Priscila Verónica Sartorio

Expressão histoimunológica de proteínas relacionadas à hipóxia tecidual em juvenis de *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae) em função do aquecimento gradual de temperatura

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Gomes

São Paulo

-2013-

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Expressão histoimunológica de proteínas relacionadas à hipóxia tecidual em juvenis de *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae) em função do aquecimento gradual de temperatura

Priscila Verónica Sartorio

Dissertação apresentada ao Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de Oceanografia Biológica.

Julgada em ____/____/____

Prof. Dr. Vicente Gomes

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

Prof(a). Dr(a).

Conceito

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais, **Guillermo e Raquel Sartorio**, que mais do que pais, sempre foram meu exemplo e referência em tudo. Espelho-me em vocês sempre. Vocês são meu porto-seguro e meu maior orgulho. Amo vocês mais do que tudo no mundo! Obrigada por existirem!*

Como pode um peixe vivo, viver fora da água fria?

(Cantiga popular)

Um dia sem sorrir é um dia perdido

(Chales Chaplin)

A arte de interrogar não é tão fácil como se pensa. É mais uma arte de mestres do que de discípulos; é preciso ter aprendido muitas coisas para saber perguntar o que não se sabe.

(J. J. Rousseau)

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Oceanográfico, pelo apoio em campo, na utilização da infraestrutura da Base de Pesquisa de Ubatuba “Clarimundo de Jesus”. E na sede do IOUSP em São Paulo, utilizando os recursos do Laboratório de Ecofisiologia de animais Marinhos.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao meu querido orientador, Prof. Dr. Vicente Gomes, um excelente professor, que ama o que faz e se dedica muito para isso. Além de ensinar Ciência, ensina cultura. É uma pessoa muito especial com quem tive o prazer de trabalhar. Muito obrigada pela paciência e ensinamentos.

Ao querido Prof. Dr. Phan Van Ngan, por estar sempre disposto a ensinar, a tomar um café na Didi e passar toda sua imensa sabedoria e experiência de vida. Muito obrigada pela convivência, aprendizado, amizade, por tudo! Obrigada também por fazer os aparelhos-chave para a realização desse trabalho (carinhosamente chamado de A3P2 – Aparelho de Aquecimento de Água do Prof. Phan) e por estar sempre do nosso lado. Seremos sempre seus “phans”!

Ao Prof. Dr. Alex Machado, co-orientador e amigo. Esse trabalho foi desenvolvido no âmbito de seu projeto de Pós-Doutorado. Obrigada por dividir sua linda ideia conosco! Espero ter correspondido às suas expectativas quando você criou este projeto. Obrigada também pelas conversas, opiniões, por nos ensinar a fazer imuno, tirar fotos, e cantar durante os dias maus / pouco dormidos em Ubatuba, nos alegrando! Bom dia, Sol nascente!

À Caroline Margonato Cardoso. Margot, não tenho palavras para você! Você esteve sempre comigo, nos estudos para a prova de mestrado, nas

dificuldades e nos bons momentos durante esses anos e, por fim, na entrega desta dissertação. Passou de “colega” para uma verdadeira amiga, daquelas que devemos cultivar! Obrigada por estar sempre comigo!

Às meninas do laboratório, Caroline Vignardi, Daniela Abras, Deborah Cardim, Juliana Nucci e ao anjo do lab, Fabio Hasue (para agüentar tanta mulher falando, só sendo um anjo! Rsrs). Obrigada por tudo, pelas tantas risadas, tantas conversas e pelos muitos desabafos! Vocês fizeram esse período muito mais divertido. Vocês são muitos especiais!

Ao Renato Ferreira, Arthur Rocha e Thais Santos, pelas conversas descontraídas e sérias, tantas piadas e risadas (Renato!), pelas boas ideias e correções deste trabalho.

À Zezé (Maria José Passos), pelos ensinamentos técnicos passados. Sempre cuidadosa durante o trabalho.

Ao Augusto Marton e Barbara Emili, pela ajuda na primeira viagem de campo à Ubatuba, onde toda a metodologia estava sendo ajustada!

À Prof. Dra. June Ferraz Dias, pela atenção, conselhos e toda ajuda quando precisei.

Ao Prof. Dr. Mario Katsuragawa e Prof. Dra. June Ferraz Dias, por terem me aceitado como monitora em sua disciplina Nécton, e ao Prof. Dr. Daniel Lemos, que também me aceitou como monitora em sua disciplina de Aqüicultura. Vocês contribuíram muito para minha formação!

Às Professoras Dra(s). Paula Papa e Maria Angélica Miglino por nos permitir a utilização do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária FMVZ/USP. Obrigada pela confiança!

Ao Prof. Dr. Francisco Blazquez, também da FMVZ/USP, por permitir a utilização dos microscópios para a obtenção das imagens deste trabalho.

Aos colegas da FMVZ/USP Ronaldo Agostinho e Diogo Palermo, sempre tão atenciosos e pacientes. Obrigada por cederem tempo e boa vontade para nos ensinar e nos acompanhar.

À queridíssima veterinária, Fernanda Cardoso, sempre bem humorada, dedicada e disposta a ajudar! Obrigada pelas conversas, risadas e protocolos! Rs. Ao também veterinário André Conrado, sempre paciente e cuidadoso!

Aos funcionários da base de Ubatuba, Ricardo, Fernando, Ayrton, Daico, Osiel, Mi, Lincoln, Roberto, Manoel, Marquinho, Marcio, Adriano, Celso, D. Cida, Vania, Bete, Orlando, Caio, Cida, Sula, Gleice, Sandra, Jamisson, Cristiano, Zé Maria, Renato. Obrigado por tudo!

Às secretárias da pós-graduação, Ana Paula Evangelista, Silvana Lima e Letícia Furusawa, que são sempre muito atenciosas e pacientes. Sempre nos tratam com um sorriso e bem humoradas. Obrigada por toda a ajuda e carinho recebido!

Ao Valter, que sempre me salvou com todos os problemas no computador! E também com as conversas durante as “arrumações” nele!

A Didi, Bertão e meninas, por sempre adoçarem nossos dias com tanta coisa gostosa!

Ao meu pai, Guillermo Sartorio, que sempre esteve do meu lado, me apoiando em todas as minhas decisões. Que sempre foi forte e íntegro. Meu exemplo e ídolo em tudo. Sei que você está do meu lado sempre, mesmo que não fisicamente. Te amo muito e sinto muito sua falta.

À minha mãe, Raquel Sartorio, guerreira, companheira e a pessoa mais forte que conheço. Sempre comigo, me dando “colo” quando precisava. Te amo muito, mãe! Você é a melhor do mundo!

À Débora Sartorio, minha querida e doce irmã e também melhor amiga. Obrigada pelo companheirismo sempre, e por existir! Com certeza eu tenho a maior sorte do mundo em ser sua irmã.

Ao Diego, Leandra e Guilherme Sartorio, que também sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e enchendo de carinho e alegria! Obrigada por existirem!

Ao amado Eudriano Costa, por toda alegria e companheirismo durante essa jornada. Sempre presente quando precisei e também em todos os outros momentos, rs. Obrigada por tudo!

Obrigada a todos que contribuíram para a conclusão dessa etapa tão importante e desejada em minha vida!

“E que se torne realidade o que hoje é apenas um sonho.”...

SUMÁRIO

ÍNDICE DE ABREVIACÕES	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABELAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
I.INTRODUÇÃO.....	2
II. HIPÓTESE	11
III. OBJETIVO	13
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	15
IV.1. Captura e manutenção	15
IV.2. Procedimentos experimentais.....	17
IV.3. Análise comportamental	22
IV.4. Análise tecidual.....	24
IV.4.1. Preparação dos blocos para microscopia de luz.....	24
IV.4.2. Coloração histológica	25
IV.4.3. Imuno-histoquímica (HIF-1 α e VEGF).....	26
IV.4.3.1. Contagem das células positivas.....	30
IV.4.3.2. Relação da expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF ...	32
IV.4.3.3. Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)	32
IV.4.3.4. Densidade e área mitocondrial.....	34
V. RESULTADOS	37
V.1. Testes de aquecimento	37
V.2. Parâmetros físico-químicos	39
V.3. Análise dos organismos utilizados	40
V.3.1. Comprimento total dos animais.....	40
V.3.2. Análise de óbitos - Experimento TCS	41
V.4. Análise comportamental	43
V.5. Análise tecidual.....	47
V.5.1. Coloração histológica	47
V.5.2. Imuno-histoquímica.....	53
V.5.2.1.Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1 α).....	54

V.5.2.2. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)	59
V.5.2.3. Expressão de HIF-1 α e VEGF em <i>Ratus norvegicus</i>	64
V.5.3. Análise quantitativa da IHQ (HScore)	65
V.5.3.1. HScore do grupo CA	65
V.5.3.2. HScore dos grupos Experimentais	67
V.5.3.3. HScore do grupo TCS	75
V.5.4. Relação entre a expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF	76
V.5.4.1. Fígado	77
V.5.4.2. Músculo	79
V.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	81
V.6.1. Identificação de mitocôndrias	81
V.6.2. Densidade Mitocondrial	88
V.6.3. Área Mitocondrial	89
VI. DISCUSSÃO	92
VII. CONCLUSÕES	111
VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	115

ÍNDICE DE ABREVIações

CA	=	Grupo controle ambiental, coletado no momento de coleta, na praia.
22°C	=	Grupos controle experimental, mantidos as 22°C
26°C	=	Grupo experimental aquecido de 22°C até 26°C e mantido nessa temperatura por 2 horas
30°C	=	Grupo experimental aquecido de 22°C até 30°C e mantido nessa temperatura por 2 horas
32°C	=	Grupo experimental aquecido de 22°C até 32°C e mantido nessa temperatura por 2 horas
34°C	=	Grupo experimental aquecido de 22°C até 34°C e mantido nessa temperatura por 2 horas
36°C	=	Grupo experimental aquecido de 22°C até 36°C e mantido nessa temperatura por 2 horas
TCS	=	Grupo experimental aquecido do 22°C até os peixes apresentarem parada do movimento opercular por mais de 1 minuto e perda de resposta ao estímulo tátil
Ac	=	Anticorpo
Ag	=	Antígeno
CB	=	Canalículo biliar
DAB	=	3,3'-diaminobenzidine
ED	=	Espaço de Disse
Fi	=	Fígado
HE	=	Hematoxilina- Eosina
HIF-1 α	=	Fator induzido por hipóxia
IHQ	=	Imuno-histoquímica
m	=	Mitocôndria

MET	=	Microscopia eletrônica de transmissão
Mus	=	Músculo
N	=	Núcleo
pmol	=	picomol
RE	=	Retículo endoplasmático
Tampão ICC	=	Tampão fosfato salino com Triton X-10
VEGF	=	Fator de crescimento do endotélio vascular

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo hipotético gráfico: peixes <i>Trachinotus carolinus</i> aclimatados a 22°C submetidos ao aumento gradual da temperatura apresentam alterações comportamentais, teciduais e celulares.	11
Figura 2. Cronologia da metodologia. A e B: coleta de <i>T. carolinus</i> em praia arenosa utilizando rede tipo Picaré; C: seleção prévia dos indivíduos por tamanho; D: transporte para a Base de Pesquisa “Clarimundo de Jesus”, com veículo apropriado; E: seleção final por tamanho dos peixes; F: tanques de 500 litros onde os peixes permaneceram por 3 a 5 dias; G: aquários, com regulador de temperatura, onde os peixes permaneceram durante 24 horas e durante todo o período do experimento. Fotos: Caroline Margonato Cardoso e Priscila Verónica Sartorio.....	16
Figura 3. Sistema de controle de temperatura da água, com o aparelho Asla Ltda (modelo CDP – 48U12).	18
Figura 4. Peixe dissecado para retirada dos tecidos-alvo: músculo e fígado. Após a retirada, os tecidos foram fragmentados de forma adequada para posterior análise. Foto de: Alex Sander Dias Machado,.....	20
Figura 5. Processo de recuperação antigênica pelo calor (HIER - heat-induced epitope retrieval) (Ramos-Vara, 2005).	27
Figura 6. Processo de IHQ método de peroxidase indireta, utilizando anticorpo secundário biotinilado, estreptavidina conjugada à peroxidase, e cromógeno DAB (Ramos-Vara, 2005).....	30
Figura 7. Classes de coloração da IHQ para contagem de célula. As Figura s correspondentes as letras A a D são de fígado, as correspondentes as letras E a H, de músculo de peixe <i>T. carolinus</i> . A e E: classe 0, nenhuma marcação; B e F: classe 1, pouca marcação; C e G: marcação moderada; D e H: forte marcação.....	31
Figura 8. Ação aditiva do glutaraldeído (azul) e tetróxido de ósmio (preto) na estrutura da membrana plasmática, apresentando bicamada lipídica e proteínas trans-membrana (vermelho).	33
Figura 9. Testes realizados para o ajuste do sistema para o aumento gradual da temperatura de 0,1°C a cada 3 minutos, ou seja, 2°C/hora. A: variação de	

temperatura da água com aquecedor de 150W a 70V; B: variação de temperatura da água com aquecedor de 150W a 95V. Neste caso, o aquário foi isolado com isopor para prevenir a perda de calor da água para a atmosfera; C: variação de temperatura da água com aquecedor de 300W a 100V..... 38

Figura 10. Variação da taxa de aumento da temperatura a cada hora, controlado pelo aparelho CDP – 48U12. A: homogeneização da água do aquário com uma bomba submersa; B: homogeneização da água do aquário com duas bombas submersas acopladas a canos de PVC fenestrados..... 38

Figura 11. Médias de comprimento total e desvios-padrão dos animais por experimento: controle ambiental (CA), temperaturas experimentais e temperatura crítica superior (TCS). 40

Figura 12. Experimento de TCS: Regressão linear entre a variação de temperatura e a taxa de mortalidade de *T. carolinus*. Discriminação da temperatura em que cada peixe veio a óbito; temperatura onde 50% dos peixes morreram; linha de tendência com valor $r^2=0,98$, indicando relação significativamente positiva da taxa de mortalidade em função do aumento de temperatura..... 41

Figura 13. Regressão linear entre o comprimento de mortalidade e a temperatura letal de *T. carolinus*. Animais maiores morreram antes que os menores. O baixo valor de $r^2 = 0,49$, entretanto, evidencia que não há relação entre o tamanho dos peixes e a temperatura letal. 42

Figura 14. Médias das pontuações atribuídas a cada um dos parâmetros comportamentais avaliados em cada um dos grupos, submetidos a diferentes temperaturas ($n=42$). 43

Figura 15. Soma das pontuações dos critérios comportamentais avaliados (equilíbrio, natação e batimento opercular) a cada temperatura (grupos testados)..... 44

Figura 16. Representação das fases I, II e III da resposta comportamental de peixes submetidos ao estresse térmico em relação às pontuações totais obtidas nas avaliações comportamentais (0 a 15). 46

Figura 17. Fotomicrografias de músculo e fígado. A (músculo) e B(fígado): coloração HE – evidenciando núcleo com coloração azulada, e citoplasma rosada; C (músculo) e D (fígado): coloração Tricrômico de Masson – vermelho

ou rosa - citoplasma, queratina, fibras musculares, fibras intercelulares, fibrina. Azul – fibras colágenas. E (músculo) e F (fígado): evidenciando fibras colágenas..... 48

Figura 18. Visão macroscópica de fígado de peixe *T. carolinus*, apresentando três lobações..... 49

Figura 19. Fotomicrografias de fígado. A: hepatócitos com formato poliedral (seta pontilhada); núcleos grandes, arredondados e localizados na região central da célula (seta tracejada e pontilhada); vasos sinusóides (seta inteira). A reta representa a distribuição cordonal dos hepatócitos. Coloração HE. B: parênquima com arranjo homogêneo, e vasos sanguíneos (V) e ductos biliares (DB) localizados aleatoriamente. Coloração Picrossirius. C: células endoteliais (seta inteira) revestindo vaso sanguíneo com hemácias em seu interior (seta tracejada). Coloração: Tricômio de Masson..... 49

Figura 20. Fotomicrografias de fígado, em microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a presença de organelas como mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (RE), espaço de Disse (ED), peroxissomos (P) e também a cromatina condensada espalhada pelo núcleo (N)..... 50

Figura 21. Fotomicrografias de músculo em corte transversal (formato poliédrico) e corte longitudinal (formato alongado)..... 51

Figura 22. Fotomicrografias de músculo A: músculo esquelético, evidenciando núcleos na periferia das fibras musculares; B: músculo cardíaco, com núcleos centralizados. As setas mostram os núcleos. Coloração HE. 51

Figura 23. As fibras musculares são envolvidas por tecido conjuntivo. A: Epimísio (cabeça de seta), perimísio (seta inteira) e endomísio (seta tracejada). Coloração Picrossirius. B: Epimísio envolvendo todas as fibras musculares. Coloração Tricômio de Masson..... 52

Figura 24. Microscopia eletrônica de músculo esquelético. As faixas mais escuras são bandas A, que são divididas pelas bandas H. As mais claras, são bandas I, divididas pelas linhas Z..... 53

Figura 25. Fotomicrografia de fígado de *Trachinotus carolinus*. A) IHQ anti-HIF-1 α /hematoxilina de animal controle ambiental: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. (c) Detalhe: Controle negativo IHQ. B) IHQ anti-HIF-1 α /hematoxilina de animal controle do experimento, mantido a temperatura

ambiental de 22°C: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. C) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 26°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. D) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 30°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. E) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 32°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. F) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 34°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. G) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 36°C: Citoplasma e núcleo positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. H) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido até o aquecimento letal: Citoplasma negativo para HIF-1alpha em hepatócitos. Barra: 20 µm. 56

Figura 26. Fotomicrografia de músculo de *Trachinotus carolinus*. A)) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal controle ambiental: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. (c) Detalhe: Controle negativo IHQ Barra: 20 µm. B) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal controle do experimento, mantido a temperatura ambiental de 22°C Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas das fibras musculares. C) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 26°C: Núcleo positivo para HIF-1alpha nas fibras musculares. D) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 30°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha nas fibras musculares. E) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 32°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha nas fibras musculares. F) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 34°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha nas fibras musculares. G) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 36°C: Citoplasma negativo para HIF-1alpha nas fibras musculares. H) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido até o aquecimento letal: Citoplasma negativo para HIF-1alpha nas fibras musculares. Barra: 20 µm. 58

Figura 27. Fotomicrografia de fígado de *Trachinotus carolinus*. A) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal controle de experimento: Expressão fisiológica

da proteína nos citoplasmas. Barra: 20 μ m. (c) Detalhe: Controle negativo IHQ. B) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal mantido a temperatura ambiental de 22°C: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. C) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 26°C: Citoplasma positivo para VEGF em hepatócitos. D) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 30°C: Citoplasma positivo para VEGF em hepatócitos. E) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 32°C: Citoplasma positivo para VEGF em hepatócitos. F) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 34°C: Citoplasma positivo para VEGF em hepatócitos. G) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 36°C: Citoplasma e núcleo positivo para VEGF em hepatócitos. H) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido até o aquecimento letal: Citoplasma negativo para VEGF em hepatócitos. Barra: 20 μ m. 61

Figura 28. Fotomicrografia de músculo de *Trachinotus carolinus*. A) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal controle de experimento: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. (c) Detalhe: Controle negativo IHQ. B) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal mantido a temperatura ambiental de 22°C: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas das fibras musculares. C) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 26°C: Citoplasma positivo para VEGF nas fibras musculares. D) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 30°C: Citoplasma positivo para VEGF nas fibras musculares. E) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 32°C: Citoplasma positivo para VEGF nas fibras musculares. F) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 34°C: Citoplasma positivo para VEGF nas fibras musculares. G) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 36°C: Citoplasma e núcleo positivo para VEGF nas fibras musculares. H) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido até o aquecimento letal: Citoplasma negativo para VEGF nas fibras musculares. Barra: 20 μ m. 63

Figura 29. Fotomicrografias de fígado de *Ratus norvegicus*. A: expressão de HIF-1 α em tecido submetido a IHQ. Detalhe: controle negativo. B: expressão de VEGF em tecido submetido a IHQ. 64

Figura 30. Comparação entre as médias de HScore entre os controles ambiental (CA) e experimental (22°C). Houve diferença significativa entre os controles no fígado de ambas as proteínas, HIF-1 α e VEGF. * indica diferença significativa com $p < 0,05$ 66

Figura 31. O gráfico apresenta valores obtidos no HScore da proteína HIF-1 α em fígado de peixes *T. carolinus* em função do aumento da temperatura. Não houve expressão proteica a 22°C. A comparação entre os grupos experimentais mostrou diferença estatística entre os resultados dos grupos 26°C e 30°C com o grupo submetido ao aquecimento de 36°C ($p < 0,05$). A tabela representa a diferença estatística encontrada. “ns” significa que não houve diferença significativa para $p < 0,05$ 68

Figura 32. Valores obtidos no HScore da proteína HIF-1 α em músculo de peixe *T. carolinus* em função do aumento da temperatura. Comparando-se o grupo controle experimental, 22°C com os grupos experimentais, houve diferença estatística na expressão a 22°C com 32°C ($p < 0,05$). A comparação entre os grupos experimentais mostrou que os resultados do grupo 36°C são diferentes estatisticamente dos de 26°C, 30°C e 32°C. A tabela representa a diferença estatística encontrada. “ns” significa que não houve diferença significativa para $p < 0,05$ 70

Figura 33. Valores obtidos no HScore da proteína VEGF em fígado de peixes *T. carolinus* em função do aumento da temperatura. Comparando-se o grupo controle experimental, 22°C com os grupos experimentais, houve diferença estatística na expressão a 22°C com 34°C e 36°C ($p < 0,01$). A comparação entre os grupos experimentais mostrou que os resultados do grupo 32°C é diferente estatisticamente do grupo 34°C ($p < 0,05$). A tabela representa a diferença estatística encontrada. “ns” significa que não houve diferença significativa ($p < 0,05$). 72

Figura 34. Valores obtidos no HScore da proteína VEGF em músculo de peixes *T. carolinus* em função do aumento da temperatura. Comparando-se o grupo controle experimental, 22°C, com os grupos experimentais, houve diferença estatística com os grupos 30°C, 34°C e 36°C ($p < 0,01$). Visualmente, nota-se aumento gradativo da expressão da proteína até 30°C, seguida de

queda em 32°C, aumento em 34°C e queda em 36°C. Há diferença na expressão do grupo 36°C com 30°C e 34°C ($p<0,05$)..... 74

Figura 35. Comparação das expressões ocorridas às temperaturas experimentais 36°C e TCS. Em fígado de peixes *T. carolinus* expostos e mantidos a 36°C, há maior expressão da proteína HIF-1 α , significativamente diferente da expressão encontrada a TCS. O mesmo padrão foi encontrado nos hepatócitos para a proteína VEGF. Em músculo, a expressão tanto do HIF-1 α quanto VEGF foi maior em TCS do que a 36°C..... 76

Figura 36. A Figura demonstra relação entre o aumento da temperatura e a expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF em tecido hepático de peixes *T. carolinus*. Nota-se que a medida que o HIF-1 α aumenta, há um aumento do VEGF, exceto a 32°C e 36°C, onde há aumento do HIF-1 α , e uma diminuição do VEGF..... 77

Figura 37. Relação da expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF em tecido hepático de peixes *T. carolinus* expostos ao aquecimento da água. O gráfico representa o aumento da expressão do VEGF em função do HIF-1 α . A análise de regressão linear apresentou o coeficiente $r^2=0,87$ 78

Figura 38. Relação entre o aumento da temperatura e a expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF em tecido muscular de peixes *T. carolinus*. Nota-se que a expressão do HIF-1 α é acompanhada do VEGF, quando há aumento ou diminuição da expressão do HIF-1 α , o mesmo ocorre com o VEGF..... 79

Figura 39. Expressão do VEGF correlacionada com a expressão do HIF-1 α em tecido muscular de *T. carolinus*. O gráfico representa o aumento do VEGF em função do HIF-1 α . Análise de regressão linear mostrou coeficiente $r^2=0,85$ 80

Figura 40. Eletromicrografias de transmissão de tecido muscular de peixe *T. carolinus* demonstrando diferenças na distribuição das mitocôndrias. A: aumento de 3500X: presença de núcleo (N), grande densidade mitocondrial (setas), áreas de sobreposição (*) e ausência (estrela). B: aumento de 5000X: observação de um núcleo (N), grande densidade mitocondrial (setas) e ausência (estrela). C: aumento de 11000X: observamos mitocôndrias bem definidas em número razoável (setas) e ausência (estrela). D: aumento de 2000X: nota-se mitocôndrias bem definidas em baixo número (setas). 82

Figura 41. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* mantido à temperatura ambiente de 22°C. A: aumento de 7.500 vezes: é possível observar mitocôndrias (setas) em três hepatócitos adjacentes com um canalículo biliar (CB) entre eles e os respectivos núcleos (N). B: aumento de 7.500 vezes: presença de grande densidade mitocondrial (seta) e núcleo (N). C: aumento de 20.000 vezes: a seta indica possível local de divisão de uma mitocôndria (m). D: aumento de 4.000 vezes: observamos várias células hepáticas, núcleos (N) e grande densidade mitocondrial (seta)..... 83

Figura 42. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* submetido à temperatura experimental de 30°C. A: aumento de 7.500 vezes: observamos duas células hepáticas com grande densidade mitocondrial (m) e respectivos núcleos (N). B: aumento de 7.500 vezes: numerosas microvilosidades da membrana celular do hepatócito voltada para o espaço de Disse (ED). C: aumento de 20.000 vezes: célula hepática com núcleo (N), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático (RE). D: aumento de 4.000 vezes: presença de numerosos hepatócitos com mitocôndrias e Espaço de Disse (ED)..... 84

Figura 43. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* submetido à temperatura experimental de 34°C. A: aumento de 7.500 vezes: observamos grande densidade mitocondrial (setas) de tamanho reduzido nas células hepáticas e um núcleo bem definido (N). B: aumento de 7.500 vezes: mitocôndrias ao redor dos núcleos (N). C: Aumento de 20.000 vezes: poucas mitocôndrias (m). D: Aumento de 4.000 vezes: células hepáticas com grande densidade mitocondrial (setas) e presença de artefatos. 85

Figura 44. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* submetido à temperatura experimental de 36°C. A: aumento de 7.500 vezes: núcleo (N) e mitocôndrias bem definidas (setas). B: aumento de 7.500 vezes: núcleo (N) e mitocôndrias bem definidas (setas). C: aumento de 20.000 vezes: observamos um núcleo (N) cercado por mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático (RE). D: aumento de 4.000 vezes: presença de várias células hepáticas de tamanho reduzido com grande densidade mitocondrial..... 86

Figura 45. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* submetido à temperatura máxima de sobrevivência (TCS - 38°C). A:

aumento de 7.500 vezes: núcleo (N) e mitocôndrias bem definidas (m). A seta indica possível estágio de fusão de duas mitocôndrias. B: aumento de 7.500 vezes: observamos a lesão do tecido hepático, com formato anômalo de núcleo (seta) e mitocôndrias (m). C: Aumento de 20.000 vezes: presença de três mitocôndrias (m). D: Aumento de 7.500 vezes: observamos mitocôndrias de grandes proporções (m) e núcleo (N). A seta indica processo de degradação da membrana mitocondrial. 87

Figura 46. Estimativa do número de mitocôndrias em hepatócitos de peixes submetidos a diferentes temperaturas experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos, com $p < 0,05$; ** - diferença significativa em relação ao controle 22°C, com $p < 0,01$ 89

Figura 47. Estimativa do valor médio das medidas da área das mitocôndrias em hepatócitos de peixes submetidos a diferentes temperaturas experimentais: comparação entre os grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos; *** - diferença significativa em relação ao controle 22°C, com $p < 0,001$ 90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. <i>Esquema experimental de elevação de temperatura ambiental 2° C/hora com indicação dos momentos de coleta** de cada grupo experimental.</i>	19
Tabela 2. <i>Esquema dos controles experimentais. A temperatura foi mantida a 22°C até o período de coleta (**) correspondente a cada grupo experimental. Desta forma, o tempo em que todos os peixes permaneceram no aquário foi padronizada.</i>	19
Tabela 3. <i>Critérios de classificação do comportamento. Pontuação entre 5 e 0 foram atribuídas de acordo com o comportamento dos peixes submetidos ao aumento gradual de temperatura.</i>	23
Tabela 4. <i>Classificação das fases comportamentais. Adaptada de Cocking (1958).</i>	24
Tabela 5. <i>Relação dos anticorpos utilizados.</i>	26
Tabela 6. <i>Médias e desvios padrão da quantidade de oxigênio dissolvido nos grupos experimentais (GI-GV) e controle (GVI-GVIII). TCS: temperatura crítica de sobrevivência.</i>	39

RESUMO

A temperatura é um fator abiótico fundamental que influencia diretamente o comportamento e a sobrevivência dos organismos, incluindo peixes. Por serem ectotérmicos, peixes respondem diretamente à variação de temperatura. Eles possuem mecanismos celulares de termoequilíbrio, com diferentes expressões, ajustados evolutivamente às condições do meio. O presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos do aumento gradual da temperatura (2°C/h) a partir da temperatura ambiente de inverno (22°C) até 26, 30, 32, 34 e 36°C e temperatura crítica de sobrevivência (TCS) em peixes pampo, *Trachinotus carolinus*. Analisou-se o comportamento a partir de vídeos; a expressão das proteínas relacionadas à hipóxia tecidual HIF-1 α e VEGF em músculo e fígado através da técnica de imuno-histoquímica; e análises celulares através da quantificação de mitocôndrias e mensuração de sua área. Os resultados mostraram que o comportamento dos pampos é alterado com o aumento da temperatura, apresentando um padrão definido. As maiores expressões proteicas foram em temperaturas elevadas, a 34°C no caso do VEGF e a 36°C no caso do HIF-1 α . Houve aumento no número de mitocôndrias e queda em sua área conforme o aumento da temperatura. Portanto, a temperatura tem influência em todos os níveis de organização estudados, ou seja, celular, tecidual e do organismo.

Palavras-chave: temperatura, comportamento, HIF-1 α , VEGF, mitocôndria, peixes.

ABSTRACT

Temperature is an important abiotic factor that influences directly the behavior and survival of organisms, including fish. Fishes are ectothermic, and respond directly to temperature variation. They have cellular mechanisms of thermostability that were adjusted during evolution to environmental conditions. The present work aims to study the effects of the gradual increase in temperature (2°C / h) from the winter temperature (22°C) to 26, 30, 32, 34 and 36°C and critical survival temperature (TCS) in fish pompano, *Trachinotus carolinus*. We analyzed the behavior out of vídeos; the expression of proteins related to tissue hypoxia HIF-1 α and VEGF in muscle and liver through the technique of immunohistochemistry; and determined the number and the área of cellular mitochondria. The results showed that the behavior of pampano changes with increasing temperature, in a gradual scale pattern. The protein expressions were higher at elevated temperatures, at 34°C in the case of VEGF and at 36°C in the case of HIF-1 α . An increase in the number of mitochondria, and a decrease in their area were observed with increasing temperature. Therefore, temperature had measurable effects at all levels of organization studied, i.e., cellular, tissular and organismic.

Key-words: temperature, behavior, HIF-1 α , VEGF, mitochondria, fish.

Introdução

I. INTRODUÇÃO

A temperatura é um dos fatores abióticos mais estudados (Angilletta Jr, 2009), pois influencia direta ou indiretamente a vida dos organismos, principalmente por afetar a velocidade das reações, o estado conformacional das macromoléculas e a estabilidade das proteínas (Alexandrov & Bernstam, 1977).

Durante a evolução foram selecionados diversos processos vitais relacionados com a manutenção da estabilidade celular em função das variações de temperatura. Dentre as adaptações dos organismos às altas temperaturas, pode-se citar, por exemplo, o aumento da estabilidade de componentes celulares em resposta ao calor e o aumento da termorresistência celular por adaptações fenotípicas e/ou fisiológicas (Alexandrov, 1994), como a síntese de proteínas anti-estresse térmico (Tomanek, 2008; Zhao *et al.*, 2010). Os mecanismos celulares de termoestabilidade podem ser diferentemente expressos, ajustados evolutivamente às condições do meio (Seebacher, 2009). Alguns mecanismos de termoestabilidade são resultantes de fatores transcricionais que controlam a transcrição de genes, os quais participam na angiogênese, na formação de eritropoetinas, no metabolismo de glicose, na proliferação e sobrevivência celular (Ke & Costa, 2006; Seebacher, 2009). A eficiência desses mecanismos, selecionados de acordo com o habitat, determina a sensibilidade termal do indivíduo em nível celular, sistêmico e orgânico (Angilletta Jr, 2009). Dessa maneira, a vida animal é possível nos mais diferentes ambientes, tanto nos de baixas temperaturas, a exemplo das regiões polares, quanto nos de temperatura elevada, tais como desertos e fontes termais (Cloudsley-Thompson, 1993, Sandblom *et al.*, 2010).

No ambiente marinho, a temperatura pode flutuar diária ou sazonalmente. Eventos climáticos como o El Niño ou La Niña também fazem com que as águas marinhas sofram mudanças de temperatura. Outro fator que pode alterar a temperatura da água é um possível aquecimento em escala global, de maneira irreversível, que o nosso planeta poderá sofrer nas próximas décadas (Metz *et al.*, 2007). Segundo o *Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC 2007, o planeta aqueceu 0,6°C durante o século passado, e o aquecimento ainda continua. A *United Nations Climate Change Conference*, COP 15 (2009), prevê um aumento de 2°C a 4°C na temperatura média do planeta até o final do século XXI (COP 15, 2009; Metz & Davidson, 2007).

O aumento de temperatura da água pode causar impactos negativos sobre a biodiversidade e sobre a economia. São possíveis consequências do aquecimento da água do mar, mudanças na taxa metabólica, na taxa de crescimento, na taxa de mortalidade, no recrutamento, no sucesso reprodutivo, na distribuição geográfica (Angilletta Jr *et al.*, 2006; Angilletta Jr *et al.*, 2010; Feder, 2010; Frederich & Pörtner, 2000) e na letalidade (Fry & Hart, 1946) dos indivíduos que habitam este ambiente. Esses fatores poderão afetar indivíduos, tamanho e estrutura de populações e composição de comunidades (Pörtner & Knust, 2007), além de possíveis extinções de espécies, gerando prejuízos ambientais e socioeconômicos (Pauly *et al.*, 2005).

Por serem pecilotérmicos, os peixes respondem rapidamente à variação de temperatura. Quando submetidos a distúrbios de temperatura, os peixes podem apresentar alterações comportamentais na alimentação, no crescimento, na reprodução e na saúde (Golovanov, 2012; Ruyet *et al.*, 2004). Os peixes possuem a capacidade de escolha de seu habitat, podendo mover-

se para ambientes com temperaturas mais adequadas que facilitem seu metabolismo e funções biológicas (Pérez *et al.*, 2003; Reyes *et al.*, 2011).

Temperaturas acima ou abaixo daquela ideal de sobrevivência podem alterar o comportamento dos peixes (Beitinger *et al.*, 2000). O aumento de temperatura, por exemplo, acarreta no aumento da taxa metabólica, que governa o desempenho cardiorespiratório, resultando em aumento da ventilação, e, conseqüentemente, dos batimentos operculares e da circulação sanguínea (Breau *et al.*, 2011). Até certo limite de temperatura, o peixe pode sobreviver. Além dela, pode haver colapso fisiológico das atividades biológicas, levando o organismo à morte (Pörtner, 2001). A perda de equilíbrio, espasmos e falta de resposta a estímulo tátil são comportamentos característicos dessa fase (Heath *et al.*, 1994; Pérez *et al.*, 2003; Breau *et al.*, 2011).

A tolerância térmica é determinada, em laboratório, por dois principais métodos: o dinâmico e o estático. O método dinâmico, utilizado neste trabalho, consiste no aumento progressivo da temperatura a partir de uma de aclimação, até que ocorra desorganização física em resposta ao estressor termal (Reyes *et al.*, 2011). O ponto final do experimento (*endpoint*) é quando o peixe fica com a locomoção desorganizada e não consegue mais escapar das condições desfavoráveis, que o levariam à morte (Mora & Maya, 2006). Pela dificuldade da determinação exata dessa fase, outros autores estabeleceram outros critérios, como por exemplo, o cessar dos movimentos respiratórios (Huntsman, 1924; Sumner & Doudoroff, 1938; Lutterschmidt & Hutchison, 1997).

Pelo método dinâmico são determinadas as médias de temperaturas máximas e mínimas que um animal tolera e que são denominadas,

respectivamente, de temperatura crítica máxima (*critical thermal maximum*) - CTMax e temperatura crítica mínima (*critical thermal minimum*) - CTMin (Beitinger *et al.*, 2000). Esta metodologia é amplamente utilizada, pois necessita de poucos indivíduos, é de rápida execução e os resultados são comparáveis às condições naturais.

No método estático os animais são aclimatados a uma determinada temperatura, divididos em grupos menores e expostos subitamente a uma série de temperaturas fixas acima ou abaixo daquela de aclimação por uma semana. Geralmente, as temperaturas utilizadas são próximas às temperaturas letais conhecidas para a espécie. A temperatura na qual 50% dos peixes morrem é denominada temperatura superior ou inferior letal incipiente (*upper or lower incipient lethal temperature*) - ITL (Fry *et al.*, 1942).

Verificou-se que durante curtos períodos de tempo, vários organismos conseguem suportar temperaturas acima daquelas esperadas na região onde vivem. Entretanto, após permanecerem nessas temperaturas por períodos prolongados, esses mesmos indivíduos sofrem danos fisiológicos acentuados que normalmente os levam à morte (Angilletta Jr, 2009). A hipótese mais estudada atualmente é a de que o aumento de temperatura ocasiona um aumento do metabolismo, acarretando em maior consumo de oxigênio. O suprimento necessário deste gás pode ser maior do que a capacidade que o animal possui de captar e distribuir o oxigênio para os tecidos (Hobbs & McDonalds, 2010; Pörtner, 2002). A demanda aumentada pode exceder a capacidade dos mecanismos de termoequilíbrio que os animais possuem para responder ao estressor ambiental (Pörtner & Knust, 2007; Gomes, 2008). O aumento do consumo de oxigênio causado pelo aquecimento resulta numa

menor disponibilidade ou mesmo hipóxia tecidual, diminuindo a capacidade aeróbica mitocondrial (Bennett, 1978; Pörtner, 2002).

As interações entre limitação de oxigênio, temperatura ambiental e níveis de performance dos animais devem ser levadas em conta nos estudos de mudanças térmicas, pois estas foram estabelecidas durante os processos evolutivos (Pörtner, 2002). Fields e colaboradores (2001) mostraram que a temperatura necessária para desnaturar proteínas pode exceder a temperatura crítica máxima do organismo. Baseado nisso, Pörtner (2001) concluiu que a limitação do oxigênio nos tecidos é a explicação mais plausível para delimitar a tolerância térmica dos organismos.

Dentro dos limites de temperatura em que os animais podem viver um dos mecanismos utilizados para manter a sobrevivência são aqueles associados ao Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1) (Horowitz, 2010). Quando falta oxigênio nos tecidos, o HIF-1 medeia a sobrevivência celular através da ativação transcricional de genes que auxiliam manutenção da homeostase celular (Agani *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2002; Davies *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2004). Esse fator é um heterodímero que possui duas subunidades, α e β . A unidade α é funcional, regulada pelo oxigênio. Já a β , também conhecida como ARNT (*aryl hydrocarbon nuclear translocator*), é constitutiva, mantida em níveis constantes de expressão, independente da concentração de oxigênio (Soitamo *et al.*, 2001; Sandoel *et al.*, 2010).

As proteínas HIF-1 α e HIF-1 β foram caracterizadas em peixes (Cao *et al.*, 2009; Law *et al.*, 2006; Powell & Hahn, 2000; Rahman & Thomas, 2007; Rytkönen *et al.*, 2007; Terova *et al.*, 2008; Soitamo *et al.*, 2001) e foi

demonstrado que nesses animais estas apresentam um papel semelhante ao conhecido para mamíferos (Nikinmaa & Rees, 2005; Seebacher, 2009).

Em normóxia, a proteína HIF-1 α é rapidamente degradada (Feng *et al.*, 2008). Quando em hipóxia, esta se torna estável e se desloca do citoplasma para o núcleo da célula, onde dimeriza com a subunidade β , formando o complexo ativado HIF-1, que induz a expressão de genes-alvo (Ema *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2004; Ke & Costa, 2006). Por esse motivo, a unidade α do HIF-1 funciona como regulador de níveis de oxigênio (Rissanen *et al.*, 2006).

Uma das funções do fator HIF-1 é a indução da transcrição da proteína Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) (Fátima & Papa, 2010; Ferrara *et al.*, 2003). O VEGF, por sua vez, estimula o recrutamento de células endoteliais para a formação de novos capilares que aumentam a capacidade de transporte do oxigênio para áreas em hipóxia, em um processo denominado angiogênese (Lee *et al.*, 2004). Foi constatada correlação entre a expressão do HIF-1, do VEGF e do desenvolvimento vascular em salmão (*Salmo salar*), de forma similar a encontrada para mamíferos (Nikinmaa & Rees, 2005). O gene VEGF já foi sequenciado em peixe zebra (Gong *et al.*, 2004) .

O HIF-1 α também é responsável pelo início do metabolismo anaeróbico, pela glicólise e transporte de glicose. Durante hipóxia severa, os ajustes feitos para aumentar a chegada de oxigênio podem não ser suficientes para atender a demanda do tecido através do metabolismo aeróbio. Por isso, muitos peixes recorrem ao metabolismo anaeróbico para produção de energia (Nikinmaa & Rees, 2005). Além disso, a alta exigência de oxigênio pelas mitocôndrias durante o aquecimento é ajustada por uma diminuição da densidade mitocondrial, o que reduz a demanda basal de oxigênio, ativando rotas

energéticas anaeróbicas (Pörtner, 2002). A diminuição do consumo de oxigênio pelas mitocôndrias e menor densidade mitocondrial é observada também em mamíferos submetidos ao aquecimento (Inbar *et al.*, 1975) e bivalves durante o verão (Cherkasov *et al.*, 2010).

Popularmente conhecidos como pampos, os organismos utilizados neste trabalho são peixes da espécie *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), membros da família Carangidae. Habitam a zona de arrebentação de praias arenosas e baías de águas tropicais, que vão desde o Atlântico Norte até o sul do Brasil. No Estado de São Paulo ocorrem na região que compreende Ubatuba, Ilha Bela e Bertioga (Sanches *et al.*, 2007).

Possuem importância ecológica, participando do começo da teia alimentar pelágica já que, quando jovens, vivem na zona de arrebentação, em cardumes. Quando adultos, migram para águas oceânicas onde vivem solitários. Possuem também importância econômica, pois é um pescado muito apreciado pelos pescadores comerciais e esportivos, inclusive no Brasil (Sanches *et al.*, 2007). São abundantes e intensamente utilizados na aquicultura na costa leste do continente americano (Santos *et al.*, 2006). No Brasil, existe o interesse em seu cultivo devido ao seu grande potencial econômico e facilidade de criação (Lazo *et al.*, 1998). É de fácil coleta na região de estudo, aclimata-se bem ao cativeiro e é resistente ao manejo em laboratório (Santos *et al.*, 2006).

Os indivíduos de *T. carolinus* toleram altos níveis de variação de salinidade e oxigênio dissolvido. A temperatura ambiental é um fator que restringe a sobrevivência desse organismo, já foram descritos em temperaturas de 17°C a 34°C, sendo o ótimas entre 25 e 30°C. Pode ocorrer mortalidade

quando há diferença brusca de temperatura em curto período de tempo (Main *et al.*, 2007).

Assim, a temperatura é de suma importância para a sobrevivência desta espécie tão importante econômica e ecologicamente. Estudar a temperatura e como ela afeta nos diferentes níveis organizacionais (celular, tecidual e organismo) pode contribuir para o entendimento da suscetibilidade desta e de outras espécies, a possíveis perturbações climáticas. Além disso, futuramente, os dados poderão ser aplicados à pesca e/ou aos sistemas de cultivo, acarretando ganhos econômicos e sociais pela importância crescente do pescado na alimentação humana (Sanches *et al.*, 2007).

Hipótese

II. HIPÓTESE

O aquecimento da água ocasionará mudanças comportamentais nos juvenis de pampo, *T. carolinus*, assim como aumento na expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF, pois suas funções estão relacionadas a mecanismos de manutenção da homeostase celular; queda no número de mitocôndrias e aumento da área mitocondrial conforme a elevação da temperatura, mecanismo envolvido nos limites de tolerância termal. O modelo hipotético e experimental para responder às hipóteses acima está descrito a seguir (Figura 1).

Figura 1. Modelo hipotético gráfico: peixes *Trachinotus carolinus* aclimatados a 22°C submetidos ao aumento gradual da temperatura apresentam alterações comportamentais, teciduais e celulares.

Objetivo

III. OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo estudar os efeitos do aumento gradual da temperatura sobre o comportamento, a expressão de proteínas relacionadas à hipóxia tecidual e as características das mitocôndrias. Esses fatores serão relacionados à sobrevivência do organismo, *Trachinotus carolinus*. Para atingir ao objetivo geral serão considerados os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar as alterações comportamentais que ocorrem durante o aumento da temperatura nos peixes testados a partir da observação e registro do comportamento durante os experimentos;

- Avaliar quali- quantitativamente alterações das proteínas relacionadas à hipóxia tecidual, HIF-1 α e VEGF, por imunolocalização e contagem de células marcadas nos tecidos hepático e muscular;

- Mensurar a quantidade e área mitocondrial no citoplasma das células hepáticas de indivíduos submetidos ao aumento de temperatura ambiental.

- Relacionar a expressão das proteínas HIF-1 α com a do VEGF e com a quantidade e área mitocondrial nos tecidos analisados nas diferentes temperaturas experimentadas, relacionando-os aos possíveis efeitos da hipóxia nos mecanismos termorregulatórios e no uso das rotas energéticas celulares.

Material e Métodos

IV. MATERIAL E MÉTODOS

Foram feitas análises comportamentais por observação visual direta e por meio de registros em vídeos, análises teciduais utilizando-se técnicas histológicas e imuno-histoquímicas, e análises celulares através da quantificação de mitocôndrias e da mensuração da área mitocondrial.

IV.1. Captura e manutenção

Peixes juvenis da espécie *T. carolinus* foram capturados em praia arenosa, em Ubatuba (23°45'S : 45°07'W), SP, próxima a Base de Pesquisa “Clarimundo de Jesus” (Autorização ICMBio/SISBIO Número: 26291-1) com auxílio da rede de arrasto de praia do tipo Picaré de utilização manual, com malhagem de 10 mm entrenós, medindo 3 X 1,5 metros (largura X altura), desenvolvida no Laboratório de Ecofisiologia de Animais Marinhos do IO-USP (Figura 2 A-B). Os peixes foram transportados para a Base, selecionados por tamanho (50 a 100 mm) e mantidos em laboratório com temperatura controlada, em tanques de 500 litros (Figura 2F) contendo água do mar, mantida a 22° C, temperatura do local de captura, no momento da coleta. Os peixes permaneceram nos tanques por 3 a 5 dias, para diminuir o estresse da coleta (Ruane *et al.*, 2001). Os peixes foram mantidos com ciclo de luz 24h claro: 0h escuro. A dieta dos peixes mantidos em cativeiro foi constituída de ração comercial, fornecida uma vez ao dia, *ad libitum*. Para higienização dos tanques, 40% da água foi renovada a cada dia.

A água do mar utilizada nos experimentos foi bombeada da baía em frente da base, e filtrada por 3 vezes consecutivas, com malhagem de 20µm, 5µm e 1µm, respectivamente.

Figura 2. Cronologia da metodologia. A e B: coleta de *T. carolinus* em praia arenosa utilizando rede tipo Picaré; C: seleção prévia dos indivíduos por tamanho; D: transporte para a Base de Pesquisa “Clarimundo de Jesus”, com veículo apropriado; E: seleção final por tamanho dos peixes; F: tanques de 500 litros onde os peixes permaneceram por 3 a 5 dias; G: aquários, com regulador de temperatura, onde os peixes permaneceram durante 24 horas e durante todo o período do experimento. Fotos: Caroline Margonato Cardoso e Priscila Verônica Sartorio.

IV.2. Procedimentos experimentais

Foram realizados três procedimentos experimentais que se complementam: a) de aquecimento gradual da temperatura; b) para determinar a temperatura crítica de sobrevivência e c) um controle com indivíduos recém-coletados, denominado por “controle ambiental”, conforme descritos a seguir.

a) Experimento de aquecimento gradual da temperatura

Após o período de manutenção, os animais foram separados em 10 grupos de 6 indivíduos cada, distribuídos em 5 aquários experimentais de 40 litros, relativos a cada temperatura a ser testada (Grupo I a Grupo V) (Tabela 1), e os respectivos aquários de controle (Grupo VI a Grupo X) (Tabela 2). Os peixes foram mantidos em repouso nestes aquários por 24 horas, à temperatura de 22°C ($\pm 0,3^\circ\text{C}$) e salinidade 35 ($\pm 0,5$). A temperatura de manutenção dos animais e a inicial do experimento foram estabelecidas de acordo com o valor mensurado no local de coleta. A salinidade selecionada representa as médias de variações deste fator no ambiente natural durante os períodos de coleta (Mantelatto & Fransozo, 1999). Para evitar interferência da dieta nos experimentos, os peixes não foram alimentados nessas 24 horas anteriores a eles, tampouco durante o mesmo (Reyes *et al.*, 2011).

Cada aquário foi equipado com um aerador de superfície e, no fundo, foi colocado um aquecedor de 300 W, ajustado a 40% de sua potência, acoplado a um sistema de controle de temperatura (ASLA Ltda, modelo CDP 48U12). Este sistema foi configurado no modo liga-desliga (on-off) para regular o aumento gradual de temperatura (denominado “rampas”) e para manutenção de uma dada temperatura experimental, por período determinado (denominado

de patamares), com precisão de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Sobre o fundo, foram também colocadas duas bombas submersas, acopladas a tubos de PVC perfurados em seu comprimento, para gerar um fluxo de água suficiente para homogeneizar rapidamente a temperatura em todo o aquário (Figura 3). Em uma das bombas o tubo estava na posição horizontal e na outra, na posição vertical.

Figura 3. Sistema de controle de temperatura da água, com o aparelho Asla Ltda (modelo CDP – 48U12).

Como mencionado, o sistema de aquecimento foi previamente calibrado para que a temperatura aumentasse $0,1^{\circ}\text{C}$ a cada 3 minutos, ou seja, 2°C por hora (Frederich & Pörtner, 2000; Rodnick *et al.*, 2004). Após atingir a temperatura específica desejada para cada aquário experimental, esta permaneceu constante por 120 minutos. Dessa maneira, o grupo I atingiu a temperatura máxima de 26°C ; o grupo II de 30°C ; o grupo III de 32°C ; grupo IV de 34°C e o grupo V de 36°C (Tabela 1). Os aquários de controle possuíam os mesmos itens do experimental, com o aquecedor programado para manter a temperatura do local de coleta (22°C), durante todo o período experimental (Tabela 2). Os animais destes grupos, de agora em diante referidos como controle experimental ou 22°C , permaneceram nos aquários durante o mesmo tempo que os animais experimentais.

Tabela 1. Esquema experimental de elevação de temperatura ambiental 2° C/hora com indicação dos momentos de coleta** de cada grupo experimental.

Programação horária	Grupo I (26°C)	Grupo II (30°C)	Grupo III (32°C)	Grupo IV (34°C)	Grupo V (36°C)
1ª hora	22 a 24°C	22 a 24°C	22 a 24°C	22 a 24°C	22 a 24°C
2ª hora	24 a 26°C	24 a 26°C	24 a 26°C	24 a 26°C	24 a 26°C
3ª hora	26°C	26 a 28°C	26 a 28°C	26 a 28°C	26 a 28°C
4ª hora	26°C**	28 a 30°C	28 a 30°C	28 a 30°C	28 a 30°C
5ª hora	---	30°C	30 a 32°C	30 a 32°C	30 a 32°C
6ª hora	---	30°C**	32°C	32 a 34°C	32 a 34°C
7ª hora	---	---	32°C**	34°C	34 a 36°C
8ª hora	---	---	---	34°C**	36°C
9ª hora	---	---	---	---	36°C**

**.: Coleta realizada ao término da segunda hora da temperatura final testada.

Tabela 2. Esquema dos controles experimentais. A temperatura foi mantida a 22°C até o período de coleta (**) correspondente a cada grupo experimental. Desta forma, o tempo em que todos os peixes permaneceram no aquário foi padronizada.

Programação horária	Grupo VI (Controle 26°C)	Grupo VII (Controle 30°C)	Grupo VIII (Controle 32°C)	Grupo IX (Controle 34°C)	Grupo X (Controle 36°C)
1ª hora	22°C	22°C	22°C	22°C	22°C
2ª hora	22°C	22°C	22°C	22°C	22°C
3ª hora	22°C	22°C	22°C	22°C	22°C
4ª hora	22°C**	22°C	22°C	22°C	22°C
5ª hora	---	22°C	22°C	22°C	22°C
6ª hora	---	22°C**	22°C	22°C	22°C
7ª hora	---	---	22°C**	22°C	22°C
8ª hora	---	---	---	22°C**	22°C
9ª hora	---	---	---	---	22°C**

**.: Período de coleta realizada, correspondente ao término da segunda hora da temperatura experimental final testada.

Ao término de cada experimento, 3 animais do aquário experimental e 3 do controle foram removidos. Os peixes foram sacrificados com secção cortical, de acordo com as normas legais de eutanásia animal (Resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do Conselho Federal de Medicina Veterinária) e os tecidos (músculo e fígado) retirados para as análises descritas a seguir (Figura 4). O experimento foi repetido três vezes, exatamente da mesma forma, para garantir a qualidade dos resultados.

Figura 4. Peixe dissecado para retirada dos tecidos-alvo: músculo e fígado. Após a retirada, os tecidos foram fragmentados de forma adequada para posterior análise. Foto de: Alex Sander Dias Machado,

Os peixes que não foram sacrificados e os demais peixes coletados, mas não utilizados, foram devolvidos ao local de origem, em perfeitas condições, após um período de repouso e recuperação.

Medições de oxigênio dissolvido, salinidade e pH foram feitas no início e no final de todos os experimentos. Utilizou-se aparelho eletrônico para medições de oxigênio e salinidade. Para medir o pH foram utilizadas tiras indicadoras.

b) Temperatura crítica de sobrevivência

Paralelamente, foi realizado um experimento para a determinação da temperatura crítica de sobrevivência (TCS) para os indivíduos da espécie. Foram empregados os mesmos procedimentos de coleta, repouso, manutenção, taxa de aumento da temperatura da água (2°C/hora) e medições de oxigênio dissolvido descritos nos experimentos acima. Entretanto, nesse experimento, o término não correspondeu a uma temperatura previamente estipulada, mas sim pela parada do movimento opercular do peixe por mais de 1 minuto e pela perda de resposta ao estímulo tátil. Assim como nos demais casos, os experimentos foram feitos em triplicata, cada qual com seu respectivo controle. Quando o movimento opercular do último animal do aquário experimental cessou, três peixes do aquário controle foram retirados e eutanasiados. Dessa forma, foram utilizados 18 peixes dos aquários experimentais e 9 dos controles (n=27).

c) Controle Ambiental.

A fim de se estabelecer uma linha de base da manifestação natural dos parâmetros investigados, foi também realizado uma amostragem que foi denominada de controle ambiental 22°C (CA). Para tanto, doze peixes foram sacrificados e seus tecidos amostrados imediatamente após a coleta.

Os tecidos hepático e muscular dos peixes foram coletados em todos os experimentos descritos acima e utilizados para as preparações de imunohistoquímica (IHQ) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), segundo a metodologia descrita mais adiante.

IV.3. Análise comportamental

Para a análise das alterações comportamentais dos peixes em relação ao aquecimento foram feitos experimentos seguindo-se a mesma metodologia já descrita. Foram utilizados sete aquários contendo seis peixes em cada (n=42), sendo um controle a 22°C, e seis experimentais, cada qual com temperatura final de 26°C, 30°C, 32°C, 34°C, 36°C e TCS. A taxa de aquecimento da água foi de 2°C/hora e, ao atingirem a temperatura final de cada aquário, permaneceram nesta por 120 minutos. Foram feitas filmagens durante a segunda hora de permanência dos peixes nas temperaturas finais de 26°C, 30°C, 32°C, 34°C, 36°C e do grupo controle a 22°C, para obtenção de dados para as análises comportamentais. No caso do TCS, a filmagem foi feita a partir de 36°C e seguiu até o óbito de todos os animais.

A partir das análises dos vídeos, o comportamento do grupo foi avaliado, considerando-se os seguintes parâmetros: **equilíbrio**: observação do equilíbrio e propriocepção do animal no aquário; **natação**: observação e apuração visual do ritmo e velocidade de natação; **batimento opercular**: observação do ritmo de ventilação através do movimento opercular; e **mortalidade**: verificação de possíveis ocorrências de mortalidade, determinadas como parada do movimento opercular por mais de 1 minuto e pela perda de resposta ao estímulo tátil.

Para quantificação das alterações comportamentais do peixe *T. carolinus* em relação ao aquecimento, os parâmetros acima foram pontuados em escalas de 0 a 5. A pontuação máxima 5, foi atribuída para o comportamento normal, e decrescia a medida de mudanças no

comportamento. A pontuação mínima 0, referiu-se à morte de indivíduos (Tabela 3).

Tabela 3. Critérios de classificação do comportamento. Pontuação entre 5 e 0 foram atribuídas de acordo com o comportamento dos peixes submetidos ao aumento gradual de temperatura.

Pontos	Equilíbrio	Natação	Batimento opercular
5	Normal	Normal	Normal
4	Não foi registrado	Levemente acelerada	Levemente acelerada
3	Distúrbio leve	Acelerada	Medianamente acelerada
2	Desequilíbrio horizontal ou lateral	Natação lenta	Acelerada
1	Decúbito lateral ou ventral	Natação rara com espasmos	Lenta
0	Morte*	Morte*	Morte*

Morte*: caracterizada pela parada do movimento opercular por mais de 1 minuto e pela perda de resposta ao estímulo tátil

As notas foram atribuídas a cada 5 minutos de vídeo, totalizando doze notas por vídeo analisado. A observação de cada um dos critérios avaliados foi feita por 3 diferentes avaliadores, e a partir desses valores, calculou-se a média para cada temperatura estudada.

Adicionalmente às notas atribuídas, a partir do momento em que os peixes submetidos ao experimento TCS começavam a apresentar comportamentos relacionados a colapsos fisiológicos, utilizou-se outro critério de separação em fases de acordo com os estudos de Cocking (1958). Na Tabela 4 estão descritas as características comportamentais de cada fase.

Tabela 4. Classificação das fases comportamentais. Adaptada de Cocking (1958).

Fases	Estágio	Sintomas
Fase I	Estresse inicial	Preferência pela parte superior da coluna d'água, deslizam rápida e verticalmente pelo aquário, colisões com o vidro, desequilíbrio horizontal ou vertical, coloração mais escura, rajadas de velocidade.
Fase II	Perda de controle	Boiam lateralmente ou horizontalmente, corpo rígido com movimentos oculares e das nadadeiras peitorais, movimento opercular rápido.
Fase III	Morte	Sem movimentos, apenas com movimentação opercular, que no caso, é a última a cessar.

IV.4. Análise tecidual

IV.4.1. Preparação dos blocos para microscopia de luz

Foram coletados fragmentos de 0,5 X 0,5 cm de músculo dorsal e fígado de cada um dos organismos utilizados (n=129) e fixados em Paraformaldeído 4% tamponado pH 7,2 por 24 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas para Solução Tampão Fosfato 0,1M pH 7,2, que foi trocada a cada 7 dias, até a chegada do material ao Laboratório de Ecofisiologia de Animais Marinhos (IOUSP) em São Paulo. Os frascos com os materiais foram mantidos em geladeira.

No laboratório, os tecidos foram desidratados em série crescente de etanol (70°, 80°, 90°, 100°, 100°), por uma hora em cada concentração e diafanizados em xilol, por duas vezes, durante uma hora cada vez. O xilol é um solvente orgânico miscível em etanol e em parafina que deixa o tecido translúcido (diafanizado). Então, os tecidos foram incluídos em parafina

histológica e permaneceram imersos em estufa a 60°C por duas horas, sendo o composto renovado a cada hora. Foram confeccionados blocos retangulares com base de 3x4 cm. Em micrótomo, foram cortadas secções dos tecidos de 3 µm que foram depositadas em lâminas tratadas com solução 3% de 3-aminopropiltrietoxi-silano em acetona (APES), que devido à reação do silano com o vidro, resulta em uma superfície com maior aderência. Cada lâmina possuía 3 cortes histológicos do mesmo tecido.

As lâminas contendo os cortes de tecidos foram acondicionadas horizontalmente em estufa a 37°C por 24 horas para promover a máxima aderência do corte à lâmina, secagem, desparafinização, e então armazenadas em geladeira até os procedimentos de colorações histológicas ou de imuno-histoquímica.

IV.4.2. Coloração histológica

Os tecidos de músculo e fígado foram corados para melhor compreensão de suas estruturas. Utilizaram-se os corantes Hematoxilina/Eosina, para caracterização microscópica da morfologia celular, com diferenciação entre núcleo e citoplasma; Tricrômio de Masson, para diferenciar fibras musculares e hepatócitos das fibras de colágeno, e Picrossírius red, para diferenciar fibras colágenas que compõem os tecidos conjuntivos de músculo estriado (Behmer *et al.*, 2003).

IV.4.3. Imuno-histoquímica (HIF-1 α e VEGF)

A imuno-histoquímica (IHQ) permite a identificação e a localização de componentes celulares ou teciduais através da reação com anticorpos específicos. É um método bastante confiável, fornecendo resultados reproduzíveis, amplamente utilizados em estudos de síntese e de funcionamento de proteínas celulares. A técnica permite estabelecer com precisão a distribuição, a localização e a intensidade da expressão das proteínas, tais como o fator induzido por hipóxia, HIF-1 α , e fator de crescimento do endotélio vascular, VEGF, objetos deste estudo.

Para a localização celular/tecidual das proteínas HIF-1 α e VEGF foi utilizado o método de peroxidase indireta, utilizando-se os anticorpos monoclonais descritos na Tabela 5. Este método foi aplicado nos tecidos hepático e muscular de peixes *T. carolinus* e em fígado de rato, *Ratus norvegicus*, para verificar a especificidade da marcação das proteínas de estudo.

Tabela 5. Relação dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Clone (Isotipo)	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor
HIF-1 α	Monoclonal [H6536]	Camundongo	1:300	Sigma®
VEGF	Monoclonal [SAB3300042]	Camundongo	1:400	Sigma®

O processo de IHQ foi iniciado com a hidratação progressiva dos preparados permanentes de fígado e músculo. Em cubeta histológica, os tecidos passaram duas vezes por xilol absoluto durante 15 minutos cada vez. A seguir, foram mergulhados em concentrações decrescentes de etanol em água (100°, 95° e 70°), água destilada e tampão citrato 0,01M pH 6, por 5 minutos

em cada banho. Após a hidratação, o material foi aquecido em tampão citrato (pH 6 a 95°C), durante 20 minutos, para recuperação antigênica. Durante a fixação em formol, é comum a formação de pontes cruzadas (*cross links*), mascarando os sítios antigênicos de interesse e, portanto, dificultando o reconhecimento antígeno/anticorpo. Porém, essa reação pode ser reversível, com o tratamento com tampão citrato pH 6, a 95°C. Essa reação desmascara os epítomos, facilitando a reação do antígeno com o anticorpo (Figura 5).

Figura 5. Processo de recuperação antigênica pelo calor (HIER - *heat-induced epitope retrieval*) (Ramos-Vara, 2005).

A seguir, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada, por 2 minutos cada vez, e com tampão ICC (solução de lavagem que consiste em um tampão fosfato salino, PBS, com Triton X-100) durante 5 minutos. Essas lavagens foram feitas em cubetas histológicas com agitação leve.

Com o auxílio de uma bomba a vácuo acoplada a uma mangueira de sucção com ponteiros estéreis em sua extremidade, retirou-se grande parte da água das lâminas, sem deixar o tecido secar. Com uma caneta histológica, foi feito um círculo ao redor de cada tecido, que funciona como uma barreira para

que a solução permaneça no corte. Das soluções descritas a seguir, foram colocadas entre 40-60 μ L sobre cada preparado histológico. As lâminas então permaneceram na posição horizontal em ambiente úmido, para evitar a evaporação das soluções.

A primeira solução utilizada foi para o bloqueio das peroxidases endógenas. Esse bloqueio é feito com 3% de peróxido de hidrogênio em água, reduzindo a zero a atividade dessas enzimas nos tecidos. As peroxidases estão presentes em muitos tecidos, e precisam ser bloqueadas, pois o cromógeno utilizado reage com elas no processo de coloração. Em seguida, foram efetuadas três lavagens com tampão ICC por 5 minutos cada, e logo a seguir as proteínas foram bloqueadas durante 25 minutos. O bloqueio é feito com caseína, uma proteína hidrofóbica que diminui as ligações inespecíficas dos anticorpos primário e secundário ao tecido.

Após tais procedimentos, a solução bloqueadora de proteínas foi removida da superfície dos cortes com o auxílio da ponteira estéril acoplada a uma bomba a vácuo e o anticorpo primário foi colocado sobre os tecidos e incubado por 20 horas, na geladeira. Cada lâmina possuía três cortes histológicos. No primeiro, pingou-se apenas tampão citrato, funcionando como controle negativo, pois não deve expressar a marcação das proteínas. Os outros dois cortes recebiam os anticorpos primários.

No dia seguinte, o anticorpo primário foi retirado dos cortes com auxílio da ponteira estéril acoplada a bomba a vácuo, e realizadas três lavagens com tampão ICC, durante 5 minutos cada. Seguindo, adicionou-se o anticorpo secundário conjugado à biotina por 15 minutos. A biotina é uma vitamina que possui um sítio de ligação pela estreptavidina, com a qual possui grande

afinidade, e pode se ligar a uma macromolécula, no caso ao anticorpo, por outro sítio. Após três lavagens com tampão ICC, os cortes receberam a solução amplificadora de estreptavidina conjugada à peroxidase por 15 minutos. A estreptavidina possui quatro sítios de ligação com a biotina, amplificando assim a sensibilidade do cromógeno. A peroxidase é conjugada à estreptavidina, pois oxida o cromógeno, formando um precipitado marrom no local onde se encontra a peroxidase (Figura 6). Após esse período, os cortes foram novamente lavados, por três vezes, com tampão ICC e então foi colocado o cromógeno DAB (3,3'-diaminobenzidine), durante 90 segundos. A solução de coloração é preparada misturando-se o cromógeno (solução cromógena de 3,3'-diaminobenzidine) com um tampão (DAB + substrate buffer, contendo solução tampão pH 7,5 e peróxido de hidrogênio). O peróxido de hidrogênio contido no tampão auxilia na oxidação do DAB.

Ao término deste processo, as lâminas foram lavadas com água destilada duas vezes por 5 minutos cada vez, e então, contra coradas com hematoxilina, por 50 segundos. Para retirada do excesso de hematoxilina, as lâminas passaram por água corrente durante 20 minutos. Em seguida, foram desidratadas por meio de banhos de soluções crescentes de etanol em água destilada (70%, 80%, 90%, 100% e 100% de etanol), por 2 minutos em cada concentração. Para a retirada de toda água do tecido, as lâminas foram embebidas em xilol, por duas vezes, durante 2 minutos cada vez, e cobertas com lamínulas em meio de montagem.

Figura 6. Processo de IHQ método de peroxidase indireta, utilizando anticorpo secundário biotinizado, estreptavidina conjugada à peroxidase, e cromógeno DAB (Ramos-Vara, 2005).

Após a secagem (72 horas) as lâminas foram fotomicrografadas em microscópio de luz acoplado a câmera digital, e as imagens foram capturadas utilizando-se o software específico.

IV.4.3.1. Contagem das células positivas

A IHQ pode ser considerada como um método semiquantitativo, pois permite a visualização e semiquantificação das células marcadas. O método de contagem das marcações utilizado foi o denominado H-Score, com modificações (Flanagan *et al.*, 2008; Kraus *et. al*, 2012; McCarty Jr. *et al.*, 1985). A intensidade de coloração foi dividida em quatro classes, variando de 0=nenhuma marcação, 1= pouca marcação, 2= marcação moderada e 3= forte marcação (Figura 7). Para a identificação de cada classe foi estabelecido um padrão para cada tecido. A contagem de células foi feita com o programa gratuito Image J (IJ 1,45m), através da ferramenta “contagem de células”.

Figura 7. Classes de coloração da IHQ para contagem de célula. As Figuras correspondentes as letras A a D são de fígado, as correspondentes as letras E a H, de músculo de peixe *T. carolinus*. A e E: classe 0, nenhuma marcação; B e F: classe 1, pouca marcação; C e G: marcação moderada; D e H: forte marcação.

A partir dos valores da contagem obtidos, somou-se a porcentagem das células coradas, conforme a equação a seguir. Os resultados podem variar de 0 (nenhuma marcação) a 300 (marcação intensa).

$$\text{H-SCORE modificado} = \sum P_i (i)$$

onde

$i = 0, 1, 2$ e 3 (intensidade de coloração);

P_i varia de 0 a 100% (quantidade de células coradas em cada classe)

A partir dos valores do H-Score, calcularam-se as médias e desvios-padrão para cada caso, para ambos os tecidos, fígado e músculo. As comparações múltiplas entre os grupos foram realizadas através de análises estatísticas ANOVA não-paramétricas de Kruskal – Wallis e pelo teste *a posteriori* de Newman-Keuls, sendo $\alpha = 0,05$. Os testes foram feitos com o auxílio do programa “BioStat 5.0”.

IV.4.3.2. Relação da expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF

Com os valores do H-Score averiguou-se a relação das expressões das proteínas em estudo, HIF-1 α e VEGF. Sabe-se que a hipóxia é um dos mais potentes estimuladores do VEGF, portanto, nessas condições o HIF-1 α seria o indutor (Fátima & Papa, 2010).

Para a avaliação da relação entre as expressões proteicas, aplicou-se a análise de regressão linear simples com o programa “Statistica 11”, onde a variável dependente foi o VEGF, e a independente o HIF-1 α (Wong *et al.*, 2003).

IV.4.3.3. Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

Imediatamente após o término de cada experimento, fragmentos de fígado de três animais testados de cada grupo, escolhidos aleatoriamente, foram cortados em tiras de aproximadamente 1mm x 1mm x 3mm. Essas tiras foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% (Sigma®) por 24 horas. Esse composto tem a capacidade de “amarrar” as proteínas, preservando estruturas, impedindo distorções e auxiliando na permeabilidade do tecido à resina no processo de inclusão. Após esse período, os tecidos foram lavados três vezes em solução tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) por 15 minutos. Posteriormente, foi realizada a pós-fixação em solução de tetróxido de ósmio (Osmium Tetroxyde, Eletron Microscopy Science) a 2% em solução tampão fosfato de sódio por 2 horas a 4°C. Esse fixador secundário juntamente com o glutaraldeído, favorece uma melhor preservação das membranas e na concentração utilizada, escurece o material (Figura 8).

Figura 8. Ação aditiva do glutaraldeído (azul) e tetróxido de ósmio (preto) na estrutura da membrana plasmática, apresentando bicamada lipídica e proteínas trans-membrana (vermelho).

Sucessivamente, o material foi lavado três vezes, por 5 minutos cada, em solução salina 0,9% e colocados em um terceiro fixador, o acetato de uranila a 0,5% por 20 horas. O acetato de uranila é um sal usado para contrastar o material e também auxiliar na preservação da membrana. No dia subsequente, os tecidos foram desidratados em séries crescentes de alcoóis a partir de 50%, passando por 70%, 80% e 90% até o absoluto, por 15 minutos em cada concentração, sendo repetido 4 vezes em álcool puro. Iniciou-se então a infiltração em resina Spurr® (Low Viscosity Embedding Kit, Electron Microscopy Science) na proporção de 1:2 (Spurr : etanol) durante 3 horas, 1:1 overnight, 3:1 por 3 horas e resina pura overnight, à temperatura ambiente, em misturador rotatório. Apesar de a resina Spurr ser de baixa viscosidade, o que facilita sua entrada no tecido, sua utilização deve ocorrer a diluições graduais, para que ela penetre totalmente no tecido. A diluição é feita em etanol, que é compatível com esse reagente. Após este período, trocou-se novamente a resina, substituída por resina pura e deixando em estufa a 37°C por 1 hora. Ao

término deste processo, foi feita a inclusão final do material, em resina pura, ficando em estufa por 24 horas a 60-70°C.

Após a polimerização, foi feita a trimagem dos blocos e obtidos cortes semifinos de 1-3 μm em ultramicrotomo Reichert Ultra Cut utilizando faca de vidro. As secções foram coradas em azul de toluidina para o exame ao microscópio de luz e localização das áreas de interesse. Uma vez as áreas localizadas, fez-se cortes ultrafinos, de 60 nm de espessura, a partir dos cortes semi-finos. Estes foram feitos em ultramicrotomo Reichert Ultra Cut com faca de diamante e coletados em telas de cobre (Eletron Microscopy Sciences) de 200 “mesh”. Em seguida, as telas foram contrastadas com a solução de acetato de uranila 4% ou citrato de chumbo 0,4%, examinadas e capturadas em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1010 e Morgani 268D).

IV.4.3.4. Densidade e área mitocondrial

O processo de amostragem teve início com uma seleção aleatória de 3 blocos de tecido hepático de 1 animal por experimento (22°C, 30°C, 34°C, 36°C e TCS). Um corte único de cada bloco forneceu 10 micrografias, selecionadas aleatoriamente sem sobreposição de regiões, resultando em um total de 30 micrografias de cada tecido por experimento, totalizando 150 micrografias. Os campos foram selecionados randomicamente e foram realizadas eletrofotomicrografias com aumento intermediário (7500x) com foco na mitocôndria. A identificação desta e das demais organelas presentes nas imagens foi realizada segundo Alberts (1997) e Junqueira (2000). O número total de mitocôndrias e a medida da área de cada uma delas, em cada

eletrofotomicrografia, foi estabelecido através do software gratuito ImageJ (IJ 1,45 m) para análise e processamento das imagens digitais.

Calcularam-se as médias e desvios-padrão para cada caso, e verificou-se a normalidade da distribuição através do teste Kolmogorov-Smirnov, considerando um grau de confiança de 95%. Para dados não paramétricos, aplicou-se Testes Mann-Whitney para comparação das médias dos diferentes grupos de temperaturas com o controle. Para dados paramétricos, aplicou-se o teste t de Student, sendo $p = 0,05$. O programa “BioStat 5.0” foi usado para as análises estatísticas descritas.

Resultados

V. RESULTADOS

V.1. Testes de aquecimento

Diversos testes foram feitos para regular o sistema de aquecimento de água, de forma que a temperatura da água de um aquário de 40 litros aumentasse à taxa de $0,1^{\circ}\text{C}$ a cada 3 minutos, ou seja, 2°C/hora . Nos testes foram utilizados aquecedores de diferentes potências, ajustados a diferentes voltagens: aquecedor de 150W ajustados a 95 e 70V, aquecedor de 300W a 100V, e aquecedor de 300W acoplado ao controlador de temperatura CDP-48U12, ajustado para 40% de sua potência. Para os testes com aquecedores ajustados a diferentes voltagens, testou-se o isolamento dos aquários com isopor para evitar a perda de calor da água para o ambiente (Figura 9). Já os testes com o controlador de temperatura CDP-48U12, foram avaliados com uma ou duas bombas submersas, visando uma melhor homogeneização da água (Figura 10).

Figura 9. Testes realizados para o ajuste do sistema para o aumento gradual da temperatura de 0,1°C a cada 3 minutos, ou seja, 2°C/hora. A: variação de temperatura da água com aquecedor de 150W a 70V; B: variação de temperatura da água com aquecedor de 150W a 95V. Neste caso, o aquário foi isolado com isopor para prevenir a perda de calor da água para a atmosfera; C: variação de temperatura da água com aquecedor de 300W a 100V.

Notou-se que nos aquários onde o controlador foi utilizado, a variação de temperatura foi menor e a taxa de aquecimento almejada se manteve durante o período do experimento. Nos aquários com duas bombas submersas houve uma melhor homogeneização da água e, conseqüentemente, uma menor variação da temperatura, se comparado à água do aquário com apenas uma bomba submersa (Figura 10).

Figura 10. Variação da taxa de aumento da temperatura a cada hora, controlado pelo aparelho CDP – 48U12. A: homogeneização da água do aquário com uma bomba submersa; B: homogeneização da água do aquário com duas bombas submersas acopladas a canos de PVC fenestrados.

A partir desses resultados, foi comprovada a maior eficiência do sistema com controlador de temperatura CDP-48U12, ligado a um aquecedor de 300W, ajustado a 40% de sua potência, utilizando-se duas bombas submersas para homogeneização da água.

V.2. Parâmetros físico-químicos

No início e no final de cada experimento foi medido o oxigênio dissolvido. A medição nos grupos experimentais (GI-GV) foi realizada ao final da segunda hora que o aquário estava em cada temperatura testada (26°C, 30°C, 32°C, 34°C e 36°C). A água do mar dos aquários utilizados estava saturada de oxigênio (Tabela 6). A temperatura da água do grupo TCS foi medida quando cada um dos peixes veio a óbito, e o oxigênio dissolvido foi medido quando o último peixe faleceu. A temperatura inicial de todos os experimentos foi de 22°C. As mesmas medições feitas nos grupos experimentais foram feitas nos respectivos controles (GVI-GX).

Tabela 6. Médias e desvios padrão da quantidade de oxigênio dissolvido nos grupos experimentais (GI-GV) e controle (GVI-GVIII). TCS: temperatura crítica de sobrevivência.

Experimental	Inicial (mg/L)	Final (mg/L)	Experimental	Inicial (mg/L)	Final (mg/L)
GI	6.19 ±0.61	5.22±0.04	GVI	5.65±0.1	5.82±0.01
GII	5.14±0.12	4.97±0.32	GVII	5.69±0.05	5.90±0.13
GIII	5.67±0.07	5.54±0.19	GVIII	5.60±0.01	5.53±0.01
GIV	6.12±0.36	4.82±0.12	GIX	6.32±0.32	5.89±0.14
GV	6.15±0.22	5.15±0.61	GX	5.88±0.03	5.90±0.06
TCS	5.77±0.15	5.42±0.78	TCS	6.13±0.18	6.03±0.04

Os altos níveis de oxigênio encontrados ao final de cada experimento indicam a eficiência do sistema de aeração. Os valores variaram entre 6,32 e 4,82 mg/L. São considerados valores normais de oxigênio dissolvidos na água os acima de 2 mg/L (Rabalais *et al.*, 1994).

V.3. Análise dos organismos utilizados

V.3.1. Comprimento total dos animais

Durante a realização do trabalho, foram eutanasiados 129 peixes. A média de comprimento dos peixes utilizados em nossos experimentos foi de 6,19 cm ($\pm 1,35$). A Figura 11 mostra a média de tamanho dos juvenis por condição experimental.

Figura 11. Médias de comprimento total e desvios-padrão dos animais por experimento: controle ambiental (CA), temperaturas experimentais e temperatura crítica superior (TCS).

V.3.2. Análise de óbitos - Experimento TCS

Durante os experimentos nos quais a temperatura da água subiu até 36°C (n=45) não houve óbito de nenhum peixe, assim como em seus respectivos controles (n=45). Nos experimentos em que o objetivo foi encontrar a temperatura crítica limite superior (TCS) dos animais, o primeiro óbito ocorreu na temperatura de 37,1°C, e o último a 38,6°C (média: $38 \pm 0,48$ °C). A figura a seguir (Figura 12) discrimina a temperatura de morte de cada peixe utilizado nesse experimento (n=18) e a média geral. Nota-se que pouco mais de 50% dos animais morreram a uma temperatura acima de 38°C.

Figura 12. Experimento de TCS: Regressão linear entre a variação de temperatura e a taxa de mortalidade de *T. carolinus*. Discriminação da temperatura em que cada peixe veio a óbito; “X” representa a temperatura onde 50% dos peixes morreram; linha de tendência com valor $r^2=0,98$, indicando relação significativamente positiva da taxa de mortalidade em função do aumento de temperatura.

Observou-se uma tendência dos animais maiores a morrerem antes que os menores. O maior peixe morreu à 37,1°C e o menor peixe à 38,5°C (Figura 13). Essa relação, entretanto, não foi estatisticamente significativa.

Figura 13. Regressão linear entre o comprimento de mortalidade e a temperatura letal de *T. carolinus*. Animais maiores morreram antes que os menores. O baixo valor de $r^2 = 0,49$, entretanto, evidencia que não há relação entre o tamanho dos peixes e a temperatura letal.

Os resultados revelam que o aquecimento a partir da temperatura de 22°C até a 37,1°C ainda é suportada pela espécie *T. carolinus* sem que nenhum animal tenha sofrido alterações patológicas suficientes para o óbito. Por outro lado, temperaturas no intervalo entre 37,1 a 38,6°C levaram rapidamente ao óbito de 100% dos animais nas condições testadas.

V.4. Análise comportamental

A análise dos parâmetros equilíbrio, natação e batimento opercular mostraram que houve alterações comportamentais em relação ao aquecimento da água. As alterações mais evidentes e os animais mais afetados são os do experimento TCS. Na Figura 14 estão representadas as médias das pontuações atribuídas aos critérios avaliados, nas diferentes temperaturas.

Figura 14. Médias das pontuações atribuídas a cada um dos parâmetros comportamentais avaliados em cada um dos grupos, submetidos a diferentes temperaturas (n=42).

As pontuações dos parâmetros **equilíbrio**, **natação** e **batimento opercular** para cada temperatura foram somados, resultando na pontuação total que pode variar de 0 a 15. Este procedimento foi adotado para facilitar a

comparação das alterações comportamentais entre os grupos testados (Figura 15).

Figura 15. Soma das pontuações dos critérios comportamentais avaliados (equilíbrio, natação e batimento opercular) a cada temperatura (grupos testados).

O comportamento dos indivíduos do grupo 22°C (grupo controle experimental) foi considerado normal durante todo o período de observação, correspondente a pontuação total igual a 15. Apresentavam coloração prateada e amarelada nas nadadeiras anal e caudal.

A 26°C e a 30°C, os peixes não apresentaram alterações comportamentais significativas. Nadavam em grupos, porém mais agitados se comparados com o grupo controle, e os submetidos a 30°C mais agitados se comparados aos a 26°C. Aos 32°C e 34°C, os *T. carolinus* tiveram natação

acelerada, assim como os batimentos operculares. Houve início de comportamento alterado para o equilíbrio dos peixes, com colisões ocasionais nas paredes dos aquários. No grupo submetido a 36°C, as alterações comportamentais foram mais intensas, em todos os parâmetros analisados, sendo que alguns animais já apresentavam comportamento de desequilíbrio horizontal e lateral. Ao retornarem à temperatura ambiental todos os animais permaneceram vivos e retomaram o comportamento normal.

Acima de 36°C, no experimento TCS, houve redução das atividades dos peixes, que apresentaram equilíbrio e propriocepção comprometidos, com comportamento de desequilíbrio horizontal e lateral e sendo “arrastados” pela corrente formada pela presença das bombas submersas. A natação tornou-se fraca assim como os batimentos operculares que, de forma gradativa, foram diminuindo até a ocorrência do óbito.

Segundo a classificação sugerida por Cocking (1958), a fase I ocorreu entre as temperaturas de 36°C e 37°C, às quais os peixes apresentavam natação bastante agitada, colidiam com a parede do aquário e demonstravam desequilíbrio lateral e horizontal. A pontuação total representativa dessa fase foi 6. A fase II, com pontuação total 4,5, que ocorreu nas temperaturas 37°C e 38°C, foi caracterizada pela redução das atividades natatórias dos peixes, que boiavam lateralmente. O batimento opercular continuou acelerado. A fase III, pontuação total 3, foi caracterizada por perda de atividade natatória, decúbito lateral, espasmos, diminuição de movimentos operculares seguido de morte (Figura 16). Após a morte, os peixes apresentaram coloração bastante escura e quantidade significativa de muco sobre o corpo, em comparação com os peixes dos aquários dos controles.

Figura 16. Representação das fases I, II e III da resposta comportamental de peixes submetidos ao estresse térmico em relação às pontuações totais obtidas nas avaliações comportamentais (0 a 15).

Assim, entre as temperaturas 22°C a 36°C, as alterações comportamentais registradas foram leves, aumentando proporcionalmente e gradativamente ao aumento da temperatura. Isso gerou um decréscimo na pontuação de todos os parâmetros observados. Aos 36°C, os peixes apresentaram alterações consideráveis, com perda de equilíbrio, natação lenta e batimento opercular acelerado. Acima dessa temperatura, houve perda da propriocepção e decúbito lateral, redução da natação e do batimento opercular, finalizando com o óbito do animal.

V.5. Análise tecidual

V.5.1. Coloração histológica

Por meio da técnica de coloração histológica Hematoxilina-Eosina (HE), os componentes celulares acidófilos, como o núcleo e proteínas, são corados pela hematoxilina com tons azulados/arroxeados, e as estruturas como o citoplasma e fibras colágenas basófilas são coradas pela eosina, em tons rosados. O Tricrômio de Masson cora o citoplasma, a queratina, as fibras musculares e intercelulares e as fibrinas de rosa/vermelho/arroxeados; as fibras colágenas, o muco, a cartilagem e os ossos de azul; por fim, o núcleo é corado de azul ou azul escuro. A outra coloração utilizada foi o Picrossírius red, para diferenciar fibras colágenas dos demais tecidos (Figura 17).

Figura 17. Fotomicografias de músculo e fígado. A (músculo) e B(fígado): coloração HE – evidenciando núcleo com coloração azulada, e citoplasma rosada; C (músculo) e D (fígado): coloração Tricrômico de Masson – vermelho ou rosa - citoplasma, queratina, fibras musculares, fibras intercelulares, fibrina. Azul – fibras colágenas. E (músculo) e F (fígado): evidenciando fibras colágenas

Localizado ventralmente na cavidade celomática, o fígado de *T. carolinus* possui três lobos quando visto macroscopicamente (Figura 18) não sendo possível identificá-las microscopicamente.

Figura 18. Visão macroscópica de fígado de peixe *T. carolinus*, apresentando três lobações

O órgão é envolvido por uma fina camada de tecido conjuntivo, uma capsula fibrosa. O parênquima é composto principalmente por hepatócitos distribuídos de forma homogênea, com formato poliedral, núcleos grandes e arredondados, localizados na região central da célula e com nucléolo proeminente. Essas células possuem distribuição cordonal, e entre elas, são encontrados vasos sanguíneos (sinusóides) irregularmente distribuídos, revestidos de células endoteliais. Veias e ductos biliares são aleatoriamente localizados por todo parênquima (Figura 19).

Figura 19. Fotomicrografias de fígado. A: hepatócitos com formato poliedral (seta pontilhada); núcleos grandes, arredondados e localizados na região central da célula (seta tracejada e pontilhada); vasos sinusóides (seta inteira). A reta representa a distribuição cordonal dos hepatócitos. Coloração HE. B: parênquima com arranjo homogêneo, e vasos sanguíneos (V) e ductos biliares (DB) localizados aleatoriamente. Coloração Picrossirius. C: células endoteliais (seta inteira) revestindo vaso sanguíneo com hemácias em seu interior (seta tracejada). Coloração: Tricômio de Masson.

A microscopia eletrônica de transmissão permitiu a visualização de organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático, canalículo biliar, espaço de Disse (espaço subendotelial que contém microvilos dos hepatócitos), lisossomos, peroxissomos e também a cromatina condensada no núcleo (Figura 20).

Figura 20. Fotomicrografias de fígado, em microscopia eletrônica de transmissão evidenciando a presença de organelas como mitocôndrias (m), retículo endoplasmático (RE), espaço de Disse (ED), peroxissomos (P) e também a cromatina condensada espalhada pelo núcleo (N).

O músculo é composto por estruturas alongadas, as fibras musculares ou miócitos. São células de formato cilíndrico quando vistas em cortes longitudinais, e poliédricos quando em secções transversais (Figura 21).

Figura 21. Fotomicrografias de músculo em corte transversal (formato poliédrico) e corte longitudinal (formato alongado).

Os miócitos são multinucleados, seus núcleos são ovais e localizados na periferia da célula, característica que diferencia o músculo estriado esquelético do cardíaco (Figura 22). O músculo esquelético possui muitos filamentos, as miofibrilas.

Figura 22. Fotomicrografias de músculo A: músculo esquelético, evidenciando núcleos na periferia das fibras musculares; B: músculo cardíaco, com núcleos centralizados. As setas mostram os núcleos. Coloração HE.

Cada célula ou fibra muscular é envolvida por tecido conjuntivo, o endomísio. Conjuntos de fibras musculares estão organizados em grupos denominados fascículos, revestidos pelo tecido conjuntivo denominado perimísio. Um conjunto de fascículos forma o músculo que está envolvido por tecido conjuntivo, o epimísio. A membrana plasmática das células muscular chama-se sarcolema, e citoplasma, denomina-se sarcoplasma. As fotomicrografias revelam as fibras colágenas e sua inserção com o músculo esquelético (Figura 23).

Figura 23. As fibras musculares são envolvidas por tecido conjuntivo. A: Epimísio (cabeça de seta), perimísio (seta inteira) e endomísio (seta tracejada). Coloração Picrosirius. B: Epimísio envolvendo todas as fibras musculares. Coloração Tricômio de Masson.

As imagens abaixo (Figura 24), feitas em microscópio eletrônico de transmissão, mostram as estriações das miofibrilas. As faixas mais escuras recebem o nome de banda A, e as claras, banda I. No centro da banda A, existe a banda H, e no centro da banda I, existe a linha Z. O intervalo entre duas linhas Z delimita o sarcômero, unidade que possui proteínas que permitem a contração muscular.

Figura 24. Microscopia eletrônica de músculo esquelético. As faixas mais escuras são bandas A, que são divididas pelas bandas H. As mais claras, são bandas I, divididas pelas linhas Z.

V.5.2. Imuno-histoquímica

Os resultados correspondentes à imunolocalização das proteínas estudadas HIF-1 α e VEGF no fígado e músculo de *T. carolinus* e sua interpretação quali-quantitativa através do HScore demonstram que ocorre uma variação passível de ser avaliada entre os grupos experimentais e controles.

Todas as lâminas utilizadas para a IHQ possuíam seu controle negativo, no qual não foi adicionado o anticorpo primário. A marcação representaria a presença do anticorpo, portanto a expressão proteica. Dessa forma, esses controles, se não marcados, demonstram a confiabilidade dos resultados. Nas IHQ feitas neste trabalho, nenhum controle negativo apresentou marcações (detalhes nas Figuras 25 a 28).

V.5.2.1.Fator Induzido por Hipóxia (HIF-1 α)

A proteína HIF-1 α tanto no fígado quanto no músculo apresentou expressão citoplasmática nas células parenquimatosas (Figuras 25 e 26). Em fígado, na temperatura de 36°C, além da marcação citoplasmática, alguns núcleos também foram marcados.

Pela observação das fotomicrografias, peixes do grupo controle ambiental (CA) coletados na praia na hora de captura apresentaram maior expressão do HIF-1 α , se comparados aos peixes controle experimental, 22°C. A partir desta (22°C), a marcação foi crescendo conforme o aumento da temperatura. Assim, a menor expressão encontrada foi no grupo 22°C e a maior a 36°C. No experimento no qual os animais foram expostos à temperatura crítica de sobrevivência (TCS) houve pouca expressão. (Figura 25).

No músculo, a expressão do HIF-1 α foi baixa no grupo 22°C, e aumentou até 32°C, pico visual da expressão proteica. Nas temperaturas subsequentes, a expressão diminuiu suavemente até 36°C. Em CA e TCS a expressão desta proteína foi baixa (Figura 26).

Figura 25. Fotomicrografia de fígado de *Trachinotus carolinus*. A) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal controle ambiental: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. (c) Detalhe: Controle negativo IHQ. B) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal controle do experimento, mantido a temperatura ambiental de 22°C: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. C) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 26°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. D) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 30°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. E) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 32°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. F) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 34°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. G) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 36°C: Citoplasma e núcleo positivo para HIF-1alpha em hepatócitos. H) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido até o aquecimento letal: Citoplasma negativo para HIF-1alpha em hepatócitos. Barra: 20 µm.

Figura 26. Fotomicrografia de músculo de *Trachinotus carolinus*. A)) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal controle ambiental: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. (c) Detalhe: Controle negativo IHQ Barra: 20 µm. B) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal controle do experimento, mantido a temperatura ambiental de 22°C Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas das fibras musculares. C) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 26°C: Núcleo positivo para HIF-1alpha nas fibras musculares. D) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 30°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha nas fibras musculares. E) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 32°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha nas fibras musculares. F) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 34°C: Citoplasma positivo para HIF-1alpha nas fibras musculares. G) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 36°C: Citoplasma negativo para HIF-1alpha nas fibras musculares. H) IHQ anti-HIF-1alpha/hematoxilina de animal submetido até o aquecimento letal: Citoplasma negativo para HIF-1alpha nas fibras musculares. Barra: 20 µm.

V.5.2.2. Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF)

A proteína VEGF marcou o citoplasma tanto dos hepatócitos quanto das fibras musculares (Figuras 27 e 28). A marcação observada nas fotomicrografias foi semelhante tanto para fígado como para músculo dos peixes *T. carolinus* submetidos ao aquecimento gradual da temperatura.

Houve um aumento da expressão a partir do controle experimental 22°C até 30°C, seguido de queda a 32°C, e aumento a 34°C, em ambos os tecidos. O pico da expressão proteica foi a 34°C. A 36°C, houve uma suave queda da expressão em fígado e uma diminuição mais acentuada no músculo, se comparada a 34°C.

Hepatócitos de peixes amostrados logo após a coleta (CA) e TCS apresentaram baixa expressão da proteína em questão. Fibras musculares não marcaram a proteína em CA, e apresentaram baixa expressão em TCS (Figuras 27e 28).

Figura 27. Fotomicrografia de fígado de *Trachinotus carolinus*. A) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal controle de experimento: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. Barra: 20 µm. (c) Detalhe: Controle negativo IHQ. B) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal mantido a temperatura ambiental de 22°C: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. C) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 26°C: Citoplasma positivo para VEGF em hepatócitos. D) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 30°C: Citoplasma positivo para VEGF em hepatócitos. E) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 32°C: Citoplasma positivo para VEGF em hepatócitos. F) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 34°C: Citoplasma positivo para VEGF em hepatócitos. G) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 36°C: Citoplasma e núcleo positivo para VEGF em hepatócitos. H) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido até o aquecimento letal: Citoplasma negativo para VEGF em hepatócitos. Barra: 20 µm.

Figura 28. Fotomicrografia de músculo de *Trachinotus carolinus*. A) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal controle de experimento: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas. (c) Detalhe: Controle negativo IHQ. B) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal mantido a temperatura ambiental de 22°C: Expressão fisiológica da proteína nos citoplasmas das fibras musculares. C) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 26°C: Citoplasma positivo para VEGF nas fibras musculares. D) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 30°C: Citoplasma positivo para VEGF nas fibras musculares. E) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 32°C: Citoplasma positivo para VEGF nas fibras musculares. F) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 34°C: Citoplasma positivo para VEGF nas fibras musculares. G) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido ao aquecimento de 36°C: Citoplasma e núcleo positivo para VEGF nas fibras musculares. H) IHQ anti-VEGF/hematoxilina de animal submetido até o aquecimento letal: Citoplasma negativo para VEGF nas fibras musculares. Barra: 20 µm.

V.5.2.3. Expressão de HIF-1 α e VEGF em *Ratus norvegicus*

Para verificar a especificidade da marcação das proteínas estudadas, realizou-se IHQ em fígado de rato, *Ratus norvegicus*, como controle positivo. A partir das fotomicrografias observou-se que as expressões de HIF-1 α e VEGF em hepatócitos de ratos foram muito semelhantes àsquelas encontradas em hepatócitos de peixes, corroborando com o fato de que estas proteínas são conservadas filogeneticamente (Figura 29).

Figura 29. Fotomicrografias de fígado de *Ratus norvegicus*. A: expressão de HIF-1 α em tecido submetido a IHQ. Detalhe: controle negativo. B: expressão de VEGF em tecido submetido a IHQ.

V.5.3. Análise quantitativa da IHQ (HScore)

A partir da IHQ, foram contadas as quantidades de hepatócitos e fibras musculares marcadas de acordo com sua intensidade pelo método HScore (Kraus *et al.*, 2012). A pontuação mínima 0, indica nenhuma expressão da proteína, e a máxima 300, indica máxima expressão.

V.5.3.1. HScore do grupo CA

O HScore referente à expressão proteica do HIF-1 α e do VEGF em tecido hepático e muscular dos peixes *T. carolinus* eutanasiados no momento de coleta foram comparados com os controles experimentais (22°C). Essa comparação foi realizada para avaliar possíveis efeitos do período de repouso em cativeiro dos peixes após a coleta.

As análises demonstraram que houve diferença significativa na expressão da proteína HIF-1 α e VEGF em fígado, sendo a maior expressão em CA, comparando-as com a do controle experimental (22°C). Entretanto, fibras musculares não mostraram diferença estatística para HIF-1 α (Figura 30).

Figura 30. Comparação entre as médias de HScore entre os controles ambiental (CA) e experimental (22°C). Houve diferença significativa entre os controles no fígado de ambas as proteínas, HIF-1 α e VEGF e em músculo para a proteína VEGF. * indica diferença significativa com $p < 0,05$.

V.5.3.2. HScore dos grupos Experimentais

Neste tópico serão apresentados os resultados de HScore dos peixes submetidos ao aumento de temperatura e de seus controles. Portanto, serão consideradas as seguintes temperaturas: 22°C (controle experimental), 26°C, 30°C, 32°C, 34°C e 36°C, que serão comparadas entre si.

- ***Expressão da proteína HIF-1 α***

No tecido hepático, a proteína HIF-1 α não apresentou expressão no grupo 22°C. Nas temperaturas seguintes, houve aumento gradativo da expressão (Figura 31).

Como a expressão a 22°C foi nula, não foi feita análise estatística. Porém, comparando-se os grupos experimentais, peixes submetidos ao aumento até 36°C apresentaram marcações estatisticamente diferentes daqueles aquecidos até 26°C ($p < 0,05$) e 30°C ($p < 0,05$). O restante dos grupos não apresentou diferença na expressão do HIF-1 α em fígado.

O pico visual da expressão desta proteína foi à temperatura de 36°C (Figura 31).

HIF-1α em Fígado	22°C	26°C	30°C	32°C	34°C
26°C	-	ns	ns	ns	ns
30°C	-	ns	ns	ns	ns
32°C	-	ns	ns	ns	ns
34°C	-	ns	ns	ns	ns
36°C	-	p<0,05	p<0,05	ns	ns

Figura 31. O gráfico apresenta valores obtidos no HScore da proteína HIF-1α em fígado de peixes *T. carolinus* em função do aumento da temperatura. Não houve expressão proteica a 22°C. A comparação entre os grupos experimentais mostrou diferença estatística entre os resultados dos grupos 26°C e 30°C com o grupo submetido ao aquecimento de 36°C ($p<0,05$). A tabela representa a diferença estatística encontrada. “ns” não houve diferença significativa para $p>0,05$.

A expressão do HIF-1 α encontrada no músculo foi baixa no grupo controle experimental, 22°C, aumentando nas temperaturas subsequentes até 34°C. Na temperatura de 36°C, houve queda na expressão.

Peixes submetidos à temperatura 22°C (controle experimental) tiveram expressão estatisticamente diferente do grupo submetido ao aquecimento de 32°C ($p < 0,05$). Os animais nos aquários a 36°C tiveram pouca expressão do HIF-1 α , apresentando diferença estatística na expressão se comparados aos submetidos a 26°C ($p < 0,05$), 30°C ($p < 0,05$) e 32°C ($p < 0,01$) (Figura 32).

HIF-1α em Músculo	22°C	26°C	30°C	32°C	34°C
26°C	ns	ns	ns	ns	ns
30°C	ns	ns	ns	ns	ns
32°C	p<0,05	ns	ns	ns	ns
34°C	ns	ns	ns	ns	ns
36°C	ns	p<0,05	p<0,05	p<0,01	ns

Figura 32. Valores obtidos no HScore da proteína HIF-1α em músculo de peixe *T. carolinus* em função do aumento da temperatura. Comparando-se o grupo controle experimental, 22°C com os grupos experimentais, houve diferença estatística na expressão a 22°C com 32°C ($p<0,05$). A comparação entre os grupos experimentais mostrou que os resultados do grupo 36°C são diferentes estatisticamente dos de 26°C, 30°C e 32°C. A tabela representa a diferença estatística encontrada. “ns” não houve diferença significativa para $p>0,05$.

- ***Expressão da proteína VEGF***

A expressão da proteína VEGF nos hepatócitos foi baixa no grupo controle, 22°C. Subsequentemente, houve aumento visual gradativo da expressão desta proteína nas temperaturas 26°C e 30°C, seguida de queda a 32°C, aumento a 34°C e novamente queda a 36°C.

Houve diferença estatística ($p < 0,01$) na expressão do VEGF no grupo controle, 22°C quando comparados com a expressão nos grupos 34°C e 36°C. Houve diferença também ($p < 0,05$) entre a marcação dos animais submetidos ao aquecimento a 34°C e a marcação daqueles submetidos a 32°C (Figura 33).

Figura 33. Valores obtidos no HScore da proteína VEGF em fígado de peixes *T. carolinus* em função do aumento da temperatura. Comparando-se o grupo controle experimental, 22°C com os grupos experimentais, houve diferença estatística na expressão a 22°C com 34°C e 36°C ($p<0,01$). A comparação entre os grupos experimentais mostrou que os resultados do grupo 32°C é diferente estatisticamente do grupo 34°C ($p<0,05$). A tabela representa a diferença estatística encontrada. “ns” não houve diferença significativa ($p>0,05$).

No músculo, a expressão do VEGF no grupo controle experimental 22°C foi baixa, aumentando gradativamente até 30°C. Peixes submetidos à temperatura de 32°C apresentaram queda da expressão. O aquecimento a 34°C gerou maior expressão se comparada à expressão a 32°C e 36°C.

Houve diferença estatística ($p < 0,01$) na expressão do grupo controle 22°C com os grupos 30°C, 34°C e 36°C. Os valores obtidos também evidenciaram diferença estatística na expressão do VEGF em fibras musculares entre o grupo 36°C em comparação aos grupos 30°C e 34°C (Figura 34).

VEGF em Músculo	22°C	26°C	30°C	32°C	34°C
26°C	ns	ns	ns	ns	ns
30°C	p<0,01	ns	ns	ns	ns
32°C	ns	ns	ns	ns	ns
34°C	p<0,01	ns	ns	ns	ns
36°C	p<0,01	ns	p<0,05	ns	p<0,05

Figura 34. Valores obtidos no HScore da proteína VEGF em músculo de peixes *T. carolinus* em função do aumento da temperatura. Comparando-se o grupo controle experimental, 22°C, com os grupos experimentais, houve diferença estatística com os grupos 30°C, 34°C e 36°C ($p<0,01$). Visualmente, nota-se aumento gradativo da expressão da proteína até 30°C, seguida de queda em 32°C, aumento em 34°C e queda em 36°C. Há diferença na expressão do grupo 36°C com 30°C e 34°C ($p<0,05$). “ns”: não houve diferença significativa ($p > 0.05$).

V.5.3.3. HScore do grupo TCS

Os resultados descritos a seguir referem-se ao HScore relacionado à expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF em fígado e músculo de peixes *T. carolinus* submetidos ao aquecimento de temperatura até que os mesmos tivessem o movimento opercular cessado por mais de 1 minuto e perda do estímulo tátil. As expressões proteicas nos diferentes tecidos do grupo TCS foram comparadas às expressões correspondentes do grupo exposto a 36°C.

Comparando-se a expressão do HIF-1 α nos hepatócitos do grupo mantido a 36°C com o grupo TCS, houve diferença significativa ($p < 0,05$). Diferente do fígado, o músculo não apresentou diferença significativa na expressão desta proteína (Figura 35).

Para o VEGF, não houve diferença estatística entre a expressão desta proteína para ambos os tecidos analisados, fígado e músculo (Figura 35).

Figura 35. Comparação das expressões ocorridas às temperaturas experimentais 36°C e TCS. Em fígado de peixes *T. carolinus* expostos e mantidos a 36°C, há maior expressão da proteína HIF-1α, significativamente diferente da expressão encontrada a TCS. O mesmo padrão foi encontrado nos hepatócitos para a proteína VEGF. Em músculo, a expressão tanto do HIF-1α quanto VEGF foi maior em TCS do que a 36°C.

V.5.4. Relação entre a expressão das proteínas HIF-1α e VEGF

As proteínas HIF-1α e VEGF são mediadoras da sobrevivência celular.

Uma das funções do HIF-1α é iniciar a expressão do VEGF. Os resultados a seguir demonstram uma relação da expressão do VEGF em função do HIF-1α.

De modo geral, à medida que há o aumento do HIF-1α, presença da outra proteína também aumenta.

V.5.4.1. Fígado

No fígado, a expressão de ambas as proteínas foi baixa, aumentando da mesma forma até 26°C. A 30°C, o HIF-1 α diminui de forma suave, e volta a aumentar gradativamente, até 36°C. Já a expressão do VEGF aumenta até 30°C, cai a 32°C, volta a aumentar a 34°C e diminui novamente a 36°C (Figura 36). A regressão demonstra linearidade nessa relação ($r^2=0,87$), evidenciando expressão do VEGF em relação ao HIF-1 α (Figura 37).

Figura 36. A Figura demonstra relação entre o aumento da temperatura e a expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF em tecido hepático de peixes *T. carolinus*. Nota-se que a medida que o HIF-1 α aumenta, há um aumento do VEGF, exceto a 32°C e 36°C, onde há aumento do HIF-1 α , e uma diminuição do VEGF.

Figura 37. Relação da expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF em tecido hepático de peixes *T. carolinus* expostos ao aquecimento da água. O gráfico representa o aumento da expressão do VEGF em função do HIF-1 α . A análise de regressão linear apresentou o coeficiente $r^2=0,87$.

V.5.4.2. Músculo

A expressão encontrada em músculo se assemelha àquela encontrada no fígado. No controle experimental, 22°C, a expressão de ambas as proteínas foi baixa, aumentando da mesma forma até 30°C. A 32°C, há uma queda da expressão de ambas as proteínas, que voltam a aumentar a 34°C e diminuem bruscamente a 36°C. Peixes submetidos ao experimento TCS possuem um novo aumento na expressão, se comparados com os de 36°C (Figura 38). Assim como no fígado, a regressão demonstra linearidade na relação de expressão das proteínas VEGF em relação ao HIF-1 α ($r^2=0,72$) (Figura 39).

Figura 38. Relação entre o aumento da temperatura e a expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF em tecido muscular de peixes *T. carolinus*. Nota-se que a expressão do HIF-1 α é acompanhada do VEGF, quando há aumento ou diminuição da expressão do HIF-1 α , o mesmo ocorre com o VEGF.

Figura 39. Expressão do VEGF correlacionada com a expressão do HIF-1 α em tecido muscular de *T. carolinus*. O gráfico representa o aumento do VEGF em função do HIF-1 α . Análise de regressão linear mostrou coeficiente $r^2=0,85$.

V.6. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

V.6.1. Identificação de mitocôndrias

A microscopia eletrônica foi realizada para identificação das mitocôndrias no tecido hepático, devido a maior facilidade de visualização, homogeneidade de distribuição e, portanto, maior confiabilidade dos dados para contagem das mesmas neste tecido. O tecido muscular não foi utilizado, pois as mitocôndrias apresentaram diferença em sua localização citoplasmática. Na periferia das células musculares, houve áreas de muita concentração e sobreposição de mitocôndria. Nas miofibrilas, houve áreas de ausência destas organelas (Figura 40).

Figura 40. Eletromicrografias de transmissão de tecido muscular de peixe *T. carolinus* demonstrando diferenças na distribuição das mitocôndrias. *A*: aumento de 3500X: presença de núcleo (N), grande densidade mitocondrial (setas), áreas de sobreposição (*) e ausência (estrela). *B*: aumento de 5000X: observação de um núcleo (N), grande densidade mitocondrial (setas) e ausência (estrela). *C*: aumento de 11000X: observamos mitocôndrias bem definidas em número razoável (setas) e ausência (estrela). *D*: aumento de 2000X: nota-se mitocôndrias bem definidas em baixo número (setas).

As Figuras a seguir evidenciam a presença de mitocôndrias e outras organelas nas células de peixes expostos às temperaturas de 22°C, 30°C, 34°C, 36°C e TCS (Figura 41 a Figura 45).

Figura 41. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* mantido à temperatura ambiente de 22°C. *A*: aumento de 7.500 vezes: é possível observar mitocôndrias (setas) em três hepatócitos adjacentes com um canalículo biliar (CB) entre eles e os respectivos núcleos (N). *B*: aumento de 7.500 vezes: presença de grande densidade mitocondrial (seta) e núcleo (N). *C*: aumento de 20.000 vezes: a seta indica possível local de divisão de uma mitocôndria (m). *D*: aumento de 4.000 vezes: observamos várias células hepáticas, núcleos (N) e grande densidade mitocondrial (seta).

Figura 42. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* submetido à temperatura experimental de 30°C. *A*: aumento de 7.500 vezes: observamos duas células hepáticas com grande densidade mitocondrial (m) e respectivos núcleos (N). *B*: aumento de 7.500 vezes: numerosas microvilosidades da membrana celular do hepatócito voltada para o espaço de Disse (ED). *C*: aumento de 20.000 vezes: célula hepática com núcleo (N), mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático (RE). *D*: aumento de 4.000 vezes: presença de numerosos hepatócitos com mitocôndrias e Espaço de Disse (ED).

Figura 43. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* submetido à temperatura experimental de 34°C. *A*: aumento de 7.500 vezes: observamos grande densidade mitocondrial (setas) de tamanho reduzido nas células hepáticas e um núcleo bem definido (N). *B*: aumento de 7.500 vezes: mitocôndrias ao redor dos núcleos (N). *C*: Aumento de 20.000 vezes: poucas mitocôndrias (m). *D*: Aumento de 4.000 vezes: células hepáticas com grande densidade mitocondrial (setas) e presença de artefatos.

Figura 44. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* submetido à temperatura experimental de 36°C. *A*: aumento de 7.500 vezes: núcleo (N) e mitocôndrias bem definidas (setas). *B*: aumento de 7.500 vezes: núcleo (N) e mitocôndrias bem definidas (setas). *C*: aumento de 20.000 vezes: observamos um núcleo (N) cercado por mitocôndrias (m) e retículo endoplasmático (RE). *D*: aumento de 4.000 vezes: presença de várias células hepáticas de tamanho reduzido com grande densidade mitocondrial.

Figura 45. Eletromicrografias de transmissão de células de fígado de peixe *T. carolinus* submetido à temperatura máxima de sobrevivência (TCS - 38°C). *A*: aumento de 7.500 vezes: núcleo (N) e mitocôndrias bem definidas (m). A seta indica possível estágio de fusão de duas mitocôndrias. *B*: aumento de 7.500 vezes: observamos a lesão do tecido hepático, com formato anômalo de núcleo (seta) e mitocôndrias (m). *C*: Aumento de 20.000 vezes: presença de três mitocôndrias (m). *D*: Aumento de 7.500 vezes: observamos mitocôndrias de grandes proporções (m) e núcleo (N). A seta indica processo de degradação da membrana mitocondrial.

V.6.2. Densidade Mitocondrial

Para a estimativa do número de mitocôndrias utilizou-se eletromicrografias de magnificação intermediária ($\times 7.500$).

No grupo controle (22°C), o valor da densidade numérica foi de 32,6 mitocôndrias por micrografia. No grupo experimental a 30°C , este valor correspondeu a 33,3 mitocôndrias. A 34°C , foram contadas 45,4 mitocôndrias, maior valor de densidade mitocondrial dentre as temperaturas. A 36°C , estimou-se 38,9 mitocôndrias. O menor valor de densidade mitocondrial encontrado foi em TCS, correspondendo a 24 mitocôndrias. Não houve diferença estatística significativa no número de mitocôndrias dos animais expostos às temperaturas de 22°C e 30°C . Entre os grupos 34°C e os anteriores (22 e 30°C), houve um aumento significativo no número dessa organela ($p<0,01$). Comparando-se a ocorrência nos grupos 36°C com os demais, esta foi significativamente diferente das dos grupos 22°C e 30°C ($p<0,05$), com uma tendência de diminuição da quantidade de mitocôndria, se comparado com 34°C . O grupo no qual ocorreu o menor número de mitocôndrias (TCS) apresentou diferença estatística em relação ao controle ($p<0,01$) e aos demais grupos ($p<0,05$) (Figura 46).

Figura 46. Estimativa do número de mitocôndrias em hepatócitos de peixes submetidos a diferentes temperaturas experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos, com $p < 0,05$; ** - diferença significativa em relação ao controle 22°C, com $p < 0,01$.

V.6.3. Área Mitochondrial

No grupo controle, 22°C, a média da área mitocondrial foi de $1,58 \mu\text{m}^2$; a 30°C, foi $1,78 \mu\text{m}^2$; a 34°C, $0,76 \mu\text{m}^2$; 36°C, $0,99 \mu\text{m}^2$; e a TCS, $3,69 \mu\text{m}^2$.

Comparando-se o grupo controle com o experimental a 30°C, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). No entanto, ao comparar o controle e experimental 30°C com as demais temperaturas, houve diferença estatística significativa ($p < 0,001$). A 34°C, menor valor médio da área mitocondrial dentre os grupos experimentais ($0,76 \mu\text{m}^2$) houve diferença significativa em relação às ocorrências a todas as temperaturas. O grupo experimental a 36°C apresentou aumento significativo da área mitocondrial, quando comparada à do grupo a

34°C, porém significativamente menor quando comparado às dos grupos a 22°C, 30°C e TCS. No experimento TCS foi obtida a maior média de área mitocondrial dentre os grupos (3,7 μm^2), significativamente diferente da dos demais (Figura 47).

Figura 47. Estimativa do valor médio das medidas da área das mitocôndrias em hepatócitos de peixes submetidos a diferentes temperaturas experimentais: comparação entre os grupos experimentais. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa entre os grupos; *** - diferença significativa em relação ao controle 22°C, com $p < 0,001$.

Díscussão

VI. DISCUSSÃO

A temperatura é um fator abiótico fundamental que influencia diretamente no comportamento e na sobrevivência dos organismos, incluindo peixes (Breau *et al.*, 2011). A preferência e tolerância térmicas podem ser influenciadas pela idade, tamanho, alimento disponível, época do ano, estresse, temperatura de aclimação e histórico do indivíduo (Angilletta Jr & Sears, 2004; Barton & Iwama, 1991; Beitinger *et al.*, 2000; Breau *et al.*, 2011; Chung & Méndez, 1993; Heally & Schulte, 2012; Pérez *et al.*, 2003; Pörtner, 2010; Reyes *et al.*, 2011; Sloman *et al.*, 2006).

Para homogeneizar a amostra biológica foram selecionados, para este trabalho, peixes juvenis de tamanhos similares, mantidos na mesma temperatura do local aonde foram coletados, e alimentados durante o cativeiro da mesma maneira. Os peixes permaneceram em repouso a partir do momento em que foram colocados nos tanques até o início dos experimentos, para recuperação do estresse de coleta.

Autores relatam a necessidade de diferentes períodos de manutenção em cativeiro para que os animais coletados retornem ao comportamento e metabolismo considerados normais (Barton & Iwama, 1991; Pickering *et al.*, 1982; Ruane *et al.*, 2001). Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostram que os indivíduos de *T. carolinus* adaptam-se bem ao cativeiro, o que pôde ser observado pelo comportamento, pelo bom estado físico dos peixes, pelo apetite e, principalmente, pela sobrevivência por longos períodos (Hasue, 2011; Santos *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2012; Vignardi, 2012).

O oxigênio dissolvido foi averiguado no início e término dos experimentos para assegurar que a hipóxia tecidual causada nos peixes fosse originada pelo aumento da temperatura, e não por uma menor disponibilidade deste gás na água. São considerados valores comuns de oxigênio dissolvido na água salgada a 0°C, 8 mg/L; a 20°C, 5,3 mg/L; e a 30°C, 4,6 mg/L. O menor valor encontrado nos experimentos realizados, foi 4,82 mg/L, superior ao valor normalmente encontrado a 30°C (Murray & Riley, 1968). Modelos teóricos sugerem que há uma perda de aproximadamente 32 pmol de oxigênio a cada 1°C de elevação da temperatura da água do mar (Gruber, 2011). Alabaster e Welcomme (1962) demonstraram que há um aumento da sobrevivência de peixes em altas temperaturas quando estes estão em água com alta concentração de oxigênio.

Durante os experimentos de aumento da temperatura, para que houvesse uma rápida homogeneização da água, foram colocadas, nos aquários, duas bombas submersas com canos de PVC fenestrados. Dessa forma, a taxa de aquecimento utilizada no trabalho, de 2°C/h, conforme sugerido no trabalho realizado Frederick e Pörtner (2000), foi mantida com eficiência. Segundo esses autores, um aquecimento muito lento pode permitir aos animais se aclimatarem à nova temperatura, enquanto que um aquecimento muito rápido pode superestimar a tolerância do peixe, pois aumenta a possibilidade de ocorrência de um retardo entre o aquecimento ambiental e o corporal (Cocking, 1959; Beers & Sidell, 2011; Beitinger *et al.*, 2000; Mora & Maya, 2006; Mora & Opsina, 2002).

A temperatura corporal dos peixes, por serem animais ectotérmicos, praticamente varia com a do ambiente, apesar de que esta é, em geral, 0,1 a

1°C acima daquela da água (Bertinger *et al.*, 2000; Reynolds *et al.*, 1976; Stevens & Sutterlin, 1976). É um fato bastante conhecido que a taxa de troca de calor entre o ambiente e o organismo varia com o tamanho e a massa corpórea do indivíduo (Beitinger *et al.*, 1977; Beitinger *et al.*, 2000; Mora & Maya, 2006). Diversos autores obtiveram resultados que indicam que indivíduos maiores de algumas espécies de peixes como, por exemplo, o *Salmo salar*, são mais sensíveis a extremos de temperaturas elevadas do que os peixes menores Breau *et al.*, 2011; Mora & Maya, 2006; Reynolds *et al.*, 1976). Em decorrência desse fato, ao se comparar diferentes estágios de maturidade, verificou-se que peixes adultos podem ser mais negativamente afetados pela temperatura, em comparação com os juvenis (Rodnick *et al.*, 2004). Uma das explicações mais aceitas está relacionada com a diminuição da área/volume em peixes maiores (Reynolds *et al.*, 1976). Outra possível explicação para o decaimento da resistência ao calor dos animais maiores é a queda da expressão de Hsps (heat-shock protein) (Fowler *et al.*, 2009). O tempo requerido para que uma dada temperatura exerça seu efeito letal depende do tempo de difusão pelo corpo todo. Assim, peixes de diferentes tamanhos expostos a temperaturas similares reagem de forma diferente, devido à variação das taxas área/volume (Mora & Maya, 2006; Opsina & Mora, 2004).

Os indivíduos utilizados neste trabalho eram todos juvenis, com pequenas variações de tamanho (média de 6,19 cm; desvio padrão 1,37 cm). Os resultados obtidos indicam pouca relação entre o comprimento dos peixes e a tolerância térmica ($r^2 = 0,49$), corroborando com os trabalhos de Hutchison (1976) e Opsina e Mora (2001; 2004), que também obtiveram pouca relação

entre as duas variáveis. Opsina e Mora (2001; 2004) utilizaram peixes recifais juvenis, e sugerem que a tolerância térmica que obtiveram foi pouco afetada devido à pequena diferença de tamanho entre os mesmos.

Mudanças comportamentais podem ser rapidamente observadas com a variação da temperatura (Murugaian *et al.*, 2008), pois o comportamento integra distintos processos fisiológicos influenciados por esse fator e que são essenciais para a sobrevivência dos organismos (Little, 1990; Murugaian *et al.*, 2008). É comum que, com o aumento da temperatura, os peixes fiquem inquietos, possivelmente devido ao aumento de atividade relacionado à busca de áreas mais adequadas (Beitinger *et al.*, 2000; Breau & Cunjak, 2011).

Notou-se que a partir de 26°C, os pampos ficaram gradualmente mais agitados e houve aumento dos batimentos operculares, possivelmente devido ao aumento do metabolismo, que gera uma maior demanda de oxigênio (Bellgraph *et al.*, 2010; Murugaian *et al.*, 2008). A partir dos 32°C, observou-se o início da perda de equilíbrio. Segundo alguns autores, esse fenômeno é resultante do comprometimento da integridade neuronal devido às altas temperaturas (Beers & Sidell, 2011; Hodson *et al.*, 1981; Reyes *et al.*, 2011).

A partir de 36°C, houve mudança de coloração, devido à movimentação dos melanóforos, células pigmentares que contêm pigmentos negros. Os melanóforos agem de forma mecânica e fisiológica, alterando padrões de cores via sistema nervoso simpático (Junqueira & Carneiro, 2005). Esse padrão foi descrito pela primeira vez por Smith, em 1928. A diminuição da capacidade natatória, perda de equilíbrio e espasmos decorrentes de alterações ambientais pode ocasionar, no meio natural, efeitos não observáveis em laboratório. Por exemplo, quando algum estressor altera a capacidade

natatória dos peixes e ao mesmo tempo aumenta suas necessidades energéticas, mesmo que a níveis bem abaixo dos letais, estes podem tornar-se mais suscetíveis aos predadores e menos capazes de perseguir as presas para se alimentarem, diminuindo seu sucesso de sobrevivência (Beitinger *et al.*, 1977; Sloman *et al.*, 2006).

A demanda energética aumentada devido ao aumento da temperatura gera maior necessidade de oxigênio, evidenciada pelo aumento dos batimentos operculares. Se as alterações ambientais persistem e/ou aumentam em intensidade pode ocorrer diminuição dos batimentos, evidenciando o colapso das atividades perto dos limites letais. Nesse caso, as atividades diminuem em decorrência, dentre outros fatores, da inabilidade de ventilação e a incapacidade do sistema circulatório captar e distribuir oxigênio. Até certo ponto, esse estado fisiológico pode ser reversível, mas a partir dos limites de resistência relacionadas ao tempo-intensidade da atuação do fator o resultado é o comprometimento irreversível das funções vitais, culminando com a morte do animal (Breau *et al.*, 2011; Murugaian *et al.*, 2008; Portner *et al.*, 2007).

Em muitos casos, além das mudanças de coloração, observam-se outras alterações externas que parecem ser uma tentativa de proteção do animal, como o aumento de secreção mucosa pela pele. Rinaldi e colaboradores (2009) estudaram mudanças morfológicas em brânquias de peixes *Dicentrarchus labrax* expostos à hipóxia. Seus resultados mostram aumento de células mucosas no tecido e aumento da secreção mucosa, evidenciando que esse é um sinal de defesa, já que o muco contém lisossomos que evitam possíveis infecções (Rinaldi *et al.*, 2009).

As fases comportamentais sugeridas por Cocking (1959) foram evidenciadas neste trabalho, apesar de terem sido registradas em momentos diferentes para cada indivíduo, devido às diferenças intra-específicas naturalmente esperadas. Uma característica facilmente observável da fase I relacionada à hipóxia é a preferência pela parte superior da coluna d'água, denominada por Sloman e colaboradores (2006) de respiração aquática superficial. Neste caso, os peixes se deslocam para as camadas superficiais onde a difusão do oxigênio do ar para a água gera uma fina região bem oxigenada.

Estudos comportamentais são essenciais para compreender como os indivíduos de uma mesma espécie são capazes de responder e de se ajustar a variações de temperatura, sejam estas relacionadas ao aquecimento global (Bradshaw *et al.*, 2001; Bradshaw *et al.*, 2010; Calosi *et al.*, 2008; Golovanov *et al.*, 2012; Pörtner & Knust, 2007; Pörtner, 2010), ou a eventos naturais recorrentes, como os fenômenos El Niño e La Niña (Beitinger *et al.*, 2000; Mora & Ospina, 2002). Apesar das controvérsias, alguns autores afirmam que existem evidências de que o aumento das temperaturas médias, possivelmente devido a fenômenos globais já está afetando a distribuição dos organismos (Parmesan, 2006; Pörtner & Knust, 2007; Pörtner & Farrell, 2008). De qualquer modo, modificações no forrageamento, na predação, na competição por alimento ou abrigo, reprodução e aparecimento de novos patógenos, como vírus, ocorrem devido ao aumento da temperatura e outras alterações do habitat, sejam elas naturais ou provocadas pelo homem (Helmuth *et al.*, 2010).

Este trabalho demonstra que *T. carolinus* juvenis suportam temperaturas de 36°C, por pelo menos duas horas, e sobrevivem sem qualquer

dano aparente quando são retirados dessa temperatura e realocados em temperaturas encontradas no ambiente em que vivem. Acima dos 36°C, alterações irreversíveis começam a ocorrer. Portanto, o gasto de energia para a manutenção metabólica em torno de 36°C já deve ter ultrapassado os limites subletais que afetam outras atividades biológicas como crescimento, reprodução, fuga de predadores e busca de alimento (Angilleta Jr *et al.*, 2004; Green & Fisher, 2004; Hofmann & Todgham, 2010; Pérez *et al.*, 2003; Ruyet *et al.*, 2004). A continuidade deste tipo de estudo e seu detalhamento, mesmo que em laboratório, pode ajudar a inferir e a prever relações ecológicas importantes.

Sabe-se que os juvenis de *T. carolinus* vivem na zona de arrebentação e, quando adultos, migram para águas mais profundas. Alguns autores verificaram que os indivíduos dessa espécie toleram níveis relativamente baixos de oxigênio ($\geq 4\text{mg/l}$) (Main *et al.*, 2007). Não foram encontrados registros na literatura se os *T. carolinus* possuem comportamento específico para evitar altas temperaturas, deslocando-se para locais mais favoráveis, como, por exemplo, a maiores profundidades ou locais mais afastados da zona de arrebentação.

Main e colaboradores (2007) evidenciaram que a temperatura é uma variável importante para o cultivo de *T. carolinus*. A temperatura ótima de crescimento desses peixes é de 25 a 30°C, mas eles podem ser encontrados em áreas com temperaturas em torno de 34°C. Nossos resultados sobre tolerância térmica dos *T. carolinus* revelaram que os óbitos ocorreram a partir de 37°C, ou seja, a apenas 3°C acima da temperatura máxima de ocorrência registrada. Sabe-se que uma pequena variação na temperatura pode diminuir

as chances de sobrevivência de organismos aquáticos (Green & Fisher, 2004; Matsuura, 1999).

Adaptações evolutivas relacionadas a mecanismos de termoequilíbrio podem ser evidenciadas em todos os níveis de organização dos seres vivos (Pörtner, 2001, 2010; Sloman *et al.*, 2006). Há evidências de que os animais mantêm seus mecanismos de suporte na medida próxima à máxima necessária para suprir suas demandas metabólicas em seus limites ambientais. O excesso dessa capacidade é evitado pela seleção, simplesmente por não ser utilizado em situações normais (Pörtner, 2002). Segundo esse autor, a plasticidade das funções fisiológicas é geralmente maior em ambientes mais variáveis do que naqueles mais estáveis, como nos ambientes polares, por exemplo, onde pequenas variações na temperatura ambiental são sentidas pelos organismos, por uma simples questão de economia e eficiência energéticas.

Com o aumento da temperatura, há um aumento do metabolismo ocasionando um maior consumo de oxigênio (Stramma *et al.*, 2008). Em peixes, na tentativa de compensar essa alta demanda de oxigênio, ocorre aumento da ventilação para captação de oxigênio, e do bombeamento sanguíneo para aumentar as trocas gasosas. Isso pode acontecer até um determinado limite, quando esses mecanismos entram em colapso, e não conseguem suprir o oxigênio exigido pelo metabolismo (Frederich & Pörtner, 2002), o que resulta em hipóxia tecidual. A limitação da oxigenação pela temperatura já foi descrita em animais de diversos grupos aquáticos, como para zooplâncton, anelídeos, moluscos (bivalves e cefalópodes), crustáceos (adultos e larvas) e vertebrados (Pörtner, 2010).

Adaptações para superar a hipóxia envolvem mudanças genéticas que modulam, por exemplo, o metabolismo (Chippari-Gomes *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009). Para a manutenção da homeostase, os eucariotos desenvolveram diversos processos que aumentam a captação e distribuição do oxigênio (Lee *et al.*, 2004), dentre os quais os mediados pelo Fator induzido por hipóxia (HIF) e pelo Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF). O histórico térmico, isto é, temperaturas as quais o animal já foi exposto e foi capaz de aclimatar-se, é um dos principais fatores que modula a capacidade do indivíduo em ajustar esses processos (Pörtner, 2012).

Ambas as proteínas são bastante conservadas ao longo da escala evolutiva, de peixes a mamíferos (Coultas *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 1998; Rissanen *et al.*, 2006; Soitamo *et al.*, 2006), o que indica a importância básica de suas funções. Por esse motivo, os anticorpos utilizados neste trabalho, apesar de serem monoclonais humanos produzidos em camundongos, conseguem responder bem aos antígenos de peixes (Rinaldi *et al.*, 2009).

Os anticorpos monoclonais, como os utilizados neste trabalho, são mais específicos às proteínas estudadas quando comparados aos anticorpos policlonais (Ramos-Vara, 2005). Para validar a eficiência desses anticorpos, realizou-se uma imuno-histoquímica com células de fígado de rato. O padrão de marcação encontrado para ambos os anticorpos foi semelhante ao encontrado em *T. carolinus*. Além disso, os controles negativos das preparações imuno-histoquímicas não apresentaram marcação, contribuindo com a ideia de que os anticorpos reagiram de modo específico para HIF-1 α e VEGF, certamente por suas características conservativas.

Para distinguir a expressão proteica causada pelo aumento de temperatura da possível expressão devido ao período de permanência dos animais dos controles nos aquários, compararam-se os resultados de todos os grupos de controle, referentes a cada temperatura final estipulada. De acordo com o desenho experimental, quanto maior a temperatura final maior o tempo que os animais dos controles permaneceram nos aquários, para que acompanhassem o caso experimental correspondente. O padrão de expressão em todos os casos, entretanto, foi bastante semelhante, tanto para HIF-1 α quanto para VEGF. Esses dados evidenciam que as variações de expressão em animais submetidos às diferentes temperaturas não estão relacionadas ao período de permanência nos aquários.

O HIF-1 é um fator de transcrição com funções na sobrevivência do peixe em condições de hipóxia (Abele *et al.*, 2007). Os níveis dessa proteína são alterados quando em situações de estresse termal (Abele & Heise, 2006; Davies *et al.*, 2011). Normalmente, o HIF-1 α é encontrado no citoplasma da célula, mas pode também ser encontrado no núcleo (Cao *et al.*, 2009; Chilov *et al.*, 1999). Nossos resultados mostram marcação nuclear tanto em hepatócitos quanto em fibras musculares, em altas temperaturas. Provavelmente, isso se deve ao fato de o HIF-1 α ser estabilizado no citoplasma das células quando em hipóxia e se deslocar para o núcleo, onde se dimeriza com seu heterodímero, o HIF-1 β (ou ARNT) formando o complexo HIF-1.

Indivíduos dissecados no momento de coleta, CA, tiveram expressão proteica do HIF-1 α maior se comparados com os que permaneceram a 22°C. Uma possível razão para essa diferença é que a temperatura da água do mar varia rapidamente conforme a hora do dia, deixando os peixes fisiologicamente

mais estressados do que os peixes em cativeiro, vivendo em condições mais estáveis, em todos os sentidos.

Animais do controle 22°C apresentaram baixa expressão da proteína HIF-1 α , tanto em fígado quanto em músculo, se comparados à expressão encontrada quando há aumento de temperatura. Quando em normóxia o HIF-1 α pode estar presente nas células, mas é rapidamente degradado (Chen *et al.*, 2012), sua meia-vida é de aproximadamente 5 minutos (Kodama *et al.*, 2012). Estudos mostram que HIF-1 α é normalmente expressa em diversos tecidos, incluindo fígado e músculo (Chen *et al.*, 2012).

A expressão desta proteína em fígado aumentou gradualmente, e a maior expressão foi a 36°C. Foi constatado que a expressão proteica do HIF-1 α pode ocorrer entre 1 a 4 horas após o estímulo (Zhang *et al.*, 2009), e que esta aumenta significativamente conforme o aumento da hipóxia (Chen *et al.*, 2012; Law *et al.*, 2006). Em temperaturas próximas à ótima às quais os indivíduos da espécie estão adaptados, não há resposta proteica (Rissanen *et al.*, 2006), o que explica os nossos resultados nos indivíduos dos controles experimentais. Em temperaturas mais elevadas, como 34 e 36°C, houve maior expressão da proteína, possivelmente para tentar compensar a demanda de oxigênio devido ao aumento do metabolismo, que pode causar a hipóxia tecidual.

Houve pequena flutuação na expressão do HIF-1 α no músculo com o aumento da temperatura, porém o padrão geral permaneceu o mesmo que no fígado. As maiores expressões foram em temperaturas elevadas, como de 32°C e 34°C, apesar de que houve queda da expressão proteica a 36°C.

Uma das funções do HIF-1 α é regular a angiogênese. Para isso, ele modula o VEGF (Nikinma & Rees, 2005). O VEGF é um potente agente angiogênico, participando diretamente desse processo por meio do recrutamento de células endoteliais para áreas em hipóxia (Akiri *et al.*, 1998; Hu & Fan, 1995). A indução da angiogênese leva a um aumento da densidade vascular e, portanto, diminui a distância de difusão do oxigênio e aumenta o fluxo de sangue para os tecidos (Lee *et al.*, 2004; Ke & Costa, 2006).

A expressão do VEGF não foi gradual no fígado e nem no músculo. Encontrou-se baixa expressão desta proteína nos grupos controles ambientais e experimentais. A expressão nessas temperaturas, mesmo que reduzida, é esperada, pois esta proteína está presente em condições fisiológicas normais, atuando na formação de novos capilares (Byrne *et al.*, 2005; Rinaldi *et al.*, 2009).

O estresse fisiológico, como em hipóxia, pode causar o aumento da expressão do VEGF (Akiri *et al.*, 1998). O padrão de expressão da proteína tanto no fígado quanto no músculo foi similar. Em ambos os casos, o máximo da expressão foi atingido em temperaturas elevadas, aos 34°C. Aos 36°C, apresentou queda suave da expressão no fígado, e brusca no músculo. O provável motivo dessa queda é que as altas temperaturas causam o colapso da síntese proteica total e, conseqüentemente, devem também comprometer os mecanismos que visam promover a homeostase (Breau *et al.*, 2011; Hochachka e Somero, 2002). De acordo com alguns autores, a redução da síntese proteica ocorre mesmo antes do colapso do organismo e teria como finalidade economizar energia e disponibilizá-la para outros processos vitais,

tais como a manutenção do balanço iônico celular para evitar o desequilíbrio osmótico e a despolarização das membranas. (Boutillier *et al.*, 2000).

No experimento TCS no fígado, encontrou-se uma tendência de menor quantidade proteica, se comparados a 36°C tanto para HIF-1 α como para VEGF. No músculo, não há diferença estatística entre a expressão nesses dois experimentos, para ambas as proteínas. Uma das possíveis explicações para esse resultado é que o calor induz a perda da integridade estrutural das proteínas, desnaturando-as, o que indica que a sobrevivência em altas temperaturas é tempo-dependente (Hochachka & Somero, 2002; Pörtner, 2010).

As diferenças na expressão proteica quando os tecidos hepáticos e musculares são comparados, para ambas as proteínas estudadas, devem estar relacionadas às diferentes demandas metabólicas do fígado e do músculo. O fígado necessita de alto suprimento de oxigênio devido a suas funções de órgão-glandular, portanto a hipóxia tecidual e o metabolismo anaeróbico devem acontecer rapidamente (Chen *et al.*, 2012; Portner, 2001; Shen *et al.*, 2010). O fígado está envolvido em diversas respostas fisiológicas à hipóxia em vertebrados, como a supressão da síntese proteica e o catabolismo (Kodama *et al.*, 2012). Autores observaram o aumento da transcrição do HIF-1 α em fígado dos teleósteos *Callionymus valenciennei* (Kodama *et al.*, 2012) e *Dicentarchus labrax* (Terova *et al.*, 2008) expostos à hipóxia. Este foi associado ao aumento do metabolismo anaeróbico, envolvendo a glicólise, regulada pelo HIF (Kodama *et al.*, 2012).

Verificou-se que a falta do VEGF pode causar a morte de embriões de peixes e de mamíferos (Hu & Fan, 1995; Liang *et al.*, 1998; Coultas *et al.*,

2005). Em mamíferos, relatou-se que o excesso da mesma causa problemas fisiológicos, como o câncer (Byrne *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 2009).

Fatores de crescimento e hormônios podem induzir a expressão do VEGF, mas é conhecido que o principal indutor é a hipóxia (Ferrara, 2004; Huang *et al.*, 2006). Autores evidenciaram relação positiva na expressão do HIF-1 α e do VEGF, sugerindo que o aumento do VEGF é fortemente relacionado à expressão do HIF-1 α (Cao *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2003). Este trabalho também mostrou relação positiva entre a expressão do HIF-1 α e do VEGF ($r^2=0,87$ no fígado e $r^2=0,85$ no músculo), o que sugere que ambas as expressões estão associadas, indicando hipóxia tecidual.

Estudos do laboratório feitos com coração e brânquias utilizando-se anticorpos para a proteína de choque térmico 70 (Hsp70) mostram um aumento da proteína conforme o aumento da temperatura, até 34°C (Margonato, 2013), indicando possível relação desta com a expressão do HIF-1 α . Trabalho feito por Katschinski e colaboradores (2002) mostra que há correlação da expressão da proteína HIF-1 α com a expressão da proteína de choque-térmico em camundongos. A proteína de choque térmico Hsp 90 (*Heat-shock protein 90*) foi requerida para a indução do HIF-1 α no calor (Katschinski *et al.*, 2002). A associação do HIF-1 α com o complexo Hsp90-Hsp70 reduz a degradação do HIF-1 α tanto em normóxia, quanto em hipóxia. Aparentemente, as Hsps são necessárias para a estabilização do HIF-1 α em condições de normóxia e de hipóxia (Katschinski *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). Airaksinen e colaboradores (1998) também associaram o aumento das Hsps (incluindo a Hsp70) com a hipóxia.

Os limites de tolerância termal podem ser ajustados por alterações na densidade e na capacidade das mitocôndrias dos tecidos, com consequências para as células, tecidos e sistemas, como o circulatório e a respiratório (Pörtner & Knust, 2007). Os resultados aqui apresentados mostram que o aumento da temperatura desencadeou modificações tanto no número quanto na área das mitocôndrias dos hepatócitos. A semelhança entre os parâmetros mitocondriais avaliados, da temperatura inicial de 22°C até 30°C, sugere que não houve alterações de grande magnitude das rotas energéticas. Estudos mostram que a temperatura ótima de crescimento do *T. carolinus* é de 25 a 30°C (Main *et al.*, 2007), o que justifica a não alteração das rotas energéticas para os indivíduos da espécie nessas condições.

O aumento significativo no número de mitocôndrias a partir dos 34°C sugere aumento do consumo de oxigênio devido à maior exigência metabólica, ocasionada pelo aumento da temperatura. Os dados comportamentais contribuem com essa hipótese, pois evidenciam aumento do batimento opercular nesta temperatura. Além disso, o H-Score refletiu a elevada expressão do HIF-1 α no fígado de *T. carolinus*, proteína envolvida na ativação das rotas anaeróbicas celulares, para promoção da sobrevivência celular (Agani *et al.*, 2000). As evidências sugerem, portanto, que para suprir a necessidade de oxigênio devido ao alto metabolismo, o peixe faz mais movimentos operculares para maior captação do oxigênio da água. Além disso, prepara sua maquinaria celular para atender a essa elevada demanda com a ativação do metabolismo anaeróbico.

A elevada densidade mitocondrial a 34°C e 36°C, deve estar relacionada ao início do processo de falta de oxigênio para as mitocôndrias

(Pörtner, 2001; Pörtner & Farrell, 2008). A insuficiência de suprimento do oxigênio resulta em insuficiência da capacidade aeróbia e necessidade de reorganização celular para suprir a demanda energética do organismo (Richard, 2010). A redução da densidade mitocondrial durante o aquecimento provavelmente leva a uma redução da demanda de oxigênio (Pörtner, 2001). Nessas temperaturas, há maior expressão da proteína HIF-1 α no fígado de *T. carolinus*, colaborando com os indícios de provável transição do metabolismo aeróbio para o anaeróbio nesta temperatura.

Por sua vez a significativa redução da densidade mitocondrial que ocorreu nos organismos expostos à TCS está, provavelmente, relacionada a uma tentativa de redução da demanda de oxigênio para evitar a hipóxia. A alta exigência de oxigênio pelas mitocôndrias durante o aquecimento é ajustada por uma diminuição da densidade mitocondrial, portanto redução da demanda basal de oxigênio, e ativação de rotas energéticas metabólicas alternativas (Pörtner, 2002). O mesmo fenômeno foi observado em mamíferos submetidos ao aquecimento (Inbar *et al.*, 1975) e em bivalves, como mecanismo de aclimatização às temperaturas de verão (Cherkasov *et al.*, 2010).

A avaliação da área mitocondrial demonstrou que a 34°C há o maior número de mitocôndrias e a menor área determinados. Esse fato pode ser resultado de fissão mitocondrial, talvez para atender a uma maior demanda de oxigênio antes da ativação do metabolismo anaeróbico. A partir dessa temperatura, notou-se inversão dessa relação, sendo mais evidenciada em TCS, onde há a menor densidade e maior área mitocondrial. De forma inversa ao caso anterior, esse resultado pode estar associado ao processo de fusão

mitocondrial. Segundo Berman e colaboradores (2008) a fusão de mitocôndrias acontece para prevenir o acúmulo de danos ao DNA mitocondrial.

A fusão e fissão mitocondrial podem ocorrer em curtos intervalos de tempo, com um mesmo grupo de mitocôndrias. A variação na densidade e na estrutura da organela está relacionada às diferentes demandas metabólicas (Bereiter-Hahn & Vöth, 1994).

As estratégias bioquímicas e fisiológicas presentes em um curto período de tempo permitem ao peixe enfrentar variações temporais e espaciais na quantidade de oxigênio dissolvido (Chippari-Gomes *et al.*, 2005), seja essa privação proveniente do aquecimento da água e/ou do aumento do metabolismo.

Espécies tropicais e subtropicais passam pelos seus extremos termais em um curto período de tempo, portanto devem ter ampla tolerância para sobreviver nesses locais, devido ao tempo insuficiente para aclimatar-se a eles (Reyes *et al.*, 2011). Muitos animais possuem respostas adaptativas para sobreviverem a diferentes graus de hipóxia. Respostas sistêmicas, como o aumento da ventilação e do batimento cardíaco, acontecem de segundos a minutos depois do início da hipóxia. Depois de minutos ou horas, há resposta celular e tecidual seguida da resposta molecular. Nesta altura, a difusão de oxigênio pela mitocôndria passa a ser limitada, dando início ao metabolismo anaeróbio. Acontecerá a conservação de energia com a supressão do metabolismo e estabilidade do gene HIF-1 (Boutilier *et al.*, 2000). Em mamíferos, os hepatócitos e cardiomiócitos podem reduzir seu metabolismo em 50% de sua capacidade sem perder a vitalidade (Budinger *et al.*, 1998; Schumacker *et al.*, 1993). A ativação do HIF induzirá a expressão de outros

genes, associados ao suprimento de oxigênio, como a do VEGF (Boutillier *et al.*, 2000) e a produção de energia pelo metabolismo anaeróbico (Davies *et al.*, 2011), o número e a área mitocondrial sofrerá alteração para adaptar-se a nova temperatura.

Determinar a tolerância térmica dos organismos marinhos é importante para sabermos como possíveis mudanças na temperatura, sejam elas naturais ou antrópicas, podem afetar a mortalidade, abundância e distribuição das espécies (Mora & Maya, 2006). Os resultados deste trabalho podem contribuir para essa compreensão e, também, para auxiliar a entender os possíveis efeitos do aquecimento ambiental sobre peixes marinhos tropicais. Além disso, também podem ser futuramente aplicados à pesca e/ou aos sistemas de cultivo, acarretando ganhos econômicos e sociais pela importância crescente do pescado na alimentação humana (Sanches *et al.*, 2007).

Conclusões

VII. CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou resultados inéditos e de considerável relevância científica. Com ele, podemos concluir:

- O aumento da temperatura altera o comportamento dos peixes em relação à natação, equilíbrio e batimento opercular. Acima de determinada temperatura (36°C), as alterações comportamentais e fisiológicas são de magnitude suficiente para influenciar na sobrevivência do organismo.
- A tolerância térmica apresenta variações intraespecificamente. No caso do peixe pampo, *T. carolinus*, a parada do batimento opercular e a ausência de resposta aos estímulos táteis ocorreram entre as temperaturas 37,1°C e 38,6°C (média 38,1°C).
- A expressão das proteínas HIF-1 α e VEGF é influenciada pelo aumento da temperatura, apresentando diferentes expressões nas diferentes temperaturas testadas e são tecido-específicas.
- A densidade e área mitocondrial foram alteradas com o aumento gradual da temperatura.

Considerações Finais

VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após as análises dos resultados deste trabalho pode-se concluir:

- A elevação da temperatura provoca alterações comportamentais e fisiológicas, revelando mecanismos relacionados à manutenção da homeostase e à sobrevivência.
- São necessários estudos com peixes de uma mesma espécie em diferentes estágios de maturidade sexual para avaliar a influencia da temperatura nas diferentes fases da vida.
- O estudo das proteínas HIF-1 α e VEGF em conjunto com os das mitocôndrias, resultaram em dados importantes para compreender mecanismos relacionados à sobrevivência dos peixes em altas temperaturas. Outros estudos, como por exemplo, o das espécies reativas ao oxigênio (ROS) são necessários para investigar com maior profundidade os efeitos da temperatura na fisiologia de espécies ecologicamente e comercialmente importantes, como o *T. carolinus*.

Referências Bibliográficas

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELE, D.; HEISE, K. 2006. Constitutive HIF-1 levels in fish change upon thermal acclimation. First International Congress of Respiratory Biology, p. 36.
- ABELE, D.; PHILIPP, E.; GONZALES, P. M.; PUNTARULO, S. 2007. Marine invertebrate mitochondria and oxidative stress. *Front. Biosci.*, v. 12, p. 933-946.
- AGANI, F. H.; PICHIULE, P.; CHAVEZ, J. C.; LAMANNA, J. C. 2000. The role of mitochondria in the regulation of hypoxia-inducible factor 1 expression during hypoxia. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 46, p. 35863-35867.
- AIRAKSINEN, S.; RABERGH, C. M. I.; SISTONEN, L.; NIKINMAA, M. 1998. Effects of heat shock and hypoxia on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) cells. *J. Exp. Biol.*, v. 2551, p. 2543-2551, 1998.
- AKIRI, G.; NAHARI, D.; FINKELSTEIN, Y.; LE, Y.; ELROY-STEIN, O.; LEVI, B. 1998. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*, v. 17, p. 227-236.
- ALABSTER, J. S.; WELCOMME, R. L. 1962. Effect of concentration of dissolved oxygen on survival of trout and roach in lethal temperatures. *Nature*, v. 194, p. 107.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2008. Molecular biology of the cell. 5th. edition. New York: Garland Science. 1268 p.

ALEXANDROV, V. Y. 1994. Functional aspects of cell response to heat shock. *Int Rev Cytol*, v. 148:171-227.

ALEXANDROV, V. Y.; BERNSTAM, V. A. 1977. Cells, molecules and temperature: conformational flexibility of macromolecules and ecological adaptation. New York: Springer-Verlag. 300 p.

ANGILLETTA Jr, M. J.; HUEY, R. B.; FRAZIER, M. R. Thermodynamic effects on organismal performance: Is hot better? 2010. *Physiol. Biochem. Zool.*, v.83 (2), p. 197–206.

ANGILLETTA Jr, M. J.; OUFIERO, C. E.; LEACHE, A. D. 2006. Direct and indirect effects of environmental temperature on the evolution of reproductive strategies: Na information-theoretic approach. *Am. Nat.*, v.168, p. 124–135.

ANGILLETTA Jr, M. J.; SEARS, M. W. 2004. Evolution of thermal reaction norms for growth rate and body size in ectotherms: An introduction to the symposium. *Integr. Comp. Biol.*, v.44, p. 401–402.

ANGILLETTA Jr, M. J.; STEURY, T. D.; SEARS, M. W. 2004. Temperature, growth rate, and body size in ectotherms: Fitting pieces of a life-history. Puzzle. *Integr. Comp. Biol.*, v. 44, p. 498-509.

ANGILLETTA Jr., M. J. 2009. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. Oxford, UK: Oxford University Press. 304 p.

- BARTON, B. A.; IWAMA, G. K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Ann. Rev. Fish Dis.*, v. 1, p. 3-26.
- BEERS, J. M.; SIDELL, B. D. 2011. Thermal tolerance of antarctic notothenioid fishes correlates with level of circulating hemoglobin. *Physiol. Biochem. Zool.*, v. 84 (4), p. 353-362.
- BEITINGER, T. L.; BENNETT, W. A.; MCCAULEY, R. W. 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environ. Biol. Fish.*, v. 58, p. 237-275.
- BEITINGER, T. L.; THOMMES, M. M.; SPIGARELLI, S. A. 1977. Relative roles of conduction and convection in the body temperature change of gizzard shad, *Dorosoma cepedianum*. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 57A, n. 2, p. 275-279.
- BELLGRAPH, B. J.; McMICHAEL, G. A.; MUELLER, R.P.; MONROE, J. L. 2010. Behavioural response of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* during a sudden temperature increase and implications for survival. *J. Therm. Biol.*, v. 35, p. 6-10.
- BELLINGER, J. W.; AVAULT, JR., J.W. 1971. Food habits of juvenile pompano, (*Trachinotus carolinus*), in Louisiana. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, n. 99, p. 486-494.
- BENNETT, A. F. 1978. Activity metabolism of the lower vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.*, v.400,p. 447-469.

- BENNETT, W. A.; JUDD, F. W. 1992. Comparison of methods for determining low-temperature tolerance - experiments with pinfish, *Lagodon rhomboides*. *Copeia*, v. 4, p. 1059-1065.
- BEREITER-HANS, J.; VÖTH, M. 1994. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Techniq.*, v. 27, p. 196-219.
- BERMAN, S. B.; PINEDA, F. J.; HARDWICK, J. M. 2008. Mitochondrial fission and fusion dynamics: the long and short of it. *Cell Death Differ.*, v.15 (7), p. 1147-1152.
- BOUTILIER, R. G.; ST-PIERRE, J. 2000. Surviving hypoxia without really dying. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, v. 126, p. 481–490.
- BRADSHAW, W. E.; HOLZAPFEL, C. M. 2001. Genetic shift in photoperiodic response correlated with global warming. *PNAS*, v. 98 (25), p. 14509–14511.
- BRADSHAW, W. E.; HOLZAPFEL, C. M. 2010. Light, time, and the physiology of biotic response to rapid climate change in animals. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 72, p. 147–166.
- BREAU, C.; CUNJAK, R. A.; PEAKE, S. J. 2011. Behaviour during elevated water temperatures: Can physiology explain movement of juvenile Atlantic salmon to cool water? *J. Anim. Ecol.*, v. 80, p. 844–853.
- BUDINGER, G. R. S., DURANTEAU, J., CHANDEL, N. S., SCHUMACKER, P. T. 1998. Hibernation during hypoxia in cardiomyocytes: role of mitochondria as the O₂ sensor. *J. Biol. Chem.* 273, 3320–3326.

- BYRNE, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D.J.; HARMEY, J. H. 2005. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). *J. Cell. Mol. Med.*, v. 9 (4), p. 777-794.
- CALOSI, P.; BILTON, D. T.; SPICER, J. I. 2008. Thermal tolerance, acclimatory capacity and vulnerability to global climate change. *Biol. Lett.*, v. 4, p. 99-102.
- CAO, D.; HOU, M.; GUAN, Y.; JIANG, M.; YANG, Y.; GOU, H. 2009. Expression of HIF-1 α and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC Cancer*, v. 9, p. 1-9.
- CARDOSO, C. M. 2013. Expressão histoimunológica de proteínas de reparo celular e comportamento de juvenis de *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae) durante aumento gradual de temperatura. Universidade de São Paulo, Departamento de Oceanografia Biológica, 113p.
- CHEN, N.; CHEN, L. P.; ZHANG, J.; CHEN, C.; WEI, X. L.; GUL, Y.; WANG, W. M.; WANG, H. L. 2012. Molecular characterization and expression analysis of three hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α /2 α /3 α of the hypoxia-sensitive freshwater species, *Chinese sucker*. *Gene*, v. 498, p. 81–90.
- CHERKASOV, A. S.; TAYLOR, C.; SOKOLOVA, I. M. 2010. Seasonal variation in mitochondrial responses to cadmium and temperature in eastern oysters *Crassostrea virginica* (Gmelin) from different latitudes. *Aquat Toxicol.*, v. 97 (1), p. 68-78.

- CHILOV, D.; CAMENISCH, G.; KVIETIKOVA, I.; ZIEGLER, U.; GASSMANN, M.; WENGER, R. H. 1999. Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 α . *J. Cell Sci.*, v. 112, p. 1203-1212.
- CHIPPARI-GOMES, A.R.; GOMES, L.C.; LOPES, N.P.; VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 2005. Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comp. Biochem. Physiol., Part B*, v. 141, p. 347 – 355.
- CHUN, Y.; KIM, M.; PARK, J. 2002. Oxygen-Dependent and -Independent Regulation of HIF-1 α . *J. Korean Med. Sci.*, v. 17, p. 581-588.
- CHUNG, K. S.; MÉNDEZ, S. 1993. Tolerancia térmica comparativa en algunos peces tropicales de Venezuela. *Ciencia*, v. 1 (1), p. 1-7.
- CLARK, T. D.; SANDBLOM, E.; COX, G. K.; HINCH, S. G.; FARRELL, A. P. 2008. Circulatory limits to oxygen supply during an acute temperature increase in the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 295, p. 1631-1639.
- CLOUDSLEY-THOMPSON, J. L. 1993. The Adaptational Diversity of Desert Biota. *Environ. Conservation*, v. 20 (03), p. 227.
- COCKING, A. W. 1959. The Effects of high temperatures on roach (*Rutilus rutilus*). I. The effects of constant high temperatures. *J. Exp. Biol.*, v. 36, n. 1, p. 203-216.

- COP 15. United Nations Climate Change Conference – Dez. 7 – Dez 18, 2009, Últimas notícias: Se acabou el tiempo, la fecha límite es Copenhague, em: <http://es.cop15.dk/news/view+news?newsid=2856>. Acessado em 20 de julho de 2010.
- COULTAS, L.; CHAWENGSAKSOPHAK, K.; ROSSANT, J. 2005. Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature*, v. 438, p. 937-945.
- DAVIES, R.; MOYES, C. D.; WANG, Y. S. 2011. Intra- and Inter-specific variation in metabolic gene expression in relationship to environmental hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, v. 159, p. 25–31.
- EMA, M.; HIROTA, K.; MIMURA, J.; ABE, H.; YODOI, J.; SOGOWA, K.; POELLINGER, L.; FUJI-KURIYAMA, Y. 1999. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF-1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.*, v. 18 (7), p.1905-1914.
- FÁTIMA, L. A.; PAPA, P. C. 2010. Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF): Regulação transcricional e pós-transcricional. *Revista da Biologia*, v. 4, p. 22-27.
- FEDER, M. E. 2010. Physiology and Global Climate Change. *Ann. Rev. Physiol.*, v.71, p 123-125.
- FENG, W.; YE, F.; XUE, W.; ZHOU, Z.; KANG, Y. J. 2009. Copper regulation of Hypoxia-Inducible Factor-1 activity. *Mol. Pharmacol.*, v. 75, p. 174-182.
- FERRARA, N.; GERBER, H.; LECOUTER, J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Med.*, v. 9 (6), p. 669-676.

- FIELDS, P. A. 2001 Review: protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol. (part A) Mol. Integr. Physiol.*, v.129, p.417–431.
- FLANAGAN, M. B.; DABBS, D. J.; BRUFISKY, A. M.; BERIWAL, S.; BHARGAVA, R. 2008. Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod. Pathol.*, v. 21, p. 1255-1261.
- FOWLER, S.L.; HAMILTON, D.; CURRIE, S. 2009. A comparison of the heat shock response in juvenile and adult rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) – implications for increased thermal sensitivity with age. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 66, p. 91–100.
- FREDERICH, M.; PORTNER, H. O. 2000. Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab *Maja squinado*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 279, p. 1531-1538.
- FRY, F. E. J. 1957. The lethal temperature as a tool in taxonomy. *Ann. Biol.*, v. 33, p. 205-219.
- FRY, F. E. J.; HART, J. S.; WALKER, K. F. 1946. Lethal temperature relations for a sample of young speckled trout, *Salvelinus fontinalis*. *Ontario Fish. Res. Lab. Univ. Toronto Stud. Biol.*, n. 66, p. 9-35.
- FRY, F. E. J. 1947. Effects of the environment on animal activity. *Publ. Ontario Fish. Res. Lab.*, v. 68, p. 1-62.
- FRY, F. E. J.; BRETT, J. R.; CLAWSON, G. H. 1942. Lethal limits of temperature for young goldfish. *Rev. Can. Biol.*, v. 1, p. 50-56.

- GOLOVANOV, V. K. 2012. Influence of various factors on upper lethal temperature. *Inland Water Biol.*, v. 5 (1), p. 105-112.
- GOMES, V. 2008. Estudo ecofisiológico de anfípodas da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. Tese de livre-docência. Universidade de São Paulo, Departamento de Oceanografia Biológica.
- GONG, B.; LIANG, D.; CHEW, T.; GE, R. 2004. Characterization of the zebrafish vascular endothelial growth factor A gene: comparison with vegf-A genes in mammals and Fugu. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1676, p. 33-40.
- GREEN, B. S.; FISHER, R. 2004. Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 299 (1), p. 115-132.
- GRUBER, N. 2011. Warming up, turning sour, losing breath: ocean biogeochemistry under global change. *Phil. Trans. R. Soc. A*, v. 369, p. 1980–1996.
- GUDERLEY, H.; JOHNSTON, I. A. 1996. Plasticity of fish muscle mitochondria with thermal acclimation. *J. Exp. Biol.*, v. 190, p. 1311-1317.
- HANSON, C. E. (eds.). 2007. IPCC, 2007: climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge.
- Disponível em:
<http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_repo

rt_wg2_report_impacts_adaptation_and_vulnerability.htm>. Acesso em: 29 janeiro 2012.

HASUE, F. M. 2011. Avaliação da fototoxicidade do antraceno sobre a mortalidade e o dano ao DNA de juvenis de pampas, *Trachinotus carolinus* (linnaeus, 1766). Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo, Departamento de Oceanografia Biológica.

HEATH, S., W.A. BENNETT, J. KENNEDY & T.L. BEITINGER. 1994. Heat and cold tolerance of the fathead minnow, *Pimephales promelas*, exposed to the synthetic pyrethroid cyfluthrin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 51, p. 437–440.

HELMUTH, B.; BROITMAN, B.; YAMANE, L.; GILMAN, S. E.; MACH, K.; MISLAN, K. A. S.; DENNY, M. W. 2010. Organismal climatology: analyzing environmental variability at scales relevant to physiological stress. *J. Exp. Biol.*, v. 213, p. 995-1003.

HOBBS, J. A.; McDONALD, C. A. 2010. Increased seawater temperature and decreased dissolved oxygen triggers fish kill at the Cocos (Keeling) Islands, Indian Ocean. *J. Fish Biol.*, v. 77, p. 1219-1229.

HOCHACHKA, P. W.; SOMERO, G. N. 2002. Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. New York: Oxford University Press, 466 p.

HODSON, R.G.; FECHLEM, R.J.; MONROE, R.J. 1981. Upper temperature tolerance of three species of marine fishes. *J. Mar. Res.*, v. 24, p. 131–140.

HOFMANN, G. E.; TODGHAM, A. E. 2010. Living in the now: Physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 72, p. 127-145.

- HOROWITZ, M. 2010. Genomics and proteomics of heat acclimation. *Front. Biosci.*, v. 1, p. 1068-80.
- HU, D. E.; FAN, T. P. D. 1995. Suppression of VEGF-induced angiogenesis by the protein tyrosine kinase inhibitor, lavendustin A. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 114, p. 262-268.
- HUANG, W.; LIN, W.; CHEN, M.; JENG, S. 2006. An endothelial-cell-enriched primary culture system to study vascular endothelial growth factor (VEGF A) expression in a teleost , the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 145, p. 33-46.
- HUNTSMAN, A. G. 1942. Death of salmon and trout at high temperature. *J. Fish. Res. Board Can.*, v. 5, p. 485–501.
- HUNTSMAN, A. G.; SPARKS, M. I. 1924. Limiting factors for marine animals. 3. Relative resistance to high temperatures. *Contrib. Can. Biol.*, v. 2, p. 97–114.
- HUTCHISON, V.H. 1976. Factors influencing thermal tolerances of individual organisms. In: ESCH, G. W.; McFARLANE, R. N. (eds.). *Thermal ecology II*. Springfield, Virginia: U. S. Natl. Tech. Inf. Serv., p. 10-26.
- INBAR I, CHAYOTH R, CASSUTO Y. 1975. Energy metabolism in kidney of heat-acclimated hamsters. *Am. J. Physiol.*, v. 229 (5), p. 1234-1236.
- JOHNSTON, I. A.; MAITLAND, B. 1980. Temperature acclimation in crucian carp *Carassius carassius* L., morphometric analyses of muscle fibre ultrastructure. *J. Fish. Biol.*, v. 17, p. 113–125.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 2005. *Biologia celular e molecular*. 8ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 332p.

- KATSCHINSKI, D. M.; LE, L.; HEINRICH, D.; WAGNER, K. F.; HOFER, T.; SCHINDLER, S. G.; WENGER, R. H. 2002. Heat induction of the unphosphorylated form of Hypoxia-inducible Factor-1 Is Dependent on Heat Shock Protein-90 Activity. *J. Biol. Chem.*, v. 277 (11), p. 9262-9267.
- KE, Q.; COSTA, M. 2006. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol.*, v. 70, n. 5, p. 1469-1480.
- KODAMA, K.; RAHMAN, M. S.; HORIGUCHI, T.; THOMAS, P. 2012. Upregulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1a and HIF-2a mRNA levels in dragonet *Callionymus valenciennei* exposed to environmental hypoxia in Tokyo Bay. *Mar. Pollut. Bull.*, v. 64, p. 1339–1347.
- KRAUS, J. A.; DABBS, D. J.; BERIWAL, S.; BHARGAVA, R. 2012. Semi-quantitative immunohistochemical assay versus oncotype DX® qRT-PCR assay for estrogen and progesterone receptors: an independent quality assurance study. *Modern Pathol.*, v. 25 (6), p. 869-876.
- LAW, S. H. W.; WU, R. S. S.; NG, P. K. S.; YU, R. M. K.; KONG, R. Y. C. 2006. Cloning and expression analysis of two distinct HIF-alpha isoforms — gcHIF-1alpha and gcHIF-4alpha — from the hypoxia-tolerant grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *BMC Mol. Biol.*, v. 7, p. 1–15.
- LAZO, J. P.; DAVIS, D. A.; ARNOLD, C. R. 1998. The effects of dietary protein level on growth, feed efficiency and survival of juvenile Florida pompano (*Trachinotus carolinus*). *Aquaculture*, v. 169, p. 225–232.

- LEE, J.; BAE, S.; JEONG, J.; KIM, S.; KIM, K. 2004. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) α : its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.*, v. 36 (1), p. 1-12.
- LIANG, D.; XU, X.; CHIN, A. J.; BALASUBRAMANIYAN, N. V.; TEO, M. A. L.; LAM, T. J.; WEINBERG, E. S.; GE, R. 1998. Cloning and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) from zebrafish, *Danio rerio*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1397, p. 14-20.
- LUTTERSCHMIDT, W. I.; HUTCHISON, V. H. 1997. The critical thermal maximum: Data support the onset of spasms as the definitive end point. *Can. J. Zool.*, v. 75 (6), p. 1553–1560.
- LUTTERSCHMIDT, W. I.; HUTCHISON, V. H. 1997. The critical thermal maximum: History and critique. *Can. J. Zool.*, v. 75 (6), p. 1561–1574.
- MAIN, K. L.; RHODY, N.; NYSTROM, M.; RESLEY, M. 2007. Species Profile: Florida Pompano. Southern Regional Aquaculture Center. Disponível em: <http://www.aces.edu/anr/fish/aquaculture/download/species/florida_pompano/Pompanosrac7206.pdf>. Acesso em: 13 agosto 2012.
- MANTELATTO, F. L. M.; FRANSOZO, A. Characterization of the physical and chemical parameters of Ubatuba Bay, northern coast of São Paulo State, Brazil. *Revta. Brasil. Biol.*, v. 59, p. 23-31.
- MATSUURA, Y. 1999. Large-scale fluctuations of small pelagic fish populations and climate change. A review. *Bul. Tohoku Reg. Fisher. Res. Lab.*, v. 62, p. 195-205.

- McCARTY Jr, K. S.; SZABO, E.; FLOWERS, J. L.; COX, E. B.; LEIGHT, G. S.;
mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 72, p. 127-145.
- METZ, B.; DAVIDSON, O. R. 2007. Climate Change 2007: Mitigation: Contribution of Working Group III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Intergovernmental Panel on Climate Change. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/wg3/en/contents.html>. Acesso: 08 novembro 2011.
- MILLER, L.; KONRATH, J.; SOPER, J. T.; BUDWIT, D. A.; CREASMAN, W. T.; SEIGLER, H. F.; McCARTY, K. S. 1986. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. *Cancer Res.*, v. 46 (8), p. 4244s-4248s.
- MORA, C.; MAYA, M. F. 2006. Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. *J. Therm. Biol.*, v. 31, n. 4.
- MORA, C.; OSPINA, A. 2001. Tolerance to high temperatures and potencial impact of sea warming on reef fishes of Gorgona Island (tropical eastern Pacific). *Mar. Biol.*, v. 139, p. 765-769.
- MORA, C.; OSPINA, A. 2002. Experimental effect of cold, La Niña temperatures on the survival of reef fishes from Gorgona Island (Eastern Pacific Ocean). *Mar. Biol.*, v. 141, n. 4, p. 789-793.

- MURRAY, C. N.; RILEY, J. P. 1969. The solubility of gases in distilled water and sea water - II. Oxygen. *Deep-Sea Res.*, v. 16, p. 311-320.
- MURUGAIAN, P.; RAMAMURTHY, V.; KARMEGAM, N. 2008. Effect of temperature on the behavior and physiological responses of Catfish, *Mystus gulkio* (Hamilton). *J. Appl. Sci. Res.*, v. 4(1), p. 1454-1457.
- NIKINMAA, M.; REES, B. B.; 2005. Oxygen-dependent gene expression in fishes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 288, p. 1079–1090.
- OSPINA, A. F.; MORA, C. 2004. Effect of body size on reef fish tolerance to extreme low and high temperatures. *Environ. Biol. Fishes*, v. 70, n. 4, p. 339-343.
- PACHAURI, R. K.; REISINGER, A. 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/publications_and_data/ar4/syr/en/contents.html>. Acesso em: 25/09/2010.
- PARMESAN, C. 2006. Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, p. 637-669.
- PARRY, M. L.; CANZIANI, J. P.; PALUTIKOF, J. P.; van der LINDEN, P. J.; HANSON, C. E. (eds.). 2007. IPCC, 2007: climate change 2007: impacts, adaptation and vulnerability. Contribution of working group II to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambridge University Press, Cambridge.

Disponível

em:

<

http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment>.

PAULY, D.; WATSON, R.; ALDER, J. 2005. Global trends in world fisheries: impacts on marine ecosystems and food security. *Phil. Trans. R. Soc. B*, v. 360, p. 5-12.

PÉREZ, E. DÍAS, F.; ESPINA, S. 2003. Thermoregulatory behavior and critical thermal limits of the angelfish *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein) (Pisces: Cichlidae). *J. Ther. Biol.*, v. 28, p. 531-537.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G.; CHRISTIE, P. 1982. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *J. Fish Biol.*, v. 20, n. 2, p. 229-244.

PÖRTNER, H. O. 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, v. 88, n. 4, p. 137-146.

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

PÖRTNER, H. O. 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.*, v. 213, p. 881-893.

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

PÖRTNER, H. O.; PECK, L. S.; SOMERO, G. N. 2012. Antarctic Ecosystems: An Extreme Environment in a Changing World – Chapter 13: Mechanisms defining thermal limits and adaptation in marine ectotherms: an integrative view.. 1^a. Edição. Blackwell Publishing Ltd. 538p.

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

POWELL, W. H.; HAHN, M. E. 2000. The evolution of aryl hydrocarbon signaling proteins: diversity of ARNT isoforms among fish species. *Mar. Environ. Res.*, v. 50, p. 39–44.

RAHMAN, M. S.; THOMAS, P. 2007. Molecular cloning, characterization and expression of two hypoxia-inducible factor alpha subunits, HIF-1 α and HIF-2 α , in a hypoxia-tolerant marine teleost, Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gene*, v. 396, p. 273-282.

RAMOS-VARA, J. A. 2005. Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet. Pathol.*, v. 42, n. 4, p. 405-426.

REYES, I.; DÍAZ, F.; RE, A. D.; PÉREZ, J. 2011. Behavioral thermoregulation, temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures. *J. Ther. Biol.*, v. 36, p. 200–205.

- REYNOLDS, W. W.; MCCAULEY, R. W.; CASTERLIN, M. E.; CRAWSHAW, L. I. Body temperatures of behaviorally thermoregulating largemouth blackbass (*Micropterus salmoides*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 54A, p. 461-463.
- RICHARDS, J. G. 2011. Physiological, behavioral and biochemical adaptations of intertidal fishes to hypoxia. *J. Exp. Biol.*, v. 214, p. 191-199.
- RINALDI, L.; BASSO, P.; TETTAMANTI, G.; GRIMALDI, A.; TEROVA, G.; SAROGLIA, M.; EGUILEOR, M. 2005. Oxygen availability causes morphological changes and a different VEGF/Flk-1/HIF-2 expression pattern in sea bass gills. *Ital. J. Zool.*, v. 72 (2), p. 103-111.
- RISSANEN, E.; TRANBERG, H. K.; NIKINMAA, M. 2006. Oxygen availability regulates metabolism and gene expression in trout hepatocyte cultures. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 291, p. 1507–1515.
- RISSANEN, E.; TRANBERG, H. K.; SOLLID, J.; NILSSON, G. E. 2006. Temperature regulates hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) in a poikilothermic vertebrate, crucian carp (*Carassius carassius*). *J. Exp. Biol.*, v. 209, p. 994-1003.
- RODNICK, K. J.; GAMPERL, A. K.; LIZARS, K. R.; BENNETT, M. T.; RAUSCH, R. N.; KEELEY, A. R. 2004. Thermal tolerance and metabolic physiology among redband trout populations in south-eastern Oregon. *Ital. J. Zool.*, v. 64, p. 310–335.
- RUANE, N. M.; HUISMAN, E. A.; KOMEN, J. 2001. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. *J. Fish Biol.*, v. 59, n. 1, p. 1-12.

- RUYET, J. P.; MAHE, K.; LE BAYON, N.; LE DELLIU, H. 2004. Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, v. 237, p. 269–280.
- RYTKÖNEN, K. T.; VUORI, K. A. M.; PRIMMER, C. R.; NIKINMAA, M. 2007. Comparison of hypoxia-inducible factor-1 alpha in hypoxia-sensitive and hypoxia-tolerant fish species. *Comp. Biochem. Physiol., Part D*, p. 177– 186.
- SANCHES, E. G.; OSTINI, S.; RODRIGUES, V. C. 2007. Occurrence and treatment of monogenoides in fingerlings of florida pompano (*Trachinotus carolinus*) cultivated experimentally in the north area of the state of São Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 16, p. 1-4.
- SANDBLOM, E.; OLSSON, C.; DAVISON, W.; AXELSSON, M. 2010. Nervous and humoral catecholaminergic control of blood pressure and cardiac performance in the Antarctic fish *Pagothenia borchgrevinki*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, v.156 (2), p. 232-236.
- SANTOS, T. C. A.; ROCHA, A. J. S.; [GOMES, V.](#); [PASSOS, M. J. A. C. R.](#); HASUE, F. M.; BICEGO, M. C.; TANIGUCHI, S.; PHAN, V. N. 2012. EROD activity and genotoxicity in the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* exposed to benzo[a]pyrene (BaP) concentrations. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, v. 34, p. 995-1003.
- SANTOS, T. C. A.; [PHAN, V. N.](#) ; [GOMES, V.](#) ; [PASSOS, M. J. A. C. R.](#) 2006. Effects of naphthalene on metabolic rate and ammonia excretion of juvenile Florida pompano, *Trachinotus carolinus*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, v. 335, p.82-90.

- SCHINDLER, S. G.; WENGER, R. H. 2002. Heat induction of the unphosphorylated form of Hypoxia-inducible Factor-1 α is dependent on Heat Shock Protein-90 activity. *The J. Biol. Chem.*, v. 277 (11), p. 9262-9267.
- SCHUMACKER, P.; CHANDEL, N.; AGUSTI, A. G. N. 1993. Oxygen conformance of cellular respiration in hepa- tocytes. *Am. J. Physiol.*, v. 265, p. 395–402.
- SEEBACHER, F. 2009. Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolism in vertebrates. *J. Exp. Biol.*, v. 212, p. 2885-2893.
- SENDOEL, A.; KOHLER, I.; FELLMANN, C.; LOWE, S.W.; HENGARTNER, M. 2010. HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neural tyrosinase. *Nature*, v. 465 (3), p. 577-585.
- SHEN, R.; JIANG, X.; PU, J.; ZOU, S. 2010. HIF-1 α and -2 α genes in a hypoxia-sensitive teleost species *Megalobrama amblycephala*: cDNA cloning, expression and different responses to hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol., Part B*, v. 157, p. 273–280.
- SLOMAN, K. A.; WOOD, C; M.; SCOTT, G. R.; WOOD, S.; KAJIMURA, M.; JOHANNSSON, O. E.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; VAL, A. L. Tribute to R. G. Boutilier: The effect of size on the physiological and behavioural responses of oscar, *Astronotus ocellatus*, to hypoxia. *J. Exp. Biol.*, v. 209, p. 1197-1205.
- SMITH, D. C. 1928. The effect of temperature on the melanophores of fishes. *J. Exp. Zool.*, v. 52, n. 1, p. 183-234.

- SOITAMO, A. J.; RÅBERGH, C. M. I.; GASSMANNI, M.; SISTONEN, L.; NIKINMAA, M. 2001. Characterization of a Hypoxia-inducible Factor (HIF-1 α) from rainbow trout. *The J. Biol. Chem.*, v. 276, p. 19699-19705.
- SOMERO, G. N. 2002. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integr. Comp. Biol.*, v. 42, n. 4, p. 780-789.
- SOMERO, G. N. 2012. The physiology of global change: linking patterns to mechanisms. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, v. 4, p. 39-61.
- STEVENS, M E. D.; SUTTERLIN, A. M. 1976. Heat transfer between fish and ambient water. *J. Exp. Biol.*, v. 65, p. 131-145.
- STRAMMA, L.; JOHNSON, G. C.; SPRINTALL, J.; MOHRHOLZ, V. 2008. Expanding oxygen-minimum zones in the tropical oceans. *Science*, v. 320, p. 655-658.
- SUMNER, F. B.; DOUDOROFF, P. 1938. Some experiments upon temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures. *J. Ther. Biol.*, v. 36, n. 3, p. 200–205.
- TEROVA, G.; RIMOLDI, S.; CORÀ, S.; BERNARDINI, G.; GORNATI, R.; SAROGLIA, M. 2008. Acute and chronic hypoxia affects HIF-1 α mRNA levels in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture*, v. 279, p. 150–159.

- TOMANEK, L. 2008. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat-shock response. *Physiol. Biochem. Zool.* v. 81 (6), p. 709-717.
- VIGNARDI, C. P. 2012. Avaliação da genotoxicidade da nanopartícula de dióxido de titânio em juvenis de pampas, *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766), através de métodos citogenotóxicos. Universidade de São Paulo, Departamento de Oceanografia Biológica, 166 p.
- WONG, C.; WELLMAN, T. L.; LOUNSBURY, K. M. 2003. VEGF and HIF-1 expression are increased in advanced stages of epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.*, v. 91, p. 513-517.
- ZHANG, Y.; SHAO, Z.; ZHAI, Z.; SHEN, C.; POWELL-COFFMAN, J. A. The HIF-1 Hypoxia-Inducible Factor modulates lifespan in *C. elegans*. *PlosOne*, v. 4.; p. 1-9.
- ZHAO, X.; ZHAO, L.; TIAN, T.; ZHANG, Y.; TONG, J.; ZHENG, X.; MENG, A. 2010. Interruption of cenph causes mitotic failure and embryonic death, and its haploinsufficiency suppresses cancer in zebrafish. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 27924-27934.
- ZHAO, Y.; CHEN, X.; DU, J. 2009. Cellular adaptation to hypoxia and p53 transcription regulation. *Zhejiang Univ. Sci. B*, v. 10 (5), p. 404-410.
- ZHOU, J.; SCHMID, T.; FRANK, R.; BRUNE, B. 2004. PI3K/Akt is required for Heat Shock Proteins to protect Hypoxia- inducible Factor 1 from pVHL-independent degradation. *J. Biol. Chem.*, v. 279, p. 13506-13513.