

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Ricelly Cristina Alcântara Monteiro

Efeitos do estresse térmico no comportamento e morfofisiologia muscular do
***Astyanax brevirostris* (Characidae)**

Diamantina
2018

Ricelly Cristina Alcântara Monteiro

**Efeitos do estresse térmico no comportamento e morfofisiologia muscular do
Astyanax brevirostris (Characidae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Alex Sander Dias Machado

**Diamantina
2018**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M775e

Monteiro, Riccelly Cristina Alcântara

Efeitos do estresse térmico no comportamento e morfofisiologia muscular do *Astyanax brevirostris* (Characidae) / Riccelly Cristina Alcântara Monteiro. – Diamantina, 2018.

79 p. : il.

Orientador: Alex Sander Dias Machado

Dissertação (Mestrado Profissional – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

1. Aquecimento. 2. Histopatologia. 3. Hsp70. 4. Temperatura. 5. Estresse oxidativo. I. Machado, Alex Sander Dias. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 597

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa, CRB6 – 3468/0.

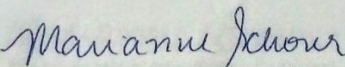
RICELLY CRISTINA ALCANTARA MONTEIRO

Efeitos do estresse térmico no comportamento e morfologia muscular do *Astyanax brevirostris* (Characidae)

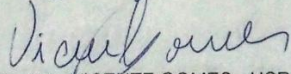
Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MAGISTER SCIENTIAE EM
BIOLOGIA ANIMAL

Orientador : Prof. Dr. Alex Sander Dias
Machado

Data da aprovação : 22/05/2018


Dr.ª MARIANNE SCHORER - UFVJM


Prof.Dr. ALEX SANDER DIAS MACHADO - UFVJM


Prof.Dr. VICENTE GOMES - USP

DIAMANTINA

Dedico este trabalho a Teca, minha Pérola (in memoriam) que me ensinou a ser forte e acreditar no meu potencial. A minha eterna gratidão por tudo que ainda representa em minha vida.

Te amo!

Agradecimentos

Uma pesquisa não é fruto do trabalho solitário, pelo contrário, é resultado da dedicação de várias pessoas. Por isto, aqui estão alguns agradecimentos àqueles que deram sua contribuição, maior ou menor, para que este objetivo fosse atingido.

Primeiramente agradeço meu orientador Alex, que me recebeu com todo carinho e confiança para começar essa longa empreitada no espinhaço. Um ser humano maravilhoso, de grande empatia, humildade e leveza ao ensinar. Obrigada pela paciência, incentivo e muitos ensinamentos. Como aprendi com você!

A Carol, minha companheira de mestrado e hoje grande amiga. Não imagino como seria essa jornada sem você, sem seus conselhos, experiências e sensatez. Crescemos juntas nesse período sem rivalidade ou competições. Compartilhamos sorrisos, alegrias, sonhos, e muito momentos de desespero. Obrigada por tudo e saiba que estarei aqui para o que você precisar.

A Ana Maiza pelas trocas compartilhadas em astrologia, meditação e ipês amarelos. A Fabi pelo companheirismo, principalmente nessa reta final.

Ao NEA que foi minha segunda casa durante esse tempo, obrigada a todos pela acolhida.

Ao programa Biologia Animal pela oportunidade.

Ao laboratório BIOEX em particular a Karine e Bruna, que estiveram sempre solícitas a nos ajudar.

Ao laboratório de aquicultura DZO por abrirem as portas para o nosso projeto, em especial o Prof. Marcelo e a Marianne por toda ajuda.

Ao ICMBio por abrir aquele paraíso para as nossas coletas, gratidão PNSV.

Ao Márcio, que nunca mediu esforços para esse projeto dar certo, muito obrigada pela ajuda essencial em campo.

A UFVJM pelo apoio financeiro.

A minha mãe, que sempre esteve do meu lado apoiando minhas decisões.

A Patrícia por acreditar em mim até quando eu mesmo não acreditava.

A Tia Julia, meu porto segura em Diamantina.

Ao meu amado Luiz, por todo companheirismo e confiança, Agradeço por está comigo a cada passo e sempre me apoiar.

“Às vezes eu penso que sai dos teus olhos o feixe de raio que controla a onda cerebral do peixe.” Lenine

“O mais importante e bonito, do mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas – mas que elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam.” Guimarães Rosa

RESUMO

Os peixes por serem ectodérmicos são um excelente modelo para estudar as estratégias dos organismos frente as alterações da temperatura. O objetivo do presente trabalho foi relacionar o aquecimento ambiental às respostas comportamentais, alterações morfofisiológicas e a ativação de mecanismos moleculares de termoestabilidade celular em *Astyanax brevirohinus*. Para isso os animais foram submetidos ao aumento gradual da temperatura (+2°C/h), a partir da temperatura ambiental (20°C) até 24°C, 28°C, 32°C. Após atingirem a temperatura de estudo os grupos experimentais foram mantidos por 2 horas nesta temperatura. Realizamos o experimento de Temperatura Crítica de Sobrevivência (TCS), onde os indivíduos foram expostos ao aumento de temperatura até o colapso fisiológico. Analisamos em relação ao aquecimento ambiental o comportamento, a morfologia e histopatologia do coração e músculo esquelético, a quantificação dos biomarcadores do estado redox e as expressões tecidual da proteína de estresse Hsp70 pela imuno-histoquímica. Os resultados mostraram que o *A. brevirohinus* apresentou comportamento agitado em relação ao aumento da temperatura até a temperatura de 33°C, quando passaram a ficar mais letárgicos. Os achados histopatológicos predominantes no músculo cardíaco e músculo esquelético relacionados ao aquecimento foram os infiltrados inflamatórios e necrose celular. No estudo do estado redox relacionado ao estresse térmico evidenciamos que o músculo cardíaco apresentou dano oxidativo, tanto na peroxidação lipídica como nos compostos carbonílicos resultantes de danos à proteínas. O músculo esquelético se manteve mais estável na produção de espécies reativas de oxigênio. A expressão da proteína Hsp70 aumentou com o aquecimento, contudo na TCS as Hsp70 também se desnaturaram. Concluímos que o aumento da temperatura causa danos morfológicos, fisiológicos e moleculares nos tecidos musculares, contudo mecanismos fisiológicos de termoestabilidade celular e tecidual são recrutados durante este processo e podem representar no *A. brevirohinus* possibilidades de adaptações orgânicas a novas temperaturas.

Palavras chave: Aquecimento. Histopatologia. Hsp70. Temperatura. Estresse oxidativo

ABSTRACT

Fishes being ectothermic are an excellent model for studying the strategies of organisms against temperature changes. The objective of the present study was to relate environmental heating to behavioral responses, morphophysiological changes and the activation of molecular mechanisms of cellular thermostability in *Astyanax brevirostris*. For this, the animals were submitted to a gradual increase in temperature (+ 2 ° C / h), from ambient temperature (20 ° C) to 24 ° C, 28 ° C, 32 ° C. After reaching the study temperature the experimental groups were maintained for 2 hours at this temperature. We performed the Survival Critical Temperature (TCS) experiment, where individuals were exposed to temperature increase until physiological collapse. We analyzed the behavior, morphology and histopathology of heart and skeletal muscle, quantification of redox biomarkers, and tissue expression of Hsp70 stress protein by immunohistochemistry. The results showed that *A. brevirostris* presented agitated behavior in relation to the increase of the temperature until the temperature of 33 ° C, when they became more lethargic. The predominant histopathological findings in heart muscle and skeletal muscle related to warming were inflammatory infiltrates and cell necrosis. In the study of the redox state related to thermal stress, we showed that the cardiac muscle presented oxidative damage, both in lipid peroxidation and in the carbonyl compounds resulting from protein damage. Skeletal muscle remained more stable in the production of reactive oxygen species. Expression of the Hsp70 protein increased with the heating, however in TCS the Hsp70 also denatured. We conclude that the increase in temperature causes morphological, physiological and molecular damages in the muscular tissues, but physiological mechanisms of cellular and tissue thermostability are recruited during this process and may represent in *A. brevirostris* possibilities of organic adaptations at new temperatures.

Key words: Heating. Histopathology. Hsp70. Temperature. Oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1- A) Imagem do ponto de coleta- Fazenda Gavião B) Imagem ampliada do ponto de coleta, mata ciliar do córrego dos Felipes. C) Poço de coleta. Fonte: Autor 32
- Figura 2- A) mapa de localização e acesso ao parque nacional das sempre vivas B) mapa hidrológico do parque nacional das sempre vivas, ponto vermelho no mapa identifica o local de coleta. (Fonte: plano de manejo PNSV).....32
- Figura 3- A) Coleta B-C) Seleção dos indivíduos. Fonte: Autor.....33
- Figura 4- Exemplar do *Astyanax brevhirinus* coletado no PNSV Fonte: Autor.....33
- Figura 5- Comprimento total (desvio padrão) dos peixes submetidos as diferentes temperaturas estudadas. 44
- Figura 6- Médias das pontuações dos critérios de comportamento: Equilíbrio, natação e batimento opercular; onde a nota 4 representa o comportamento normal e 0 a morte do indivíduos45
- Figura 7- Gráfico do grupo TCS em relação a temperatura individual dos peixes. 46.
- Figura 8- Macroscopia e microscopia do músculo esquelético de *A. brevhirinus*. [A] Dissecção do músculo axial. [B] macroscopia do músculo evidenciando as fibras vermelhas e brancas. Coloração HE. [C] Fotomicrografia do músculo em corte longitudinal com os núcleos periféricos. [D] Fotomicrografia em corte transversal, formato poliedro e multinúcleos periféricos (seta).....47
- Figura 9- macroscopia e microscopia do coração de *a. Brevirhinus*. [a] localização do coração após retirada das brânquias. [b] macroscopia do coração. Observa-se todas as estruturas cardíacas, seio venoso (sv), átrio (at), ventrículo (ve) e bulbo arterial (ba). Coloração de he: [c] histologia do coração evidenciando o ventrículo (ve), átrio (at) e

bulbo arterial (ba), aumento de 100x. [d] bulbo arterial constituído por tecido fibroelastico com armazenamento de lipídios (seta). [e] fibras musculares cardíacas dispostas em vários sentidos. [f] cardiomiócitos com os núcleos densos (nd) e núcleos alongados (na). [g] coloração picrosirius red evidenciando colágeno na lâmina basal do epicárdio e endocardio. [h] coração revestido pelo epicárdio (seta).....49

Figura 10- Histopatologia do músculo estriado *A. brevirhinus* com aumento de temperatura. Coloração de HE, aumento 1000x. [A] Controle ambiental, sem alterações no tecido. [B] Controle experimental, sem alterações no tecido. [C] Temp. 24°C. sem alterações no tecido. [D] Temp. 28°C. Infiltrado inflamatório mononuclear (IN). [E] Temp. 32°C. Presença de infiltrado inflamatório mononuclear (IN), granulócitos entre as fibras (GR) e melanóforos na superfície das fibras (ME). [F] TCS. Presença de melanóforos entre as fibras musculares (ME). [G] TCS. Infiltrado inflamatório (IN) e Colágeno eosinófilo (CO). [H] TCS. Fibras musculares com pontos de necrose.....51

Figura 11- Histopatologia do coração *A. brevirhinus* com aumento de temperatura. Coloração de HE, aumento 1000x. [A] Controle ambiental. Cardiomiócitos preservados. [B] Controle do experimento. Cardiomiócitos preservados. [C] Temp. 24°C. Cardiomiócitos preservados com presença de eritrócitos (ER). [D] Temp 28°C. Presença de infiltrados inflamatórios mononuclear (IN), eritrócitos(ER) e regiões sem núcleos centrais. [E] Temp 32°C. Presença de infiltrados inflamatórios polinuclear (PN) e mononuclear (MN). Granulócitos (GR). [F] TCS. Infiltrado inflamatório mononuclear no epicárdio e células com aspecto necrótico..... 53

Figura 12- Efeito do estresse térmico nas concentrações de TBARS no coração e músculo. Concentração de MDA em nmol/mg..... 54

Figura 13- : Efeito do estresse térmico nas concentrações de derivados carbonílicos em proteínas no coração e músculo. A concentração de derivados carbonílicos em proteínas em nmol/mg de proteína. 55

Figura 14-:Efeito do estresse térmico na capacidade antioxidante total pelo método FRAP no coração e músculo. Concentração de μM FeSO₄/mg de proteína 55

Figura 15- Fotomicrografias do músculo esquelético de *A. brevirhinus* submetidos a técnica de imuno-histoquímica para expressão da Hsp70 e contracoradas com Hematoxilina . [A] Controle negativo. [B] Controle ambiental. [C] Contole experimental. [D] Temperatura 28°C. [E] Temperatura de 32°C [F] TCS56

Figura 16- Fotomicrografias do músculo cardíaco de *A. brevirhinus* submetidos a técnica de imuno-histoquímica para expressão da Hsp70 e contracoradas com Hematoxilina . [A] Controle negativo. [B] Controle ambiental. [C] Contole experimental. [D] Temperatura 28°C. [E] Temperatura de 32°C [F] TCS 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Critérios de comportamento. A escala de 4 a 0 foi atribuída de acordo com o comportamento dos peixes com o aumento da temperatura.....	35
Tabela 2- Classificações das fases comportamentais.....	36
Tabela 3- Valores da porcentagem da saturação de oxigênio dissolvido e ph nos grupos experimentais (t24°, t28°, t32° e tcs) e controle (c24°, c28°, c32° e tcs).....	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	29
2.1 Objetivos gerais.	29
2.2 Objetivo específicos.	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Local de estudo	31
3.2 Captura e manutenção dos peixes.....	32
3.2.1 Ambiente	32
3.2.2 Experimento em laboratório.....	34
3.2.3 Temperatura crítica sobrevivência (TCS).....	34
3.2.4 Análise comportamental	35
3.2.5 Parâmetros químicos e físicos da água.....	36
3.3 Análises histológicas.....	36
3.3.1 Preparação dos blocos para microscopia.....	36
3.3.2 Picrosirius red.	37
3.4 Análise dos parâmetros redox.....	37
3.4.1 Preparo das amostras.....	38
3.4.2 Análise da peroxidação lipídica.	38
3.4.3 Derivados carbonílicos em proteínas.....	39
3.4.4 Atividade da enzima CAT.....	40
3.4.5 Atividade da enzima SOD.....	40
3.4.6 Capacidade antioxidante não enzimática.....	40
3.4.7 Dosagem de proteínas.	41
3.5 Imuno-histoquímica.....	41
3.6 Análises estatísticas.....	42
4 RESULTADOS	43
4.1 Parâmetros físicos-químicos da água	43
4.2 Tamanho.	43

4.3 Análises comportamentais.....	44
4.4 Temperatura crítica de sobrevivência (TCS).....	45
4.5 Análise tecidual.	46
4.5.1 <i>Músculo esquelético</i>	46
4.5.2 <i>Músculo cardíaco</i>	48.
4.6 Histopatologia.....	50
4.6.1 <i>Músculo esquelético</i>	50
4.6.2 <i>Músculo cardíaco</i>	52
4.7 Parâmetros redox	54
4.8 Imuno-histoquímica.....	55
4.8.1 <i>Músculo esquelético</i>	55
4.8.2 <i>Músculo cardíaco</i>	66
5 DISCUSSÃO.	59
5.1 Comportamento.	59
5.2 Histologia e histopatologia.	60
5.2.1 <i>Músculo esquelético</i>	60
5.2.2 <i>Músculo cardíaco</i>	62
5.3 Parâmetros redox	63
5.4 Imuno-histoquímica.....	65
6 CONCLUSÕES.....	67
7 REFÊRENCIAS.....	69

1. INTRODUÇÃO:

A problemática das mudanças climáticas é um dos maiores desafios socioeconômicos e científicos que a humanidade terá que enfrentar ao longo deste século (Medeiros et al., 2012). As emissões de CO₂ possui uma grande efetividade no aumento das temperaturas da superfície terrestre e esse aumento pode provocar danos irreversíveis ao clima (Marego e Valverde 2007).

De acordo com o relatório “Intergovernmental Panel on Climate Change” (IPCC-2014) se essas emissões continuarem em tendência atuais até 2100 a temperatura do planeta pode aumentar até 4,8°C. Em relação a temperatura da água tenderá a aumentar de 1°C a 8°C nos próximos 200 anos.

A temperatura é um fator abiótico de grande relevância, afetando diretamente o comportamento e a sobrevivência dos organismos (Sartorio, 2013). O aumento da temperatura pode provocar mudanças no tempo de reprodução, bem como mudanças no sucesso reprodutivo, recrutamento, crescimento, mortalidade de espécies e sua distribuição geográfica (Pörtner, 2002). Além disso, as alterações na temperatura podem comprometer a velocidade das reações, o estado conformacional das macromoléculas e a estabilidade das proteínas (Alexandrov e Bernstam 1977).

Para compreender a resposta dos animais frente a essas variações ambientais, estudos ecofisiológicos abordam as estratégias de sobrevivência dos organismos, suas tolerâncias a variações físico-químicas e suas adaptações ao meio (Gutierre, 2011). Os peixes são um excelente modelo para estudar os efeitos celulares da temperatura, pois eles são ectodérmicos e respondem mais prontamente as essas variações, com isso podem sofrer estresse térmico e prejudicar suas funções fisiológicas (Cardoso, 2015).

As alterações fisiológicas nos peixes devido a temperatura afetam seu comportamento. Em altas temperaturas os peixes tendem a exibir repetição de ações a medida que se aproximam do colapso fisiológico, sendo elas; o início de espasmos musculares (Matthews e Maness, 1979), perda do equilíbrio no nado (Watenpaugh et al., 1975), perda dos batimentos operculares (Bettoli et al., 1985) e perda de resposta ao estímulo tátil (Heath et al., 1994).

Esses colapsos fisiológicos não acontecem na mesma temperatura para todos os peixes (Beitinger et al., 2000). Assim, existem dois métodos experimentais utilizados para determinar a tolerância térmica, o método estático ou Fry e o método dinâmico (Mora &

Maia, 2006). No método estático os peixes são expostos subitamente a uma temperatura constante superior ou inferior aos limites da espécie, posteriormente, são analisados a relação entre o tempo de exposição, a temperatura e a morte para 50% dos indivíduos, sendo denominada temperatura letal incipiente (Fry, 1947)

No método dinâmico, utilizado nesse trabalho, os peixes são aclimatados a temperatura do ambiente e depois expostos ao aumento ou diminuição progressivo da temperatura até chegar no momento subletal (Cardoso, 2015). O ponto final (*endpoint*) é estabelecido quando a locomoção se torna desorganizada e o peixe perde a capacidade de escapar de condições que podem levar a sua morte. São denominadas temperatura crítica máxima (CTMax- *critical thermal maximum*) e temperatura crítica mínima (CTMin- *critical thermal minimum*) (Beitinger et al., 2000). Em metodologias onde a mudança de temperatura é lenta o *endpoint* utilizado no experimento é o letal (Fields et al., 1987).

Com o aumento da temperatura alterações morfológicas são observadas e podem determinar as respostas biológicas a esse estresse. A histopatologia gera dados sobre lesões em níveis teciduais e quando associados a outros métodos de análise auxiliam na compreensão de determinadas modificações do tecido (Lins et al., 2007).

Além das alterações morfológicas o aumento da temperatura causa um maior consumo do oxigênio, limitando a tolerância térmica dos animais aquáticos. A diminuição das taxas de oxigênio tecidual produz em excesso os radicais livres provocando o estresse oxidativo no organismo (Pörtner, 2002).

Os radicais livres são definidos como qualquer átomo, molécula ou fragmento molecular contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (Pereira, 1996). Radicais livres, assim como outras moléculas derivadas do oxigênio são coletivamente denominadas de espécies reativas de oxigênio (EROs, do inglês ROS). As principais espécies reativas radicalares centradas no oxigênio são o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}), os não radicalares são representados pelo oxigênio singlete ($^1O_2^*$) e pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Costa, 2017).

As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em processos de sinalização e ativação de receptores celulares e na expressão gênica (Valko et al., 2004), porém quando há produção exacerbada dessas moléculas podem gerar dano celular e até a morte da célula. A maior produção de EROs provoca o desequilíbrio redox, onde há um excesso de oxidantes em relação aos antioxidantes (Sies e Jones, 2006). Existem moléculas que

funcionam como biomarcadores desse desequilíbrio, nesse estudo utilizaremos a TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) e a formação de derivados carbonílicos em proteínas.

O TBARS indica o dano oxidativo aos lipídios. Para mensurar a peroxidação lipídica usa-se o composto malondialdeído (MDA) que é o produto de degradação em reação com o ácido tiobarbitúrico, assim detectam as suas substâncias reativas (Ohkawa et al., 1979). Outro marcador de desequilíbrio redox é a formação de derivados carbonílicos em proteínas que indica o dano oxidativo da proteína. Com a oxidação dos aminoácidos há a produção de compostos carbonilados que são um marcador de inativação proteica (Filippin et al., 2008). Essa inativação leva a degradação proteossômica, contudo o próprio proteossoma pode ser alvo da inativação oxidativa, o que limita a capacidade das células processarem proteínas com derivados carbonílicos (Wu et al., 2009).

Um mecanismo de defesa para as espécies reativas de oxigênio são os componentes antioxidantes. Essas substâncias podem atrasar, prevenir ou remover o dano oxidativo mantendo a integridade celular e o bom funcionamento do organismo (Halliwell e Gutteridge, 2007). Existem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos e ambos são encontrados nos meios intra e extracelulares (Powers e Jackson, 2008).

A superóxido dismutase (SOD) é um antioxidante enzimático que catalisa a dismutação do superóxido em uma espécie menos reativa, o peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (Costa, 2017). Existem três isoformas do SOD que diferem pela ligação do metal ao seu sítio ativo, SOD1 e SOD3 ligando-se no cobre e zinco e a SOD2 ligando-se ao manganês. E pela sua localização celular; SOD1 encontrado no citoplasma, espaço intermembranas da mitocôndria e lisossomos, SOD2 presente na matriz mitocondrial e o SOD3 encontrado nos fluidos extracelulares como plasma, linfa e líquido sinovial (Powers e Jackson, 2008).

Outro antioxidante enzimático é a catalase (CAT) que tem função de converter o peróxido de hidrogênio em água e O₂ (Barreiros e David, 2006). Para a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular a enzima utiliza o Fe³ ligado ao grupamento heme da catalase, essa enzima está localizada nos peroxissomos, mitocôndria e núcleo.

O método não enzimático utilizado para medir a capacidade antioxidante total do tecido é o FRAP (*Ferric Reducing Antioxdant Power*) que consiste em determinar a

capacidade da redução no ferro pelo antioxidantes não enzimáticos presentes no tecido (Benzie e Strain, 1996).

Na sequência de eventos fisiológicos ao estresse térmico pode-se afirmar a desnaturação e perda das funções proteicas (Pörtner, 2001). Dessa maneira mecanismos de proteção são ativados para manter a homeostase corporal e garantir o equilíbrio de suas funções quando sofrem o aumento de temperatura (Maraschi, 2012). Uma resposta de proteção celular ao estresse térmico é a ativação das proteínas de choque térmico (Hsp-Heat Shock Proteins) (Lindquist e Graig, 1988). Conhecidas como chaperonas moleculares, são proteínas capazes de interagir com o enovelamento de outras proteínas, prevenindo interações errôneas, má formação e desdobramentos proteicos (Cagliari, 2009). É necessário destacar que nem todas Hsps agem como chaperonas (Ellis e Hartl, 1999).

As HSPs se encontram em todos os organismos, desde as bactérias até os mais complexos como o homem. Em células não estressadas elas auxiliam na montagem de polissacarídeos, dobramento proteico (Geething e Sambrook, 1992), na translocação de proteínas (Chirico et al, 1988) e na degradação das proteínas deformadas (Lindquist e Craig, 1988). Quando o organismo é exposto a um estressor, a síntese de Hsp aumenta e esse aumento fornece a célula uma proteção adicional importante na restauração da forma nativa da proteína (Benavides, 2013). Assim que o sinal de estresse é removido, as proteínas deixam de ser geradas em resposta ao choque térmico e são rapidamente diminuídas. Essa diminuição é importante para reduzir os custos energéticos da síntese de Hsp (Currie et al., 2011).

As HSPs são agrupadas de acordo com suas sequências de aminoácidos e com seus pesos moleculares em kilodantons (KDa) (Fuller et al, 1994). A mais estudada é a Hsp70, que está comumente associada ao início e duração da tolerância à temperatura. A Hsp70 em condições estressantes ajudam as proteínas deformadas a atingir ou recuperar os seus estados nativos (Fink et al., 1999). A regulação à resposta ao choque térmico acontece mediada pela transcrição de uma família de fatores de choque térmico (HSF) (Currie et al., 2011). As HSF quando ativados se ligam ao DNA em uma região específica que reconhece o fator de transcrição HSE (Elemento de choque térmico) e que induz a produção de Hsp70 (Abravaya et al., 1991).

Os peixes oferecem um excelente modelo para investigar a ação das Hsp70. As taxas de sobrevivência e a manutenção da saúde do peixe estão diretamente relacionadas com

a exposição a estressores ambientais e o aumento dessa proteína (Basu et al., 2002). O estudo dos mecanismos dessa proteína e como agem nos organismos ectodérmicos é de grande relevância para entender como podem sobreviver a uma faixa mais ampla de temperatura (Hofmann e Todgham. 2010).

O presente trabalho objetivou compreender os efeitos do aquecimento no organismo da espécie *Astyanax brevirostris* (Eigenmann, 1908) pertencente à família Characidae. Essa família possui elevado número de espécies e ampla distribuição geográfica na região neotropical (Baumgartener et al. 2012). O gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) abrange os peixes conhecidos popularmente como piaba ou lambari, sendo o gênero dominante em toda América do Sul. No Brasil cerca de 100 espécies estão amplamente distribuídas nas bacias hidrográficas, tal distribuição desse gênero tem provavelmente uma grande importância ecológica e revela enorme plasticidade adaptativa (Silva, 2008).

O *Astyanax brevirostris* possui uma distribuição restrita ao Rio Jequitinhonha. São animais bentopelágicos, suas características morfológicas são: perfil dorsal e ventral igualmente arqueados, raios caudais médios hialino e apresentam uma mancha umeral escura e seus exemplares possuem tamanho reduzido (Eigenmann, 1908). Pouco se sabe sobre a ecologia, alimentação e reprodução dessa espécie. O *Astyanax brevirostris* foi utilizado neste trabalho por ser abundante no local de coleta e por se adaptarem rapidamente as alterações ambientais sendo resistentes aos experimentos.

Os resultados desse estudo contribuirão para entendermos melhor como a temperatura afeta o comportamento e a morfofisiologia dos peixes e compreender os possíveis efeitos do aquecimento ambiental na espécie *Astyanax brevirostris* além de investigarmos como alguns mecanismos de reparo celular podem contribuir para sua plasticidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Relacionar o aquecimento ambiental às respostas comportamentais, alterações morfofisiológicas e a ativação de mecanismo moleculares de termoestabilidade celular em *Astyanax brevirostris*.

2.2 Objetivos específicos:

- Descrição da arquitetura tecidual do músculo cardíaco e músculo esquelético da espécie *Astyanax brevirostris*;
- Avaliar possíveis alterações comportamentais e parâmetros fisiológicos, provocadas pela exposição experimental ao aumento gradual da temperatura ambiental, a partir da observação e registro do comportamento;
- Avaliar as histopatologias do músculo cardíaco e músculo esquelético após a exposição experimental ao aumento gradual da temperatura;
- Avaliar os parâmetros do estado redox, como o dano oxidativo a lipídios e proteínas, a atividades enzimáticas e a capacidade antioxidante total após a exposição experimental ao aumento gradual da temperatura ambiental;
- Realizar a imunolocalização das proteínas hsp70 e analisar qualitativamente a expressão, correlacionando-a ao aumento gradual da temperatura ambiental.

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1 Local de estudo:

O Parque Nacional das Sempre-Vivas (PNSV) está localizado na região da Serra do Espinhaço Meridional, uma região de importância biológica com grande biodiversidade, alto grau de endemismo e a existência de grandes áreas naturais conservadas. Sendo uma região de drenagens dos rios São Francisco, Doce, Jequitinhonha e Araçuaí, confirmando seu caráter de teto orográfico regional. O território da unidade de conservação protege mais de 600 nascentes e todos os cursos d'águas dos córregos do interior do parque descem para o entorno, não havendo o fluxo ao contrário (ICMBio, 2016).

O PNSV possui seus limites inseridos integralmente no estado de Minas Gerais, nos municípios de Buenópolis, Olhos D'Água, Bocaiúva e Diamantina, com uma área aproximada de 124.156 hectares. O principal acesso à Unidade de Conservação se dá pelo município de Diamantina que dista 280 km Belo Horizonte. Sua altitude está entre 1.100 e 1.250 metros, existem cerca de 20 picos com altitude acima de 1.400 metros como, por exemplo, a Serra do Galho com 1.525 metros, ao sul da UC, sendo seu ponto mais alto. O clima da região é classificado como mesotérmico, com verões brandos e úmidos e invernos mais frescos e secos. A temperatura média da região é 18,79 °C e precipitação média anual de 112,64 mm. A estação chuvosa é entre os meses de novembro até março, sendo os meses de maior precipitação dezembro e janeiro com médias de 237 mm e 231 mm. Nos meses de junho a setembro é a estação seca com o índice de precipitação de 125 mm e 113 mm nos meses de agosto e setembro.

De acordo com o Plano de Manejo da Unidade por definição a vegetação é de campo rupestre *latu sensu*. O complexo de fitofisionomias que caracteriza os campos rupestres inclui formações campestres, savânicas e florestais, determinadas pelas variações do ambiente. Nos campos rupestres da região do Espinhaço, predominam fitofisionomias campestres associadas a solos originados da intemperização de rochas com alto teor de quartzo. Em meio a estes campos há uma grande diversidade de fitofisionomias determinadas pela complexidade da paisagem.

Os peixes foram capturados na cabeceira do rio Inhaí, afluente do rio Jequitinhonha, na parte leste do parque. O ponto de coleta está localizado dentro da Fazenda Gavião (17°54'32.22"S – 43°42'33.26"), conhecido como córrego dos Felipes (FIG. 1A-C). O acesso se dá pela comunidade de Macacos e fica no extremo sul do parque (FIG 2A-B).



Figura 1: A) Imagem do ponto de coleta- Fazenda Gavião B) Imagem ampliada do ponto de coleta, mata ciliar do córrego dos Felipes. C) Poço de coleta. Fonte: Autor

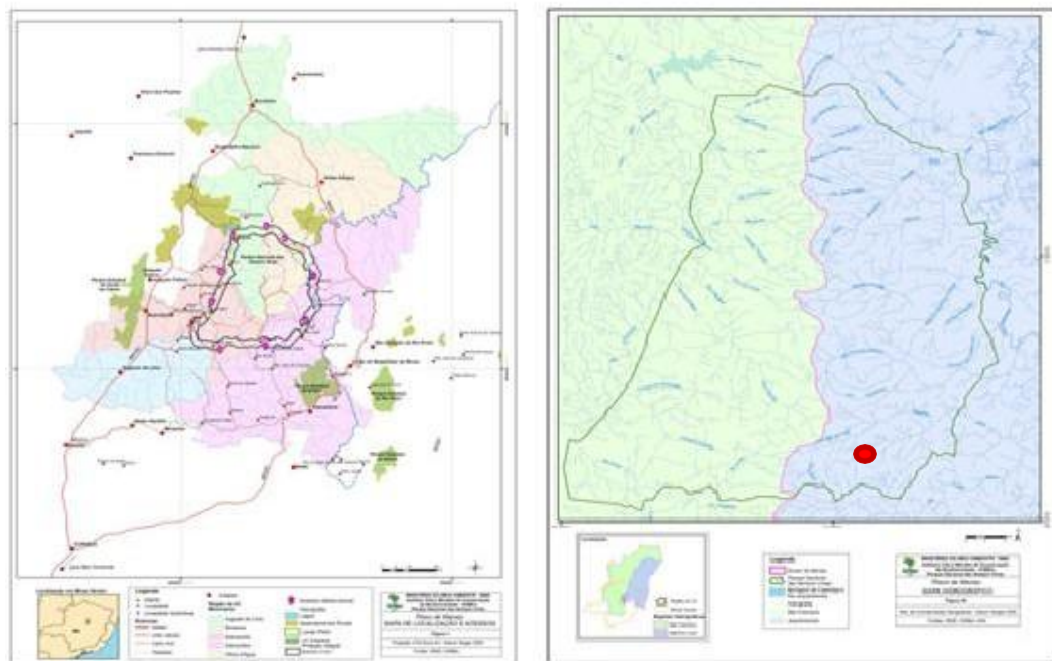


Figura 2: A) mapa de localização e acesso ao parque nacional das sempre vivas B) mapa hidrológico do parque nacional das sempre vivas, ponto vermelho no mapa identifica o local de coleta. (Fonte: plano de manejo PNSV)

3.2 Captura e manutenção dos peixes:

3.2.1 Ambiente:

Os peixes foram coletados com auxílio de uma rede de arrasto do tipo “Picaré”, com malha de 10 mm, medindo 3 x 1,5 metros (largura x altura), de uso manual (FIG 3A-C). Os indivíduos amostrados, foram selecionados de acordo com o tamanho (40 a 60 mm) (FIG 4) e em seguida, os indivíduos foram eutanasiados, dissecando imediatamente o coração e o músculo lateral (sistema axial). O material coletado foi acondicionado em

cassetes, fixado em paraformaldeído 4 % tamponado por 12 horas, e em seguida, submerso em tampão fosfato 0,2M (Licença SISBIO: 26291-2).



Figura 3: A) Coleta B-C) Seleção dos indivíduos. Fonte: Autor



Figura 4: Exemplar do *Astyanax brevirohinus* coletado no PNSV. Fonte: Autor

3.2.2 Experimento em laboratório:

O presente projeto teve parecer aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFVJM n. 58/2016B). Os experimentos em laboratório ocorreram no dia 12/01/2018, estação chuvosa. Os +/- 100 animais da espécie *Astyanax brevirohinus* utilizados no experimento foram coletados com auxílio de redes de arrasto, acondicionados em tanques com aeração, contendo a água do rio em que eles foram coletados com intuito de manter as características fisiológicas e foram transportados até o Laboratório de Aquicultura DZO – UFVJM.

Em laboratório, para minimizar o estresse ocasionado pela captura, os peixes permaneceram no período de 5 dias em repouso em um tanque de 500 litros com aeração e temperatura igual ao local de coleta, para que o histórico térmico dos mesmos não fosse alterado. Durante este período, eles foram alimentados diariamente com ração comercial.

Decorrido o período de cinco dias de descanso os indivíduos foram separados aleatoriamente em 6 grupos de 13 indivíduos e foram distribuídos em 6 aquários de 45 litros onde permaneceram 24 horas para minimizar o estresse decorrente a manipulação

e troca do ambiente. A temperatura dos aquários foi mantida a 20°C, temperatura ambiental no momento da captura.

Cada aquário foi equipado com um aerador de superfície e um aquecedor de 300W no qual estava previamente calibrado para a temperatura específica de cada aquário.

As temperaturas finais estabelecidas para cada aquário foram respectivamente; Grupo I - 24°C, Grupo II - 28°C, Grupo III - 32°C. Após atingir a temperatura final os aquários permaneceram com temperatura constante por 2 horas. Após a conclusão do experimento de cada aquário, os peixes foram capturados, eutanasiados e os tecidos foram dissecados acondicionados em cassetes, fixados em paraformaldeído 4% tamponado por 24 horas e em seguida, submersos em tampão fosfato 0,2 M. Foram utilizados para análises histológicas tecidos de 3 indivíduos. Para avaliação dos marcadores de estresse oxidativo foram utilizados os tecidos de 10 indivíduos fixados em nitrogênio.

Para cada aquário teste do experimento foi mantido um grupo controle que permaneceu em temperatura ambiental de 20°C. O mesmo número de indivíduos foram coletados e eutanasiados simultaneamente a cada grupo experimental correspondente.

3.2.3 Temperatura crítica de sobrevivência (TCS)

Para determinar a tolerância térmica da espécie em estudo, foram realizados experimentos complementares. As etapas iniciais de captura e manutenção dos animais foram semelhantes às descritas na seção 3.2.2: os peixes amostrados foram mantidos durante 5 dias em um tanque de 500 litros, onde receberam alimentação. Após esse período, 13 peixes foram selecionados aleatoriamente e colocados no aquário de 45 litros, com aeração e um aquecedor de 300w. Outro aquário com 13 peixes foi mantido como grupo controle, permanecendo na temperatura ambiental de 20°C.

Após o período de repouso de 24 horas, a temperatura do aquário foi aferida com o auxílio de um termômetro de mercúrio. Logo depois o aquecedor foi ligado por tempo indeterminado. A temperatura a qual os peixes apresentaram parada de movimento opercular foi denominada temperatura crítica de sobrevivência (TCS). Quando o primeiro peixe apresentou comportamento de estresse térmico máximo, a temperatura da água foi aferida e anotada e o peixe coletado. O mesmo foi feito com todos os peixes do aquário TCS (Cowles e Bogert 1944). Foram coletados também indivíduos do grupo controle, eutanasiados e dissecados simultaneamente ao grupo TCS. Os tecidos musculares cardíacos e esqueléticos de 10 indivíduos foram fixados em nitrogênio líquido e

armazenados em freezer -80°C para análises do estresse oxidativo. 3 indivíduos foram acondicionados em cassetes, fixados em paraformaldeído 4% tamponado por 24 horas e em seguida, submersos em tampão fosfato 0,2 M até posterior inclusão em parafina.

3.2.4 Análise comportamental:

Para as análises comportamentais dos peixes foram observados os experimentos anteriormente descritos. No experimento do aumento gradual ao atingirem a temperatura máxima de cada aquário (Controle 20°C , 24°C , 28°C , 32°C) Os peixes permaneceram nesta constante por 2 horas, assim os foram filmados em todo esse período. Os indivíduos do grupo controle também foram monitorados.

No experimento TCS foi realizada uma filmagem com duração de 20 min. ao início do experimento. A partir da temperatura de 34°C a filmagem foi contínua até o óbito de todos os animais.

A partir das análises dos vídeos o comportamento dos grupos de cada aquário foi avaliado considerando os seguintes critérios; equilíbrio, natação, batimento opercular e morte. Para quantificar esses critérios foi feita uma escala de 4 a 0, onde o 4 é caracterizado pelo comportamento normal e 0 indica a morte do indivíduo (Tabela 1).

Tabela 1: Critérios de comportamento. A escala de 4 a 0 foi atribuída de acordo com o comportamento dos peixes com o aumento da temperatura.

Pontos	Equilíbrio	Natação	Batimento Opercular
4	Normal	Normal	Normal
3	Distúrbio leve	Acelerado	Acelerado
2	Desequilíbrio horizontal ou lateral	Muito acelerada	Muito acelerado
1	Decúbito lateral	Lenta com espasmos	Lento
0	Morte	Morte	Morte

No experimento de TCS quando os peixes atingiram a temperatura subletal começaram a apresentar comportamentos de colapso fisiológicos foi utilizado outro tipo de critério, onde as médias de pontuação foram separadas em fases de acordo com o

estudo de Cocking (1959), cada fase descreve as características comportamentais (Tabela 2).

Tabela 2: Classificações das fases comportamentais. Adaptada de Cocking (1959).

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

3.2.5 Parâmetros químicos e físicos da água:

O oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C) e pH da água foram aferidos com auxílio de um multiparâmetro (HI9828; Hanna Instruments® Michigan, USA). Os valores foram aferidos nas coleta ambiental. Nos experimentos em laboratório, os parâmetros foram estimados antes e após cada experimento.

3.3 Análises histológicas:

3.3.1 Preparação dos blocos para microscopia:

Após a eutanásia o coração inteiro e fragmentos do músculo esquelético de 5mm x 5mm foram coletados fixados em paraformaldeído 4% por 12 horas e em seguida no tampão fosfato 0,2 M. Os músculos cardíaco e esquelético foram desidratados em banhos de soluções crescentes de etanol em água destilada (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% e

100% I e II de etanol). Após a desidratação, os tecidos foram diafanizados em xilol, solvente orgânico que deixa o tecido translúcido. Em seguida, os tecidos foram incluídos em parafina *overnight*. No dia seguinte, foram confeccionados blocos do mesmo material com dimensões de 3cm x 4cm, contendo os fragmentos de tecidos.

Para a preparação das lâminas, blocos de tecidos musculares cardíacos e esqueléticos foram cortados em micrótomo, com espessura de 5 µm. Os cortes foram colocados em banho-maria contendo água destilada a temperatura de 40°C e em seguida, aderidos a lâminas previamente identificadas. As lâminas com os cortes foram levadas na posição horizontal para a estufa a 60°C, por 2 horas, para secagem, aderência dos tecidos à lâmina e desparafinização. Para garantir a desparafinização completa, as lâminas foram colocadas em xilol. Em seguida, os cortes foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%), seguida de um banho em água destilada. Após este processo, as lâminas foram submersas em hematoxilina, por 20 segundos, lavadas em água corrente e submersas em Eosina por 55 segundos.

Após coloração, foi realizado o processo de montagem, onde as lamínulas foram aderidas as lâminas com algumas gotas de *Permount*®. As lâminas foram colocadas na posição horizontal, onde permaneceram à temperatura ambiente por 72 horas, até secarem. As lâminas foram fotomicrografadas em microscópio (Labomed, Lx400p).

3.3.2 *Picrosirius red*:

Para diferenciar as fibras colágenas que compõem os tecidos conjuntivos foi utilizada a coloração de picrosirius red. O procedimento inicial da coloração foi semelhante ao descrito para a coloração de HE, porém, após a reidratação dos cortes as lâminas foram submersas em picrosirius red e levadas no período de 20 minutos à estufa a uma temperatura de 60°C. Em seguida ao processo de coloração foi realizada a montagem das lâminas para análise microscópica.

3.4 Análise dos parâmetros redox:

Para determinar se o experimento com diferentes temperaturas alterou o estado redox do tecidos analisados as amostras foram divididas da seguinte forma; T1 (animais coletados no ambiente), T2 (grupo controle do experimento, temperatura de 20°C), T3 (aquário 24°C), T4 (aquário 28°C), T5 (aquário 32°C) e o T6 (aquário Temperatura crítica

de sobrevivência -TCS). Os tecidos foram armazenados no freezer -80°C até o dia da análise redox.

Os parâmetros de estado redox avaliados foram os seguintes: 1. Dano oxidativo a lipídeos, pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); 2. dano oxidativo a proteínas, pela mensuração do conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas; 3. atividade da catalase; 4. atividade da superóxido dismutase e 5. capacidade antioxidante total, determinada pelo poder de redução do ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*). Um mesmo avaliador conduziu uma determinada análise em todos os tempos, para minimizar variações interavaliador.

3.4.1 Preparo das amostras:

As amostras do músculo cardíaco foram divididas em dois grupos de cinco tecidos devido ao pequeno tamanho do coração. As amostras do músculo esquelético divididas em três grupos com três tecidos. Os tecidos foram macerados em um macerador de tecidos Potter-Elvehjem (Corning) mantido no gelo, em PBS (pH 7,34) gelado. Logo após foram divididos em duas alíquotas. A primeira alíquota foi centrifugada (Thermo Electron. Led GMBH D37520, Alemanha) a 5000 g, por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante foi destinado à mensuração TBARS e à capacidade antioxidante não enzimática. O sedimento foi utilizado para a mensuração do conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas. A segunda alíquota foi centrifugada a 10000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi utilizado para a medida da atividade das enzimas SOD e CAT, como parâmetro da capacidade antioxidante enzimática. As alíquotas para cada ensaio foram mantidas no gelo enquanto aguardavam dosagem.

3.4.2 Análise da peroxidação lipídica:

A reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica, foi utilizada para determinar a concentração de TBARS, de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.*, (1979). Alíquotas do homogenato (0,230 mL) foram adicionadas a 0,250 mL de ácido acético (pH 3,4), 0,1 mL de duadecil sulfato de sódio (8,1%) e 0,25 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Essa mistura foi homogeneizada e aquecida a 95 °C durante 90 minutos. Decorrido esse período, as amostras foram resfriadas e centrifugadas durante 5 minutos, a 5000 g (Thermo Electron. Led GMBH D37520, Alemanha) e 0,25 mL do sobrenadante foi transferido para placa de

96 poços de fundo chato. Na sequência, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 532 nm em leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA). A concentração de TBARS nas amostras foi determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de MDA (1,1,3,3 – tetrametoxipropano - Sigma, EUA) e expressa em nmol MDA/mg proteína. As medidas foram realizadas em duplicata.

3.4.3 Derivados carbonílicos em proteínas:

A determinação da concentração de derivados carbonílicos em proteínas nos tecidos foi realizada conforme metodologia por Levine *et al.*, (1994). O sedimento do homogenato de cada um dos tecidos foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,7, contendo 1 mM de ácido etilenodiamino-tetra-acético (EDTA). Em seguida, cada amostra foi homogeneizada e dividida em branco e teste. Foi adicionado ácido tricloroacético 10% a todas as amostras que, então, foram centrifugadas a 5000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. Adicionou-se, ao sedimento do teste 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH 10 mM) (Sigma-Aldrich®, EUA) diluído em ácido clorídrico 2mM. Ao branco foi adicionado apenas HCl 2 mM. As amostras foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos e homogeneizadas com o vórtex a cada 15 minutos. Após esse período foi adicionado ácido tricloroacético 10% às amostras, que foram homogeneizadas e centrifugadas a 5000 g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimentado lavado em 1 mL de etanol e acetato de etila (1:1) e centrifugado a 5000 g, por 10 min e a 4°C, por duas vezes. Por fim o sedimentado foi dissolvido em SDS 6% e centrifugado a 10000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi avaliado espectrofotometricamente a 370 nm, em placa de 96 poços, em leitor de microplacas, em triplicata. A concentração de derivados carbonílicos em proteínas foi determinada utilizando a equação de Lambert Berr: $A=c.b.\epsilon$. Onde A é a diferença entre a absorvância do teste e do branco, c é a concentração, b é o caminho óptico e ϵ é o coeficiente de extinção molar. O coeficiente de extinção molar para o DNPH a 370 nm é 22000 M-1cm-1 e o caminho óptico nesse ensaio foi de 0,73 cm. O conteúdo de derivados carbonílicos em proteínas foi expresso como nmol de derivados carbonílicos por mg de proteína (nmol/mg prot.).

3.4.4 Atividade da enzima CAT:

A atividade da CAT foi determinada pelo decaimento da absorvância do peróxido de hidrogênio a 240nm, de acordo com o método descrito por Nelson e Kiesow (1972). As amostras foram adicionadas a uma solução de peróxido de hidrogênio a 0,03 M (Sigma, EUA). A reação de decomposição do peróxido de hidrogênio foi acompanhada durante 1 minuto, a 25°C, espectrofotometricamente, a 240 nm (Double beam spectrophotometer visible UV, CE-Libra S22, Faotuo) em cubetas de quartzo. A atividade da catalase foi expressa em milimolar de H₂O₂ decomposto por minuto por miligrama de proteína ($\Delta E/\text{min}/\text{mg prot.}$). As medidas foram realizadas em triplicata.

3.4.5 Atividade da enzima SOD:

A determinação da atividade da enzima SOD foi determinada pela inibição da autoxidação do pirogalol, de acordo com Maklund e Maklund (1974). As amostras de cada tecido foram adicionadas a tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 8.2, 37 °C) contendo 1 mM de ácido dietilenotriaminopenta-acético (Sigma, EUA) e a reação foi iniciada por adição de pirogalol (1,2,3-benzenotriol, Sigma, EUA) a 0,2 mM. A reação foi determinada espectrofotometricamente em leitor de microplacas a 420 nm, 37°C, durante 4 minutos. A atividade da SOD foi expressa em U/mg proteína, onde uma unidade de enzima é a quantidade que causa inibição da autoxidação do pirogalol em 50%. As medidas foram realizadas em duplicata.

3.4.6 Capacidade antioxidante não enzimática:

A capacidade antioxidante não enzimática das amostras foi determinada pelo método FRAP, de acordo com Benzie e Strain (1996). A capacidade de redução do complexo da forma Fe³⁺-ferri-tripiridiltriazina (TPTZ) para a forma Fe²⁺-TPTZ pelos antioxidantes não enzimáticos do homogenato, em pH ácido, vai determinar o poder antioxidante da amostra. Para a confecção do reagente FRAP, 25 mL de tampão acetato de sódio (0,3 M, pH 3,6) foram acrescentados a 2,5 mL de TPTZ (10 mM, Sigma-Aldrich®, EUA) e depois misturados a 2,5 mL de FeCl₃.H₂O (20 mM). A uma alíquota de 528 μL do reagente FRAP foi adicionado 72 μL do homogenato. Essa mistura foi homogeneizada e incubada no escuro, a 37 °C, por 30 minutos. Depois as amostras foram centrifugadas a 300 g por 5 min, e o sobrenadante foi analisado espectrofotometricamente, em duplicata, em leitor de microplacas, a 593 nm. A capacidade antioxidante total das

amostras foi expressa em equivalentes de Fe^{2+} , determinada a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de $FeSO_4$ e normalizada pela quantidade de proteína na amostra. Os resultados foram expressos como $FeSO_4/mg$ de proteína.

3.4.7 Dosagem de proteínas:

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de quantificação de Bradford (*Comassie blue assay*) (Bradford, 1976). Albumina de soro bovino (BSA, 1mg/mL) foi utilizada para construção de uma curva com concentrações conhecidas de proteína (curva padrão). A leitura, em triplicata, foi realizada espectrofotometricamente em leitor de microplacas (SpectranMax®190, Molecular Devices, EUA) a 590 nm e os valores de proteína determinados pelo Software Softmaxpro® (V5.4, molecular Devices, EUA) em mg/mL.

3.5 Imuno-histoquímica:

As proteínas Hsp70 presentes nos tecidos foram identificadas, localizadas e quantificadas por meio de reações com anticorpos específicos, através da imuno-histoquímica. Para realização do método, as lâminas foram previamente silanizadas em solução de 3-aminopropiltriétoxi-silano 2% em acetona, por 2 minutos e em seguida submersas em água destilada e secas em estufa. Este procedimento promove uma maior aderência dos fragmentos de tecido à lâmina. Tal procedimento é necessário, pois, a imuno-histoquímica, diferente das colorações histológicas, é uma técnica que demanda um longo período de tempo submerso e sob agitação o que é agressivo aos tecidos.

Após o preparo das lâminas, cortes com espessura de 5 μ m foram feitos nos tecidos, com auxílio de um micrótomo. Em cada lâmina, foram depositados 3 cortes. As lâminas confeccionadas foram acondicionadas horizontalmente em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente, os tecidos foram desparafinizados em xilol absoluto e reidratado em séries decrescentes de álcool (100% a 70%) e em água destilada.

Para recuperar os antígenos bloqueados nos tecidos, pela fixação com paraformaldeído, as lâminas foram embebidas em tampão citrato e aquecidas à 95°C em banho-maria por 30 minutos. Após o aquecimento, as lâminas foram colocadas em cubetas histológicas, onde foi adicionado tampão salino (PBS). As cubetas foram colocadas em placas de agitação por 5 minutos, sob agitação leve. Todo esse processo se repetiu por três vezes. Após o término as lâminas foram secas com tiras de papel filtro.

Com auxílio de uma caneta histológica, os fragmentos de tecidos presentes nas lâminas foram circundados, funcionando como barreira para as soluções utilizadas ao longo do processo permanesse preso aos cortes. Após a demarcação de cada corte, as lâminas foram acondicionadas na posição horizontal dentro de uma câmara úmida, constituída por um recipiente escuro com tampa, cujo fundo foi adicionado água destilada. O ambiente úmido criado evita que as soluções evaporem.

A solução utilizada primeiramente foi bloqueio de peroxidase endógena, na qual realiza a inativação de todas as enzimas peroxidases presentes no tecido. Logo em seguida foi aplicada aos cortes a solução bloqueadora de proteínas (Protein Block DAKO X0909), que age como uma proteína hidrofóbica, diminuindo assim as ligações dos anticorpos com as proteínas do tecido. Posteriormente a retirada da solução bloqueadora de proteínas os tecidos foram cobertos com o anticorpo primário HSP70 monoclonal (BRM-22, Sigma®, EUA), extraído de camundongo, à uma diluição de 1:500 diluído em solução PBS e incubados no período de 20 horas em câmara úmida em geladeira. Com exceção do primeiro corte de cada lâmina que foi usado somente o tampão, funcionando como um controle negativo da reação.

Após as 20 horas o anticorpo primário foi retirado dos cortes e lavado com o tampão PBS e em seguida todos os tecidos foram cobertos com o anticorpo secundário. Posteriormente a mais uma lavagem com o tampão PBS os tecidos receberam o cromógeno DAB, o qual reage com as proteínas produzindo assim uma coloração marrom acastanhada. Para uma contra coloração utilizamos a hematoxilina. As lâminas então foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol em água (70% a 100% de etanol), logo após banhadas em xilol e montadas com lamínulas. Depois de 72 horas para completa secagem, as lâminas foram fotomicrografadas em um microscópio (Labomed, LC400p).

3.6 Análises Estatísticas:

Os dados foram submetidos a testes de independência (Durbin- Watson), normalidade (Shapiro Wilk) e homogeneidade de variância (Barlett), para verificar se os mesmos obedeciam a tais pressupostos. Em seguida modelos lineares foram criados para compararse a saturação e o pH tiveram diferença entre os grupos teste e controle no início do experimento. Eles foram utilizados também para verificar se há diferença de tamanho entre os indivíduos pertencentes ao grupo teste e controle.

4. RESULTADOS:

4.1 Parâmetros físico-químicos da água:

Os valores foram aferidos no início e término do experimento em cada grupo. A temperatura inicial de todos os aquários foi de $20,0^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$. Em cada aquário a capacidade de aquecimento foi em média $1,83^{\circ}\text{C}/\text{hora}$. No momento que os aquários alcançaram as temperaturas finais estabelecidas foram medidos os parâmetros com exceção do aquário TCS, que foi medido quando retirou o último peixe do aquário a temperatura de $37,6^{\circ}\text{C}$. A porcentagem da saturação do oxigênio dissolvido e pH estão representados na tabela 3. Não houve diferenças significativas na variação entre grupos testes e controle ($p < 0,05$, $r^2 = 0,05$). Assim os níveis de oxigênio saturado entre os grupos permaneceram normais e o pH se manteve alcalino

Tabela 3: Valores da porcentagem da saturação de oxigênio dissolvido (OS%) e pH nos grupos experimentais (T24°, T28°, T32° e TCS) e controles mantidos á 20°C (C24°, C28°, C32° e CTCS).

Aquários	OS% Inicial	OS% Final	pH Inicial	pH Final
T24°	88,6%	73%	6,85	6,6
T28°	87,3%	77,5%	6,81	6,2
T32°	87,9%	87%	6,58	6,41
TCS	88,4%	79,3%	6,79	5,27
C24°	82,6%	82%	7,1	7
C28°	85%	83,6%	6,95	6,59
C32°	87%	85%	6,41	6,35
CTCS	87,1%	86,8%	6,96	6,88

4.2 Tamanho:

Foram submetidos ao experimento 104 peixes com comprimento médio de $39,88 \text{ mm} \pm 7,00 \text{ mm}$. Nenhum animal morreu durante o experimento com temperatura estabelecida. No experimento para determinar a temperatura crítica máxima (TSC) os peixes foram coletados no momento subletal. A figura 5 apresenta as médias e desvio padrão do comprimento dos peixes de cada grupo submetido ao aquecimento. O tamanho dos peixes pertencentes ao grupo teste e grupo controle não apresentaram diferença

significativa em relação ao tamanho ($p > 0,05$), mostrando que não há diferença do tamanho entre os grupos comparados.

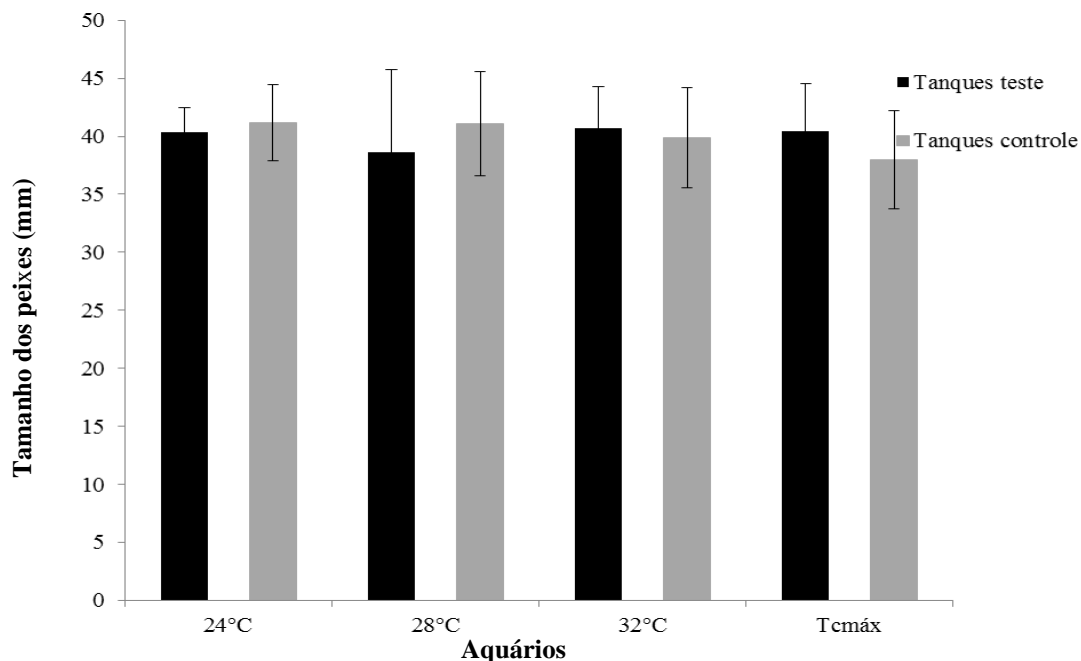


Figura 5: Comprimento total (desvio padrão) dos peixes submetidos a diferentes temperaturas estudadas.

4.3 Análises comportamentais:

Os peixes no momento que foram colocados no tanque de 500 litros à 20°C estavam muito agitados, natação acelerada utilizando toda a área do tanque. No decorrer dos 5 dias de cativeiro para descanso eles passaram a apresentar comportamento normal com ritmo natatório, equilíbrio e respiração fisiológicos.

Quando os peixes foram transferidos para os aquários do experimento notou-se também uma agitação no primeiro momento, porém esse comportamento cessou em poucas horas. No dia seguinte, ao início do experimento os indivíduos de cada aquário se encontravam com comportamento normal e coloração do corpo como no dia da coleta.

Na figura 6 estão representadas as médias das pontuações dos critérios equilíbrio, natação e batimento opercular que foram utilizadas para avaliação do comportamento dos peixes submetidos às diferentes temperaturas. A média foi calculada a partir das pontuações dada a cada 5 minutos da filmagem dos 60 minutos finais do experimento.

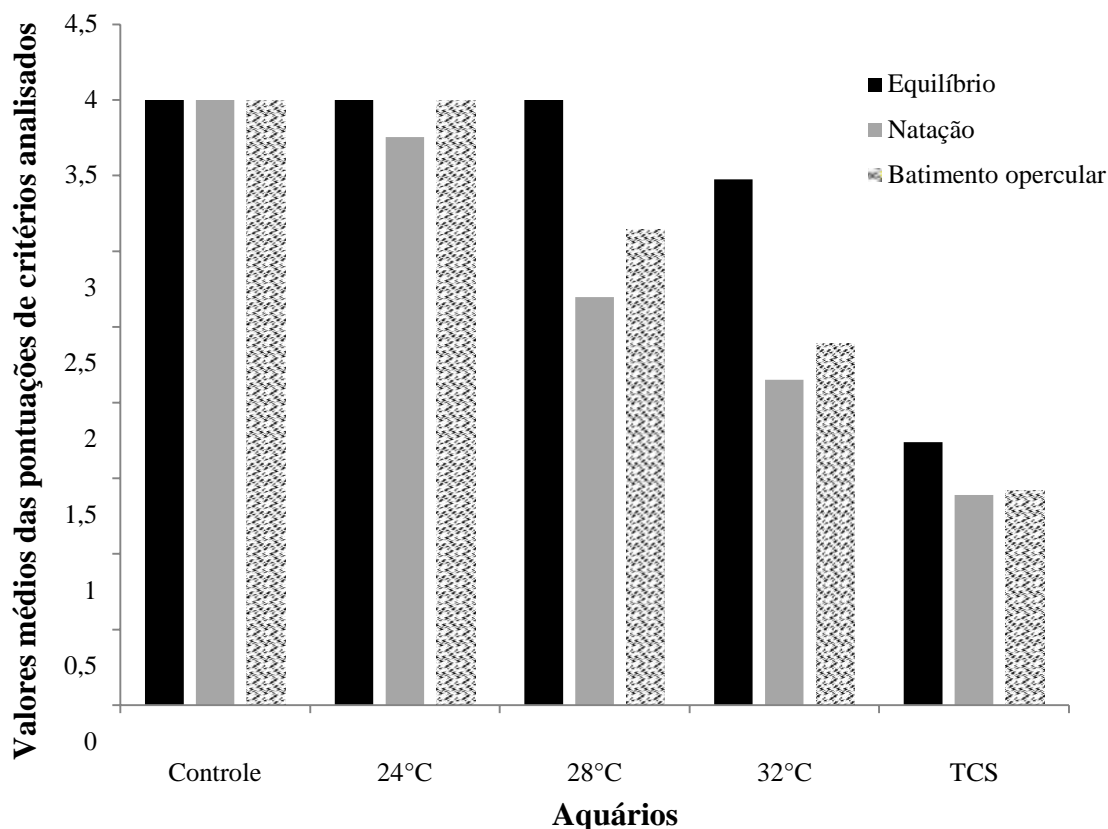


Figura 6: Médias das pontuações dos critérios de análise de comportamento: Equilíbrio, Natação e Batimento opercular, onde a nota 4 representa o comportamento normal e 0 a morte dos indivíduos.

No aquário onde os peixes ficaram por 2 horas na temperatura de 24°C o comportamento foi aparentemente normal, nadando por todo o aquário com equilíbrio e batimento opercular conservados, notou-se apenas o nado acelerado em alguns momentos. No aquário com temperatura 28°C o comportamento dos indivíduos também não apresentou grandes variações, apenas o nado ficou muito acelerado. O equilíbrio e batimento opercular não sofreram alterações.

No aquário 32°C notou a coloração dos indivíduos mais escura. A natação mais lenta e com repentina aceleração (espasmos), os indivíduos na maioria do tempo analisado se encontravam no fundo do aquário e com nado solitário, tendo desaparecido o comportamento de cardume. Alguns indivíduos perderam o equilíbrio horizontal e debatiam contra as paredes e o fundo do aquário. O batimento opercular estava acelerado.

4.4 Temperatura crítica de sobrevivência (TCS):

No experimento de TCS, a partir da temperatura 33°C os peixes apresentaram comportamento de colapso, alguns indivíduos com decúbito lateral e espasmos na natação e com batimento opercular muito acelerado (Fase I). Na temperatura 35°C alguns

indivíduos boiando em decúbito lateral e com espasmos, batimento opercular ainda acelerado (Fase II). A partir da temperatura 36°C a maiorias dos peixes no aquário se encontravam em decúbito lateral, sem movimento e ainda respirando (Fase III). Essas fases foram observadas apenas no experimento de temperatura crítica de sobrevivência.

A Figura 7 representa a temperatura no qual ocorreu o óbito das 13 peixes do TCS. O primeiro animal atingiu à temperatura TCS de 35,6°C e o último à temperatura de 37,6°C.

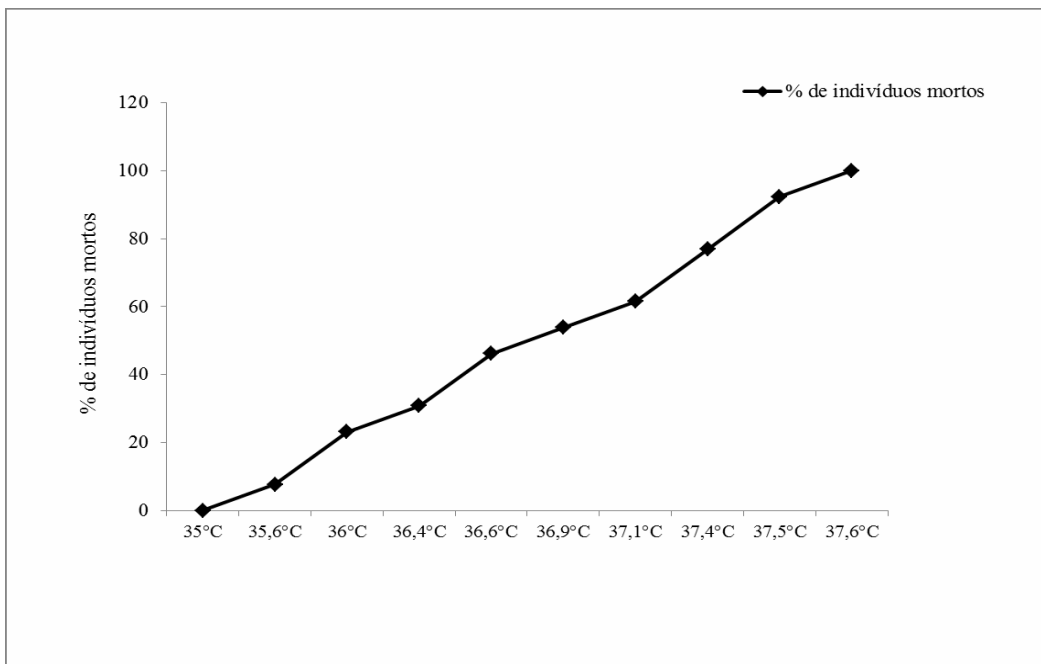


Figura 7: Gráfico do grupo TSC em relação a temperatura individual dos peixes

4.5 Análise tecidual:

4.5.1 Músculo esquelético:

A. brevirhinus possui o músculo axial constituído por dois tipos de fibras envolvidas na atividade de natação. As fibras brancas possuem maior volume com alta capacidade anaeróbica responsável pela contração e explosão de movimentos. As fibras vermelhas estão em menor quantidade no músculo, contração lenta e desempenham alta capacidade aeróbica (FIG.8 A-B).

O músculo estriado possui células alongadas denominadas míocitos, possuem formato cilíndrico e apresentam estriações longitudinais e organizado em formato de W (FIG.8 C). São multinucleados e seus núcleos ficam em posição periférica (FIG.8 D). A membrana plasmática da célula muscular é denominada sarcolema e o citoplasma

sarcoplasma. Cada fibra muscular é revestida por uma fina camada de tecido conjuntivo, o endomísio.

O conjunto de miócitos (fibras musculares) formam os feixes musculares ou fascículos que se orientam em diferentes direções e são revestido por tecido conjuntivo denominado perimísio (FIG.8 E). Todo o feixe muscular é envolto pelo epimísio (FIG.8 F).

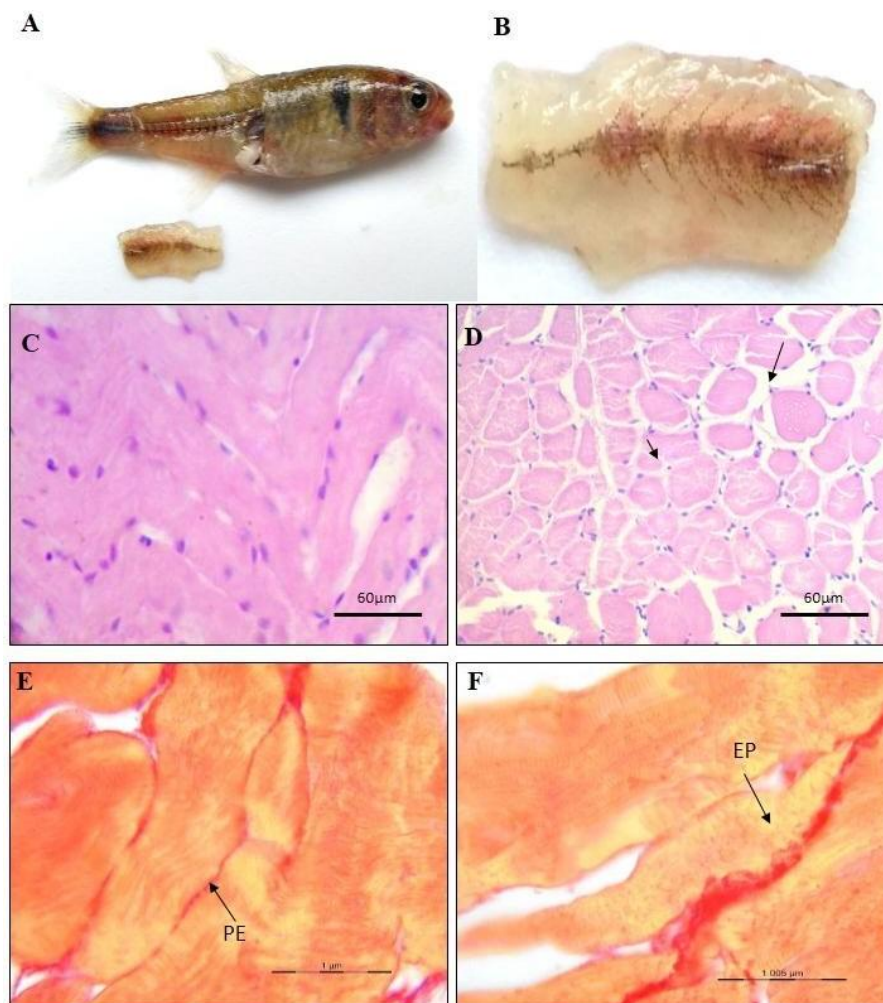


Figura 8 :Macroscopia e microscopia do músculo esquelético de *A. brevirhinus*. [A] Dissecção do músculo axial. [B] macroscopia do músculo evidenciando as fibras vermelhas e brancas. Coloração HE. [C] Fotomicrografia do músculo em corte longitudinal com os núcleos periféricos. [D] Fotomicrografia em corte transversal, formato poliedro e multinúcleos periféricos (seta).

4.5.2 *Músculo cardíaco:*

O coração do *A. brevirhinus* está localizado medialmente às brânquias, na porção cranial da cavidade celomática, na região opercular (FIG.9 A). O coração nos teleósteos possui quatro compartimentos das quais o sangue flui em sucessão simples, unidirecional: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo artéria (FIG.9 B). A circulação sanguínea se dá do coração para os arcos branquiais.

O sangue venoso entra no seio venoso, não há válvulas de entrada e essa estrutura não pode ser conhecida como uma câmara cardíaca. O átrio se localiza na parte dorsal do ventrículo apresentando uma parede fina (FIG.9 C). O sangue sai do átrio através de válvulas átrio-ventriculares.

O ventrículo tem uma parede mais espessa que o átrio, possui duas camadas musculares. A camada externa é mais compacta onde se localiza inúmeras artérias coronárias por onde as células musculares recebem oxigênio. A camada interna é esponjosa com inúmeras trabéculas (FIG. E). As fibras musculares dessa camada não possuem uma organização bem definida, assim possibilita comunicações entre o lúmen ventricular e áreas mais periféricas da estrutura do ventrículo.

O Bulbo Arterial constitui a base espessa da aorta ventral, a parede é grossa e composta por tecido fibroelástico (FIG.9 D) O sangue passa pelo bulbo arterial e chega até as brânquias para ser oxigenado e começar todo o processo novamente.

Cada fibra muscular estriada cardíaca é uma unidade distinta e denomina-se cardiomiócito, são alongadas com um ou dois núcleos localizados centralmente (FIG.9 F). Possui três camadas estratificadas de tecido, sendo elas; o epicárdio, o miocárdio e o endocárdio (FIG.9 G-H). O epicárdio é a camada mais externa, sendo uma única camada do epitélio pavimentoso. O miocárdio é a camada mais espessa do coração, constituído por inúmeros cardiomiócitos com diferentes direções. O endocárdio é a camada mais interna, homóloga a túnica íntima dos vasos sanguíneos, constituído por tecido conjuntivo que reveste as fibras musculares (FIG.9 G).

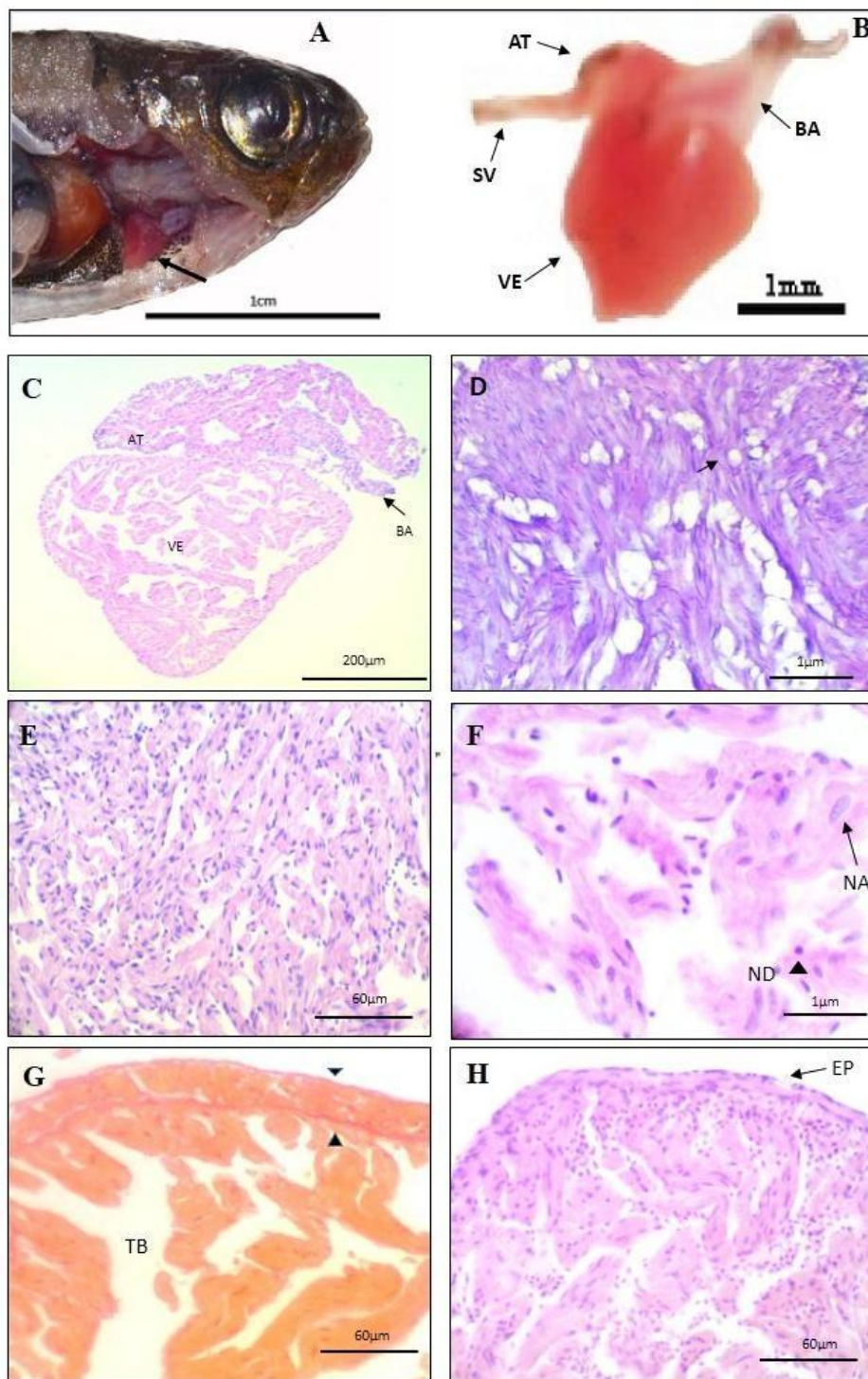


Figura 9 : Macroscopia e microscopia do coração de *A. brevihinus*. [A] Localização do coração após retirada das brânquias. [B] Macroscopia do coração. Observa-se todas as estruturas cardíacas, seio venoso (SV), átrio (AT), ventrículo (VE) e bulbo arterial (BA). Coloração de HE: [C] Histologia do coração evidenciando o ventrículo (VE), átrio (AT) e bulbo arterial (BA), aumento de 100x. [D] Bulbo arterial constituído por tecido fibroelástico com armazenamento de lipídios (seta). [E] Fibras musculares cardíacas dispostas em vários sentidos. [F] Cardiomiócitos com os núcleos densos (ND) e núcleos alongados (NA). [G] Coloração picosirius red evidenciando colágeno na lâmina basal do epicárdio e endocárdio e trabéculas (TB) [H] coração revestido pelo epicárdio (seta).

4.6 Histopatologia:

4.6.1 *Músculo esquelético:*

A análise histopatológica mostrou que os animais coletados no ambiente tiveram a estrutura celular do músculo esquelético preservadas, sem nenhuma modificação estrutural (FIG.10 A). Os indivíduos do controle experimental e do experimento a temperatura de 24°C também não apresentaram alterações teciduais (FIG.10 B-C).

Em animais mantidos à temperatura de 28°C observamos a presença de infiltrado inflamatório mononuclear em regiões isoladas do tecido (FIG.10 D). Os indivíduos mantidos a temperatura de 32°C também apresentaram infiltrado inflamatório mononuclear e regiões com presença de melanóforos (FIG.10 E).

No experimento TCS as lesões celulares foram mais marcantes, presença de infiltrado inflamatório mononuclear e colágeno eosinófilo (FIG.10 F). Alguns trechos com presença de granulócitos e melanóforos na superfície do tecido (FIG.10 G). Os miócitos de algumas regiões sofreram fragmentação e alguns pontos de necrose (FIG.10 H).

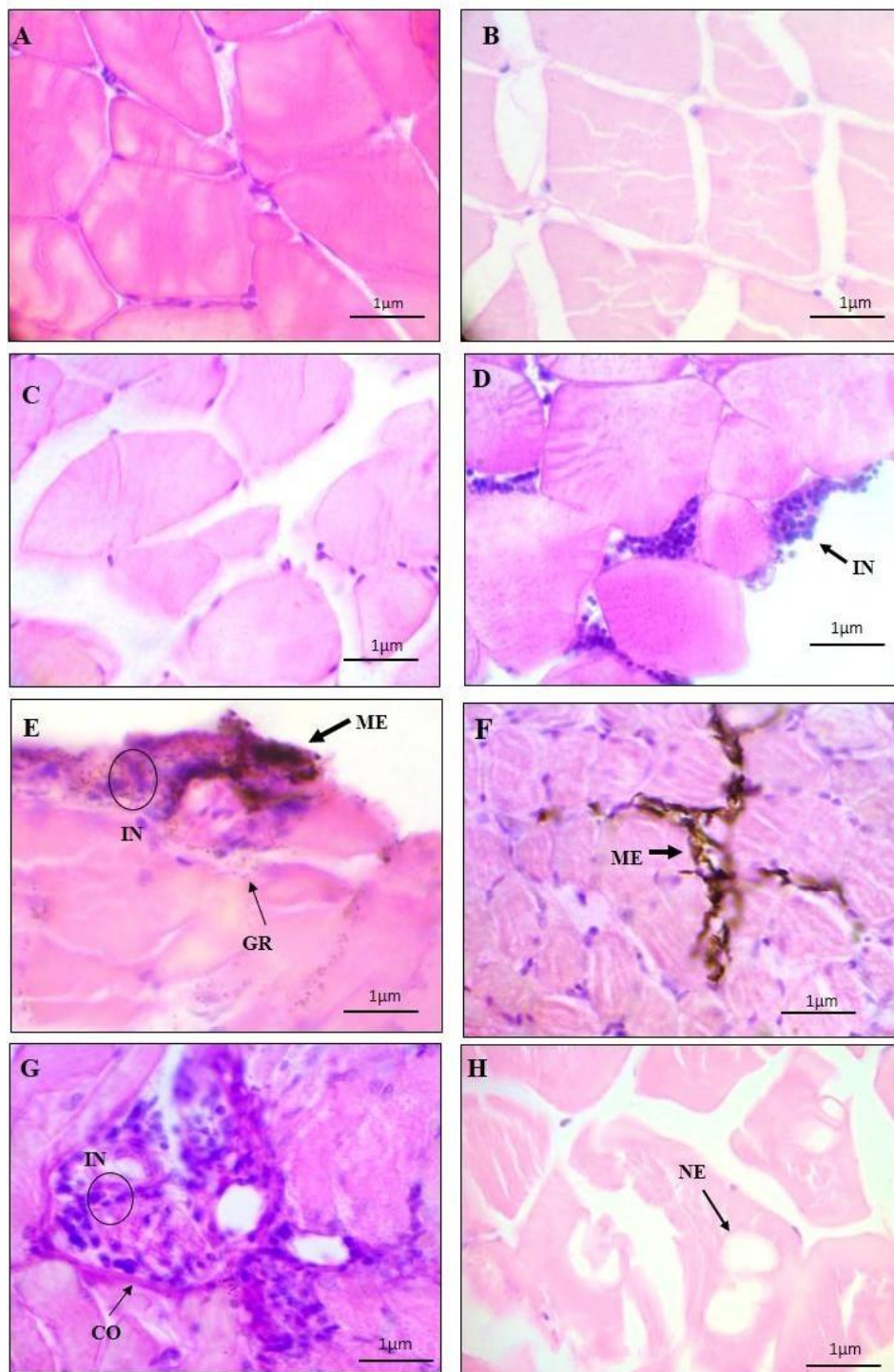


Figura 10 : Histopatologia do músculo estriado *A. brevirhinus* com aumento de temperatura. Coloração de HE, aumento 1000x. [A] Controle ambiental, sem alterações no tecido. [B] Controle experimental, sem alterações no tecido. [C] Temp. 24°C. sem alterações no tecido. [D] Temp. 28°C. Infiltrado inflamatório mononuclear (IN). [E] Temp. 32°C. Presença de infiltrado inflamatório mononuclear (IN), granulócitos entre as fibras (GR) e melanóforos na superfície das fibras (ME). [F] TCS. Presença de melanóforos entre as fibras musculares (ME). [G] TCS. Infiltrado inflamatório (IN) e Colágeno eosinófilo (CO). [H] TCS. Fibras musculares com pontos de necrose.

4.6.2 Músculo cardíaco:

O músculo cardíaco dos animais coletados no ambiente não apresentou nenhuma alteração celular, os cardiomiócitos preservaram as fibras intactas e o seu núcleo centralmente (FIG.11 A.). Semelhante ao controle ambiental os indivíduos do controle experimental e do experimento mantidos a temperatura de 24°C também não apresentaram modificações teciduais (FIG.11 B). No 24°C observamos uma maior quantidade de eritrócitos (FIG.11 C)

Em animais mantidos a temperatura de 28°C observamos modificações na estrutura dos cardiomiócitos, como a perda do núcleo central. Apresentou discreto processo inflamatório, na superfície do epicárdio houve infiltrados inflamatórios mononucleados (FIG.11 D).

Em animais mantidos à temperatura de 32°C observamos dilatação dos vasos, presença de infiltrado mononuclear e polinuclear. Em alguns trechos do tecido presença de granulócitos (FIG.11 E.).

No experimento TCS o tecido cardíaco apresentou infiltrado inflamatório mononuclear na região do epicárdio com presença de granulócitos liberando citocinas. Os cardiomiócitos do miocárdio com modificações estruturais e algumas células com aspecto necrótico (FIG.11 F).

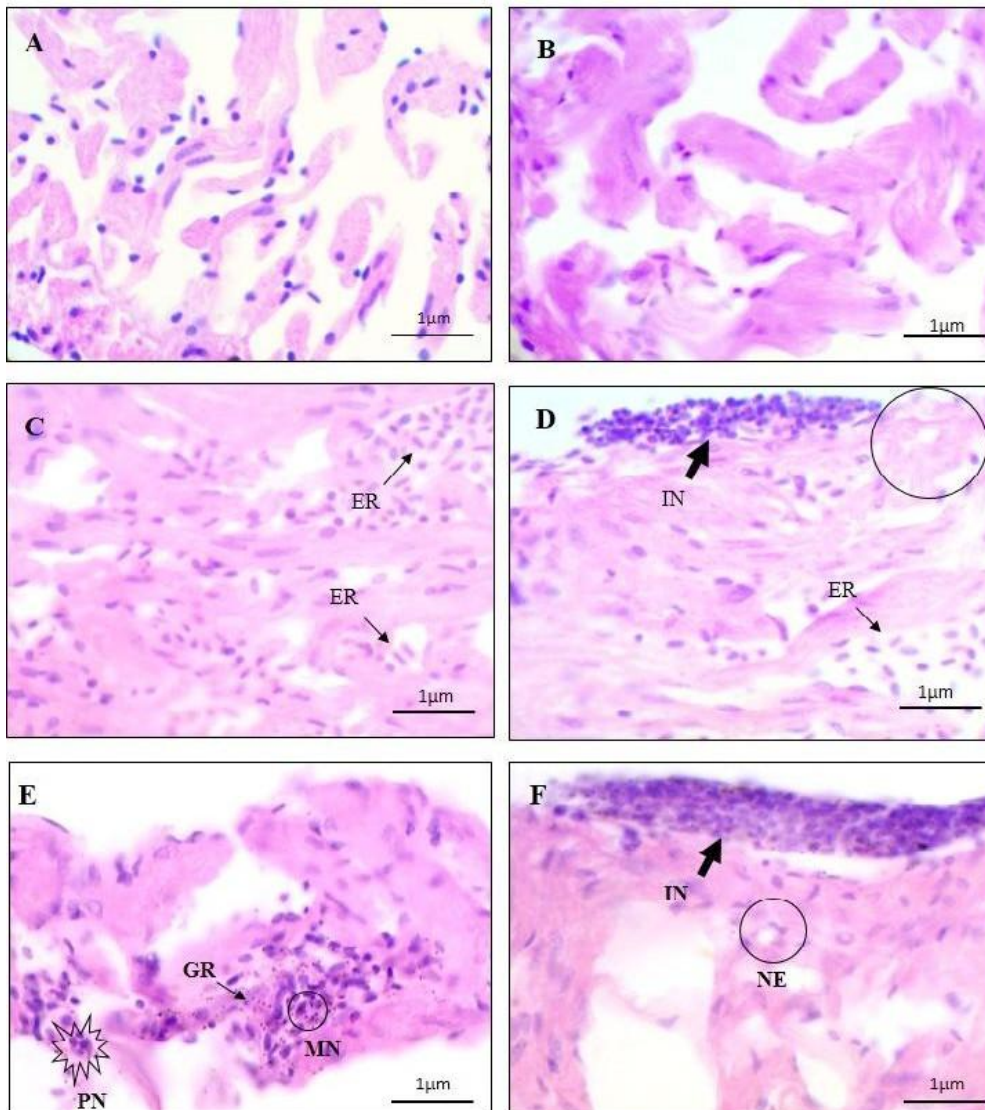


Figura 11 : Histopatologia do coração *A. brevihinus* com aumento de temperatura. Coloração de HE, aumento 1000x. [A] Controle ambiental. Cardiomiócitos preservados. [B] Controle do experimento. Cardiomiócitos preservados. [C] Temp. 24°C. Cardiomiócitos preservados com presença de eritrócitos (ER). [D] Temp 28°C. Presença de infiltrados inflamatórios mononuclear (IN), eritrócitos(ER) e regiões sem núcleos centrais. [E] Temp 32°C. Presença de infiltrados inflamatórios polinuclear (PN) e mononuclear (MN). Granulócitos (GR). [F] TCS. Infiltrado inflamatório mononuclear no epicárdio e células com aspecto necrótico .

4.7 Parâmetros Redox:

Investigando a resposta dos biomarcadores do estado redox nas amostras após a exposição ao aumento da temperatura observou que no músculo cardíaco houve alterações na concentração de TBARS. Onde a taxa maior da peroxidação lipídica foi no aquário com temperatura crítica de sobrevivência (FIG.12). No músculo esquelético não houve grande alteração da taxa da peroxidação lipídica nos diferentes testes.

A concentração de proteína carbonilada no músculo cardíaco sofreu um aumento considerável no controle experimental comparado ao controle ambiente. A concentração do controle experimental é semelhante ao TCS. No músculo esquelético também houve diferenças da concentração desse oxidante, a concentração dos tecidos a 28°C foi menor que o controle ambiental e as temperaturas de 24°C e o TCS apresentaram os maiores valores (FIG.13).

As concentrações do antioxidante não enzimático FRAP no músculo cardíaco sofreu uma abrupta queda dos valores ambientais para o experimento de aumento da temperatura. E a partir da temperatura de 24°C até o TCS os valores mantiveram parecidos. No músculo esquelético a concentração caiu no controle experimental, porém se manteve estável no decorrer do aumento da temperatura (FIG.14).

Os antioxidantes enzimáticos SOD e CAT não reagiram no ensaio feito com os dois tecidos estudados.

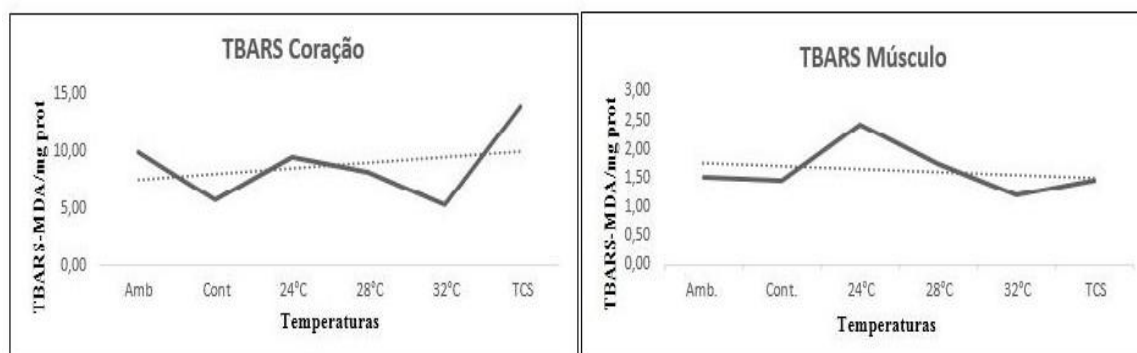


Figura 12: Efeito do estresse térmico nas concentrações de TBARS no coração e músculo. Concentração de MDA em nmol/mg

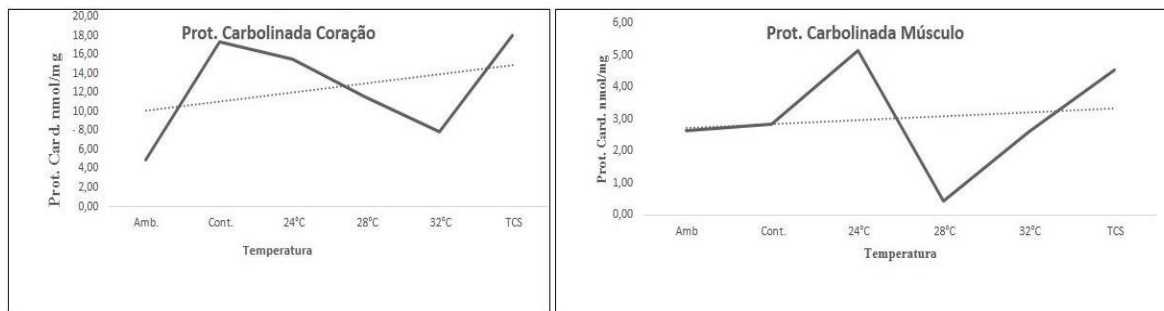


Figura 13: Efeito do estresse térmico nas concentrações de derivados carbonílicos em proteínas no coração e músculo. A concentração de derivados carbonílicos em proteínas em nmol/mg de proteína.

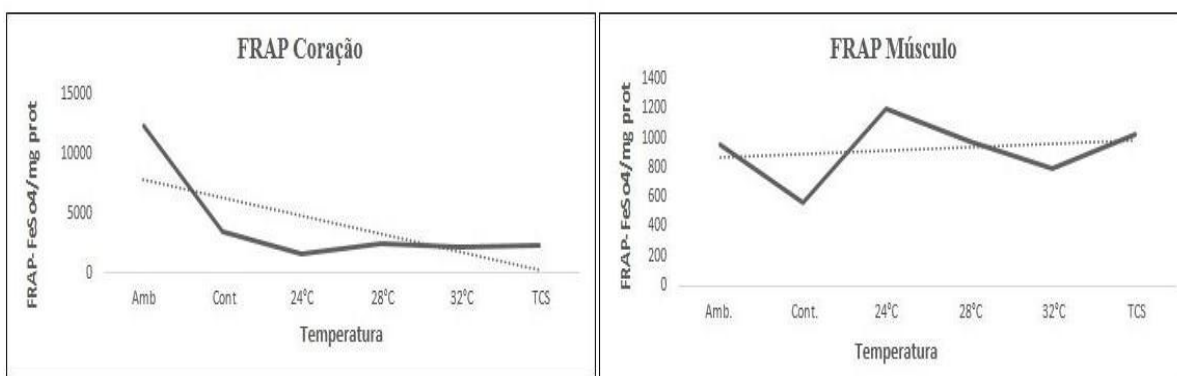


Figura 14: Efeito do estresse térmico na capacidade antioxidante total pelo método FRAP no coração e músculo. Concentração de $\mu\text{m FeSO}_4/\text{mg}$ de proteína.

4.8 Imuno-histoquímica:

4.8.1 Músculo esquelético:

O controle negativo não obteve expressão imuno-histoquímica (FIG.15 A) A expressão de Hsp70 no músculo esquelético na maioria das vezes foi citoplasmática e variou de intensidade conforme a temperatura. A expressão no controle ambiental foi maior, quando comparada ao controle experimental (FIG.15 B-C)

Em animais mantidos a temperatura de 28°C obtiveram expressão somente citoplasmática é menor intensidade que em animais mantidos a temperatura de 32°C (FIG.15 D). A expressão máxima desse experimento foi na temperatura 32°C, expressando tanto no citoplasma como no núcleo (FIG.15 E). Para os animais submetidos a temperatura crítica máxima a intensidade da expressão foi menor, quando comparada as outras temperaturas do experimento (FIG.15 F).

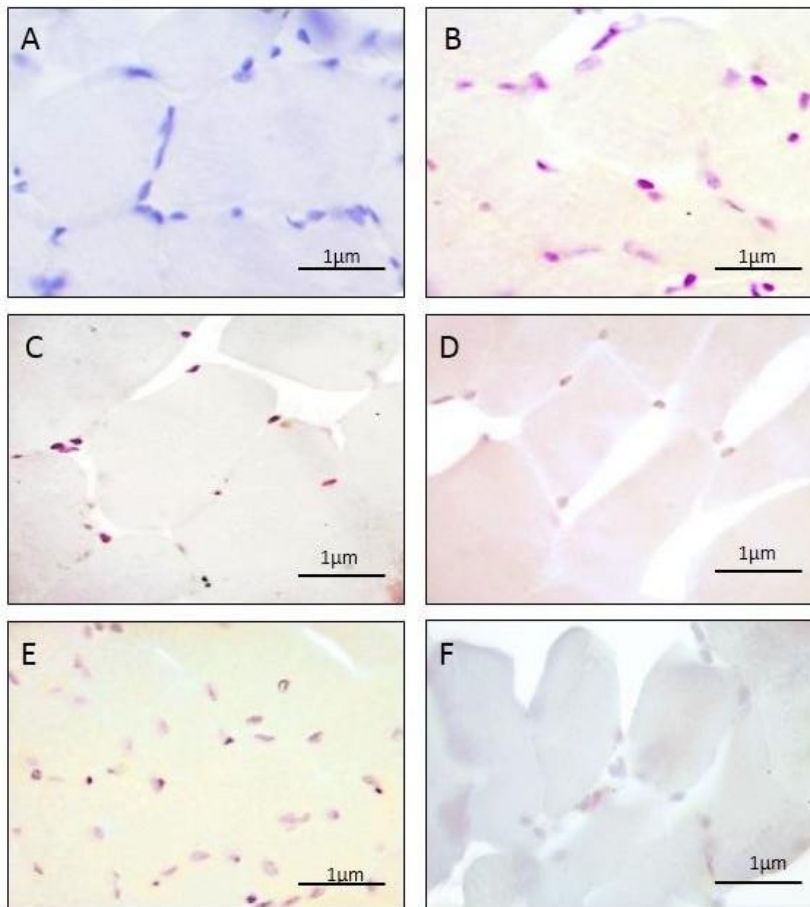


Figura 15: Fotomicrografias do músculo esquelético de *A. brevirhinus* submetidos a técnica de imuno-histoquímica para expressão da Hsp70 e contracoradas com Hematoxilina. [A] Controle negativo. [B] Controle ambiental. [C] Controle experimental. [D] Temperatura 28°C. [E] Temperatura de 32°C [F] TCS.

4.8.2 Músculo cardíaco:

O controle negativo não obteve expressão imuno-histoquímica (FIG.16 A). A expressão da Hsp 70 no músculo cardíaco variou de intensidade dependendo da temperatura estudada. A expressão no controle ambiental foi ligeiramente maior que no controle experimental (FIG.16 B-C). Observa-se que a intensidade da marcação aumentou de maneira gradual conforme o aumento da temperatura.

Em animais mantidos a temperatura de 28°C houve marcação citoplasmática e também nuclear semelhante a temperatura de 32°C (FIG.16 D). A marcação da Hsp70

aumentou na temperatura de 32°C sendo o experimento que mais expressou a proteína (FIG.16 E). Para o experimento TCS os níveis de marcação da proteína decaíram de intensidade e com expressão estritamente citoplasmática (FIG.16 F).

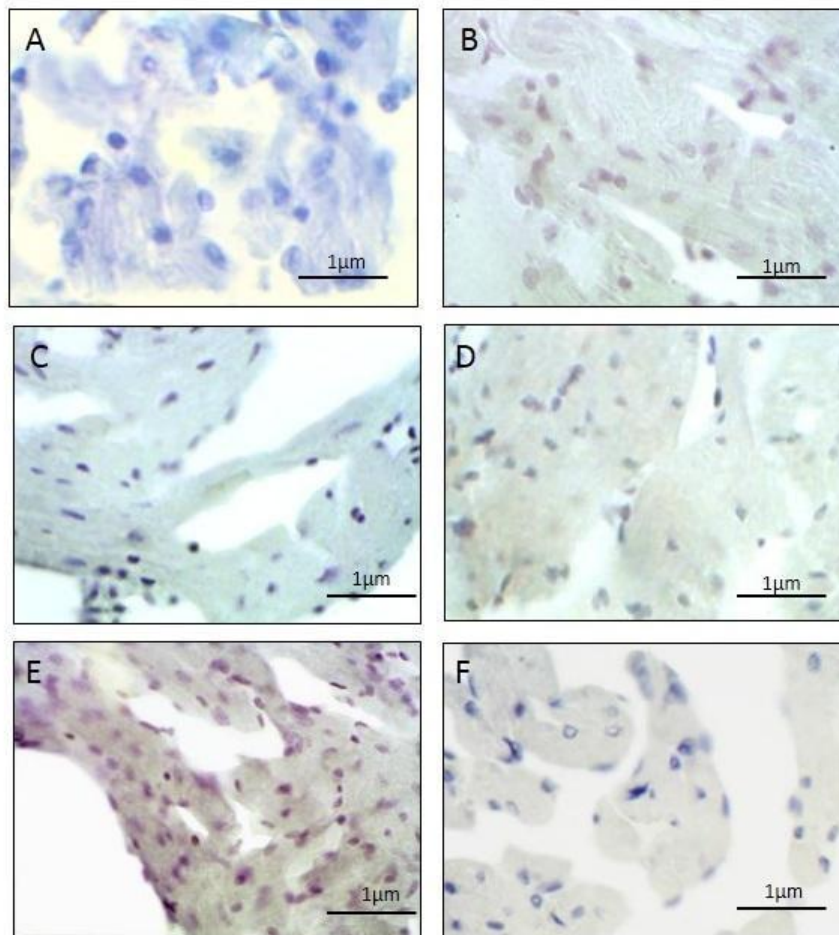


Figura 16 : Fotomicrografias do músculo cardíaco de *A. brevirostris* submetidos a técnica de imuno-histoquímica para expressão da Hsp70 e contracordadas com Hematoxilina . [A] Controle negativo. [B] Controle ambiental. [C] Controle experimental. [D] Temperatura 28°C. [E] Temperatura de 32°C [F] TCS.

5. DISCUSSÃO:

5.1 Comportamento:

As mudanças comportamentais devido a alterações da temperatura ambiental são rapidamente observadas nos organismos, principalmente nos peixes por serem ectodérmicos. Com o aumento da temperatura os peixes ficam mais agitados, pois altas temperaturas induzem o aumento da atividade metabólica desses animais (Pörtner, 2002). No presente estudo essa agitação pôde ser percebida a partir da temperatura de 28°C. O aumento da atividade metabólica auxilia os peixes a saírem do local de estresse e procurar um local com temperatura adequada (Beitinger et al., 2000), contudo essa reação não surtiu efeito em nossos experimentos pela homogeneização da temperatura em todo o aquário experimental.

A partir da temperatura de 32°C os peixes apresentaram batimento opercular acelerado. O aumento da atividade opercular acontece para atender a demanda de oxigênio pelos tecidos, em consequência da aceleração da frequência cardíaca e respiratória (Murugain, et al., 2008).

Nos períodos finais a exposição à temperatura de 32°C, os indivíduos apresentaram a natação mais lenta com espasmos esporádicos. Essa diminuição do movimento natatório pode ser explicada como comportamento adaptativo ao estresse, transferindo essa energia para processos fisiológicos de reparo e manutenção vital, resultando em uma menor quantidade de energia para locomoção (Silva et al., 2007). Os espasmos no nado acontecem devido a estimulação descontrolada das atividades cerebrais em altas temperaturas corporais (Coutinho et al., 2005). A presença de contrações musculares involuntárias no nado demonstra que esse nível de aquecimento já causa perdas de atividade cerebrais normais, além de falhas na junção neuromuscular e envio de sinapse (Junqueira, 2000). Também foi observada a perda do equilíbrio, indicando que as mudanças fisiológicas nessa temperatura foram tão altas que afetaram o sistema de propriocepção provocando comportamentos resultantes de situações subletais (Reyes et al., 2011).

Nos animais mantidos a temperatura de 32°C além das alterações em todos os parâmetros avaliados (natação, respiração e equilíbrio), também apresentaram mudança de coloração, a pele ficou mais escura. Tal mudança se dá pela maior produção dos melanóforos, responsáveis pela pigmentação da pele, indicando uma resposta a estímulos ambientais e fisiológicos (Nery e Castrucci, 1997).

No experimento de TCS observamos que a partir de 33°C os peixes apresentaram comportamento de colapso fisiológico, movimento letárgico e decúbito lateral. Podemos afirmar que o ponto final da temperatura crítica máxima (TCS) do *Astyanax brevihinus* a partir dos 35°C. Nessa temperatura os movimentos locomotores se tornaram desorganizados, perdendo a capacidade de escapar de condições que podem levar a sua morte (Beitinger, 2000). De acordo com as fases propostas por Cocking (1959) todos os indivíduos apresentaram as três fases bem características, o que as diferenciou para cada peixe foi a rapidez de transição entre elas e a temperatura na qual ocorreu o momento subletal, sendo a diferença entre o primeiro indivíduo e o último de apenas 2°C.

Dessa forma os estudos comportamentais auxiliam para conhecermos a tolerância térmica dos indivíduos de uma mesma espécie e como são capazes de responder a variações de temperatura. Além disso, informações sobre a temperatura letal para as espécies são importantes para compreendermos a capacidade de sobrevivência em um determinado ambiente climático (Reyes et al., 2011).

5.2 Histologia e histopatologia:

5.2.1 Músculo esquelético:

As análises macroscópica do músculo esquelético axial do *Astyanax brevihinus* revelaram que sua morfologia possui um padrão organizacional que maximiza a eficiência mecânica dos músculos em relação a limitada capacidade de flexões do corpo no plano lateral (Patrino et al., 1998). Ainda segundo autores, os feixes musculares, identificados como miômeros, se repetem ao longo do corpo do animal e apresentam formato em W, esse padrão peculiar está relacionado com a necessidade de todas as fibras contraírem em uma mesma velocidade para resultar na flexão de todo o corpo do animal. Esses miômeros são separados por bainhas de tecido conjuntivo, os miosseptos (Jorge, 2009).

As fibras musculares podem ser divididas em dois tipos distintos; as fibras vermelhas e as fibras brancas. As fibras vermelhas são encontradas na região superficial, abaixo da derme e possuem maior proporção na linha lateral do animal, possui metabolismo oxidativo, grande concentração de mioglobinas e mitocôndrias (Santos, 2007). As fibras vermelhas são recrutadas durante a realização de movimentos lentos e de sustentação, como a migração (Bone, 1979). As fibras brancas se encontram em maior quantidade nos peixes, possuem maior diâmetro e seu metabolismo é glicolítico. Essa

musculatura é recrutada nos movimentos bruscos de natação, como captura de alimentos e fuga de predadores (Altringham e Johnston, 1981).

Na análise microscópica evidenciamos os inúmeros núcleos na região periférica dos miócitos. Esses miócitos são agrupados paralelamente formando feixes de fibras ou fascículos musculares (Carani e Aguiar, 2008). Notamos a presença de tecido conjuntivo formando uma rede contínua envolvendo todo o tecido muscular. O colágeno que envolve todo o músculo é o epimísio (Carani e Aguiar, 2008).

O perimísio envolve os feixes musculares e o colágeno com redes extremamente delicadas envolvendo os Miócitos, o endomísio, A função de todo esse tecido conjuntivo é manter as fibras musculares unidas, assim a força gerada em cada fibra individualmente atua sobre todo o músculo, fazendo com que a força de contração possa chegar a outras fibras (Munford, 2008).

Nas análises histológicas do músculo esquelético nas diferentes temperaturas do experimento foram encontrados achados histopatológicos a partir da temperatura de 28°C. Nos animais mantidos a essa temperatura encontramos infiltrados inflamatórios. Na histopatologia muscular o componente mais evidente é a inflamação (Kongtorp et al., 2004). Essa inflamação acontece por algum fator de estresse, atraindo células inflamatórias como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos entre outras. Essas células se infiltram no tecido muscular e preparam para a regeneração por meio da limpeza tecidual e fagocitose de detritos celulares (Bondesen et al., 2004). As primeiras células fagocitárias a chegarem ao sítio da lesão são os neutrófilos, que constituem a primeira linha de defesa no processo inflamatório (Vasconcelos, 2017).

Com o aumento da temperatura além dos infiltrados inflamatórios como resposta ao estresse o músculo apresentou os melanóforos. Esses grânulos contendo melanina diminuem o estresse oxidativo, contribuindo para a neutralização das espécies reativas de oxigênio (Zuasti et al., 1989). Foram encontrados grande número de granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) nos animais submetidos às temperaturas mais elevadas do experimento. Os granulócitos estão intimamente associados as células do tecido conjuntivo e são muitas vezes encontrados próximos a vasos (Thomaz, 2011), essas células em caso de lesão tecidual aguda, sofrem degranulação, liberando mediadores da inflamação contidos em seu citoplasma (Reite e Evesen, 2006).

No experimento de TCS alguns miócitos apresentaram necrose, isso pode ter ocorrido devido a uma inflamação severa induzindo a degeneração miocitária sem

resposta de reparo (Kongtorp et al., 2004). Em estudos com a espécie *Salmo salar* (Kongtorp, 2004; Taggart e Ferguson, 1990) obtiveram achados de infiltrados e necrose semelhantes ao nosso estudo.

5.2.2 *Músculo cardíaco:*

As análises macroscópicas do coração no *Astyanax brevirostris*, revelaram que, assim como dos demais teleósteos, este órgão é formado por quatro câmaras em série; seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso (Farrell e Jones, 1992). A circulação sanguínea se dá do coração para os arcos branquiais para serem oxigenados por difusão pelas lamelas, então o sangue é bombeado da aorta dorsal para as artérias até chegar no capilares periféricos e começar todo o ciclo novamente (Munford, 2007).

Microscopicamente não analisamos o seio venoso, por ser uma estrutura pequena e frágil a manipulação. Sua principal função está relacionada a inicialização e controle da frequência cardíaca (Moreira, 2013).

O átrio apresentou uma parede delgada, formato irregular e trabeculada, assim como descrito por Farrell e Jones (1992). Esse arranjo das fibras em redes trabeculadas aumentam a área da superfície e a difusão do oxigênio, permitindo uma oxigenação tissular. Isso acontece devido ao fato que, grande maioria das espécies de peixes, o átrio não é irrigado por coronárias (Olson e Farrell, 2006).

O ventrículo apresentou duas camadas musculares distintas, sendo a camada externa mais compacta e a interna esponjosa. A mesma morfologia do ventrículos foram encontrados nas espécies híbridas tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Ribeiro e Almeida, 2016). A camada compacta do ventrículo possui inúmeras artérias coronárias. A circulação coronária é essencial em condições de exercício e hipóxia, pois em tais condições o fluxo coronariano aumenta para que aumente o suprimento cardíaco de oxigênio (Farrell et al, 2007). A camada interna é esponjosa com inúmeras trabéculas, obtém a maior parte do suplemento de oxigênio pelo lúmen. As fibras cardíacas possui diferentes arranjos musculares, além da comunicação conseguir atingir todas as áreas ventriculares, reduzem o diâmetro cardíaco favorecendo a sístole ventricular (Thomaz, 2011). O sangue é passado do ventrículo para o bulbo arterioso através de um par de válvulas (Munford, 2007)

A última estrutura cardíaca no sentido do fluxo sanguíneo é o bulbo arterial, pode apresentar forma e morfologia diferentes dependendo da espécie (Thomaz, 2011). Não

possuem músculo cardíaco, assim não apresenta contração muscular, porém essa estrutura possui fibras elásticas que servem como sustentação e regulação da velocidade do fluxo sanguíneo bombeado pelo ventrículo (Munford, 2007). Este órgão no *Astyanax brevierhinus* apresenta coloração esbranquiçada, com característica elástica ao corte e pode estar envolvido na regulação do fluxo no sentido das brânquias. Em outras espécies de teleosteos essa regulação reduz a força do fluxo sanguíneo na vasculatura branquial, a qual é muito delicada, bem como manter um fluxo constante nas brânquias, fundamental para as trocas gasosas (Farrell e Jones, 1992, Thomaz, 2011).

As três camadas do tecido possuem características e funções diferentes. O epicárdio é a camada mais externa do coração, possui epitélio pavimentoso e tecido conjuntivo (colágeno). Esse colágeno atua na regulação da distensão, transmissão de força durante a contração, relaxamento e resistência a deformações patológicas (Sandrinni, 2015). O endocárdio também é constituído por tecido conjuntivo, essa camada tem a função de estabelecer a integridade das camadas esponjosas dos cardiomiócitos, o miocárdio, mantem as mesmas juntas.

Nos estudos histopatológicos observamos a presença de modificações no coração a partir da temperatura 24°C, onde houve uma maior quantidade de eritrócitos no lúmen do miocárdio. Esse aumento é justificado como resposta a hipóxia cardíaca, quando acontece a bradicardia e conseqüentemente aumenta o tempo de residência do sangue dentro do ventrículo, o que permite uma maior extração de oxigênio para o tecido cardíaco (Thomaz, 2011).

Semelhante aos achados na histopatologia do músculo esquelético, o músculo cardíaco apresentou infiltrados inflamatórios polimorfonucleares e mononucleares, cardiomiócitos com perda do músculo e tecidos necróticos, indicando lesões devido ao aumento da temperatura. O recrutamento celular dos infiltrados inflamatórios no miocárdio e necrose tecidual foram documentados pelos estudos de regeneração do tecido cardíaco do peixe-zebra (Poss et al., 2002), danio gigante (*D. aequipinnatus*) e em peixe dourado (*Carassius auratus*) (Lafontant et al., 2012)

5.3 Parâmetros redox:

O estresse térmico que os peixes foram submetidos ocasionou desequilíbrio no estado redox no músculo cardíaco e musculo esquelético do *A. brevirhinus*. Onde foi demonstrado através do aumento do biomarcadores do estresse oxidativo (TBARS e

proteína carbonilada) e pela diminuição da capacidade antioxidante total (FRAP) decorrente do aumento da temperatura.

No músculo cardíaco houve um discreto aumento da peroxidação lipídica no grupo do experimento TCS comparado ao grupo ambiental. Durante o aumento da temperatura o fluxo sanguíneo também aumenta justificando assim o aumento da concentração de MDA no coração (Radak et al., 2007). No músculo esquelético a peroxidação lipídica apresentou maior estabilidade. Não houve o aumento do dano lipídico pois o músculo esquelético nos peixes é predominante de fibras brancas, onde o metabolismo é glicolítico e não oxidativo. De acordo com Gonçalves e Soares (1998) a concentração lipídica nos músculos dos peixes se encontra em maior quantidade nas fibras vermelhas. Diferentes do nosso resultado, estudos feitos em roedores o aumento do fluxo sanguíneo ativa sistemas geradores de espécies reativas de oxigênio aumentando a concentração de MDA nos músculos desses animais (Powers e Jackson, 2008).

Outro biomarcador de dano oxidativo investigado nesse estudo foi os derivados carbonílicos nas proteínas que indica o dano a nível de proteína dos tecidos analisados. O músculo cardíaco mostrou-se sensível ao dano oxidativo de proteínas, com o decorrer do aumento da temperatura houve também aumento dos seus níveis. O músculo esquelético apresentou discreto aumento, o que pode ser justificado pela baixa concentração basal dos derivados carbonílicos proteicos nesse tecido (Costa, 2017).

A capacidade de redução do ferro pelos antioxidantes não enzimáticos é determinado pelo método FRAP. No músculo cardíaco, o conteúdo antioxidante não enzimáticos pode chegar até 3 vezes mais em relação ao músculo esquelético (JI, 2000), sendo notória essa diferença também em nossos resultados.

A atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT não conseguiu ser identificada no músculo cardíaco e esquelético mesmo com o pool de tecidos, sendo necessário um ensaio mais sensível ou então mais tecidos para esta análise. Em outros organismos o tecido cardíaco é conhecido por sua baixa taxa enzimática. Apesar de ter altas taxas oxidantes o tecido cardíaco, tem duas vezes menos atividade de SOD que o fígado a atividade da CAT pode chegar a ser mais dez vezes menor que o fígado (Grankvist et al., 1981).

5.4 Imuno-histoquímica:

O aumento da expressão da proteína Hsp70 está relacionado a diferentes estresses, sobretudo quando a célula é submetida ao estresse térmico (Kiang e Tsokos, 1998). Os resultados obtidos nesse estudo demonstram as alterações qualitativas na expressão da Hsp70 com o aumento da temperatura. Nos dois tecidos analisados, coração e músculo esquelético, a expressão começou desde o controle ambiental, onde a expressão foi mais acentuada do que no controle experimental. De acordo com Pickering et al (1982) os períodos de descanso em cativeiro antes dos experimentos são importantes para que o animal cesse todo o estresse sofrido na manipulação em campo. O efeito desse descanso foi observado em nossos estudos, resultados semelhantes foram obtidos por Cardoso et al.,(2015) que estudaram o efeito da temperatura em juvenis de *Trachinotus carolinus* e na espécie *Salmo trutta* (Pickering et al., 1982).

Nos animais mantidos à temperatura de 28°C tanto o músculo como o coração apresentaram aumento da expressão proteica da Hsp70 no citoplasma. No coração alguns núcleos também tiveram expressão. Podemos constatar que o coração responde de maneira diferente que o músculo esquelético, sendo mais sensível ao aquecimento. O coração parece ser um dos primeiros órgãos a comprometer seu funcionamento, portanto é um importante determinante de tolerância térmica dos organismos (Somero, 2002).

A expressão máxima em ambos tecidos foi na temperatura de 32°C, onde a Hsp70 foi expressa no citoplasma e núcleo das células do músculo cardíaco e esquelético. A expressão no citoplasma já é bem definida, porém sua expressão no núcleo significa que o estresse térmico também desnatura proteínas nucleares. A localização nuclear da Hsp70 indica o reparo das proteínas ribonucleicas (RPN) (Sanders et al., 1994). A transferência de Hsp70 do citoplasma para o núcleo em altas temperaturas também foi observada nos estudos dos juvenis de *Trachinotus carolinus* (Cardoso, 2015).

No experimento TCS podemos perceber o decréscimo da expressão da Hsp70, demonstrando que em altas temperaturas elas próprias se desnaturam. Este fato está relacionado a retroalimentação negativa dessa proteína em altas temperaturas, onde a concentração aumentada da Hsp70 inibe a sua produção regulando e equilibrando sua resposta ao choque térmico (Abravaya et al., 1991).

6. Conclusões:

O presente trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- ✓ As análises morfológicas do músculo cardíaco e músculo esquelético do *Astyanax brevirohinus* revelaram a similaridade dessas estruturas com demais teleósteos.
- ✓ O aumento da temperatura altera o comportamento do *A. brevirohinus* em relação a natação, equilíbrio e batimento opercular. A partir da temperatura de 35°C atingem colapso fisiológico.
- ✓ *A. brevirohinus* apresenta alterações histopatológicas de inflamação e necrose nos músculos cardíaco e esquelético derivadas do aumento da temperatura.
- ✓ A análise do estado redox indica que os tecidos sofrem lesões oxidativas desde o momento da coleta, contudo, níveis de antioxidantes acompanham este aumento.
- ✓ O aquecimento ativa diferentemente os mecanismos redox nos tecidos estudados resultados de taxas de diferentes lesões lipídicas ou proteicas nestes tecidos em relação a temperatura ambiental.
- ✓ A proteína Hsp70 é ativada durante o aquecimento, porém decai no experimento da TCS, comprovando sua desnaturação em temperaturas subletais.
- ✓ O período de descanso depois da coleta provoca a diminuição da expressão da Hsp70 nos dois tecidos estudados, indicando que o estresse de captura influencia os resultados.

7. REFERÊNCIAS:

ABRAVAYA, K., PHILLIPS, B., & MORIMOTO, R. 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 & development*, 5(11), 2117-2127. 1991

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

ALMEIDA, S.S.N, COSTA,C.G, PAULA, F.G descrição histológica de órgãos viscerais de tilápia (*oreochromis niloticus*) 2015

ALTRINGHAM, J. D; JOHNSTON, I. A. Quantitative histochemical studies of the peripheral innervation of cod (*Gadus morhua*) fast myotomal muscle fibres 1981.

ANDRÉ L. B et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Nova, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S., DAVID, J. M., & DAVID, J. P. D. L. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. 2006

BASU,S., A. BANERJEE, AND R. J. Mooney. Semi-supervised clustering by seeding. In Proceedings of 19th International Conference on Machine Learning (ICML-2002), pages 19–26, 2002.

BAUMGARTNER, G., et al. Peixes do baixo rio Iguaçu [online]. Maringá: Eduem, 2012.

BEITINGER, T.L., BENNETT, W.A., MCCAULEY, R.W. Temperature tolerance of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environ. Biol. Fish.* 58, 237–275. 2000

BETTOLI, P.W., W.H. NEILL & S.W. KELSCH. Temperature preference and heat resistance of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes), bighead carp, *Hypophthalmichthys nobilis* (Gray), and their F1 hybrid. *J. Fish Biol.* 27: 239–247. 1985

BENEVIDES, L.E.E. Indicadores fisiológicos de estresse e expressão do gene hsp70 em juvenis do pacu (*piaractus mesopotamicus*) após implante de cortisol. Jaboticabal, São Paulo. 2013.

BENZIE, I.F; FSTRAIN, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry.* v.239, p.70-76, 1996.

BONDESEN, B.A.; MILLS, S.T.; KEGLEY, K.M.; PAVLATH, G.K. The COX-2 pathway is essential during early stages of skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*, v. 287, p. C475-C483, 2004.

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

CAGLIARI, T. C. Análise da expressão de chaperonas moleculares em plantas e clonagem, purificação e caracterização inicial das proteínas Hsp100 e Hsp90 de cana-de-açúcar. 2009.

CARANI, F.R, AGUIAR, D.H. Morfologia e crescimento do músculo estriado esquelético no pirarucu, Cuvier, 1817. - repositorio.unesp.br. 2008

CARDOSO, C. M. Expressão histoimunológica de proteínas de reparo e comportamento de juvenis *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae) durante aumento gradual da temperatura. 2013. 95f. Tese (Mestrado)- Instituto Oceanógrafo da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2015

CHIRICO, W.J et al. 70 k heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature*, v. 332, p.805–810, 1988.

COCKING, A.W.. The effect of high temperatures on roach (*Rutilus rutilus*). II: The effect of temperature increasing at a known constant rate. *J. Exp. Biol.* 36, 217–226. 1959

COUTINHO, C. F., TANIMOTO, S. T., GALLI, A., GARBELLINI, G. S., TAKAYAMA, M., DO AMARAL, R. B., ... & MACHADO, S. A. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. *Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente*, 15. 2005.

COWLES, R. B; BOGERT, C.M. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. *Bul. Amer. Mus. Nat. Hist.*, v83 p.265-296, 1944.

COSTA, K. B. Efeitos do tempo de congelamento da amostra na estabilidade de biomarcadores de estado redox no gastrocnemio, coração e cérebro de camundongos swiss submetidos a uma sessão de exercício máximo. 2017

CRISTINA, A. M. Expressão de proteínas de estresse (hsp70) no camarão dulcícola eurihalino *macrobrachium acanthurus* submetido a estresse térmico. 2012.

CURRIE, S. Heat shock proteins and temperature. *Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment*. Ed: Elsevier, 2266p, 2011.

EIGENMANN, C.H. Preliminary descriptions of new genera and species of tetragonopterid characins (Zoological Results oh the Thayner Brazilian expedition). *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College* v. 52, p. 91-106 1908.

ELLIS, J. "Proteins as molecular chaperones." *Nature* 328 - 378-379. 1987

ELLIS, R.J. HARTL. Principles of protein folding in the cellular environment. *Curr. Opin. struct boil*, v.9, p.102-110, 1999.

FARRELL, A.J. JONES. R. *Fifth Physiology: The cardiovascular system*, San Diego: Academic Press. p.88 1992.

FARRELL, A.P. Tribute to P.L. Lutz: a message from the heart- why hypoxic bradycardia in fishes? *J. Esp. Biol.*, 210, p.1715-1725, 2007

FIELDS, R., S.S. LOWE, C. KAMINSKI, G.S. WHITT & D.P. PHILIPP. Critical and chronic thermal maxima of northern and Florida largemouth bass and their reciprocal F1 and F2 hybrids. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 116: 856–863. 1987

FILIPPIN, L.I., MOREIRA, A.J, XAVIER, R. M, Nitric oxide and repair os skeletal musclu injury. *Nitric oxide-Biology Chemirtry* p. 157-63 2009

FINK, et al. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol*, v.79, p.425-449, 1999.

FULLER K J., ISSELS R D., SLOSMAN D O., GUILLET J G., SOUSSI T., POLLA B S.. Cancer and the heat shock response. *European Journal of Cancer*. 30(12): P.1884-1891. 1994

FRY, F.E.J. Effects of the environment on animal activity. *Univ. Toronto Studies in Biol.*, Series No. 55, Publ. Ont. Fish. Res. Lab. 68: 1–62. 1947

GEETHING, M.J., SAMBROOK, J., Protein folding in the cell. *Nature* 355, 33–45 1992

GRANKVIST, K.; MARKLUND, S.L.; TÄLJEDAL, I.B. CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *The Biochemical Journal*. v. 199, n. 2, p. 393-398, 1981.

GONÇALVES.A.A, SOARES. L.A.S Lipídios em peixes. *Revista Vetor*. researchgate.net - 1998

GUTIERRE, S. M. M. Ferramentas fisiológicas para avaliação do potencial invasor de peixes dulcícolas. 2011

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine.4^a ed. *Oxford University Press*. 2007.

HARTZ, S. M et al. Alimentação de *Astyanax Baird & Girard*, 1854 ocorrentes na Lagoa do Caconde, RS, Brasil (Teleostei, Characidae). *Revista Unimar*, v. 18, n. 2, p. 269-281, 1996.

HEATH, S., W.A. BENNETT, J. KENNEDY & T.L. BEITINGER. Heat and cold tolerance of the fathead minnow, *Pimephales promelas*, exposed to the synthetic pyrethroid cyfluthrin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51: 437–440. Q1994

HOFMANN GE, TODGHAM A., E. Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annu. Rev. Physiol.* 72:127–45 2010

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE – IPCC. *Climate Change – the Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the IPCC.* 2014

ICMBio. Plano de Manejo do Parque Nacional da Sempre-Vivas. 2016

JL, L.L. Exercise-induced oxidative stress in the heart. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. p. 689-711, 2000.

JORGE, E. C. Anatomia dos peixes. Curitiba. *Journal of Comparative Physiology_ A*, 143(1), 123-127. 2009

LAFONTANT, P. J., BURNS, A. R., GRIVAS, J. A., LESCH, M. A., LALA, T. D., REUTER, S. P., & FROUNFELTER, T. D. The giant danio (*D. aequipinnatus*) as a model of cardiac remodeling and regeneration. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 295(2), 234-248. 2012

LEVINE, R.L et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods in enzymology*. v. 233, p. 346-357, 1994.

LINDQUIST. S. ; CRAIG E A. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*. 22: 631-677, 1988.

LINS, J.A.P.N ; KIRSCHNIK, P.G. FALTA O TÍTULO - *Revista Acadêmica* , 2010.

MARENGO, MC . Caracterização do clima no Século XX e Cenário de Mudanças de clima para o Brasil no Século XXI usando os modelos do IPCC-AR4JA - *Revista Multiciência*, 2007.

KIANG, J. G. ; TSOKOS, G. C. Heat shock protein 70 kDa: *molecular Biology*, Elsevier 1998

KONGTORP, R. T., TAKSDAL, T., LYGØY, A., Pathology of heart and skeletal muscle inflammation (HSMI) in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* - *Diseases of Aquatic Organisms*, 2004

MARASCH .A.C.C, Expressão de proteínas de estresse (HSP70) no camarão dulcícola eurialino *Macrobrachium acanthurus* submetido a estresse térmico acervodigital.ufpr.br 2012

MARENGO, JOSE A., AND MARIA C. VALVERDE. "Caracterização do clima no Século XX e Cenário de Mudanças de clima para o Brasil no Século XXI usando os modelos do IPCC-AR4." *Revista Multiciência* 8 5-28. 2007

MATTHEWS, W.J. & J.D. MANESS. Critical thermal maxima, oxygen tolerance and success of cyprinid fishes in a southwestern river. *Amer. Midl. Nat.* 102: 374–377. 1979

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. v. 47, p. 469-474, 1974.

MEDEIROS ET AL.. Avaliação das condições hídricas por meio do panorama de mudanças climáticas em Cabaceiras-PB.2012

MORA, C.; MAYA, M.F. Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method . *Journal of Thermal Biology* 2006

MOREIRA, C. Sistemas de transporte nos animais. *Revista de Ciência Elementar*, 1(01):0008, 2013.

MUNFORD. S; ET AL *Fish Histology and Histopathology*. 2007

MURUNGAIN. P, RAMAMURTHY, V. KARMERGAM. N. Efect of temperature oh the behaviural and physiological responses oj catfish, *mystus gulio* (Hamilton). *Jounarl of Appleid Sciencies Research* p.1454-1457, 2008

1

NELSON, D.P.; KIESOW, L.A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with Molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*. v.49, p.474-478, 1972.

NERY, L.E.M, CASTRUCCI, A.M. Pigment cell signalling for physiological color change. *Caomparative Biochemistry- Elsevier* 1997

NIEL, MARCELO. Anestesiologistas e uso de drogas: um estudo qualitativo. 149 f . Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo. 2012.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in animal tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*. v. 95, p. 351-358, 1979..

OLSON, K.R.; FARREL, A.P. The cardiovascular system. In: Evans, D.H Claiborne, The physiology of fishes, 3 ed. Taylor e Francis Group, USA p.119-152, 2006

PATRINO, M. et al. Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anat. Embryol.* 198, 487-504, 1998.

PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. 1996.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T. G; CHRISTIE, P. Recovery of the brown trout, *salmo l.*, from acute handling stress: a time course study. *J fish Biol.*, v.20. p. 229-244 1982

PÖRTNER H.O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part* 2001

PÖRTNER H.O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, 132: 739–761, 2002.

POSS, Kenneth D.; WILSON, Lindsay G.; KEATING, Mark T. Heart regeneration in zebrafish. *Science*, v. 298, n. 5601, p. 2188-2190, 2002.

POWERS, S.K.; JACKSON, M.J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological reviews*. v. 88n. 4, p. 1243-1276, 2008.

RADAK, Z.; TAYLOR, A.W.; OHNO, H.; GOTO, S. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. *Exercise immunology review*, v. 7, p. 90-107, 2001.

REITE, O.B.; EVENSEN, O. Inflammatory cells os telesntean fish: a review focusing on mast cells/eosinophilic granulocyte cells and rodlet cells. *Fish Shemmfish Immunol*. V.20, p.192-208, 2006

REYES, I et al. Thermoregulation, temperature tolerance and oxygen consumption in the Mexican bullseye puffer fish, *Sphoeroides annulatus* Jenyns (1842), acclimated to different temperatures. 2011.

RIBEIRO, L. S., ALMEIDA, S. S.N, descrição histológica de órgãos viscerais de tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*) – Enciclopédia Biosfera. 2016

SAADI, A. A geomorfologia da Serra do Espinhaço em Minas Gerais e de suas margens. *Geonomos*, Belo Horizonte-MG, v. 3, n. 1, p. 41-63, 1995.

SANDERS, B.M. NGURYE, J. DOUGLASS, T.G.; MILLER, S. Heat-inducible proteins that react with antibodies to chaperonin 60 are localized in the nucleus of fish cell line. *Biochem. J*, v.297, n Pt, p 21 1994

SANDRINI NETO, Leonardo. Avaliação da contaminação por hidrocarbonetos em distintos níveis de organização biológica. 2015.

SANTOS, V.B. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. *Revista acadêmica. Periódicos Puc*, 2007.

SARTÓRIO, P. V. Expressão histoimunológica de proteínas relacionadas à hipóxia tecidual em juvenis de *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae)

em função do aquecimento gradual de temperatura.2013. 136f. Tese (Mestrado)- Instituto Oceanógrafo da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2013

SIES, H.; JONES, D. Oxidative stress.*Encyclopedia of Stress*, 2ª ed, p.45-48, 2007.

SILVA, E.L., R. FUGI & N.S. HAHN. 2007. Variações temporais e ontogenética na dieta de um peixe onívoro em ambiente impactado (reservatório) e em ambiente natural (baía) da bacia do rio Cuiabá. *Acta Sci. Biol. Sci. Maringá* 29: 387-394.

SOMERO, G. N. Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animal optima, limits and costs of living. *Com. Biol*, v.42, p 780-789, 2002

SOUZA, J. P. Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzuron para daphnia magna, poecilia reticulata e lemna minor na ausência e presença de sedimento. Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita Filho” centro de aquicultura – Caunesp. 2010.

TAGGART, J. B.; FERGUSON, A. Hypervariable minisatellite DNA single locus probes for the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. **Journal of Fish Biology**, v. 37, n. 6, p. 991-993, 1990.

THOMAZ, J. M., Habitat, hábito e morfologia cardíaca: influencia destes fatores sobre as respostas cardiorrespiratórias a hipóxia e alterações térmicas em espécies de peixe. Repositório.usfcar.br 2011

VALKO, M., IZAKOVIC, M., MAZUR, M., RHODES, C. J., & TELSNER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 266, 37–56. 2004

VASCONCELOS, A.B.S. Efeito fotobiomodulador da terapia com diodo emissor de luz de baixa intensidade na inflamação muscular induzida por exercício em ratos. ri.ufs.br 2017

WATENPAUGH, D.E., T.L. BEITINGER & D.W. HUEY. Temperature tolerance of nitrite-exposed channel catfish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 114: 274–278. 1975

WU, M.X.; BIAN, Q.N.; LIU, Y.Z.; FERNANDES, A.F.; TAYLOR, A.; PEREIRA, P.; SHANG, F. Sustained oxidative stress inhibits NF- κ B activation partially via inactivating the proteasome. *Free radical Biology and Medicine*.v. 46, n. 1, p. 62–69, 2009.

ZUASTI A, JR JARA, C FERRER Occurrence of melanin granules and melanosynthesis in the kidney of *Sparus auratus* *Pigment Cell & ...*, 1989 - Wiley Online Library