et al.*, 2000, CLARK *et al.*, 2008, CLARK e PECK, 2009). Carpenter e Hofmann (1999) analisaram tecidos de *T. bernacchii* aclimatados a 4°C e observaram que os animais superexpressaram membros da família multigênica de proteínas de choque térmico de 70kDa (*Heat Shock Protein 70kDa* - HSP70). Os níveis de HSP70 em *T. bernacchii* foram maiores mesmo quando comparados com

tecidos de brânquias e músculo esquelético branco de *Notothenia angustata* coletados na Estação de Portobello, Nova Zelândia.

Marcadores de estresse

Ao longo do processo evolutivo a sobrevivência dos organismos esteve relacionada com a capacidade de se ajustar aos agentes estressores e recuperar a homeostase (ABELE *et al.*, 1998). Por exemplo, quando o O₂ passou a ser utilizado no processo respiratório ocorreu, paralelamente, a seleção de organismos com um sistema antioxidante para proteger as células da toxicidade daquele gás, uma vez que o metabolismo aeróbico conduz a formação de radicais livres (DROGE, 2002). Os danos causados pelos agentes estressores devem-se a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), tal como o íon superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical hidroxila ([•]OH) e oxigênio molecular (O) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Essas EROs no organismo reagem com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos causando diversos danos às células (STADTMAN e LEVINE, 2000).

A destoxificação das EROs tornou-se um pré-requisito para a vida aeróbica, havendo o surgimento e seleção de um sistema de defesa destinado a prevenir, interceptar e reparar os danos no organismo. Muitas destas defesas são representadas pelas enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) e (GR) glutathione redutase (LEHNINGER *et al.*, 2007).

As temperaturas extremas também afetam o estresse oxidativo. O choque térmico afeta o transporte de elétrons e altera a integridade de moléculas enzimáticas e antioxidantes, levando à formação de EROs (COGO *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo ocorre quando a formação de oxidantes excede a capacidade do sistema antioxidante de remover as EROs, causando danos às moléculas orgânicas (HAGERMAN, 2006). Um dano importante é a oxidação de proteínas, que pode ser avaliada pela quantificação de proteínas carbonílicas (PC) nos tecidos biológicos, um importante marcador não enzimático para o estresse oxidativo (SHACTER, 2000). Outro marcador não enzimático de estresse oxidativo é o processo de peroxidação lipídica (LPO) iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado e propagado por radicais peroxilas (LIMA e

ABDALLA, 2001). A Glutathione, formada por três peptídeos λ -glutamil-cisteína-glicina, está presente no organismo nas formas reduzida (GSH) e dissulfeto (GSSG) e é um dos mais importantes agentes antioxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999, COGO *et al.*, 2009). Mudanças na concentração deste tripeptídeo podem ser um indicador útil em certas desordens fisiológicas (STADTMAN e LEVINE, 2000, PARK *et al.*, 2008). É denominado de índice redox, a porcentagem de glutathione total (GSH + 2 GSSG) na forma de glutathione dissulfeto (GSSG). O estresse oxidativo pode ocasionar mudanças no estado redox da glutathione aumentando a liberação da forma dissulfeto no organismo tornando o índice um poderoso marcador do estresse oxidativo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999, COGO *et al.*, 2009).

A resposta ao choque térmico (HSR, do inglês *Heat Shock Response*) é caracterizada por desencadear mecanismos moleculares que compensem os distúrbios causados pelo aumento ou diminuição da temperatura. A rápida transcrição e tradução de uma série de proteínas de choque térmico da família das HSPs representa uma das respostas celulares ao estresse térmico. As HSPs são uma família de proteínas altamente conservadas que agem como chaperonas para estabilizar proteínas desnaturadas, prevenindo a formação de agregados citotóxicos (PARSELL e LINDQUIST, 1993; HARTL, 1996; FINK, 1999). Dentre a família das HSPs, a HSP70 apresenta síntese rápida e significativa diante de diferentes estressores sendo, portanto, uma ferramenta útil para quantificar níveis de estresse dos organismos (JONSSON *et al.*, 2006).

O presente trabalho tem como objetivo investigar variações nos níveis de HSP70, nos níveis de atividade de várias enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GR e GST) e nos níveis dos marcadores não enzimáticos (GSH, PC e LPO) do estresse oxidativo nos peixes antárticos, *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps* em condições naturais e de estresse térmico. Para tanto, três capítulos compõem este trabalho, onde o primeiro analisa o efeito da temperatura no metabolismo oxidativo de *N. rossii* e *N. coriiceps* (Efeito da temperatura de aclimação no sistema de defesa antioxidante do fígado dos nototheniídeos antárticos *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii*); o segundo avalia os níveis de expressão de HSP70 (Avaliação da expressão hepática da proteína do choque térmico (HSP70) em duas espécies de peixes antárticos (*Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*) submetidos a estresse térmico) e o terceiro analisa ao longo do ano os níveis de atividades dos marcadores de estresse oxidativo em diferentes órgãos de *N. rossii* e *N. coriiceps* (Níveis de

atividade dos marcadores de estresse oxidativo em diferentes órgãos de duas espécies de peixes antárticos do gênero *Notothenia* (Notothenioidei: Nototheniidae) da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica).

II. CAPÍTULO 1

Efeito da temperatura de aclimação no sistema de defesa antioxidante do fígado dos nototheniids antárticos *Notothenia coriiceps* e *Notothenia rossii**

* = Artigo publicado: Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry & Molecular Biology. Vol.172-173, p.21-28, 2014 - <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.02.003>

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de investigar se nototheniids endêmicos da Antártica são capazes de passar por ajustes no metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes no fígado frente ao aumento da temperatura ambiental. Atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona-S-transferase (GST) e glutathiona redutase (GR), e o conteúdo de marcadores não enzimáticos do estresse oxidativo como a glutathiona reduzida (GSH), peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PC), foram medidos no fígado de duas espécies de peixes antárticos, *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*, ao longo de 1, 3 e 6 dias expostos a temperatura de 0°C e 8°C. As atividades da SOD e CAT não foram alteradas com o aquecimento a 8°C em relação a 0°C nas duas espécies estudadas. A atividade da GST foi modulada negativamente pelo aquecimento somente em *N. rossii* em 6 dias de exposição. O perfil da atividade da GST e GR em *N. rossii* e da atividade da GPx em *N. coriiceps* foram alterados pelo aquecimento a 8°C em relação a 0°C. O conteúdo de GSH foi modulado positivamente pelo aquecimento a 8°C em *N. rossii* em 6 dias. Houve um aumento de GSH em 3 dias de exposição a 8°C em relação a 1 e 6 dias em *N. coriiceps*. O conteúdo de TBARS foi modulado negativamente pelo aquecimento a 8°C em relação a 0°C em *N. rossii* em 3 dias, indicando uma relação positiva com os níveis de GST. Não foram observadas alterações nos níveis de peróxidos de lipídeos (LOOH) e PC em relação aos tempos de exposição e temperaturas testadas nas duas espécies estudadas. Com os resultados do presente estudo podemos concluir que o aquecimento a 8°C induziu respostas nos níveis e perfis ao longo do tempo, da atividade das enzimas antioxidantes e de defesas antioxidantes, nos nototheniids *N. rossii* e *N. coriiceps*. Estudos enfatizando outros órgãos devem ser realizados possibilitando melhor entendimento sobre o efeito da temperatura no sistema antioxidante de peixes antárticos.

Palavras-chave: peixes antárticos, temperatura de aclimação, estresse oxidativo

1 INTRODUÇÃO

A temperatura é um fator abiótico que influencia muitos processos biológicos e que pode determinar e delimitar a distribuição geográfica dos organismos vivos (WINDISCH *et al.*, 2011). Nos peixes, a temperatura é um agente estressor (WEDEMEYER *et al.*, 1990) e a taxa metabólica de um organismo ectodérmico está fortemente relacionada com a temperatura ambiental (CLARKE e JOHNSTON, 1996) sendo que os mecanismos básicos envolvidos foram descritos por Clarke e Fraser (2004).

Estudos indicam que a tolerância térmica dos organismos está intimamente relacionada à sua capacidade aeróbica, uma vez que, tanto o resfriamento como o aquecimento, podem alterar o equilíbrio de oxigênio nos tecidos promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que reagem com lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos causando o estresse oxidativo e diversos danos às células (ABELE *et al.*, 1998; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; STADTMAN E LEVINE, 2000; MARTINEZ-ALVAREZ *et al.*, 2005). Como consequência, os organismos podem desenvolver sistemas celulares de defesas antioxidantes (ABELE *et al.*, 1998, 2001, MARTINEZ-ALVAREZ *et al.*, 2005, HEISE *et al.*, 2006) que podem ser enzimáticos e não enzimáticos. (SIES, 1985, MARTINEZ-ALVAREZ *et al.*, 2005, YILMAZ *et al.*, 2006).

O Oceano Polar Antártico, é considerado o ambiente marinho mais frio e estável termicamente da Terra onde a temperatura do mar nas áreas próximas ao continente permanece constante em torno de $-1,9^{\circ}\text{C}$, e nas regiões mais ao nordeste, na Península Antártica e ilhas, pode variar de $+1,5^{\circ}\text{C}$ no verão até $-1,8^{\circ}\text{C}$ no inverno (SIDELL, 2000). As atuais pressões ambientais sobre a Antártica (CLARKE *et al.*, 2007, HELLMER *et al.*, 2012, ROSS *et al.*, 2012) indicam que a temperatura da água em lagos nesta região está aumentando em maior velocidade do que a temperatura do ar, devido ao efeito de ampliação, causada pela diminuição da camada de gelo (KING, 1994; KING e HARANGOZO, 1998; QUAYALE *et al.*, 2002, 2003). A temperatura da água no Oceano Austral aumentou cerca de $0,2^{\circ}\text{C}$, desde 1950, em profundidades de 700 a 1100m, entre 35 e 65°S e estudos recentes mostram que esse aquecimento se estende até águas superficiais (RENWICK, 2002; TURNER *et al.*, 2005).

A fauna de peixes que habita o Oceano Austral desenvolveu mecanismos de adaptação às temperaturas extremamente baixas responsáveis pela sobrevivência desses organismos neste ambiente (CROSSLEY, 1995; SOMERO *et al.*,1996, CHEN *et al.*,1997; JIN e DEVRIES, 2006; DIPRISCO *et al.*,2007; BRODTE *et al.*, 2008; CROCKETT, 2011). A aclimatação e a tolerância térmica de organismos antárticos a temperaturas elevadas têm sido estudadas, e se intensificado devido às mudanças climáticas globais (SOMERO e DEVRIES, 1967; LOWE *et al.*,2005; BRODTE *et al.*, 2008; JIN e DEVRIES 2006; CLARKE *et al.*,2007; CLARK e PECK, 2009; BILYK e DEVRIES, 2011; WINDISCH *et al.*, 2011, JAYASUNDARA, 2013).

A atividade e expressão de enzimas antioxidantes e outros marcadores do estresse oxidativo tem sido utilizados para a avaliação de organismos antárticos submetidos a estresse térmico. Mueller *et al.* (2012) trabalharam com a hipótese de que a menor tolerância térmica de peixes antárticos da família Chaennichthyidae (sangue branco) em comparação com os da família Nototheniidae (sangue vermelho) (BILYK e DEVRIES, 2011) pode decorrer de uma maior vulnerabilidade dos peixes de sangue branco aos danos oxidativos, em consequência da exposição a sua temperatura crítica máxima (CTMax). Os resultados encontrados por Mueller *et al.* (2012) mostraram um aumento nos níveis de proteínas e lipídios oxidados somente no coração de *icefishes* em resposta ao aquecimento podendo contribuir para a redução da tolerância térmica nesta espécie. Ansaldo *et al.* (2000), comparando essas duas famílias, em peixes coletados da natureza, em um ambiente de baixas temperaturas e altas concentrações de oxigênio, observou que a atividade de SOD no sangue foi significativamente maior nos nototheniids enquanto que nas brânquias foi maior em channichthyids. Os valores de CAT foram maiores em peixes de sangue vermelho em relação aos de sangue branco exceto no músculo.

O presente estudo foi delineado para investigar se o tecido hepático dos nototheniids (*Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*) é capaz de passar por ajustes no metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes frente ao aumento da temperatura ambiental, apesar de viverem em um ambiente frio e estável termicamente. Essas duas espécies são filogeneticamente muito próximas (NEAR e CHENG, 2008), encontradas nos mesmos locais em muitas regiões da Antártica (BELLISIO e TOMO, 1973), mas apresentam distribuições geográficas distintas

(GON e HEEMSTRA, 1990) e, portanto, sujeitas a diferentes temperaturas ambientais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF) localizada na Baía do Almirantado (61°S e 63°30'S e 53°55'W e 62°50'W), Ilha Rei George, no Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica. As licenças ambientais foram concedidas pelo Grupo de Assessoramento Ambiental do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. A experimentação foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o n° 496.

2.1 Bioensaios de temperatura

Notothenia coriiceps (n = 60; TL = 35 ± 3 cm; W = 775 ± 182 g) e *Notothenia rossii* (n = 60; TL = 37 ± 3 cm; W = 791 ± 145 g) foram coletadas com anzol e linha a uma profundidade de 10 a 25 metros. Após a coleta os peixes foram mantidos durante 3 dias em tanques de 1000 L com condições abióticas controladas, salinidade de 35 ± 1,0, temperatura de 0 ± 0,5°C e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. A alimentação, a base de músculo epaxial de peixe, ocorreu a cada dois dias alternando-se a troca de água dos tanques.

Em seguida, para cada espécie, os peixes foram randomicamente selecionados e transferidos para tanques de 1000L contendo água do mar à temperatura de 8 ± 0,5°C (experimentais) por 1, 3 e 6 dias, ou 0 ± 0,5°C (controle) pelo período de 1, 3 e 6 dias, sendo que para cada experimento foram utilizados 10 indivíduos. Salinidade foi de 35 ± 1,0 e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. A temperatura da água dos tanques foi rigorosamente mantida com termostatos Aquaterm 09-01T-11457 (Full Cauge) acoplados a aquecedores (Altman).

Após a realização dos bioensaios, os animais foram anestesiados com benzocaína 1% (p.v⁻¹) e mortos via secção medular, seguindo-se a retirada de amostras de fígado que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C.

2.2 Métodos Analíticos

As amostras de fígado de *N. coriiceps* e *N. rossii* foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2 e, em seguida centrifugadas a 12.000 x g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi separado para a determinação da concentração de proteínas, da atividade das enzimas antioxidantes e dos níveis dos marcadores não enzimáticos.

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

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com método de Bradford (1976), utilizando o soro de albumina bovina (BSA) para o estabelecimento da curva padrão e a absorbância das amostras foi verificada a 545 nm.

2.2.1 Ensaio enzimático das enzimas antioxidantes

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espectrofotometricamente a 240nm. O meio de reação continha tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 10mM (BEUTLER, 1975).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo a metodologia descrita por Crouch *et al.* (1981), que se baseia na capacidade da enzima em inibir a redução do NBT (Azul de nitrotetrazólio) para azul formazan pelo O_2^- gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. Essa inibição foi medida espectrofotometricamente a 560 nm.

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi avaliada espectrofotometricamente através da oxidação do NADPH com a concomitante redução da glutathiona dissulfídica (GSSG) a 340 nm. O meio de reação continha tampão fosfato de potássio (100 mM, pH 7,0), EDTA 1 mM, NADPH 0,1 mM e glutathiona oxidada 1 mM (CARLBERG e MANNERVIK, 1985).

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

A atividade da glutathiona-s-transferase (GST) foi determinada de acordo com a metodologia de Keen *et al.* (1976) utilizando o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A glutathionação do CDNB foi medida espectrofotometricamente em 340 nm.

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

2.2.2 Marcadores não enzimáticos de estresse oxidativo

A concentração de glutathiona (GSH) e outros tióis 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. Os Valores de GSH foram expressos em nmols de tióis por mg de proteínas.

O índice de peroxidação lipídica (LPO) foi avaliado pelos níveis de peróxidos de lipídeos (LOOH) e pelos níveis dos produtos finais da peroxidação lipídica, incluindo o malondialdehyde (MDA), pela reação de TBARS. O conteúdo de LOOH foi mensurado pelo método de FOX, descrito por Jiang *et al.* (1991), que baseia-se na oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e formação do complexo Fe^{+3} – laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve luz a 560 nm. Os níveis de MDA foram determinados espectrofotometricamente em 535 nm pela reação de TBARS, utilizando malondialdehyde-(bis)-acetate (MDA, Merck, Darmstadt, Germany) como padrão (Uchiyama e Mihara, 1978). Os valores de LOOH e TBARS foram expressos em nmols de hidroperóxidos por miligrama de proteína e nmols de MDA por grama de tecido (gwm) respectivamente.

A concentração do dano oxidativo em proteínas (PC) foi determinada pela medida de grupos carbonil conforme descrito por Levine *et al.* (1990), onde as amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com

dinitrofenilidrazina. Os grupamentos carbonil foram mensurados pela absorvância em 362 nm. Os resultados foram expressos em nmols de carbonilas por mg de proteína.

2.3 Análise dos dados

Os dados foram previamente testados para normalidade (Kolmogorov–Smirnov) e homogeneidade de variâncias (Leveve). A atividade enzimática da CAT, SOD, GR, GPx e GST e os níveis de GSH, LOOH e CP do grupo controle foram comparados aos grupos experimentais utilizando uma análise de variância bifatorial (ANOVA two-way), no qual o tempo de exposição (1, 3 e 6 dias) e a temperatura (0 e 8°C) foram as variáveis categóricas. Em seguida realizou-se o teste de Tukey para a comparação das médias. Os dados foram apresentados como média + erro padrão da média (SEM), as diferenças foram consideradas significativas se $p \leq 0.05$.

3. RESULTADOS

3.1 Enzimas antioxidantes

Os valores médios \pm SEM da determinação da atividade das enzimas antioxidantes em *N. coriiceps* e *N. rossii* estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Valores médios \pm SEM da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion-s-transferase (GST), glutathion peroxidases (GPx) e glutathion redutase (GR) no fígado de *Notothenia coriiceps*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por um, três e seis dias. O número de amostras para cada análise foi 10 exceto para 0°C – 3 dias (n = 8) e 8°C – 1 dia (n=9). Valores expressos em U/mg protein.

	SOD	CAT	GST	GPX	GR
0°C – 1 dia	88,64 \pm 8,11	1,43 \pm 0,12	1,98 \pm 0,18	0,23 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01
0°C – 3 dias	30,91 \pm 3,75	0,62 \pm 0,06	2,38 \pm 0,18	0,15 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01
0°C – 6 dias	27,22 \pm 1,43	0,59 \pm 0,04	2,36 \pm 0,10	0,68 \pm 0,15	0,04 \pm 0,01
8°C – 1 dia	83,35 \pm 7,43	1,06 \pm 0,18	2,26 \pm 0,16	0,24 \pm 0,04	0,03 \pm 0,01
8°C – 3 dias	39,13 \pm 4,67	1,03 \pm 0,20	2,03 \pm 0,11	0,09 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01
8°C – 6 dias	19,51 \pm 1,55	0,54 \pm 0,04	2,46 \pm 0,11	0,99 \pm 0,16	0,05 \pm 0,01

Tabela 2: Valores médios \pm SEM da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutiona-s-transferase (GST), glutiona peroxidases (GPx) e glutiona redutase (GR) no fígado de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por um, três e seis dias. O número de amostras para cada análise foi 10 exceto para 0°C – 3 dias (n = 8) e 8°C – 1 dia (n=9). Valores expressos em U/mg protein.

	SOD	CAT	GST	GPX	GR
0°C – 1 dia	9,38 \pm 1,38	1,37 \pm 0,19	1,84 \pm 0,11	0,20 \pm 0,02	0,08 \pm 0,01
0°C – 3 dias	32,50 \pm 3,87	0,93 \pm 0,13	2,57 \pm 0,16	0,12 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01
0°C – 6 dias	15,51 \pm 0,49	0,61 \pm 0,04	2,73 \pm 0,06	0,27 \pm 0,02	0,05 \pm 0,01
8°C – 1 dia	10,77 \pm 1,74	0,95 \pm 0,13	1,83 \pm 0,15	0,21 \pm 0,03	0,10 \pm 0,02
8°C – 3 dias	34,79 \pm 2,55	0,81 \pm 0,12	2,24 \pm 0,13	0,11 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01
8°C – 6 dias	18,62 \pm 1,21	0,42 \pm 0,04	1,88 \pm 0,17	0,25 \pm 0,03	0,04 \pm 0,01

O aquecimento a 8°C não modulou os níveis de SOD em relação a 0°C nas duas espécies analisadas (figs. 1A e B). No entanto foram observadas diferenças no perfil da atividade da SOD entre as espécies ao longo dos tempos de exposição. Em *N. coriiceps*, tanto a 0°C quanto a 8°C, os níveis da SOD nos grupos de 3 e 6 dias foram menores em relação aos de 1 dia (fig. 1A) enquanto que em *N. rossii* seus valores foram aumentados nos grupos de 3 dias em relação aos de 1 e 6 dias (fig. 1B).

O aquecimento em 8°C não modulou os níveis de CAT em relação a 0°C nas duas espécies analisadas (figs. 1C e D). O perfil da atividade da CAT foi semelhante para ambas as espécies ao longo dos tempos de exposição. Nos grupos controle (0°C) os níveis de CAT diminuíram significativamente em 3 e 6 dias de experimento enquanto que, nos grupos experimentais (8°C) houve diminuição da atividade somente em de 6 dias.

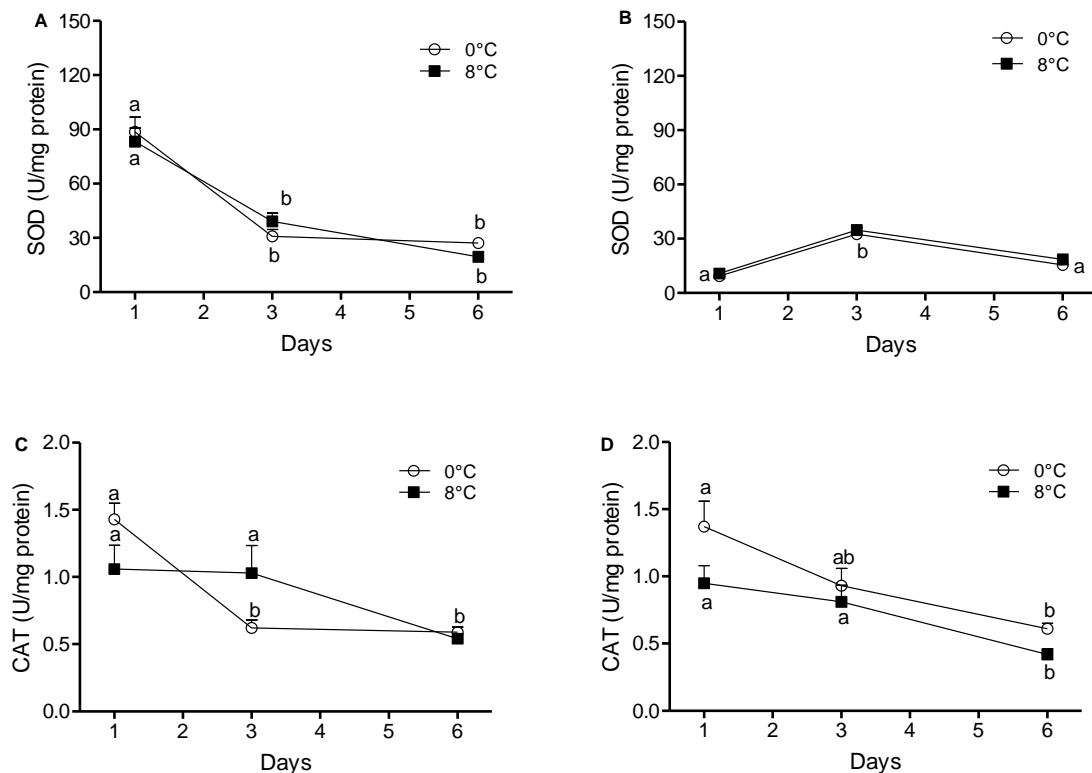


Figura 1: Atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no fígado de *Notothenia coriiceps* (A e C) e *Notothenia rossii* (B e D), expostos a 0°C e 8°C (círculo vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. As linhas verticais indicam médias \pm SEM. As letras minúsculas diferentes indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em cada temperatura (0°C e 8°C). Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as temperaturas (0°C e 8°C).

O aquecimento a 8°C, em *N. coriiceps*, não modulou os níveis de GST em relação a temperatura e tempo de exposição de 0°C. Já, em *N. rossii* o aquecimento em 8°C modulou negativamente os níveis de GST em relação a temperatura de 0°C (figs. 2A e B), em 6 dias de experimento. Ao longo do tempo, em *N. rossii*, foi observado aumento nos níveis de GST nos grupos controle (0°C) de 3 e 6 dias de exposição o que não aconteceu nos grupos experimentais (8°C) (fig 2B).

O aquecimento a 8°C não modulou os níveis de GR em relação a 0°C nas duas espécies analisadas (figs. 2C e D). O perfil da atividade da GR foi diferente para as espécies ao longo dos tempos de exposição, em *N. coriiceps* os valores obtidos não mostraram interação com os tempos de exposição e temperaturas testadas (fig. 2C). Já em *N. rossii* os níveis de GR não variaram entre os grupos controle enquanto que nos grupos experimentais os valores de GR diminuíram em 3 e 6 dias de exposição (fig. 2D).

O aquecimento a 8°C não modulou os níveis de GPx em relação a 0°C nas duas espécies analisadas (figs. 2E e F). No entanto, o perfil da atividade da GPx foi

diferente para as espécies ao longo dos tempos de exposição. Em *N. coriiceps*, a 8°C, houve aumento de GPx em 6 dias enquanto que a 0°C os níveis não variaram ao longo dos tempos de exposição (fig. 2E). Em *N. rossii*, houve modulação negativa nos grupos experimentais e nos controles em 3 dias de exposição, porém em 6 dias houve aumento dos níveis de GPx retornando aos níveis dos grupos de 1 dia de exposição para ambas as temperaturas testadas.

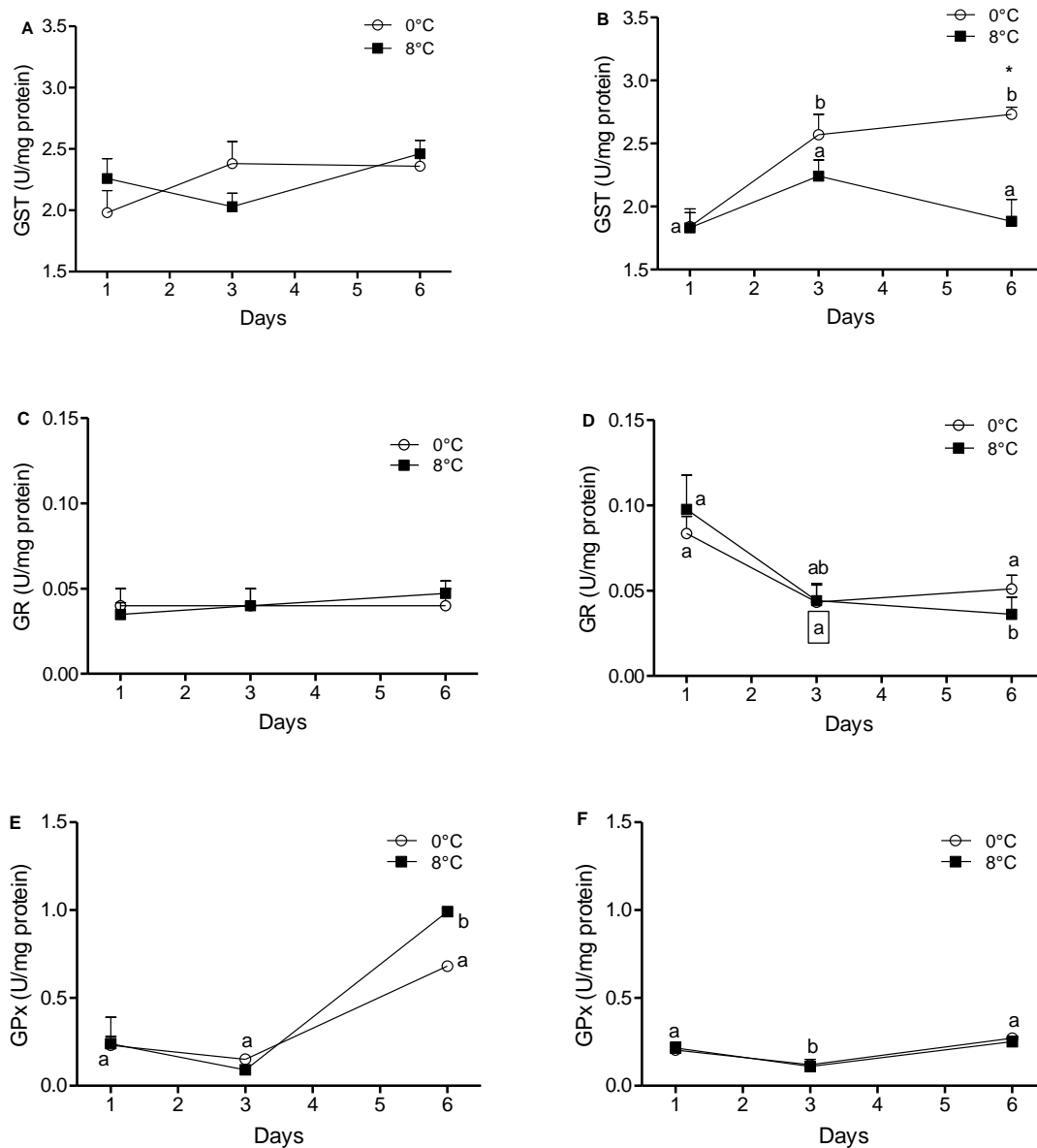


Figura 2: Atividade da glutatona S-transferase (GST), glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) no fígado de *Notothenia coriiceps* (A, C e E) e *Notothenia rossii* (B, D e F), expostos a 0°C e 8°C (círculo vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. As linhas verticais indicam médias \pm SEM. As letras minúsculas diferentes indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em cada temperatura (0°C e 8°C).

3.2 Índices de estresse oxidativo

Os valores médios \pm SEM da determinação dos marcadores não enzimáticos do estresse oxidativo em *N. coriiceps* e *N. rossii* estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3: Valores médios \pm SEM dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), peróxidos de lipídeos (LOOH), malondialdehyde (MDA) e carbonilação de proteínas (PC) no fígado de *Notothenia coriiceps*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por um, três e seis dias. O número de amostras para cada análise foi 10 exceto para 0°C – 1 dia (n = 9). Valores expressos em GSH: [tiois] nmoles. mg proteína⁻¹, LOOH: [hidroperóxido] nmols. mg proteína⁻¹, MDA: [MDA] μ mols . gwm⁻¹, PC: [carbonilas] nmols. mg proteína⁻¹

	GSH	LOOH	MDA	PC
0°C – 1 dia	66,90 \pm 5,15	0,0016 \pm 0,0003	11,27 \pm 0,99	0,0256 \pm 0,0022
0°C – 3 dias	125,32 \pm 19,44	0,0015 \pm 0,0004	10,15 \pm 0,58	0,0174 \pm 0,0034
0°C – 6 dias	102,69 \pm 16,11	0,0029 \pm 0,0003	10,32 \pm 0,98	0,0173 \pm 0,0023
8°C – 1 dia	71,52 \pm 12,23	0,0015 \pm 0,0004	12,56 \pm 0,91	0,018 \pm 0,002
8°C – 3 dias	147,91 \pm 19,97	0,0017 \pm 0,0005	12,37 \pm 0,86	0,020 \pm 0,002
8°C – 6 dias	89,57 \pm 12,83	0,0030 \pm 0,0005	10,62 \pm 1,48	0,016 \pm 0,002

Tabela 4: Valores médios \pm SEM dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), peróxidos de lipídeos (LOOH), malondialdehyde (MDA) e carbonilação de proteínas (PC) no fígado de *Notothenia rossii*, expostos as temperaturas de 0°C e 8°C por um, três e seis dias. O número de amostras para cada análise foi 10 exceto para 0°C – 1 dia (n = 9). Valores expressos em GSH: [tiois] nmoles. mg proteína⁻¹, LOOH: [hidroperóxido] nmols. mg proteína⁻¹, MDA: [MDA] μ mols . gwm⁻¹, PC: [carbonilas] nmols. mg proteína⁻¹

	GSH	LOOH	MDA	PC
0°C – 1 dia	144,43 \pm 12,14	0,0054 \pm 0,0007	10,54 \pm 1,32	0,0245 \pm 0,0036
0°C – 3 dias	81,90 \pm 17,66	0,0005 \pm 0,0004	17,54 \pm 2,84	0,0178 \pm 0,0022
0°C – 6 dias	12,91 \pm 2,22	0,0043 \pm 0,0003	10,13 \pm 0,79	0,0175 \pm 0,0020
8°C – 1 dia	122,47 \pm 17,97	0,0051 \pm 0,0011	9,57 \pm 1,12	0,0221 \pm 0,0027
8°C – 3 dias	137,06 \pm 27,50	0,0052 \pm 0,0005	11,61 \pm 1,16	0,0149 \pm 0,0016
8°C – 6 dias	39,21 \pm 9,42	0,0037 \pm 0,0006	14,01 \pm 1,33	0,0126 \pm 0,0015

O aquecimento a 8°C não modulou os níveis de GSH em relação a 0°C em *N. coriiceps*. No entanto, sua concentração nos grupos experimentais aumentou em 3 dias em relação a 1 e 6 dias de exposição. Em 0°C, a concentração de GSH manteve-se constante ao longo dos tempos de exposição (fig. 3A). O aquecimento em 8°C modulou os níveis de GSH em relação a 0°C em *N. rossii* onde, em 6 dias, esses níveis foram significativamente maiores nos grupos experimentais em relação aos grupos controle. Quanto aos tempos de exposição, os níveis de GSH diminuíram consideravelmente em 6 dias nas duas temperaturas em relação a 1 e 3 dias de exposição (fig. 3B).

O conteúdo de MDA foi modulado negativamente pelo aquecimento a 8°C em *N. rossii*, onde em 3 dias, esses níveis foram significativamente maiores em 0°C em relação a 8°C. Ao longo do tempo, em *N. rossii*, foi observado aumento nos níveis de MDA nos grupos controle (0°C) somente em 3 dias de exposição o que não aconteceu nos grupos experimentais (8°C) (fig 3F). Em *N. coriiceps*, o aquecimento a 8°C não modulou os níveis de MDA em relação a 0°C e aos tempos de exposição (fig. 3E).

Não foram encontradas diferenças significativas nos níveis de LOOH e PC em relação aos tempos de exposição e temperaturas testadas nas duas espécies estudadas (fig. 3).

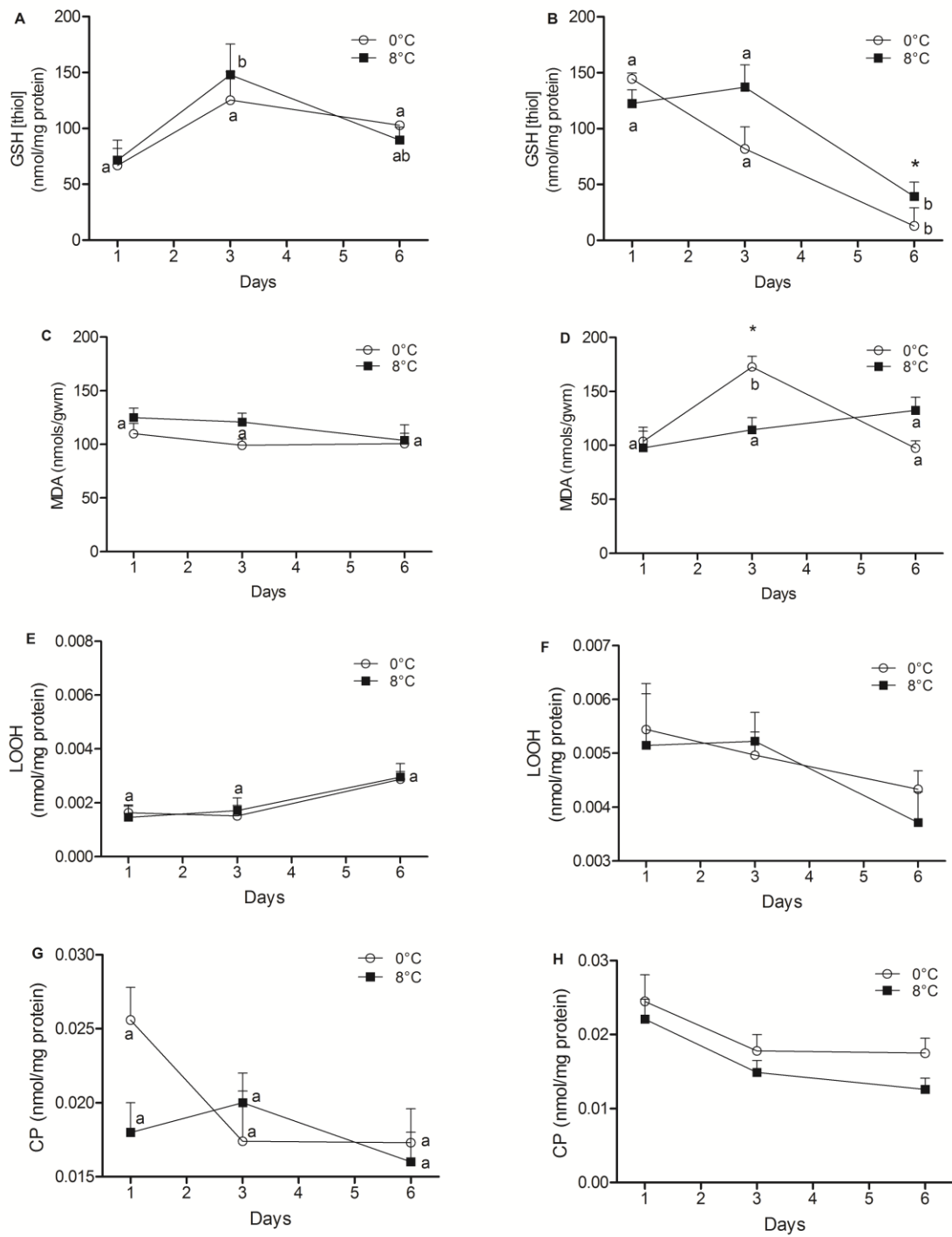


Figure 3: Glutathiona reduzida (GSH), peróxidos de lipídeos (LOOH), malondialdehyde (MDA) e carbonilação de proteínas (PC) no fígado de *Notothenia coriiceps* (A, C, E e G) e *Notothenia rossii* (B, D, F e H), expostos a 0°C e 8°C (círculo vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. As linhas verticais indicam médias \pm SEM. As letras minúsculas diferentes indicam que há diferenças entre os tempos de exposição em cada temperatura (0°C e 8°C). Asteriscos indicam diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre as temperaturas (0°C e 8°C).

4 DISCUSSÃO

A atividade e a expressão de enzimas antioxidantes têm sido utilizadas para a avaliação de organismos antárticos submetidos a estresse térmico (PARK *et al.*,2008a, PARK *et al.*,2008b, MUELLER *et al.*,2012), já que estudos indicam que o aumento na temperatura do ambiente pode aumentar o consumo de oxigênio que, por sua vez, promove a geração de ROS (ABELE *et al.*,1998, 2001). Neste contexto, testamos se o aumento da temperatura ambiental altera os níveis de algumas enzimas do metabolismo oxidativo e de defesas antioxidantes no fígado de dois nototheniids antárticos, *N. rossii* e *N. coriiceps*, adaptados a um ecossistema estável e de baixas temperaturas.

Neste trabalho, a temperatura de 0°C foi escolhida como controle e encontra-se dentro da média da variação térmica encontrada nas áreas próximas na Península Antártica e ilhas do Oceano Austral (Sidell, 2000), onde os peixes foram capturados. A temperatura experimental de 8°C fica próxima da tolerância térmica de peixes antárticos demonstrada em trabalhos como Somero e DeVries (1967), Pörtner *et al.*,(2004), Lowe e Davison (2005).

A SOD e a CAT são importantes enzimas do metabolismo oxidativo, onde a SOD, pela reação com o íon superóxido, forma peróxido de hidrogênio que será decomposto em água e oxigênio pela CAT (AEBI,1984). Algumas isoformas de SOD foram bem caracterizadas em peixes, incluindo peixes antárticos (CASSINI *et al.*,1997; KEN *et al.*,2003; LESSER, 2006; SANTOVITO *et al.*,2006), mostrando que essas proteínas evoluíram para manter a função catalítica sobre uma vasta gama de temperatura (CASSINI *et al.*, 1997; ABELE e PUNTARULO, 2004; LESSER, 2006). Neste trabalho, o aquecimento em 8°C não modulou os níveis de SOD e CAT em relação a 0°C nas duas espécies analisadas. Mueller *et al.* (2012) também não encontraram alterações nos níveis de CAT em coração e músculo de peixes antárticos, dentre eles *N. coriiceps*, em resposta a exposição a sua CTMax, no entanto foi observado diminuição dos níveis de transcrição da SOD em corações de *icefishes* (sangue branco) e *Gobionotothen gibberifrons* (sangue vermelho), sugerindo que esses organismos podem ter reduzido a capacidade para elevar os níveis de antioxidantes em resposta ao estresse térmico. O fato de não observarmos diferenças significativas na atividade da CAT e SOD frente ao aumento da temperatura ambiental pode estar vinculado ao órgão de escolha, neste caso o

fígado, e que, nas espécies analisadas, outros órgãos ou tecidos podem estar envolvidos nesta defesa. Em *N. rossii* coletados da natureza foram encontrados valores de SOD aproximadamente duzentas vezes maiores no sangue do que no fígado (ANSALDO *et al.*, 2000). Estudos indicam que os eritrócitos possuem mecanismos responsáveis pela defesa frente a alta formação de ânion superóxido, em consequência das altas concentrações de oxigênio que é transportado por essas células (HOLETON, 1970; CASSINI *et al.*, 1993). Em invertebrados antárticos, alguns trabalhos têm demonstrado maiores variações nos níveis de SOD em brânquias em relação a outros tecidos analisados em resposta ao estresse térmico (ABELE *et al.*, 1998; PARK *et al.*, 2008) mostrando que as brânquias são mais suscetível a variações de temperatura.

Os níveis da SOD em *N. coriiceps*, assim como os níveis de CAT, nas duas espécies estudadas, foram modulados negativamente ao longo do tempo indicando uma inibição dessa enzima. Já em *N. rossi* os níveis de atividade da SOD foram modulados positivamente em 3 dias em relação a 1 e 6 dias. Lushchak *et al.* (2006) verificaram a atividade de enzimas antioxidantes em *Carassius auratus* (goldfish) expostos a choque térmico (de 21°C para 35°C) por 1,6 e 12 horas e observou, no fígado, um aumento acentuado da SOD (3-fold) em 6 horas, seguido de diminuição (1,5-fold) em 12 horas. Nesse mesmo estudo, a atividade da CAT diminuiu cerca de 3-fold em relação ao controle em 1 hora de exposição ao choque térmico, porém aumentou aos níveis do controle em 6 e 12 horas. Bagnyukova *et al.* (2007), ao submeterem *C. auratus* cold aclimatados (3°C) ao aumento agudo da temperatura (23°C) verificaram diminuição nos níveis de CAT após 48 horas de exposição a 23°C, seguido de aumento desses níveis em 120 horas.

As enzimas antioxidantes GSH dependentes (GPx, GR e GST) também são marcadores utilizados na avaliação da relação entre o estresse oxidativo e o estresse térmico em peixes tropicais e temperados (HEISE *et al.* 2006; LEGGATT *et al.*, 2007; BAGNYUKOVA *et al.*, 2007; GRIM *et al.*, 2013), porém, em peixes antárticos, ainda não se tem registro do comportamento desse sistema antioxidante frente ao aumento da temperatura ambiental. Estes marcadores em peixes antárticos foram avaliados sob outras condições de estresse como a exposição a pesticidas (GHOSH *et al.*, 2013) e a metais pesados (BENETTI *et al.*, 2007). A ação da GPx consiste em consumir H₂O₂ transformando a glutathiona reduzida (GSH) em glutathiona oxidada (GSSG) (WENDEL, 1981). A GR por sua vez, age regenerando a

glutathione na sua forma reduzida (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Neste trabalho, somente em *N. rossii* o aquecimento em 8°C modulou, de forma negativa, os níveis de GST em relação a 0°C. No entanto, o aquecimento a 8°C não foi capaz de modular os níveis de GR e de GPx em relação a 0°C nas duas espécies estudadas. Em peixes temperados submetidos ao estresse térmico, os níveis das enzimas GSH dependentes também não foram modulados pelo aquecimento em diferentes tecidos (LUSHCHAK *et al.*, 2006; LEGGATT *et al.*, 2007; GRIM *et al.*, 2013).

Ao longo do tempo apenas a GPx, em *N. coriiceps*, teve uma resposta ao aquecimento com o aumento nos níveis de atividade em 6 dias no grupo experimental (8°C). Já em *N. rossii* foi possível observar, ao longo do tempo, um aumento nos níveis de GST nos grupos controle (0°C) e diminuição nos níveis de GR ao longo do tempo nos grupos experimentais (8°C). Bagnyukova *et al.*, (2007) verificaram um aumento acentuado da GPx, no fígado de *C. auratus*, em 6 horas de exposição ao aquecimento (23°C), seguido de diminuição dos níveis em 120 horas e, não foram observadas alterações de GST e GR, ao longo do tempo de exposição ao aquecimento.

O conteúdo de GSH presente nas células é utilizado como marcador não enzimático de estresse oxidativo (SEDILAK e LINDSAY, 1968; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; GRIM *et al.*, 2013). Em *N. coriiceps*, o aquecimento em 8°C não modulou os níveis de GSH mas, ao longo do tempo observamos um aumento dos níveis de GSH em 3 dias a 8°C em relação a 1 e 6 dias enquanto que a 0°C não houve modulação. Em fígado de *C. auratus* submetidos ao choque térmico (23°C), Bagnyukova *et al.* (2007) observaram aumento significativo nos níveis de GSH em 24 horas de exposição, seguido por diminuição aos níveis do controle em 48 e 120 horas. Em *N. rossii*, houve modulação positiva nos níveis de GSH, em resposta ao aquecimento de 8°C quando comparado a 0°C. Respostas semelhantes foram observadas por Leggatt *et al.* (2007) que verificaram, em fígado e cérebro de *Fundulus heteroclitus* (killifish) e, Lushchak *et al.* (2005) em fígado e músculo de *C. auratus*. No entanto ao longo do tempo, a modulação da GSH em *N. rossii*, foi negativa, em 6 dias nas duas temperaturas testadas, mostrando um decréscimo significativo desse marcador a 0°C em relação a 8°C. Acreditamos que a diminuição da GSH ao longo do tempo, pode estar relacionada com o aumento dos níveis de GST encontrados, a partir de 3 dias em peixes mantidos a 0°C, uma vez que esta

enzima utiliza a GSH para promover a associação deste tripeptídeo com metabólitos potencialmente perigosos para as células, ajudando na excreção dessas substâncias (LEAVER e GEORGE, 1998). É importante salientar que, a glutatona é um tri-peptídeo que, na sua forma reduzida (GSH), pode neutralizar ROS e também serve como um cofator importante para várias enzimas antioxidantes glutatona-dependentes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). No entanto, além do consumo da GSH pelas vias metabólicas já citadas, aspectos relacionados a síntese da GSH, frente ao aumento da temperatura, devem ser considerado. Leggatt *et al.* (2007) verificaram em linhagem de células hepáticas de rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), expostas as temperaturas de 10, 18 e 26°C diminuições nos níveis de GSH, ao longo do tempo nas 3 temperaturas, porém, um declínio significativamente maior em 26°C. A modulação negativa encontrada por Leggatt *et al.* (2007) deve-se a utilização de inibidores da síntese de GSH, podendo sugerir que, a modulação positiva encontrada em nosso estudo pode ser decorrente de um aumento na síntese de GSH em resposta ao aquecimento a 8°C em *N. rossii*.

A evolução do estresse oxidativo é evidenciada por alterações nos níveis de marcadores de dano oxidativo que podem ser produtos da oxidação de proteína e de lipídios (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999; STADTMAN e LEVINE, 2000; HERMES-LIMA, 2004; LUSHCHAK, 2011). O processo de LPO, iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo insaturado, propagado pela formação de radicais peroxilas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999, LIMA e ABDALLA, 2001) e a quantificação de PC (SHACTER, 2000) são importantes marcadores não enzimáticos para o estresse oxidativo.

Os níveis de LOOH, não foram alterados nem pelo tempo de experimento nem entre as temperaturas nas duas espécies estudadas. O método de FOX, utilizado neste trabalho determina a concentração de hidroperóxidos (JIANG *et al.*, 1991), produtos da oxidação inicial de lipídeos, e, são moléculas instáveis que, após serem formadas, se quebram ou se conjugam com outras moléculas resultando em produtos secundários da lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). A LPO por ser um processo complexo, necessita ser avaliada por meio de abordagens metodológicas distintas (LIMA e ABDALLA, 2001), e neste trabalho, determinamos também a concentração de MDA, visando obtermos informações mais consistentes sobre os níveis de LPO relacionados ao estresse térmico em peixes antárticos. Os níveis de MDA foram modulados negativamente pelo aquecimento a 8°C em 3 dias

de exposição em *N. rossii*. O aumento dos níveis de MDA e GST em 3 dias a 0°C indica uma possível up-regulação dessa enzima pelo aumento nos níveis de MDA, uma vez que a GST está envolvida na detoxicação dos produtos da lipoperoxidação (HERMES-LIMA, 2004; BAGNYUKOVA *et al.*, 2006), sustentada pela redução dos níveis de MDA em 6 dias a 0°C. Em *N. coriiceps*, não observamos interação entre os níveis de MDA em relação as temperaturas testadas e entre os tempos de exposição. Regoli *et al.* (2005), avaliaram a resposta para o aumento natural das condições pró-oxidativas, que acontece no início da primavera austral, em *Pleuragrama antarcticum* e detectaram níveis elevados de MDA. O aumento nos níveis de MDA e PC em corações de icefishes, mas não em nototheniids, em resposta a exposição a CTMax, foi verificado por Mueller *et al.* (2012). Os níveis de PC não variaram com o aumento da temperatura nas duas espécies estudadas. Park *et al.* (2008) também não observaram modulação desse marcador no invertebrado *Lanternula elliptica* após o aquecimento a 10°C. O nível de PC está intimamente ligado à geração de ROS e são modificações oxidativas irreversíveis relativamente difíceis de ser induzidas, pois outros mecanismos além do sistema antioxidante, são utilizados na proteção das células contra esse dano, como por exemplo, a ação de chaperonas (DALLE-DONNE *et al.*, 2003).

Levando-se em consideração os estudos que indicam uma tendência de aquecimento da Antártica, em especial da península Antártica, a necessidade de ajustes metabólicos dos organismos antárticos frente a estas oscilações de temperatura e a importância de entendermos os mecanismos celulares pelos quais os organismos antárticos se defendem contra o estresse oxidativo imposto pela elevação da temperatura, podemos concluir neste trabalho, que o aquecimento a 8°C induziu respostas nos níveis e perfis ao longo do tempo, da atividade das enzimas antioxidantes e de defesas antioxidantes, nos nototheniids *N. rossii* e *N. coriiceps*. Estudos enfatizando outros órgãos devem ser realizados possibilitando melhor entendimento sobre o efeito da temperatura no sistema antioxidante de peixes antárticos.

III. Capítulo 2

Avaliação da expressão hepática da proteína do choque térmico (HSP70) em duas espécies de peixes antárticos (*Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*) submetidos a estresse térmico

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis da proteína do choque térmico (HSP70) em tecido hepático em duas espécies de peixes antárticos (*Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*) submetidos a estresse térmico (8°C) por 1, 3 e 6 dias através do método de *Western Blotting*. O interesse na resposta de choque térmico de espécies marinhas da Antártida foi motivado pelo fato do Oceano Antártico ser um ambiente muito estável e ter uma estreita faixa de temperatura. No entanto, estudos indicam que a resposta de choque térmico clássica está ausente em algumas espécies de peixes antárticos. Neste estudo, não foi possível verificar uma modulação dos níveis de HSP70 em resposta ao aquecimento a 8°C em relação a 0°C nas duas espécies analisadas e nos tempos de exposição às temperaturas testadas. Os resultados obtidos neste trabalho corroboram o existente na literatura e se estendem para *N. rossii* e *N. coriiceps*. Contudo, torna-se necessário a realização de mais estudos sobre a expressão da HSP70 e o aumento da temperatura ambiental para entendermos melhor as respostas de choque térmico em peixes antárticos.

Palavras-chaves: HSP, peixes antárticos, estresse térmico.

1 INTRODUÇÃO

As HSPs (*Heat Shock Proteins*) pertencem a uma família de proteínas de baixo peso molecular, altamente conservadas, que agem como chaperonas visando estabilizar proteínas desnaturadas e prevenindo a formação de agregados citotóxicos (PARSELL e LINDQUIST, 1993; HARTL, 1996; FINK, 1999). Dentre as diferentes HSPs, a HSP70 é a mais estudada e tem papel essencial na resposta celular do organismo, sendo expressa de forma constitutiva e atuando na manutenção das condições fisiológicas das células (FEDER e HOFMANN, 1999; DEANE e WOO, 2011). No entanto, a expressão de HSP70 é rapidamente induzida quando as células são expostas a agentes estressores, tais como variações bruscas

de temperatura e oxigênio, exposições a contaminantes industriais e agrícolas (WEBER e JANZ, 2001; PORTER e JANZ, 2003). Nestas condições, a HSP70 atua impedindo a desnaturação de proteínas e inibindo ou promovendo a apoptose (CARNEVALI e MARADONNA, 2003; PARCELLIER *et al.*, 2003).

Estudos confirmam que a família das HSP70 está envolvida com a adaptação de animais aquáticos a condições adversas (SCHLESINGER 1990; SANDERS 1993; FEDER e HOFMANN 1999; DEANE *et al.*, 2002; HEREDIA-MIDDLETON, 2008; WANG *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2009). Aumento da síntese de HSP70 em resposta ao estresse térmico envolvendo peixes tem sido relatada em trabalhos como o de Lund *et al.* (2002) que utilizaram esse marcador para determinar os limiares de temperatura para estresse térmico em salmão (*Salmo salar*). Currie *et al.* (2000) observaram aumento na transcrição do gene HSP70 em células do sangue, cérebro, coração, fígado e músculo de trutas (*Oncorhynchus mykiss*) submetidas a aumento da temperatura ambiental. Dalvi *et al.* (2012) verificaram em brânquias, cérebro, músculo e fígado de *Horabagrus brachysoma* uma regulação positiva da expressão da HSP70 com o aumento da temperatura de aclimação. A expressão do fator de transcrição de choque térmico foi aumentada durante a aclimação do peixe dourado (*Sparus sarba*) a baixa temperatura (DEANE e WOO, 2005).

O interesse na resposta de choque térmico de espécies marinhas da Antártida foi motivado pelo fato do Oceano Antártico ser um ambiente muito estável e ter uma estreita faixa de temperatura (CLARK e PECK, 2009, PECK, 2011). No entanto, Hofmann *et al.* (2000) observaram que a resposta de choque térmico clássica esta ausente no peixe antártico *Trematomus bernacchii*. Mais investigações em outras espécies de peixes antárticos (*T. bernacchii*, *Pagothenia borchgrevinki* e *Harpagifer antarcticus*) mostraram que não foi apenas a falta de resposta ao estresse térmico, mas que a forma induzida de HSP70 não foi afetada pelo cádmio (um metal tóxico que provoca desnaturação protéica) e MG132 (um inibidor da actividade de proteassoma que resulta em danos proteicos) também não conseguiram induzir a expressão da HSP70 (HOFMANN *et al.*, 2000, BUCKLEY *et al.*, 2004, CLARKE e PECK, 2009). Place *et al.* (2004), ao submeterem peixes antárticos (*T. bernacchii*) e dois notothenioids não antárticos (*Bovichtus variegatus* e *Notothenia angustata*) a 10°C por 2 horas, verificaram que apenas os notothenioids não antárticos exibiram uma regulação positiva da HSP70 com o aumento da temperatura.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a expressão da proteína de choque térmico (HSP70) em tecido hepático em duas espécies de peixes antárticos (*Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*) submetidos a estresse térmico (8°C) por 1, 3 e 6 dias. Neste trabalho, a temperatura de 0°C foi escolhida como controle e encontra-se dentro da média da variação térmica encontrada nas áreas próximas na Península Antártica e ilhas do Oceano Austral (SIDELL, 2000), onde os peixes foram capturados. A temperatura experimental de 8°C fica próxima da tolerância térmica de peixes antárticos demonstrada em trabalhos como Somero e DeVries (1967), Pörtner (2004) e Lowe e Davison (2005).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados na Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF) localizada na Baía do Almirantado (61°S e 63°30'S e 53°55'W e 62°50'W), Ilha Rei George, no Arquipélago das Shetlands do Sul, Península Antártica. As licenças ambientais foram concedidas pelo Grupo de Assessoramento Ambiental do Ministério do Meio Ambiente do Brasil. A experimentação foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob o n° 496.

2.1 Bioensaios de temperatura

Notothenia coriiceps (n = 60; TL = 35 ± 3 cm; W = 775 ± 182 g) e *Notothenia rossii* (n = 60; TL = 37 ± 3 cm; W = 791 ± 145 g) foram coletadas com anzol e linha na Baía do Almirantado. Após a coleta os peixes foram mantidos durante 3 dias em tanques de 1000 L com condições abióticas controladas, salinidade de 35 ± 1,0, temperatura de 0 ± 0,5°C e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. A alimentação, a base de músculo epaxial de peixe, ocorreu a cada dois dias alternando-se a troca de água dos tanques.

Em seguida, para cada espécie, os peixes foram randomicamente selecionados e transferidos para tanques de 1000L contendo água do mar à temperatura de 8 ± 0,5°C (experimentais) por 1, 3 e 6 dias, ou 0 ± 0,5°C (controle) pelo período de 1, 3 e 6 dias, sendo que para cada experimento foram utilizados 10

indivíduos. A salinidade foi de $35 \pm 1,0$ e fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro. A temperatura da água dos tanques foi rigorosamente mantida com termostatos Aquaterm 09-01T-11457 (Full Cauge) acoplados a aquecedores (Altman).

Após a realização dos bioensaios, os animais foram anestesiados com benzocaína 1% (p v-1) e mortos via secção medular, seguindo-se a retirada de amostras de fígado que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C .

2.2 Métodos Analíticos

As amostras de fígado de *N. coriiceps* e *N. rossii* (200mg) foram homogeneizadas em 500 μL de tampão HEPES 20mM, NaCl 15mM, Triton X-100 1%, NP-40 1% (inibidores de protease Benzamidina 20mM, EDTA 10mM, Iodocetamida 10mM, Pepstatina 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1,10 Fenantrolina 5mM, PMSF 2mM) e, em seguida centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante com as proteínas extraídas foi transferido para um novo tubo, onde foram processadas as análises.

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com método de Bradford (1976), utilizando o soro de albumina bovina (BSA) para o estabelecimento da curva padrão e a absorbância das amostras foi verificada a 545 nm.

2.2.1 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As proteínas extraídas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida. Uma alíquota do extrato de proteínas foi submetida a um gel de corrida (acrilamida 10%) em tampão Tris-base 150mM contendo SDS 1mM (pH 8,8), seguido do gel de empilhamento (acrilamida 5%) também em tampão Tris-base 50mM contendo SDS 1mM (pH 6,8).

Imediatamente após a corrida as proteínas do gel foram transferidos para a membrana de nitrocelulose em câmara de *Western Blot* contendo tampão de transferência (Tris-Base 25mM, Glicina 192mM, SDS 10% e Metanol 20%).

2.2.2 Ensaio imunológico de Western Blotting

As membranas foram coradas com Ponceau-S (Ácido Acético Glacial 3% e Ponceau S 0,2%) por 10 minutos e, em seguida, secas sobre papel toalha. Com base no marcador de peso molecular (ColorBurst™ Electrophoresis Marker - Sigma) a membrana contendo as proteínas foi separada na faixa de aproximadamente 50kDa onde, parte da membrana contendo as proteínas com pesos maiores que 50kDa foi incubada por duas horas na presença do anticorpo primário (anti-HSP70 marca BD diluído 1:1000 em TBST + leite Mólico 5%), e a parte da membrana contendo as proteínas com pesos menores que 50kDa foi incubada por duas horas na presença do anticorpo primário (anti-Actina marca BD diluído 1:1000 em TBST + leite Mólico 5%). Em seguida as membranas foram lavadas cinco vezes, por cinco minutos, com tampão TBST e incubadas com o anticorpo secundário (anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich) diluído 1:1000 em TBST + leite Mólico 5%) por duas horas à temperatura ambiente.

As membranas foram lavadas três vezes com tampão TBST por cinco minutos e em seguida o material foi coberto com cromógenos da fosfatase alcalina Premixed BCIP/NBT, (Sigma-Aldrich), permanecendo nesta solução até o aparecimento das bandas de marcação das proteínas. Após o aparecimento das bandas, as membranas de nitrocelulose foram mergulhadas em água destilada para parar a reação.

2.3 Análise dos dados

As membranas com as bandas de HSP70 e actina foram digitalizadas e a expressão das proteínas foi quantificada através da análise da intensidade relativa de cinza das bandas. A intensidade das bandas foi quantificada pelo programa ImageJ.

A análise estatística dos dados foi determinada através do test-t de student, sempre com limite de significância em 0,05.

3 RESULTADOS

Os anticorpos tiveram afinidade e especificidade com as proteínas extraídas do fígado dos peixes em estudo. As figuras 1 e 2 exibem o resultado do *Western blot* da proteína HSP70 no fígado de *N. rossii* e *N. coriiceps* expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias. A intensidade das bandas representa os níveis de HSP70 de cada amostra.

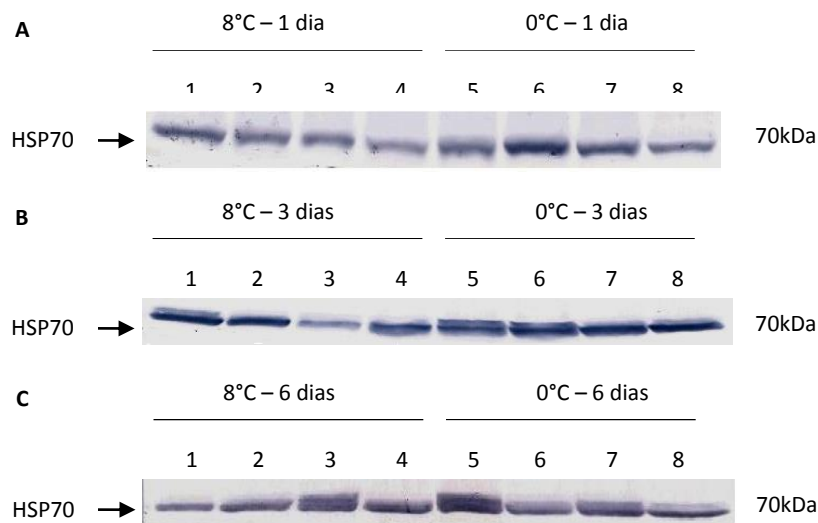


Figura 1: Representação do *Western blot* da proteína HSP70 no fígado de *Notothenia rossii* expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias (A,B e C respectivamente).

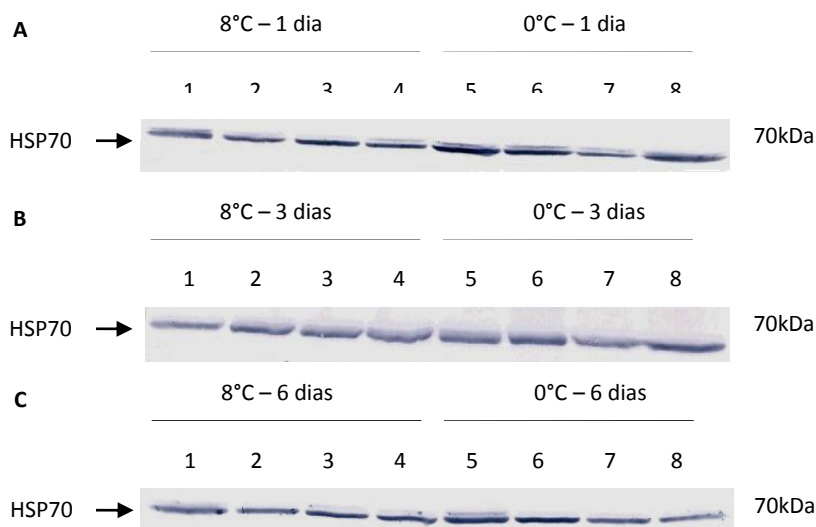


Figura 2: Representação do *Western blot* da proteína HSP70 no fígado de *Notothenia coriiceps* expostos a 0°C e 8°C durante 1, 3 e 6 dias (A,B e C respectivamente).

As Figuras 3 e 4 representam o efeito da aclimação sobre os níveis da HSP70 no fígado de *N. rossii* e *N. coriiceps* expostos a 0°C e 8°C (quadrado vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. A análise da intensidade das bandas de β -actina foi utilizada como normalizador, sendo os resultados expressos em unidades arbitrárias da razão HSP70/ β -actina.

O aquecimento a 8°C não modulou os níveis de HSP70 em relação a 0°C nas duas espécies analisadas e nos tempos experimentais de 1,3 e 6 dias.

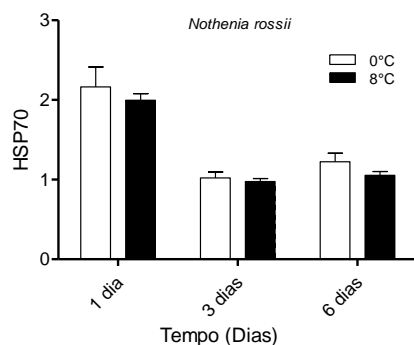


Figura 3: Efeito da aclimação sobre os níveis da HSP70 no fígado de *Nothenia rossii* expostos a 0°C e 8°C (quadrado vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. Estão representados os valores da média da densidade relativa das bandas HSP70/Actina em unidades arbitrárias \pm erro padrão da média; não houve diferença significativa ($P < 0,05$, teste t).

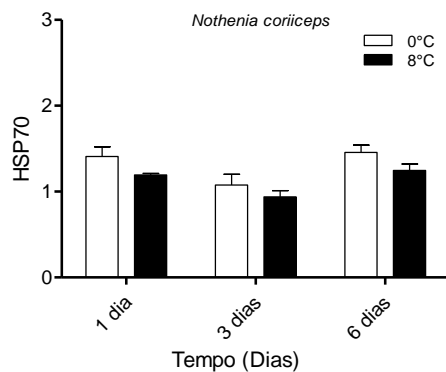


Figura 4: Efeito da aclimação sobre os níveis da HSP70 no fígado de *Nothenia coriiceps* expostos a 0°C e 8°C (quadrado vazio e quadrado cheio respectivamente) durante 1, 3 e 6 dias. Estão representados os valores da média da densidade relativa das bandas HSP70/Actina em unidades arbitrárias \pm erro padrão da média; não houve diferença significativa ($P < 0,05$, teste t).

4 DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi verificar se o aquecimento a 8°C era capaz de induzir uma resposta da proteína do choque térmico (HSP70) em tecido hepático

em duas espécies de peixes antárticos, *N. rossii* e *N. coriiceps*, por 1, 3 e 6 dias de exposição.

Bioensaios anteriores, publicados (MACHADO *et al.*, 2014) e ainda não publicados, realizados, pelo grupo de pesquisa de Biologia Adaptativa do Departamento de Biologia Celular – UFPR, em condições semelhantes demonstraram que há uma grande variabilidade de resposta ao estresse térmico entre as duas espécies estudadas (*N. rossii* e *N. coriiceps*). Fato esse que nos instigou a avaliar os mecanismos de resposta desses organismos fazendo um estudo comparativo dos níveis da HSP70 entre as duas espécies. Contudo, neste estudo, não foi possível verificar uma modulação dos níveis de HSP70 em resposta ao aquecimento a 8°C em relação a 0°C nas duas espécies analisadas e nos tempos de 1,3 e 6 dias de exposição as temperaturas. Este resultado está de acordo com outros autores que não observaram indução da resposta de choque térmico nos peixes antárticos: três espécies do gênero *Trematomus* (CARPENTER e HOFMANN, 2000; HOFMANN *et al.*, 2000), *Pagothenia borchgrevinki*, *Lycodichthys dearborni* (PLACE e HOFMANN, 2005) e *Harpagifer antarcticus* (CLARK *et al.*, 2008). Este estudo estende as observações anteriores sobre a alteração da resposta das proteínas termicamente sensíveis (HSP70) para duas espécies de peixes antárticos (*N. rossii* e *N. coriiceps*).

A maioria dos estudos envolvendo HSP70 e aumento da temperatura em peixes antárticos foi conduzida em curto período de tempo (até 12hs) e em temperaturas que variaram de 4°C a 6°C (CARPENTER e HOFMANN, 2000, PLACE *et al.*, 2004, BUCKLEY *et al.*, 2004, HOFMANN *et al.*, 2005, PLACE e HOFMANN, 2005, CLARK *et al.*, 2008). Apenas *T. bernacchii* foi testado por um período de aclimação de 3 semanas a 4°C (CARPENTER e HOFMANN, 2000; HOFMANN *et al.*, 2000) e estes apresentaram uma resposta celular ao estresse clássica, com um aumento na expressão de HSP70 em relação aos peixes coletados diretamente da natureza (CLARK e PECK, 2009, PECK, 2011). No entanto, como esses experimentos não contaram com um controle experimental, como no presente estudo, torna difícil a interpretação dessa resposta em relação à temperatura (4°C) e ao tempo de 3 semanas.

A proteína de choque térmico (HSP70) é uma das principais proteínas envolvida na resposta ao estresse (CLARK e PECK, 2009, GROSS, 2004) e resposta de choque térmico clássica foi identificada na maioria das espécies

estudadas com exceção de organismos antárticos e uma espécie de hidra (*Hydra oligactis*) (BOSCH *et al.*, 1988, CLARK e PECK, 2009). Estudos demonstram que a ausência de regulação da HSP70 de peixes antárticos em resposta ao aumento da temperatura está relacionada, em parte, a uma mutação na região de ligação do fator de transcrição HSF1 (BUCKLEY *et al.*, 2004) e, também devido a esses organismos possuírem, constitutivamente, níveis elevados de isoformas induzíveis de HSP70 devido ao aumento dos níveis de desnaturação proteica causados pelo frio (TOMANEK, 2010, CLARK *et al.*, 2008, PLACE *et al.*, 2004).

Portanto, a perda de resposta do choque térmico em organismos marinhos da Antártida é de grande interesse, dadas as previsões de mudanças climáticas, como o rápido aumento da temperatura da água do mar previstos ao longo da Península Antártica (TURNER *et al.*, 2005, CLARKE *et al.*, 2007, ROSS *et al.*, 2012), podendo colocar esses animais em risco (PECK *et al.*, 2004). Contudo, torna-se necessário a realização de mais estudos sobre a expressão da HSP70 e aumento da temperatura ambiental, envolvendo *N. rossii*, *N. coriiceps* e outras espécies e diferentes tempos experimentais, para entendermos melhor as respostas de choque térmico em peixes antárticos.

IV. Capítulo 3

Níveis de atividade dos marcadores de estresse oxidativo em diferentes órgãos de duas espécies de peixes antárticos do gênero *Notothenia* (Notothenioidei: Nototheniidae) da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica.

RESUMO

O presente estudo investigou as variações naturais e temporais de parâmetros de estresse oxidativo: atividades da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) e níveis de peroxidação lipídica (MDA) em diferentes órgãos de duas espécies de peixes antárticos, *Notothenia rossii* e *Notothenia coriiceps*. A amostragem foi realizada durante as Expedições Antárticas XXVII (2009), XXVIII (2010) e XXIX (2011), na Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica. Variações anuais e mensais na eficiência de antioxidantes foram observadas nas duas espécies estudadas. Em *N. coriiceps* variações nos níveis de SOD foram observadas em encéfalo e brânquias e de MDA no coração e em *N. rossii* nos níveis de SOD no fígado e de MDA no coração. Variações mensais da CAT e GST foram observadas nas brânquias de *N. coriiceps* e em *N. rossii* a SOD no encéfalo e músculo e GST em fígado. Os órgãos e marcadores utilizados neste estudo exibiram respostas distintas para as duas espécies estudadas. Também foram encontradas variações nos níveis dos marcadores para as duas espécies em órgãos específicos. Marcadores como a SOD nas brânquias e de MDA no coração, de ambas as espécies, mostraram ser uma opção na avaliação de parâmetros antioxidantes. Este estudo forneceu uma contribuição adicional sobre o sistema antioxidante de *N. rossii* e *N. coriiceps* cujas alterações nas respostas bioquímicas podem representar uma ferramenta útil para o biomonitoramento do ambiente antártico. Porém, maiores estudos devem ser feitos visando elucidar o efeito dos fatores abióticos sazonais no sistema antioxidante de peixes antárticos.

Palavras - chaves: variações sazonais, peixes antárticos, estresse oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

O ambiente aquático é extremamente dinâmico e os animais que vivem nesse meio enfrentam alterações ambientais como mudanças rápidas ou extremas na concentração de O₂ dissolvido, pH e salinidade, o que podem ocasionar estresse e reduzir a capacidade em manter a homeostase (MARIANO *et al.*, 2009). Os peixes que habitam o Oceano Antártico estão expostos a elevados níveis de oxigênio

dissolvido na água do mar que termicamente é muito fria e a mudanças acentuadas na disponibilidade de alimentos (ABELE e PUNTARULO, 2004; REGOLI *et al.*, 2004, 2005).

Em peixes de regiões temperadas, as variações de temperatura e a sazonalidade da disponibilidade de alimentos são fatores importantes que afetam as taxas metabólicas, a atividade locomotora e o crescimento desses organismos ectotérmicos (KIRCHIN *et al.*, 1992, MALANGA *et al.*, 2007). As temperaturas das águas do Oceano Antártico são muito baixas, porém muito estáveis em comparação com as águas temperadas. Embora as variações sazonais da temperatura sejam pequenas, elas podem ser detectadas com temperaturas mais altas durante o verão austral e tendem a ser maiores em águas superficiais e em menores latitudes (CLARKE, 1988, DEVRIES e STEFFENSEN, 2005). Variações sazonais no crescimento e na reprodução de organismos marinhos antárticos foram relacionadas a pequenos aumentos da temperatura no verão (EVERSON, 1970; BURCHETT *et al.*, 1983; NORTH e WHITE, 1987, CLARKE, 1988).

Talvez mais do que a temperatura, a principal influencia da sazonalidade no Oceano Antártico é a variação anual da luminosidade, juntamente com um grande ciclo anual de extensão do gelo do mar (ZWALLY *et al.*, 1979, CLARKE, 1988, BARGAGLI, 2005; CONVEY, 2007). Tomados em conjunto, estes dois fatores são responsáveis pela sazonalidade marcante na produtividade primária que tem efeitos profundos sobre a biologia dos produtores secundários no Oceano Antártico, tanto de plâncton quanto de bentos (DEVRIES e STEFFENSEN, 2005, BARGAGLI, 2005; CONVEY, 2007). Vale ressaltar que a sazonalidade da produção primária, assim como as variações da temperatura, tende a aumentar em direção as baixas latitudes do Oceano Antártico (HARRINGTON, 1986, CLARKE, 1988, DEVRIES e STEFFENSEN, 2005).

A sazonalidade imposta pelo padrão anual de produção primária no Oceano Austral é percebida mais claramente na biologia das espécies herbívoras (CLARKE, 1988; DEVRIES e STEFFENSEN, 2005). Nos organismos que ocupam níveis mais elevados da cadeia alimentar, como os peixes, a dieta ao longo do ano, pode vir a ser menos acoplada a esta sazonalidade. No entanto, a literatura tem demonstrado para algumas espécies de peixes antárticos, padrões sazonais distintos de crescimento e composição energética atribuídos à dieta. Apesar do alimento estar disponível durante todo o ano para estes peixes, eles parecem se alimentar

extensivamente no verão (BURCHETT, 1983, CLARKE, 1988, RAGA *et al.*, 2014, no prelo).

A eficiência das defesas antioxidantes pode ser influenciada por variações sazonais de fatores ambientais como a temperatura, disponibilidade de alimentos e fotoperíodo (ABELE e PUNTARULO, 2004). Alterações sazonais no metabolismo dos radicais livres têm sido relatados em animais ectotérmicos marinhos, incluindo peixes bentônicos, salmonete (*Mullus barbatus L.*) e tainha (*Liza ramada*) (PAVLOVIĆ *et al.*, 2004, 2010), poliquetas estuarinos (ABELE-OESCHGER *et al.*, 1994, GERACITANO *et al.*, 2004; KELLER *et al.*, 2004) e em várias espécies de bivalves (LESSER e KRUSE, 2004, MANDUZIO *et al.*, 2004, BOCCHETTI *et al.*, 2008, MALANGA *et al.*, 2007). Benedetti *et al.* (2010) estudaram a eficiência de antioxidantes basal em três notothenioides antárticos, *Trematomus bernacchii*, *Trematomus hansonii* e *Trematomus newnesi* e flutuações sazonais em *T. bernacchii* amostrados durante diferentes períodos do ciclo reprodutivo, derretimento do gelo e crescimento do fitoplâncton foram descritas. Os autores observaram diferenças apenas limitada entre os três notothenioids, com maiores valores de antioxidantes em *T. hansonii* e *T. newnesi*. No entanto, ainda são escassas as informações sobre a influencia sazonal ou a variação ao longo do ano dos parâmetros antioxidantes em peixes Antárticos, principalmente em peixes localizados em regiões de altas latitudes onde essas variações são maiores.

Avaliação das variações naturais na eficiência antioxidante em peixes pode ser útil na interpretação adequada dos estudos de campo, para discriminar fatores de estresse naturais e a variabilidade natural (PAVLOVIĆ *et al.*, 2010, BENEDETTI, 2010). Estudos sobre a suscetibilidade ao estresse oxidativo em organismos da Antártica também são importantes para monitorar o impacto das atividades humanas nas áreas remotas e para o desenvolvimento de biomarcadores, revelando perturbação do estado redox e oxidativo em relação a diferentes classes de agentes químicos (REGOLI *et al.*, 2004, 2005, BENETTI *et al.*, 2007, GHOSH *et al.*, 2013).

O presente trabalho tem como objetivo analisar ao longo do ano os níveis de atividades dos marcadores de estresse oxidativo em diferentes órgãos de duas espécies de peixes antárticos do gênero *Notothenia* (Notothenioidei: Nototheniidae) da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Península Antártica.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Local de Coleta

A Baía do Almirantado, localizada na Ilha Rei George, arquipélago das Shetlands do Sul tem uma área aproximada de 122 km² (RAKUSA-SUSZCZEWSKI *et al.*, 1993) atingindo profundidades de 535 m na região central (SICIŃSKI *et al.*, 2011). Apresenta uma linha de costa bastante variável (RAKUSA-SUSZCZEWSKI, 1995), com uma topografia e geomorfologia de fundo complexas (SICIŃSKI *et al.*, 2011) sendo a mais conhecida a da Ezcurra Inlet (Marsz, 1983). A Baía é aberta para o sul em direção ao Estreito de Bransfield, de onde recebe águas derivadas do Mar de Bellingshausen e do Mar de Weddell (GORDON e NOWLIN, 1978; SICIŃSKI *et al.*, 2011). A dinâmica das marés, os ventos e o regime sazonal são os principais responsáveis pela circulação de água no interior da Baía (RAKUSA-SUSZCZEWSKI *et al.*, 1993; BROMBERG, 1999; SICIŃSKI *et al.*, 2011). No verão predominam águas mais quentes, em torno de 2,3°C e menos salinas, em torno de 33,5, devido a maior influência das águas do Mar de Bellingshausen e no inverno, sob maior influência do Mar de Weddell predominam as águas mais frias (-0,8°C) e mais salinas (34,4) (SICIŃSKI *et al.*, 2011). Segundo Pruszek (1980), uma troca completa da camada superficial do mar, até 100 m ocorre em aproximadamente 1 a 2 semanas, sendo estas responsáveis, segundo Lipski (1987), pela variação na concentração de clorofila *a* na Baía ao longo do ano. As águas superficiais da Baía são bem oxigenadas, com valores entre 7.0 e 9.2 cm³ L⁻¹ na Ezcurra Inlet (SARUKHANYAN & TOKARCZYK, 1988). O fundo do mar da Baía do Almirantado tem composição variada sendo formado por pedras, seixos, cascalho, areia e/ou lama dependendo a região analisada (NONATO *et al.*, 1992a, b; SICIŃSKI, 2004). A Baía do Almirantado congela em períodos irregulares e segundo KRUSZEWSKI (1999) em 20 invernos congelou 11 vezes.

2.2 Coleta

Os exemplares de *N. rossii* e *N. coriiceps* foram capturados com linha e anzol na Baía do Almirantado durante as Expedições Antárticas XXVII (2009), XXVIII (2010) e XXIX (2011). As pescas foram realizadas com auxílio de botes pneumáticos

do tipo “Zodiac” e MK6 ou a bordo da lancha oceanográfica “Skua”. Os peixes capturados foram transportados para a Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) e, num período de no máximo 24 horas, foram anestesiados em benzocaína 1% (p v⁻¹) e mensurados em comprimento total e padrão em cm ~0.1 cm e pesados em g ~0,1 g. O sexo foi determinado macroscopicamente e indivíduos adultos e juvenis em *N. rossii* foram determinados segundo Burchett (1983b) e em *N. coriiceps* segundo Sapota (1999). Após a obtenção das variáveis morfométricas os animais foram mortos para a retirada de tecidos que foram congelados em freezer -30°C.

2.3 Métodos Analíticos

As amostras de fígado, músculo, coração, brânquias, encéfalo e rim de *N. coriiceps* e *N. rossii* foram homogeneizadas em tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2 e, em seguida centrifugadas a 12.000 g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi separado para a determinação da concentração de proteínas, da atividade das enzimas antioxidantes e dos níveis dos marcadores não enzimáticos.

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

A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com método de Bradford (1976), utilizando o soro de albumina bovina (BSA) para o estabelecimento da curva padrão e a absorbância das amostras foi verificada a 545 nm.

2.3.1 Ensaio enzimático das enzimas antioxidantes

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada pelo consumo de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) espectrofotometricamente a 240nm. O meio de reação continha tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 10mM (BEUTLER, 1975).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada segundo a metodologia descrita por Crouch *et al.*, (1981), que se baseia na capacidade da enzima em inibir a redução do NBT (Azul de nitrotetrazólio) para azul formazan pelo O₂⁻ gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. Essa inibição foi medida espectrofotometricamente a 560 nm.

A atividade da glutathiona-s-transferase (GST) foi determinada de acordo com a metodologia de Keen *et al.* (1976) utilizando o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A glutathionação do CDNB foi medida espectrofotometricamente em 340 nm.

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

2.3.2 Índice de peroxidação lipídica (LPO)

Os níveis de LPO foram determinados espectrofotometricamente em 535 nm pela reação de TBARS, utilizando malondialdehyde-(bis)-acetate (MDA, Merck, Darmstadt, Germany) como padrão (UCHIYAMA e MIHARA, 1978). Os valores foram expressos em nmols de MDA por miligrama de proteína.

2.4 Análise dos dados

Os dados foram previamente testados para normalidade (Kolmogorov–Smirnov) e homogeneidade de variâncias (Leveve). A atividade enzimática da CAT, SOD e GST e os níveis de MDA foram comparados entre os órgãos e o tempo (meses) utilizando uma análise de variância bifatorial (ANOVA one-way). Em seguida realizou-se o teste de Tukey para a comparação das médias. Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM), as diferenças foram consideradas significativas se $p \leq 0.05$.

3 RESULTADOS

3.1 Aspectos da população

Um total de 67 espécimes de *N. rossii* foram utilizados neste estudo dos quais 35 eram fêmeas, 27 machos e 5 de sexo indeterminado (Tabela 1). O comprimento total dos espécimes variou entre as médias de $24,00 \pm 0,00$ e $33,75 \pm 2,62$ cm (Tabela 1) e o peso variou de $185,00 \pm 21,21$ e $525,83 \pm 142,28$ g (Tabela 1).

Tabela 1: Valores médios (\pm desvio padrão) mensais de peso em gramas (g), comprimento total e padrão em centímetros (cm) e sexo de *Notothenia rossii* coletados na Baía do Almirantado, Antártica. Estão apresentados numero de indivíduos capturados (n) entre parênteses, os valores médios \pm desvio padrão, máximo e mínimo, o sexo (♀ = fêmea, ♂ = macho, Ind = indeterminado) e juvenis = J.

		Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Sexo
1	mar-09	525,83 \pm 142,28 (6)	33,75 \pm 2,62 (6)	29,35 \pm 2,27 (6)	3 ♀ /3 ♂
2	mai-09	443,00 \pm 199,24 (5)	31,88 \pm 5,29 (5)	30,34 \pm 4,88 (5)	3 ♀ /2 ♂
3	jun-09	243,33 \pm 47,92 (6)	27,67 \pm 1,60 (6)	24,18 \pm 1,28 (6)	5 ♂ /1 ind
4	nov-09	348,09 \pm 168,81 (6)	29,25 \pm 4,40 (6)	25,25 \pm 4,03 (6)	1 ♀ /4 ♂ /1 ind
5	dez-09	239,04 \pm 70,72 (7)	26,97 \pm 2,30 (7)	23,34 \pm 2,29 (7)	5 ♀ /2 ♂
6	jan-10	400,00 \pm 244,44 (6)	30,60 \pm 6,05 (6)	26,67 \pm 5,78 (6)	3 ♀ /3 ♂
7	mar-10	185,00 \pm 21,21 (2)	24,00 \pm 0,00 (2)	20,00 \pm 0,00 (2)	2J
8	abr-10	255,00 \pm 35,36 (2)	27,00 \pm 1,41 (2)	23,25 \pm 1,06 (2)	2 ♀
9	mai-10	282,50 \pm 81,96 (6)	28,33 \pm 3,27 (6)	24,17 \pm 3,09 (6)	2 ♀ /4 ♂
10	jun-10	259,17 \pm 60,94 (6)	27,42 \pm 2,42 (6)	23,83 \pm 1,54 (6)	6 ♀
11	out-10	186,67 \pm 96,09 (3)	24,50 \pm 4,27 (3)	21,67 \pm 3,82 (3)	1 ♀ /1 ♂ /1 ind
12	dez-10	457,50 \pm 306,82 (6)	31,68 \pm 7,11 (6)	27,50 \pm 6,52 (6)	3 ♀ /3 ♂
13	jan-11	408,83 \pm 195,90 (6)	30,32 \pm 3,79 (6)	26,60 \pm 3,40 (6)	1 ♀ /5 ♂

Quanto a *N. coriiceps*, 64 espécimes foram coletados dos quais 37 eram fêmes, 20 machos e 3 de sexo indeterminado (Tabela 2). O comprimento total de *N. coriiceps* variou entre as médias de 30,50 \pm 8,67 e 39,93 \pm 2,53 cm e o peso variou entre as médias de 381,25 \pm 41,91 e 1004,17 \pm 161,23 g (Tabela 2).

Tabela 2: Valores médios (\pm desvio padrão) mensais de peso em gramas (g), comprimento total e padrão em centímetros (cm) e sexo de *Notothenia coriiceps* coletados na Baía do Almirantado, Antártica. Estão apresentados numero de indivíduos capturados (n) entre parênteses, os valores médios \pm desvio padrão, máximo e mínimo, o sexo (♀ = fêmea, ♂ = macho, Ind = indeterminado) e juvenis = J

		Peso (g)	Comprimento Total (cm)	Comprimento Padrão (cm)	Sexo
1	mar-09	851,83 \pm 139,45 (6)	37,60 \pm 1,63 (6)	32,80 \pm 1,58 (6)	1 ♀ /5 ♂
2	abr-09	938,33 \pm 116,13 (6)	38,00 \pm 1,63 (6)	33,92 \pm 3,34 (5)	4 ♀ /2 ♂
3	nov-09	695,72 \pm 173,80 (5)	37,84 \pm 3,73 (5)	33,42 \pm 2,68 (5)	4 ♀ /2 ♂
4	dez-09	852,50 \pm 256,43 (6)	39,17 \pm 3,83 (6)	34,75 \pm 3,33 (6)	5 ♀ /1 ♂
5	jan-10	1004,17 \pm 161,23 (6)	39,93 \pm 2,53 (6)	35,37 \pm 2,45 (6)	3 ♀ /3 ♂
6	mar-10	863,75 \pm 555,18 (4)	36,25 \pm 7,05 (4)	32,00 \pm 6,72 (4)	3 ♀ /1 ♂
7	mai-10	457,50 \pm 212,69 (6)	30,67 \pm 5,12 (6)	27,33 \pm 4,61 (6)	2 ♀ /2 ♂ /2J
8	jun-10	760,00 \pm 433,56 (3)	35,50 \pm 8,67 (3)	31,00 \pm 7,70 (3)	1 ♀ /1 ♂ /1 ind
9	out-10	381,25 \pm 41,91 (4)	30,50 \pm 1,00 (4)	26,88 \pm 1,25 (4)	1 ♀ /3 ♂
10	dez-10	1104,17 \pm 519,04 (6)	44,33 \pm 2,56 (6)	39,17 \pm 2,04 (6)	6 ♀
11	jan-11	827,00 \pm 523,83 (5)	36,30 \pm 9,32 (5)	31,70 \pm 8,41 (5)	5 ♀
12	fev-11	1057,50 \pm 470,23 (2)	39,75 \pm 5,30 (2)	34,75 \pm 4,60 (2)	2 ♀

3.2 Enzimas antioxidantes

3.2.1 Superóxido dismutase (SOD)

Os valores dos níveis de SOD em brânquias de *N. rossii* não apresentaram diferenças significativas entre os meses e os anos analisados (Figura 1E), assim como no coração, com exceção do mês de janeiro de 2011 onde foram encontrados valores significativamente menores para SOD em relação aos meses de janeiro, março, abril e maio de 2009 (Figura 1C). Em encéfalo de *N. rossii* os valores de SOD mostraram uma variação anual em 2009, e esses valores foram menores em março, maio e junho em relação a novembro e dezembro deste ano (Figura 1A). Variação anual similar ao encéfalo pode ser percebida em músculo de *N. rossii* em 2009 (Figura 2A). No fígado de *N. rossii* foi possível observar uma variação da SOD entre os anos de 2009 e 2010 onde valores menores foram encontrados em 2009 (Figura 2C). O rim exibiu maiores valores de SOD em maio e outubro de 2010 em relação a maioria dos outros meses analisados (Figura 1E).

Em *N. coriiceps*, os valores dos níveis de atividade de SOD em músculo não apresentaram variação significativa entre os meses e os anos amostrados (Figura 2B). Nas brânquias e no encéfalo pode-se observar variação da SOD entre os anos amostrados onde em 2009 esses valores foram maiores em relação a 2010 e 2011 (Figuras 2F e 1B). No encéfalo, houve variação mensal em 2010 onde os valores referentes a janeiro foram significativamente maiores que os outros meses amostrados deste ano (Figura 1 B). No fígado de *N. coriiceps* houve pequena variação entre os meses de 2009 e 2010 onde os primeiros mostraram valores menores em relação ao segundo (Figura 2D). O coração de *N. coriiceps* exibiu maiores valores de SOD em janeiro e junho de 2010 em relação à maioria dos outros meses analisados (Figura 1D), enquanto que no rim, os valores de SOD foram maiores em março de 2009 quando comparados com a maiorias dos meses amostrados (Figura 1F).

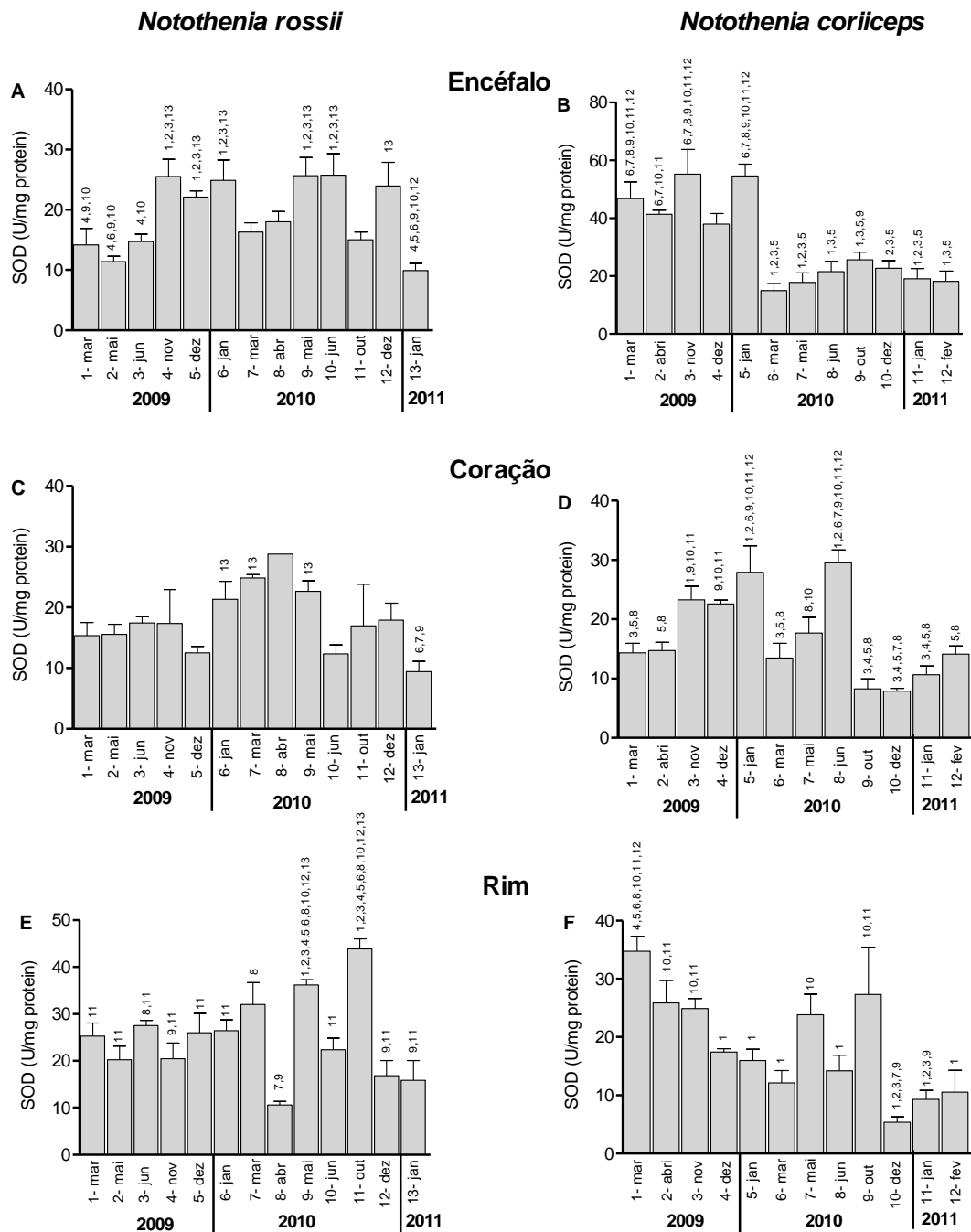


Figura 1: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de SOD no encéfalo (A), coração (C) e rim (E) de *Notothenia rossii* e no encéfalo (B), coração (D) e rim (F) de *Notothenia coriiceps*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam que há diferenças significativas entre os meses amostrados ($P \leq 0,05$) e * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$).

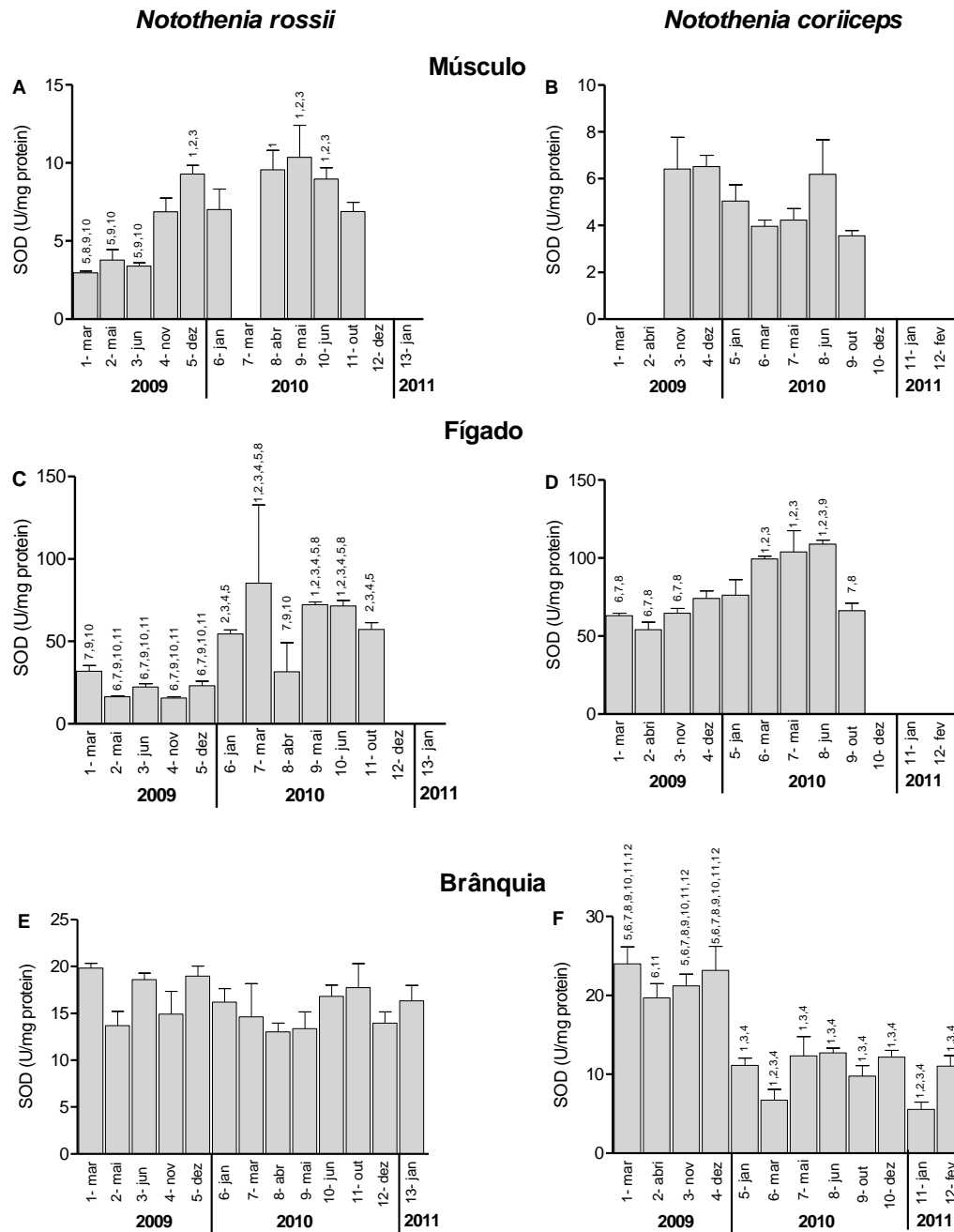


Figura 2: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de SOD no músculo (A), fígado (D) e brânquia (E) de *Notothenia rossii* e no músculo (B), fígado (D) e brânquia (F) de *Notothenia coriiceps*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam que há diferenças significativas entre os meses amostrados ($P \leq 0,05$) e * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$).

3.2.2 Catalase (CAT)

Os valores de CAT em coração de *N. rossii* não apresentaram diferenças significativas entre os meses e os anos analisados (Figura 3C). O fígado exibiu maiores valores de CAT em janeiro de 2010 em relação a todos os outros meses amostrados (Figura 4C) e no rim de *N. rossii* os valores de CAT apresentaram pico em maio de 2010 (Figura 3E). No encéfalo, os valores de CAT em maio, junho, outubro e dezembro de 2010 foram maiores em relação a maioria dos outros meses amostrados, exibindo uma variação mensal em relação aos meses do início deste ano (Figura 3A). Nas brânquias, os maiores valores para CAT foram outubro de 2010 e janeiro de 2011 e no músculo dezembro de 2009 e junho de 2010 (Figuras 4E e 4A).

Em *N. coriiceps*, a CAT no fígado exibiu um pico em março de 2009 (Figura 4D). No coração os valores de CAT foram maiores em dezembro de 2009 em relação aos outros meses analisados (Figura 3D). Nas brânquias de *N. coriiceps* pode-se observar variação mensal da CAT em 2009 onde esses valores foram maiores em dezembro em relação aos outros meses e em 2010 sendo observado um pico em janeiro (Figura 4F) e em 2011, fevereiro foi o mês onde os valores de CAT foram maiores em relação aos outros meses amostrados neste ano (Figura 4F). No encéfalo, não foi observado variação entre os meses e os anos amostrados com exceção de dezembro de 2009 que exibiu valores menores em relação aos outros meses (Figura 3B). No rim de *N. coriiceps*, os valores de CAT em dezembro de 2009 e janeiro de 2010 foram significativamente maiores que novembro de 2009 e junho e outubro de 2010 (Figura 3F).

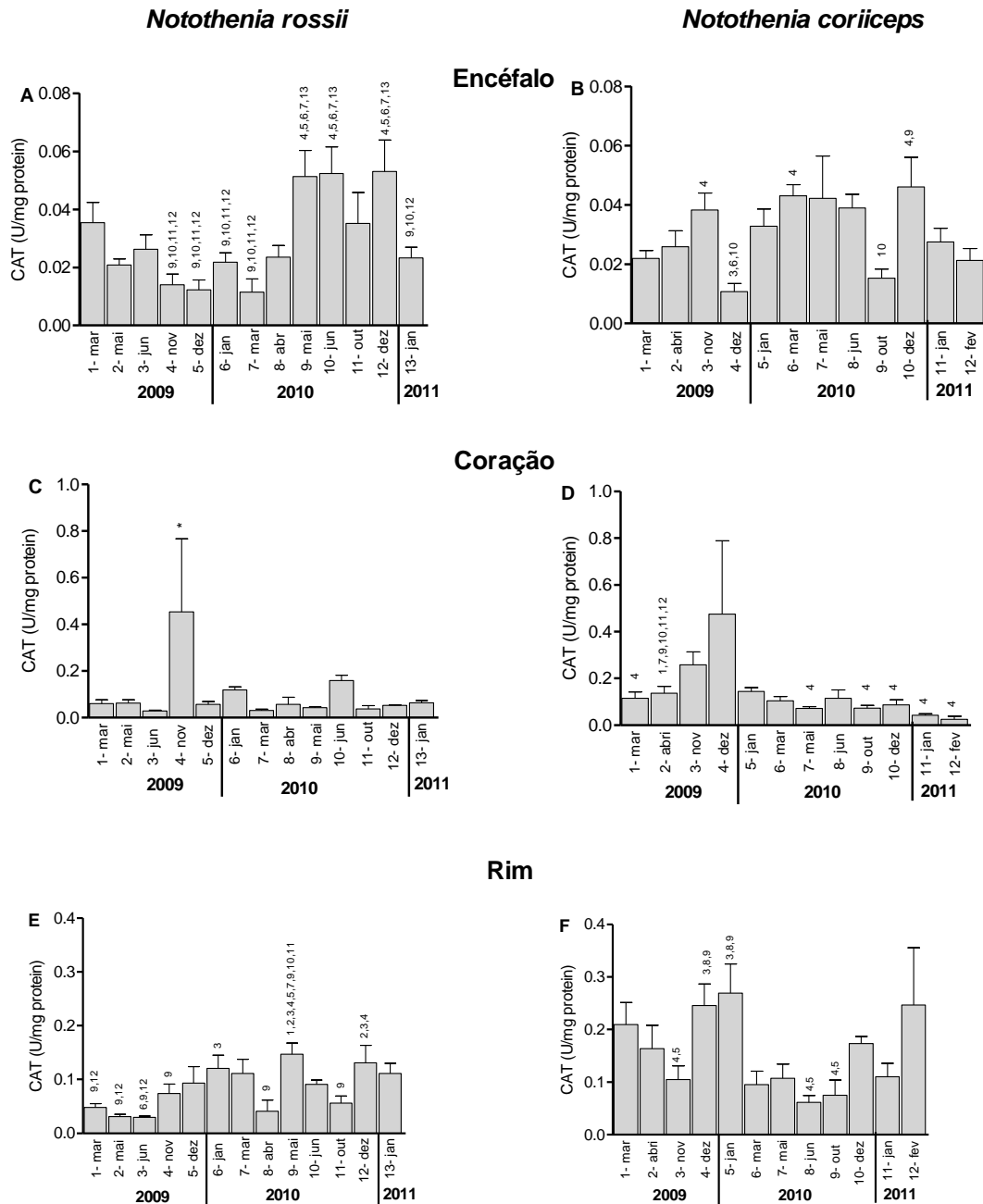


Figura 3: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de CAT no encéfalo (A), coração (C) e rim (E) de *Notothenia rossii* e no encéfalo (B), coração (D) e rim (F) de *Notothenia coriiceps*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam que há diferenças significativas entre os meses amostrados ($P \leq 0,05$) e * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$).

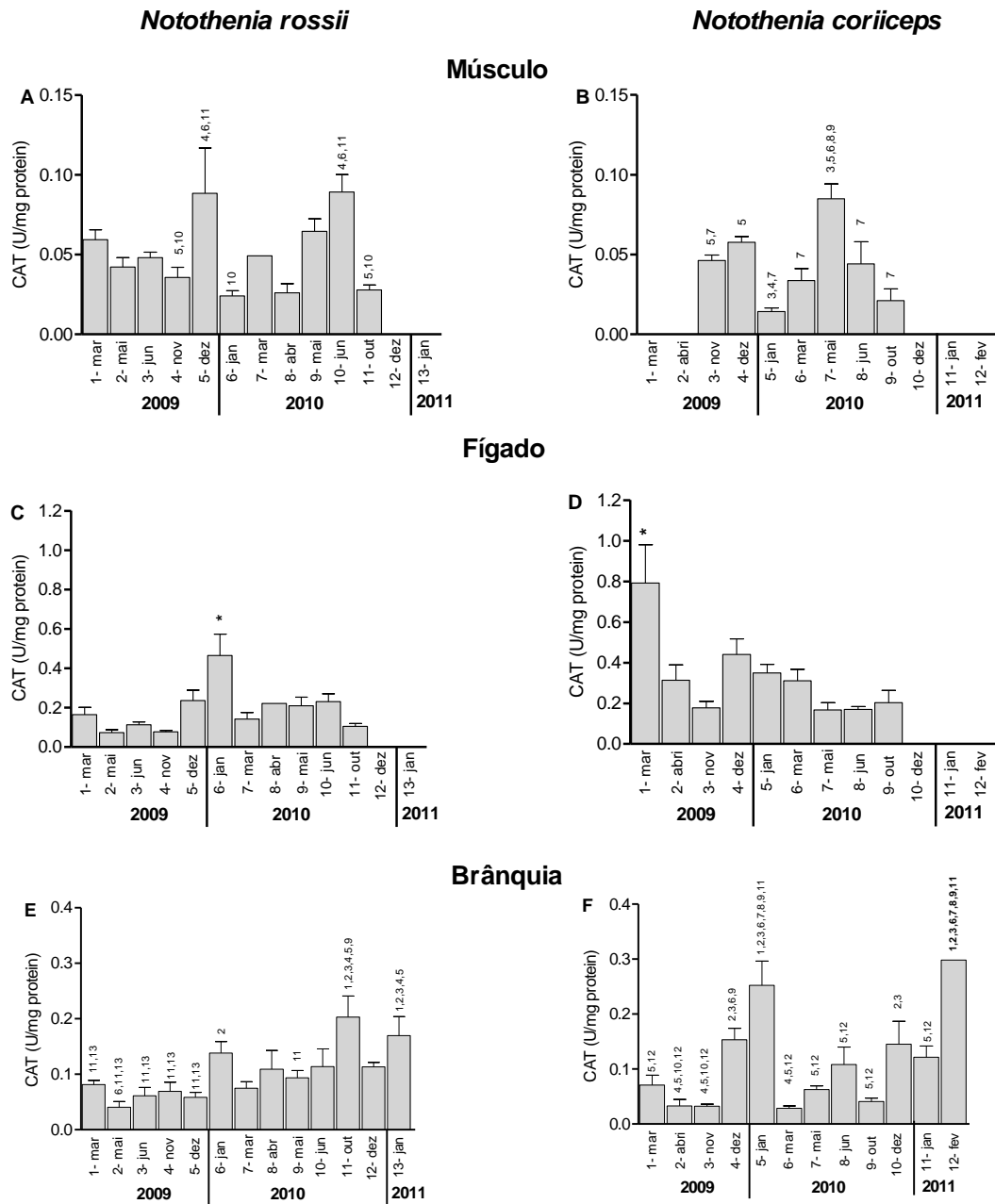


Figura 4: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de CAT no músculo (A), fígado (D) e brânquia (E) de *Notothenia rossii* e no músculo (B), fígado (D) e brânquia (F) de *Notothenia coriiceps*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam que há diferenças significativas entre os meses amostrados ($P \leq 0,05$) e * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$).

3.2.2 *Glutathione-S-transferase (GST)*

Em *N. rossii*, os valores de GST no encéfalo, músculo e rim não apresentaram diferenças significativas entre os meses e os anos analisados, com exceção do rim de 2011 que exibiu um pico em janeiro (Figuras 5A, 6A e 5E). No fígado houve variação mensal em 2009 onde em dezembro foram encontrados os maiores valores de GST (Figura 6C). No coração de *N. rossii* a GST apresentou os maiores valores em dezembro de 2009, janeiro de 2010 e de 2011 (Figura 5C). Nas brânquias, os maiores valores para a GST foram observados em novembro de 2009 e janeiro de 2011 (Figura 6E).

Em *N. coriiceps*, os valores de GST em rim apresentaram diferenças significativas entre os anos amostrados e os menores valores foram observados em 2009 com exceção de junho e outubro de 2010 (Figura 5F). No fígado, menores valores de GST foram encontrados em março de 2009 e março e maio de 2010 (Figura 6C). No encéfalo, os valores de GST exibiram um pico em março de 2010 (Figura 5B). Não foram encontradas diferenças significativas nos valores da GST em coração com exceção de janeiro de 2010 e 2011 que exibiram valores maiores que abril de 2009 e outubro de 2010 (Figura 5D). Em músculo de *N. coriiceps* a GST foi significativamente maior em outubro de 2010 em relação a novembro e dezembro de 2009 (Figura 6B).

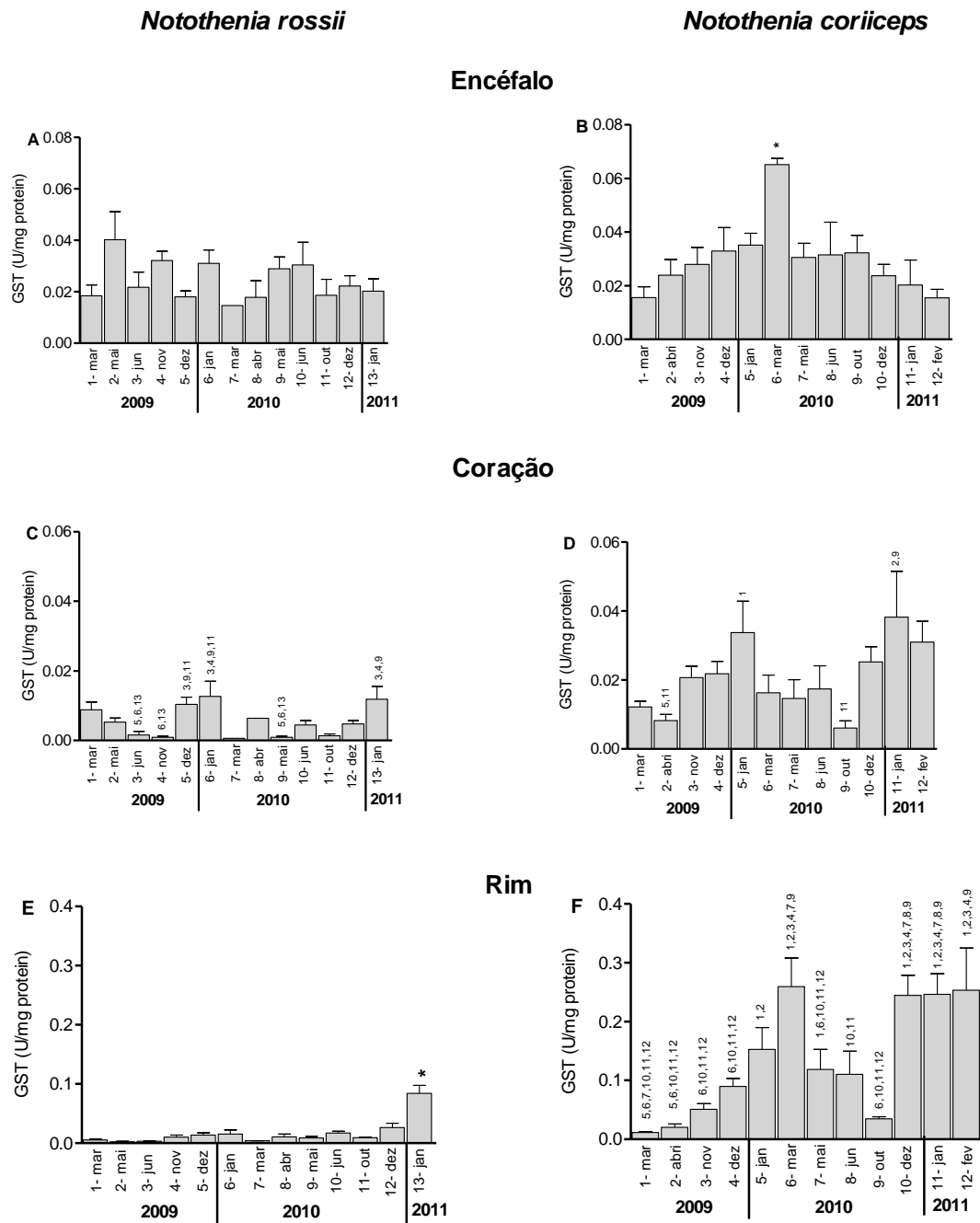


Figura 5: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de GST no encéfalo (A), coração (C) e rim (E) de *Notothenia rossii* e no encéfalo (B), coração (D) e rim (F) de *Notothenia coriiceps*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam que há diferenças significativas entre os meses amostrados ($P \leq 0,05$) e * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$).

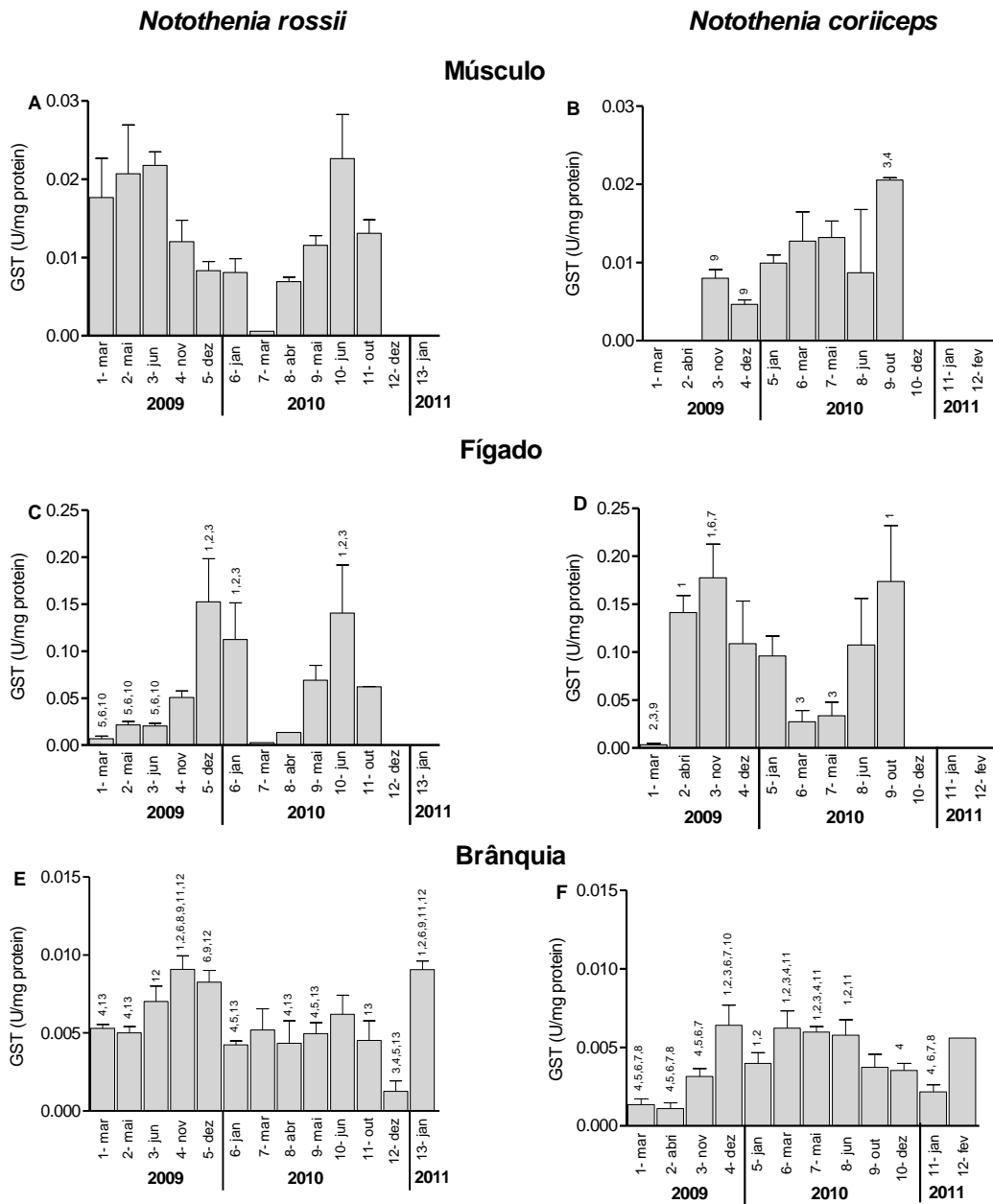


Figura 6: Variação mensal da atividade (U/mg proteína) de GST no músculo (A), fígado (D) e brânquia (E) de *Notothenia rossii* e no músculo (B), fígado (D) e brânquia (F) de *Notothenia coriiceps*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam que há diferenças significativas entre os meses amostrados ($P \leq 0,05$) e * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$).

3.3 Índice de peroxidação lipídica (LPO)

Em *N. rossii*, os níveis de MDA não variaram no fígado entre os meses e anos amostrados (Figuras 8C). No encéfalo, músculo e brânquias também não houve grandes variações nos níveis de MDA, mas, o encéfalo exibiu pico em maio de 2009 e o músculo em maio de 2010 (Figuras 7A, 8A e 8E). Foi possível observar variação anual nos níveis de MDA no coração de *N. rossii* que foram maiores em 2009 em relação aos outros anos amostrados (Figura 7C). No rim de *N. rossii* os níveis de MDA foram mais altos em dezembro de 2010 e janeiro de 2011 (Figura 7E).

Em *N. coriiceps*, os níveis de MDA no encéfalo, fígado e rim não apresentaram diferenças significativas entre os meses e os anos analisados, com exceção do encéfalo que exibiu um pico em junho de 2011 (Figuras 7B, 8D e 7F). Nas brânquias houve variação mensal em 2010 onde em outubro e dezembro foram encontrados os maiores níveis de MDA (Figura 8F). No coração de *N. coriiceps* os níveis de MDA foram maiores em novembro e dezembro de 2009 e janeiro de 2010 (Figura 7D) e no músculo em março e maio de 2010 (Figura 8B).

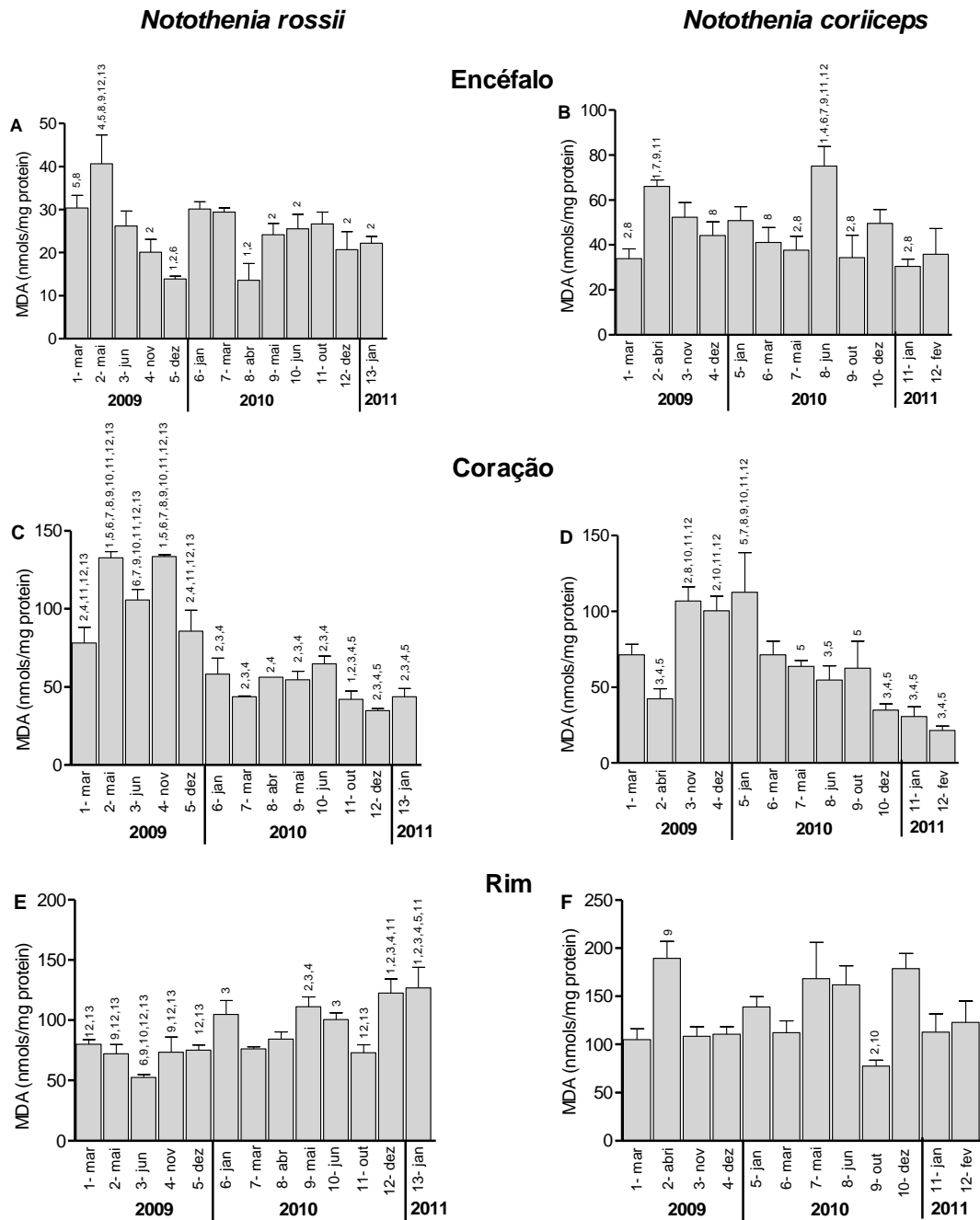


Figura 7: Variação mensal dos níveis de LPO (concentração de MDA em nmols/mg proteína) no encéfalo (A), coração (C) e rim (E) de *Notothenia rossii* e no encéfalo (B), coração (D) e rim (F) de *Notothenia coriiceps*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam que há diferenças significativas entre os meses amostrados ($P \leq 0,05$) e * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$).

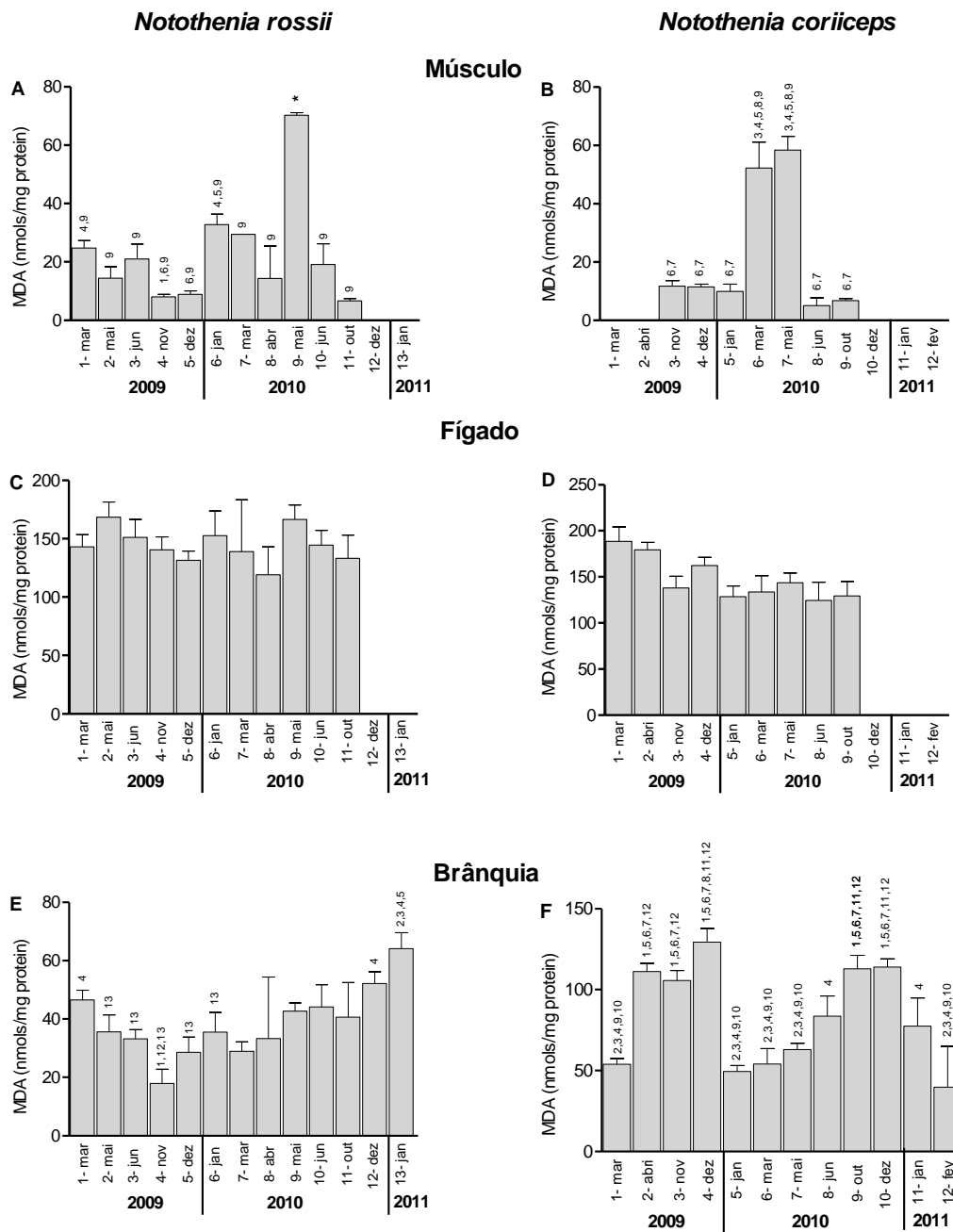


Figura 8: Variação mensal dos níveis de LPO (concentração de MDA em nmols/mg proteína) no músculo (A), fígado (D) e brânquia (E) de *Notothenia rossii* e no músculo (B) e fígado (D) e brânquia (F) de *Notothenia coriiceps*. Os dados são expressos como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam que há diferenças significativas entre os meses amostrados ($P \leq 0,05$) e * indica diferença significativa ($P \leq 0,05$).

4 DISCUSSÃO

O Brasil juntamente com outros países, em 1996, propôs um plano de gerenciamento para designar a Baía do Almirantado e seus arredores como uma Área Antártica Especialmente Gerenciada (ASMA#1) durante a XX Reunião do Comitê das Partes Consultivas do Tratado Antártico (ATCM, 2005) e em 2007 durante a XXX reunião do mesmo comitê (ATCM, 2007), determinou-se a realização de programas de monitoramento científicos a longo prazo nos componentes biológicos da ASMA#1. Dessa forma, o crescente interesse científico em obter dados para a elaboração do plano de gerenciamento da Baía do Almirantado motivou o desenvolvimento deste trabalho que teve o objetivo de avaliar as variações naturais e temporais na eficiência antioxidante em diferentes órgãos de duas espécies de peixes antárticos, *N. rossii* e *N. coriiceps*, uma vez que são escassas as informações sobre a influência sazonal ou a variação ao longo do ano dos parâmetros antioxidantes em peixes Antárticos.

Neste trabalho, a ausência de coletas e conseqüentemente de informações em alguns meses do ano impossibilitou as análises sazonais, mas permitiu a identificação de variações entre os meses e anos amostrados. Limitações climáticas e congelamento da superfície marinha (*ice Pack*) impossibilitaram e/ou dificultaram as saídas de campo.

Variações anuais na eficiência de antioxidantes foram observadas em *N. coriiceps* nos níveis de SOD em encéfalo e brânquias e de MDA no coração e em *N. rossii* nos níveis de SOD no fígado e de MDA no coração. Em ambas as espécies, maiores valores, com exceção de SOD no fígado de *N. rossii*, foram observados em 2009. A variação nos níveis de MDA no coração *N. coriiceps* ficou restrita aos meses de verão que em 2009/2010 foram significativamente maiores quando comparados com 2010/2011. Níveis de SOD e de MDA mais elevados são indicativos de estresse que, no caso de MDA, indicam maiores danos oxidativos nos lipídios das células no referido órgão (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999, STADTMAN e LEVINE, 2000). Já, a SOD é uma importante enzima antioxidante de primeira ação que atua neutralizando o superóxido de oxigênio, uma ROS, causadora de danos celulares (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999, HERMES-LIMA, 2004). Estudos

demonstraram que temperaturas baixas são fatores que proporcionam a formação de ROS favorecendo o estresse térmico (ABELE e PUNTARULO, 2004, WEBER e BOSWORTH, 2005, LESSER, 2006). A dinâmica irregular da temperatura e do congelamento do mar na Baía do Almirantado, pode estar influenciando esta variação. Segundo Kruszewski, (1999) a Baía do Almirantado congela em períodos irregulares e a persistência do gelo também varia de um ano para outro. Dados meteorológicos indicam que a temperatura média do ar em 2009 foi mais baixa em relação a 2010 (CPTEC, 2014) e houve congelamento do mar em 2009 (observação pessoal).

Variações mensais ao longo do ano também foram detectadas nesse estudo e podem estar ligadas as variações sazonais de luminosidade, temperatura, derretimento do gelo do mar e disponibilidade de alimento. Isso pode ser observado nas brânquias de *N. coriiceps* em que os valores de CAT e GST foram significativamente maiores nos meses relativos ao verão de 2009 em relação aos outros meses. Padrões similares a este foram também encontrados para SOD no encéfalo e músculo e GST em fígado de *N. rossii*. O início do verão austral é caracterizado por variações acentuadas em fatores biológicos e ambientais que são conhecidas por modular o metabolismo de oxidantes nos organismos marinhos, como a liberação maciça de nutrientes inorgânicos, o desenvolvimento de algas e a fotoativação de matéria orgânica dissolvida (GÜNTHER *et al.*, 1999; GUGLIELMO *et al.*, 2000, YOCIS *et al.*, 2000, QIAN *et al.*, 2001, ABELE e PUNTARULO, 2004, REGOLI *et al.*, 2005, BENEDETTI *et al.*, 2010). Regoli *et al.* (2005) mostraram que estes fatores pró-oxidantes, característicos do verão austral, aumentaram a eficiência de antioxidantes em embriões de *Pleuragramma antarcticum*. No entanto, Benedetti *et al.* (2010) não encontraram variações em antioxidantes de *Trematomus bernacchii* coletados entre os meses de novembro de 2002 a janeiro de 2003 no mar de Ross. A divergência nos resultados de Benedetti *et al.* (2010) e os do presente estudo, apesar da espécie ser diferente, pode estar ligada, dentre outros fatores, a quantidade de meses amostrados, que no primeiro se restringiu a 3 meses relativos ao final de primavera e início do verão, e o local de coleta, isto é o Mar de Ross, que se localiza numa região de latitude mais alta.

Os órgãos e marcadores utilizados neste estudo exibiram respostas distintas para as duas espécies estudadas como, por exemplo, a SOD em coração (Figs. 1C e 1D) e em brânquias (Figs. 2E e 2F) e a GST em rim (Figs. 5E e 5F). Também

foram encontradas variações nos níveis dos marcadores para as duas espécies em órgãos específicos como em GST no rim (Figs 5E e 5F) e CAT em coração, rim e fígado (Figs 3C, 3D, 3E, 3F, 4C e 4D). Benedetti *et al.* (2010) observaram diferenças nos níveis de antioxidantes entre três notothenioides antárticos, *Trematomus bernacchii*, *Trematomus hansonii* e *Trematomus newnesi*, encontrando níveis mais elevados de CAT em fígado de *T. hansonii* e *T. newnesi* em comparação com *T. bernacchii*, porém, este último, com níveis mais elevados de glutathione reduzida (GSH) e de glutathione-redutase (GR) em relação as outras espécies. Benedetti *et al.* (2010) sugeriram que estas diferenças podem estar relacionadas a dieta dos peixes que em *T. bernacchii* é composta quase exclusivamente de *Adamussium colbecki*, que contém níveis elevados de glutathione, carotenóides e vitamina E (REGOLI *et al.*, 1997, VIARENGO *et al.*, 1998), enquanto que as outras duas espécies possuem dieta mais variada. Raga *et al.* (2014) estudaram os hábitos alimentares de *N. rossii* e *N. coriiceps* encontrados na Baía do Almirantado e identificaram diferenças na dieta entre as duas espécies. *N. rossii* tem preferência por Krill e alta ingestão de salpas enquanto *N. coriiceps* consome maior variedade de crustáceos e menor ingestão de salpas. Raga *et al.* (2014) associaram a dieta diferenciada dos dois notothenioides aos estágios de vida e habitats das espécies. A composição da dieta, estágios de vida, ciclo reprodutivo e maturação gonadal são fatores que podem influenciar o metabolismo dos organismos, incluindo o metabolismo oxidativo (LEAF e NEUBERGER, 1947, REGOLI *et al.*, 1997, 2002, BENEDETTI *et al.*, 2010).

A grande variabilidade nos parâmetros oxidativos nos diferentes órgãos e meses de ambas as espécies mostraram que estes organismos são capazes de modular seu sistema antioxidante frente aos fatores de estresse naturais do meio em que vivem. Marcadores como a SOD nas brânquias e de MDA no coração, de ambas as espécies, mostraram ser uma opção na avaliação de parâmetros antioxidantes relacionados a dinâmica da temperatura e congelamento do mar. CAT e GST em brânquias e SOD no encéfalo e músculo, em ambas as espécies, mostraram ser eficientes na detecção de efeitos sazonais no sistema antioxidantes de peixes antárticos, apesar de não termos todos os meses de coleta durante o período amostrado.

Este estudo forneceu uma contribuição adicional sobre o sistema antioxidante de *N. rossii* e *N. coriiceps* cujas alterações nas respostas bioquímicas podem

representar uma ferramenta útil para o biomonitoramento do ambiente antártico. Porém, outros estudos devem ser feitos visando elucidar o efeito dos fatores abióticos sazonais no sistema antioxidante de peixes antárticos.

V. CONCLUSÃO

Levando-se em consideração os estudos que indicam uma tendência de aquecimento da Antártica, em especial da Península Antártica e a necessidade de ajustes metabólicos dos organismos antárticos frente a estas oscilações de temperatura é de grande importância entendermos os mecanismos celulares pelos quais os organismos antárticos se defendem contra o estresse oxidativo imposto pela elevação da temperatura. Podemos concluir neste trabalho, que o aquecimento a 8°C induziu respostas nos níveis e perfis ao longo do tempo, da atividade das enzimas antioxidantes e de defesas antioxidantes, nos nototheniids *N. rossii* e *N. coriiceps*. No entanto, a temperatura de 8°C não modulou os níveis de HSP70 nas duas espécies, mostrando que essas espécies parecem ter perdido a resposta de choque térmico clássica como em outras espécies de peixes antárticos estudados anteriormente. Porém, há a necessidade de estudos posteriores, com tempos superiores aos utilizados aqui para a melhor avaliação desta resposta. A grande variabilidade nos parâmetros oxidativos nos diferentes órgãos e meses de ambas as espécies mostraram que estes organismos são capazes de modular seu sistema antioxidante frente aos fatores de estresse naturais do meio em que vivem. Marcadores como a SOD nas brânquias e de MDA no coração, de ambas as espécies, mostraram ser uma opção na avaliação de parâmetros antioxidantes. Porém, maiores estudos devem ser feitos visando elucidar o efeito da temperatura e dos fatores abióticos sazonais no sistema antioxidante de peixes antárticos.

VI. 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 Part B**. 120B, p.425–435, 1998.
- 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**, v.138, p.405–415, 2004.
- ABELE, D.; TESCH, C.; WENCKE, P.; PÖRTNER, H. O. How do oxidative stress parameters relate to thermal tolerance in the Antarctic bivalve *Yoldia eightsi*? **Antarctic Science**. v.13, p.111–118, 2001.
- ABELE-OESCHGER, D.; OESCHGER, R.; THEEDE, H. Biochemical adaptations of *Nereis diversicolor* (Polychaeta) to temporarily increased hydrogen peroxide levels in intertidal sandflats. **Marine Ecology Progress Series**., v.106, p.101–110, 1994.
- AEBI, H. Catalase *in Vitro*. **Methods Enzymology**., v.105, p.121-126, 1984.
- 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.
- BAGNYUKOVA, T. V.; CHAHRAK, O. I.; LUSHCHAK, V. I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**., v.78, p.325–331, 2006.
- BAGNYUKOVA, T. V.; 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 1C. **Journal of Thermal Biology**, v.32, p.227–234, 2007.
- BARGAGLI, R. **Antarctic Ecosystems: Environmental Contamination, Climate Change, and Human Impact**. Springer, Berlin, 2005.
- BEERS, J. M.; SIDELL, B. D. Thermal Tolerance of Antarctic Notothenioid Fishes Correlates with Level of Circulating Hemoglobin. **Physiological and Biochemical Zoology**, v.84, n.4, p.353-362, 2011.
- BELLISIO, N.; TOMO, A. **Biogeografía de la península antártica, archipiélagos y mares adyacentes**. Instituto Antártico Argentino, Buenos Aires, p.222, 1974.
- BENEDETTI, M.; MARTUCCIO, G.; FATTORINI, D.; CANAPA, A.; BARUCCA, M.; NIGRO, M.; REGOLI, F. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*, **Aquatic Toxicology**, v.85, n.3, p.167–175, 2007.

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

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

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

BOCCHETTI, R.; VIRNO LAMBERTI, C.; PISANELLI, B.; RAZZETTI, E.M.; MAGGI, C.; CATALANO, B.; SESTA, G.; MARTUCCIO, G.; GABELLINI, M.; REGOLI, F. Seasonal variations of exposure biomarkers, oxidative stress responses and cell damage in the clams, *Tapes philippinarum*, and mussels, *Mytilus galloprovincialis*, from Adriatic Sea. **Mar. Environ. Res.**, 66, 24–26, 2008.

BOSCH, T.C.G., KRYLOW, S.M., BODE, H.R., STEELE, R.E. Thermotolerance and synthesis of heat-shock proteins — these responses are present in *hydra attenuata* but absent in *hydra oligactis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 85, 7927–7931, 1988.

BOTTINO, N. R.; JEFFREY, L. M.; REISER, R. The lipids of Antarctic fish. **Antarctic Journal of the United States**, v.2, p.194-195, 1967.

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

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.

BROMBERG, S. **Distribuição dos anelídeos poliquetas na zona costeira rasa da Enseada Martel, Baía do Almirantado (Ilha Rei George – Antártica)**. Dissertação de MSc., Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo. 1999.

BUCKLEY, B. A.; PLACE, S. P.; HOFMANN, G. E. Regulation of heat shock genes in isolated hepatocytes from an Antarctic fish, *Trematomus bernacchii*. **J. Fish. Biol.** v.207, p.3649–3656, 2004.

BURCHETT, M. S. Food, feeding and behaviour of *Notothenia rossi* nearshore at South Georgia. **Br. Antarct. Surv. Bull.**, n.61, p.45-51, 1983.

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

CARNEVALI, O.; MARADONNA, F. Exposure to xenobiotic compounds: looking for new biomarkers. **Gen. Comp. Endocrinol.** 131: 203-209, 2003.

CARPENTER, C. M.; HOFMANN, G. E. Expression of 70 kDa heat shock proteins in Antarctic and New Zealand notothenioid fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.125, p.229–238, 2000.

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

Centro de Previsão do tempo e estudos climáticos – CPTEC:
<http://www.cptec.inpe.br/antartica> - acesso em 14/07/2014.

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

CLARKE, A., JOHNSTON, I. A. Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. **Trends Ecol. Evol.** 11, 212-218, 1996.

CLARKE, A. Seasonality in the antarctic marine environment. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 3, 461-473, 1988.

CLARK, M. S., FRASER K. P. P., BURNS G., PECK, L. S. The HSP70 heat shock response in the Antarctic Wsh *Harpagifer antarcticu*. **Polar Biol**, v.31, p.171–180, 2008.

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

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

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

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

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A.G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. **Natureza on line**, v.7, n.1, 37-42, 2009.

CONVEY P. Antarctic ecosystems. In LEVIN, S. A. ed. **Encyclopedia of biodiversity**. 2nd ed. Elsevier, 12 pp. 2007.

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.

CROSSLEY, L. Explore Antarctica. **Cambridge University Press**, London, 1995.

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

CURRIE, S.; MOYES, C. D.; TUFTS, B. L. The effects of heat shock and acclimation temperature on Hsp70 and Hsp30 mRNA expression in trout: in vivo and in vitro comparisons. **J Fish Biol**, v.56, p.398–408, 2000.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidativestress. **Clinica Chimica Acta**, v.329, p.23–38, 2003.

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

DEANE, E. E.; KELLY, S. P.; LUK, J. C. Y.; WOO, N. Y. S. 2002. Chronic salinity adaptation modulates hepatic heat shock protein and insulinlike growth factor I expression in black sea bream. **Mar Biotechnol**, v.4, p.193–205, 2002.

DEANE, E.E.; WOO, N.Y. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287: R1054-R1063, 2004.

DEANE, E.E.; WOO, N.Y.S. Advances and perspectives on the regulation and expression of piscine heat shock proteins. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 21,153–185, 2011.

DEVRIES, A. L.; STEFFENSEN, J. F. The Arctic and Antarctic polar marine environments. In: FARRELL, A.; STEFFENSEN, J.F. (eds) **Fish physiology**, v.22, Academic Press, New York, p 1–24, 2005.

DI PRISCO, G.; EASTMAN, J. T.; GIORDANO, D.; PARISI, E.; VERDE, C. Biogeography and adaptation of Notothenioid fish: hemoglobin function and globin-gene evolution. **Gene**, v. 398, n.1-2, 143-55, 2007.

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

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

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

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

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

EICHER, D. L. **O tempo geológico**. Ed. Edgar Blücher, São Paulo, 1982.

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

EVERSON, I. The population dynamics and energy budget of *Notothenia neglecta* Nybelin at Signy Island, South Orkney Islands. **Br. Antarct. Surv. Bull.**, Cambridge, v. 23, p.25-50, 1970.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat shock proteins, molecular chaperones and their stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 61, p.243–282, 1999.

FELICIO, R. A. Antártida, A geografia do continente gelado e as operações brasileiras. **Anais do I Encontro de Ensino de Geografia das escolas públicas de São Paulo**. 2006.

FINK, A. L. Chaperone-mediated protein folding. **Physiol. Rev.**, v.79, p. 425–449, 1999.

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

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

GHOSH, R.; LOKMAN, P. M.; LAMARE, M. D.; METCALF, V. J.; BURRITT, D. J.; DAVISON, W.; HAGEMAN, K. J. Changes in physiological responses of an Antarctic fish, the emerald rock cod (*Trematomus bernacchii*), following exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). **Aquatic Toxicology** v.128–129, p.91–100, 2013.

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, n.3, 371-8, 2000.

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

GORDON, A. L.; NOWLIN, W. D. J. The basin waters of the Bransfield Strait. **J Phys Oceanogr** v.8: p.258–264, 1978.

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

HAGERMAN, H. M. A. Oxidative Stress. **Exercise and Aging**, p.1-184, 2006.
HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, third ed. Clarendon Press, Oxford. 1999.

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

HARDING, M. M; ANDERBERG, P. I.; HAYMET, A. D. J. “Antifreeze” glycoproteins from polar fish. **European Journal of Biochemistry**, v.270, n.7, p.1381-92, 2003.

HARTL, F. U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, v. 381, p.571–580, 1996.

HEISE, K.; PUNTARULO, S.; NIKINMAA, M.; ABELE, D.; PÖRTNER, H. O. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. **J. Exp. Biol.**, v.209, p.353-363, 2006.

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

HEREDIA-MIDDLETON, P.; BRUNELLI, J.; DREW, R. E., THORGAARD, G. H. Heat shock protein (HSP70) RNA expression differs among rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) clonal lines. **Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.**, v.149, p.552–556, 2008.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: STOREY, K.B., editor. **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. John Wiley & Sons; New Jersey. p. 319–368, 2004.

HOFMANN, G. E.; BUCKLEY, B. A.; AIRAKSINEN, S.; KEEN, J. E.; SOMERO, G. N. Heat-shock protein expression is absent in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii* family Nototheniidae. **J. Exp. Biol.** v. 203, p.2331–2339, 2000.

HOFMANN, G. E; LUND, S. G; PLACE, S. P; WHITMER, A. C. Some like it hot, some like it cold: the heat shock response is found in New Zealand but not Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** v.316, p.79–89, 2005.

HOLETON, G. F. Oxygen uptake and circulation by a hemoglobinless antarctic fish (*Chaenocephalus aceratus*) Lonnberg compared with three red-blooded antarctic fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v.34, p.457-471, 1970.

JAYASUNDARA, N.; HEALY, T. M.; SOMERO, G. N. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic nototheniid *Trematomus bernacchii*. **Polar Biology**, 2013.

JIANG, S.T.; MOODY, M.W.; CHEN, H.C. Purification and characterization of proteases from digestive tract of grass shrimp (*Penaeus monodon*). **J. Food Sci.** v.56, p.322–326, 1991.

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

KAMLER, E.; KRASICKA, B.; RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Comparison of lipid content and fatty acid composition in muscle and liver of two nototheniid fishes from Admiralty Bay (Antarctica): an eco-physiological perspective. **Polar Biology**, v. 24, n.10, p.735-743, 2001.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **J. Biol. Chem.**, 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. **J. Exp. Biol.**, v.207, p.2529–38, 2004.

KEN, C. F.; LIN, C. T.; SHAW, J. F.; WU, J. L. Characterization of fish Cu/Zn-superoxide dismutase and its protection from oxidative stress. **Mar. Biotechnol.** v.5, n.2, p.167-173, 2003.

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.

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

KOCK, K. H. **Antarctic fish and fisheries; Studies in polar research.** Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK. p.359, 1992.

KRUSZEWSKI, G. Zlodzenie Zatoki Admiralicji w latach 1977–1996. **Probl Klimatol Polar**, v.9, p.173–191, 1999.

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

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

- LEAVER, M.; GEORGE, S. A piscine glutathione S-transferase which efficiently conjugates the end-products of lipid peroxidation, **Marine Environmental Research**, v.46, n.1-5, p.71-74, 1998.
- LEGGATT, R. A.; BRAUNER, C. J.; SCHULTE, P. M.; IWAMA, G. K. Effects of acclimation and incubation temperature on the glutathione antioxidant system in killifish and RTH-149 cells. **Comp. Biochem. Physiol. A** v.146, p.322–328, 2007.
- LESSER, M. P. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. **Annu. Rev. Physiol.** v.68, p.253–278, 2006.
- LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v.186, p.464-478, 1990.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.37, n.3, 2001.
- LIPSKI, M. Variations of physical conditions, nutrients and chlorophyll a contents in Admiralty Bay (King George Island, South Shetland Islands, 1979). **Pol. Polar Res.** v.8, p.307-332, 1987.
- LOWE, C. J.; DAVISON, W. Plasma osmolarity, glucose concentration and erythrocyte responses of two Antarctic nototheniid fishes to acute and chronic thermal change. **Journal of Fish Biology**, v.67, n.3, p.752-766, 2005.
- LUND, S. G.; CAISSIE, D.; CUNJAK, R. A.; VIJAYAN, M. M.; TUFTS, B. L. The effects of environmental heat stress on heat-shock mRNA and protein expression in Miramichi Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr. **Can J Fish Aquat Sci.**, v.59, p.1553–1562, 2002.
- Lushchak, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, p.13–30, 2011.
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.143, p.30–35, 2006a.
- LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.143, p.36–41, 2006b.
- MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. D. S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S'A.; 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.

MALANGA, G.; ESTEVEZ, M. S.; CALVO, J.; ABELE, D.; PUNTARULO, S. The effect of seasonality on oxidative metabolism in *Nacella* (*Patinigera*) *magellanica*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v.146, n.4, p.551–558, 2007.

MANDUZIO, H.; MONSINJON, T.; GALAP, C.; LEBOULENGER, F.; ROCHER, B. Seasonal variations in antioxidant defences in blue mussels *Mytilus edulis* collected from a polluted area: major contributions in gills of an inducible isoform of Cu/Zn-superoxide dismutase and of glutathione S-transferase. **Aquatic Toxicology** v.70, p.83–93, 2004.

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

MARSZ, A. A. From surveys of the geomorphology of the shores and bottom of the Ezcurra Inlet. **Oceanol.** v.15, p.209–220, 1983.

MARSZ, A. From surveys of the geomorphology of the shores and bottom of the Ezcurra Inlet. **Oceanol**, v.15, p.209–220, 1983.

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.

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

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

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

NONATO, E. F.; BRITO, T. A. S.; PAIVA, P. C.; PETTI, M. A. V. Programa Antártico Brasileiro: Projeto “Bionomia da Fauna Bentônica Antártica”. Atividades subaquáticas realizadas na Baía do Almirantado a partir da VI Expedição (1988). **Relatório Inter Inst Oceanogr**, Universidade de São Paulo 33 p.1–12, 1992b.

NONATO, E. F.; PETTI, M. A. V.; PAIVA, P.C.; BRITO, T. A. S. Programa Antártico Brasileiro: amostragem de organismos bentônicos realizadas nas seis primeiras expedições (1982 a 1988) com a participação do N/Oc. “Prof.W.Besnard”. **Relatório Inter Inst Oceanogr**, Universidade de São Paulo 32, p.1–12, 1992a.

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.1287–97, 2000.

PARK, H.; AHN, I-Y.; KIM, H.; CHEON, J.; KIM, M. 2008. Analysis of ESTs and expression of two peroxiredoxins in the thermally stressed Antarctic bivalve *Laternula elliptica*. **Fish & Shellfish Immunology**, v.25, p.550-559, 2008b.

PARK, H.; AHN, I-Y.; PARK, K.I.; HYUN, S. Response of antioxidant defence system to thermal stress in the Antarctic clam *Laternula elliptica*. **Antarctic Science**, v.20, n.6, p.521-526, 2008a.

PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance degradation and reactivation of damaged proteins. **Ann. Rev. Genet.**, v.27, p.437-496, 1993.

PAVLOVIĆ, S. Z.; MITIĆ, S. S. B.; RADOVANOVIĆ, T. B.; PERENDIJA, B. R.; DESPOTOVIĆ, S. G.; GAVRIĆ, J. P.; SAIČIĆ, Z. S. Seasonal Variations of the Activity of Antioxidant Defense Enzymes in the Red Mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic Sea. **Mar. Drugs**, v.8 n.3, p.413-428, 2010.

PECK, L. S. Organisms and responses to environmental change. **Marine Genomics**, v.4 p.237-243, 2011.

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

PLACE, S. P.; HOFMANN, G. E. Constitutive expression of a stress-inducible heat shock protein gene, hsp70, in phylogenetically distant Antarctic fish. **Polar Biol**, v.28, p.261-267, 2005.

PLACE, S. P.; ZIPPAY, M. L.; HOFMANN, G. E. Constitutive roles for inducible genes: evidence for the alteration in expression of the inducible hsp70 gene in Antarctic notothenioid fishes. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v.287, p.429-436, 2004.

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

PRUSZAK, Z. Currents circulation in the water of Admiralty Bay (region of Arctowski Station on King George Island). **Pol. Polar Res.** v.1, p.55-74, 1980.

QUAYALE, W. C.; CONVEY, P.; PECK, L. S.; ELLIS-EVANS, C. J.; BUTLER, H. G.; PEAT, H. G. Ecological responses of maritime Antarctic lakes to regional climate change. **Antarct. Res. Ser.**, v.76, p.335-34, 2003.

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

RAGA, G., PICHLER, H. A., ZALESKI, T., SILVA, F. B. V., MACHADO, C., RODRIGUES, E., KAWALL, H. G., RIOS, F. S., DONATTI, L. Ecological and

physiological aspects of the antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* in Admiralty Bay, Antarctic Peninsula. **Environ Biol Fish.** DOI 10.1007/s10641-014-0311-2.

RAKUZA-SUSZCZEWSKI, S.; MIETUS, M.; PIASECKI, J. Weather and climate. 1993. In RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. **The Maritime Antarctic Coast-al Ecosystem of Admiralty Bay.** Warsaw, Poland, Polish Academy of Sciences, p.19-25, 1993.

RAKUSA-SUSZCZEWSKI, S. Flow of matter in the Admiralty Bay area, King George Island, Maritime Antarctic. **Polar Biol.**, v.8: 101-113, 1995

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.

RENWICK, J. A. Southern Hemisphere Circulation and Relations with Sea Ice and Sea Surface Temperature. **Journal of Climate**, v. 15, n.21, p. 3058-3068, 2002.

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

SANDERS, B. M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. **Critical Reviews in Toxicology**, v.23, p.49–75, 1993.

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

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

SARUKHANYAN, E. J.; TOKARCZYK, R. Coarse-scale hydrological conditions in Admiralty Bay, King George Island, West Antarctica, summer 1982. **Pol. Polar Res.**, v.9, p.121-132, 1988.

SCHLESINGER, M. J. Heat shock proteins. (minireview). **J. Biol. Chem.**, v.265, p.12111–12114, 1990.

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

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. **Drug Metabolism Reviews**, v.32, n. 3-4, p.307-326, 2000.

SICIŃSKI, J. Polychaetes of Antarctic sublittoral in the pro glacial zone (King George Island, South Shetland Islands). **Pol. Polar Res.**, v.25, p.67–96, 2004.

SICIŃSKI, J.; JAŻDŻEWSKI, K.; DEBROYER, C.; PRESLER, P.; LIGOWSKI, R.; NONATO, E. F.; CORBISIER, T. N.; PETTI, M. A. V.; BRITO, T. A. S.; LAVRADO, H. P.; BŁAŻEWICZ-PASZKOWYCZ, M.; PABIS, K.; JAŻDŻEWSKA, A.; CAMPOS, L. S. Admiralty Bay Benthos diversity –A census of a complex polar ecosystem. **Deep Sea Res II** v.58, p.30–48, 2011.

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.

SIDELL, B. D.; DRIEDZIC, W. R.; STOWE, D. R.; JOHNSTON, I. A. Biochemical correlations of power development and metabolic fuel preferenda in fish hearts. **Physiol. Zool.**, v.60, p.221-232, 1987.

SIDELL, B. D.; O'BRIEN, K. M. When bad things happen to good fish: the loss of hemoglobin and myoglobin expression in Antarctic icefishes. **J Exp Biol**, v.209, p.1791-1802, 2006.

SIES, H. Oxidative stress, Introductory remarks, In: **Oxidative Stress** (H. Sies, ed.) Academic Press, London, 1985.

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

SOMERO, G. N.; DAHLHOFF, E.; LIN, J. J. Stenotherms and eurytherms: mechanisms establishing thermal optima and tolerance ranges. **Society for Experimental Biology Seminar Series**, v.59, p.53-78, 1996.

SOMERO, G. N.; DE VRIES, A. L. Temperature tolerance of some antarctic fishes. **Science**, v. 156, n.3772, p.257-258, 1967.

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

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

TOMANEK, L. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. **The Journal of Experimental Biology**, v.213, p.971-979, 2010.

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

- UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**, v.86, p.271–278, 1978.
- VAN DIJK, P. L. M.; TESCH, C.; HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O. Physiological disturbances at critically high temperatures: A comparison between stenothermal Antarctic and eurythermal temperate eelpouts (Zoarcidae). **Journal of Experimental Biology**, v.202, n.24, p.3611-3621, 1999.
- WANG, Y.; XU, J.; SHENG, L.; ZHENG, Y. Field and laboratory investigations of the thermal influence on tissue-specific Hsp70 levels in common carp (*Cyprinus carpio*). **Comp Biochem Physiol A** v.148, p.821–827, 2007.
- WEDEMEYER, G. A.; BARTON, B. A.; MCLEAY, D. J. Stress and acclimation. In: SCHRECK, C. B.; MOYLE, P. B. (eds.), **Methods for fish biology**, p. 451–489. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 1990.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v.77, p.325-333, 1981.
- WINDISCH, S. H., KATHÖVER, R., PÖRTNER, H. O.; FRICKENHAUS, S.; LUCASSEN, M. Thermal acclimation in Antarctic fish: Transcriptomic profiling of metabolic pathways. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v.301, n.R1453-R1466, 2011.
- YILMAZ, H. R.; TURKOZ, Y.; YUKSEL, E.; ORUN, Y. An Investigation of Antioxidant Enzymes Activities in Liver of *Cyprinus carpio* Taken from Different Stations in the Karakaya Dam Lake. **International Journal of Science & Technology**, v.1, n.1, p.1-6, 2006.