Caroline Margonato Cardoso

Expressão histoimunológica de proteínas de reparo celular e comportamento de juvenis de *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae) durante aumento 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, Programa de Oceanografia, área de Oceanografia Biológica.

Orientador: Prof. Dr. Vicente Gomes

São Paulo

2013

Universidade de São Paulo
Instituto Oceanográfico

Expressão histoimunologica de proteínas de reparo celular e comportamento de juvenis de *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae) durante aumento gradual de temperatura.

Versão Corrigida

Caroline Margonato Cardoso

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

Profa. Dra. June Ferraz Dias

Conceito

Profa. Dra. Maria Inês Borella

Conceito

*Dedico este trabalho a minha mãe
Helena, a minha madrinha de batismo
Suely e a minha madrinha de crisma
Rosinha. Mulheres fortes, guerreiras,
que me ensinaram tudo o que eu precisava e
nas quais eu me espelho. Obrigada por
acreditarem em mim!*

Nós deveríamos ser o coração e a mente da Terra, não sua moléstia. Então, sejamos corajosos e paremos de pensar somente nos direitos e necessidades da humanidade, e enxerguemos que nós ferimos a Terra e precisamos fazer as pazes com Gaia. Precisamos fazer isso enquanto somos fortes o bastante para negociar, e não uma turba esfacelada liderada por senhores de guerra brutais. Acima de tudo, precisamos lembrar que somos parte dela, e que ela é de fato nosso lar.

James Lovelock

*Quando a gente anda sempre em frente,
não pode mesmo ir longe.*

Antoine de Saint-Exupéry

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	HIPÓTESE	10
III.	OBJETIVOS	11
IV.	ÁREA DE ESTUDO	12
V.	MATERIAL E MÉTODOS	14
	A) Captura e manutenção dos peixes.....	14
	B) Procedimentos experimentais	17
	i) Grupos controle.....	19
	C) Temperatura crítica de sobrevivência (TCS).....	19
	D) Sistema de controle da temperatura dos experimentos.....	20
	E) Fatores químicos e físicos da água	22
	F) Análises comportamentais	22
	G) Análises histológicas	24
	i) Coleta e fixação dos tecidos.....	24
	ii) Preparação de blocos para a microscopia	24
	iii) Microscopia de luz.....	24
	iv) Imuno-histoquímica (Hsp70 e p53)	25
	v) Anticorpo primário.....	29
	vi) Contagem das células positivas	30
	H) Análises estatísticas	31
VI.	RESULTADOS	32
	A) Eficiência do sistema de controle da temperatura	32
	B) Parâmetros físico-químicos das condições da água dos aquários experimentais e controles.....	33
	C) Organismos estudados	34
	i) Tamanho	34
	ii) Análises Comportamentais.....	35
	iii) Temperatura crítica de sobrevivência (TCS).....	37
	D) Macroscopia e Microscopia de luz	40
	i) Brânquias	40
	ii) Coração	44
	E) Imuno-histoquímica.....	47

i) Proteínas de Choque Térmico (Hsp70).....	47
ii) Proteína 53 (p53).....	57
iii) Hsp 70 e p53 em <i>Rattus norvegicus</i>	67
iv) Hsp70 x p53 nos tecidos branquiais e cardíacos.....	68
VII. DISCUSSÃO	71
VIII. CONCLUSÕES	855
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	877

ÍNDICE DE ABREVIACÕES

22°C	Grupos controle, 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
CA	Controle Ambiental
DAB	3,3'-diaminobenzidine
HE	Hematoxilina- Eosina
Hsp70	<i>Heat shock protein 70</i>
P53	<i>Protein 53</i>
Tampão ICC	Tampão fosfato salino com Triton X-10
TCS	Temperatura crítica de sobrevivência

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Esquema representando o modelo hipotético do estudo, separado em duas vertentes: respostas fisiológicas por meio da expressão de proteínas Hsp70 e p53 e alterações comportamentais por meio das análises das atividades dos peixes submetidos ao aquecimento.</i>	10
<i>Figura 2. Foto de satélite das regiões de coleta. A Base de Pesquisa “Clarimundo de Jesus” está representada pelo pentágono. As áreas de coleta dos peixes são as Praias do Lázaro (A) e Domingas Dias (B). Foto: Google Earth.</i>	12
<i>Figura 3. Sequência de eventos dos experimentos. A-C) Coleta de peixes com rede Picaré. D-E) Transporte por meio do veículo disponibilizado pela Base de Pesquisa do IOUSP “Clarimundo de Jesus”. F) Aquário para o transporte acondicionado em um tanque de 250 litros utilizado para conter a água e atenuar o distúrbio visual dos peixes. G) Tanques de 500 litros cobertos com lona azul para o período de repouso e um tanque para troca de água. H) Aquário onde os peixes permaneceram 24 horas e durante todo o período do experimento envolto por uma proteção azul. I) Coleta dos peixes após o experimento com rede tipo puçá. J) Processamento dos tecidos e coletas de amostras. Fotos: Caroline Margonato Cardoso e Priscila Verónica Sartorio.</i>	16
<i>Figura 4. Exemplar juvenil de Trachinotus carolinus. No momento da captura os peixes foram selecionados por tamanho, entre 50 mm a 100 mm. Escala: 5 mm. Fotos: Alex Sander Dias Machado.</i>	17
<i>Figura 5. Esquema do sistema controlador de temperatura de cada um dos aquários experimentais de 40 litros. O aquecedor de 300 W era posicionado no fundo do aquário. Duas bombas submersas adaptadas foram utilizadas para homogeneização da água. Em cada aquário foram colocados 6 peixes. A temperatura era verificada por um termômetro acoplado ao controlador de temperatura, em sistema on-off.</i>	21
<i>Figura 6. Visão do interior de um aquário experimental com: um aquecedor (1), duas bombas submersas acopladas a canos de PVC repletos de orifícios para homogeneização da água (2 e 3), um aerador (4) e o termômetro (5).</i>	21
<i>Figura 7. Esquema de coleta de material para imuno-histoquímica.</i>	26
<i>Figura 8. Representação da ligação entre um antígeno e o anticorpo primário. O anticorpo secundário se liga especificamente ao anticorpo primário e carrega consigo uma molécula de biotina. A biotina tem alta afinidade com a estreptavidina, que por sua vez, está conjugada com peroxidase. A peroxidase reage com o cromógeno DAB produzindo a coloração marrom nas proteínas marcadas. Foto adaptada de Ramos- Vara (2005).</i>	28
<i>Figura 9. Padrões para a identificação das intensidades de expressão das proteínas analisadas pela marcação imuno-histoquímica. Códigos: 0 - nenhuma marcação; 1 – marcação fraca; 2 – marcação moderada e 3 – marcação forte. A primeira linha refere-se às células da brânquia e a segunda refere-se às do coração. Fotomicrografias tiradas em aumento de 1000 vezes.</i>	30

Figura 10. Taxa de aumento da temperatura da água em dois sistemas distintos: A) Em aquário com apenas uma bomba submersa para a homogeneização da água. B) Em aquário com duas bombas submersas acopladas a um cano perfurado para melhor homogeneização da água.....32

Figura 11. Comprimento total (média e desvio padrão) dos peixes submetidos às diferentes temperaturas estudadas. CA - controle ambiental; C22 – controle 22°C e TCS - temperatura crítica de sobrevivência.34

Figura 12. Médias das pontuações dos critérios de análise de comportamento: Equilíbrio, Natação e Batimento opercular, em que a nota 5 é correspondente ao comportamento normal e 0 corresponde à morte. C22 - controle 22 °C; TCS - temperatura crítica de sobrevivência. n=4236

Figura 13. Soma das pontuações dos critérios de análise de comportamento: Equilíbrio, Natação e Batimento opercular para avaliar o estado geral do peixe. A pontuação foi relacionada às fases críticas que englobam as temperaturas subletais e a letal.38

Figura 14. Taxa de mortalidade dos peixes dos grupos TCS em relação à temperatura. Linha de tendência com intersecção na média de temperatura de morte.39

Figura 15. Relação entre temperatura crítica de sobrevivência e o tamanho de *Trachinotus carolinus*.40

Figura 16. A) *Trachinotus carolinus* com o opérculo identificado (op). B) Após a remoção do opérculo, os arcos branquiais (ab) ficam expostos. C) Os quatro arcos branquiais (ab) se inserem na cavidade branquial (cb). Estas estruturas se repetem no lado contralateral do peixe. Escala: 5 mm.....41

Figura 17. Um arco branquial de *Trachinotus carolinus* visualizado em microscópio estereoscópico com aumento de 10 vezes. Os filamentos branquiais são unidos por uma base cartilaginosa. A partir de um arco branquial, obteve-se a microscopia do filamento branquial com as lamelas alinhadas paralelamente. Escala: 50 μ m.41

Figura 18. Brânquias. Cortes sagitais das lamelas primárias e secundárias. A) Coloração Hematoxilina e Eosina. 1- Lamela primária; 2- Lamela secundária com capilar central; 3- Condrócitos juntamente com a 4- matriz extracelular, para dar sustentação ao filamento branquial. Uma ou duas camadas de células do epitélio pavimentoso revestem as lamelas secundárias (setas). As células clorídricas são observadas na junção entre as lamelas primárias e secundárias (*). B) Coloração Picrossirus Red. 1 – Tecido cartilaginoso de sustentação contendo muitas fibras de colágeno tipo I; 2 – Epitélio que reveste a lamela primária com algumas células mucosas (setas). Os eritrócitos (cabeças de setas) e as células pilares são delimitadas por fibras colágenas (vermelho). C) Coloração Tricômio Masson. 1 - Seio venoso central composto por arteríolas e vasos anastomosados, delimitados por colágeno (setas), de onde se ramificam redes capilares para as lamelas carregando os eritrócitos (cabeças de setas). Na porção central do filamento branquial também se encontram o tecido cartilaginoso de sustentação e 2- sua matriz extracelular. D) Coloração Hematoxilina e Eosina. Células clorídricas (*) na lamela secundária. Do seio venoso central, os eritrócitos (cabeças de setas) são distribuídos para as lamelas e intercalados por células pilares (setas).43

Figura 19. Coração de *Trachinotus carolinus* situado na região da junção pré-opercular. B) Após a retirada do opérculo e dos arcos branquiais, o coração foi retirado. Escala: 5 mm. C) Coração visualizado em lupa com o aumento de 10 vezes. Observa-se o átrio (At), o ventrículo (Vt) e o bulbo arterial (Ba).44

Figura 20. Coloração Hematoxilina e Eosina: A) Histologia do ventrículo (Vt) e do bulbo arterial (Ba). B) O bulbo arterial é constituído principalmente de tecido fibroelástico que serve de sustentação para receber o sangue que foi bombeado do ventrículo; os eritrócitos (setas) se diferenciam do tecido fibroelástico. C) Cardiomiócitos com os núcleos alongados centralmente (setas longas). Núcleos densos do endocárdio (setas). D) O coração é revestido por um epitélio pavimentoso simples, o epicárdio (cabeças de setas). Coloração Tricômio Masson: E) Eritrócitos (setas) e seus núcleos em azul. Fibras musculares cardíacas dispostas em vários sentidos com o epicárdio revestindo o coração (cabeças de setas). Coloração Picrosirius red: F) Epicárdio revestindo externamente o coração (cabeças de setas) e vários espaços, denominados trabéculas (Tb). Endocárdio revestindo o miocárdio (setas). A lâmina basal do endocárdio e do epicárdio possuem colágeno.46

Figura 21. Fotomicrografias de brânquias de *Trachinotus carolinus* submetidas à técnica de imuno-histoquímica anti-Hsp70 e contracoradas com hematoxilina. A) Controle negativo. B) Brânquia de peixe controle ambiental. C) Brânquia de peixe controle 22 °C. D) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 26 °C. E) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 30 °C. F) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 32 °C. G) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 34 °C. H) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 36 °C. I) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS) com núcleos fortemente marcados de Hsp70 (setas). Diluição do anticorpo de 1:9000.48

Figura 22. Médias de Hscore de Hsp70 em brânquias de controle ambiental e controle 22 °C. Os peixes controle 22 °C (C22) ficaram de 3 a 5 dias em tanques e posteriormente foram colocados em aquários de vidro a 22 °C por 24 horas. Os peixes controle ambiental (CA) foram eutanasiados assim que foram coletados, em temperatura ambiente de 22 °C.49

Figura 23. Médias e desvio padrão do Hscore referentes à marcação de Hsp70 em brânquias às diferentes temperaturas. Nas brânquias a Hsp70 variou entre 110 e 180. Resultados significativos em comparação com o controle 22 °C (C22) são representados por asteriscos (*), onde: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ 50

Figura 24. Diferenças das médias de Hscore de Hsp70 em brânquias entre as distintas condições experimentais. Os valores de p estão indicados nos casos em que houve diferenças significativas entre as médias de Hscore. Gráfico gerado automaticamente pelo Biostat 5.0.51

Figura 25. Médias de Hscore de Hsp70 em brânquias submetidas às temperatura 36 °C e crítica de sobrevivência (TCS).52

Figura 26. Fotomicrografias de corações de *Trachinotus carolinus* submetidos à técnica de imuno-histoquímica anti-Hsp70 e contracorados com Hematoxilina. A) Controle negativo. B) Coração de peixe controle ambiental. C) Coração de peixe controle 22 °C. D) Coração de peixe submetido a aquecimento até 26 °C. E) Coração de peixe submetido a aquecimento até 30 °C. F) Coração de peixe submetido a aquecimento até 32 °C. G) Coração de peixe submetido a

aquecimento até 34 °C. H) Coração de peixe submetido a aquecimento até 36 °C. I) Coração de peixe submetido a aquecimento até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS) com núcleos marcados de Hsp70 (setas vermelhas). Diluição do anticorpo de 1:9000.....53

Figura 27. Médias de Hscore de Hsp70 no coração de controle ambiental (CA) e controle 22°C (C22). O asterisco (*) indica diferença significativa com $p < 0,05$54

Figura 28. Médias e desvio padrão do Hscore referente à marcação de Hsp70 no coração às diferentes temperaturas. No coração a Hsp70 variou entre 130 e 215. Resultados significativos em comparação com o 22 °C (C22) são indicados por asteriscos (*), onde: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$55

Figura 29. Diferenças das médias de Hscore de Hsp70 no coração entre as distintas condições experimentais. Os valores de p estão indicados nos casos em que houve diferenças significativas entre as médias de Hscore. Gráfico gerado automaticamente pelo Biostat 5.0.56

Figura 30. Médias de Hscore de Hsp70 no coração submetidos às temperaturas 36°C e crítica de sobrevivência (TCS). O asterisco (*) indica diferença significativa com $p < 0,05$57

Figura 31. Fotomicrografias de brânquias de *T. carolinus* submetidas à técnica de imuno-histoquímica anti-p53 e contracolorados com hematoxilina. A) Controle negativo. B) Brânquia de peixe controle ambiental. C) Brânquia de peixe controle 22 °C. D) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 26 °C. E) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 30 °C. F) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 32 °C. G) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 34 °C. H) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 36 °C. I) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS). Diluição do anticorpo de 1:3500.58

Figura 32. Médias de Hscore de p53 em brânquias de controle ambiental (CA) e controle 22 °C (C22).59

Figura 33. Médias com desvio padrão do Hscore referentes à marcação p53 em brânquias às diferentes temperaturas. Nas brânquias, a p53 varia entre 120 e 170. Resultados significativos em comparação com o controle 22 °C (C22) são indicados por asteriscos (*), onde: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$60

Figura 34. Diferenças das médias de Hscore de p53 em brânquias entre as distintas condições experimentais. Os valores de p estão indicados nos casos em que houve diferenças significativas entre as médias de Hscore. Gráfico gerado automaticamente pelo Biostat 5.0.61

Figura 35. Médias de Hscore de p53 em brânquias submetidos às temperaturas 36°C e crítica de sobrevivência (TCS).62

Figura 36. Fotomicrografias de corações de *Trachinotus carolinus* submetidos à técnica de imuno-histoquímica anti-p53 e contracolorados com hematoxilina. A) Controle negativo. B) Coração de peixe controle ambiental. C) Coração de peixe controle 22 °C. D) Coração de peixe submetido a aquecimento até 26 °C. E) Coração de peixe submetido a aquecimento até 30 °C. F) Coração de peixe submetido a aquecimento até 32 °C. G) Coração de peixe submetido a

aquecimento até 34 °C. H) Coração de peixe submetido a aquecimento até 36 °C. I) Coração de peixe submetido a aquecimento até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS). Diluição do anticorpo de 1:3500.63

Figura 37. Médias de Hscore de p53 no coração de controle ambiental (CA) e controle 22°C (C22). O asterisco (*) indica diferença significativa com $p < 0,05$64

Figura 38. Médias e desvio padrão do Hscore referente à marcação p53 no coração às diferentes temperaturas. No coração a p53 variou entre 110 e 230. Resultados significativos em comparação com o controle 22 °C (C22) são representados por asteriscos (*), onde: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$65

Figura 39. Diferenças das médias de Hscore de p53 no coração entre as distintas condições experimentais. Os valores de p estão indicados nos casos em que houve diferenças significativas entre as médias de Hscore. Gráfico gerado automaticamente pelo Biostat 5.0.66

Figura 40. Médias de Hscore de p53 no coração submetidos às temperaturas 36°C e crítica de sobrevivência (TCS).67

Figura 41. Fotomicrografias de tecido muscular estriado cardíaco de *Rattus norvegicus*. A) Tecido submetido à imuno-histoquímica anti-Hsp70. B) Tecido submetido à imuno-histoquímica anti- p53. Detalhe: controle negativo de ambas as proteínas.68

Figura 42. Comparação entre as médias de Hscore das proteínas Hsp70 e p53 nas brânquias em diferentes temperaturas. Observa-se que ambas atingem o pico de marcação entre as temperaturas de 32 °C e 34 °C, posteriormente decaem a valores semelhantes ao do controle. 69

Figura 43. Comparação entre as médias de Hscore das proteínas Hsp70 e p53 no coração em diferentes temperaturas. Observa-se que o comportamento das duas proteínas no coração aparenta ser semelhante, porém, porém com algumas particularidades (comentadas no texto). Enquanto a quantidade Hsp70 eleva-se até 34 °C, decai à 36 °C e retorna a expressar-se intensamente na TCS. A p53 eleva-se até 30°C e mantém-se mais ou menos constante até a TCS.70

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1. Esquema de elevação de temperatura ambiental de 2°C/h com indicação dos momentos de coleta de cada grupo experimental. A coleta era efetuada ao término dos 120 minutos de permanência dos peixes à temperatura estipulada. n=90.</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 2. Critérios de classificação comportamental utilizando a pontuação entre 5 e 0 de acordo com os comportamento observado nos peixes que foram submetidos ao aumento gradual de temperatura.....</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 3. Tabela adaptada de estudos comportamentais de Cocking (1959), nos quais as alterações de comportamento em temperaturas subletais são classificadas em fases.</i>	<i>23</i>
<i>Tabela 4. Relação dos anticorpos utilizados.</i>	<i>30</i>
<i>Tabela 5. Médias das quantidades de oxigênio dissolvido nos grupos experimentais e controle. Cada grupo experimental (I a V) tinha um grupo controle correspondente (VI a X). TCS: temperatura crítica de sobrevivência.</i>	<i>33</i>

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Oceanográfico, pela infraestrutura que nos foi disponibilizada, pelos recursos humanos, alojamentos, laboratórios e embarcações da Base de Pesquisa Clarimundo de Jesus.

Ao Prof. Vicente Gomes, meu orientador, que me aceitou prontamente em seu laboratório como sua aluna, e assim, em sua vida. Gostaria de agradecer pela paciência, pelas conversas divertidas, pelos ensinamentos (científicos e de vida) e pelas grandes ideias. Foi um grande período de aprendizado ao seu lado.

Ao Prof. Phan Van Ngan, uma das pessoas mais sábias que tive o prazer de conhecer e compartilhar de seus ensinamentos, que sabe lidar com todas as situações. Obrigada pelos conselhos, pelos presentes de Natal, pelos deliciosos almoços, pela ajuda e preocupação. Somos todos fãs do Phan!

Ao Alex Machado, meu co-orientador, cuja ideia de mestrado nasceu de seus pensamentos. Obrigada pela amizade, pela ajuda, por nos ensinar a manter as portas abertas e abrir outras mais, por ensinar a tirar fotos e a fazer imuno, QUASE como você sabe fazer, pelo bom-humor diário, por nos ouvir, pelos conselhos de vida. Ávida vida a professorar!

Às minhas lindas do lab, Caroline Vignardi, Daniela Abras, Juliana Nucci e Deborah Cardim e ao Fabio Hasue, guerreiro, que aguenta seis mulheres! Vocês sabem individualmente o quanto foram importantes para mim e graças a vocês minha “viagem” entre São Caetano e USP sempre valeu a pena. Todos vocês fizeram parte deste mestrado e sem vocês eu nada sou!! Obrigada por iluminar minha vida, Facis cantantis!

Ao Arthur Rocha, à Thais Santos, ao Augusto Marton (que saudades de você!!), a Bárbara Emili e a Maria José Passos (Zezé), que me ajudaram de várias maneiras, seja

nas viagens de campo, nas correções, nas referências ou nas boas ideias. Obrigada por tudo!!

Ao Renato Ferreira, pela amizade, pelas caronas, pelos almoços divertidos no bandejão, pelas risadas, piadas, conversas sobre o futuro e pela espontaneidade e alegria diárias.

À Profa. Paula Papa e à Profa. Maria Angélica Miglino, que nos abriram as portas do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária FMVZ/USP. Obrigada pela confiança.

Ao Prof. Francisco Javier Hernandez Blazquez, também da FMVZ/USP, por permitir a utilização de seus aparelhos microscópicos para que obtivéssemos as imagens mostradas nesta dissertação.

Aos colegas da FMVZ/USP, que nos ajudaram muito durante todo o mestrado, em especial o Ronaldo Agostinho e o Diogo Palermo. Ambos disponibilizaram tempo, material, aparelhos e boa vontade para que este trabalho fosse concluído. Sinceramente, nem tenho como agradecer tanta ajuda!

Aos amigos da veterinária, Leandro Rui e Fernanda Cardoso, simpáticos, sempre bem humorados e, no caso da Fê, nos ajudou a decifrar alguns protocolos. Ao André Conrado que nos aguentou pacientemente estes três anos quando estávamos desesperadas atrás de um horário para o microscópio.

Aos funcionários da base de Ubatuba: Ricardo, Fernando, Ayrton, Daico, Osiel, Mi, Lincoln, Roberto, Manoel, Marquinho, Marcio, Adriano, Celso, D. Cida, Vania, Bete, Orlando, Nilton, Cassia, Jonathan, Caio, Cida, Sula, Gleice, Sandra, Jamisson, Cristiano, Zé Maria, Renato. Obrigado por tudo e espero vê-los ainda muito mais vezes!

Às secretárias da pós: Ana Paula Evangelista, Silvana Lima e Leticia Furusawa, que não cansam de responder nossas dúvidas diárias, em assessorar nossa vida agitada de pós-graduando e pela disposição em nos ajudar.

À minha mãe, por acreditar em mim desde o princípio e nunca duvidar da minha capacidade, mesmo quando eu duvidei! Sem o seu apoio lá atrás, quando decidi fazer Biologia, eu não estaria aqui hoje!

Ao Pedro Souza, companheiro amado, que participou desta ideia desde os tempos gélidos do Alasca até os tempos de distância de Londrina. Agora, finalmente ao meu lado, ainda suportou com afinho os meses de separação, os dias de trabalho intenso, apoiou a minha dedicação ao mestrado e as minhas escolhas. Obrigada por fazer parte da minha vida!!

À minha família, que nunca questionou as minhas decisões e sempre me deu todo o suporte e compreensão para que eu prosseguisse esse caminho. Aos meus babys (Nanny, Teodoro, Brenda e falecido Toby), minha família de quatro patas, que sempre me trazem imensas alegrias.

À Natalia Bazán, grande amiga da faculdade. Obrigada por ser sempre assim, você. Amigona e sempre de bem com a vida. Caminhamos na mesma direção por um bom tempo e o que eu mais quero é que a vida continue nos deixando próximas. Te quiero mucho mi gran amiga!!

À Juliana Ribeiro e a Natália Signorelli, por me aceitarem em sua casa, pelas noites de conversas, jantares e risadas. Vocês fizeram parte desta história.

Aos amigos Luís Fabiano (Bica), que sempre esteve presente nas nossas viagens de Ubatuba e por ser um companheiro; Pedro Cristales, que apareceu nos últimos minutos do segundo tempo para salvar o nosso congresso, pelos bons conselhos e pelas conversas divertidas; Wagner Machado, agora Doutor, pelas conversas, por nos dar de

presente a trilha sonora que fez parte deste mestrado e por sempre lembrar com carinho da gente como lembramos de você.

Ao Diego Franco, por nos ajudar quando estávamos desesperadas, sendo super atencioso e solícito. Te devemos uma!!

Obrigada a todos que passaram e fizeram parte desta fase importante da minha vida. Todos deixaram as suas marcas!!

Obrigada ao Cnpq pela bolsa concedida.

À Priscila Sartorio, minha companheira de mestrado que se tornou uma grande amiga. Sorrimos e choramos juntas, compartilhamos dos mesmos medos e das mesmas alegrias. Aprendemos, batalhamos muito e crescemos aqui neste lab. Obrigada por tudo, você foi meu alicerce, aquela em que eu me apoiei quando achei que não ia conseguir, que me mostrou que juntas podemos chegar mais longe e que me fez saber o verdadeiro significado do companheirismo e da cumplicidade.

RESUMO

A temperatura é um fator abiótico que exerce profundos efeitos no funcionamento dos ecossistemas marinhos, influenciando na biologia das espécies. Os peixes são um bom modelo para se estudar este fator, pois são pecilotérmicos e possuem importância comercial e ecológica. O objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento, a tolerância térmica e os mecanismos moleculares de juvenis de peixe pampo *Trachinotus carolinus* em relação à elevação da temperatura. Para isso, foram submetidos ao aumento controlado da temperatura da água (2 °C/h) a partir da temperatura de coleta (22 °C) até 26 °C, 30 °C, 32 °C, 34 °C e 36 °C e nestas foram mantidos por 120 minutos, ou foram aquecidos até a morte no estudo de tolerância térmica. O comportamento foi analisado usando-se vídeos e as expressões de Hsp70 e p53 nas brânquias e no coração dos pampos foram obtidas por meio da técnica de imuno-histoquímica. Os resultados mostraram que os pampos comportam-se de forma agitada com o aquecimento até a temperatura de 36 °C, e a partir dela apresentam uma desorganização dos sistemas e órgãos. A expressão de Hsp70 e p53 está relacionada ao aumento de temperatura até 34 °C e decai nas temperaturas de 36 °C e TCS. Assim, conclui-se que o aumento de temperatura afeta o comportamento e a expressão de Hsp70 e p53.

Palavras-chave: p53, Hsp70, sobrevivência celular, temperatura, comportamento, peixes.

ABSTRACT

Temperature is an abiotic factor that influences the biology of marine species. Fishes are a good model to study temperature because they are poikilothermic and have ecological and commercial importance. The aim of this study was to analyze the behavior and study the expression of Hsp70 and p53 using the immunohistochemistry assay. The Expression of these two protein was observed in relation to temperature rise in heart and gills tissues of juvenile pompano fish *Trachinotus carolinus*. The Fishes were exposed to controlled increase of the water temperature (2 °C/h), from 22 °C (control) to 26 °C, 30 °C, 32 °C, 34 °C and 36 °C and they were maintained in these temperature for 120 minutes . After that fishes were maintained in these temperature for 120 minutes. In addition, experiments were performed to determinate the critical temperature survival (TCS). The results revealed that the expression of Hsp70 and p53 were proportional to the temperature rise until 34 °C and that it declines at temperatures of 36 °C and TCS. The fishes behavior was frantic with heating until a temperature of 36 ° C and subsequently they have showed a disorganization of systems and organs. We concluded that the temperature increase affects the behavior and expression of p53 and Hsp70 in pompanos fishes.

Keywords: p53, Hsp70, cell survival, temperature, behavior, fish.

I. INTRODUÇÃO

Para sobreviverem em um determinado habitat, os organismos devem estar aptos a se ajustarem às variações têmporo-espaciais do meio (Lutterschmidt; Hutchison, 1997). Dentre todos os fatores abióticos, a temperatura é um dos mais bem estudados (Angilletta Jr, 2009), pois afeta diretamente o comportamento, a energia cinética dos reagentes, a bioquímica e os processos fisiológicos dos organismos (Alexandrov; Bernstam, 1977). Uma das grandes preocupações atuais relacionadas com as variações de temperatura nos ambientes naturais é o aquecimento global. De acordo com o “Intergovernmental Panel on Climate Change” – IPCC 2007, o planeta aqueceu 0,6 °C durante o século passado e continua a aquecer neste século. Os estudos para a identificação das causas primárias do aquecimento global permitem que os cientistas elaborem algumas projeções para o futuro. Poucos são os que contestam a existência de uma ligação entre o aumento das emissões de gases do efeito estufa e os recentes aumentos de temperatura (Pachauri; Reisinger, 2007). Os gases dos efeitos estufa, tais como o dióxido de carbono, o metano e o CFC’s, influenciam na absorção, dispersão e emissão da radiação ultravioleta, levando ao aumento da temperatura do ar e da superfície do planeta. Estas emissões provêm principalmente das atividades industriais, da queima de combustível fóssil e de outras atividades humanas. A tendência é que a quantidade de gases acumulados na atmosfera aumente, a menos que essas atividades cessem ou sejam muito modificadas. Segundo as previsões, mesmo que as emissões parem imediatamente, o planeta iria aquecer 0,5 °C no próximo século. Se as emissões continuarem, a temperatura da superfície terrestre poderá aumentar de 2 °C a 4 °C até 2100 (Metz; Davidson, 2007).

As consequências do aumento da temperatura nos ecossistemas marinhos incluem mudanças nos períodos e no sucesso reprodutivo, alterações no recrutamento, nas taxas de crescimento e de mortalidade e, finalmente, na distribuição geográfica de

espécies (Frederich; Pörtner, 2000). Em última instância, o efeito mais dramático da temperatura é sua ação como agente letal (Fry, 1947). O ambiente marinho será um dos que mais deverá sofrer alterações em sua dinâmica biológica, bem como das espécies que o habitam, pois os ciclos biológicos dos organismos marinhos estão intrinsecamente relacionados à temperatura da água do mar (Parry et al., 2007). Dentre os organismos pecilotérmicos marinhos, os peixes se destacam por estarem sujeitos a flutuações de temperatura diária e sazonal, serem componentes numerosos da teia alimentar e serem importantes economicamente. Assim, o aquecimento global ou qualquer outro evento que envolva o distúrbio da temperatura pode levar o organismo a uma situação de estresse.

O estudo da fisiologia térmica de organismos pecilotérmicos é complexo, pois o comportamento faz parte da regulação da temperatura corporal destes animais, incluindo os peixes. Alguns tipos de comportamento são governados pelos limites fisiológicos de temperatura para a espécie (Lutterschmidt; Hutchison, 1997; Beitinger et al., 2000). Por exemplo, até um determinado ponto, o aumento de temperatura induz o aumento do metabolismo (Pörtner, 2001) e assim, a atividade natatória dos peixes, bem como o aumento dos batimentos operculares. No entanto, em temperaturas próximas à letal, o comportamento normal mistura-se ao colapso fisiológico dos organismos. Em peixes, isso pode ser identificado pela presença de espasmos, perda de equilíbrio (Watenpaugh; Beitinger, 1985), cessamento dos movimentos operculares, (Bettoli et al., 1985) e falta de resposta a um estímulo tátil (Heath et al., 1994).

A temperatura é o fator abiótico mais importante para os processos vitais de peixes e há vários métodos para se estimar suas tolerâncias térmicas. Os dados obtidos diretamente em campo são pouco utilizados, pois nem sempre estes organismos se localizam em áreas que possuam temperaturas de acordo com as preferências fisiológicas

(Brett, 1956), devido a uma série de fatores bióticos (predação e competição) e abióticos que interagem entre si.

Os dois métodos mais utilizados para a determinação da tolerância térmica são o método estático e o método dinâmico. No método estático os peixes são colocados de forma súbita em ambientes com uma dada temperatura. Os dados são analisados utilizando técnicas estatísticas da farmacologia para determinar o equivalente de LD 50, onde a “dosagem” é a relação entre o tempo de exposição, a temperatura e a morte de 50% dos indivíduos, sendo denominada temperatura letal incipiente superior ou inferior (ITL – *incipient lethal temperature*), técnica esta idealizada primeiramente por Fry e colaboradores (Fry et al., 1942; Fry 1957; Fry et al, 1946). No método dinâmico, os peixes são aclimatados a uma determinada temperatura e são sujeitos a uma mudança da temperatura da água de forma constante e contínua até que o ponto térmico máximo ou mínimo seja atingido (Beitinger et al. , 2000). O ponto máximo (*endpoint*) é dado quando a atividade locomotora se torna desorganizada e os animais ficam vulneráveis às condições que os levariam prontamente à morte (fugir de predadores ou se alimentarem, por exemplo), sendo assim denominada de temperatura crítica máxima ou mínima (CTMax – *critical thermal maximum* e CTMin – *critical thermal minimum*). Esta técnica foi amplamente estudada por Cowles; Bogert (1944). Esse método se aproxima das condições naturais mais do que os métodos estáticos (Bennett; Judd, 1992). Porém, devido à dificuldade de se obter o exato ponto em que a desorganização sistêmica ocorre, o método criado por Sumner e Doudoroff (1938), utiliza o mesmo *endpoint* do método estático para que seja estabelecido o CTMax. Estas combinações entre o método estático e o método dinâmico foram utilizados por diversos autores como Punzo e Rosen (1984), Whitfield e Livezey (1973) e Bennett e Judd (1992).

Os peixes são um excelente modelo para estudar os efeitos celulares da temperatura, pois eles são pecilotérmicos e respondem mais prontamente a variações de temperatura, além de ativarem os mesmos caminhos de regulação térmica que os vertebrados superiores (Seebacher, 2009). Os peixes euritérmicos fornecem uma base firme para previsões sobre a sensibilidade das espécies às mudanças ambientais (Somero, 2012). Por eles suportarem uma variação maior de temperatura, pode-se observar mais detalhadamente como ocorre as respostas fisiológicas a temperatura.

Quando os organismos são expostos a temperaturas elevadas e subletais, a síntese de um conjunto de proteínas específicas é induzida. Estas proteínas de choque térmico (*Heat shock protein*, Hsp) ocorrem desde as arqueobactérias até mamíferos. Estas fazem parte de mecanismos de proteção das proteínas celulares durante o estresse térmico, e também ajudam na recuperação celular após o estresse (Craig, 1985).

Muitas famílias de Hsp foram identificadas e suas nomenclaturas estão relacionadas aos seus pesos moleculares em kilodaltons (kDa). A mais estudada destas famílias é a que possui o peso molecular de 70 kDa, a Hsp70, cuja função bem característica é a de chaperona celular (Clark; Peck, 2009). As chaperonas foram primeiramente identificadas em bactérias, quando mutantes de *E. coli* produzidas com versões alteradas de duas delas, Hsp70 e Hsp60, falharam em permitir a replicação do bacteriófago lambda (Alberts et al., 2008). Como elas agem assessorando outras proteínas a atingirem a sua forma quaternária (dobramento proteico), qualquer problema que acarrete na disfunção destas chaperonas resulta em má formação proteica (Kapinga; Craig, 2010). É necessário destacar que nem todas Hsp agem como chaperonas e nem todas as chaperonas são Hsp (Ellis; Hartl, 1999).

Em eucariotos, a família da Hsp70 é a mais abundante do grupo das Hsp, incluindo ambas as formas constitutivas (Hsp73) e induzidas (Hsp72). As formas

constitutivas são aquelas que estão presentes em quantidades basais e exercem a sua função de chaperona na formação das proteínas, ao passo que a forma induzida, como o próprio nome diz, tem sua expressão aumentada por causa de algum estresse (Quenneville et al., 2002). No entanto, nem todos os autores fazem esta separação entre a constitutiva e a induzida. Neste trabalho, a denominação de Hsp70 se refere a ambas.

Apesar da Hsp70 ocorrer em resposta a diversos estresses ambientais (exposição a metais pesados, etanóis, radiação, etc.) e patológicos (infecções virais, bacterianas e fúngicas, inflamações, etc.), ela tem sido intensivamente usada nos modelos de estresse térmico (Kiang; Tsokos, 1998). Em condições fisiológicas, a Hsp70 evita a formação de agregações proteicas por meio de sua ligação nas áreas hidrofóbicas das proteínas nascentes. Estas agregações impossibilitam o funcionamento normal das células e podem ser citotóxicas. Além disso, a Hsp70 também se liga a proteína nascente para auxiliá-las no transporte através das membranas para os compartimentos celulares ou na transferência para o sistema proteolítico, que degrada proteínas mal formadas. (Feder; Hofmann, 1999; Hartl; Hayer-Hartl, 2002; Kampinga ;Craig, 2010). Sob condições de estresse, há um aumento significativo dos problemas de conformação das proteínas e são as Hsp70 que ajudam as proteínas deformadas a atingir ou recuperar os seus estados nativos (Parsell; Lindquist, 1993; Fink, 1999).

No entanto, a Hsp70 não atua sozinha, por isso também é conhecida como maquinaria Hsp70, pois ela conta com a ajuda de outras famílias de Hsp, como a co-chaperona Hsp40 (também conhecida como proteína J) e a Hsp90, que pode interagir com Hsp70 na maturação de certos tipos de proteínas mais complexas (Kampinga; Craig, 2010).

A regulação da Hsp ocorre em níveis transcricionais. Em condições normais, a Hsp70 está associada a um fator de transcrição chamado HSF (*Heat shock factor*) que

está inativo. À medida que aparecem proteínas nascentes, as Hsp70 liberam os HSF e se ligam às proteínas nascentes. Em situações de estresse, há maiores quantidades de proteínas desnaturadas que se ligam às Hsp70, liberando os HSF. Eles se acumulam no núcleo e são fosforilados, tornando-se ativos. Ativados, eles se ligam ao DNA em uma região específica que reconhece o fator de transcrição HSE (*Heat shock element*) e que induz a produção de Hsp70. No entanto, quanto maior a quantidade de Hsp70, maior a interação com os HSF livres, o que regula negativamente a expressão de Hsp70 (Abravaya et al., 1991).

Em peixes, a indução de Hsp tem sido reportada em culturas primárias de células, bem como em vários tecidos (Iwama et al., 1998) como cérebro, coração, brânquias. (Dubeau et al., 1998) células sanguíneas, musculares (Rome, 1990; Wakeling et al., 2000) e hepatócitos (Braunbeck et al., 1987; Hazel et al., 1998). Muitos destes estudos demonstram que há correlação entre o aumento de Hsp e a exposição a estressores ambientais. Estas observações sugerem que as respostas parecem ter um papel importante nas taxas de sobrevivência e na manutenção da saúde de peixes sob estresse (Basu et al., 2002). Outros estudos demonstram que a inibição da expressão de Hsp70 diminui a sobrevivência celular em geral (Riabowol et al., 1988). O estudo desta proteína é importante porque faz parte dos principais mecanismos que permitem com que os organismos euritérmicos sobrevivam a uma faixa mais ampla de temperatura, aumentando a capacidade de preservar ou restaurar a integridade das proteínas que se desnaturam quando ocorre a perturbação térmica (Hofmann; Todgham, 2010)

Os efeitos da temperatura na célula também podem causar danos ao DNA, resultar alterações na integridade dos nucléolos e afetar a estrutura e a função dos centríolos (BROWN et al., 1996). Uma proteína muito estudada por ativar as rotas de reparo celular é a p53. Ela é conhecida por ser supressora de tumores e por desempenhar

um papel importante nas respostas celulares a uma variedade de estressores ambientais e intracelulares que causam a quebra das fitas de DNA (radiação ultravioleta, mutações, hipóxia, estresse térmico, etc.). A indução da p53 impõe mudanças drásticas ao destino celular, variando desde uma parada no ciclo celular até sua saída permanente do ciclo, senescência replicativa e apoptose (Huang et al., 1996; Wahl; Carr, 2001; Oren et al., 2002). A p53, em células normais, encontra-se em estado essencialmente latente, não interferindo no destino celular. Contudo, quando as células são expostas a vários tipos de estressores, a p53 é ativada rapidamente (Oren et al., 2002). A p53 induz a paralisação do ciclo celular na fase G1, o que permite o reparo do DNA antes que a célula entre na fase S da replicação (Huang et al., 1996). Se o dano ao DNA for muito severo e não puder ser reparado, os mecanismos de apoptose são ativados para eliminar a célula. A p53, desta forma, pode induzir a apoptose aumentando a expressão de genes promotores ou diminuindo a expressão de genes supressores de apoptose. Ambos os mecanismos previnem a transmissão de mutações para as células filhas e, conseqüentemente, a progressão em carcinogênese (Matsumura; Ananthaswamy, 2004). Alguns pesquisadores demonstraram que peixes-zebra que sofreram manipulação genética e deleção parcial do gene p53 apresentaram apoptose diminuída (Zhao et al., 2010)

Enquanto a Hsp70 reestabiliza as proteínas que foram degradadas durante o aquecimento, a p53 avalia a integridade do DNA.

Para que a expressão de ambas as proteínas fossem observadas, utilizou-se a técnica de imuno-histoquímica, uma metodologia consistente e confiável, amplamente utilizada nas pesquisas sobre expressões proteicas. A base teórica da imuno-histoquímica é muito simples e engloba conceitos de três temas: imunologia, histologia e química. De maneira simplificada, a detecção da proteína de interesse (antígeno) ocorre pela ligação de um anticorpo específico (anticorpo primário). Em seguida, outro anticorpo (anticorpo

secundário) é adicionado ao complexo, que é específico ao anticorpo primário e carrega um marcador cromógeno fluorescente ou uma enzima ativadora do marcador cromógeno não fluorescente. Quando esta última ligação ocorre, uma reação química faz com que os antígenos de estudo se tornem visíveis e possam ser analisados ou por microscópio de luz ou por fluorescente, dependendo do tipo de marcador (Ramos-Vara, 2005).

No presente estudo, optou-se por utilizar, como material de estudo, juvenis de peixes da espécie *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae), conhecido popularmente por pampo.

T. carolinus é um peixe marinho utilizado para a aquicultura nos Estados Unidos e possui alto valor comercial nesta região, por isso, a maior parte dos dados provém principalmente de populações de águas costeiras do sudeste dos Estados Unidos (Sanches et al., 2007). É uma espécie que possui ampla distribuição no Oceano Atlântico, encontrado desde Massachusetts até o Brasil (Hoese; Moore, 1977). No Brasil, possui relativa importância comercial e tem sido recentemente utilizado em sistemas de cultivos (Sanches et al., 2007), principalmente pela sua adaptabilidade (Lazo et al., 1998). No Estado de São Paulo são frequentemente encontrados na região entre Ilha Bela, Bertioga e Ubatuba (Sanches et al., 2007).

O pampo possui o corpo prateado com o dorso cinza azulado, algumas vezes apresentando coloração amarela na parte ventral (Bellinger; Avaut, 1971). A biologia e ecologia do pampo não são completamente compreendidas. Os indivíduos jovens costumam formar cardumes, enquanto que os adultos são solitários. Habitam praias arenosas, baías e estuários, vivendo quando jovens na zona de arrebentação. Adultos podem ser encontrados em águas rasas, igualmente em zona de arrebentação, mas quando as gônadas amadurecem, podem ser capturados em águas oceânicas a médias profundidades (Shipp; Hopkins, 1978). É uma espécie pelágica que pode atingir 60 - 70

cm de comprimento total e até 3 - 4 kg de massa corpórea. Alimentam-se de moluscos, crustáceos, outros invertebrados e pequenos peixes. Desde a idade jovem toleram ampla gama de condições ambientais, incluindo os baixos níveis de oxigênio dissolvido (≥ 4 mg / L) e salinidades variadas. A temperatura ideal de crescimento juvenil é de 25 °C a 30 °C, embora os juvenis possam prosperar em temperaturas tão elevadas como 34 °C. A mortalidade pode ocorrer quando há mudanças extremas de temperatura durante um curto período de tempo (Main et al., 2007). Pouco se conhece sobre a reprodução do pampo. Acredita-se que as larvas permaneçam em mar aberto durante o primeiro mês de vida, quando então migram para áreas costeiras e instalam-se em zonas de arrebentação de praias rasas. A temperatura tem um papel importante nesta migração (Fields, 1962).

Nesse contexto, a temperatura é importante para a sobrevivência e para a ecologia dos pampas. Estudar como este fator afeta o comportamento e a fisiologia desta espécie pode servir de informação sobre sua susceptibilidade a possíveis perturbações climáticas. Adicionalmente, as análises moleculares podem fornecer dados importantes sobre o reparo e a plasticidade celular relacionada à temperatura.

II. HIPÓTESE

Tanto a Hsp70 quanto a p53 aumentam de acordo com a temperatura até que sua expressão se estabilize. Como o comportamento está associado às mudanças fisiológicas, espera-se que as alterações comportamentais dos peixes sejam perceptíveis e relacionadas ao aquecimento até sua morte (Figura 1).

Figura 1. Esquema representando o modelo hipotético do estudo, separado em duas vertentes: respostas fisiológicas por meio da expressão de proteínas Hsp70 e p53 e alterações comportamentais por meio das análises das atividades dos peixes submetidos ao aquecimento.

III. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo compreender como a temperatura afeta o organismo de juvenis de *Trachinotus carolinus* em três diferentes níveis biológicos: a) comportamental, pela observação da resposta a temperatura; b) fisiológico, visando verificar a tolerância térmica e c) molecular, por meio do estudo de duas proteínas importantes para o reparo celular. Para atender ao objetivo geral foram considerados os seguintes objetivos específicos:

- a) Avaliar as alterações comportamentais dos peixes em relação à elevação da temperatura e relacionar com possíveis efeitos ecológicos.
- b) Verificar a tolerância térmica de juvenis de pampas por meio do aumento constante de temperatura.
- c) Avaliar qualitativa e quantitativamente as expressões das proteínas Hsp70 e p53 por imunolocalização e relacionar às suas possíveis funções durante o aquecimento ambiental.
- d) Comparar os efeitos do cativeiro na expressão das proteínas Hsp70 e p53 com a de organismos recém-coletados da natureza.

IV. ÁREA DE ESTUDO

Os peixes foram capturados na região costeira de Ubatuba, litoral norte de São Paulo, nas praias do Lázaro e Domingas Dias. Estas praias estão localizadas nas proximidades da Base de Pesquisa do Instituto Oceanográfico “Clarimundo de Jesus” (Figura 2 mkn,k).

Figura 2. Foto de satélite das regiões de coleta. A Base de Pesquisa “Clarimundo de Jesus” está representada pelo pentágono. As áreas de coleta dos peixes são as Praias do Lázaro (A) e Domingas Dias (B). Foto: Google Earth.

As praias do Lázaro ($23^{\circ}31'S$ - $45^{\circ}08'W$) e a praia Domingas Dias ($23^{\circ}30'S$ - $45^{\circ}09'W$) são praias adjacentes e estão localizadas na Enseada da Fortaleza. O Lázaro possui moderada exposição às ondas (Tanaka, 2000; Jacobucci; Leite, 2002) e condições muito similares são observada na praia Domingas Dias (Guth, 2004).

A Praia do Lázaro é composta, em sua maioria, por sedimentos de textura fina e possuem maior depósito de conteúdo orgânico do que em granulações mais (Burone et al. 2003). De acordo com Negreiros-Fransozo et al., (1991), o alto teor de matéria orgânica encontrado nesta região ocorre principalmente devido à concentração de

dejetos oriundos do grande número de habitações na praia do Lázaro e, como as águas no local tem baixo hidrodinamismo, o material tende a depositar-se no fundo. Essa matéria orgânica pode explicar a alta incidência de pampos nesta região pois eles se alimentam principalmente de moluscos e de crustáceos.

V. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi dividido em três partes: a) análises comportamentais, nas quais foram utilizados 42 peixes pampo da espécie *Trachinotus carolinus* e b) análises fisiológicas na qual foram obtidos dados sobre a temperatura letal de 27 indivíduos e c) análises-histológicas e imuno-histoquímicas, para a qual foram coletados tecidos de outros 129 indivíduos.

A) Captura e manutenção dos peixes

Os arrastos foram realizados na zona de arrebentação com uma rede do tipo picaré, com malhagem de 10 mm, medindo 3 m X 1,5 m (largura X altura) e efetuados paralelos à linha da costa, numa profundidade inferior a 1,5 m, em áreas escolhidas ao acaso (Autorização ICMBio/SISBIO Número: 26291-1). Esta rede, de utilização manual, foi desenvolvida no próprio Laboratório de Ecofisiologia de Organismos Marinhos do IOUSP (Figura 3A-C). Os peixes foram selecionados por tamanho (50 mm a 100 mm) no momento da captura (Figura 4).

Dentre peixes coletados, doze foram eutanasiados e seus tecidos, coração e brânquia, foram fixados no momento da coleta na praia para serem utilizados como controle ambiental (CA) dos experimentos descritos a seguir. Os dados desse grupo foram comparados ao dos grupos controle experimental para averiguar, a nível molecular, os possíveis efeitos do período de cativeiro. A temperatura da água no momento em que eles foram coletados era de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os demais peixes coletados foram transportados em pequenos tanques com água do mar recolhida no local e aerada com aeradores portáteis (Figura 3D-F). Os outros

organismos capturados juntamente com os pampos foram devolvidos vivos ao mar, durante a triagem.

Para minimizar o estresse da captura e do transporte, os peixes permaneceram em repouso por 3 a 5 dias em tanques de 500 litros, na proporção de 1 peixe para cada 5 litros de água do mar. Este período de cativeiro visou minimizar o estresse decorrente da captura. A água dos tanques foi permanentemente aerada e mantida os valores de salinidade de $35 \pm 0,5$ e temperatura de $22 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figura 3G). A temperatura foi mantida semelhante à da região da coleta durante os dias de repouso para que as variações de temperatura ambiental que os organismos lidaram ao longo da vida (história térmica) não fosse alterada devido a aclimação.

Figura 3. Sequência de eventos dos experimentos. A-C) Coleta de peixes com rede Picaré. D-E) Transporte por meio do veículo disponibilizado pela Base de Pesquisa do IOUSP “Clarimundo de Jesus”. F) Aquário para o transporte acondicionado em um tanque de 250 litros utilizado para conter a água e atenuar o distúrbio visual dos peixes. G) Tanques de 500 litros cobertos com lona azul para o período de repouso e um tanque para troca de água. H) Aquário onde os peixes permaneceram 24 horas e durante todo o período do experimento envolto por uma proteção azul. I) Coleta dos peixes após o experimento com rede tipo puçá. J) Processamento dos tecidos e coletas de amostras. Fotos: Caroline Margonato Cardoso e Priscila Verónica Sartorio.

Os peixes foram alimentados com ração comercial, fornecida *ad libitum*, durante todo o período de repouso. A higienização e renovação da água foram diárias. A água do mar utilizada nos experimentos e nos tanques foi filtrada por 3 filtros, sendo o primeiro de 20 μm , o segundo de 5 μm e o último de 1 μm .

No final do período de repouso, os peixes foram separados em 10 grupos de 6 indivíduos e distribuídos em 10 aquários de 40 litros, onde permaneceram por 24 horas para minimizar o estresse decorrente da manipulação e troca de ambiente (Figura 3H-I). Durante o período de repouso, a temperatura da água de todos os aquários foi mantida a $22^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ temperatura ambiental na qual os peixes se encontravam até serem capturados. A alimentação foi suspensa a partir da transferência para os aquários.

Os peixes ficaram em ciclos de 24 horas de luz, devido ao fato de que muitos experimentos começavam no período da madrugada.

Figura 4. Exemplar juvenil de *Trachinotus carolinus*. No momento da captura os peixes foram selecionados por tamanho, entre 50 mm a 100 mm. Escala: 5 mm. Fotos: Alex Sander Dias Machado.

B) Procedimentos experimentais

Decorrido o período de 24 horas no aquário, 5 grupos (I - V) foram submetidos ao aumento gradual de temperatura da água a uma taxa de $2^{\circ}\text{C}/\text{h}$ (Pörtner, 2000) e 5 grupos (VI - X) permaneceram à temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, para servirem,

respectivamente, como controles dos grupos I ao V. Este último foi denominado controle 22 °C. As temperaturas experimentais finais estabelecidas para cada um dos grupos I ao V estão descritas na Tabela 1. O grupo I atingiu a temperatura máxima de 26 °C; o grupo II atingiu a temperatura máxima de 30 °C; o grupo III de 32 °C; o grupo IV de 34 °C e o grupo V de 36 °C. Após atingir a temperatura desejada, todos os grupos experimentais permaneceram nesta temperatura por 120 minutos (Tab.1).

Tabela 1. Esquema de elevação de temperatura ambiental de 2°C/h com indicação dos momentos de coleta de cada grupo experimental. A coleta era efetuada ao término dos 120 minutos de permanência dos peixes à temperatura estipulada. n=90.

Duração do experimento	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	Coleta	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	---	Coleta	32°C	32 a 34°C	32 a 34°C
7ª hora	---	---	Coleta	34 °C	34 a 36 °C
8ª hora	---	---	---	Coleta	36 °C
9ª hora	---	---	---	---	Coleta

Após o término de cada experimento, três dos seis animais de cada aquário foram selecionados para as amostragens de tecidos. Os peixes foram sacrificados com secção cortical, de acordo com as normas legais de eutanásia animal (Resolução nº 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária).

Cada condição experimental foi reproduzida em 3 réplicas, resultando em 3 grupos amostrais para cada uma das temperaturas finais estipuladas. Os tecidos coletados foram fixados de acordo com a necessidade de cada uma das técnicas a que foram submetidos (Figura 3J).

i) Grupos Controle

Os animais dos grupos controle 22 °C eram coletados simultaneamente ao grupo experimental correspondente, padronizando assim o tempo em que todos os peixes permaneceram no aquário. Os demais peixes que não foram eutanasiados foram devolvidos em boas condições ao ambiente, no mesmo local em que foram coletados.

C) Temperatura crítica de sobrevivência (TCS)

Foram realizados experimentos complementares para determinar a tolerância térmica dos peixes. As etapas iniciais foram semelhantes às descritas acima: os peixes permaneceram de 3 a 5 dias em tanques, sendo posteriormente distribuídos em 6 grupos de 6 peixes e transferidos para os aquários de vidro por 24 horas. Em seguida, a temperatura da água dos aquários de 3 grupos foi elevada 2 °C/h, por tempo indeterminado. Os outros 3 grupos foram mantidos como grupos controle, permanecendo na temperatura de 22 °C $\pm$ 0,5 °C (controle 22 °C). Quando o peixe apresentou parada do movimento opercular (Sumner; Doudoroff 1938), a temperatura foi anotada e o peixe coletado. A temperatura na qual os peixes apresentaram parada de movimento opercular foi denominada de temperatura crítica de sobrevivência (TCS). Tecidos brânquias e cardíacos de 3 indivíduos de cada grupo controle 22 °C foram coletados, seguindo-se a amostragem dos aquários experimentais. Nos grupos experimentais, todos os 6 peixes de cada aquário foram coletados.

As expressões de Hsp70 e p53 dos peixes submetidos a este experimento apenas foram comparadas com o experimento de maior temperatura estudada (36 °C).

D) Sistema de controle da temperatura dos experimentos

O aumento gradual de temperatura foi efetuado utilizando-se um controlador de temperatura (CDP – 48U12, Asla Ltda) configurado na função liga-desliga (*on-off*), acoplado a um termômetro e a um aquecedor de 300 W, a 40% de sua potência. O aparelho foi programado para controlar um aumento de temperatura de 0,1 °C /min, ou seja, 2 °C/h. Dessa forma, o aquecedor do sistema era ligado e desligado de acordo com os critérios impostos pela calibração. O controlador permite também manter a temperatura estável durante um período pré-estabelecido, chamado de patamar, que foi de 120 minutos (Tabela 1). Testes preliminares foram realizados para: 1- confirmar a precisão do aparelho; 2- para definir a potência do aquecedor que melhor satisfizesse as necessidades de precisão de 0,1 °C, e 3- estabelecer um sistema de circulação de água para homogeneizar a temperatura em todo o aquário.

Duas bombas submersas foram instaladas no fundo do aquário para melhor homogeneização da temperatura da água, sendo que uma direcionava a água no sentido horizontal e a outra no sentido vertical. A elas foram acoplados extensores de fluxo feitos com canos de PVC repletos de pequenos orifícios para melhor distribuição da água e para diminuir os efeitos de turbilhonamento provocado pelas bombas (Figura 6). Para o fornecimento de oxigênio, cada aquário recebeu um aerador (Figura 5).

Figura 5. Esquema do sistema controlador de temperatura de cada um dos aquários experimentais de 40 litros. O aquecedor de 300 W era posicionado no fundo do aquário. Duas bombas submersas adaptadas foram utilizadas para homogeneização da água. Em cada aquário foram colocados 6 peixes. A temperatura era verificada por um termômetro acoplado ao controlador de temperatura, em sistema *on-off*.

Figura 6. Visão do interior de um aquário experimental com: um aquecedor (1), duas bombas submersas acopladas a canos de PVC repletos de orifícios para homogeneização da água (2 e 3), um aerador (4) e o termômetro (5).

Os aquários dos grupos controle 22 °C continham os mesmos itens mencionados acima, com exceção do controlador de temperatura CDP – 48U12 (Asla Ltda). Em

substituição, utilizaram-se termostatos (N321 – NTC) para manter constante a temperatura da água a 22 °C, com precisão de 0,1 °C.

E) Fatores químicos e físicos da água

O oxigênio dissolvido na água e salinidade foram quantificadas, antes e depois da cada experimento, por um aparelho eletrônico. O pH da água também foi monitorado durante todo o período de cativeiro por meio de tiras indicadoras

F) Análises comportamentais

Para as análises comportamentais foram adotados procedimentos experimentais similares aos já descritos, mudando-se apenas a quantidade de controles 22 °C. Sete aquários com seis peixes em cada (n=42) foram utilizados, sendo um controle 22 °C e seis aquários experimentais, com patamares nas temperaturas de 26 °C, 30 °C, 32 °C, 34 °C e 36 °C (Tabela 1). O comportamento foi observado ao longo de todo o experimento e os animais foram filmados a partir da segunda hora de estabilização da temperatura, ou seja, a duração de cada filmagem era de 60 minutos.

O sétimo aquário foi destinado a TCS e a filmagem foi feita a partir de 36 °C e seguiu até o cessamento do batimento opercular (morte) do último peixe.

Foram utilizados 3 critérios para a classificação das alterações comportamentais: Equilíbrio, Natação e Batimento Opercular. A escala utilizada foi de 5 a 0, onde 5 caracterizava o comportamento normal e 0 indicava o óbito (Tab.2). As notas foram atribuídas a cada 5 minutos e por 3 observadores diferentes. A partir destes valores foi calculada uma média para cada temperatura estudada.

Tabela 2. Critérios de classificação comportamental utilizando a pontuação entre 5 e 0 de acordo com os comportamento observado nos peixes que foram 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	Natação rara com espasmos	Lenta
0	Morte	Morte	Morte

Adicionalmente, quando os peixes atingiam a temperatura subletal no experimento de TCS e começavam a apresentar comportamentos relacionados a colapsos fisiológicos, as médias das pontuações foram também separadas em fases de acordo com os estudos de Cocking (1959). Cada fase refere-se a algumas características comportamentais, como descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Tabela adaptada de estudos comportamentais de Cocking (1959), nos quais as alterações de comportamento em temperaturas subletais são classificadas em fases.

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

G) Análises histológicas

i) Coleta e fixação dos tecidos

Imediatamente após o término de cada experimento, fragmentos de tecidos de 0,5 cm x 0,5 cm foram coletados das brânquias e do coração de 3 peixes de cada grupo, aleatoriamente. Os tecidos foram fixados em Paraformaldeído 4 % por 24 horas, transferidos para solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e permaneceram na geladeira até o processamento. A solução tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 era renovada a cada 7 dias.

ii) Preparação de blocos para a microscopia

Cada fragmento de coração e brânquia passou pelo processo de desidratação em banhos de soluções crescentes de etanol em água (70 % a 100 % de etanol). Posteriormente, os fragmentos receberam dois banhos de xilol, um solvente orgânico miscível tanto em etanol quanto em parafina e que deixa o tecido translúcido (diafanização). Os fragmentos, então, foram incluídos em Ery-Plast® (EasyPath/Eryegas) e blocos retangulares com base de 3 cm x 4 cm foram feitos com o mesmo material.

iii) Microscopia de luz

Foram realizadas colorações histológicas para visualizar as células e os diferentes tecidos que compõem os órgãos estudados. Optou-se por três colorações distintas: a) hematoxilina/eosina, que diferencia o citoplasma do núcleo, fornecendo uma boa visualização dos tipos celulares; b) tricômio Masson, que diferencia fibras musculares

e colágenas, para melhor compreensão da composição dos tecidos e c) picrossirius red, que diferencia as fibras colágenas que compõem os tecidos conjuntivos (Behmer et al., 2003).

Para a confecção das preparações permanentes, os blocos com os tecidos branquiais e cardíacos foram cortados em micrótomo na espessura de 3 μ m e cada lâmina foi montada com 3 cortes. As lâminas com os cortes foram mantidas em estufa a 37 °C por 24 horas na posição horizontal, para secagem, maior aderência do corte à lâmina e desparafinização. O xilol foi utilizado para completar a desparafinização. A reidratação dos tecidos foi realizada em banhos de etanol puro e etanol diluído em água em concentrações decrescentes (de 100 % a 70 % etanol). Posteriormente, foram seguidos os protocolos específicos de coloração

A montagem das lâminas foi realizada com lamínula fixada com meio de montagem. Após secagem por 72 horas, as lâminas foram fotomicrografadas em um microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera digital Olympus DB71, utilizando-se o software DPcontroler para captura das imagens.

iv) Imuno-histoquímica (Hsp70 e p53)

A imuno-histoquímica (IHQ), permite a identificação e a localização de proteínas, tais como as Hsp70 e p53, em células de um tecido por meio de reações com anticorpos específicos. Esta técnica também permite determinar a intensidade das proteínas por métodos quantitativos.

Dos três peixes coletados em cada temperatura, apenas um peixe de cada réplica foi utilizado para se estudar os efeitos de cada temperatura (Figura 7).

Figura 7. Esquema de coleta de material para imuno-histoquímica.

Por ser uma técnica mais longa e agressiva aos tecidos, em comparação com as colorações histológicas, as lâminas foram banhadas em uma solução de 2% de 3-aminopropiltietoxi-silano em acetona por 2 minutos, depois banhadas duas vezes em água destilada e secas em estufa. Esta solução reage com o grupo - OH do vidro, promovendo a ligação do tecido à lâmina por formar uma superfície coloidal.

Foram cortadas secções de 3 μ m com 3 cortes de tecido em cada lâmina. Após a confecção das lâminas, elas foram acondicionadas horizontalmente em estufa a 37 °C por 24 horas. Decorrido esse período, os tecidos foram desparafinizados em xilol absoluto e reidratados em séries com concentrações decrescentes de álcool (100 % a 70 %) em água destilada.

Para a recuperação dos antígenos bloqueados pela fixação dos tecidos com paraformaldeído, as lâminas foram embebidas em tampão citrato pH 6,0 e aquecidas à temperatura de 95 °C por 15 minutos. A seguir, estas foram lavadas, em tampão fosfato salino (PBS) contendo triton X-10, o qual recebe a denominação de tampão imuno-histoquímico (ICC). Todas as lavagens das lâminas com este tampão foram realizadas em cubetas histológicas e repetidas 3 vezes por 5 minutos cada, sob agitação leve. Entre cada lavagem, as lâminas eram secas com o auxílio de uma bomba a vácuo. Para tanto, na mangueira de sucção da bomba foram acopladas ponteiros estéreis de pipetadores que eram utilizadas como ferramentas para a sucção.

As soluções que serão descritas a seguir foram gotejadas sobre cada corte de cada lâmina, individualmente. Para que cada corte recebesse entre 40 μL e 60 μL de solução, os tecidos foram circundados com caneta histológica, que funciona como barreira para que o líquido permanecesse preso sobre o corte. As lâminas permaneceram na posição horizontal e em ambiente úmido para que as soluções não escorressem e não evaporassem. Para isso, utilizou-se uma câmara úmida, constituída por um recipiente com tampa em cujo fundo foi colocado um filme de água e com um suporte para que as lâminas permanecessem na posição horizontal.

A primeira solução utilizada foi a solução bloqueadora de peroxidases endógenas. Esse procedimento é necessário, pois a peroxidase é empregada na IHQ para a reação entre o anticorpo secundário e o cromógeno. Como essas enzimas são encontradas em muitos tecidos é necessário inativar todas as peroxidases presentes antes de se iniciar o processo. Novamente as lâminas foram lavadas com ICC, e a solução bloqueadora de proteínas composta por caseína (Protein Block DAKO X0909 - Dako North America, Inc., 6392 Via Real, Carpinteria, CA) foi aplicada aos cortes. A caseína é uma proteína hidrofóbica que diminui as ligações não específicas dos anticorpos com proteínas dos tecidos.

Posteriormente, a solução bloqueadora de proteínas foi removida da superfície dos cortes, com o auxílio da ponteira estéril acoplada à bomba a vácuo. Os tecidos foram cobertos com anticorpo primário diluído em solução citrato e incubados por um período de 20 horas (Tabela 4).

O primeiro corte de tecido de cada lâmina foi utilizado como controle negativo. Este não recebia o anticorpo primário, apenas o tampão citrato que era utilizado como diluente dos anticorpos. Desta forma, por não receber o anticorpo primário, o corte não deveria expressar marcação das proteínas.

No segundo dia, o anticorpo primário foi retirado dos cortes com a ajuda de uma ponteira estéril acoplada à bomba a vácuo. Após lavagem das lâminas com tampão ICC, o anticorpo secundário conjugado à biotina foi colocado em todos os cortes. Depois, os cortes receberam a solução de estreptavidina conjugada com a peroxidase. A estreptavidina tem alta afinidade com a biotina e, por possuir quatro sítios que são conjugados com as peroxidases, aumenta a sensibilidade do cromógeno, funcionando como uma solução amplificadora. Finalmente, as lâminas receberam o cromógeno DAB (tetra-hidrocloreto de 3,5-diamino-benzidina). O cromógeno, ao reagir com a peroxidase conjugada à estreptavidina, produz uma coloração marrom.

Figura 8. Representação da ligação entre um antígeno e o anticorpo primário. O anticorpo secundário se liga especificamente ao anticorpo primário e carrega consigo uma molécula de biotina. A biotina tem alta afinidade com a estreptavidina, que por sua vez, está conjugada com peroxidase. A peroxidase reage com o cromógeno DAB produzindo a coloração marrom nas proteínas marcadas. Foto adaptada de Ramos- Vara (2005).

Para o emprego deste método, denominado de peroxidase indireta, foi utilizado um kit comercial (DAKO K0679), que contém o bloqueador de peroxidase endógena, o anticorpo secundário, a solução amplificadora (estreptavidina horseradish peroxidase-HRP) e o cromógeno DAB (Figura 8).

Para a coloração do tecido de fundo (contracoloração), utilizou-se hematoxilina. As lâminas então foram desidratadas em banhos de soluções de concentrações crescentes de etanol em água (70% a 100% de etanol). Após a desidratação, as lâminas foram banhadas duas vezes em xilol e montadas com lamínula fixada com resina Permount® (Fisher Scientific/USA).

Após a secagem por 72 horas, as lâminas foram fotomicrografadas em um microscópio Olympus BX 60 acoplado a câmera digital Olympus DB71, utilizando-se o software DPcontroler para captura das imagens.

v) Anticorpo primário

Devido à dificuldade em se obter anticorpos específicos para *T. carolinus* contra as proteínas estudadas, e devido a estas proteínas serem conservadas na escala filogenética, empregaram-se anticorpos contra as Hsp70 e p53 de mamíferos. No caso do anticorpo anti-p53, a proteína que serviu de antígeno foi extraída de células humanas. O anticorpo utilizado reconhece o epítipo da proteína p53 e não reage com outras proteínas celulares. O anticorpo anti-Hsp70 localiza tanto as proteínas Hsp constitutivas (Hsp73) e as induzidas por stress (Hsp72), ambas da família Hsp70. A proteína utilizada como antígeno foi extraída do tecido cerebral de bovinos. Ambos os anticorpos são da marca Sigma® e foram extraídos de camundongos (Tabela 4).

Tabela 4. Relação dos anticorpos utilizados.

Anticorpo	Clone (Isotipo)	Hospedeiro	Diluição	Fornecedor(Cat.)
p53	Monoclonal [BP53-12]	Camundongo	1:3500	Sigma® (P5813)
Hsp70	Monoclonal [BRM-22]	Camundongo	1:9000	Sigma® (H5147)

A fim de verificar o caráter de especificidade destes anticorpos, foram realizados ensaios complementares de imuno-histoquímica em tecidos de coração de ratos, *Rattus norvegicus*. Para isso, utilizou-se a mesma metodologia empregada para os tecidos de peixes submetidos a imuno-histoquímica.

vi) Contagem das células positivas

A quantificação das células positivas para as proteínas Hsp70 e p53 por imuno-histoquímica foi determinada utilizando-se o método Hscore modificado (Kraus et al., 2012; Flanagan et al., 2008; McCarty Jr. et al., 1986). A pontuação consiste na soma das porcentagens de células coradas, entre 0 e 100%, multiplicadas por um valor ordinal correspondente à intensidade de coloração, sendo 0= nenhuma, 1= fraca, 2= moderada e 3= forte (Figura 9).

Figura 9. Padrões para a identificação das intensidades de expressão das proteínas analisadas pela marcação imuno-histoquímica. Códigos: 0 - nenhuma marcação; 1 – marcação fraca; 2 – marcação moderada e 3 – marcação forte. A primeira linha refere-se às células da brânquia e a segunda refere-se às do coração. Fotomicrografias tiradas em aumento de 1000 vezes.

Com estes quatro níveis de intensidade, os resultados variam de 0, correspondente a nenhuma marcação a 300, que indica intensa marcação.

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

i = intensidade de 0,1,2 ou 3

e P_i varia de 0 a 100%

Em cada corte do tecido analisado eram selecionados, ao acaso, três campos de tecidos branquiais e seis campos de músculo cardíaco, ambos em aumento de 1000 vezes. Cada campo foi fotomicrografado com câmera digital Olympus DB71, utilizando-se o software DPcontroler. As células foram contadas com auxílio do programa Adobe Photoshop CS6, que possui uma ferramenta de contagem. Neste programa, fica registrado o número de cada célula contada, evitando-se a recontagem. Esta ferramenta também pode separar as células contadas em grupo, sendo uma ferramenta muito útil para este tipo de estudo. As médias do Hscore foram feitas por temperatura para posteriormente receberem os tratamentos estatísticos.

H) Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os dados quantitativos do Hscore. Foi empregado o teste ANOVA não paramétrico Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferenças entre os grupos, complementado com o pós-teste Newman-Keuls, apropriado para pequenas amostras. As análises foram feitas com o programa BioStat 5.0, e o valor de significância adotado foi de $p < 0,05$.

VI. RESULTADOS

A) Eficiência do sistema de controle da temperatura

A Figura 10 apresenta a diferença entre a taxa de aquecimento da água em relação à programada pelo aparelho CDP – 48U12. A temperatura da água deveria aquecer 2 °C/h, de acordo com a programação do aparelho. Porém, com apenas uma bomba submersa, devido à falta de homogeneização, a taxa de aquecimento na água não acompanhava precisamente a taxa programada, sendo que o aquecimento registrado foi de 1,8 °C ou 2,2 °C em uma hora (Figura 10A). No entanto, com a utilização de duas bombas submersas, a água aqueceu 1,9 °C a 2 °C por hora, uma taxa de aquecimento precisa, em concordância com o programa. (Figura 10B).

Figura 10. Taxa de aumento da temperatura da água em dois sistemas distintos: A) Em aquário com apenas uma bomba submersa para a homogeneização da água. B) Em aquário com duas bombas submersas acopladas a um cano perfurado para melhor homogeneização da água.

A partir destes resultados, optou-se por utilizar duas bombas submersas em cada aquário para melhor homogeneização da temperatura da água.

B) Parâmetros físico-químicos das condições da água dos aquários experimentais e controles

Os valores de oxigênio dissolvido indicam que a água do mar dos aquários estava sempre saturada (Tabela 5). Todos os grupos (experimentais e os controles) tiveram a concentração de oxigênio dissolvido medido no início (inicial) e no final dos experimentos (final). Em todos os grupos, a temperatura inicial da água era de 22 °C ($\pm 0,3$ °C). Em todos os grupos experimentais (I - V), o oxigênio dissolvido final foi medido ao término do processo, ou seja, nas temperaturas finais de: grupo I – 26 °C, grupo II – 30 °C, grupo III – 32 °C, grupo IV – 34 °C e grupo V – 36 °C. O oxigênio dissolvido referente ao grupo TCS foi medido quando o último peixe morreu na temperatura de 38,6 °C (Tabela 5).

Tabela 5. Médias das quantidades de oxigênio dissolvido nos grupos experimentais e controle. Cada grupo experimental (I a V) tinha um grupo controle correspondente (VI a X). TCS: temperatura crítica de sobrevivência.

Experimental	Inicial (mg/L)	Final (mg/L)	Controle	Inicial (mg/L)	Final (mg/L)
GI	6.19 $\pm$ 0.61	5.22 $\pm$ 0.04	GVI	5.65 $\pm$ 0.1	5.82 $\pm$ 0.01
GII	5.14 $\pm$ 0.12	4.72 $\pm$ 0.32	GVII	5.69 $\pm$ 0.05	5.90 $\pm$ 0.13
GIII	5.67 $\pm$ 0.07	5.54 $\pm$ 0.19	GVIII	5.60 $\pm$ 0.01	5.53 $\pm$ 0.01
GIV	6.12 $\pm$ 0.36	4.82 $\pm$ 0.12	GIX	6.32 $\pm$ 0.32	5.89 $\pm$ 0.14
GV	6.15 $\pm$ 0.22	5.15 $\pm$ 0.61	GX	5.88 $\pm$ 0.03	5.90 $\pm$ 0.06
TCS	5.77 $\pm$ 0.15	5.42 $\pm$ 0.78	TCS	6.13 $\pm$ 0.18	6.03 $\pm$ 0.04

Tanto a salinidade ($35 \pm 0,5$) quanto o pH (8,0) se mantiveram constantes durante os dias de cativeiro e de experimentação.

C) Organismos estudados

i) Tamanho

Foram utilizados 171 peixes com comprimento total médio de 61,9 mm ($\pm 13,7$ mm). Nenhum animal morreu durante os experimentos de aquecimento, com exceção do experimento para determinar a temperatura crítica de sobrevivência (TCS). A Figura 11 apresenta as médias do comprimento dos peixes de cada grupo submetido ao aquecimento, do controle 22 °C e do controle ambiental (CA).

Figura 11. Comprimento total (média e desvio padrão) dos peixes submetidos às diferentes temperaturas estudadas. CA - controle ambiental; C22 – controle 22°C e TCS - temperatura crítica de sobrevivência.

ii) Análises Comportamentais

Os peixes, no primeiro dia de cativeiro, à temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ procuravam o fundo do tanque nas primeiras horas.

No segundo dia de cativeiro, eles já utilizavam ativamente toda a área do tanque para a natação, normalmente formando grupos e já se aproximavam das pessoas com o intuito de receber alimento.

Quando os peixes foram transferidos para os aquários destinados aos experimentos, eles apresentaram comportamento agitado nas primeiras horas, subindo e descendo na coluna d'água e explorando todo o aquário. Posteriormente, este comportamento cessou.

Os peixes, ao início dos experimentos, apresentavam as cores características, corpo prateado com a parte ventral amarelada.

Na Figura 12 estão representadas as médias das pontuações dos critérios equilíbrio, natação e batimento opercular, utilizadas para avaliar o comportamento dos peixes submetidos às diferentes temperaturas. Esses valores foram calculados a partir das médias da pontuação dada a cada 5 minutos durante os 60 minutos finais dos experimentos.

Figura 12. Médias das pontuações dos critérios de análise de comportamento: Equilíbrio, Natação e Batimento opercular, em que a nota 5 é correspondente ao comportamento normal e 0 corresponde à morte. C22 - controle 22 °C; TCS - temperatura crítica de sobrevivência. n=42

Nos experimentos em que os peixes permaneceram por duas horas a cada temperatura final estipulada (grupos de 26 °C a 36 °C), observou-se que: a) no critério equilíbrio, os peixes apresentaram comportamento aparente normal até a temperatura de 32 °C. Posteriormente, houve alterações leves de equilíbrio até 36 °C; b) no critério natação, as alterações foram observadas já nas temperaturas iniciais. De modo geral, a agitação foi proporcional à temperatura até 36 °C, os peixes percorriam todo o aquário, apresentando uma natação rápida tanto de baixo para cima, quanto de um lado para o outro; c) no critério batimento opercular, observou-se que houve uma aceleração do movimento de forma gradual e proporcional a temperatura de 36 °C (Figura 12).

Nos experimentos controle 22 °C de cada grupo, o comportamento dos peixes foi normal durante todo período de avaliação.

Apesar de haver mudanças esperadas de agitação, a troca gasosa e de equilíbrio de acordo com a elevação da temperatura nos experimentos, não houve comportamentos críticos que indicassem o começo de uma desorganização dos sistemas e dos órgãos dos peixes.

iii) Temperatura crítica de sobrevivência (TCS)

No experimento de TCS, a partir da temperatura de 36 °C, os peixes apresentaram comportamentos que indicam que os sistemas fisiológicos estavam entrando em colapso, ou seja, estas temperaturas podem ser consideradas como subletais aos peixes. As alterações comportamentais evoluíram rapidamente até a morte.

Para separar as fases críticas conforme as sugeridas por Cocking (1959), estas foram relacionadas à soma da pontuação dos 3 critérios utilizados. Assim, entre a temperatura de 36 °C e 37 °C, os peixes nadavam de maneira agitada, colidindo frequentemente com as paredes do aquário e apresentando desequilíbrio lateral e horizontal (Fase I - pontuação total 6). Na temperatura de 37 °C e 38 °C, os peixes reduziram a atividade natatória, boiando lateralmente, com ritmo respiratório ainda acelerado (Fase II - pontuação total 4,5). Este quadro foi evoluindo até a perda de atividade natatória, decúbito lateral, espasmos, diminuição de movimentos operculares (Fase III - pontuação total 3) e morte. Alguns peixes apresentaram esses comportamentos de maneira mais rápida do que outros, alguns na temperatura aproximada de 37 °C, enquanto outros morreram em temperaturas superiores a 38 °C. Estas fases foram observadas apenas no experimento de temperatura crítica máxima (Figura 13).

Figura 13. Soma das pontuações dos critérios de análise de comportamento: Equilíbrio, Natação e Batimento opercular para avaliar o estado geral do peixe. A pontuação foi relacionada às fases críticas que englobam as temperaturas subletais e a letal.

Os peixes submetidos à TCS apresentavam coloração mais escura do que os peixes controle 22 °C.

A Figura 14 mostra a temperatura na qual ocorreu o óbito dos 18 animais experimentados. O primeiro animal morreu à temperatura de 37,1 °C e o último à temperatura de 38,6 °C (média=38 ± 0,48 °C).

Figura 14. Taxa de mortalidade dos peixes dos grupos TCS em relação à temperatura. Linha de tendência com intersecção na média de temperatura de morte.

A Figura 15 mostra a relação entre o comprimento dos indivíduos de *T. carolinus* das três réplicas e a temperatura de morte. O maior peixe morreu à temperatura de 37.1 °C e o menor peixe morreu a temperatura de 38.5 °C.

Os resultados referentes ao valor de r^2 (0,4917) indicam que não houve relação entre a temperatura de morte e o comprimento dos peixes.

Figura 15. Relação entre temperatura crítica de sobrevivência e o tamanho de *Trachinotus carolinus*.

D) Macroscopia e Microscopia de luz

i) Brânquias

As brânquias de *T. carolinus* encontram-se no interior da cavidade branquial e são cobertas pelo opérculo (Figura 16A). Os arcos branquiais se estendem da base até a parte superior da cavidade bucal (Figura 16B) e cada cavidade branquial possui quatro arcos branquiais, totalizando quatro pares de arcos branquiais (Figura 16C).

Figura 16. A) *Trachinotus carolinus* com o opérculo identificado (op). B) Após a remoção do opérculo, os arcos branquiais (ab) ficam expostos. C) Os quatro arcos branquiais (ab) se inserem na cavidade branquial (cb). Estas estruturas se repetem no lado contralateral do peixe. Escala: 5 mm.

O arco branquial é constituído por filamentos branquiais e uma base cartilaginosa que os sustentam. Esta base cartilaginosa é ligada a músculos abdutores e adutores promovendo o movimento das brânquias (Figura 17).

Figura 17. Um arco branquial de *Trachinotus carolinus* visualizado em microscópio estereoscópico com aumento de 10 vezes. Os filamentos branquiais são unidos por uma base cartilaginosa. A partir de um arco branquial, obteve-se a microscopia do filamento branquial com as lamelas alinhadas paralelamente. Escala: 50 μ m.

Histologicamente, os filamentos branquiais são compostos por lamelas secundárias que se alinham em ambos os lados das lamelas primárias (ou filamentos). (Figura 17). As lamelas primárias também apresentam suporte cartilaginoso central, com condrócitos perfilados e a matriz extracelular adjacente. O seio venoso central é composto por arteríolas aferentes e eferentes e outros vasos anastomosados (Figura 18A)

As lamelas primárias são revestidas por um fino epitélio de células adjacentes e as lamelas secundárias contam com as células pilares, dispostas em fileiras, separadas uma das outras para a formação de lacunas ocupadas por capilares sanguíneos onde as hemácias circulam, denominado de lúmen capilar (Figura 18A).

As células clorídricas (Figura 18D) são envoltas por células pavimentosas achatadas e podem ser observadas na junção entre a lamela primária e secundária (Figura 18A e C). As células mucosas também estão presentes no epitélio da brânquia e é uma característica conspícua do mesmo (Figura 18B).

Figura 18. Brânquias. Cortes sagitais das lamelas primárias e secundárias. A) Coloração Hematoxilina e Eosina. 1- Lamela primária; 2- Lamela secundária com capilar central; 3- Condrócitos juntamente com a 4- matriz extracelular, para dar sustentação ao filamento branquial. Uma ou duas camadas de células do epitélio pavimentoso revestem as lamelas secundárias (setas). As células clorídricas são observadas na junção entre as lamelas primárias e secundárias (*). B) Coloração Picrosirius Red. 1 – Tecido cartilaginoso de sustentação contendo muitas fibras de colágeno tipo I; 2 – Epitélio que reveste a lamela primária com algumas células mucosas (setas). Os eritrócitos (cabeças de setas) e as células pilares são delimitadas por fibras colágenas (vermelho). C) Coloração Tricômio Masson. 1 - Seio venoso central composto por arteríolas e vasos anastomosados, delimitados por colágeno (setas), de onde se ramificam redes capilares para as lamelas carregando os eritrócitos (cabeças de setas). Na porção central do filamento branquial também se encontram o tecido cartilaginoso de sustentação e 2- sua matriz extracelular. D) Coloração Hematoxilina e Eosina. Células clorídricas (*) na lamela secundária. Do seio venoso central, os eritrócitos (cabeças de setas) são distribuídos para as lamelas e intercalados por células pilares (setas).

ii) Coração

O coração do *T. carolinus* encontra-se protegido centralmente na região da junção pré-opercular (Figura 19A e B) e, como nos demais peixes teleósteos, consiste de quatro partições, sendo duas delas as câmaras cardíacas: o seio venoso, o átrio, o ventrículo e o bulbo arterial (Figura 19C). O seio venoso não foi coletado com o coração devido à fragilidade do tecido e à dificuldade de sua coleta.

Figura 19. Coração de *Trachinotus carolinus* situado na região da junção pré-opercular. B) Após a retirada do opérculo e dos arcos branquiais, o coração foi retirado. Escala: 5 mm. C) Coração visualizado em lupa com o aumento de 10 vezes. Observa-se o átrio (At), o ventrículo (Vt) e o bulbo arterial (Ba).

O coração é construído por três camadas estratificadas de tecido: o epicárdio, o miocárdio e o endocárdio. O epicárdio consiste de uma única camada de epitélio pavimentoso (Figura 20D-F). O miocárdio varia em espessura nas diferentes partes do coração e é constituído por inúmeras fibras musculares. Cada fibra muscular estriada

cardíaca é uma unidade celular distinta. Essas células, chamadas de cardiomiócitos, são alongadas com um ou, raramente, dois núcleos localizados centralmente. (Figura 20C).

Os cardiomiócitos são revestidos por uma delicada bainha de tecido conjuntivo, o endocárdio (Figura 20F).

O bulbo arterial constitui a base espessada da aorta ventral, o vaso principal que sai do coração e leva o sangue a ser oxigenado pelas brânquias. Ele é constituído por fibrócitos com núcleos alongados e entre eles observam-se muitos eritrócitos (Figura 20A e B).

Figura 20. Coloração Hematoxilina e Eosina: A) Histologia do ventrículo (Vt) e do bulbo arterial (Ba). B) O bulbo arterial é constituído principalmente de tecido fibroelástico que serve de sustentação para receber o sangue que foi bombeado do ventrículo; os eritrócitos (setas) se diferenciam do tecido fibroelástico. C) Cardiomiócitos com os núcleos alongados centralmente (setas longas). Núcleos densos do endocárdio (setas). D) O coração é revestido por um epitélio pavimentoso simples, o epicárdio (cabeças de setas). Coloração Tricômio Masson: E) Eritrócitos (setas) e seus núcleos em azul. Fibras musculares cardíacas dispostas em vários sentidos com o epicárdio revestindo o coração (cabeças de setas). Coloração Picrosirius red: F) Epicárdio revestindo externamente o coração (cabeças de setas) e vários espaços, denominados trabéculas (Tb). Endocárdio revestindo o miocárdio (setas). A lâmina basal do endocárdio e do epicárdio possuem colágeno.

E) Imuno-histoquímica

Os resultados descritos abaixo se referem à imunolocalização das proteínas Hsp70 e p53 em brânquias e coração.

i) Proteínas de Choque Térmico (Hsp70)

• *Marcação imuno-histoquímica nas Brânquias*

Os controles negativos não obtiveram marcação imuno-histoquímica que corresponde à expressão proteica (de agora em diante referida no texto apenas como marcação), indicando que a técnica foi bem ajustada (Figura 21A). A marcação de Hsp70 referentes ao controle ambiental foi ligeiramente menor do que o controle 22 °C (Figura 21B e C).

Nas brânquias, a localização da proteína Hsp70 foi, na maioria das vezes, citoplasmática. Ela foi marcada em diferentes intensidades, dependendo da temperatura estudada, nas células endoteliais de lamelas primárias e secundárias, e nas células clorídricas. A marcação desta proteína em eritrócitos foi menor e em condrócitos foi incipiente (Figura 21).

Observando-se as fotomicrografias, a intensidade de marcação da Hsp70 aumenta a partir de 22 °C até 34 °C. Porém, na temperatura mais alta de 36 °C, e nos experimentos de TCS, os níveis de marcação da proteína decaíram em intensidade, mostrando-se iguais ou inferiores às marcações obtidas nos controles (Figura 21).

Observou-se que às temperaturas de 30 °C a 34 °C, além da marcação citoplasmática, alguns núcleos também foram marcados (Figura 21E-G). Na TCS, apesar

da quantidade citoplasmática ser baixa, observam-se muitos núcleos marcados (Figura 21I).

Figura 21. Fotomicrografias de brânquias de *Trachinotus carolinus* submetidas à técnica de imunohistoquímica anti-Hsp70 e contracoradas com hematoxilina. A) Controle negativo. B) Brânquia de peixe controle ambiental. C) Brânquia de peixe controle 22 °C. D) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 26 °C. E) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 30 °C. F) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 32 °C. G) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 34 °C. H) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 36 °C. I) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS) com núcleos fortemente marcados de Hsp70 (setas). Diluição do anticorpo de 1:9000.

- ***Hscore de Brânquias***

A Figura 22 apresenta as médias de Hscore de Hsp70 de peixes controle ambiental e 22 °C . Não houve diferenças significativas entre os dois grupos na marcação de Hsp70.

Figura 22. Médias de Hscore de Hsp70 em brânquias de controle ambiental e controle 22 °C. Os peixes controle 22 °C (C22) ficaram de 3 a 5 dias em tanques e posteriormente foram colocados em aquários de vidro a 22 °C por 24 horas. Os peixes controle ambiental (CA) foram eutanasiados assim que foram coletados, em temperatura ambiente de 22 °C.

Os resultados de Hscore indicam que o aumento de Hsp70 em brânquias foi gradual e proporcional à elevação de temperatura a partir de 22 °C até 34 °C. Este aumento é menos expressivo entre às temperaturas de 22 °C e 26 °C. Posteriormente houve uma queda de Hsp70 à 36 °C, chegando a níveis inferiores aos do controle 22 °C.

Estatisticamente, quando as marcações de Hsp70 às diferentes temperaturas são comparadas com 22 °C, observou-se que apenas o grupo aquecido a 34 °C teve quantidade significativamente maior (Figura 23).

Figura 23. Médias e desvio padrão do Hscore referentes à marcação de Hsp70 em brânquias às diferentes temperaturas. Nas brânquias a Hsp70 variou entre 110 e 180. Resultados significativos em comparação com o controle 22 °C (C22) são representados por asteriscos (*), onde: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$

No entanto, quando os grupos são comparados entre si, observou-se que a quantidade de Hsp70 em células branquiais à temperatura de 26 °C foi significativamente menor do que à temperatura de 34 °C. A marcação à temperatura de 36 °C apresentou intensidade significativamente menor do que as reveladas às temperaturas de 30 °C, 32 °C e 34 °C (Figura 24).

Figura 24. Diferenças das médias de Hscore de Hsp70 em brânquias entre as distintas condições experimentais. Os valores de p estão indicados nos casos em que houve diferenças significativas entre as médias de Hscore. Gráfico gerado automaticamente pelo Biostat 5.0.

Não houve diferenças significativas entre a quantidade de Hsp70 em brânquias de peixes submetidos a 36 °C em relação à TCS.

Figura 25. Médias de Hscore de Hsp70 em brânquias submetidas às temperatura 36 °C e crítica de sobrevivência (TCS).

- ***Marcação imuno-histoquímica no coração***

O coração apresentou um aumento na marcação de Hsp70 a partir da temperatura 22 °C até a 34°C, teve queda aos 36 °C e aumentou novamente em TCS (Figura 26). Os indivíduos do controle ambiental apresentaram maior quantidade de Hsp70 do que os do controle 22 °C (Figura 26B e C).

Figura 26. Fotomicrografias de corações de *Trachinotus carolinus* submetidos à técnica de imunohistoquímica anti-Hsp70 e contracolorados com Hematoxilina. A) Controle negativo. B) Coração de peixe controle ambiental. C) Coração de peixe controle 22 °C. D) Coração de peixe submetido a aquecimento até 26 °C. E) Coração de peixe submetido a aquecimento até 30 °C. F) Coração de peixe submetido a aquecimento até 32 °C. G) Coração de peixe submetido a aquecimento até 34 °C. H) Coração de peixe submetido a aquecimento até 36 °C. I) Coração de peixe submetido a aquecimento até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS) com núcleos marcados de Hsp70 (setas vermelhas). Diluição do anticorpo de 1:9000.

A partir de 26 °C, além do sarcoplasma, a Hsp70 também foi encontrada nos núcleos das células cardíacas (Figura 26E-I). A marcação foi maior às temperaturas de 34 °C e TCS (Figura 26G e I).

- **Hscore de Coração**

Comparando-se a quantidade de Hsp70 no coração de peixes do controle ambiental com o controle 22 °C, observou-se que houve diferenças significativas entre os dois grupos na marcação das proteínas (Figura 27).

Figura 27. Médias de Hscore de Hsp70 no coração de controle ambiental (CA) e controle 22°C (C22). O asterisco (*) indica diferença significativa com $p < 0,05$.

A marcação de Hsp70 no coração aumentou em relação à temperatura a partir de 22 °C até 34 °C. À temperatura de 36 °C houve queda da proteína. As análises estatísticas revelaram que os corações dos peixes controle 22 °C apresentaram marcação proteica de Hsp70 significativamente menor que os que foram submetidos às temperaturas de 32 °C e 34 °C (Figura 28).

Figura 28. Médias e desvio padrão do Hscore referente à marcação de Hsp70 no coração às diferentes temperaturas. No coração a Hsp70 variou entre 130 e 215. Resultados significativos em comparação com o 22 °C (C22) são indicados por asteriscos (*), onde: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Quando as quantidades de Hsp70 às diferentes temperaturas são comparadas entre si, observou-se que os cardiomiócitos dos peixes submetidos à 26 °C tiveram marcação significativamente menor de Hsp70 do que os que foram submetidos à 34 °C. A queda de Hsp70 à 36 °C foi significativa em relação à registrada à 34 °C (Figura 29).

Figura 29. Diferenças das médias de Hscore de Hsp70 no coração entre as distintas condições experimentais. Os valores de p estão indicados nos casos em que houve diferenças significativas entre as médias de Hscore. Gráfico gerado automaticamente pelo Biostat 5.0.

A marcação de Hsp70 foi significativamente maior à TCS em relação à 36 °C (Figura 30).

Figura 30. Médias de Hscore de Hsp70 no coração submetidos às temperaturas 36°C e crítica de sobrevivência (TCS). O asterisco (*) indica diferença significativa com $p < 0,05$.

ii) Proteína 53 (p53)

• *Marcação imuno-histoquímica nas Brânquias*

A localização característica da proteína p53 é nuclear, porém houve células, especialmente as clorídricas, nas quais a imunolocalização citoplasmática foi intensa. O padrão de marcação desta proteína guarda semelhança com a da proteína Hsp70, porém em menor intensidade. Houve um aumento da p53 a partir de 22 °C até a temperatura de 34 °C e depois uma queda de marcação às temperaturas de 36 °C e à TCS, apresentando quantidade similar a do controle 22 °C (Figura 31).

O controle 22°C tem marcação de p53 similar a do controle ambiental (Figura 31B e C) e o controle negativo não apresentou marcação (Figura 31A)

Figura 31. Fotomicrografias de brânquias de *T. carolinus* submetidas à técnica de imuno-histoquímica anti-p53 e contracolorados com hematoxilina. A) Controle negativo. B) Brânquia de peixe controle ambiental. C) Brânquia de peixe controle 22 °C. D) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 26 °C. E) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 30 °C. F) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 32 °C. G) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 34 °C. H) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até 36 °C. I) Brânquia de peixe submetido a aquecimento até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS). Diluição do anticorpo de 1:3500.

- ***Hscore de Brânquias***

Observou-se que não houve diferenças significativas entre o controle ambiental e o controle 22 °C (Figura 32).

Figura 32. Médias de Hscore de p53 em brânquias de controle ambiental (CA) e controle 22 °C (C22).

A quantidade de p53 nas células branquiais foi praticamente constante às temperaturas 22 °C, 26 °C e 30 °C. A marcação aumentou às temperaturas de 32 °C e 34 °C e decaiu à temperatura de 36 °C. As brânquias de peixes submetidos às temperaturas de 32 °C e 34 °C tinham maiores quantidades de p53 em relação à 22 °C (Figura 33).

Figura 33. Médias com desvio padrão do Hscore referentes à marcação p53 em brânquias às diferentes temperaturas. Nas brânquias, a p53 varia entre 120 e 170. Resultados significativos em comparação com o controle 22 °C (C22) são indicados por asteriscos (*), onde: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Notou-se que a marcação da p53 manteve-se constante às temperaturas iniciais, e após o pico abrupto às temperaturas de 32 °C e 34 °C, a quantidade de p53 decaiu até valores próximos aos obtidos à 22 °C. Quando as marcações de p53 dos diferentes grupos são comparadas entre si, observa-se que à 32 °C e à 34 °C as quantidades de p53 são significativamente maiores do que à 36 °C (Figura 34).

Figura 34. Diferenças das médias de Hscore de p53 em brânquias entre as distintas condições experimentais. Os valores de p estão indicados nos casos em que houve diferenças significativas entre as médias de Hscore. Gráfico gerado automaticamente pelo Biostat 5.0.

Não houve diferenças significativas na quantidade de p53 entre 36 °C e TCS (Figura 35).

Figura 35. Médias de Hscore de p53 em brânquias submetidos às temperaturas 36°C e crítica de sobrevivência (TCS).

- ***Marcação imuno-histoquímica no Coração***

A proteína p53 teve marcação maior nos tecidos cardíacos dos peixes do controle ambiental do que nos do controle 22 °C (Figura 23B-C).

A partir da temperatura controle 22 °C, a proteína p53 teve a quantidade proporcional ao aquecimento até 34 °C (Figura 36C-G). Às temperaturas de 36 °C e TCS, houveram uma diminuição da marcação de p53 em relação à observada à temperatura de 34 °C. Observou-se que, além da localização nuclear, também houve a localização sarcoplasmática desta proteína em todas as temperaturas (Figura 36G-I).

Figura 36. Fotomicrografias de corações de *Trachinotus carolinus* submetidos à técnica de imunohistoquímica anti-p53 e contracolorados com hematoxilina. A) Controle negativo. B) Coração de peixe controle ambiental. C) Coração de peixe controle 22 °C. D) Coração de peixe submetido a aquecimento até 26 °C. E) Coração de peixe submetido a aquecimento até 30 °C. F) Coração de peixe submetido a aquecimento até 32 °C. G) Coração de peixe submetido a aquecimento até 34 °C. H) Coração de peixe submetido a aquecimento até 36 °C. I) Coração de peixe submetido a aquecimento até a temperatura crítica de sobrevivência (TCS). Diluição do anticorpo del:3500.

- **Hscore de coração**

O Hscore do controle 22 °C foi baixo e por isso houve diferenças significativas entre ele e o controle ambiental, como mostrado na Figura 37.

Figura 37. Médias de Hscore de p53 no coração de controle ambiental (CA) e controle 22°C (C22). O asterisco (*) indica diferença significativa com $p < 0,05$.

No coração, os peixes controle 22 °C apresentaram Hscore baixo de p53, significativamente menor do que o encontrado às temperaturas de 30 °C, 32 °C e 34 °C. O aumento de p53 foi gradual a partir de 22 °C até à temperatura de 30 °C. A marcação de p53 manteve-se elevada nas temperaturas de 32 °C e 34 °C, apresentado queda a 36 ° (Figura 38). A marcação de p53 à temperatura de 36 °C não é estatisticamente diferente à temperatura de 22 °C e de 34 °C, devido ao desvio padrão (Figura 38 e 39).

Figura 38. Médias e desvio padrão do Hscore referente à marcação p53 no coração às diferentes temperaturas. No coração a p53 variou entre 110 e 230. Resultados significativos em comparação com o controle 22 °C (C22) são representados por asteriscos (*), onde: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$.

Comparando-se a marcação de p53 entre os grupos, constatou-se que esta foi significativamente menor à temperatura de 26 °C em relação à 34 °C. As expressões nos demais casos foram semelhantes estatisticamente (Figura 39).

Figura 39. Diferenças das médias de Hscore de p53 no coração entre as distintas condições experimentais. Os valores de p estão indicados nos casos em que houve diferenças significativas entre as médias de Hscore. Gráfico gerado automaticamente pelo Biostat 5.0.

Não houve diferenças significativas na marcação de p53 entre os peixes submetidos a 36 °C e TCS (Figura 40).

Figura 40. Médias de Hscore de p53 no coração submetidos às temperaturas 36°C e crítica de sobrevivência (TCS).

iii) Hsp 70 e p53 em *Rattus norvegicus*

As imuno-histoquímicas realizadas em ratos *Rattus norvegicus* apresentaram resultados de marcação semelhantes às observadas nos peixes: ambas as proteínas localizam-se no sarcoplasma dos cardiomiócitos (Figura 41).

Figura 41. Fotomicrografias de tecido muscular estriado cardíaco de *Rattus norvegicus*. A) Tecido submetido à imuno-histoquímica anti-Hsp70. B) Tecido submetido à imuno-histoquímica anti- p53. Detalhe: controle negativo de ambas as proteínas.

iv) Hsp70 x p53 nos tecidos branquiais e cardíacos

Em tecidos branquiais, quando as marcações das duas proteínas foram comparadas, pôde-se observar que o aumento de Hsp70 com a temperatura foi gradual a partir de 22 °C, com maior quantidade à temperatura de 34 °C, enquanto que a de p53 apresentou um aumento mais abrupto à temperatura de 32 °C (temperatura em que a p53 tem a maior marcação) e manteve-se elevada a 34 °C. Posteriormente, as marcações de ambas decaem significativamente nas temperaturas de 36 °C e TCS (Figura 42).

Figura 42. Comparação entre as médias de Hscore das proteínas Hsp70 e p53 nas brânquias em diferentes temperaturas. Observa-se que ambas atingem o pico de marcação entre as temperaturas de 32 °C e 34 °C, posteriormente decaem a valores semelhantes ao do controle.

Comparando-se as médias de Hscore referentes às expressões das proteínas Hsp70 e p53 no coração, observou-se que ambas possuem quantidades crescentes já nas temperaturas iniciais de 26 °C e se elevam proporcionalmente ao aumento da temperatura até 34 °C. No entanto, após apresentar maior quantidade às temperaturas de 32 °C e 34 °C em relação ao controle 22 °C, a Hsp70 sofre um declínio significativo à temperatura de 36 °C e eleva-se novamente à temperatura de TCS. Já a p53 teve elevação significativa na marcação em relação ao controle 22 °C às temperaturas de 30 °C, 32 °C e 34 °C. Posteriormente, apresentou uma queda não expressiva às temperaturas de 36 °C e manteve-se similar à TCS (Figura 43).

Figura 43. Comparação entre as médias de Hscore das proteínas Hsp70 e p53 no coração em diferentes temperaturas. Observa-se que o comportamento das duas proteínas no coração aparenta ser semelhante, porém, porém com algumas particularidades (comentadas no texto). Enquanto a quantidade Hsp70 eleva-se até 34 °C, decai à 36 °C e retorna a expressar-se intensamente na TCS. A p53 eleva-se até 30°C e mantém-se mais ou menos constante até a TCS.

VII. DISCUSSÃO

A temperatura tem um importante papel no comportamento dos animais, incluindo os peixes. A mudança de comportamento é umas das primeiras respostas às alterações da temperatura do meio. Mudanças comportamentais normalmente ocorrem antes que ajustes dos processos fisiológicos ocorram. Por exemplo, é comum que o aumento da temperatura acima do ideal tenha efeitos sobre o estado de agitação dos peixes, fazendo com que eles tendam abandonar a área em que se encontram a procura de condições mais adequadas (Beitinger et al., 2000). Uma das causas para esse comportamento inquieto está relacionada ao fato de que em altas temperaturas há aceleração do metabolismo e aumento das demandas energéticas (Reyes et al., 2011). A necessidade de mais oxigênio nos tecidos provoca, até certo ponto, a aceleração das frequências respiratória e cardíaca (Frederich; Pörtner, 2000). Desta forma, o comportamento mais agitado era esperado nos experimentos. No entanto, observou-se que, enquanto a natação e batimento opercular foram afetados a partir da temperatura de 26 °C, a perda de equilíbrio tornou-se aparente apenas na temperatura de 32 °C (Figura 12). De acordo com Hodson et al. (1981), a perda de equilíbrio é resultante de um rompimento na integridade neuronal devido às altas temperaturas. Isso indica que à temperatura de 32 °C há mudanças fisiológicas que correspondem a comportamentos subletais.

No experimento de TCS, observou-se, entretanto, que a partir de 36 °C, os peixes passaram a apresentar comportamentos letárgicos. Em uma faixa muito pequena de temperatura, de 36 °C até um pouco acima de 38 °C, os peixes apresentaram mudança de coloração, perda de equilíbrio seguida de espasmos, culminando com a parada total dos batimentos operculares (Figura 13). Esses mesmos comportamentos e a mudança de coloração também foram observados por Cocking (1959) que estudou os efeitos da temperatura em peixes *Rutilus rutilus*. Segundo o autor, os peixes apresentam coloração

mais escura quando submetidos a temperaturas elevadas por que os melanóforos responsáveis pela pigmentação da pele reagem mecânica, comportamentalmente e fisiologicamente, alterando os padrões de cores (Nery; de Lauro Castrucci, 1997; Höglung et al. 2000). Embora, dependendo do indivíduo, as fases propostas por Cocking (1959) tenham sido registradas em diferentes momentos, todos eles apresentaram as 3 fases bem características (Tabela 3), diferenciando apenas na rapidez de transição entre elas. Diferenças individuais são comuns nesses casos (López-Olmeda; Sanchez-Vázquez, 2011) principalmente se considerarmos que os experimentos são do tipo agudo e que a faixa de variação na qual ocorreu a morte foi relativamente pequena (1,5 °C). Em nível de comparação, os espasmos observados em animais ectotérmicos são comparados às convulsões humanas, provocadas quando há exposição excessiva do corpo ao calor (insolação, febre alta, etc.) (Attia et al., 1983). Assim, os espasmos e perda de equilíbrio dificultam, ou mesmo impossibilitam que os peixes respondam de forma esperada quando há necessidade de escapar dos predadores ou de se alimentarem (Beitinger et al., 1977).

Desta forma, os estudos sobre comportamento auxiliam a compreender como os indivíduos de uma determinada espécie são capazes de responder e de se ajustar a variações de temperatura, não só concernentes ao aquecimento global, mas também a eventos como os de El Niño e La Niña (Beitinger et al., 2000; Mora; Ospina, 2002). Existem evidências que, tanto em ecossistemas marinhos polares, temperados quanto tropicais, o aumento das temperaturas médias já está afetando a distribuição dos organismos (Parmesan, 2006).

As taxas de troca de calor entre o ambiente e o organismo dependem de uma série de fatores, tais como a relação entre área e volume, o tamanho e a massa corpórea do indivíduo (Mora; Maya, 2006). Alguns estudos demonstram que a massa corpórea dos peixes é inversamente proporcional à troca de calor (Beitinger et al., 1977; Weller et al.,

1984), enquanto outros estudos consideram o tamanho corporal como crucial no estudo da tolerância térmica (Hutchison, 1976; Becker; Genoway, 1979), pois a penetração do calor seria mais lenta em peixes maiores.

A massa corpórea dos pampos utilizados no presente estudo não foi mensurada o que impossibilita a comparação com os estudos de Beitinger et al. (1977) e de Weller et al. (1984). Por sua vez, os resultados deste trabalho indicam que há pouca relação entre o comprimento dos peixes utilizados em relação à tolerância térmica (valor de r^2 de 0,4917 e detalhes na Figura 15). Tais resultados corroboram com os estudos de Hutchison (1976) e Ospina e Mora (2004) que também obtiveram pouca relação entre estes dois fatores, pois estudaram peixes de recifes pequenos e com pequena diferença de tamanho entre si. Assim como eles, o presente trabalho foi realizado com peixes que possuíam pequena variação de tamanho (Figura 11), com comprimento médio 61,9 mm e desvio padrão de $\pm 13,7$ mm, porém da mesma espécie.

A temperatura corporal da maioria dos peixes é muito próxima da temperatura da água, pois tanto o sangue quanto a água do mar tem alta capacidade térmica e a área superficial do epitélio branquial é grande o suficiente para que exista a troca de calor com 80 a 90% de eficiência (Stevens; Sutterlin, 1976). Por isso, em experimentos como os realizados neste estudo, a taxa de aquecimento deve ser estipulada com critério para que não haja discrepância entre a temperatura da água e a corpórea. Além disso, certos cuidados devem ser tomados para se estabelecer a taxa de aumento de temperatura. O aquecimento muito rápido pode produzir um retardo entre o aquecimento corporal e o do ambiente (Lutterschmidt; Hutchison, 1997; Ospina; Mora, 2004). Em contraste, o aquecimento mais vagaroso pode permitir que os peixes se aclimatem a nova temperatura (Cocking, 1959; Beitinger et al., 2000; Mora; Maya, 2006). A hipótese deste trabalho se fundamenta em estudos sobre a taxa de aumento de temperatura realizado por Frederich

e Pörtner (2000), no qual os autores utilizaram uma taxa de aquecimento de 2 °C/h para estudar o batimento cardíaco, a ventilação e a pressão do oxigênio na hemolinfa de *Maja squinado* durante o aquecimento de 12 a 40 °C.

O patamar de 120 minutos é suficiente para que haja a expressão máxima de Hsp70 (Currie; Tufts, 1997; Burkhardt-Holm et al., 1998). Não foram encontrados dados na literatura para a p53, embora nossos experimentos mostrem que o período é suficiente para a expressão desta proteína.

Embora os juvenis possam prosperar em temperaturas tão elevadas como 34 °C (Main et al., 2007), os resultados deste trabalho indicam que os pampos podem suportar a temperatura de 36 °C por pelo menos duas horas, sobrevivendo ao estresse quando realocados em ambientes com as temperaturas comumente encontradas em seus locais de origem. Os indivíduos de algumas espécies são adaptados a uma grande variação térmica. A carpa comum, *Cyprinus carpio* é exemplo de peixe que tolera uma amplitude grande de temperatura. Esta espécie sobrevive em temperaturas que vão desde 3 °C até 35 °C (Froese; Pauly, 2011). No entanto, mesmo em espécies euritérmicas como esta, os mecanismos fisiológicos de plasticidade que permitem ao organismo sobreviver além da faixa ótima de temperatura, geralmente demandam muita energia. Os limites de tolerância para a sobrevivência, nesses casos, dependem, em parte, da energia que resta para outras funções críticas como crescimento, reprodução e competição com indivíduos de outras espécies (Hofmann; Todgham, 2010). Desta forma, mesmo que organismos sobrevivam por um período de tempo prolongado, em laboratório, isto não indica que eles podem exercer suas funções ecológicas de maneira apropriada.

A mortalidade dos pampos estudados ocorreu em temperaturas acima de 37 °C (Figura 14). Segundo os resultados obtidos neste trabalho, um aumento de apenas 3 °C acima da temperatura máxima de 34 °C, a qual eles já foram encontrados no meio

ambiente (Main et al., 2007), é suficiente para causar mortalidade. Não foram encontrados registros na literatura se os pampos adotam algum comportamento para evitar altas temperaturas, como por exemplo, o deslocamento para profundidades maiores e locais mais afastados das áreas de arrebentação. Por ser um peixe bastante utilizado para a aquicultura nos Estados Unidos, a maioria das informações sobre sua ecologia provem da América do Norte. Estudos desse tipo em águas brasileiras são inexistentes, pelo menos pelo que se pode concluir pelo levantamento bibliográfico realizado. Para os indivíduos de espécies estenotérmicas a situação é ainda mais crítica. Peck et al. (2004) demonstraram que não é possível aclimatar estrelas-do-mar *Ophiotus victoriae*, encontradas em águas antárticas, à temperatura de 2 °C, apenas <0,5 °C acima da temperatura máxima de verão. Estudos realizados com algumas espécies antárticas de peixes concluíram que, com taxa de aumento de temperatura de 1 °C/mês⁻¹, estes sobrevivem a uma temperatura de 1 °C – 6 °C (média de 3.3 °C), apenas 2 °C – 3 °C acima da temperatura máxima de verão encontrada na região Antártica (Peck et al. 2009).

A tolerância térmica e a resposta à temperatura de um organismo também podem ser influenciadas por diversos fatores: estresse (Barton; Iwama, 1991), idade, tamanho, alimentação (Mora; Maya, 2006) e temperatura de aclimação (Mora; Maya, 2006; Healy; Schulte, 2012; Lutterschmidt; Hutchison, 1997). Adicionalmente, estudos de Beitinger et al. 2000 indicam que a história térmica também influencia na tolerância térmica dos organismos. Desta forma, além dos experimentos terem sido cuidadosamente controlados (peixes de tamanhos semelhantes, juvenis e alimentados de forma similar), optou-se em obter um resultado mais fiel em relação ao meio ambiente. Levamos em consideração a história térmica dos peixes ao invés de aclimatá-los, mantendo-os à temperatura na qual foram coletados (22 °C) e permitindo, nos dias em que eles permaneceram no tanque, uma variação de ± 1 °C. Como os experimentos de aumento de

temperatura deveriam partir de 22 °C, a variação de temperatura ficou restrita a $\pm 0,3$ °C quando localizados no aquário.

Estes períodos de descanso foram baseados nos estudos de Pickering et al. (1982), que indicaram que eram necessários 4 horas de descanso, depois de 2 minutos de manuseio, para que as quantidades de cortisol no plasma de trutas marrons, *Salmo trutta* retornassem a níveis normais. Além disso, tanto Pickering et al. (1982) quanto Ruane et al. (2001) observaram que os efeitos secundários do estresse eram identificáveis por períodos prolongados sobre as trutas em comparação às carpas. Esses estudos indicam que o tempo necessário para o retorno à normalidade após estresse, no que se referem aos corticosteroides, efeitos metabólicos, hematológicos ou estruturais secundários é dependente da espécie (Barton; Iwama, 1991). Os dados de consumo de oxigênio dos pampas (Tabela 5) e a observação do comportamento em cativeiro indicam sua alta adaptabilidade ao manuseio humano. Desta forma, acredita-se que os períodos utilizados para descanso foram suficientes para evitar a interferência do estresse da manipulação nos resultados.

Os efeitos positivos do repouso podem ser observados em nossos resultados de imuno-histoquímica, nos quais observamos que no tecido do coração houve diminuição significativa da expressão (observada por meio de marcadores imuno-histoquímicos) de Hsp70 e p53 nos peixes controle 22 °C em relação aos peixes controle ambiental (Figura 26 e 36).

Devido à dificuldade de se obter anticorpos específicos para *T. carolinus* contra as proteínas Hsp70 e p53, e devido a estas proteínas serem conservadas na escala filogenética, utilizamos anticorpos contra proteínas Hsp70 e p53 extraídas de mamíferos e inoculadas em camundongos (*mouse*). Muitos trabalhos com peixes e outros organismos marinhos também utilizam proteínas Hsp70 e p53 de mamíferos. No caso da Hsp70,

Yamashita et al. (2004) e Burkhardt-Holm et al. (1998) utilizaram anticorpos monoclonais de camundongos feitos com proteínas Hsp70 bovinas em peixe platô, *Xiphophorus maculatus* e em trutas-marrom, *Salmo trutta*, respectivamente. Miguel et al. (2007) estudaram a expressão de p53 em caranguejos *Ucides cordatus* utilizando anticorpo monoclonal de camundongo feito a partir de p53 humanas. Liu et al. (2011) compararam anticorpos policlonais de camundongos anti-p53 de truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss* e de humanos, *Homo sapiens*, através da técnica de Western Blot. Os autores encontraram resultados semelhantes nos dois anticorpos. A diferença entre os anticorpos monoclonais e policlonais está relacionada principalmente com a especificidade. Embora os anticorpos policlonais possuam maior afinidade do que o monoclonal, este último é muito mais específico às proteínas de estudo (Ramos-Vara, 2005). Por esse motivo, optou-se por utilizar os anticorpos monoclonais. A ampla utilização de anticorpos produzidos em mamíferos se explica pela conservação destas proteínas na escala filogenética (Kiang; Tsokos, 1998; Basu et al., 2002; Belyi et al., 2010; Kampinga; Craig, 2010), indicando sua importância primordial nas funções celulares.

Além da revisão literária para a escolha dos anticorpos, também testamos a eficiência destes aplicando as técnicas utilizadas de imuno-histoquímica em células cardíacas de ratos (Figura 41). Os resultados demonstraram que os padrões de marcação imuno-histoquímica de Hsp70 e p53 nesses animais são muito similares aos encontrados nos peixes. Complementarmente, os controles negativos não continham nenhuma marcação das proteínas. Ambas as informações corroboram com a ideia de que os anticorpos funcionaram de modo específico para a Hsp70 e a p53, estas se conservam filogeneticamente nas diferentes espécies.

Em todos os controles referentes a cada temperatura final estudada, obtiveram-se padrões de expressão semelhantes de proteína, tanto para a Hsp70 quanto para a p53. Esses dados demonstram que as variações de expressão em animais submetidos às diferentes temperaturas não estão relacionadas ao período de permanência dos animais nos aquários.

Tanto em corações quanto em brânquias observou-se o aumento de Hsp70 marcante a partir de 22 °C até 34 °C. Em relação a 22 °C, apenas peixes submetidos a 34 °C tiveram maior expressão de Hsp70, enquanto que no coração as expressões às temperaturas de 32 °C e a 34 °C foram significativamente diferentes de 22 °C. Além disso, os valores de Hscore são maiores no coração do que nas brânquias, ou seja, o coração expressa mais Hsp70 do que as brânquias. Estes resultados indicam que os tecidos respondem de maneira diferenciada ao aquecimento, sendo uns tecidos mais sensíveis do que outros. Resultados semelhantes foram obtidos por Selvakumar e Geraldine (2005) que observaram pela técnica de Western Blot que o coração de camarões de água doce, *Macrobrachium malcolmsonni* continha maior quantidade de Hsp70 e respondia anteriormente ao aumento de temperatura do que as brânquias. Com o aumento de temperatura, o coração parece ser um dos primeiros órgãos a falhar, sendo, portanto, determinante para os limites de tolerância térmica dos organismos (Somero, 2002). Os resultados deste trabalho concordam com os resultados desse autor e indicam, pela quantidade maior de Hsp70, que o coração tem maior sensibilidade à temperatura.

Tanto nas brânquias quanto no coração, a expressão de Hsp70 decai na temperatura de 36 °C (Figura 21 e 26). Resultados semelhantes foram obtidos por Selvakumar e Geraldine (2005). Embora os estudos de Hsp70 tenham sido realizados com uma espécie diferente, com uma técnica quantitativa de maior precisão (Western Blot) e com o emprego de anticorpo monoclonal contra proteína Hsp70 humana, os autores

também identificaram um pico de indução de Hsp70 em camarões aclimatados a 20 °C na temperatura de 34 °C em brânquias e 32 °C no coração, seguido de uma queda drástica de expressão a 37 °C. Os resultados semelhantes entre o presente estudo e o de Selvakumar e Geraldine (2005) enfatiza o fato de que esta proteína é bem conservada filogeneticamente e possui a mesma função nos diferentes táxons.

De fato, altas temperaturas causam um colapso da quantidade proteica total (Hochachka; Somero, 2002). Esta queda de expressão proteica já foi observada em nosso laboratório com a utilização de eletroforese.

No caso da Hsp70, Abravaya et al. (1991) observaram em seus experimentos esse mesmo tipo de queda e o relacionou com a retroalimentação negativa e autorregulatória características da Hsp70. Quando a quantidade de Hsp70 aumenta em resposta a quantidade de proteínas desnaturadas, a Hsp70 excedente conjuga-se novamente ao HSF que havia se acumulado, cessando a resposta ao choque térmico.

Pode-se observar nas fotomicrografias (Figura 21) que, a partir das temperaturas de 30 °C e principalmente na TCS, as proteínas Hsp70 começam a ser expressas não apenas no citoplasma, mas também no núcleo das células. A expressão citoplasmática da Hsp70 está bem fundamentada, pois esta se liga a proteína nascente assim que ela é produzida pelos ribossomos, e esse processo ocorre no citoplasma celular. Sua localização no núcleo indica que a Hsp70 faz o reparo das proteínas ribonucleares (RNP - *Nuclear Ribonucleoprotein*), proteínas nucleares associadas com ácidos ribonucleicos (Sanders et al., 1994), Burkhardt-Holm et al. (1998) também constataram a transferência de Hsp70 do citoplasma para o núcleo em altas temperaturas nas células da epiderme de truta marrom (*Salmo trutta*). Estes resultados indicam que o choque térmico altera a conformação das proteínas no núcleo, principalmente nas temperaturas mais altas como a TCS. Isso também explica o porquê da expressão de Hsp70 na TCS ter sido maior do

que a 36 °C, pois o deslocamento desta proteína do citoplasma para o núcleo é mais nítido no coração e esse deslocamento aumenta a intensidade da marcação da proteína no núcleo.

As fotomicrografias de brânquias também demonstra que as células clorídricas possuem expressão bem acentuada e perceptível de Hsp70 em relação a outras células. As células clorídricas são reconhecidas pela sua importância no balanço osmótico dos peixes. Além disso, ela possui grande quantidade de mitocôndrias, devido à demanda energética elevada (Perry, 1997). É provável que estas células sofram mais intensamente a falta de oxigênio celular que o aumento de temperatura impõe, devido à aceleração do metabolismo. O aquecimento pode aumentar metabolismo de modo tal que ultrapassa a capacidade do organismo de captar, distribuir e utilizar o oxigênio, mesmo que este esteja disponível no ambiente (Frederich; Pörtner, 2000; Pörtner, 2001; Schimdt-Nielsen, 2002). Isso pode indicar que a expressão de Hsp70 além de ser tecido-específica, também deve ser célula-específica, sendo que alguns tipos celulares são mais sensíveis do que outros.

Não há relatos de que o estresse por si só estimula a expressão da p53 (Pluquet; Hainaut, 2001), no entanto, os resultados deste trabalho indicam que há quantidade significativamente maior de p53 no coração controle ambiental do que no controle 22 °C, novamente indicando que o tecido cardíaco pode estar mais susceptível ao estresse como observado por Somero (2002) em seus estudos (Figura 36 e 37).

A expressão basal da p53 foi bastante baixa nos indivíduos do grupo controle 22 °C. Nas brânquias, o aumento expressão de p53 em relação ao controle é significativo nas temperaturas de 32 °C e 34 °C, e, no coração, nas temperaturas de 30 °C, 32 °C e 34 °C.

No entanto, em relação à p53, há maiores diferenças entre os padrões de expressão nos dois tecidos. Enquanto nas brânquias, a quantidade de p53 é semelhante

nas temperaturas mais baixas, sofre um aumento abrupto nas temperaturas de 32 °C e 34 °C e depois decai à 36 °C e TCS (Figura 31); no coração, o aumento da quantidade é gradual desde as temperaturas iniciais até os 34 °C, porém sofre uma leve queda não é significativa de expressão à temperatura de 36 °C e TCS que (Figura 36). Novamente, todos estes resultados indicam a sensibilidade do coração e que o padrão da expressão das proteínas podem ser tecido-específicas.

Pôde-se observar que em ambos os tecidos, a expressão da p53 é citoplasmática nas primeiras temperaturas (Figura 31 e 36). A partir da temperatura de 30 °C consegue-se identificar expressão nos núcleos das células. Embora nas brânquias, essa expressão nuclear diminua nas temperaturas de 36 °C e TCS, no coração, essa diminuição é pouco visível, sendo a diminuição citoplasmática mais evidente. Embora não haja diferenças significativas da quantidade de p53 entre as temperaturas de 36 °C, 34 °C e 22 °C devido ao grande desvio padrão (Figura 38 e 39), é provável que haja queda da expressão de p53 entre a temperatura de 34 °C para a de 36 °C, como observada nos outros casos. A p53 é produzida no citoplasma, e quando o dano no DNA ocorre, a p53 é exportada para o núcleo. Dependendo do tipo e da intensidade do dano, a p53 exerce função de fator de transcrição, ativando diferentes vias que vão desde a parada do ciclo celular até mecanismos apoptóticos. A localização da p53 no citoplasma é indicativa de que a proteína está sendo produzida, mas não está ativa. Assim, pode-se inferir que a síntese das proteínas no citoplasma aumenta nas fases iniciais do estresse para serem posteriormente exportadas para o núcleo (Meek, 2004).

Alguns estudos, no entanto, têm indicado que uma parte das p53 em estado ativo se desloca até o citoplasma com o intuito de ativar os componentes apoptóticos das mitocôndrias (Marchenko et al., 2000) como, por exemplo, o citocromo c (Goldstein et al., 2000) e o fator indutor de apoptose (IAF) (Susin et al., 1999). Estudos também

demonstram que estes mecanismos podem ser ativados simplesmente pelo contato da p53 com a mitocôndria (Marchenko et al., 2000). Esses resultados indicam que, a p53 não age apenas como um fator de transcrição, o que melhor explicaria a presença conspícua de p53 no citoplasma nos nossos resultados. Por exemplo, nas temperaturas mais elevadas (36 °C e TCS) as células clorídricas das brânquias expressam grande quantidade de p53 no citoplasma. Parece lógico inferir que esta maior quantidade poderia estar relacionada à grande quantidade de mitocôndrias que estas células possuem. Nossos resultados contribuem para a confirmação da hipótese de que diferentes tipos de células possuem diferentes respostas biológicas a um determinado fator de estresse (Gudkov; Komarova, 2003).

Quando as expressões das duas proteínas são comparadas, podemos observar que, nas brânquias, o pico de expressão de Hsp70 (34 °C) foi tardio em relação ao da expressão da p53 (32 °C e posteriormente 34 °C). A Hsp70 e a p53 descaíram a 36 °C e TCS (Figura 42). O fato da proteína p53 se expressar anteriormente em resposta ao aumento da temperatura do que a Hsp70 pode estar relacionada à baixa quantidade de p53 no controle 22 °C. O mesmo ocorre nas células cardíacas, que atingem picos de expressão de Hsp70 às temperaturas de 32 °C e 34 °C e picos de expressão de p53 nas temperaturas de 30 °C, 32 °C e 34 °C. No entanto, enquanto os níveis de Hsp70 decaem nitidamente às temperaturas de 36 °C e TCS, a queda dos níveis de p53 à temperatura de 36 °C e TCS não são muito acentuados (Figura 43). A quantidade alta de p53 no sarcoplasma dos cardiomiócitos pode ter influenciado no resultado. Como discutido anteriormente, a p53 no citoplasma pode indicar sua inativação ou a sua atividade na morte celular através da ativação de mecanismos apoptóticos relacionados às mitocôndrias.

O estudo sobre como estas duas proteínas se comportam e se relacionam durante o aquecimento pode possibilitar a compreensão dos mecanismos de sobrevivência e

reparo celular. Muitos trabalhos analisam a relação entre a Hsp70 e a p53, pois se sabe que a p53 regula negativamente a Hsp70 pela inativação dos sítios promotores. (Szymanska; Zylicz, 2009; Chen et al., 1999; Agoff et al., 1993). Enquanto a Hsp70 está relacionada principalmente com os mecanismos de sobrevivência celular, a p53 tem como uma de suas principais funções a regulação de mecanismos apoptóticos. Quando este balanço não ocorre, ou seja, células mutantes de p53 não bloqueiam a Hsp70 e nem o ciclo celular, estas células anormais se tornam potencialmente imortais (Quenneville et al., 2002).

Há possivelmente estreita relação entre o aumento de temperatura e a falta de oxigênio nos tecidos, o que pode causar a morte do organismo. De acordo com essa hipótese o limite de tolerância térmica é, muitas vezes, diretamente dependente do limite da capacidade de oxigenação, a OLTT (*oxygen-limited thermal tolerance*), dos sistemas orgânicos. A OLTT, variável de acordo com a espécie, depende da habilidade que os mecanismos de ventilação e de circulação possuem para suprir a alta demanda de oxigênio causada pelo aumento de temperatura. Em altas temperaturas, ao se atingirem os limites de capacidade desses mecanismos, o indivíduo pode morrer mesmo que alimento e oxigênio estejam disponíveis (Pörtner, 2001). Mesmo que os níveis de oxigênio durante os experimentos sejam suficientes para a respiração dos peixes (Tabela 4), a demanda metabólica é tão alta que tornam os mecanismos compensatórios de ventilação não mais suficientes (Frederich; Pörtner, 2000).

Além da sua importância ecológica, a espécie aqui estudada tem grande potencial como uma opção para a aquicultura. Conhecer suas respostas fisiológicas ao estresse térmico pode auxiliar no manejo ou na seleção zootécnica dos indivíduos dessa espécie. Os estudos de Hayashi et al. (2002) indicam que a glutamina pode aumentar a expressão de Hsp70 e, em consequência, aumentar a sobrevivência celular. Estes dados

implicam que o conhecimento desses mecanismos podem ser utilizados em sistemas de cultivo no qual os organismos são expostos a altas temperaturas e ao estresse, incluindo técnicas de engenharia genética.

Os pampos possuem respostas comportamentais, fisiológicas e moleculares a temperatura e por possuir uma parte do seu ciclo de vida em regiões costeiras, são organismos susceptíveis a variações térmicas. Compreender a relação entre esta espécie e a temperatura pode servir como base de dados para pesquisas ecológicas e de distribuição geográfica. Além disso, as informações aqui obtidas podem ser comparadas com outras espécies da ictiofauna.

VIII. CONCLUSÕES

Podemos concluir que:

- ✓ Há mudanças de comportamento e de expressão proteica em resposta ao aquecimento.
- ✓ A partir de 36°C, o comportamento letárgico indica uma desorganização dos sistemas e órgãos, que evolui rapidamente para a morte.
- ✓ A expressão proteica de p53 e Hsp70 decai nas temperaturas acima de 36°C, indicando que este é ponto no qual a temperatura pode se tornar letal para o peixe.
- ✓ A tolerância térmica varia individualmente entre os peixes, mas dentro de um intervalo relativamente estreito de temperatura,
- ✓ O período de repouso após as coletas acarreta em diminuição da expressão das duas proteínas no coração, o que indica que o estresse pode influenciar nos resultados.
- ✓ A expressão de Hsp70 e p53, bem como o comportamento da proteína frente ao aquecimento é tecido-específica e célula-específica.
- ✓ A localização das proteínas p53 e Hsp70 na célula varia de acordo com a temperatura.

A) Considerações

- ✓ A análise de como estas duas proteínas interagem durante o aquecimento pode fornecer uma base sólida de informação sobre seus papéis no processo de reparo e sobrevivência celular.
- ✓ Para compreender a relação entre a p53 e a apoptose celular, recomenda-se que sejam realizados estudos futuros que analisem a expressão da p53 com outras

proteínas pró-apoptóticas ou através de colorações que avaliam a viabilidade celular.

- ✓ Neste trabalho, a expressão de proteínas de reparo celular associadas a mecanismos de termoestabilidade foi estudada em juvenis de uma única espécie, uma investigação usando mais estágios de mesma espécie e também de outras espécies que possuam características térmicas diferentes é necessário.
- ✓ Os resultados indicam que mudanças climáticas poderão alterar a composição das populações e reestruturar os ecossistemas devido a possível mudança de distribuição geográfica causada pela temperatura, já que alterações profundas de expressão de proteínas com importantes funções para a sobrevivência celular e alterações significativas do comportamento ocorrem em um intervalo relativamente estreito de temperatura como demonstrados neste estudo.

IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAVAYA, K.; PHILLIPS, B.; MORIMOTO, R. I. 1991. Attenuation of the heat shock response in HeLa cells is mediated by the release of bound heat shock transcription factor and is modulated by changes in growth and in heat shock temperatures. *Genes Dev.*, v. 5, p. 2117-2127.
- ALEXANDROV, V. Y.; BERNSTAM, V. A. 1977. Cells, molecules and temperature: conformational flexibility of macromolecules and ecological adaptation. New York: Springer-Verlag. 300 p.
- AGOFF, S. N.; HOU, J.; LINZER, D. H.; WU, B. 1993. The human hsp70 promoter by p53, v. 259, p. 84-87.
- ANGILLETTA Jr., M. J. 2009. Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis. Oxford, UK: Oxford University Press. 304 p.
- ATTIA, M.; KHOGALI, M.; EL-KHATIB, G.; MUSTAFA, M.K.E.; MAHMOUD, N.A.; ELDIN A.N.; GUMAA, K. 1983. Heat stroke: an upward shift of temperature regulation set point at an elevated body temperature. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, v. 53, p. 9 - 17.
- BASU, N.; TODGHAM, A. E.; ACKERMAN, P. A.; BIBEAU, M. R.; NAKANO, K.; SCHULTE, P. M.; IWAMA, G. K. 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene*, v. 295, p. 173-183.
- 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.
- BECKER, C. D.; GENOWAY, R. G. 1979. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environ. Biol. Fish.*, v. 4, n. 3, p. 245-256.
- 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.
- 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.
- BELIYI, V. A.; AK, P.; MARKERT, E.; WANG, H.; HU, W.; PUZIO-KUTER, A.; LEVINE, A. J. 2010. The origins and evolution of the p53 family of genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, v. 2, n. 6, article a001198.

- 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.
- BETTOLI, P. W.; NEILL, W. H.; KELSCH, S. W. 1985. Temperature preference and heat resistance of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes), bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis* (Gray), and their F1 hybrid. J. Fish Biol., v. 27, n. 3, p. 239-247.
- BRAUNBECK, T.; GORGAS, K.; STORCH, V.; VÖLKL, A. 1987. Ultrastructure of hepatocytes in golden ide (*Leuciscus idus melanotus* L.; Cyprinidae: Teleostei) during thermal adaptation. Anat. Embryol., v. 175, p. 303-313.
- BRETT, J. R. 1956. Some principles in the thermal requirements of fishes. Quart. Rev. Biol., v. 31, p. 75-87.
- BROWN, C.R.; BROWN, Q.H.; DOXSEY, S.J.; WELCH, W.J. 1996. Molecular chaperones and centrosomes, J. Biol. Chem., v. 271, n. 2 , p. 833-840.
- BURKHARDT-HOLM, P.; SCHMIDT, H.; MEIER, W. 1998. Heat shock protein (hsp70) in brown trout epidermis after sudden temperature rise. Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol., v. 120, n. 1, p. 35-41.
- BURONE, L.; MUNIZ, P.; PIRES-VANIN, A. M.; RODRIGUES, M. 2003. Spatial distribution of organic matter in the surface sediments of Ubatuba Bay (Southeastern – Brazil). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 75, p. 77-90.
- CHEN, Z.C.; WU, W.S.; LIN, M.T.; HSU, C.C. 2009. Protective effect of transgenic expression of porcine heat shock protein 70 on hypothalamic ischemic and oxidative damage in a mouse model of heatstroke. BMC Neurosci., v. 10, n. 1, p. 111.
- CLARK, M. S.; PECK, L. S. 2009. HSP70 heat shock proteins and environmental stress in Antarctic marine organisms: A mini-review. Mar. Genom., v. 2, p. 11-18.
- 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.
- COWLES, R. B.; BOGERT, C. M. 1944. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., v. 83, p. 265-296.
- CRAIG, E. A. 1985. The heat shock response. CRC Crit. Rev. Biochem., v. 18, p. 239-280.
- CURRIE, S.; TUFTS, B. 1997. Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. J. Exp. Biol., v. 200, n. 3, p. 607-614.

- DUBEAU, S. F.; PAN, F.; TREMBLAY, G. C.; BRADLEY, T. M. 1998. Thermal shock of salmon in vivo induces the heat shock protein (Hsp70) and confers protection against osmotic shock. *Aquaculture*, v. 168, p. 311-323.
- ELLIS, R. J.; HARTL, F. U. 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v. 9, p. 102-110.
- FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 61, p. 243-282.
- FIELDS, H. M. 1962. Pompanos (*Trachinotus* spp.) of the South Atlantic coast of the United States. *Fish. Bull.*, v. 62, p. 189-222.
- FINK, A. L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.*, v. 79, p. 425-449.
- 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.
- 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.
- FROESE, R.; PAULY, D. 2012. FishBase. World Wide Web electronic publication. Disponível em: <www.fishbase.org/summary/Cyprinus-carpio+carpio.html> Acesso em: 13 dezembro 2012.
- 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. 1957. The lethal temperature as a tool in taxonomy. *Ann. Biol.*, v. 33, p. 205-219.
- 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.
- 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.
- GOLDSTEIN, J. C.; WATERHOUSE, N. J.; JUIN, P.; EVAN, G. I.; GREEN, D. R. 2000. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell Biol.*, v. 2, n. 3, p. 156-162.
- GUDKOV, A. V.; KOMAROVA, E. A. 2003. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat. Rev. Cancer*, v. 3, n. 2, p. 117-129.
- GUTH, A. Z. 2004. A comunidade fital: Variação espacial e nictemeral da epifauna, especialmente anfípodos, associada à alga parda *Sargassum* spp. em quatro praias

- de Ubatuba, litoral norte do estado de São Paulo. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 78 p.
- HARTL, F. U.; HAYER-HARTL, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, v. 295, p. 1852-1858.
- HAYASHI, Y.; SAWA, Y.; FUKUYAMA, N.; NAKAZAWA, H.; MATSUDA, H. 2002. Preoperative glutamine administration induces heat-shock protein 70 expression and attenuates cardiopulmonary bypass-induced inflammatory response by regulating nitric oxide synthase activity. *Circulation*, v. 106, n. 20, p. 2601-2607.
- HAZEL, J. R.; MCKINLEY, S. J.; GERRITS, M. F. 1998. Thermal acclimation of phase behavior in plasma membrane lipids of rainbow trout hepatocytes. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 275, p. R861-R869.
- HEALY, T. M.; SCHULTE, P. M. 2012. Factors affecting plasticity in whole-organism thermal tolerance in common killifish (*Fundulus heteroclitus*). *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, v. 182, n.1, p. 49–62.
- HEATH, S.; BENNETT, W. A.; KENNEDY, J.; BEITINGER, T. L. 1994. Heat and cold tolerance of the fathead minnow, *Pimephales promelas*, exposed to the synthetic pyrethroid cyfluthrin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, v. 51, n. 2, p. 437-440.
- 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.
- HOESE, H. D.; MOORE, R. H. 1977. Fishes of the Gulf of Mexico, Texas, Louisiana, and adjacent waters . Texas: Texas A&M University Press. 327 p.
- 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.
- HÖGLUND, E.; BALM, P.H.M.; WINBERG, S., 2000. Skin darkening, a potential social signal in subordinate Arctic charr (*Salvelinus alpinus*): the regulatory role of brain monoamines and pro-opiomelanocortin-derived peptides. **J. Exp. Biol.** v. 203, p. 1711–1721.
- HUANG, L. C.; CLARKIN, K. C.; WAHL, G. M. 1996. Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 4827-4832.
- 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.

- IWAMA, G. K.; THOMAS, P. T.; FORSYTH, R. B.; VIJAYAN, M. M. 1998. Heat shock protein expression in fish. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v. 8, p. 35-56.
- JACOBucci, G. B.; LEITE, F. P. P. 2002. Distribuição vertical e flutuação sazonal da macrofauna vágil associada a *Sargassum cymosum* C. Agardh, na praia do Lázaro, Ubatuba, São Paulo, Brasil. *Revta. Bras. Zool.*, v. 19, (supl. 1), p. 87-100.
- KAMPINGA, H. H.; CRAIG, E. A. 2010. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 11, p. 579-592.
- KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. 1998. Heat shock protein 70 kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.*, v. 80, p. 183-201.
- 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. *Mod. Pathol.*, v. 25, p. 869-876.
- 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.
- LIU, M.; TEE, C.; ZENG, F.; SHERRY, J. P.; DIXON, B.; BOLS, N.C.; DUNCKER, B. P. 2011. Characterization of p53 expression in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, v. 154, n. 4, p. 326-332.
- LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Therm. Biol.*, v. 36, p. 91-104.
- LUTTERSCHMIDT, W. I.; HUTCHISON, V. H. 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Can. J. Zool.*, v. 75, 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.
- MARCHENKO, N. D.; ZAIKA, A.; MOLL, U. M. 2000. Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria a potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.*, v. 275, n. 21, p. 16202-16212.
- MATSUMURA, Y.; ANANTHASWAMY, H. N. 2004. Toxic effects of ultraviolet radiation on the skin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 195, p. 298-308.
- McCARTY Jr., K. S.; SZABO, E.; FLOWERS, J. L.; COX, E. B.; LEIGHT, G. S.; 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 (Suppl. 8), p. 4244s-4248s.

- MEEK, D. W. 2004. The p53 response to DNA damage. *DNA Repair*, v.3, p.1049–56.
- 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 em: 08 novembro 2011.
- MIGUEL, N. C.; WAJSENZON, I. J.; TAKIYA, C. M.; de ANDRADE, L. R.; TORTELOTE, G. G.; EINICKER-LAMAS, M.; ALLODI, S. 2007. Catalase, Bax and p53 expression in the visual system of the crab *Ucides cordatus* following exposure to ultraviolet radiation. *Cell Tissue Res.*, v. 329, n. 1, p. 159-168.
- 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. 2002. Experimental effect of cold, La Nina temperatures on the survival of reef fishes from Gorgona Island (Eastern Pacific Ocean). *Mar. Biol.*, v. 141, n. 4, p. 789-793.
- NEGREIROS-FRANSOZO, M.L.; FRANSOZO, A. 1995. On the distribution of *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 and *Callinectes danae* Smith, 1869 (Brachyura, Portunidae) in the Fortaleza Bay, Ubatuba, Brazil. **Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre**. v.79, p.13-25.
- NERY, L.E.M.; de LAURO CASTRUCCI, A.M., 1997. Pigment cell signalling for physiological color change: a review. **Comp. Biochem. Physiol.** v.118A, p. 1135–1144.
- OREN, M.; DAMALAS, A.; GOTTLIEB, T.; MICHAEL, D.; TAPLICK, J.; LEAL, J. F.; MAYA, R.; MOAS, M.; SEGER, R.; TAYA, Y.; BEN-ZE'EV, A. 2002. Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. *Biochem. Pharmacol.*, v. 64, p. 865-871.
- 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: 15 novembro 2011.
- 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_report_wg2_report_impacts_adaptation_and_vulnerability.htm>. Acesso em: 29 janeiro 2012.
- PARSELL, D. A.; LINDQUIST, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Ann. Rev. Genet.*, v. 27, p. 437-496.
- PECK, L. S.; WEBB, K. E.; BAILEY, D. M. 2004. Extreme sensitivity of biological function to temperature in Antarctic marine species. *Funct. Ecol.*, v. 18, n. 5, p. 625-630.
- PECK, L. S.; CLARK, M. S.; MORLEY, S. A.; MASSEY, A.; ROSSETTI, H. 2009. Animal temperature limits and ecological relevance: effects of size, activity and rates of change. *Funct. Ecol.*, v. 23, p. 248–256.
- PERRY, S. F. 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.*, v. 59, n. 1, p. 325-347.
- 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.
- PLUQUET, O.; HAINAUT, P. 2001. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett.*, v. 174, n. 1, p. 1-15.
- PÖRTNER, H. 2001. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. *Naturwissenschaften*, v. 88, n. 4, p. 137-146.
- PUNZO, F.; ROSEN, L. 1984. Comparative temperature and water relations of *Tenebrio obscurus* larvae (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 77, p. 779-784.
- QUENNEVILLE, L. A.; TROTTER, M. J.; MAEDA, T.; TRON, V. A. 2002. p53 dependent regulation of heat shock protein 72. *Br. J. Dermatol.*, v. 146, n. 5, p. 786-791.
- 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, n. 3, p. 200–205.

- RIABOWOL, K. T.; MIZZEN, L. A.; WELCH, W. J. 1988. Heat shock is lethal to fibroblasts microinjected with antibodies against hsp70. *Science*, v. 242, p. 433-436.
- ROME, L. C. 1990. Influence of temperature on muscle recruitment and muscle function in vivo. *Am. J. Physiol.*, v. 259, p. R210-R222.
- 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.
- 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.
- SANDERS, B. M.; NGUYEN, J.; DOUGLASS, T. G.; MILLER, S. 1994. Heat-inducible proteins that react with antibodies to chaperonin60 are localized in the nucleus of a fish cell line. *Biochem. J.*, v. 297, n. Pt 1, p. 21.
- SCHIMDT-NIELSEN, K. 2002. Fisiologia animal – Adaptação e meio ambiente. 5ª ed. São Paulo: Santos Editora. 611p.
- SEEBACHER, F. 2009. Responses to temperature variation: integration of thermoregulation and metabolism in vertebrates. *J. Exp. Biol.*, v. 212, p. 2885-2891.
- SELVAKUMAR, S.; GERALDINE, P. 2005. Heat shock protein induction in the freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii*: Acclimation-influenced variations in the induction temperatures for Hsp70. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, v. 140, n. 2, p. 209-215.
- SHIPP, R. L.; HOPKINS, T. S. 1978. Physical and biological observations of the northern rim of the DeSoto Canyon made from a research submersible. *NE Gulf Sci.*, v. 2, n. 2, p. 113-121.
- 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, D. E.; SUTTERLIN, M. A. 1976. Heat transfer between fish and ambient water. *J. Exp. Biol.*, v.65, n.1, p. 131-145.
- SUMNER, F. B.; DOUDOROFF, P. 1938. Some experiments upon temperature acclimatization and respiratory metabolism in fishes. *Biol. Bull.*, v. 74, p. 403-429.

- SUSIN, S. A.; LORENZO, H. K.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; SNOW, B. E.; BROTHERS, G. M.; MANGION, J.; JACOTOT, E.; COSTANTINI, P.; LOEFFLER, M.; LAROCLETTE, N.; GOODLETT, D. R.; AEBERSOLD, R.; SIDEROVSKI, D. P.; PENNINGER, J. M.; KROEMER, G. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, v. 397, n. 6718, p. 441-446.
- SZYMAŃSKA, Z.; ZYLICZ, M. 2009. Mathematical modeling of heat shock protein synthesis in response to temperature change. *J. Theor. Biol.*, v. 259, n.3, p. 562–569.
- TANAKA, M. O. 2000. Distribuição especial e dispersão entre manchas da macrofauna associada à alga parda *Sargassum stenophyllum* (Mertens) Martius. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 88 p.
- WAHL, G. M.; CARR, A. M. 2001. The evolution of diverse biological responses to DNA damage: insights from yeast and p53. *Nat. Cell Biol.*, v. 3, p. E277-286.
- WAKELING, J. M.; COLE, N. J.; KEMP, K. M.; JOHNSTON, I. A. 2000. The biomechanics and evolutionary significance of thermal acclimation in the common carp *Cyprinus carpio*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 279, p. R657-R665.
- WATENPAUGH, D. E.; BEITINGER, T. L. 1985. Se exposure and temperature tolerance of fathead minnows, *Pimephales promelas*. *J. Ther. Biol.*, v. 10, n. 2, p. 83-86.
- WELLER, D. E.; ANDERSON, D.J.; DEANGELIS, D.L.; COUTANT, C. C. 1984. Rates of heat exchange in largemouth bass: experiment and model. *Physiol. Zool.*, v. 413-427.
- WHITFIELD, C. L.; LIVEZEY, R.L. 1973. Thermoregulatory patterns in lizards. **Physiol . Zool** . v.46, p. 285 - 296.
- YAMASHITA, M.; HIRAYOSHI, K.; NAGATA, K. 2004. Characterization of multiple members of the HSP70 family in platyfish culture cells: molecular evolution of stress protein HSP70 in vertebrates. *Gene*, v. 336, n. 2, p. 207-218.
- 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.