

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Caroline Reis Pereira

**AQUECIMENTO X RESPOSTAS FISIOLÓGICAS: Mecanismos de estabilidade
térmica em *Astyanax brevirostris* (Teleostei, Characidae)**

Diamantina

2018

Caroline Reis Pereira

**AQUECIMENTO X RESPOSTAS FISIOLÓGICAS: Mecanismos de estabilidade
térmica em *Astyanax brevirostris* (Teleostei, Characidae)**

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

Orientador: Prof. Dr. Alex Sander Dias Machado

Diamantina

2018

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

P436a

Pereira, Caroline Reis

Aquecimento x respostas fisiológicas: mecanismos de estabilidade térmica em *Astyanax brevirostris* (Teleostei, Characidae) / Caroline Reis Pereira. – Diamantina, 2018.
86 p. il.

Orientador: Alex Sander Dias Machado

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

1.Comportamento. 2.Histopatologia. 3.Desequilíbrio redox.
4. Imuno-histoquímica. Hsp70. I. Machado, Alex Sander Dias.
II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

CDD 577.7

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618

CAROLINE REIS PEREIRA

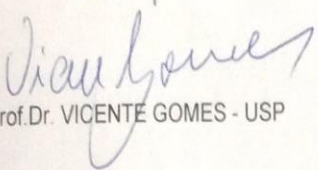
**Aquecimento x Respostas fisiológicas: Mecanismos de estabilidade
térmica em *Astyanax brevirostris* (Teleostei, Characidae)**

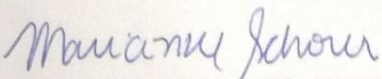
Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM BIOLOGIA ANIMAL,
nível de MESTRADO como parte dos
requisitos para obtenção do título de
MAGISTER SCIENTIAE EM
BIOLOGIA ANIMAL

Orientador : Prof. Dr. Alex Sander Dias
Machado

Data da aprovação : 22/05/2018


Prof.Dr. ALEX SANDER DIAS MACHADO - UFVJM


Prof.Dr. VICENTE GOMES - USP


Prof.Dr.ª MARIANNE SCHORER - UFVJM

Aos meus pais, por todo o amor...

AGRADECIMENTOS

Como o tempo voou... Há pouco mais de 24 meses atrás fui morar fora de casa pela primeira vez. Mesmo com tantas incertezas sentia a todo o momento que era a melhor coisa a se fazer... E realmente foi.

Tento aqui, resumir o sentimento de gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para que a minha passagem por essa cidade que enche meus olhos e meu coração fosse tão incrível.

Gostaria de agradecer a Deus pela oportunidade do recomeço... Por me guiar com tanto amor por essa caminhada.

Aos meus pais, por perdoarem a minha ausência ao longo desse tempo. Pelo incentivo e motivação, pelo amor mais puro e verdadeiro que já pude sentir.

Ao Léo, companheiro de longos anos, pelo amor, carinho e paciência. Pelo cuidado, mesmo de longe.

Ao professor Alex Sander Dias Machado, pela confiança, amizade, entusiasmo em ensinar... Uma das almas mais nobres e humildes no “mundo acadêmico” que tive a sorte e oportunidade de conhecer. Muito obrigada por tudo, Professor!

A Riccelly, por sua amizade e companhia. A quem tive a oportunidade de compartilhar os trabalhos, anseios, erros e acertos. Fui grandemente presenteada com a sua amizade e posso afirmar, que a minha caminhada não seria tão prazerosa sem a sua ajuda e companhia. Obrigada pela amizade, confiança e carinho...

A Ana e Fabi, por tornarem as rotinas de laboratório e campo mais leves e descontraídas. Pelos desabafos, conselhos e risadas...

A Roberta Vasconcelos, pelo acolhimento, carinho e amizade.

Ao meu primo Alexandre, por compartilhar comigo uma parte dessa experiência... Pelas viagens para casa, sempre cheias de risadas e boas lembranças.

A Fernanda, a quem o destino sempre se encarrega de fazer nossos caminhos se cruzarem. Obrigada pela amizade de décadas, pelos momentos de grandes risadas e de mesa farta.

Ao NEA, em especial a professora Thaís Machado, por todo acolhimento e ensinamentos durante o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao laboratório de aquicultura, em especial ao professor Marcelo, Marianne e Thalita, por todo suporte e cordialidade durante o desenvolvimento dos nossos experimentos.

Ao BioEx, em especial a professora Etel, por abrir as portas do seu laboratório para a nossa pesquisa. A Karine e Bruna, por se dedicarem tanto ao nosso trabalho. Obrigada, meninas!

Ao Laboratório de Biologia Evolutiva, Sistemática e Ecologia; em especial ao professor Thiago e a Renata, por serem tão solícitos e por sempre nos lembrar de que lá também é a nossa “casa”.

Ao ICMBio por todo suporte e logística durante as coletas.

Ao Márcio Lucca, pela gentileza de nos conduzir mensalmente ao parque, por auxiliar nas coletas e pela descontração e ensinamentos.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Animal, pela oportunidade.

A instituição, pela bolsa concedida.

A Diamantina, por me acolher tão bem e me fazer sentir em casa.

Volto para casa com o sentimento de dever cumprido, levando em meu coração muito mais do que pude deixar para trás.

Muito obrigada!!!

"No mesmo instante em que recebemos pedras em nosso caminho, flores estão sendo plantadas mais longe. Quem desiste não as vê."

William Shakespeare

RESUMO

A temperatura é um dos fatores que mais influencia o funcionamento celular de organismos no meio aquático. Por serem ectotérmicos, as variações na temperatura da água interferem potencialmente todos os processos fisiológicos e comportamentais dos peixes. Este estudo teve como objetivo relacionar o aquecimento ambiental às respostas comportamentais, alterações histopatológicas e a ativação de mecanismos moleculares de termoestabilidade celular nas brânquias e fígado de peixes da espécie *Astyanax brevirostris*. Os animais foram submetidos ao aquecimento controlado, partindo dos 20°C, temperatura ao qual foram coletados, até que cada tanque atingisse as temperaturas de 24°C, 28°C e 32°C, onde permaneceram por 120 minutos. Para determinar a temperatura crítica de sobrevivência, animais foram submetidos ao aquecimento gradual por tempo indeterminado, até apresentarem parada de batimento opercular. O comportamento foi analisado a partir de filmagens. Após o tempo de cada experimento, os animais foram eutanasiados e seus tecidos fixados para as análises de histologia, histopatologia, estado redox e imuno-histoquímica; para avaliar a expressão da proteína de estresse Hsp70. Os resultados demonstraram que os animais apresentaram alterações em seu comportamento, respiração, equilíbrio e natação devido ao aquecimento. O aquecimento também promoveu alterações histopatológicas como hiperplasia e hipertrofia celular, vasodilatação, descolamento do epitélio, necrose celular e tecidual. O estudo do estado redox das brânquias demonstrou que o aumento da temperatura ocasionou maior peroxidação lipídica e dano oxidativo a proteínas, além de promover a diminuição da capacidade antioxidante não enzimática. No fígado, a peroxidação lipídica, a capacidade antioxidante não enzimática e a atividade antioxidante diminuíram com o aquecimento. A análise da expressão da Hsp70 nos tecidos demonstrou relação qualitativa com o aumento da temperatura. É possível concluir que o aquecimento ambiental promove alterações que provocam desequilíbrio homeostático, refletido em todos os níveis orgânicos: comportamental, tecidual, estado redox e expressão de Hsp70 celular na espécie estudada.

Palavras-chave: Comportamento. Histopatologia. Desequilíbrio redox. Imuno-histoquímica. Hsp70.

ABSTRACT

The temperature is one of the factors that most influence the cellular functioning of organisms in the aquatic environment. Because they are ectothermic, water temperature variations potentially interfere with all fish's physiological and behavioral processes. This study aimed to relate environmental warming to behavioral responses, histopathological changes and the activation of molecular mechanisms of cellular thermostability in the gills and liver of fish of the species *Astyanax brevirostris*. The animals were subjected to controlled heating, starting at 20°C, at which temperature they were collected, until each tank reached temperatures of 24°C, 28°C and 32°C, where they remained for 120 minutes. To determine the survival critical temperature, the animals were exposed to gradual warming for undefinable period of time, until they present an opercular beating stop. The behavior was analyzed from filming. After the time of each experiment, the animals were euthanized and their tissues fixed for analysis of histology, histopathology, redox state and immunohistochemistry; to evaluate the expression of the Hsp70 stress protein. The results indicate that the animals showed changes in their behavior, breathing, balance and swimming due to warm up. Warming also promoted histopathological alterations such as hyperplasia and cellular hypertrophy, vasodilation, epithelial detachment and cellular and tissue necrosis. The study of the redox state of the gills showed that the increase in temperature caused greater lipid peroxidation and oxidative damage to proteins, besides promoting the reduction of the non-enzymatic antioxidant capacity. In the liver, lipid peroxidation, non-enzymatic antioxidant capacity and antioxidant activity decreased with heating. Analysis of the expression of Hsp70 in the tissues demonstrated a qualitative relationship with the increase in temperature. It is possible to conclude that the environmental heating promotes changes that cause homeostatic imbalance, reflected in all organic levels: behavioral, tissue, redox state and expression of cellular Hsp70 in the studied species.

Keywords: Behavior. Histopathology. Redox imbalance. Immunohistochemistry. Hsp70.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - (A) Localização do Parque Nacional das Sempre-Vivas (Fonte: Google Maps). (B) Córrego Inhaí.....	27
Figura 2 - Amostragem, processamento do material e acondicionamento dos peixes para o experimento	28
Figura 3 - Tamanho médio (mm) e desvio padrão dos indivíduos de <i>A. brevirohinus</i> utilizados nos grupos teste e controle durante os experimentos de aquecimento.	40
Figura 4 - Valores médios das pontuações dos critérios de análise de comportamento: Equilíbrio, natação e batimento opercular.....	42
Figura 5 - Porcentagem de indivíduos mortos em função da temperatura crítica de sobrevivência (°C).	43
Figura 6 - Macroscopia e microscopia da brânquia de <i>A. brevirohinus</i>	45
Figura 7 - Macroscopia e microscopia do tecido hepático de <i>A. brevirohinus</i>	47
Figura 8 - Histopatologia das brânquias de animais submetidos a diferentes temperaturas	49
Figura 9 - Histopatologias do tecido hepático de <i>A. brevirohinus</i>	51
Figura 10 - Parâmetros de estado redox das brânquias de animais do controle ambiental (CA), controle experimental (CE) e animais submetidos ao aquecimento.....	52
Figura 11 - Parâmetros de estado redox no fígado de animais do controle ambiental (CA), controle experimental (CE) e animais submetidos ao aquecimento.....	54
Figura 12 - Expressão da proteína Hsp 70 em brânquias de animais submetidos ao aquecimento.....	55

Figura 13 - Expressão da proteína Hsp 70 no fígado de animais submetidos ao aquecimento 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Critérios de comportamento	31
Tabela 2 - Classificação das fases comportamentais.....	31
Tabela 3 - Valores da porcentagem de saturação de oxigênio (OS) dissolvido e pH nos grupos experimentais (T24°C, T28°C, T32°C e TCS) e controle (C24°C, C28°C, C32°C e CTCS) aferidos no início e no final de cada experimento	39

LISTA DE SIGLAS

ATP – Trifosfato de adenosina

BioEx – Laboratório de Biologia Molecular e do Exercício

BSA - *Bovine serum albumin*

CAT - Catalase

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm – Centímetro

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal-

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNPH - Dinitrofenilhidrazina

DP – Desvio padrão

DZO - Departamento de zoologia

EC - *Enzyme commission number*

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ERO - Espécies reativas de oxigênio

EUA - Estados Unidos da América

Fe²⁺ - Íon ferroso

Fe³⁺ - Íon férrico

Fe³⁺-TPTZ - Ferri–tripiridiltriazina

Fe²⁺-TPTZ - Ferroso–tripiridiltriazina

FRAP - *Ferric Reducing Antioxidant Power*

HCl – Ácido clorídrico

HE: Hematoxilina e Eosina

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HO• - radical hidroxila

Hsp – *Heat shock proteins*

Hsp70 - *Heat shock proteins 70*

IHQ - Imuno-histoquímica.

M - Molar

MDA - Malondialdeído

mg - miligrama

mL - mililitro

μl - Microlitros

μm - Micrômetro

mm - Milímetro

mg - Miligrama

mM - milimolar

nm – nanômetro

NEA – Núcleo de Experimentação Animal

min - minuto

nmol - Nanomol

O₂ – Oxigênio

O₂⁻ - ânion superóxido

¹O₂ - oxigênio singlete

PBS - Tampão fosfato salina

pH - Potencial hidrogeniônico

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - *Thiobarbituric Reactive Substances*

TCS - Temperatura crítica de sobrevivência.

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

UV - Ultravioleta

IHQ - Imuno-histoquímica.

W - watt

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo geral	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Área de estudo	27
3.2 Amostragem e manutenção dos peixes para os experimentos em laboratório	27
3.3 Parâmetros físico-químicos da água	29
3.4 Procedimentos experimentais	29
3.4.1 <i>Elevação gradual da temperatura</i>	29
3.4.2 <i>Temperatura crítica de sobrevivência (TCS)</i>	30
3.4.3 <i>Análise Comportamental</i>	30
3.5 Análises histológicas	32
3.5.1 <i>Preparação dos blocos para microscopia</i>	32
3.5.2 <i>Hematoxilina e Eosina (HE)</i>	32
3.6 Biomarcadores do estado redox	33
3.6.1 <i>Análise dos parâmetros redox</i>	33
3.6.2 <i>Análise da peroxidação lipídica</i>	33
3.6.3 <i>Derivados carbonílicos em proteínas</i>	34
3.6.4 <i>Atividade da enzima CAT</i>	35
3.6.5 <i>Atividade da enzima SOD</i>	35
3.6.6 <i>Capacidade antioxidante não enzimática</i>	35
3.6.7 <i>Dosagem de proteínas</i>	36
3.7 Imuno-histoquímica	36
3.8 Análises Estatísticas	37
4 RESULTADOS	39
4.1 Parâmetros físico-químicos da água	39
4.2 Tamanho dos indivíduos	40

4.3 Análises comportamentais	40
4.3.1 <i>Elevação gradual da temperatura</i>	40
4.3.2 <i>Temperatura crítica de sobrevivência (TCS)</i>	42
4.4 Análises histológicas.....	44
4.4.1 <i>Histologia das brânquias</i>	44
4.4.2 <i>Histologia do fígado</i>	446
4.4.3 <i>Histopatologia das brânquias</i>	48
4.4.4 <i>Histopatologia do fígado</i>	50
4.5 Biomarcadores do estado redox	51
4.6 Imuno-histoquímica	54
5 DISCUSSÃO	57
5.1 Comportamento.....	57
5.2 Morfologia	58
5.2.1 <i>Histologia e histopatologia das brânquias</i>	58
5.2.2 <i>Histologia e histopatologia do fígado</i>	61
5.3 Estado Redox	63
5.4 Imuno-histoquímica	64
6. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69
ANEXOS	81

1 INTRODUÇÃO

As condições do ambiente exercem efeitos significativos sobre a fisiologia dos organismos (HANNA *et al.*, 2008). As alterações ambientais têm afetado negativamente a maioria dos sistemas biológicos do planeta, modificando as condições físicas dos ambientes e como consequência promovendo alterações no bem-estar e na sobrevivência das espécies (ACEVEDO-WHITEHOUSE; DUFFUS, 2009).

A temperatura controla quase todas as reações químicas e biológicas nos organismos e é, portanto, uma forte influência sobre os sistemas em todos os níveis (MCCULLOUGH *et al.*, 2009). Em ambientes aquáticos, ela é uma das variáveis ambientais mais importantes, pois afeta diretamente o metabolismo e como consequência o consumo de oxigênio, crescimento, sobrevivência (JIAN *et al.*, 2003), reprodução, atividade natatória e distribuição dos organismos (PÖRTNER, 2002).

A temperatura influencia todos os níveis de organização biológica. Cada espécie possui um limite de tolerância térmica, seja ela máxima ou mínima e temperaturas ótimas para que os processos fisiológicos ocorram (REBOUÇAS *et al.*, 2014). Nos peixes, por serem ectotérmicos, a temperatura corporal está diretamente relacionada a temperatura da água; assim, quaisquer oscilações térmicas influenciam todos os seus processos fisiológicos (PANG *et al.*, 2011; WALBERG, 2011). À medida que a temperatura da água aumenta, a maior energia cinética das reações bioquímicas acelera os processos metabólicos, afetando a fisiologia e o comportamento desses organismos (ANGILLETTA, 2009; ABRAM *et al.*, 2016).

O comportamento dos peixes é determinado pelos limites fisiológicos de cada espécie (BEITINGER *et al.*, 2000). Em resposta ao estresse, além da atividade metabólica, a natação e o batimento opercular são intensificados, promovendo um aumento do fluxo sanguíneo branquial e na capacidade de difusão e transporte de oxigênio pelo sangue, o que leva a uma maior captação de oxigênio (OBA *et al.*, 2009). Porém, em temperaturas próximas a letal, o colapso fisiológico nesses organismos leva a perda de equilíbrio, espasmos e o parada nos batimentos operculares (CARDOSO, 2013). Assim, o comportamento dos peixes em resposta a oscilações térmicas é essencial para compreender como eles são capazes de responder e se ajustar a variações de temperatura do meio aquático (CARDOSO *et al.*, 2015).

Além do comportamento, a histologia de órgãos que reagem a estímulos específicos também constitui uma ferramenta sensível à detecção de alterações do ambiente

(CAJARAVILLE *et al.*, 2000). As brânquias de peixes apresentam uma grande superfície de contato com o meio externo e são particularmente sensíveis às alterações do ambiente aquático (FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011). Assim, elas são um excelente parâmetro para avaliar os efeitos de variáveis ambientais, substâncias tóxicas e qualidade da água (MAZON *et al.*, 2002). O fígado é considerado um órgão-alvo e de grande importância para os peixes, pois participa dos processos de biotransformação e eliminação de xenobióticos e, por isso, também pode ser utilizado em biomonitoramentos devido à sua alta sensibilidade (THOPHON *et al.*, 2003).

Com o aumento da temperatura em ambientes aquáticos, a solubilidade dos gases dissolvidos na água diminui ao mesmo tempo em que a demanda por oxigênio pelos organismos aumenta (SOUZA, 2013). Os peixes compensam essa falta de oxigênio aumentando a taxa de ventilação, promovendo um aumento no consumo desse gás (ROSSO *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2009). O aumento da atividade respiratória pode levar à produção de subprodutos reativos que podem ser tóxicos e gerar danos (KEHRER, 1993). Esses metabólitos reativos são conhecidos como espécies reativas, onde incluem os radicais livres (COSTA, 2017).

Os radicais livres podem ter origem através metabolismo aeróbico celular normal, e podem ser gerados também por reações anormais estimuladas por doenças e por xenobióticos (SIES, 1986). Eles são moléculas ou átomos com número de elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa, conferindo-os alta reatividade e meia vida curta (KEHRER, 1993). Esses elétrons, quando centrados no oxigênio, recebem o nome de espécies reativas de oxigênio (ERO). Elas podem ter natureza radicalar, representadas principalmente pelo ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila (HO^{\bullet}); e não radicalares, como o oxigênio singlete (1O_2) e pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARREIROS *et al.*, 2006).

No organismo, os radicais livres estão relacionados a produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, o seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios da membrana celular, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIROS *et al.*, 2006; ALVES *et al.*, 2010).

Mecanismos endógenos e exógenos, conhecidos como antioxidantes atuam na tentativa de minimizar os efeitos lesivos das ERO nos tecidos. Os antioxidantes são substâncias que atrasam, previnem ou removem o dano oxidativo a uma molécula alvo a fim de manter a integridade celular e um correto funcionamento do organismo (HALLIWELL;

GUTTERIDGE, 2007). As enzimas antioxidantes têm o papel de converter os oxidantes em moléculas menos reativas (CANTIN *et al.*, 2012). Dentre os antioxidantes enzimáticos, se destacam a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT).

A SOD catalisa a dismutação do superóxido, um radical altamente reativo, em outro com menor reatividade, que é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (POWERS; JACKSON, 2008). A enzima CAT tem como função catalisar a quebra do H_2O_2 em água e O_2 utilizando como cofator o Fe^{+3} (YOUNG; WOODSIDE, 2001; POWERS; JACKSON, 2008).

O desequilíbrio entre essas espécies reativas (oxidantes) e antioxidantes, em favor dos oxidantes, leva a perturbação da sinalização celular e do controle redox e a danos moleculares, situação está denominada desequilíbrio redox (FILIPPIN *et al.*, 2008). A oxidação de biomoléculas leva a produção de metabólitos específicos que podem ser usados como biomarcadores de estado redox, já que as ERO têm, em sua maioria, meia vida curta e reagem rapidamente com as biomoléculas. Tais marcadores são derivados principalmente da oxidação de lipídios, proteínas e DNA (COSTA, 2017).

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) são utilizadas para quantificar produtos de peroxidação lipídica em células, tecidos e fluidos corporais (LANDAU *et al.*, 2013). O malondialdeído (MDA) um dos produtos da peroxidação lipídica é reativo ao TBARS, sendo assim, um potencial biomarcador da ação de radicais livres (DEL RIO *et al.*, 2005; ANTUNES *et al.*, 2008). O conteúdo carbonílico de proteínas, produto da peroxidação de aminoácidos, também é utilizado como marcador de dano oxidativo em proteínas, sob a ação de radicais livres (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Outro método de estudo para detecção de estresse fisiológico é através da análise das proteínas de choque térmico (Hsp - *Heat shock proteins*) (TOMANEK, 2008). As Hsp são uma família de proteínas celulares produzidas por grande parte dos organismos, incluindo os peixes. Elas são conhecidas como chaperonas moleculares, pois, interagem com outras proteínas auxiliando no dobramento, montagem, translocação e degradação durante o crescimento e desenvolvimento celular (WANG *et al.*, 2004), permitindo que os organismos se adaptem a estressores ambientais (KAYHAN; DUMAN, 2010). Em condições adversas como o aumento de temperatura e o estresse osmótico ou oxidativo, os níveis de Hsp são aumentados, auxiliando a identificação e facilitando o redobramento de proteínas danificadas. Em casos cujos danos não podem ser reparados, elas facilitam a sua eliminação. As Hsp contribuem também para o desenvolvimento de novas proteínas que irão substituir aquelas

afetadas pelo estresse metabólico (BUKAU; HORWICH, 1998; MEYER; BUKAU, 2005; CASTRO *et al.*, 2013).

Entre as diferentes proteínas que compõem as Hsp, a família das Hsp70 é a mais fortemente induzida por fatores estressantes (MACARIO *et al.*, 1999). A Hsp70 ocorre em resposta a diversos estressores ambientais e patológicos e está comumente associada ao estresse térmico (KIANG; TSOKOS, 1998; CARDOSO, 2013). Tais respostas mediante as diversas formas de estresse fazem com que a Hsp70 seja amplamente utilizada em biomonitoramentos (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2003).

A atuação dos antioxidantes mediante ao desequilíbrio redox e a atividade das Hsp em resposta ao estresse, promovem proteção molecular em temperaturas extremas, influenciando assim o período de sobrevivência de determinadas espécies ao aquecimento (PÖRTNER, 2002).

A família Characidae possui um elevado número de espécies e ampla distribuição geográfica (BAUMGARTNER *et al.*, 2012). Peixes do gênero *Astyanax*, popularmente conhecidos como Lambaris, pertencem a essa família e distribuí-se por praticamente toda a região Neotropical, onde habitam os mais diversos ambientes, sendo um dos gêneros dominantes na América do Sul (KAVALCO, 2008). As espécies pertencentes a ele apresentam pouca diferenciação morfológica, ecológica e comportamental e são amplamente utilizadas em estudos ecotoxicológicos, tanto *in vivo* quanto *in situ* (OSÓRIO, 2016). A espécie *Astyanax brevirostris*, Eigenmann, 1908, utilizada como modelo neste estudo, apresenta distribuição restrita a Bacia do Jequitinhonha (LIMA *et al.*, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo é relacionar o aquecimento ambiental as respostas comportamentais, alterações histopatológicas e a ativação de mecanismos moleculares de termoestabilidade celular em *Astyanax brevirostris*.

2.2 Objetivos específicos

- Descrever a histologia das brânquias e fígado de *A. brevirostris*;
- Analisar o comportamento e a fisiologia de animais submetidos à exposição experimental ao aumento gradual da temperatura;
- Analisar a histopatologia das brânquias e do fígado dos animais, após a exposição experimental ao aumento gradual da temperatura;
- Avaliar os parâmetros do estado redox; como o dano oxidativo a lipídeos e proteínas; a atividade das enzimas superóxido dismutase e a catalase e avaliar a capacidade antioxidante total após a exposição experimental ao aumento gradual da temperatura;
- Realizar a imunolocalização da proteína Hsp70 e pelo método qualitativo, estabelecer uma correlação entre a sua expressão e o aumento gradual da temperatura.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

O estudo foi conduzido no Parque Nacional das Sempre-Vivas, localizado nos municípios de Olhos d'Água, Bocaiúva, e Diamantina, em Minas Gerais (FIG.1 A). A região possui clima mesotérmico, com verões brandos e úmidos e invernos mais frescos e secos, apresentando duas estações bem definidas: uma estação seca entre os meses de junho a agosto e uma chuvosa, de novembro a março. A temperatura média anual é de 18,79°C, com as médias mensais entre 16,83°C a 21,27°C (MMA, 2016).

As coletas foram realizadas em um trecho de cabeceira do Rio Inhaí (17°54' 32.22" S – 43°42' 33.26"), afluente do Rio Jequitinhonha (Licença SISBIO: 26291-2) (FIG.1 B).

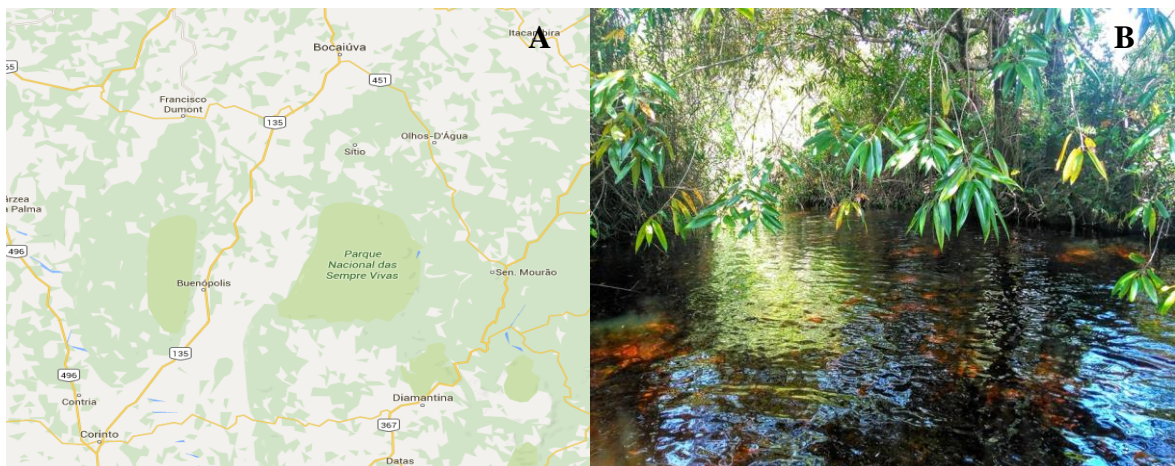


Figura 1 - (A) Localização do Parque Nacional das Sempre-Vivas (Fonte: Google Maps). (B) Córrego Inhaí.

3.2 Amostragem e manutenção dos peixes para os experimentos em laboratório

O presente estudo teve parecer aprovado junto ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFVJM n. 58/2016B). As amostragens foram realizadas com rede de arrasto manual (FIG.2 A). Em uma primeira amostragem, para representar o controle ambiental do experimento, 13 indivíduos da espécie *A. brevirohinus* foram coletados e eutanasiados através de secção cortical, de acordo com as normas legais de eutanásia de animais (Portaria N. 596, de 25 de junho de 2013, CONCEA) e em seguida, foram medidos

com auxílio de uma régua milimetrada e dissecados (FIG. 2 C e D). Brânquias e fígado de nove animais foram armazenados em criotubos, fixados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C , para posterior análise do potencial redox. Os quatro animais restantes tiveram os mesmos tecidos acondicionados em cassetes, fixados em paraformaldeído a 4% tamponado por 12 horas e logo depois, submersos em tampão fosfato 0,2 M; para posterior identificação das estruturas e imuno-histoquímica (FIG. 2 E).

Em uma segunda amostragem, ainda no mesmo ponto de coleta, 100 indivíduos foram coletados e acondicionados em um tanque com aeração, contendo água do rio. Os peixes foram transportados até o Laboratório de Aquicultura da UFVJM. No laboratório, eles foram transferidos para um tanque com capacidade para 500 litros de água com aeração controlada e temperatura ambiente, onde permaneceram por 5 dias, para minimizar o estresse ocasionado pela captura (FIG. 4 F). Durante este período, eles foram alimentados com ração comercial *ad libitum*.

Para a realização dos experimentos, 500 litros de água do rio foram acondicionados em tanques e levados para o laboratório. A água foi filtrada e recebeu aeração constante até o dia do experimento.



Figura 2 - Amostragem, processamento do material e acondicionamento dos peixes para o experimento. Coleta e dissecação dos peixes do controle experimental: (A) Amostragem realizada com rede de arrasto no córrego Inhaí. (B) Animais coletados. (C) Medição do tamanho dos peixes. (D) Dissecação. (E) Acondicionamento dos tecidos em cassetes. Período de repouso dos peixes em laboratório: (F) Tanque de armazenamento dos peixes em laboratório, após a coleta em campo. (G) Tanques utilizados para o experimento, equipados com aquecedores e aeradores.

3.3 Parâmetros físico-químicos da água

O oxigênio saturado (%), temperatura (°C) e pH da água foram aferidos com auxílio de um multiparâmetro da marca Hanna –HI 9828 em campo e na fase inicial e final de cada experimento. A temperatura da água foi monitorada com auxílio de um termômetro de mercúrio em intervalos de 30 minutos durante os experimentos.

3.4 Procedimentos experimentais

3.4.1 *Elevação gradual da temperatura*

Após o período de 5 dias em laboratório, foram selecionados aleatoriamente 78 indivíduos e, em seguida, distribuídos em 6 tanques com capacidade de 45 litros de água, cada (FIG. 2 G). Cada tanque foi equipado com um aerador e um aquecedor com potência de 300 W. Os peixes permaneceram por 24 horas nos tanques, para que o estresse decorrente da manipulação e troca de ambiente fosse minimizado. A alimentação foi suspensa durante esse período.

Decorridas às 24 horas, os aquecedores de três tanques foram ligados e quando a temperatura experimental de cada tanque foi atingida, a mesma foi mantida constante por 120 minutos. Os demais tanques permaneceram com os aquecedores desligados e foram utilizados como controles do experimento. Em média, a velocidade de aquecimento da água foi de 1,83°C/hora.

Após o término de cada experimento, os peixes foram eutanasiados através de secção cortical. Para determinação do potencial redox, brânquias e fígado de nove indivíduos foram coletados, acondicionados em criotubos, submersos em nitrogênio líquido e em seguida armazenados em freezer a -80°C para posterior análise. Brânquias e fígado de quatro indivíduos foram dissecados, fixados em paraformaldeído 4 % tamponado por 12 horas e, em seguida, submersos em tampão fosfato 0,2 M, para posterior emblocagem, coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) e Imuno-histoquímica.

3.4.2 Temperatura crítica de sobrevivência (TCS)

Para determinar a tolerância térmica da espécie em estudo, 26 indivíduos foram distribuídos em dois tanques com capacidade para 45 litros, cada. Os peixes tiveram a alimentação suspensa por 24 horas.

Após o período de repouso, a temperatura da água presente nos tanques foi aferida com o auxílio de um termômetro de mercúrio. O tanque selecionado como teste, teve o seu aquecedor ligado por tempo indeterminado. O grupo controle permaneceu à temperatura ambiente inicial.

No grupo teste, quando o primeiro peixe apresentou sintomas de perda do equilíbrio, parada da natação e do movimento opercular, a temperatura da água foi aferida e anotada e o peixe coletado, eutanasiado e medido com auxílio de uma régua milimetrada. A temperatura a qual os peixes apresentaram parada de movimento opercular foi denominada temperatura crítica de sobrevivência (TCS). O mesmo foi feito com todos os peixes do grupo experimental, assim que os movimentos operculares foram cessados.

Para cada indivíduo do grupo experimental coletado, um indivíduo do grupo controle também era amostrado, eutanasiado, medido e dissecado. Para determinação do potencial redox, brânquias e fígado de nove indivíduos foram coletados, acondicionados em criotubos, fixados em nitrogênio líquido e sem seguida congelados a -80°C para posterior análise. Os tecidos de quatro indivíduos, destinados à coloração de HE e imuno-histoquímica, foram armazenados em cassetes e fixados em paraformaldeído 4% tamponado por 12 horas e, em seguida, submersos em tampão fosfato 0,2 M, para posterior inclusão em parafina.

3.4.3 Análise Comportamental

Para a análise do comportamento, os peixes foram observados durante todos os experimentos. Após cada tanque atingir a temperatura de interesse, filmagens foram realizadas durante 60 minutos em que se mantinham em tal temperatura experimental.

O experimento para determinação da TCS também foi filmado a partir dos 36°C (temperatura em que o primeiro animal atingiu a TCS), até que todos os animais apresentassem parada do batimento opercular e óbito.

A partir da análise do comportamento dos animais em cada tanque, foram avaliados os seguintes critérios: equilíbrio, natação, batimento opercular e morte.

Para transformar os dados qualitativos em dados numéricos, o comportamento foi avaliado de acordo com uma escala de 4 a 0, onde o 4 é caracterizado pelo comportamento normal e o 0 indica a morte (TAB. 1).

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

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

Para o experimento da TCS, ao atingirem a temperatura subletal, o comportamento apresentado pelos peixes foi classificado em fases, de acordo com Cocking (1959) (TAB.2).

Tabela 2 - Classificação das fases comportamentais.

Fases	Estágio	Sintomas
Fase I	Estresse inicial	Preferência pela parte superior da coluna d'água; deslizam verticalmente de forma rápida 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	Morte	Sem movimentos, apenas com movimentação opercular, que no caso é a última a cessar.

3.5 Análises histológicas

3.5.1 Preparação dos blocos para microscopia

Após a fixação dos tecidos, brânquias e fígado foram desidratados em banhos de soluções crescentes de etanol em água destilada (70%, 80%, 90%, 95% e 100% de etanol I e II). Para que os tecidos se tornassem translúcidos, após a desidratação, os mesmos foram diafanizados em xilol, e, em seguida, incluídos em parafina histológica *overnight*, em estufa a 60°C. Após a impregnação os tecidos foram emblocados em parafina (ANEXO A).

3.5.2 Hematoxilina e Eosina (HE)

A coloração HE foi utilizada para visualizar os diversos tipos celulares bem como os tecidos que compõe as estruturas estudadas, uma vez que essa coloração diferencia o citoplasma do núcleo.

Para a preparação das lâminas, blocos de tecidos branquiais e hepáticos foram cortados em micrótomo, com espessura de 5 µm. Os cortes foram colocados em banho-maria contendo água destilada à temperatura de 38° C e em seguida, aderidos a lâminas previamente silanizadas e 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 que a desparafinização fosse completa, as lâminas foram submersas em xilol. Em seguida, os cortes foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%), seguida de um banho em água. Após este processo, as lâminas foram submersas em Hematoxilina, por 20 segundos, lavadas em água corrente e submersas em Eosina por 55 segundos (ANEXO B).

Após o processo e coloração, lamínulas foram aderidas os cortes com *PermOUNT*, e colocadas na posição horizontal, onde permaneceram por 72 horas, até a secagem. As lâminas foram fotomicrografadas em microscópio (Labomed, LC400p).

3.6 Biomarcadores do estado redox

3.6.1 Análise dos parâmetros redox

Para análise dos parâmetros redox, as amostras foram retiradas do freezer a -80°C e imersas em gelo. Cada amostra foi macerada em 500 microlitros de PBS (0,15M, pH 7,36) com auxílio de um macerador de tecidos Potter-Elvehjem (*Corning*). Todo o processo foi conduzido dentro de uma caixa térmica com gelo. Os macerados foram acondicionados em eppendorfs e centrifugados (Thermo Electron. Led GMBH 52 D37520, Alemanha) a uma velocidade de 5.000 g, durante 5 minutos a uma refrigeração de 4°C . Do sobrenadante, alíquotas de 220 μl foram retiradas para avaliação do dano oxidativo de lipídeos, através da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 72 μl para avaliação da capacidade antioxidante total, determinada pelo poder de redução do ferro (FRAP, do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) e o restante dos homogenatos, foram armazenados em eppendorfs e mantidos em gelo, para posterior análise da atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). O sedimento restante foi utilizado para determinar o conteúdo de derivados carbonílicos presentes nas proteínas.

As alíquotas destinadas a quantificação da atividade enzimática foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C . Após a centrifugação, 30 μl do sobrenadante de cada amostra foram retirados com auxílio de uma micropipeta e armazenados em eppendorf para análise da CAT. O restante do sobrenadante foi utilizado para analisar a SOD. Os eppendorfs foram acondicionados em gelo, até a dosagem.

3.6.2 Análise da peroxidação lipídica

Para determinar a concentração de TBARS, foi utilizada a reação do ácido tiobarbitúrico com o malondialdeído (MDA), principal produto da peroxidação lipídica, de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* (1979). Para a análise, alíquotas do homogenato (0,230 mL) foram adicionadas a 0,250 mL de ácido acético (2,5 M, pH 3,4), 0,1 mL de duadecil sulfato de sódio (8,1%) e 0,25 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8%. A mistura foi homogeneizada e aquecida a 95°C durante 90 minutos. Após o aquecimento, as amostras foram resfriadas e centrifugadas a 5000 g (Thermo Electron. Led GMBH D37520, Alemanha) por 5 minutos. Logo após, 0,25 mL do sobrenadante de cada amostra foi transferido para uma

placa contendo 96 poços de fundo chato. As amostras foram submetidas à leitura no espectrofotômetro 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.

3.6.3 Derivados carbonílicos em proteínas

Para determinar a concentração de derivados carbonílicos em proteínas nos tecidos, foi utilizado um método descrito 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-tetraacético (EDTA). Em seguida, cada amostra foi homogeneizada e dividida em branco e teste. Foi adicionado ácido tricloroacético 10% a todas as amostras, em seguida elas 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 53 HCl 2 mM. As amostras foram mantidas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos. A cada 15 minutos, as mesmas eram agitadas, com auxílio de um vórtex. Após esse processo, foi adicionado ácido tricloroacético 10% às amostras. Em seguida elas 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 a 4°C, por duas vezes. O sedimento proveniente da centrifugação foi dissolvido em SDS 6% e centrifugado a 10000 g, por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi avaliado no espectrofotômetro a 370 nm, em placa de 96 poços, no leitor de microplacas, em duplicata.

A concentração de derivados carbonílicos em proteínas foi determinada utilizando a equação de Lambert: $A=c.b.\epsilon$. 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.)

3.6.4 Atividade da enzima CAT

A atividade da CAT (EC 1.11.1.6) foi determinada através do decaimento da absorvância do peróxido de hidrogênio a 240 nm, de acordo com o método descrito por Nelson; 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 no espectrofotômetro, 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 duplicata.

3.6.5 Atividade da enzima SOD

A atividade da SOD (EC 1.15.1.1) foi determinada pela inibição da autoxidação do pirogalol, de acordo com Maklund; Maklund (1974). Foi adicionada a cada amostra de tecido, tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 8.2, 37 °C) contendo 1 mM de ácido dietilenotriaminopenta-acético (Sigma, EUA). A reação foi iniciada com a adição do pirogalol (1,2,3-benzenotriol, Sigma, EUA) a 0,2 mM. As amostras foram pipetadas em microplacas e a reação foi determinada através da leitura em espectrofotômetro 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 necessária para inibir a autoxidação do pirogalol em 50%. As medidas foram realizadas em duplicata.

3.6.6 Capacidade antioxidante não enzimática

A capacidade antioxidante não enzimática das amostras foi determinada pelo método FRAP, de acordo com Benzie; 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, determina 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. A mistura foi homogeneizada e incubada no escuro, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 30 minutos.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 300 g por 5 minutos, e uma alíquota do sobrenadante de cada uma delas foi adicionada em microplacas e analisadas em espectrofotômetro, a 593 nm em duplicata. 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 em $\mu\text{M FeSO}_4/\text{mg}$ de proteína.

3.6.7 Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo método de quantificação de Bradford (*Comassie blue assay*) (BRADFORD, 1976). Para a construção da curva padrão, composta por concentrações conhecidas de proteínas, foi utilizada albumina de soro bovino (BSA, 1mg/mL). A leitura foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplacas (Spectran Max®190, Molecular Devices, EUA) a 590 nm, e os valores da concentração de proteínas, foram determinados pelo Software Softmaxpro® (V5.4, Molecular Devices, EUA) em mg/mL .

3.7 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica (IHQ) permite identificar e localizar proteínas em células por meio de reações de anticorpos específicos. Ela também permite quantificar proteínas a partir da intensidade das mesmas.

A proteína Hsp70 presente nos tecidos foi localizada e identificada por meio de reações com anticorpos específicos. Para realização do método empregado, as lâminas foram previamente banhadas em solução de 3-aminopropiltriétoxi-silano 2% em acetona para aumentar a aderência dos tecidos na sua superfície.

Após o preparo das lâminas silanizadas, cortes com espessura de $5\mu\text{m}$ foram feitos nos tecidos, com auxílio de um micrótomo. As lâminas confeccionadas foram acondicionadas horizontalmente em estufa a 37°C por 24 horas. Posteriormente, os tecidos sofreram desparafinização em xilol absoluto e foram reidratados em séries decrescentes de álcool (100% a 70%) e em água destilada.

Para recuperar os antígenos silenciados nos tecidos, pela fixação com paraformaldeído, as lâminas foram embebidas em tampão citrato onde permaneceram em banho-maria por 30 minutos a 95°C. Em seguida, as peroxidases presentes nos tecidos foram inativadas com uma solução bloqueadora de peroxidase endógena 3% em metanol. Para reduzir a possibilidade de ligações não específicas dos anticorpos com as proteínas presentes nos tecidos, foi utilizada uma solução bloqueadora de proteínas (*Protein Block* DAKO X0909) Posteriormente, a solução bloqueadora de proteínas (*Protein Block*) foi removida dos tecidos e, em seguida, foi pipetado sobre eles o anticorpo primário Hsp70 monoclonal (BRM - 22, Sigma, EUA), extraído de camundongo, com diluição em PBS na proporção de 1:500. As lâminas foram incubadas por 20 horas em câmara úmida, na geladeira.

Após as 20 horas de incubação, o anticorpo primário presente nos cortes foi retirado e logo após o anticorpo secundário foi adicionado. Em seguida os cortes receberam o cromógeno DAB (tetra-hidrocarboneto de 3,5-diamino-benzidina). O cromógeno, ao reagir com a peroxidase conjugada à estreptavidina, produz coloração marrom.

Para contra-coloração foi utilizada hematoxilina. Logo após a coloração, os cortes foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de etanol em água, diafanizados em xilol e montados com lamínulas, fixadas com resina *Permount* (Fisher scientific /USA) (ANEXO C). As lâminas foram secas em temperatura ambiente por 72 horas e em seguida foram fotomicrografadas em microscópio (Labomed, LC400p).

3.8 Análises Estatísticas

Para verificar se o tamanho dos indivíduos presentes nos tanques era semelhante entre os grupos, e se havia diferença entre os parâmetros da água no início e ao final de cada experimento, os dados foram submetidos aos testes de Durbin-Watson, Shapiro-Wilk e Bartlett para verificar se os mesmos cumpriam os pressupostos de independência, normalidade e homogeneidade de variâncias. Em seguida modelos lineares foram criados no software R 3.5.1. Estatística descritiva (média \pm DP) foi utilizada para mostrar as alterações ocasionadas pelo aquecimento no estado redox das brânquias e músculo. Análises qualitativas foram utilizadas para descrever a reatividade da Hsp70 nos animais submetidos ao aquecimento.

4. RESULTADOS

Os resultados apresentados nessa sessão estão subdivididos em tópicos, com o objetivo de manter em sequência cronológica a obtenção dos dados.

4.1 Parâmetros físico-químicos da água

A Tabela 3 mostra os valores de porcentagem de saturação do oxigênio dissolvido na água e os valores de pH, aferidos nos grupos teste e controle no início e ao final de cada experimento. A temperatura da água em todos os tanques no início do experimento foi de 20°C. Os valores médios de saturação de oxigênio entre os grupos testes e controles, foram de $88,05 \pm 0,58$ % e $85,42 \pm 2,11$ %, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre eles ($p > 0,05$). Os valores médios de pH para os grupos testes e controles foram de $6,75 \pm 0,12$ e $6,85 \pm 0,30$, respectivamente, também não havendo diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Assim, os níveis de oxigênio saturado entre os grupos permaneceram normais e o pH se manteve levemente ácido no início do experimento.

Tabela 3 - Valores da porcentagem de saturação de oxigênio (OS) dissolvido e pH nos grupos experimentais (T24°C, T28°C, T32°C e TCS) e controle (C24°C, C28°C, C32°C e CTCS) aferidos no início e no final de cada experimento.

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

4.2 Tamanho dos indivíduos

Durante o experimento, nenhum peixe veio a óbito, com exceção dos que estavam no tanque destinado ao TCS. A Figura 3 mostra as médias e desvio padrão do comprimento dos indivíduos utilizados nos tanques teste e controle. Os peixes utilizados no experimento tiveram em média $39,88 \text{ mm} \pm 7,00 \text{ mm}$ de comprimento e não apresentaram diferenças significativas em relação ao tamanho dos grupos teste e controle ($p > 0,05$).

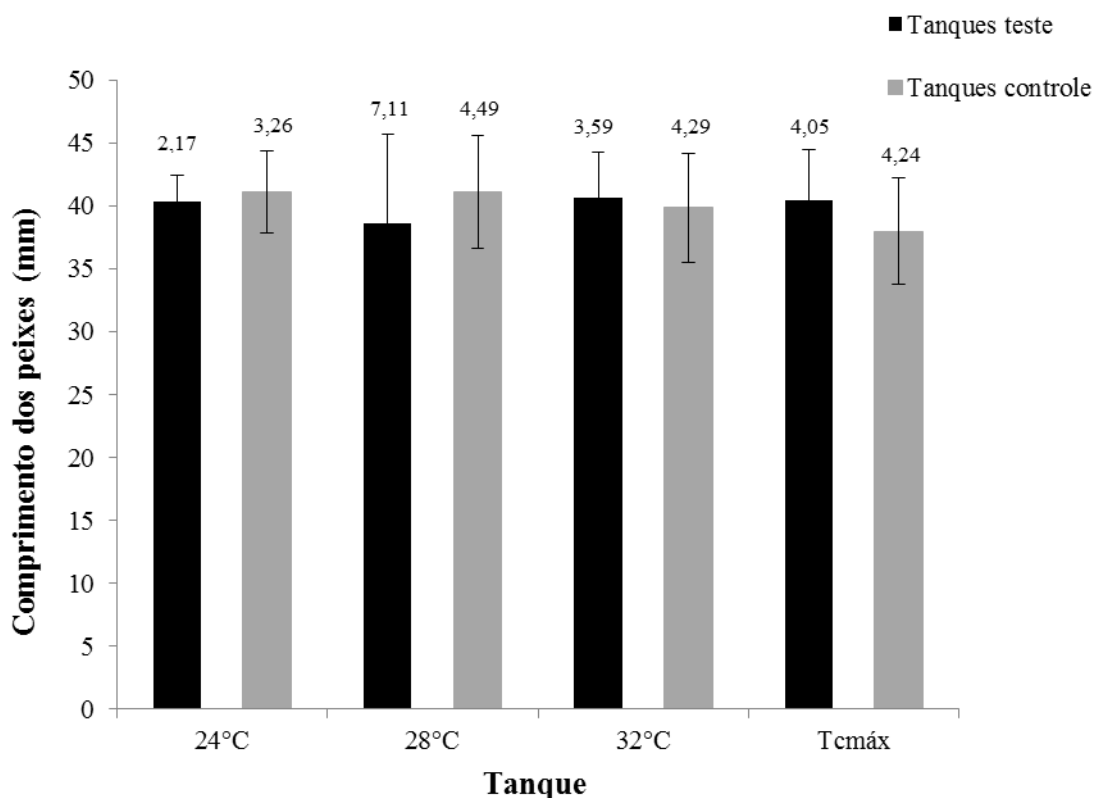


Figura 3 - Tamanho médio (mm) e desvio padrão dos indivíduos de *A. brevirostris* utilizados nos grupos teste e controle durante os experimentos de aquecimento.

4.3 Análises comportamentais

4.3.1 Elevação gradual da temperatura

Após o transporte e o acondicionamento dos peixes no tanque, os mesmos permaneceram agitados nas primeiras horas em laboratório. Na maior parte do tempo eles ficaram no fundo do tanque, às vezes subindo e descendo pela coluna d'água, agrupados em cardume e nadando de forma acelerada. Após o primeiro dia em laboratório, os animais

ficaram mais calmos. A pigmentação da pele durante esse período se tornou levemente mais clara, devido à mudança de ambiente.

Vinte e quatro horas antes do início dos experimentos, os peixes foram transferidos para os tanques teste. Após a transferência, permaneceram agitados durante as primeiras horas, retornando a desempenhar comportamentos normais após o reconhecimento do tanque.

Antes de iniciar os experimentos, os peixes nadavam de forma tranquila e descontínua, sempre próximos uns dos outros. Em alguns momentos percorriam todo o tanque e em outros permaneciam praticamente parados em determinados locais do mesmo. O equilíbrio permaneceu normal, sem nenhum tipo de alteração aparente, assim como batimento opercular, que permaneceu constante.

Os peixes presentes no tanque a 24°C permaneceram com as mesmas características apresentadas no início no experimento. Decorrido aproximadamente 40 minutos de filmagem, os animais começaram a nadar de forma levemente acelerada por todo o tanque. Este comportamento foi sendo alternado com momentos em que os mesmos permaneciam por instantes parados ou nadando lentamente.

No tanque 28°C, a atividade natatória se tornou mais acelerada, com deslocamento do cardume por todo o tanque. Foi possível observar também, ao decorrer do tempo de experimento, que a organização em cardume começou a sofrer alterações em sua conformação, pois, em alguns momentos, eles se dispersavam. Após 2 horas de filmagens, a natação permaneceu constantemente acelerada assim como o batimento opercular. A coloração dos indivíduos também sofreu alteração, ficando mais escura.

Os indivíduos do tanque 32°C, ao longo dos últimos 60 minutos, apresentaram-se levemente dispersados, nadando de forma acelerada por todo o tanque. O batimento opercular se tornou muito acelerado, e a coloração permaneceu escura.

A Figura 4 mostra os valores médios de pontuação dos critérios equilíbrio, natação e batimento opercular, utilizados para avaliar o comportamento dos peixes em relação às diferentes temperaturas.

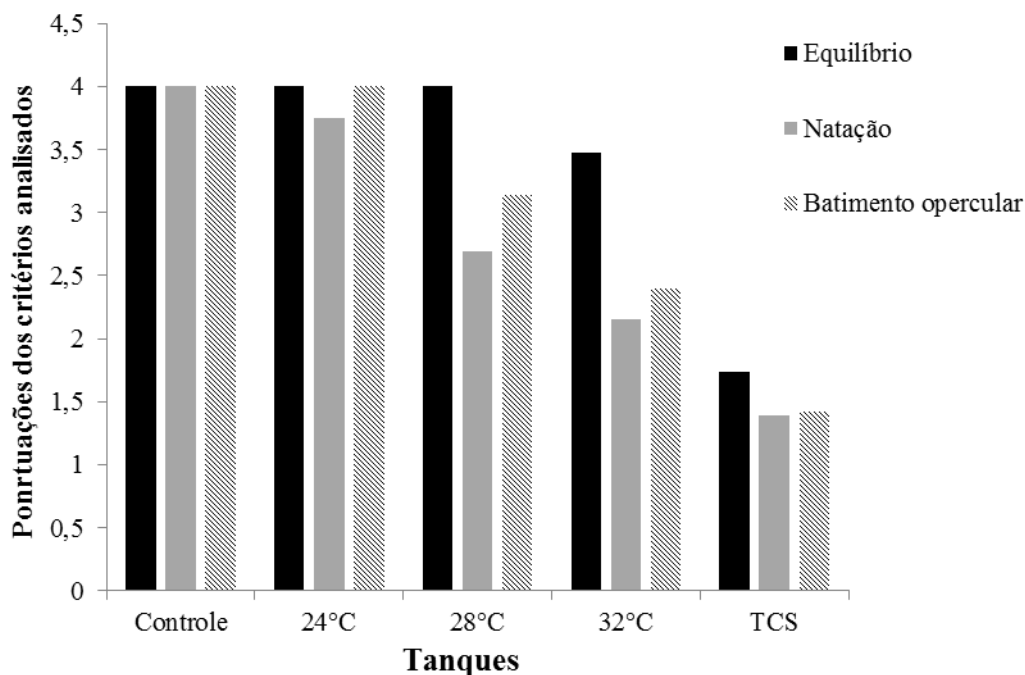


Figura 4 - Valores médios das pontuações dos critérios de análise de comportamento: Equilíbrio, natação e batimento opercular. A pontuação 4 se refere ao comportamento normal dos indivíduos e a 0 representa a morte dos mesmos.

4.3.2 Temperatura crítica de sobrevivência (TCS)

No experimento de TCS, a partir dos 35°C, os peixes passaram a apresentar comprometimento nas suas funções fisiológicas. A natação se tornou muito acelerada e os mesmos percorriam por todo o tanque, rapidamente. Ao atingir os 36°C, os peixes se dispersaram, perdendo a sua organização de cardume. Eles nadavam de forma rápida ao longo de todo o tanque, alguns mais agitados que os outros. Alterações no equilíbrio e natação se tornaram mais evidentes até que eles permanecessem em decúbito lateral. A coloração dos indivíduos se tornou mais escura que a dos demais experimentos. A velocidade dos batimentos operculares diminuiu à medida que eles apresentavam perda de movimentos, até cessar (FIG. 4).

A Figura 5 apresenta a porcentagem de indivíduos que atingiram a TCS durante o aumento gradual da temperatura. O primeiro animal a atingir a TCS foi registrado nos primeiros sete minutos de gravação das imagens, onde a temperatura da água atingiu os 35,6°C. Um dos indivíduos apresentou perda total de equilíbrio, permanecendo estático no fundo do tanque, com parada nos batimentos operculares (Fase III). Os demais organismos ao longo dessa temperatura, já apresentavam desequilíbrio horizontal e vertical e natação

acelerada, sendo que algumas vezes, nadavam em direção a superfície da água, voltando em seguida para o fundo do tanque. Acelerações súbitas (espasmos) durante a atividade natatória também foram observadas.

Com o aumento da temperatura, a perda de equilíbrio se tornou mais acentuada e o aumento de colisões contra as paredes do tanque, mais constantes. Durante a natação os organismos passaram a posicionar a cabeça em direção ao fundo do tanque e o corpo voltado para cima (movimento conhecido como *pitching*). As acelerações súbitas (espasmos) de velocidade também se tornaram constantes até que eles perdessem totalmente o equilíbrio.

Entre as temperaturas de 36°C a 36,9°C, seis indivíduos chegaram a óbito (46,15% do total). Neste período ficaram mais evidentes as fases II e III. Entre os intervalos de 37,1°C e 37,6°C, os animais que restaram atingiram a TCS. Assim, a TCS variou entre 35,6°C e 37,6°C, com uma diferença de 2 graus entre o registro do primeiro animal a atingir TCS e do último.

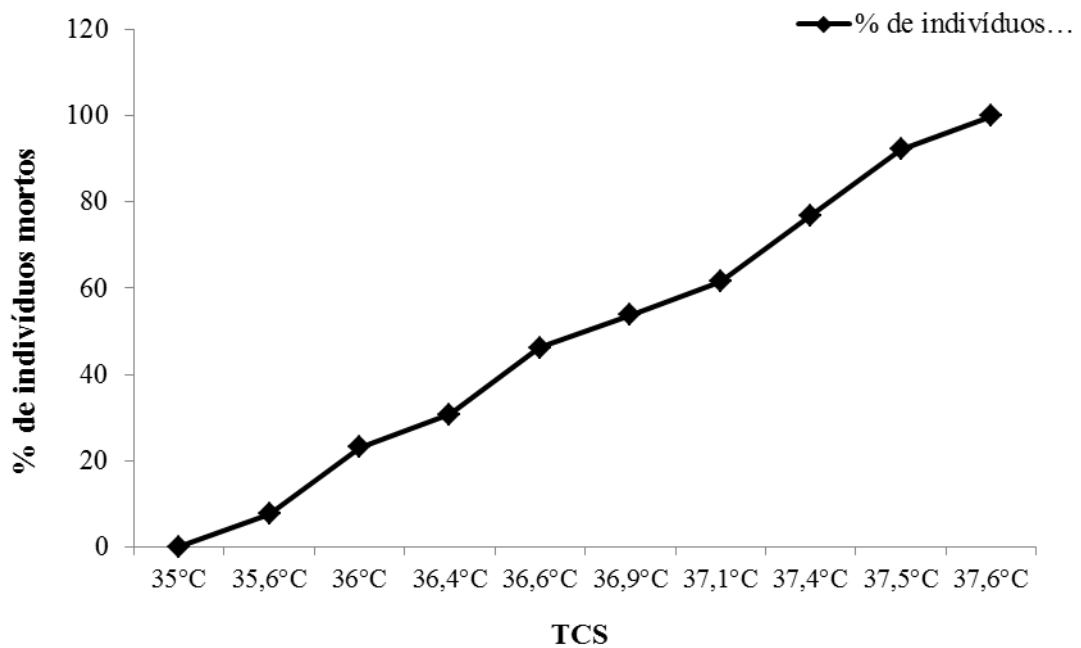


Figura 5 - Porcentagem de indivíduos mortos em função da temperatura crítica de sobrevivência (°C).

4.4 Análises histológicas

4.4.1 Histologia das brânquias

Em *A. brevirhinus*, as brânquias estão localizadas abaixo do opérculo, inseridas nas câmaras branquiais. (FIG. 6 A). A espécie possui quatro pares de arcos branquiais, dois pares posicionados em cada lado da cavidade bucal. Os arcos são compostos em sua grande parte por tecido cartilaginoso (FIG. 6 B).

Na curvatura medial dos arcos branquiais, voltados para a parte interna da câmara branquial, estão os rastros branquiais. Essas projeções são sustentadas por tecido cartilaginoso e revestidas por um epitélio estratificado, composto por células pavimentosas e em sua face mais interna, por tecido conjuntivo. Corpúsculos gustativos inseridos de maneira aleatória ao longo dos rastros e células mucosas, também compõem sua estrutura (FIG. 6 D). Acima dos rastros branquiais, assentadas abaixo do tecido epitelial estratificado, tem-se uma camada de tecido adiposo e condrócitos, localizados na curvatura do arco (FIG. 6 C). Compondo o arco branquial, regiões contendo músculo estriado foram evidenciadas (FIG. 6 C).

Na região lateral dos arcos branquiais, sustentados por condrócitos e revestidos por tecido epitelial, estão os filamentos branquiais (FIG. 6 C e E). O tecido epitelial, responsável pelo seu revestimento se projeta, formando as lamelas (FIG. 6 E) que são nutridas por ramos das artérias branquiais. No epitélio lamelar foram encontradas células mucosas (FIG. 6 E), dispersas entre a base e o ápice das lamelas. Revestindo a superfície do epitélio lamelar, encontram-se células pavimentosas planas (FIG. 6 F).

Nas junções entre os filamentos e as lamelas foram observadas células clorídricas (FIG. 6 F). As células de clorídricas são as maiores do epitélio branquial. Seu núcleo apresenta a cromatina frouxa e encontra-se na periferia da célula. O seu citoplasma é abundante e apresenta forte coloração basófila. Dando sustentação ao epitélio lamelar e margeando os ramos lamelares das arteríolas branquiais estão as células pilares (FIG. 6 F).

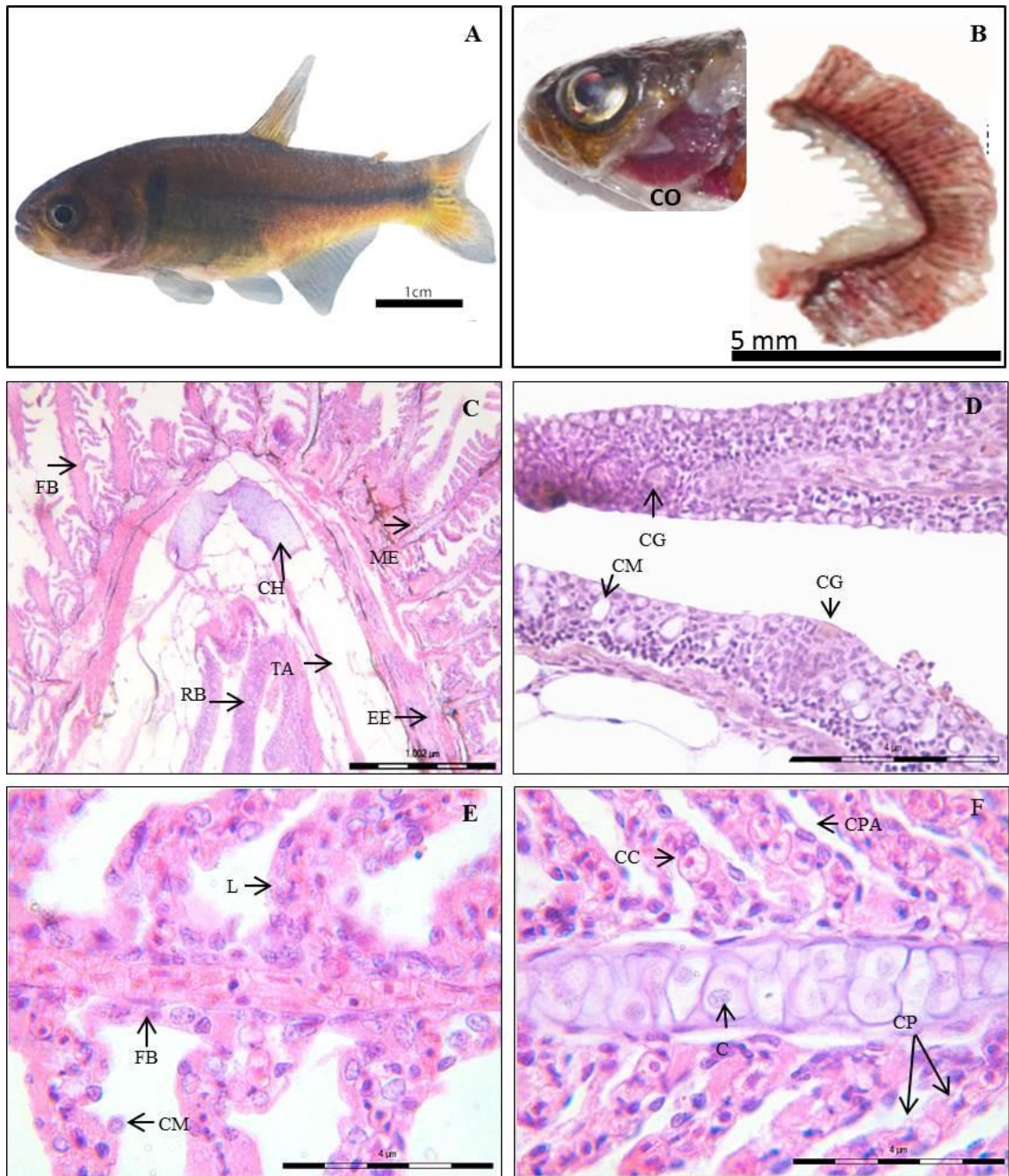


Figura 6 - Macroscopia e microscopia da brânquia de *A. brevihinus*. [A] Inserção das brânquias na cavidade opercular (CO). [B] Macroscopia da brânquia. [C] Microscopia de luz, evidenciando as estruturas que compõem o arco branquial: rastros branquiais (RB) epitélio estratificado (EE), tecido adiposo (TA), músculo estriado (ME), filamentos branquiais (FB), cartilagem hialina (CH). Coloração: HE. [D]: Rastros branquiais. Detalhe: Setas indicando os corpúsculos gustativos (CG) e células mucosas (CM) Coloração HE. [E] Filamento branquial (FB) e lamelas (L) e células de muco (CM). Coloração: HE. [F] Lamela com destaque para as células pavimentosas achatadas (CPA), células clorídricas (CC), células pilares (CP) e condrócitos (C). Coloração: HE.

4.4.2 Histologia do fígado

O fígado do *A. brevirhinus* está localizado na porção cranial da cavidade celomática e sua maior porção fica do lado esquerdo, sobrepondo o estômago. Possui coloração marron-avermelhada característica. O fígado é dividido em três lobos (direito, central e esquerdo), que apresentam formato irregular e assimétrico. Não foi possível encontrar diferenciação histológica entre eles (FIG. 7 A). O parênquima hepático é constituído em sua maior parte por hepatócitos, vasos, nervos e tecido conjuntivo, distribuídos de forma homogênea.

Os hepatócitos apresentam formato poliédrico, bordas distintas e amplo citoplasma. O seu núcleo possui forma circular, cromatina frouxa e nucléolo proeminente. Na maioria das vezes ele se encontrava na região central do citoplasma, e em alguns casos, onde os acúmulos de glicogênio no interior dos vacúolos eram mais acentuados, eles sofreram deslocamento para a periferia da célula (FIG. 7 D).

Vasos sanguíneos revestidos por epitélio simples pavimentoso estão distribuídos de maneira aleatória em todo o tecido (FIG. 7 D), assim como a disposição de veias, tecido pancreático intra-hepático (FIG. 7 E) e capilares sinusóides entre os hepatócitos (FIG. 7 D). Não foi observada a formação de tríade portal no tecido.

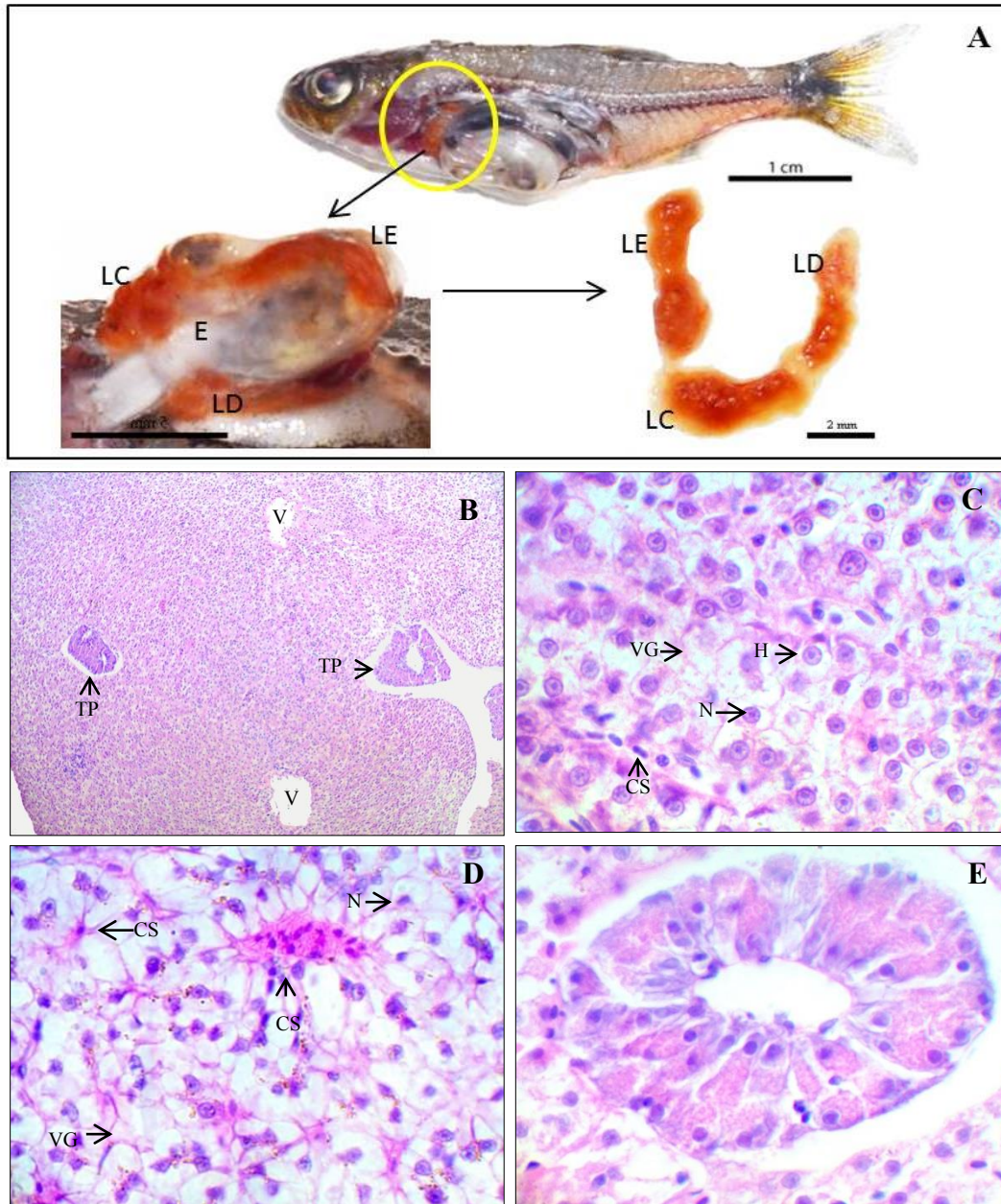


Figura 7 - Macroscopia e microscopia do tecido hepático de *A. brevirostris*. [A] Localização do fígado na cavidade celomática e macroscopia do órgão (LE – lobo esquerdo, LD – lobo direito, LC – lobo central, E – estômago); [B] Microscopia do parênquima hepático, evidenciando a distribuição aleatória do tecido pancreático intra-hepático (TP) e dos vasos sanguíneos (V). Aumento: 400x. [C] Setas indicando os hepatócitos (H), núcleo com nucléolo proeminente (N), vacúolos contendo glicogênio (VG) e capilares sinusóides (CS) Aumento: 1000x. [D] Setas indicando a presença de capilares sinusóides (CS), vacúolos contendo glicogênio (VG) e célula com núcleo periférico (N). Aumento: 1000x. [E] Detalhe para o tecido pancreático intra-hepático. Aumento: 1000x. Coloração: HE.

4.4.3 Histopatologia das brânquias

No experimento de elevação gradual da temperatura, a morfologia celular do tecido branquial dos animais utilizados para representar o controle experimental, apresentaram pequenas alterações quando comparadas ao controle ambiental (FIG. 8 A e B).

Foi observado um acúmulo de tecido epitelial, com maior incidência entre o filamento e a base das lamelas (FIG. 8 B) das brânquias de animais que passaram por um período de descanso em condições laboratoriais e foram utilizados como controles experimentais.

Alterações morfológicas foram observadas nos animais submetidos às temperaturas experimentais, a partir dos 24°C. As brânquias dos peixes submetidos à temperatura de 24°C apresentaram vasodilatação, fusão lamelar parcial e/ou total em algumas regiões, definidas pelo acúmulo de células epiteliais nas lamelas, hipertrofia das células clorídricas e descolamento do epitélio lamelar (FIG. 8 C).

Os animais mantidos à temperatura de 28°C apresentaram espessamento lamelar, devido ao acúmulo de tecido epitelial, fusão lamelar parcial e /ou total. Infiltrados inflamatórios também foram observados. Os condrócitos, responsáveis por garantirem a sustentação das lamelas primárias, em alguns trechos do tecido, sofreram redução em seu tamanho (atrofia celular) e estavam dispostos de maneira mais compacta, quando comparada a mesma estrutura nos grupos controle. O epitélio filamentososo, aderido aos condrócitos, em alguns pontos do tecido, sofreu descolamento. A vasodilatação se tornou mais evidente (FIG. 8 D).

Os peixes submetidos a temperatura de 32°C apresentaram espessamento e fusão das lamelas em todo o tecido. Eventos de vasodilatação e a presença de infiltrados inflamatórios tornaram-se evidentes. A atrofia dos condrócitos promoveu o encurtamento dos filamentos branquiais. Em alguns pontos esse encurtamento foi tão severo, que levou ao rompimento dos cordões de condrócitos. O tecido epitelial, aderido a esses cordões sofreu descolamento. Pontos de necrose entre os filamentos também foram observados (FIG. 8 E).

Os indivíduos submetidos ao aquecimento gradual até atingirem a sua TCS, apresentaram lesões severas. As lamelas estavam totalmente fusionadas e apresentaram grandes áreas de necrose, assim como o descolamento do epitélio dos filamentos. Infiltrados inflamatórios foram evidenciados, assim como aneurismas, originados a partir dos filamentos branquiais e no ápice das lamelas (FIG. 8 F).

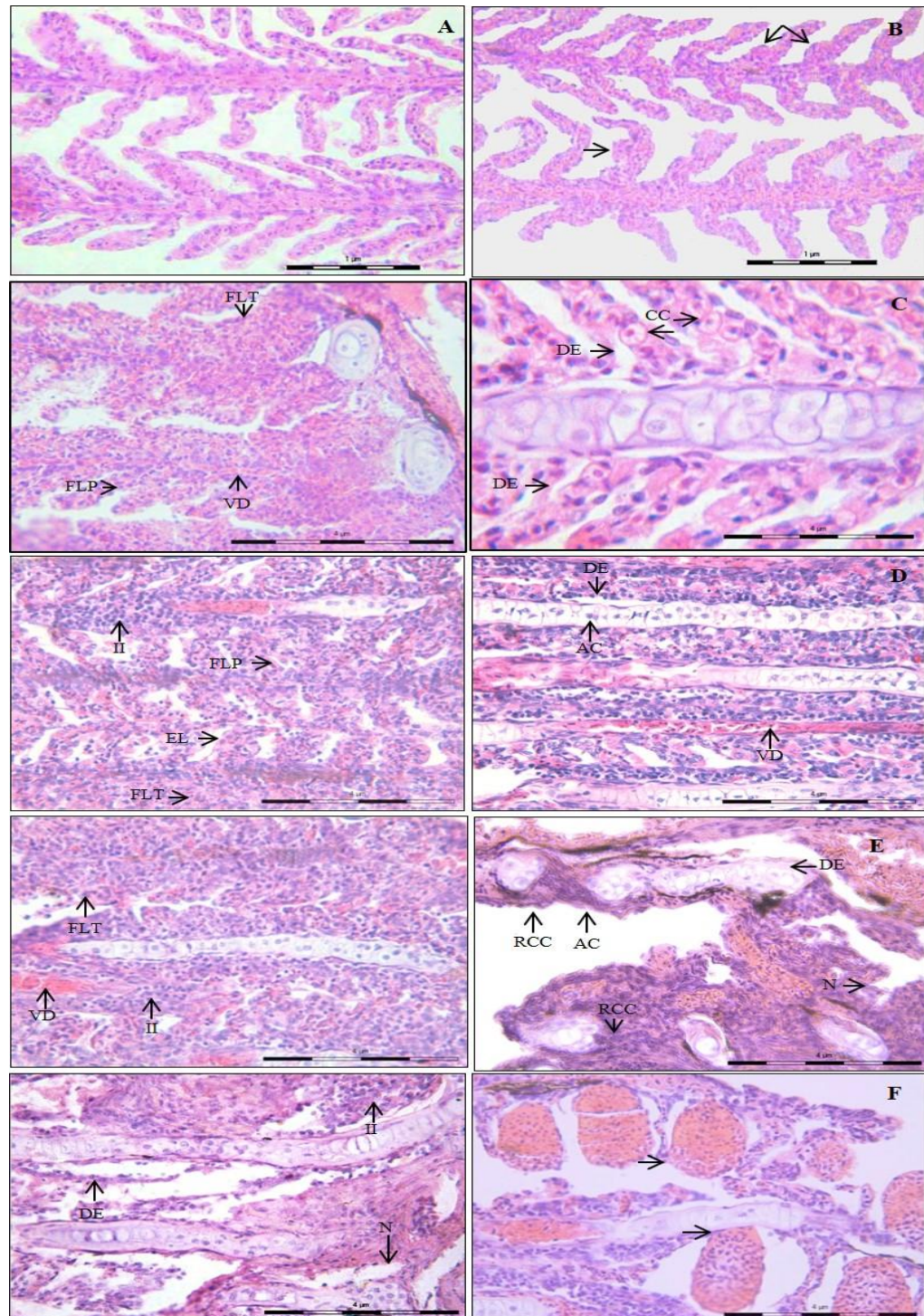


Figura 8 - Histopatologia das brânquias de animais submetidos a diferentes temperaturas. [A] Controle ambiental. [B] Controle experimental. Setas indicando o acúmulo de tecido epitelial na base das lamelas e ao longo das mesas. [C] 24°C: Setas indicando vasodilatação (VD), fusão lamelar parcial (FLP) e fusão lamelar total (FLT). [D] 28°C: Setas indicando o espessamento das lamelas (EL), fusão lamelar parcial (FLP), fusão lamelar total (FLT), infiltrados inflamatórios (II), atrofia dos condrócitos (AC), descolamento do epitélio (DE) e vasodilatação (VD). [E] 32°C: Setas indicando fusão lamelar total (FLT), vasodilatação (VD), infiltrados inflamatórios (II), a atrofia dos condrócitos (AC), rompimento dos cordões de condrócitos (RCC), deslocamento do epitélio (DE) e necrose (N). [F] TCS: Necrose (N), descolamento do epitélio (DE), infiltrados inflamatórios (II), aneurismas originados nos filamentos branquiais (cabeça da seta) e no ápice das lamelas (seta longa). Coloração: HE.

4.4.4 Histopatologia do fígado

A morfologia celular do tecido hepático de animais pertencentes aos grupos controle ambiental e experimental não apresentaram alterações. Nos dois grupos, os hepatócitos exibiram formato arredondado e espesso e núcleos característicos (FIG. 9 A e B). Modificações morfológicas na histologia de animais submetidos ao aumento de temperatura foram observadas. Indivíduos submetidos à temperatura de 24° C apresentaram dilatação dos capilares sinusóides, ondulações da membrana citoplasmática dos hepatócitos e diminuição dos grânulos citoplasmáticos (estoque de glicogênio intracitoplasmático) (FIG. 9 C). Animais submetidos à temperatura de 28°C também apresentaram dilatação dos capilares sinusóides. Os limites celulares se tornaram menos evidentes e em alguns pontos a membrana celular foi rompida. Núcleos pequenos e picnóticos foram observados. Em algumas áreas, houve a formação de vacúolos citoplasmáticos, resultantes da degeneração de glicogênio (FIG. 9 D).

Alterações histológicas em animais submetidos às temperaturas de 32°C e a TCS foram mais severas. Os dois experimentos se comportaram de maneira semelhante, sendo que a maioria das células apresentava diminuição do volume citoplasmático, ruptura do citoplasma ou apoptose, resultando em grandes áreas de necrose (FIG. 9 E e F).

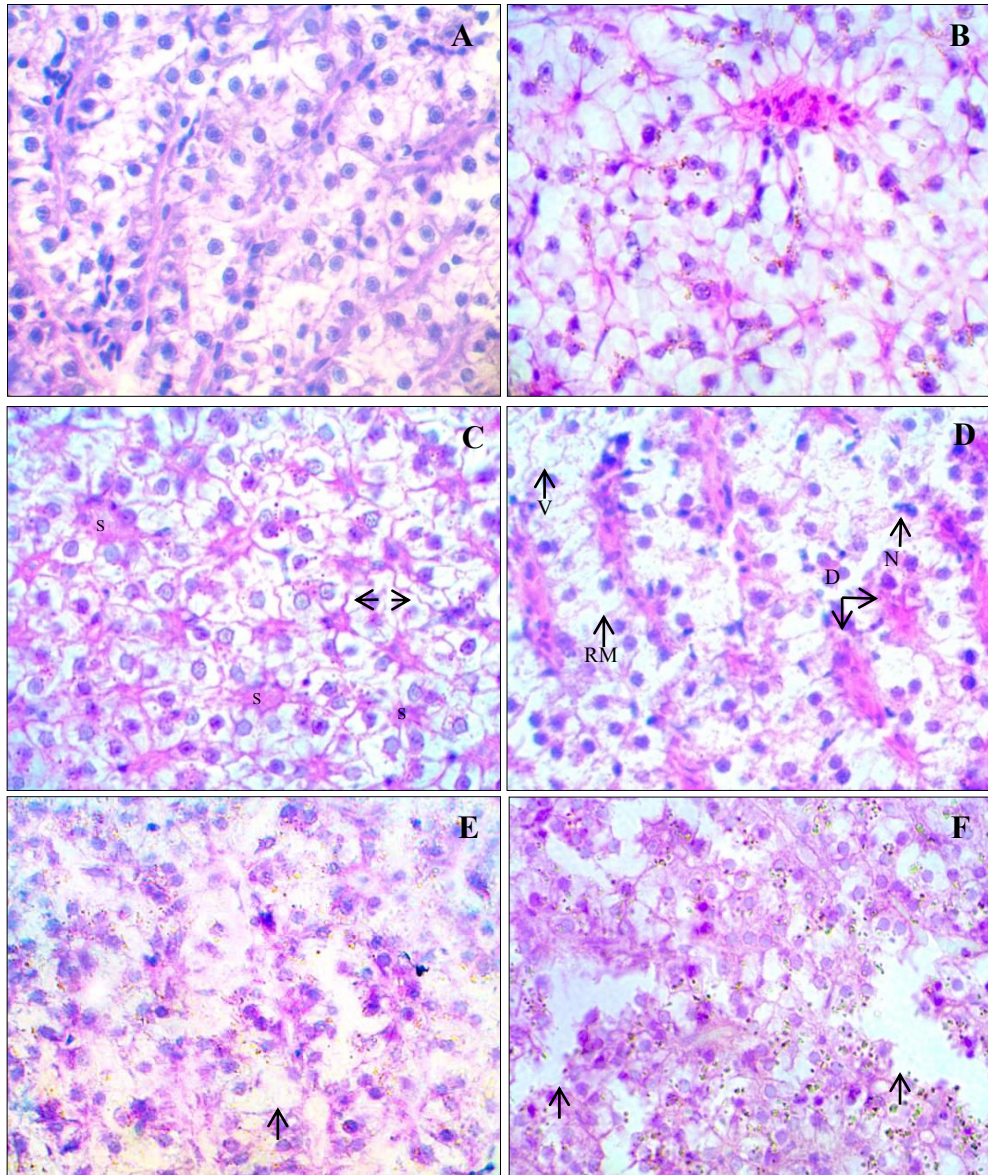


Figura 9 - Histopatologias do tecido hepático de *A. brevirostris*. [A] Controle ambiental. [B] Controle experimental. [C] Animais submetidos a temperatura de 24°C. Sinusóides visivelmente dilatados (SD) e ondulações na membrana citoplasmática (setas). [D] Animais submetidos a temperatura de 28°C. Sinusóides dilatados (SD), rompimento da membrana citoplasmática (RMC), núcleos pequenos e picnóticos (NP) e formação de vacúolos (V). [E] Animais submetidos a temperatura de 32°C. Morte de células com formação de grandes áreas de necrose (setas). [F] Animais submetidos a TCS: Setas indicando áreas de necrose. Coloração: HE. Aumento: 400x.

4.5 Biomarcadores do estado redox

Neste estudo investigaram-se as respostas de biomarcadores do estado redox nas brânquias e fígado de animais submetidos ao aquecimento controlado.

Os biomarcadores de estado redox das brânquias estão demonstrados na Figura 10. As concentrações de TBARS foram menores no controle ambiental ($9,73 \pm 1,67$ nmol

MDA/mg prot.) quando comparada aos demais grupos. As concentrações aumentaram de maneira sutil com o aumento da temperatura até os 28°C. No experimento da TCS, a concentração de TBARS foi maior do grupo experimental ($21,19 \pm 6,00$ nmol MDA/mg prot.), quando comparada aos controles ambiental ($9,73 \pm 1,67$ nmol MDA/mg prot.) e experimental ($18,48 \pm 6,14$ nmol MDA/mg prot.), indicando que o aumento da temperatura ocasiona uma maior peroxidação lipídica (Fig. 10 A). A capacidade antioxidante total (FRAP) do controle ambiental (5129 ± 1612 FeSO₄/mg prot.) foi maior que a do controle experimental (3182 ± 724 FeSO₄/mg prot.) ao final do experimento. Entre as temperaturas de aquecimento, a capacidade antioxidante diminuiu com o aumento da temperatura, quando comparado ao controle ambiental. No experimento para determinação da TCS, o FRAP foi menor (3200 ± 180 FeSO₄/mg prot.) quando comparada ao controle ambiental (FIG. 10 B). A concentração de derivados carbonílicos foi maior no controle ambiental quando comparada ao controle experimental e as temperaturas testadas (FIG. 10 C). No experimento da TCS, a concentração foi maior do que no grupo teste e no controle do experimento, indicando uma diminuição da capacidade antioxidante com o aquecimento (FIG. 10 C). As enzimas SOD e CAT não apresentaram reatividade nas brânquias.

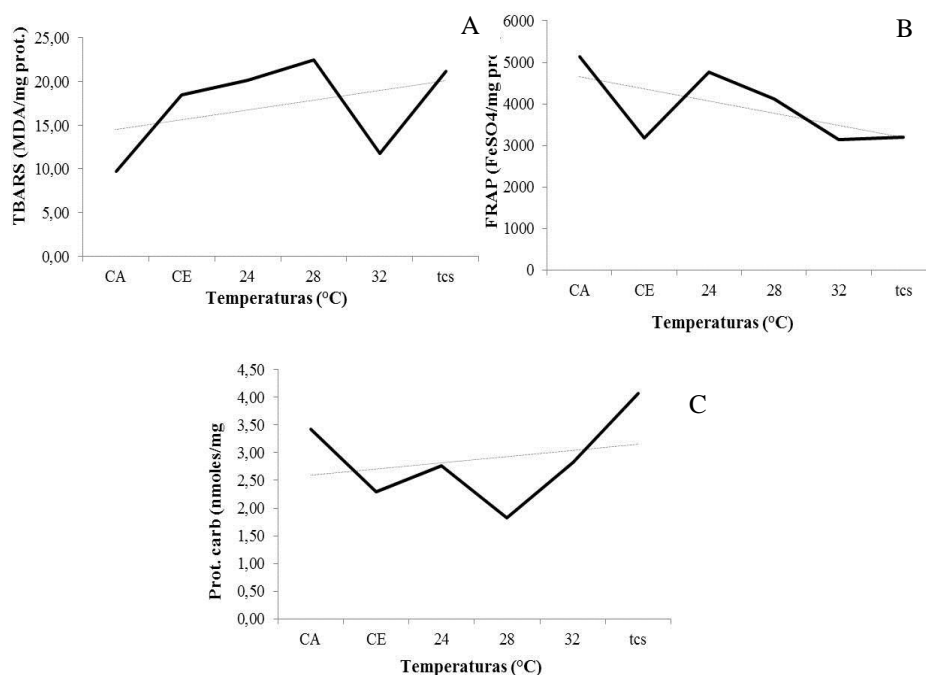


Figura 10 - Parâmetros de estado redox das brânquias de animais do controle ambiental (CA), controle experimental (CE) e animais submetidos ao aquecimento. Nos gráficos, as linhas na cor preta representam os valores de absorvância encontrados para cada biomarcador, seguidas das linhas de tendência para os valores encontrados, na cor cinza. (A) TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em nmol MDA/mg prot.; (B) FRAP: capacidade antioxidante total em FeSO₄/mg prot.; (C) Prot. carb.: proteína carbonilada em nmoles/mg prot.).

Os biomarcadores do estado redox para o fígado estão demonstrados na Figura 11. A concentração de TBARS foi maior no controle ambiental ($12,01 \pm 6,30$ nmol MDA/mg prot.), quando comparada ao controle experimental ($3,81 \pm 0,76$ nmol MDA/mg prot.) e as demais temperaturas testadas. No experimento da TCS, houve um decréscimo de TBARS do controle ambiental quando comparada ao valor médio obtido no experimento ($4,10 \pm 0,17$ nmol MDA/mg prot.). O controle experimental apresentou concentrações semelhantes ($3,81 \pm 0,76$ nmol MDA/mg prot.) os encontrados no grupo experimental (FIG. 11 A). A capacidade antioxidante foi maior no controle ambiental quando comparado a controle experimental e demais temperaturas testadas. Em geral ela parece diminuir com o aumento da temperatura, até os 28°C . No experimento para determinação da TCS, a capacidade antioxidante diminuiu com o aquecimento, quando comparada ao controle ambiental. O controle experimental apresentou valores semelhantes aos encontrados no grupo testado (FIG. 11 B). As concentrações da enzima superóxido dismutase foram maiores no controle ambiental e experimental. A sua concentração decaiu com o aumento das temperaturas testadas. Na TCS, a concentração de SOD diminuiu, quando comparado aos controles ambiental e experimental (FIG. 11 C). A enzima catalase apresentou maiores concentrações no controle ambiental e na temperatura de 24°C , quando comparada as demais temperaturas testadas. Entre os grupos controle do experimento, a concentração de CAT sofreu um decaimento no controle experimental ($0,93 \pm 0,40$ $\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$ prot.) quando comparado ao controle ambiental ($2,77 \pm 1,24$ $\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$ prot.). No experimento da TCS, a concentração de CAT diminuiu quando comparado ao controle ambiental, porém apresentou valores semelhantes aos encontrados no controle experimental. Os derivados carbonílicos não apresentaram reatividade para o fígado.

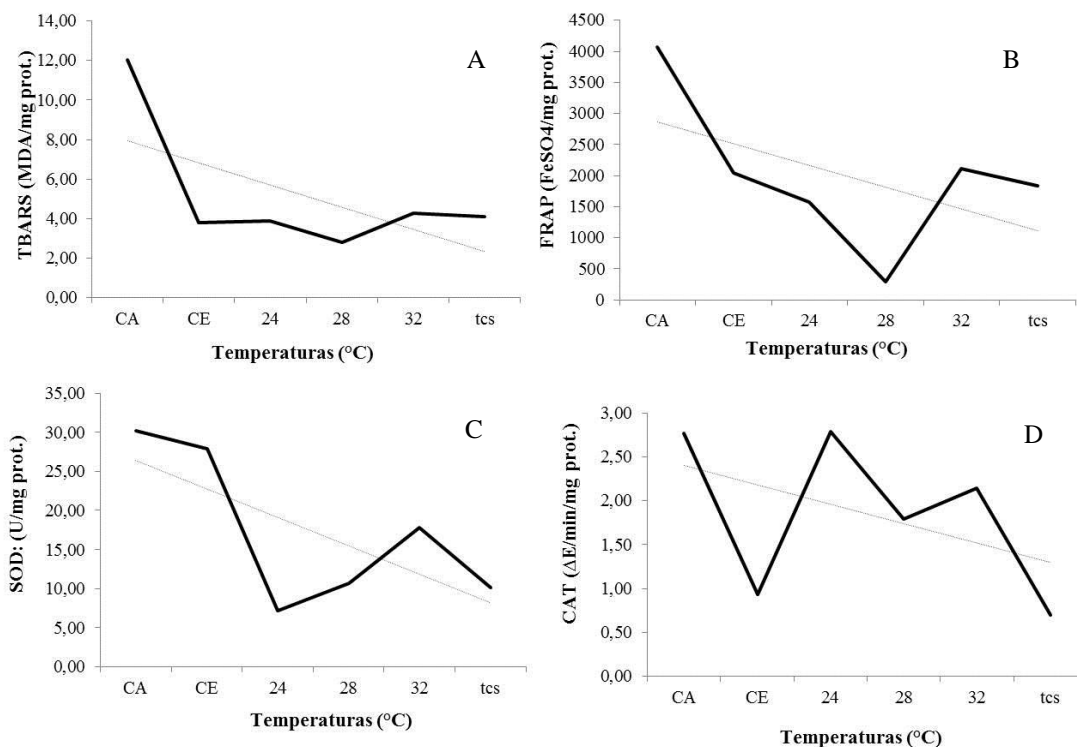


Figura 11 - Parâmetros de estado redox no fígado de animais do controle ambiental (CA), controle experimental (CE) e animais submetidos ao aquecimento. Nos gráficos, as linhas na cor preta representam os valores de absorvância encontrados para biomarcador, seguidas das linhas de tendência para os valores encontrados, na cor cinza. (A) TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico em nmol MDA/mg prot.; (B) FRAP: capacidade antioxidante total em FeSO₄/mg prot.; (C) SOD: Superóxido dismutase em U/mg prot.; (D) CAT: Catalase em ΔE/min/mg prot.

4.6 Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos utilizados como controles negativos da reação não obtiveram marcação de expressão proteica, o que indica que a técnica foi bem ajustada (FIG. 12 A). Nas brânquias e no fígado a expressão Hsp70 foi, na maioria das vezes, citoplasmática e a intensidade da reação variou conforme as temperaturas estudadas.

Nas brânquias dos animais utilizados como controle ambiental, a intensidade de marcação foi maior que no controle experimental e na temperatura de 28°C (FIG. 12 B, C e D). Aos 28°C, a marcação, além de citoplasmática, atingiu alguns núcleos (FIG.12 D). Na temperatura de 32°C os níveis de marcação da proteína foram as mais intensas do experimento, corando não só o citoplasma, mas a grande maioria dos núcleos (FIG. 12 E). No experimento da TCS, a intensidade da marcação foi menor, quando comparada aos demais grupos estudados, obtendo intensidade semelhante ou menor que a temperatura de 28°C (FIG. 12 F).

No fígado, a intensidade da marcação também variou conforme as temperaturas estudadas. No controle experimental, a marcação foi menor, quando comparada aos demais grupos (FIG. 13 C). Em geral, intensidade da expressão de Hsp70 aumentou com a elevação da temperatura (FIG.13 D e E). Na TCS, a marcação foi semelhante aos 32°C (FIG. 13 F).

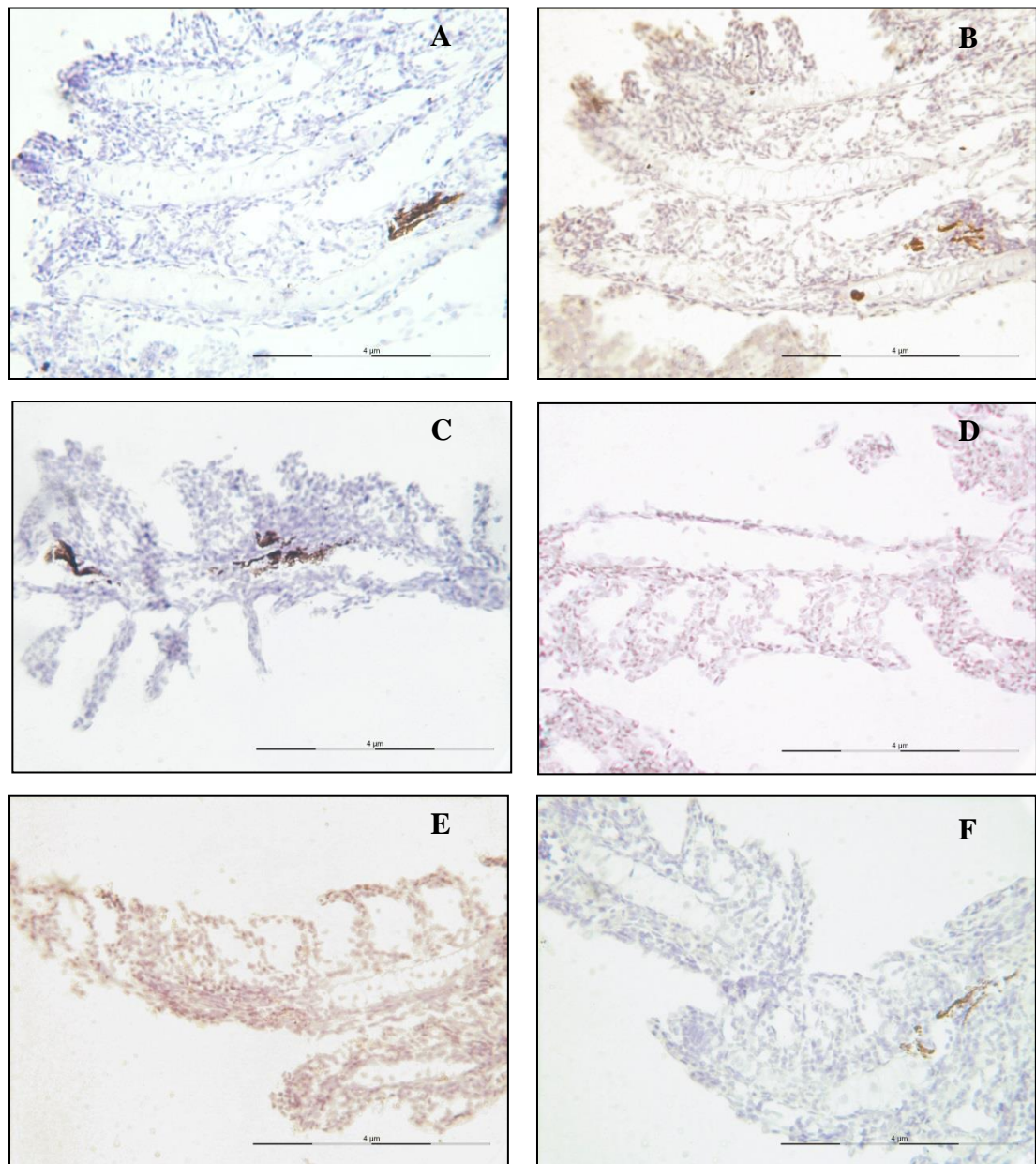


Figura 12 - Expressão da proteína Hsp 70 em brânquias de animais submetidos ao aquecimento. (A) Controle negativo da reação. (B) Controle ambiental. (C) Controle experimental. (D) Tanque aquecido a 28°C. (E) Tanque aquecido a 32°C. (F) Tanque com aquecimento gradual para determinação da temperatura crítica de sobrevivência (TCS).

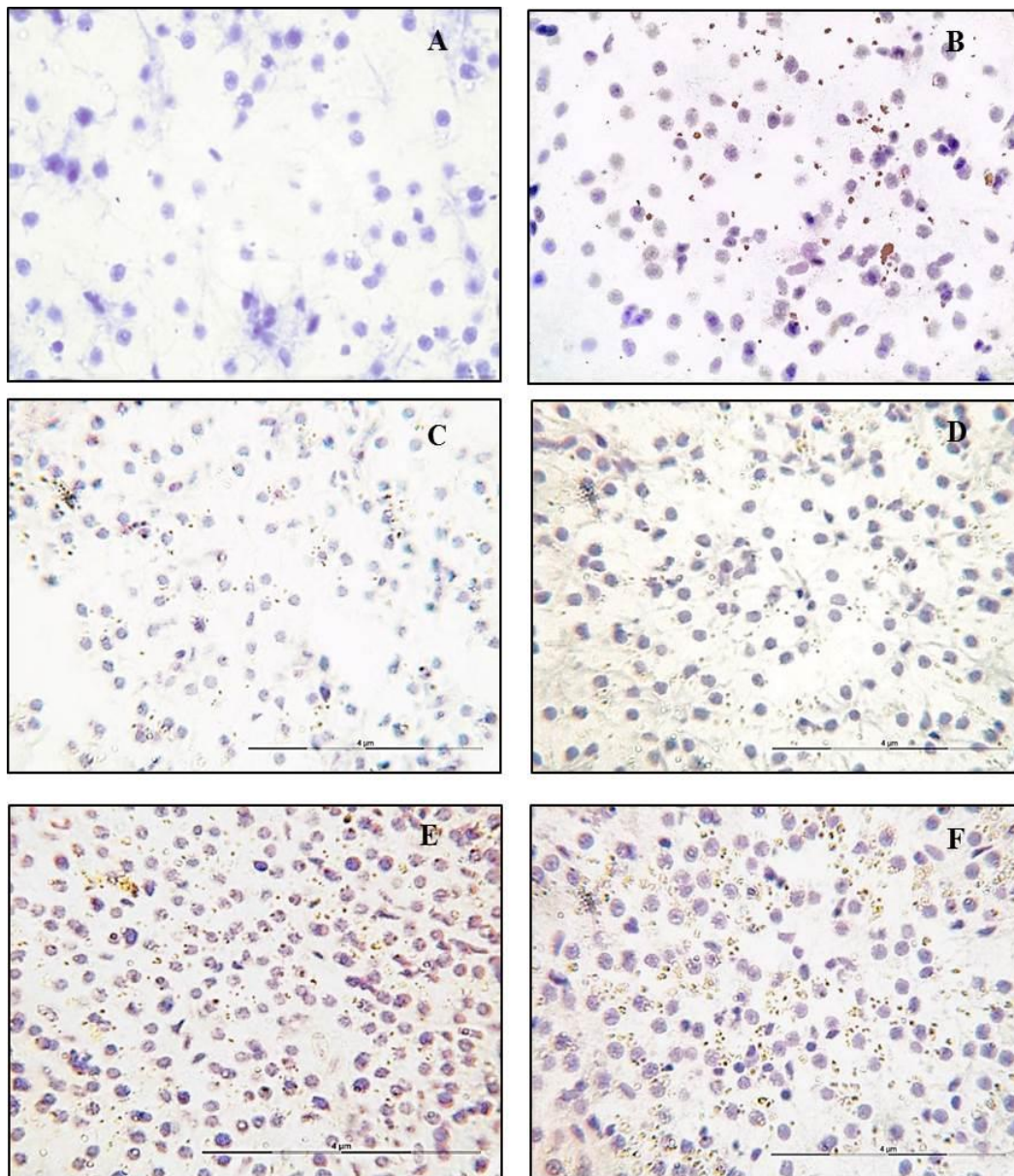


Figura 13 - Expressão da proteína Hsp 70 no fígado de animais submetidos ao aquecimento. (A) Controle negativo da reação. (B) Controle ambiental. (C) Controle experimental. (D) Tanque aquecido a 28°C. (E) Tanque aquecido a 32°C. (F) Tanque com aquecimento gradual para determinação da temperatura crítica de sobrevivência (TCS).

5 DISCUSSÃO

Esta discussão está estruturada em tópicos abordando o comportamento, a morfologia - histologia e histopatologia, o estado redox e a expressão da proteína de choque térmico (Hsp70) nos indivíduos *A. brevirhinus* submetidos ao aquecimento.

5.1 Comportamento

O tamanho do indivíduo e o seu nível de atividade tem efeitos significativos sobre a tolerância térmica. Em geral, indivíduos menores apresentam uma maior tolerância do que indivíduos maiores dentro de uma mesma espécie (PÖRTNER, 2002). Neste estudo, com o intuito de não haver diferenças discrepantes no comportamento e na tolerância térmica, optou-se por utilizar indivíduos com tamanhos semelhantes. Quando comparado os tamanhos dos animais utilizados nos grupos teste e controle, não foi observada uma diferença significativa entre eles, podendo afirmar que os mesmos possuem tamanho semelhante, e logo, apresentam respostas semelhantes ao aquecimento, não havendo diferenças que possam prejudicar a interpretação dos dados.

Por terem a temperatura do corpo regulada pelo ambiente, o aumento gradual da temperatura da água acelerou o metabolismo dos peixes submetidos ao aquecimento. Como consequência, a atividade natatória e os batimentos operculares também aumentaram, na tentativa de suprir o aumento na demanda de oxigênio do organismo (MARK, 2002). O aumento da frequência do batimento opercular foi observado em todos os tanques submetidos ao aquecimento, à medida que a temperatura aumentava. Em indivíduos que estavam próximos a sua TCS, essa frequência foi reduzida, demonstrando colapso do sistema cardiorrespiratório e hemodinâmica nestas temperaturas (STEINHAUSEN *et al*, 2008)

Alterações na coloração foram observadas em temperaturas iguais e superiores a 28°C em todos os indivíduos testados. Essas alterações foram promovidas por células de pigmento, os melanóforos, que possuem a função de proteção contra a ação dos raios solares. As modificações na coloração podem ser provocadas também por estressores e em geral, são passageiras (PERESSIN; SILVA, 2015).

A perda de equilíbrio e espasmos em indivíduos expostos a temperaturas superiores a 35°C pode estar relacionada ao comprometimento da integridade neural, que perdida quando os peixes são submetidos a altas temperaturas (REYES *et al.*, 2011).

A formação de cardumes entre os peixes é um comportamento comum em teleósteos. Esse tipo de organização confere ao grupo ganho hidrodinâmico e maior proteção contra predadores (GODIN, 1986). Temperaturas iguais e superiores a 28°C alteram esse tipo de organização, o que em ambiente natural pode dispersar os indivíduos, deixando-os mais vulneráveis a predação. Em temperaturas próximas ao TCS, os peixes perdem totalmente esse tipo de organização.

5.2 Morfologia

5.2.1 Histologia e histopatologia das brânquias

A morfologia das brânquias dos teleósteos é semelhante, havendo variações que estão relacionadas com o seu habitat, alimentação e fatores filogenéticos. *A. brevirhinus* apresenta as mesmas características da maioria das espécies de peixes teleósteos, os quais possuem quatro pares de arcos branquiais, dois pares posicionados em cada câmara branquial, protegidos e separados do meio externo pelos opérculos (RAMOS, 2008).

Os rastros branquiais são estruturas responsáveis por agregar e reter o alimento, impedindo que ele retorne ao meio aquático, juntamente com a água expelida durante o processo de respiração (ZAVALA-CAMIN, 1996; SAMPAIO; GOULART, 2011). A sua morfologia e abundância estão diretamente relacionados com o tipo de alimentação de cada espécie apresentada (HYATT, 1979). O tamanho relativamente curto e a pouca quantidade de rastros apresentados por *A. brevirhinus* pode estar relacionada ao tipo de dieta que a espécie apresenta. Em geral, a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Astyanax* são onívoras (VILELLA *et al.*, 2002), o que pode justificar o tamanho e a distribuição dos rastros ao longo da região mais interna do arco branquial (ZAYED; MOHAMED, 2004). Os corpúsculos gustativos, distribuídos principalmente na superfície do epitélio dos rastros, apresentam receptores químicos, relacionados a detecção, retenção e degustação do alimento filtrado (EIRAS-STOFELLA; CHARVET-ALMEIDA, 1998; LIMA *et al.*, 2009). As células mucosas produzem muco, responsável pela retenção do alimento, separado pelos corpúsculos gustativos, protegendo as estruturas contra lesões durante o deslocamento do alimento em

direção ao estômago, além de agir como uma barreira contra agentes externos (SABÓIA-MORAES *et al.*, 1996; LIMA *et al.*, 2009).

A presença de musculatura no arco branquial, adjacente a cartilagem e na base dos filamentos, está associada a movimentação dos mesmos, que ao desempenhar tal atividade, geram pequenas turbulências ao seu redor, facilitando a respiração e a troca de substâncias (TORRES *et al.*, 2010).

Os filamentos branquiais, sustentados por condrócitos em sua região central, possuem arteríolas aferentes e eferentes e vasos linfáticos, compondo o seio venoso central (GENTEN *et al.*, 2009). O tecido epitelial, responsável pelo seu revestimento dá origem às lamelas, locais onde ocorrem as trocas gasosas com o meio (MACHADO, 1999). Cada lamela é formada por duas camadas de epitélio, que são separadas por células pilares, entre as quais o sangue flui (MUMFORD *et al.*, 2007). Além de fornecer sustentação à lâmina basal, as células pilares regulam as trocas gasosas, pois tem a capacidade de contrair ou expandir, controlando a passagem de sangue e a consequente troca de gases com o meio aquático (EVANS, 1998; BAHUGUNA *et al.*, 2014). Assim, a água que flui pela boca, circula pelo trato respiratório e sai pelas fendas branquiais, onde ao passar pelas lamelas, trocam solutos com o sangue, que circula na direção oposta da água, gerando um mecanismo de contracorrente (STROTHER, 2013), que maximiza a transferência de oxigênio (NEWSTEAD, 1984; BAHUGUNA *et al.*, 2014). Presentes também no epitélio lamelar, assim como nos rastros branquiais, estão as células mucosas, que conferem proteção contra partículas suspensas na água, agentes infecciosos e patogênicos ou poluentes (SINGH; BANERJEE, 2008). Elas também atuam como um mecanismo de adaptação a diferentes condições do meio aquático (MÓRON *et al.*, 2009).

Nas junções do filamento com as lamelas e na base das mesmas, estão as células clorídricas. Elas atuam na tentativa de manter a homeostase iônica interna, provendo a regulação de íons e atuando no equilíbrio ácido-base em peixes de água doce (PERRY, 1997; MUMFORD *et al.*, 2007).

Uma vez que as brânquias executam várias funções relacionadas à respiração, e possuem uma grande superfície de contato com o ambiente, elas são particularmente sensíveis a poluentes e alterações físicas no ambiente aquático (CERQUEIRA; FERNANDES, 2002; FLORES-LOPES; THOMAZ 2011), apresentando uma resposta direta aos impactos ambientais e estressores (IGER *et al.*, 1994; LEDY *et al.*, 2003). Neste estudo, foi observado que a exposição a temperaturas, acima das quais os animais estavam submetidos no ambiente

de origem podem levar a alterações histológicas nas brânquias de *A. brevirhinus*. O grau de lesão e os danos ao tecido variaram conforme a faixa de temperatura ao qual eles foram submetidos.

A mudança de ambiente também promoveu alterações sutis nas brânquias de animais submetidos ao controle experimental, como a hiperplasia das células epiteliais. A hiperplasia epitelial ocorre devido a um aumento no número de células no epitélio de revestimento das lamelas ou na base das mesmas, resultado de uma elevação na atividade mitótica (ZENI, 2016).

Com o aquecimento, áreas com descolamento do epitélio entre o filamento e as lamelas, surgiram de maneira sutil aos 24°C, aumentando a sua incidência conforme a elevação da temperatura, assim como a proliferação excessiva de epitélio lamelar, o qual conduziu a fusão parcial e por vezes total das lamelas, diminuindo a área da superfície respiratória. O deslocamento do epitélio, hiperplasia e a fusão lamelar podem ser causados por estressores e são mecanismos naturais de defesa que protegem o epitélio lamelar do contato direto com agentes patológicos (ORTIZ *et al.*, 2003; AL-HASHEML, 2017) e alterações do ambiente que possam causar irritação ao tecido (FERNANDES; MAZON, 2003; DALZUCHIO *et al.*, 2016). Esses mecanismos de defesa promovem o aumento da distância de difusão entre o meio aquático e a corrente sanguínea, dificultando o acesso de substâncias ao sangue (ERKMEN; KOLANKAYA, 2000; GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007). Essas alterações morfológicas são uma tentativa de conservar funções fisiológicas (PEREIRA *et al.*, 2014), gerando mecanismos compensatórios de defesa. Porém, dependendo da severidade do processo, eles podem comprometer a função branquial (MALLATT, 1985; LEONARDO *et al.*, 2001), provocando uma redução nas trocas gasosas e por consequência diminuindo a capacidade respiratória (ZENI, 2016).

O comprometimento da capacidade respiratória nos animais submetidos ao aquecimento pode ter induzido a vasodilatação (ERKMEN; KOLANKAYA, 2000), um processo de adaptação que leva ao aumento do fluxo sanguíneo, facilitando o transporte de células de defesa para as regiões danificadas, além de melhorar a oxigenação dessas áreas (SILVA, 2004). Também em resposta ao aquecimento, as células clorídricas sofreram hipertrofia e hiperplasia, o que pode ser um mecanismo para melhorar a capacidade de transporte de íons em condições desfavoráveis (NESKOVIC *et al.*, 1996; MARCATO, 2014). Entretanto, o transporte de gases pode ser prejudicado, com o aumento no tamanho e quantidade de células (PEREIRA; CAETANO, 2009).

A morte celular pelo aquecimento a temperatura igual e superior a 32°C deu origem a várias áreas de necrose, lesões que causam efeitos fisiológicos deletérios e são irreversíveis (TAKASHIMA; HIBIYA, 1995; DALZOCHIO *et al.*, 2016). A vasodilatação prolongada do eixo vascular das lamelas, devido a dificuldades respiratórias, ocasionou o rompimento das células pilares, que ao perderem a sua capacidade suporte levaram ao aparecimento de aneurismas (GARCIA-SANTOS *et al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2014), patologia comumente encontrada nos animais submetidos a temperaturas superiores a 35°C.

Alterações histopatológicas encontradas nesse estudo corroboram com os achados na literatura, em resposta a alterações no ambiente. Em um estudo realizado com *Astyanax altiparanae* e *A. fasciatus*, duas espécies pertencentes ao mesmo gênero em estudo, os peixes apresentaram alterações patológicas em resposta a qualidade da água, como descolamento e elevação do epitélio branquial, aneurisma lamelar, hiperplasia e hipertrofia celular (WINKALER *et al.*, 2001).

Em um estudo desenvolvido em laboratório, os efeitos da exposição aguda de peixes da espécie *Astyanax jacuhiensis* a diferentes concentrações de alumínio, mostrou alterações como hiperplasia, hipertrofia de células epiteliais, fusão lamelar, edema, deslocamento epitelial, aneurisma e necrose como resposta a exposição ao agente estressor (DALZOCHIO *et al.*, 2016). *Astyanax fasciatus* e *Cyanocharax alburnus* apresentaram vacuolização, hiperplasia do epitélio dos filamentos, elevação epitelial, alteração da estrutura e ocorrência de aneurismas nas lamelas em resposta a degradação ambiental (FLORES-LOPES; THOMAZ, 2011).

As histopatologias encontradas neste estudo evidenciam que o aumento da temperatura provoca alterações teciduais, que nada mais são do que uma tentativa de manter a integridade das células e as funções fisiológicas atribuídas a elas. A temperatura induziu uma resposta tecidual semelhante aos poluentes, quando comparado aos achados em outros trabalhos relacionados à histopatologia; isto devido á hipóxia celular ser, tanto em um quanto em outro tipo de agressão, um mecanismo de dano celular.

5.2.2 Histologia e histopatologia do fígado

A histologia do fígado de peixes apresenta diferenças em sua arquitetura que variam de acordo com a espécie, não havendo um padrão morfológico definido (BOMBONATO *et al.*, 2007; FLORES-LOPES; MALABARBA, 2007). Em *A. brevihinus*,

assim como na maioria dos peixes teleósteos, o fígado é composto por três lóbulos (BRUSLÉ; ANADON, 1996; ROCHA *et al.*, 2010), sem uma delimitação evidente entre eles. A sua estrutura segue um modelo descrito para o grupo, onde o parênquima hepático é composto por células com núcleos grandes, arredondados, localizados predominantemente na região central e com um nucléolo proeminente (FLORES-LOPES; MALABARBA, 2007).

Os hepatócitos, células predominantes, são responsáveis pelo metabolismo de proteínas, carboidratos e lipídeos; produção da bile, proteínas essenciais do plasma e fatores de coagulação, além de armazenar substâncias como lipídeos, glicogênio, aminoácidos e ferro e atuar nos processos de desintoxicação (MENKE *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2012). Animais utilizados nesse estudo apresentaram hepatócitos com amplo citoplasma, uma consequência do armazenamento de glicogênio. A quantidade de glicogênio está relacionada ao estado nutricional, sendo que animais bem alimentados e saudáveis apresentam maior teor de glicogênio armazenado, quando comparados a animais com a alimentação escassa (ROCHA *et al.*, 2010). Assim, é possível inferir que os animais utilizados nesse estudo estavam em um bom estado nutricional e saudáveis.

A organização dos hepatócitos ao longo do tecido também apresenta características semelhantes a alguns grupos de teleósteos, onde as células não estão dispostas em formato de cordões distintos. Também não foi possível observar a formação de tríades portais, as quais são constituídas por ramificações da veia porta, artéria hepática e por ducto biliar, características do fígado de mamíferos (BOMBONATO *et al.*, 2007; MENKE *et al.*, 2011). Outra diferença estrutural no parênquima hepático de peixes é a presença de tecido pancreático intra-hepático ao redor dos vasos de algumas espécies (FLORES-LOPES; MALABARBA, 2007). *A. brevirhinus* apresenta inserido ao tecido hepático células de tecido pancreático, conhecidas também como células ácinos serosas, que possuem formato piramidal, núcleo arredondado e citoplasma contendo grânulos de zimogênio (GENTEN *et al.*, 2009). No tecido hepático, centros de melanomacrófagos, responsáveis pela captura e eliminação de partículas estranhas derivadas da degeneração celular foram observados.

O fígado está associado aos processos de desintoxicação e biotransformação e é um dos órgãos mais afetados com as alterações ambientais (HADI; ALWAN, 2012). A captura, manipulação, transporte e acondicionamento em laboratório também são fatores críticos à sobrevivência uma vez que expõe os peixes a condições diferentes aos quais eles estavam acostumados. Essas alterações estimulam uma série de respostas fisiológicas como o intuito de se adaptar os fatores estressantes (PEDRAZZANI *et al.*, 2007; PAULA 2009). Neste estudo, os animais pertencentes aos controles ambiental e experimental não

apresentaram alterações relacionadas à troca de ambiente, o que demonstrou que o seu manejo e conservação foram adequados, garantindo a integridade dos mesmos para a realização dos experimentos.

As reservas de lipídeos e glicogênio presentes em vacúolos no citoplasma dos hepatócitos são um indício de funções metabólicas normais. Em condições de estresse, o glicogênio atua como fonte de glicose, sendo utilizado para suprir a perda de energia em tais situações, o que leva a sua depleção dentro do citoplasma (PANEPUCCI *et al.*, 2001; CAMARGO; MARTINEZ, 2007). Assim como a formação de vacúolos, as ondulações da membrana plasmática, evidenciadas a partir dos 28°C, também são um indicativo de disfunções induzidas pelo aumento da temperatura, uma vez que áreas metabolicamente ativas do fígado ao serem reduzidas, levam a uma possível diminuição das funções desempenhadas por ele (TEH *et al.*, 1997).

A vasodilatação dos sinusóides pode ser uma resposta ao aquecimento, onde o aumento do fluxo sanguíneo no tecido hepático facilita o transporte de macrófagos para as regiões lesionadas deste tecido e também melhora a oxigenação destas áreas ou ainda, pode indicar um mecanismo auxiliar na desintoxicação (SANTOS, 2010).

Alterações como vacuolização dos hepatócitos, depleção de glicogênio e alteração no formato dos vasos sinusóides podem ser interpretados como respostas ao estresse ambiental, sendo, desta forma, considerados como indicadores histopatológicos da qualidade do ambiente (FLORES-LOPES; MALABARBA, 2007).

5.3 Estado Redox

Os resultados obtidos demonstram que o estresse térmico promoveu alterações nos parâmetros do estado redox nas brânquias e no fígado de *A. brevirhinus*.

O aumento nas concentrações de MDA são resultado do estresse oxidativo (FERNANDES *et al.*, 2012). Nas brânquias, o aumento da temperatura gerou maior peroxidação lipídica e carbonilação das proteínas, indicando que o aquecimento promove alterações no estado redox. Era esperada que a ação de antioxidantes não enzimáticos fosse maior, devido ao seu papel no combate das lesões ocasionadas pela ação dos radicais livres. Porém, com o aquecimento, as defesas antioxidantes não enzimáticas também diminuíram, o que pode justificar um aumento do dano oxidativo a esse tecido. Assim, a sua redução mediante tal situação não foi capaz de conter os danos causados pelo aquecimento.

Os danos lipídicos causados na membrana podem provocar alterações no funcionamento celular, pois promovem modificações estruturais dos complexos lipoprotéicos das membranas celulares, promovendo o desarranjo da bicamada lipídica, o que permite o contato das proteínas intracelulares com as ERO, prejudicando funções essenciais como a atividade enzimática intrínseca e transportadores de membrana (KOZYREV; SLUTSKY, 2010). Dependendo da intensidade da peroxidação, mecanismos apoptóticos podem ser acionados, promovendo a morte celular (LACERDA *et al.*, 2015). O aumento da formação de grupos carbonila, em decorrência do aquecimento, pode promover alterações na conformação das proteínas, aumentando a agregação, fragmentação, distorção das estruturas secundária e terciária, suscetibilidade à proteólise e alteração das suas funções (BUTTERFIELD *et al.*, 1998; COSTA, 2017).

No fígado, o dano oxidativo a lipídeos foi maior nos animais pertencentes ao controle ambiental, apresentando um acentuado declínio quando comparado ao controle do experimento e aos animais submetidos ao aquecimento. Era esperado que no aumento da temperatura, as concentrações de MDA fossem maiores, resultado de uma maior peroxidação lipídica. Ainda que o aumento nos níveis de MDA esteja relacionado a agentes estressores, alguns estudos têm demonstrado a sua diminuição com o estresse (GARCIA, 2016). A diminuição desses níveis pode estar relacionada a ativação de defesas antioxidantes em animais, com o intuito de prevenir lesões oxidativas (FELÍCIO *et al.*, 2015) Porém nesse estudo, foi observado que as concentrações de SOD e CAT, responsáveis pela atividade antioxidante também diminuíram com o aquecimento. Garcia (2016) estudando o metabolismo de MDA em peixes da espécie *Astyanax altiparanae* observou que as enzimas antioxidantes não são as responsáveis pela diminuição da quantidade de MDA, uma vez que em grupos onde ocorreram tal diminuição não foram observadas alterações significativas das enzimas CAT e SOD.

5.4 Imuno-histoquímica

As brânquias e o fígado respondem de formas distintas ao aquecimento. Entretanto como esperado, a expressão proteica aumentou conforme o aumento da temperatura nos dois tecidos. Mesmo respeitando essa tendência, cada tecido apresentou diferentes tipos de resposta às temperaturas estudadas.

No experimento da TCS, de forma qualitativa, a intensidade de marcação das brânquias e do fígado foi inversamente proporcional. Enquanto nas brânquias a expressão foi

a menor, quando comparada as demais temperaturas; no fígado ela alcançou maior intensidade de marcação que as demais. Nas brânquias, a intensa marcação apresentada por animais pertencentes ao controle ambiental, pode estar relacionada ao estresse da captura e manipulação dos indivíduos (PEDRAZZANI *et al.*, 2007). Por ser um órgão mais externo, quaisquer alterações no ambiente podem ocasionar respostas a um agente estressor. A manipulação dos mesmos não gerou alterações semelhantes na expressão de proteínas no fígado, fato observado pela menor expressão em seu tecido hepático no grupo controle ambiental. Contudo sua expressão foi considerável, semelhante a do estresse por aquecimento a 28°C neste tecido. Este achado demonstra que tanto a brânquia como o fígado já sofrem estresse no momento da captura. Porém, por ser um órgão mais interno, o fígado sofre menos danos com a manipulação.

A faixa de temperatura ideal para espécies tropicais varia de 20°C a 30°C, onde o nível ótimo está entre 25°C e 28°C (VIEIRA *et al.*, 2003). Para espécies do gênero *Astyanax*, intervalos de variação adequados estão entre 15°C e 30°C (VILELA; HAYASHI, 2001). A maior intensidade de marcação nas brânquias ocorreu na temperatura de 32°C, o que pode ser justificada por ser uma temperatura acima dos limites ideais para a espécie em estudo, assim como a maior expressão no grupo da TCS para o fígado.

Nas temperaturas de 28°C e 32°C, a expressão de Hsp70, que antes era citoplasmática, passou a ser também nuclear. A imunolocalização dessas proteínas no núcleo das células é uma consequência do seu deslocamento do citoplasma para região nuclear, com o intuito de proteger proteínas ribonucleicas, essenciais ao metabolismo dos ácidos nucleicos (CARDOSO *et al.*, 2015).

6. CONCLUSÕES

Para as condições experimentais testadas, é possível concluir que:

- A arquitetura tecidual das brânquias e do fígado de *Astyanax brevirostris* apresenta características comuns ao gênero e que se relacionam com sua biologia e ecologia;
- O aquecimento promoveu alterações no comportamento natatório, equilíbrio e na fisiologia respiratória dos animais submetidos ao aquecimento até as temperaturas testadas e a TCS;
- O aquecimento promoveu alterações teciduais nas brânquias e fígado da espécie em estudo, na tentativa de manter a integridade das suas funções;
- A capacidade antioxidante não enzimática dos tecidos diminuiu com o aquecimento;
- A temperatura pode influenciar de maneiras distintas a peroxidação lipídica nos tecidos estudados. Nas brânquias, ela tende a aumentar com o aquecimento e no fígado, ela diminuiu com o aumento da temperatura;
- Há mudanças na expressão da Hsp70 em resposta ao aquecimento;
- O aquecimento a 32°C nas brânquias obteve maior expressão de Hsp70, com marcações tanto citoplasmáticas quanto nucleares;
- No fígado, a intensidade da expressão de Hsp70 foi qualitativamente maior nas temperaturas de 32°C e na TCS.

REFERÊNCIAS

ABRAM, P. K. *et al.* Behavioural effects of temperature on ectothermic animals: unifying thermal physiology and behavioural plasticity. **Biological Reviews**, v. 9, 2016.

ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; DUFFUS A. L. Effects of environmental change on wildlife health. **Philos Trans R. Soc Lond B. Biol Sci.**, v. 364, n.1534, p.3429-38, 2009.

AL-HASHEM, M. A. Gill histopathological effects of PAHs on adult pearl oyster, *Pinctada radiata* at Al-Khiran Coast in Kuwait. **Journal of Environmental Protection**, v.8, p. 109-119, 2017.

ALVES, C. Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim. Nova**, v.33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANGILLETTA, M. J. **Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis.** Oxford: Oxford University Press, 2009.

ANTUNES, M. V. *et al.* Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n.2, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BAHUGUNA, S. N. *et al.* Histological study of the gill (gill filaments and gill rakers) in post flexion to finger ling stage of *Schizothorax plagiostomus* (Heckel). **Global Research Journal of Fishery Science and Aquaculture**, v. 1, n. 3, p. 010-016, 2014.

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.**, v.58, p. 237-275, 2000.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, 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.

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.

BOMBONATO, M. T. S. *et al.* Estudo morfológico do tecido hepático de *Leporinusma crocephalus*. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 29, n. 1, p. 81-85, 2007.

BUKAU, B.; HORWICH, A. The Hsp70 and Hsp60 chaperonis machines. **Cell.**, v. 92, p. 351-366, 1998.

BUTTERFIELD, D. A. *et al.* Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-Butyl- α -phenylnitron and vitamin E. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 854, p. 448-462, 1998.

CAJARAVILLE, M. P. *et al.* The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **Sci Total Environ.**, v.20, n. 247, p. 295-311. 2000.

CANTIN, A. M.; RICHTER, M. V. Cigarette smoke-Induced proteostasis imbalance in obstructive lung diseases. **Current Molecular Medicine**. v.12, n. 7, 2012.

CAMARGO, M. P.; MARTINEZ, B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in na urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n.3, p.327-336, 2007.

CARDOSO, C. M. **Expressão histoimunológica de proteínas de reparo celular e comportamento juvenis de *Trachinotus carolinus* (Linnaeus, 1766) (Perciformes, Carangidae)**. 115 f. 2013. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

CARDOSO, C. M. *et al.* Hsp70 and p53 expressions and behavior of juvenile pompano, *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae), at controlled temperature increase. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.470, p. 34–42, 2015.

CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 52, p. 83-91, 2002.

CASTRO, S. V. *et al.* Proteínas de choque térmico Hsp 70: estrutura e atuação em resposta ao estresse celular. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.4, p.261-271, 2013.

COCKING, A. W. The effects of high temperatures on roach (*Rutilus rutilus*). The effects of temperature increasing at a known constant rate. **J. Exp. Biol.**, v. 36, n.1, p. 203-216, 1959.

COSTA, G. M. *et al.* Estrutura morfológica do fígado de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818). **Pesq. Vet. Bras**, v.32, n. 9, p. 947-950, 2012.

COSTA, K. B. **Efeito do tempo de congelamento da amostra na estabilidade de biomarcadores de estado redox no gastrocnêmio, coração e cérebro de camundongos swiss submetidos a uma sessão de exercício máximo.** 99 f. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2017.

DALZUCHIO, T. *et al.* Gill histopathology and micronucleus test of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) to evaluate effects caused by acute exposure to aluminum. **Biotemas**, v. 29, n. 1, p. 75-83, 2016.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v.15, p.316-328, 2005.

EIRAS-STOFELLA, D. R.; CHARVET-ALMEIDA, P. Ultrastructure (SEM) of the gills of *Prochilodus scrofa steindachner*, 1881 (Pisces, Teleostei). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, p. 279-287, 1998.

ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Effects of water quality on epithelial morphology in the gill of *Capoeta tinca* living in two tributaries of Kizilirmak River, Turkey. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.64, p.418-425, 2000.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; POTTS, W. T. W. Ionic transport in the fish gill epithelium. **Journal of Experimental Zoology**, v. 283, p. 641– 652, 1999.

FELÍCIO, A. A. *et al.* Biochemical responses, morphometric changes, genotoxic effects and CYP1A expression in the armored catfish *Pterygoplichthys anisitsi* after 15 days of exposure to mineral diesel and biodiesel. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 115, p. 26-32, 2015.

FERNANDES, M. N.; MAZON, A. F. Environmental pollution and fish gill morphology. In: VAL, A. L.; KAPOOR, B. G. **Fish adaptations**. Enield: Enield Science Publishers, 2003. p. 203-231.

FERREIRA, P. M. F. *et al.* Efeito da temperatura sobre a taxa metabólica da carpa-comum (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758). **Rev. Bras. Eng. Pesca**, v. 4, n. 2, p 1-10, 2009.

FILIPPIN, L. I. *et al.* A Influência de Processos redox na resposta inflamatória da artrite reumatóide. **Rev Bras Reumatol.**, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

FLORES-LOPES, F.; MALABARBA, L. R. Alterações histopatológicas observadas no fígado do lambarí *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Teleostei, Characidae) sob influência de efluentes petroquímicos. **Biociências**, v. 15, n. 2, p. 166-172, 2007.

FLORES-LOPES, F.; THOMAZ, A.T. Histopathologic alterations observed in fish gills as a tool in environmental monitoring, **Braz. J. Biol.**, v. 71, n.1, p. 179-188, 2011.

HADI A. A.; ALWAN S. F. Histopathological changes in gills, liver and kidney of fresh water fish, *Tilapia zillii*, exposed to aluminum, **In. J. of Pharm. & Life Sci.**, v.3, n. 11, 2012.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, 2007.

GARCIA-SANTOS, S.; CARROLA, J.; FONTAINHAS-FERNANDES, A. Alterações histológicas em brânquias de tilápia nilótica *Oreochromis niloticus* causadas pelo cádmio. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.59, n.2, p.376-381, 2007.

GARCIA, D. P. **Metabolismo do malondialdeído em peixes: Implicações na avaliação da peroxidação lipídica como biomarcador de contaminação aquática**. 93 f. 2016. Dissertação . (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2016.

GENTEN, F.; TERWINGHE, E.; DANGUY, A. **Atlas of fish histology**. Enfield: Science Publishers, 2009.

GODIN, J. G. J. Antipredator function of shoaling in Teleost fishes: A selective review. **Naturaliste can.**, v. 113, p. 241-250, 1986.

HANNA, S. K. *et al.* Temperature effects on metabolic rate, swimming performance and condition of Pacific cod *Gadus macrocephalus* Tilesius. **Journal of Fish Biology.**, v. 72, p. 1068-1078, 2008.

HYATT, K. D. Feeding strategy. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D.J.; BRETT, J. R. **Fish Physiology**. San Diego: Academic Press, 1979, p. 71-119.

IGER Y. *et al.* Cellular responses in the skin of carp (*Cyprinus carpio*) exposed to copper. **Aquat Toxicol.**, v. 29, p. 49-64, 1994.

JIAN, C. Y.; CHENG, S. Y.; CHEN, J. C. Temperature and salinity tolerances of yellowfin sea bream, *Acanthopagrus lotus*, at different salinity and temperature levels. **Aquaculture Research**, v.34, p.175-185, 2003.

KIANG, J. G.; TSOKOS, G. C. Heat shock proteins 70kDa: Molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacol. Ther.**, v.80, p.183-201,1998.

KAYHAN, F. E.; DUMAN, B. S. Heat Shock Protein Genes in Fish. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences.**, v. 10, p. 287-293, 2010.

KAVALCO, K. F. **Estudos evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae)**. 197 p. 2008. Tese (Doutorado em Biologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

KEHRER, J. P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Critical reviews in toxicology.**, v. 23, n. 1, p. 21-48, 1993.

KOZYREV, D.; SLUTSKY, V. **Handbook of free radicals: formation, types and effects**. Nova Science Publishers, 2010.

LACERDA, D. S.; BOCK, P. M.; FUNCHAL, C. Consumo exacerbado de lipídeos provoca dano celular em algumas doenças metabólicas e cardiovasculares. **Nutrire**, v. 40, n. 2, p. 200-213, 2015.

LANDAU, G. *et al.* Detection of oxidative damage in response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. **Methods in Enzymology**, v. 526, p. 231-250, 2013.

LEDY, K.; GIAMBÉRINI, L.; PIHAN, J. C. Mucous cell responses in gill and skin of brown trout *Salmo trutta* fario in acidic, aluminium-containing stream water. **Dis Aquat Org.**, v. 56, p. 235-240, 2003.

- LEONARDO, J. M. L. O. *et al.* Histologia das brânquias de larvas da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (L.), de origem tailandesa, submetidas a diferentes níveis de vitamina C. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 4, p. 863-870, 2001.
- LEVINE, R. L. *et al.* Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in enzymology**, v. 233, p. 346-357, 1994.
- LIMA, F. C. T, L. R. *et al.* Genera incertae sedis in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check List of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003, p. 134-141.
- LIMA, F. B. *et al.* Morfologia das brânquias de *Steindachnerina brevipinna* (Eigenmann; Eigenmann, 1889) (Characiformes, Curimatidae). **Biotemas**, v. 22, n. 1, p. 87-92, 2009.
- MACARIO A. J. L. *et al.* Stress genes and proteins in the Archaea. **Microbiol. Mol. Biol. Ver.**, v.63, p. 923-967, 1999.
- MACHADO, M. R. Uso de brânquias de peixes como indicadores de qualidade de água. **Ciênc. Biol. Saúde**, v. 1, n. 1, p. 63-76, 1999.
- MALLATT, J. Fish Gill Structural Changer induced by toxicants and other irritants: A *statistical review*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 42, p. 630-648, 1985.
- MARCATO, A. C. C. **Investigação da toxicidade e da capacidade de recuperação do herbicida 2,4-D comercial (2,4-diclorofenoxiacético) empregando brânquias de tilápias, *Oreochromis niloticus*, como biomarcador**. 74 f. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, 2014.
- MARK, F. C., BOCK, C., PÖRTNER, H. O. Oxygen limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by magnetic resonanceimaging (MRI) and spectroscopy (31P-MRS). **Am. J. Physiol.**, v.283, p. 1254-1262, 2002.
- MARKLUND, S.; MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem.**, v. 47, n. 3, p. 469-474, 1974.
- MAZON, A. F. *et al.* Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 4, p. 621-631. 2002.

MCCULLOUGH, D. A. *et al.* Research in Thermal Biology: Burning Questions for Coldwater Stream Fishes. **Reviews in Fisheries Science**, v.17, n.1, p. 90-115, 2009.

MENKE, A.L. *et al.* Normal anatomy and histology of the adult zebrafish. **Toxicologic Pathology**, v.39, n.5, p. 759-775, 2011.

MEYER, M. P.; BUKAU, B. Hsp70 Chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n.6, p. 670-684, 2005.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO. **Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal**. Portaria nº 596, de 25 de junho de 2013. Aprova as diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA, Brasília, 2013

MMA/ICMBio. **Plano de manejo do Parque Nacional das Sempre-Vivas**. Brasília, 2016.

MORON, S. E.; ANDRADE, C. A.; FERNANDES, M. N. Response of mucous cells of the gills of traíra (*Hoplias malabaricus*) and jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) (Teleostei: Erythrinidae) to hypo- and hyper-osmotic ion stress. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p.491-498, 2009.

MUKHOPADHY, A. Y. I.; SAXENA, D. K.; CHOWDHURI, D. K. Hazardous effects of effluent from the chrome plating industry: 70 kDa heat shock protein expression as a marker of cellular damage in transgenic *Drosophila melanogaster* (Hsp70-lacZ). **Environmental Health Perspectives**, v.111, n.16, p. 1926-1932, 2003.

MUMFORD, S. *et al.* **Fish Histology and Histopathology**, Shepherdstown: U.S. Fish & Wildlife Service, 2007.

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.

NESKOVIC, N.K. *et al.* Biochemical and histopathological effects of glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.56, n. 2, p. 295–302, 1996.

NEWSTEAD, J. D. Fine structure of the respiratory lamellae of teleostean gills. **Z.Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, v.79, p. 396-428, 1984.

OBA, E. T.; MARIANO, W. S.; SANTOS, L. R. B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável. In: TAVARES-DIA, M. **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Macapá: Embrapa, 2009.

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.

ORTIZ, J. B.; GONZALEZ, C. M. L.; SARASQUE, C. Histopathological changes induced by lindane (γ-HCH) in carious organs of fish. **Scientia Marina**, v. 67, p. 53-61, 2003.

OSÓRIO, F. H. T. **Validação do gênero *Astyanax* (Baird e Girard, 1854) como bioindicador de testes ecotoxicológicos**. 119p. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2016.

PANG, X.; CAO, Z. D.; FU, S. J. The effects of temperature on metabolic interaction between digestion and locomotion in juveniles of three cyprinid fish (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio*, and *Spinibarbus sinensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology**., v.159, p. 253-260, 2011.

PANEPUCCI, R. A. *et al.* The effect of hypoxia and recuperation on carbohydrate metabolism in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Brazilian journal of Biology**., v. 61, p. 547-554, 2001.

PAULA, C. **Efeito do eugenol na sobrevida de Lambaris (*Astyanax* sp.) em diferentes concentrações e temperaturas**. 38 f. 2009. Dissertação (Mestrado Profissional – Tecnologia em Aquicultura Continental) – Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2009.

PEDRAZZANI, A. S. *et al.* Senciência e bem-estar de peixes uma visão de futuro do mercado consumidor. **Panorama da aquicultura**, p. 25-29, 2007.

PEREIRA, B. F.; CAETANO, F. H. Histochemical technique for the detection of chloride cells in fish. **Micron**, v. 40, p. 783-786, 2009.

PEREIRA, D. P. *et al.* Alterações morfológicas em brânquias de *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) como biomarcadores de poluição aquática na Laguna da Jansen, São Luís, MA (Brasil). **Biosci. J.**, v. 30, n. 4, p. 1213-1221, 2014.

PERESSIN, A.; SILVA, T. T. Sistemática, anatomia, fisiologia e ecologia de peixes. In: GANDINI, C. V.; LOURES, R. C. **Tópicos de manejo e conservação da ictiofauna para o setor elétrico**. Belo Horizonte: Cemig, 2015, v. 1, p. 11-33.

PERRY, S. F. The chloride cell: Structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 59, p. 325-347, 1997.

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**, v. 132, p.739– 761, 2002.

POWERS, S.; JACKSON, M. J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular mechanisms and Impact on muscle force production. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, 2008.

SABÓIA-MORAES, S. M. T. *et al.* Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivípara*. **Journal Fish Biology**, v. 49, p. 545-548, 1996.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria. Disponível em: <<https://www.R-project.org>>. Acesso em: 02 de fev. 2018.

RAMOS, C. A. **Caracterização morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas*, durante a transição da respiração aquática para respiração aérea**. 101f. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

REBOUÇAS, P. M. *et al.* Influência da oscilação térmica na água da piscicultura. **J Anim Behav Biometeorol.**, v.2, n.2, 2014.

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

ROCHA, E. *et al.* The hepatocytes of the brown trout (*Salmo trutta* fario): a stereological study of some cytoplasmic components with the breeding cycle. **Microscopy Research and Technique**, v.73, p. 766-778, 2010.

ROSSO, F. L.; BOLNER, K. C. S.; BALDISSEROTTO, B. Ion fluxes in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n.4, p. 435-440, 2006.

SILVA A. G. **Alterações histopatológicas de peixes como biomarcadores da contaminação aquática.** 75 f. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2004.

SAMPAIO, A. L. A.; GOULART, E. Ciclídeos neotropicais: ecomorfologia trófica **Oecologia Australis**, v.15, n.4 2011.

SANTOS, D. M. S. **Qualidade da água e histopatologia de órgãos de peixes provenientes de criatórios do município de Itapecuru Mirim, Maranhão.** 83 f. 2010. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

SIES, H. Biochemistry of oxidative stress. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.25, p. 1058-1071, 1986.

SINGH, A. K.; BANERJEE, T. K. Toxic effects of sodium arsenate ($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) on the skin epidermis of air-breathing catfish *Clarias batrachus* (L.). **Veterinarski Arhiv.**, v.78, n. 1, p. 73-88, 2008.

SOUZA, J. E. R. T. **Ictiofauna e bioacumulação de metais pesados na cadeia trófica, Rio Gramame, Bacia do Rio Gramame Paraíba.** 201 f. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

STEINHAUSEN, M. F. *et al.* The effect of acute temperature increases on the cardiorespiratory performance of resting and swimming sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **J Exp Biol.**, v. 211, n. 24, p. 3915-3926, 2008.

STROTHER, J. A. Hydrodynamic resistance and flow patterns in the gills of a tilapine fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, p. 2595-2606, 2013.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T. **An atlas of fish histology: normal and pathological features.** 2 ed. Tokyo: Kodansha, 1995.

THOPHON, S. *et al.* Histological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121, p. 307-320, 2003.

TEH, S. J.; ADAMS, S. M.; HINTON, D. E. Histopathological biomarkers in feral freshwater fish populations exposed to diferente types of contaminant stress. **Aquatic Toxicology**, v. 37, p. 51-70, 1997.

TOMANEK, L. The importance of physiological limits in determining biogeographical range shifts due to global climate change: the heat shock response. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 81, 2008.

TORRES, R. G. A.; GONZÁLEZ, P. S.; PEÑA, S. E. Descripción anatómica, histológica y ultraestructural de labranquia e hígado de tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Int. J. Morphol.**, v. 28, n.3, p.703-712, 2010.

WALBERG, E. Effect of increased water temperature on warm water fish feeding behavior and habitat use. **Journal of Undergraduate Research at Minnesota State University**, v. 11, 2011.

WANG, W.; VINOCUR, B.; SHOSEYOV, O.; ALTMAN, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends Plant Sci.**, v. 9, n. 5, p.244-252, 2004.

WINKALER, E. U, *et al.* Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 176-186, 2001.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VIEIRA, J. S.; LOGATO, P. V. R.; DIONÍZIO, M. A. Aspectos gerais da piscicultura. **Editora UFLA**, Lavras, 2003.

VILELA, C; HAYASHI, C. Desenvolvimento de juvenis de lambari *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758), sob diferentes densidades de estocagem em tanques-rede. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 491-496, 2001.

VILELLA, F. S.; BECKER, F. G. HARTZ, S. M. Diet of *Astyanax* species (Teleostei, Characidae) in an Atlantic Forest River in Southern Brazil. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 45, n. 2, pp. 223-232, 2002.

ZAVALA-CAMIN, L. A. **Introdução aos estudos sobre alimentação natural em peixes**. Maringá: EDUEM, 1996.

ZAYED, A. E.; MOHAMED, S. A. Morphological study on the gills of two species of fresh water fishes: *Oreochromis niloticus* and *Clarias gariepinus*. **Annals of Anatomy**, v. 186, p. 295- 304, 2004.

ZENI, T. O. **O uso da histopatologia por microscopia de luz em estudos com peixes dulcícolas em condições ambientais controladas.** 182 f. 2016. Tese (Doutorado em Zoologia) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

ANEXO A– PROTOCOLO DE INCLUSÃO EM PARAFINA

DESIDRATAÇÃO	Tempo
Álcool 50%	<i>Overnight</i>
Álcool 60%	1 hora
Álcool 70%	1 hora
Álcool 80%	1 hora
Álcool 90%	1 hora
Álcool 95%	1 hora
Álcool 100% (I)	1 hora
Álcool 100% (II)	1 hora
 DIAFANIZAÇÃO	
Xilol I	1 hora
Xilol II	1 hora
 INCLUSÃO	
Parafina I	<i>Overnight</i>
Parafina II	1 hora
Parafina III	Emblocar

Observação: Na inclusão, todos os procedimentos envolvendo a parafina histológica ssão realizados em estufa a 60°C.

ANEXO B - PROTOCOLO DE COLORAÇÃO – HEMATOXILA/ EOSINA

- Colocar as lâminas com os cortes por 2h horas na estufa a 60°C.
- Filtrar hematoxilina e eosina antes de iniciar o procedimento de coloração.

	Tempo
Xilol I	10 minutos
Xilol II	10 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
H ₂ O torneira	3 minutos
Hematoxilina	20 segundos
H ₂ O corrente	10 minutos
H ₂ O destilada	3 banhos
Eosina	55 segundos
Álcool 95°C	Super rápido
Álcool 100 I	2 trocas
Álcool 100 II	2 minutos
Álcool – Xilol (1:1)	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol montagem	Colagem das lamínulas

- A colagem das lamínulas é feita com Permout
- Deixar secar as lâminas por 72 horas antes de manusear.

ANEXO C - PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

	Tempo
Estufa 37°C	Overnight
Xilol I	15 minutos
Xilol II	15 minutos
Álcool 100% I	5 minutos
Álcool 100% II	5 minutos
Álcool 95%	5 minutos
Álcool 70%	5 minutos
H ₂ O destilada	5 minutos
Tampão citrato – temperatura ambiente	5 minutos
Tampão citrato – temperatura : 95° C	30 minutos
Tampão citrato – temperatura ambiente	20 minutos
H ₂ O destilada – (sob agitação)	2 minutos
H ₂ O destilada – (sob agitação)	2 minutos
Tampão PBS	5 minutos
Bloqueio Peroxidase endógena 3%	40 minutos
Tampão PBS (sob agitação) I	5 minutos
Tampão PBS (sob agitação) II	5 minutos
Tampão PBS (sob agitação) III	5 minutos
Secagem com papel filtro, contorno com caneta histológica ao redor dos cortes	
Protein block (Super Block) Temperatura ambiente	5 minutos
Anticorpo (AC) 1°: -4° a 8° C	20 horas
Secagem AC 1°	
Rinsagem em tampão PBS	
Tampão PBS (sob agitação) I	5 minutos
Tampão PBS (sob agitação) II	5 minutos
Tampão PBS (sob agitação) III	5 minutos
Secagem com papel filtro	
Anticorpo (AC) 2° - Temperatura ambiente	30 minutos
Rinsagem em PBS	
Tampão PBS (sob agitação) I	5 minutos

	Tempo
Tampão PBS (sob agitação) II	5 minutos
Tampão PBS (sob agitação) III	5 minutos
Rinsagem em H ₂ O destilada	
DAB (Chromogen Substrate Bulk Pack, SeyTek Laboratories)	2 minutos
Rinsagem em H ₂ O destilada	
DAB (Chromogen Substrate Bulk Pack, SeyTek Laboratories)	5 minutos
H ₂ O destilada (sob agitação)	5 minutos
H ₂ O destilada (sob agitação)	5 minutos
Hematoxilina	15 segundos
Água corrente	20 minutos
Álcool 70%	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 100% I	2 minutos
Álcool 100% II	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos
Xilol III	Montagem

- A colagem das lamínulas é feita com Permount
- Deixar secar as lâminas por 72 horas antes de manusear.