

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA DOCE E PESCA
INTERIOR – PPG BADPI

Respostas fisiológicas e metabólicas do tambaqui (*Colossoma
macropomum*, Cuvier 1818) às alterações climáticas previstas pelos
diferentes cenários do IPCC para o ano de 2100

Fernanda Garcia Dragan

Manaus, Amazonas

02/2015

FERNANDA GARCIA DRAGAN

Respostas fisiológicas e metabólicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) às alterações climáticas previstas pelos diferentes cenários do IPCC para o ano de 2100

Orientadora: Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Financiamento: Bolsa - CAPES

INCT-ADAPTA FAPEAM (3159/08) – CNPq (573976/2008-2)

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Manaus, Amazonas

02/2015

D759 Dragan, Fernanda Garcia
Respostas fisiológicas e metabólicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) às alterações climáticas previstas pelos diferentes cenários do IPCC para o ano de 2100 / Fernanda Garcia Dragan. --- Manaus : [s.n], 2014.
xiv, 81 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.

Orientador : Vera Maria Fonseca de Almeida e Val.

Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

1. *Colossoma macropomum*. 2. Tambaqui. 3. LDH. I. Título.

CDD 597.5

À minha família, pelo apoio incondicional
e por todo o amor, mesmo a distância.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais por terem estimulado minha mente inquieta, por me permitirem sonhar e por sempre estarem do meu lado.

À minha irmã por ser uma das pessoas mais importantes da minha vida, me apoiando incondicionalmente, mesmo quando não faz ideia do que eu estou falando.

Ao amor que descobri durante esta jornada e que me manteve forte, mesmo quando achava que não tinha mais força.

À querida Dra. Vera, por ter me dado a oportunidade de mostrar do que sou capaz. Nunca vou esquecer o carinho com o qual me recebeu e nem o estímulo que me deu para que eu me tornasse melhor do que era quando comecei.

Ao Dr. Adalberto por me abrir a porta para uma área inusitada e apaixonante. Agradeço a confiança que depositou em mim.

À MSc. Nazaré, pela amizade, carinho e broncas. Sem sua ajuda muito deste trabalho não seria possível!

À Alzira pela incrível parceria que permitiu a realização do experimento. Agradeço também pelo apoio, dicas e assistências ao longo desse processo de crescimento.

Ao Derek pela disponibilidade e paciência em me ajudar nas análises de LDH.

À Leka por abraçar o microcosmos, pelo apoio com as análises diárias ao longo do experimento e pela amizade.

À Luciana, pelo apoio e ajuda na fase final dessa etapa.

À Susana pela amizade e apoio desde o início dessa minha jornada.

Aos amigos Jéssica, Denise, Rodrigo e Marcos por estarem junto a mim durante os experimentos no microcosmo.

Ao “Portuga” pela ajuda no experimento do polígono.

À toda a equipe do LEEM pelo apoio, amizade e ensinamentos.

Às secretárias do LEEM, Claudinha e D. Rai pelo carinho e atenção.

Às secretárias do PPG-BADPI, em especial a Carminha, por ser uma pessoa tão especial.

À Capes pela concessão da bolsa.

Aos meus amigos pelo carinho, apoio e compreensão ao longo do percurso.

À toda a minha família por estar perto, mesmo estando longe.

À Sophia, meu pinguinho de gente que veio pra tornar minha vida mais especial.

E, por fim, agradeço aos membros da banca avaliadora que gentilmente dispuseram do seu precioso tempo para leitura e presença neste momento tão esperado.

Obrigada!

"Aqui, no entanto, nós não olhamos para trás por muito tempo. Nós continuamos seguindo em frente, abrindo novas portas e fazendo coisas novas. Porque somos curiosos... e a curiosidade continua nos conduzindo por novos caminhos.

Siga em frente."
Walt Disney

RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie que possui diversas adaptações que lhe permitem sobreviver às diversidades impostas pelos ambientes amazônicos. Em contrapartida, ainda são necessários estudos para compreender os impactos que as mudanças climáticas terão sobre esta espécie. Existe uma relação direta entre temperatura e a distribuição da espécie em seu ambiente. O tambaqui foi aclimatado em quatro temperaturas distintas (25°, 28°, 31° e 34°C) por 14 dias, seguido de uma alteração linear de temperatura até atingir o valor subletal. Os resultados permitiram a obtenção do polígono de tolerância térmica da espécie, cuja área total é de 266,71°C². O tambaqui apresenta baixa plasticidade térmica quando comparado às espécies de clima temperado. No experimento envolvendo exposição por 30 dias aos cenários climáticos previstos pelo IPCC para 2100, o tambaqui apresentou alterações significativas ($p < 0,05$), após 30 dias de exposição no hematócrito em relação ao tempo zero nos cenários intermediário e extremo. A atividade da LDH de músculo apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) nos animais expostos por 30 dias nos cenários brando, intermediário e extremo em relação aos respectivos tempos zero. A razão LDH1/LDH10 indicou inibição para o músculo cardíaco e esquelético. Nas análises de cinética enzimática da LDH, o K_m do coração do tambaqui não apresentou alterações significativas ao longo do experimento, reafirmando sua termoestabilidade. Em contrapartida, o K_m da LDH do músculo do tambaqui apresentou aumento significativo após 30 dias de exposição em relação ao tempo zero. O presente estudo verificou que o aumento de temperatura concomitante ao aumento de CO₂ provocam estresse metabólico no tambaqui.

ABSTRACT

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is a well adapted fish, since it survives natural environmental adversities of Amazon ambient. However, we still need to understand the possible effects of climate changes over this species. There is a straight relationship between temperature and this species distribution in it's natural habitat. Several fish were acclimated in four distinct temperatures (25°, 28°, 31° e 34°C) during 14 days, following by a linear increase or decrease in temperature, until reaching the sublethal temperatures. The temperature tolerance polygon was determined with a total area of 266,71°C². Results show that tambaqui has lower thermal plasticity in comparison with temperate species. The experiment's related to 30 days exposure to IPCC climate change scenarios for 2100, resulted in hematological changes for tambaqui after 30 days. Hematocrit showed to be significantly different ($p < 0,05$) after 30 days, suggesting that the exposure to the different scenarios caused stress in these fish. Muscle LDH activity showed to be significantly different ($p < 0,05$) after 30 days of exposure to light, medium and extreme scenarios, in comparison to initial time. LDH ratio indicates inhibition of LDH in muscle and heart tissue. LDH kinetic results in heart muscle LDH resulted in no significant differences during the experiment, reassuring its thermostability. On the other hand, the K_m of skeletal muscle LDH showed, for animals exposed after 30 days to the scenarios, to be variable ($p < 0,05$). The present study concludes that high temperatures with high CO₂ concentrations induce metabolic stress on tambaqui.

Sumário

Lista de Tabelas	xii
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviações e Siglas	xiii
INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 O tabaqui e as mudanças climáticas	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
Capítulo I- Tolerância térmica do tabaqui (<i>Colossoma macropomum</i>, Cuvier, 1818) em diferentes temperaturas de aclimação	6
INTRODUÇÃO	7
1.1 A Temperatura como fator limitante	7
1.2 O polígono de tolerância térmica	9
2 OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	11
3.1 Obtenção dos animais	11
3.2 Delineamento experimental	11
3.3 Determinação do polígono de tolerância térmica	12
3.4 Acompanhamento da qualidade da água	12
3.5 Análise estatística	13
4 RESULTADOS	13
5 DISCUSSÃO	15

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	18
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18
Capítulo II- Efeito de diferentes cenários climáticos sobre a LDH do tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>, Cuvier 1818)	23
INTRODUÇÃO	24
1.1 Efeito da temperatura e CO ₂ sobre os peixes	24
1.2 Lactato Desidrogenase (LDH)	25
1.3 Efeito da temperatura e CO ₂ sobre o sangue dos peixes	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Obtenção dos animais e aclimação	29
3.2 Delineamento Experimental	29
3.2.1 Cenários climáticos em microcosmos	29
3.2.2 Exposição aos cenários climáticos em microcosmos	30
3.3 Acompanhamento da qualidade da água	31
3.4 Obtenção das amostras	31
3.5 Análise dos Parâmetros sanguíneos	32
3.6 Atividade e cinética da LDH	32
3.7 Análise Estatística	33
4 RESULTADOS	34
4.1 Microcosmos	34
4.2 Parâmetros sanguíneos	36
4.3 Atividade da LDH	38
4.4 Cinética Enzimática da LDH	41
5 DISCUSSÃO	47

5.1 Parâmetros físico-químicos da água	47
5.2 Estresse do tabaqui exposto aos cenários	47
5.3 Efeito dos cenários climáticos na atividade da LDH	49
5.4 Taxa de inibição da LDH	51
5.5 Cinética da LDH vs cenários climáticos	52
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAL	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

Lista de Tabelas

Capítulo I- Tolerância térmica do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) em diferentes temperaturas de aclimação

Tabela 1. Características físico-químicas da água e dos juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) durante os experimentos de tolerância térmica 12

Tabela 2. CTmáximas e CTmínimas para cada temperatura de aclimação 12

Capítulo II- Efeito de diferentes cenários climáticos sobre a LDH do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818)

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água utilizada no experimento com tambaqui em microcosmos 35

Tabela 2. Razão enzimática da LDH do coração de tambaqui..... 39

Tabela 3. Razão enzimática da LDH do músculo esquelético de tambaqui..... 40

Lista de Figuras

Capítulo I- Tolerância térmica do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) em diferentes temperaturas de aclimação

Figura 1. Temperaturas máxima e mínima para o tambaqui submetido em diferentes temperaturas de aclimação..... 13

Capítulo II- Efeito de diferentes cenários climáticos sobre a LDH do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818)

Figura 1. Representação das condições de cada cenário simulados pelos microcosmos	29
Figura 2. Valores diários da concentração de CO ₂ no ar nos diferentes cenários ao longo do período experimental em microcosmos.....	34
Figura 3. Valores diários da temperatura do ar nos diferentes cenários ao longo do período experimental em microcosmos.....	34
Figura 4. Valores de temperatura e concentração de CO ₂ do ar no período de 24 horas nos cenários climáticos.....	35
Figura 5. Glicose dos indivíduos de tabaqui expostos por 30 dias em microcosmos.....	36
Figura 6. Hematócrito dos indivíduos de tabaqui expostos por 30 dias em microcosmos.....	37
Figura 7. Atividade da LDH presente no coração de tabaqui.....	38
Figura 8. Atividade da LDH presente no músculo esquelético de tabaqui	39
Figura 9. Perfil de saturação da LDH do coração de tabaqui a concentrações de piruvato dos animais expostos ao cenário controle.....	41
Figura 10. Perfil de saturação da LDH do coração de tabaqui a concentrações de piruvato dos animais expostos ao cenário brando.....	41
Figura 11. Perfil de saturação da LDH do coração de tabaqui a concentrações de piruvato dos animais expostos ao cenário Intermediário.....	42
Figura 12. Perfil de saturação da LDH do coração de tabaqui a concentrações de piruvato dos animais expostos ao cenário extremo.....	42
Figura 13. Perfil de saturação da LDH do músculo esquelético de tabaqui a concentrações de piruvato dos animais expostos ao cenário controle.....	43
Figura 14. Perfil de saturação da LDH do músculo esquelético de tabaqui a concentrações de piruvato dos animais expostos ao cenário brando.....	44

Figura 15. Perfil de saturação da LDH do músculo esquelético de tabaqui a concentrações de piruvato dos animais expostos ao cenário intermediário.....	44
Figura 16. Perfil de saturação da LDH do músculo esquelético de tabaqui a concentrações de piruvato dos animais expostos ao cenário extremo.....	45
Figura 17. Cinética enzimática da LDH de coração dos indivíduos de tabaqui expostos por 30 dias em microcosmos.....	46
Figura 18. Cinética enzimática da LDH de músculo dos indivíduos de tabaqui expostos por 30 dias em microcosmos.....	47

Lista de Abreviações e Siglas

ATP	Adenosina trifosfato
A1B	Cenário intermediário
A2	Cenário extremo
B1	Cenário brando
Cm	Centímetro
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CO ₂	Dióxido de carbono
CTM	Metodologia de Temperatura Crítica (do inglês: <i>Critical Thermal Meodology</i>)
Ct _{máx}	Temperatura crítica máxima
Ct _{min}	Temperatura crítica mínima
°C	Graus Celsius
°C ²	Graus celsius elevado ao quadrado

EPA	Do inglês: <i>United States Environmental Protection Agency</i>
G	Gramas
H ⁺	Hidrogênio
HCO ³⁻	Íons bicarbonato
HIF-1	Do inglês: <i>hypoxia inducible fator 1</i>
Ht	Hematócrito
[Hb]	Concentração de hemoglobina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IPCC	Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (do inglês: <i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>)
K _m	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LDH	Lactato desidrogenase
mg/L	Miligrama por litro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm ³	Milímetro cúbico
μg	Micrograma
μL	Microlitro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sódio
NADH	Nicotiamida adenina dinucleotídeo oxidada
NASA	Administração Nacional da Aeronáutica e do Espaço (do inglês: <i>National Aeronautics and Space Administrations</i>)
Nm	Nanômetro
NSIDC	Do inglês: <i>National Snow and Ice Data Center</i>
O ₂	Oxigênio
pCO ₂	Pressão parcial do CO ₂ no sangue

pH	Potencial hidrogeniônico
Ppm	Partes por milhão
PVC	Policloreto de vinila
RBC	Do inglês: <i>Red blood cell</i>
Rpm	Rotações por minuto
[S]	Concentração de substrato
SEM	Erro padrão da média
TL ₅₀	Temperatura letal 50 por cento
VCM	Volume corpuscular médio
V _{max}	Velocidade máxima da enzima
V ₀	Velocidade inicial da enzima

INTRODUÇÃO

1.1 O tabaqui e as mudanças climáticas

O termo “mudança climática” refere-se comumente a todos os tipos de alterações climáticas que durem por décadas ou mais, incluindo mudanças na temperatura, na precipitação, concentração de dióxido de carbono (CO₂) ou padrão de vento, entre outros (NASA, 2012a). Tais mudanças podem ser causadas por processos naturais do sistema climático, por mudanças na atividade solar, por mudanças nos elementos orbitais do planeta e por atividades antropogênicas (EPA, 2012; NSIDC, 2012). Para melhor compreensão, o enfoque da presente dissertação será com relação ao aumento da temperatura e da concentração de dióxido de carbono de acordo com alguns cenários preconizados pelo quarto relatório do IPCC (Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas) para o ano de 2100.

Estudos paleoclimáticos buscam entender o funcionamento dos ciclos climáticos e Petit *et al.* (1999) acreditam, inclusive, ser plausível afirmar que os gases do efeito estufa (dióxido de carbono, óxido nitroso, metano, clorofluorcarbonetos e vapor d'água) têm a capacidade de influenciar em até 3°C a temperatura média do planeta. Em meio a estes fatos, a preocupação atual com relação aos eventos climáticos está relacionada com a influência que o ser humano pode ter sobre eles (Henderson-Sellers & McGuffie, 2012).

Um marco importante com relação às atividades antrópicas, por consequência das emissões de CO₂, ocorreu na década de 1950, quando o nível de CO₂ atmosférico ultrapassou os valores máximos registrados nos últimos 400 mil anos, apresentando, desde então, um aumento contínuo, sendo este acompanhado por um aumento de temperatura (NASA, 2012b). Conforme tais alterações foram ocorrendo, cientistas de diversos países sentiram a necessidade de estudar suas consequências. Foi criado então, em 1988, o IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*) cujo objetivo é consolidar e reunir informações climáticas globais, não apenas com a condição atual do planeta, mas também com previsões climáticas baseadas nas condições atuais, e disponibilizá-las em relatórios detalhados (IPCC, 2013).

Embora as consequências destas mudanças ainda sejam desconhecidas, algumas se tornam cada vez mais evidentes, como a diminuição da área da calota polar ártica, que vem sendo registrada desde 1979; a diminuição da massa do gelo antártico e o consequente aumento do nível dos oceanos (NASA, 2012b). Estudos sobre as possíveis consequências na Amazônia indicam que suas florestas podem estar em um limiar, com capacidade de transformar completamente seus ambientes (Henderson-Sellers & McGuffie, 2012). Os modelos climáticos para a região da Amazônia precisam de aprimoramento para uma maior precisão das previsões, entretanto especulações têm sido apresentadas em duas vertentes opostas: a savanização da floresta pela diminuição do regime de chuvas, e o aumento de tempestades devido à uma maior intensidade no regime de chuva. Ambas as previsões propiciam impactos aos ambientes terrestre e aquático (Manzi, 2008).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) ocorre naturalmente tanto na bacia do Rio Amazonas quanto na bacia do Rio Orinoco, estando presente no Brasil, Bolívia, Peru, Venezuela e Colômbia. Possui adaptações para viver em águas claras, pretas e brancas, embora seja mais abundante em rios de água branca (Araújo-Lima & Goulding, 1998). Ele é um peixe pertencente à ordem Characiformes da família Serrasalminidae (Mirande, 2010). É uma espécie de corpo alto e comprimido que possui uma nadadeira adiposa raiada (Ferreira *et al.*, 1998) característica deste grupo. É onívora e apresenta dentes molariformes que lhe permite alimentar-se de frutos e sementes, tendo como alternativa o zooplâncton (Ferreira *et al.*, 1998; Santos *et al.*, 2006). Pelo fato do tambaqui ser um dos peixes mais apreciados da culinária local e apresentar um alto valor comercial, sua criação em cativeiro vem se tornando cada vez mais intensa (Ferreira *et al.*, 1998; Val & Honczaryk, 1995; Golding & Carvalho, 1982; Santos *et al.*, 2006). Apesar disso, devido à sua sobre-pesca, a espécie integra a lista do IBAMA, desde 2003, de espécies protegidas durante o período de defeso conforme Instrução Normativa Nº35/2005 (MMA, 2012).

Os diferentes tipos de água da Amazônia possuem características distintas com relação ao pH, condutividade, carbono orgânico dissolvido (COD), entre outros (Sioli, 1985) e, sendo assim, o tambaqui necessita ter uma ampla faixa de tolerância para ser capaz de habitar todos esses ambientes.

Essa espécie possui diversas adaptações que lhe permitem sobreviver às diversidades impostas pelos ambientes amazônicos. Conforme a concentração de oxigênio dissolvido diminui, o tambaqui aumenta a taxa de ventilação branquial com o objetivo de otimizar a captação de oxigênio (Araújo-Lima & Goulding, 1998) e os níveis de lactato aumentam rapidamente (Almeida-Val *et al.*, 1993). Quando o nível de oxigênio fica inferior a 0.5 mg/L, o lábio inferior expande-se com a formação de um edema, permitindo que o indivíduo capte a camada superficial da água, onde se encontra uma concentração maior de oxigênio, regredindo o lábio quando o ambiente volta a normóxia (Val *et al.*, 1998). Estudos com a espécie indicam que o aumento da temperatura proporciona um aumento na taxa de crescimento relativo do tambaqui (Araújo-Lima & Goulding, 1998) e provoca uma diminuição na excreção de amônia (Ismiño-Orbe *et al.*, 2003). Já a exposição do tambaqui a uma temperatura elevada, juntamente à uma alta concentração de CO₂, induz a expressão da HSP70 (Heat Shock Protein) (Sakuragui *et al.*, 2012), sendo esta a proteína mais comum com relação à resposta ao estresse térmico (Hochachka & Somero, 2002). Em experimento com aumento de temperatura em conjunto com o aumento do CO₂, o tambaqui apresentou anormalidades nucleares eritrocíticas significativas (Souza-Netto, 2012).

Embora a espécie apresente diversas adaptações para as variações ambientais, os resultados apresentados na literatura científica para a exposição a alterações de temperatura concomitante a alterações na concentração de CO₂, mostram um impacto negativo sobre a espécie. Em contrapartida, ainda são necessários estudos complementares para compreender os impactos que as mudanças climáticas terão sobre o tambaqui.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida-Val, V. M. F.; Val, A. L.; Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in amazon fishes: status of an under-explored biological “goldmine”. IN: Hochachka, P. W.; Lutz, P. L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Thillart, G. V. den.

- (Eds.). *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation*. Boca Raton, CRC Press, p. 435-445.
- Araújo-Lima, C. A. R. M.; Goulding, M. 1988. *Os frutos do tambaqui*. Editora Sociedade Civil Mamirauá. Tefé, 186p.
- Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S.; Santos, G. M. 1998. *Peixes Comerciais do Médio Amazonas*. 1ª ed. Editora IBAMA, Brasília, 211p.
- Goulding, M.; Carvalho, M. L. 1982. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia*, 1: 107–133.
- Hochachka, P. W.; Somero, G. N. 2002. *Biochemical Adaptation*. Oxford University Press, New York, 466 p.
- Ismiño-Orbe, R. A.; Araújo-Lima, C. A. R. M.; Gomes, L. C. 2003. Excreção de amônia por tambaqui (*Colossoma macropomum*) de acordo com variações na temperatura da água e massa do peixe. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38(10): 1243-1247.
- Mirande, J. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. *Neotropical Ichthyology*, 8(3): 385-568.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente), 2012. (www.ibama.gov.br). Acesso em: 20/10/2013.
- Sakuragui, M. M.; Caterina, F. E. G.; Vasquez, K. L.; Fagundes, D. B.; Nozawa, S. R.; Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F. 2012. Heat shock expression in *Colossoma macropomum* exposed to increased temperature and CO₂. *ADAPTA Short Note*, 1: 34-36.
- Santos, G. M.; Ferreira, E. J. G.; Zuanon, J. A. S. 2006. *Peixes comerciais de Manaus*. Editora IBAMA, Manaus, 146 p.
- Sioli, H. 1985. *Amazônia fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais*. Editora Vozes, 72p.

- Souza-Netto, J. G. 2012. *Respostas fisiológicas de Colossoma macropomum (Cuvier 1818) ao aumento de temperatura e CO₂*. Dissertação de mestrado para o Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 59p.
- Val, A. L.; Honczaryk, A. 1995. *Criando Peixes na Amazônia*. Editora INPA, Manaus, 149 p.
- Val, A. L; Paula-Silva, M. N.; Almeida-Val, V. M. F. 1998. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. *South African Journal of Surgery*, 33(2): 107-114.

Capítulo I- Tolerância térmica do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) em diferentes temperaturas de aclimação

INTRODUÇÃO

1.1 A Temperatura como fator limitante

Os limites de tolerância encontram-se relacionados com os valores mínimo e máximo de fatores que influenciam o sucesso de um organismo ou de um grupo. Esses fatores não são obrigatoriamente físicos e há possibilidade de adaptação dos organismos, embora esta seja dificultada conforme as condições se aproximem dos extremos (Odum, 2010). Um fator letal é aquele que impõe uma condição na qual o animal morre em consequência de falhas no seu metabolismo promovidas pelo fator em questão. Já um fator limitante, implica na restrição ou privação de um recurso, impondo um custo energético adicional para sua regulação (Wootton, 1990). Estudos fisiológicos colaboram na estimativa dos efeitos que as mudanças climáticas vão ter, por determinarem quais espécies vivem perto do seu limite máximo de temperatura (Somero, 2009).

Os peixes, em sua maioria, possuem sua temperatura corporal semelhante à do ambiente em que se encontram. Fato que ocorre por conta da passagem do sangue pelas lamelas, sendo resfriado pela água que envolve as brânquias (Schmidt-Nielsen, 2010). O calor específico elevado da água torna o processo de modificação da temperatura da mesma lento, permitindo que os peixes migrem para regiões com temperaturas mais favoráveis (Wootton, 1990). No entanto, no caso de permanência no ambiente alterado, os peixes podem sofrer de estresse térmico que, como todo fator estressante, desencadeia no animal respostas como aumento de catecolaminas, alterações na glicose, íons e parâmetros hematológicos, podendo inclusive influenciar no crescimento, capacidade de natação, entre outros (Barton, 2002). O efeito do clima pode influenciar negativamente os peixes, podendo inclusive prejudicar o desempenho reprodutivo (Pörtner & Peck, 2010)

Os peixes possuem a capacidade de sobreviver dentro de uma faixa de temperatura limitada pelos valores incipientes de temperatura letal superior e inferior (Wootton, 1990). Consequentemente, existe uma relação direta da temperatura em relação à distribuição da espécie conforme a temperatura do ambiente (Brett, 1969). Caudill *et al.* (2013) ressaltam a importância de se estudar os regimes térmicos com o intuito de compreender o deslocamento dos peixes. De forma geral, é mais rápida

a aclimação a temperaturas mais elevadas que a temperaturas mais baixas (Schmidt-Nielsen, 2010). No entanto, os limites superiores tendem a se tornarem críticos com uma maior facilidade que os inferiores (Odum, 2010). Portanto, muitas das espécies adaptadas a regiões tropicais são mais vulneráveis ao aumento da temperatura do que espécies adaptadas a regiões temperadas (Somero, 2005).

Em experimentos que visam averiguar o limite térmico de uma espécie, o tempo de exposição influencia diretamente o resultado final (Terblanche *et al.*, 2011). Os organismos, em geral, possuem distinção entre a faixa de tolerância ao longo do seu desenvolvimento (Wilson & Nagler, 2006). Comumente, a faixa de tolerância é mais estreita no início do desenvolvimento e durante o período reprodutivo (Moyes & Schulte, 2010; Odum, 2010). Estudos com o aumento da temperatura demonstram em *Acanthochromis polyacanthus* a diminuição da atividade da enzima colinesterase (Botté *et al.*, 2013) e do seu sucesso reprodutivo (Donelson *et al.*, 2010), assim como um aumento na bioacumulação de mercúrio em *Lepomis macrochirus* (Cember & Curtis, 1978). Em revisão bibliográfica Gale *et al.* (2013) verificaram que o aumento da temperatura representa um aumento da mortalidade de peixes em condição de captura em 70% dos artigos analisados. A temperatura também influencia as larvas de peixes, podendo influenciar no crescimento como no caso de indivíduos de *Amphiprion melanopus* (Green & Fisher, 2004); na taxa de sobrevivência como no estudo com *Amphiprion clarkii* (Le *et al.*, 2011); e inclusive na tolerância a salinidade, como demonstrado em indivíduos de *Lophosilurus alexandri* (Martins *et al.*, 2014). A variação da temperatura de acordo com a latitude colabora para a determinação da distribuição das espécies nos ambientes aquáticos marinhos e de água doce (Hochachka & Somero, 2002).

A tolerância térmica dos peixes varia entre as espécies e encontra-se intimamente ligada às variações de temperatura pelas quais as espécies estão submetidas em seu habitat natural (Hochachka & Somero, 2002). As consequências provocadas por modificações na temperatura da água por meio de mudanças climáticas advindas de atividades antrópicas podem ser diferentes entre as espécies, podendo inclusive ocorrer espécies não afetadas (Elliott, 1991). Um exemplo desta condição são os resultados obtidos por Fé (2014) ao expor duas espécies de peixes ornamentais, *Paracheirodon axeroldi* e *Paracheirodon simulans*,

ao aumento de temperatura e CO₂. Ao fim do experimento, os indivíduos de *P. axeroldi* apresentaram alta taxa de mortalidade enquanto os indivíduos de *P. simulans* não foram afetados. Desta forma, a resposta que os organismos ectotermos vão ter às mudanças que o aumento da temperatura corporal provocará no seu metabolismo será vital para o entendimento dos efeitos das mudanças climáticas (Somero, 2005).

1.2 O polígono de tolerância térmica

O polígono de tolerância térmica pode ser determinado através da CTM (*Critical Thermal Methodology*), que permite caracterizar a tolerância térmica dos peixes. A aplicação desta técnica envolve a aclimação de uma dada espécie a diferentes temperaturas, seguida de uma alteração linear de temperatura até um valor subletal (Beitinger *et al.*, 2000). Uma característica favorável quanto a este método é a capacidade de estimar temperaturas letais sem necessariamente matar o animal (Ford & Beitinger, 2005). Ao determinarmos as temperaturas de aclimação é necessário cautela, pois é preciso levar em consideração a faixa de temperatura na qual a espécie apresenta seu ciclo de vida (Hernández & Buckle, 2002).

A conformação do polígono permite especulações quanto ao papel da aclimação na tolerância térmica das espécies (Beitinger & Bennett, 2000) além de servir como ferramenta para a comparação entre espécies (Elliott, 1991). Sua área, expressa em °C², reflete o quão euritérmica é a espécie (Ford & Beitinger, 2005). Existem diversas variações metodológicas para a determinação de um polígono de tolerância térmica. A taxa de variação da temperatura deve ser determinada com cuidado. É necessário assegurar-se que a taxa de variação da temperatura não será lenta o suficiente para o animal se aclimatar e nem rápida o suficiente para provocar choque térmico no animal. Quanto maior a taxa de variação, maior será a diferença da temperatura final para a temperatura incipiente letal (Becker & Genoway, 1979). Comumente, é considerada a apresentação de perda de equilíbrio como fim do experimento (Bennett & Beitinger, 1997) por representar a perda da capacidade de escapar de uma condição que levará o animal à morte (Beitinger *et al.*, 2000).

A finalidade em se estabelecer diferentes temperaturas de aclimação está na variação encontrada tanto nas CTmáximas (Temperatura Crítica Máxima) quanto nas CTmínimas (Temperatura Crítica Mínima). Quanto maior a temperatura de aclimação, maior será o valor de ambas, sendo o oposto verdadeiro (Currie *et al.*, 1998). No entanto, os limites mínimos e máximos de temperatura da conformação geral de um polígono de tolerância térmica contem platôs. Após atingir o platô, mesmo que a temperatura de aclimação continue sendo alterada em direção ao extremo, a temperatura máxima, ou mínima se mantém constante (Beitinger & Bennett, 2000). Experimentos realizados com fatores ambientais permitem a compreensão do papel de tais fatores nas espécies com relação ao seu desenvolvimento e ao metabolismo (Brett, 1969).

O presente estudo teve por finalidade ampliar a compreensão da tolerância do tambaqui (*Colossoma macropomum*) à temperatura. Diante das constantes alterações climáticas registradas, o aprofundamento de estudos na área permitirá estimar as possíveis consequências para a espécie. Por ser uma espécie de alto valor comercial, o impacto não afeta apenas a biodiversidade, mas também a economia da região.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a tolerância térmica do tambaqui (*Colossoma macropomum*) quando aclimatado a diferentes temperaturas.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar os limites inferior e superior de temperatura do tambaqui (*Colossoma macropomum*);

Definir o polígono de tolerância térmica do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos animais

Juvenis de *Colossoma macropomum* com comprimento médio de $6,45 \pm 0,1$ cm e peso médio de $8,25 \pm 0,4$ g foram adquiridos na Fazenda Tajá (Km 101-BR174) e transportados para o Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/CBio/INPA). No laboratório, os animais foram aclimatados à temperatura aproximada de 26°C e alimentados *ad libitum* com ração comercial, uma vez ao dia por duas semanas. A alimentação foi suspensa 24 horas antes do início dos experimentos.

3.2 Delineamento experimental

Foram montados 2 tanques para o grupo de resfriamento e 2 tanques para o grupo de aquecimento. Em cada tanque foram colocados 8 aquários de 2 L cada. As paredes dos aquários contiam furos que permitiam a entrada e saída da água proveniente do tanque. Para impedir que os indivíduos de tambaqui se machucassem nos furos, ou que eles pudessem ver uns aos outros, a parede interna de aquário estava revestida por uma tela azul. O excesso de água dos tanques era drenado por um ladrão que direcionava a água ou para o reservatório central de aquecimento ou para o reservatório central de resfriamento, dependendo de a qual grupo pertencesse o tanque. Uma bomba de água em cada reservatório central enviava a água de volta para os tanques, permitindo que o sistema tivesse circulação constante.

Para resfriar a água foi utilizado um sistema de serpentina de alumínio atrelado a um motor de geladeira, controlado por um termostato digital (TIK- 17). Para aquecer a água foi utilizado um mergulhão comercial (110v) controlado por termostato digital (TIK-17).

Os animais foram transferidos para o sistema do polígono com a água em temperatura ambiente. A temperatura foi modificada 1 °C por hora até atingir 25 °C. Tanto os animais do grupo de resfriamento quanto os animais do grupo de aquecimento permaneceram 14 dias a 25 °C para o período de aclimação, durante

o qual ocorreu privação alimentar. Foi feita a troca parcial da água há cada 3 dias e sempre antes do experimento ser iniciado.

Passado o período de aclimação, foi dado início ao experimento. A mudança de temperatura foi realizada sempre na razão de 1°C por hora até que 50% dos indivíduos de cada grupo apresentasse perda de equilíbrio (modificado de Hernández & Buckle, 1998). A perda de equilíbrio foi representada pela perda da capacidade do indivíduo em manter-se no eixo vertical, mesmo com estímulo. Ao final do experimento, todos os animais foram medidos e pesados utilizando-se um ictiômetro e uma balança analítica Marte BL3200H.

Esse procedimento foi repetido mais 3 vezes tendo como temperaturas de aclimação 28 °C, 31°C e 34 °C. As temperaturas de aclimação foram determinadas conforme a faixa de temperatura na qual a espécie se encontra na natureza, conforme descrito por Araújo-Lima & Golding (1998).

O manuseio e eutanásia dos animais obedecem as normas das diretrizes brasileiras para ética no uso de animais de laboratório, publicadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) (CONCEA, 2013 a; b). O experimento realizado no presente trabalho foi aprovado pelo CEUA do INPA e tem por número de protocolo 023/2012.

3.3 Determinação do polígono de tolerância térmica

As médias obtidas com os valores finais dos grupos de aquecimento e resfriamento foram utilizadas para delimitar as margens do polígono. Para cada temperatura de aclimação foi obtida uma temperatura máxima e outra mínima. As faixas de temperatura obtidas para as 4 temperaturas de aclimação possuíam uma região em comum que foi usada para calcular a zona de tolerância intrínseca. Já as regiões das faixas que não eram comuns as quatro, foram utilizadas para os cálculos das zonas de tolerância adquiridas superior e inferior. Sendo assim, a figura geométrica gerada foi subdividida em três áreas distintas: zona de tolerância intrínseca; zona de tolerância adquirida superior e zona de tolerância adquirida inferior (Bennet & Beitinger, 1997).

3.4 Acompanhamento de parâmetros da água

No decorrer do experimento foram realizadas medidas de pH, com auxílio de um pHmetro PG 1800 e de oxigênio dissolvido utilizando-se um oxímetro YSI-85. As medidas tiveram por objetivo garantir que os animais não estivessem sob hipóxia ou hiperóxia, uma vez que a alteração da temperatura influencia inversamente a solubilidade do oxigênio na água.

3.5 Análise estatística

As análises dos resultados obtidos para as CTmáximas e CTmínimas foram realizadas utilizando-se a análise de variância com um fator (*One way ANOVA*) sendo temperaturas de aclimação *versus* temperatura final, seguido do pós-teste de Dunn (Zar, 1984). O nível de significância admitido foi 95% ($p < 0,05$). O gráfico do polígono, assim como as análises de variância, foram obtidos utilizando-se o pacote estatístico SigmaPlot 11.0.

4. RESULTADOS

Durante o experimento foram realizadas análises do pH e oxigênio de cada grupo. Embora tanto os grupos de resfriamento quanto os de aquecimento tenham sido aerados da mesma forma, foi verificado uma diferença significativa entre eles. No entanto, não foi observada diferença quanto a peso e comprimento dos indivíduos e nem quanto ao pH dos tratamentos. Os valores de qualidade de água medidos durante o experimento, assim como o peso e o comprimento dos animais utilizados estão expostos na tabela 1.

Tabela 1. Características físico-químicas da água e dos juvenis de tambaqui (*C. macropomum*) durante os experimentos de tolerância térmica, divididos entre os experimentos de resfriamento e aquecimento. Os valores estão apresentados como média \pm erro padrão da média.

	Peso (g)	Comprimento (cm)	pH	Oxigênio (mg/L)
Resfriamento	8,19 \pm 0,35	6,49 \pm 0,09	6,64 \pm 0,27	8,42 \pm 0,45*
Aquecimento	8,32 \pm 0,49	6,42 \pm 0,1	5,71 \pm 0,41	5,59 \pm 0,23*

(*) Indica diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de resfriamento em relação ao de aquecimento.

Os juvenis de tambaqui apresentaram uma CTmáxima de 43,48°C \pm 0,21 enquanto a CTmínima foi 12°C \pm 0 (Tabela 2). No caso das temperaturas máximas,

em nenhum dos grupos foi possível obter uma TL₅₀, a mortalidade foi de 100% dos indivíduos sem que apresentassem perda de equilíbrio. Em contrapartida, nos grupos nos quais foi realizado o procedimento de resfriamento, foi possível estabelecer uma TL₅₀.

Tabela 2. CT_{máximas} e CT_{mínimas} para cada temperatura de aclimação. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média.

	25 °C	28 °C	31 °C	34 °C
Resfriamento	13,33 ± 1,85	12	13 ± 0,28	15,22 ± 0,27
Aquecimento	40,5 ± 0,84	43,48 ± 0,21	43,2	42,5

O polígono foi delimitado utilizando-se os valores máximos e mínimos obtidos em cada temperatura de aclimação, cuja área foi expressa em °C². A figura geométrica formada foi dividida em zona de tolerância intrínseca com uma área de 227,52°C², zona de tolerância adquirida superior com uma área de 20,04°C² e zona de tolerância adquirida inferior com uma área de 19,15°C², totalizando uma área de 266,71°C², conforme observado na figura 1. O gráfico permite a constatação de que foi estabelecido um platô na parte superior do polígono, referente as CT_{máximas}. No entanto o mesmo não ocorre na parte inferior

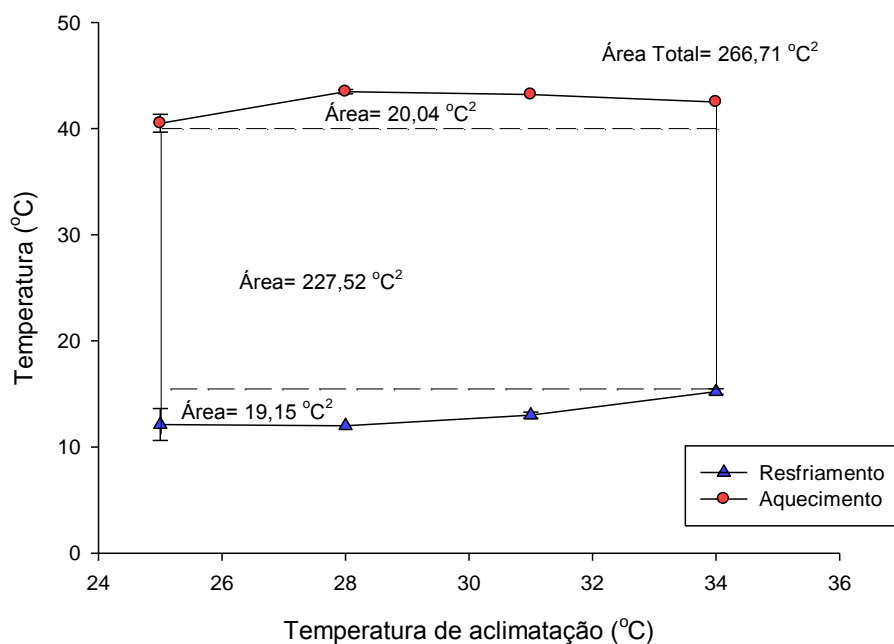


Figura 1. Temperaturas máxima e mínima para o tambaqui submetido em diferentes temperaturas de aclimação. As linhas pontilhadas internas delimitam as três zonas do polígono: zona de tolerância intrínseca; zona de tolerância adquirida superior e zona de tolerância adquirida inferior.

5. DISCUSSÃO

A aclimação é um mecanismo importante para que os organismos se adaptem a mudanças no ambiente (Donelson & Munday, 2012). Experimentos que testam limites térmicos são de extrema importância para a obtenção de um melhor entendimento da fisiologia do peixe (Eme & Bennett, 2009) além da sua ecologia (Odum, 2010). O polígono térmico disponibiliza um resumo das exigências térmicas de uma espécie (Elliott, 1991).

Durante a obtenção do polígono térmico de uma determinada espécie, é importante observar que a faixa de temperatura a ser testada deve estar de acordo com a variação de temperatura na qual a mesma está submetida em seu ambiente natural (Hernández & Buckle, 2002). Muitos dos experimentos com espécies de clima temperado têm as temperaturas de aclimação variando entre a faixa de 10°C a 40°C. No entanto, o tambaqui vive em uma faixa que varia de 25° a 34°C (Araújo-Lima & Goulding, 1998; Gomes *et al.*, 2010), e esta foi a faixa utilizada para estabelecer as temperaturas de aclimação do presente estudo.

Embora, no presente estudo, tenha existido uma diferença estatística significativa na concentração de oxigênio entre os animais expostos ao aquecimento em relação aos expostos ao resfriamento, os valores permaneceram dentro do padrão de qualidade de água para peixes (Wetzel, 1993; Arana, 1997). Durante os testes com as temperaturas de aclimação foi observado que nas temperaturas extremas (25° C e 34° C) os indivíduos não aceitavam a ração oferecida ou comiam pouco. Para a alimentação não se tornar um fator que diferenciasse os tratamentos, optamos por suspender a de todos os grupos. Dessa forma todos passariam pelo mesmo tipo de estresse. A privação alimentar durante os 14 dias de aclimação, tendo por base o estudo de Ituassu *et al.* (2004) sobre crescimento compensatório em tambaqui, encontra-se na margem de tolerância da espécie, apresentada no

estudo. Ituassu *et al.* (2004) comprovaram que a espécie tem a capacidade de permanecer 28 dias sob privação alimentar.

O presente estudo foi realizado com uma espécie de clima tropical e que, por tanto, sofre pouca variação de temperatura ao longo do ano. Sunday *et al.* (2011) observou que as faixas de tolerância quanto ao aumento de temperatura são maiores para espécies de ambientes com variações climáticas mais pronunciadas. Este fato justifica a faixa de temperatura obtida para o tambaqui ser menor que a obtida para *Cyprinodon variegatus* por Bennett & Beitinger (1997). No entanto, Donelson & Munday (2012) verificaram que a capacidade de *Acanthochromis polyacanthus* de se adaptar a diferentes temperaturas de aclimação não está diretamente relacionada com as experiências térmicas prévias dos indivíduos. Já em estudo com exemplares de *Salmo salar* L. foi verificado que a tolerância térmica variou entre as diferentes linhagens utilizadas (Anttila *et al.*, 2013).

A variação da área do polígono entre as espécies está relacionada com a aclimação ao ambiente preferencial de cada espécie (Hernández & Buckle, 2002). No presente estudo a área do polígono obtida foi de 266,71°C², um valor que representa 19,32% do valor apresentado na revisão realizada por Beitinger & Bennett (2000) para *C. variegatus*, cuja área é de 1380°C², uma das maiores já documentadas e 56,98% do valor apresentado no mesmo estudo para *Oncornynchus keta*, cuja área é de 468°C², o menor valor mostrado na revisão. Já, em comparação com espécies da região amazônica, a área total do polígono do tambaqui é 18,22% maior que a de *P. axelrodi* e 11,61% maior que a de *P. simulans* (Campos *et al.*, in prep.). Demonstrando que o tambaqui apresenta menor plasticidade térmica que peixes subtropicais e de clima temperado, mas é uma espécie mais euritérmica que as duas espécies amazônicas de peixes ornamentais e, assim, possui maior tolerância térmica que ambas.

Ao observar a conformação do polígono e os valores máximos obtidos no presente estudo, é possível verificar a presença de um platô na zona de tolerância adquirida superior. O platô é um indicador de que a temperatura, no caso do presente estudo a máxima, já foi atingida e, sendo assim, a aclimação em temperaturas superiores a 34 °C não vão apresentar novos valores para as CTMáximas (Beitinger & Bennett, 2000). No entanto, não foi observado platô nas

temperaturas mínimas, indicando que talvez seja possível aclimatar a espécie em temperaturas mais baixas.

A CT_{máxima} encontrada para o tambaqui no presente estudo se assemelha aos valores de CT_{máxima} encontrados para *Carassius auratus* por Ford & Beitinger (2005). No entanto, quando comparamos os valores mínimos encontrados para o tambaqui a 24°C, sua menor temperatura de aclimação, com os valores mínimos para *C. auratus* aclimatado a 25°C temos uma diferença de aproximadamente 8°C, demonstrando uma maior plasticidade térmica do *C. auratus* em relação ao tambaqui. Em experimento com larvas de *Rhamdia quelen*, a tolerância de animais aclimatados a 21°C e a 26°C foi semelhante, com temperatura máxima de 29,25°C (Chippari-Gomes *et al.*, 2000).

Currie *et al.* (1998) sugerem que mudanças na temperatura de aclimação possuem maior influência na tolerância a baixas temperaturas que na tolerância a altas temperaturas. Provavelmente em função da aclimação à diminuição da temperatura ser mais demorada que ao aumento da temperatura (Schmidt-Nielsen, 2010). Também é preciso considerar que o efeito da temperatura no crescimento e desenvolvimento de espécies tropicais nem sempre é melhor que o de espécies temperadas ou sub-tropicais (Le *et al.*, 2011). O conhecimento acerca da sensibilidade térmica, assim como os limites térmicos são de grande valor para o entendimento das adaptações das espécies ao ambiente atual e para colaborar em previsões dos efeitos que as mudanças climáticas vão ter sobre as mesmas (Pidcock, 2010).

É necessário levar em consideração que os resultados obtidos no presente estudo são para juvenis de tambaqui e, como comprovado por Wilson & Nagler (2006), a tolerância à temperatura pode alterar-se ao longo do período de vida do indivíduo. Outro ponto a ser levado em consideração é o fato de diferentes populações não necessariamente terem a mesma capacidade de aclimação térmica (Seebacher *et al.*, 2012). Sendo assim, animais de pisciculturas diferentes podem ter variação quanto à plasticidade térmica.

O tambaqui já é uma espécie amplamente cultivada em pisciculturas, não apenas da região Norte, como também Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (Pezzato

& Scorvo-Filho, 2000; Ostrensky *et al.*, 2008). Conseqüentemente, estudos acerca de sua tolerância térmica podem ser de grande interesse para os piscicultores de regiões com temperaturas mais frias.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O tambaqui apresenta baixa plasticidade térmica quando comparado às espécies de clima temperado.
- O tambaqui possui uma plasticidade térmica maior quando comparado a espécies da região.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arana, L. V. 1997. *Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura*. 1ª ed. Editora da UFSC, Florianópolis, 166p.
- Araújo-Lima, C. A. M.; Goulding, M. 1998. *Os Frutos do Tambaqui*. 1ª edição. Editora Sociedade Civil Mamirauá, Tefé, 186p.
- Anttila, K.; Dhillon, R. S.; Boulgind, E. G.; Farrell, A. P.; Glebe, B. D.; Elliott, J. A. K.; Wolters, W. R.; Schulte, P. M. 2013. Variation in temperature tolerance among families of Atlantic salmon (*Salmo salar*) is associated with hypoxia tolerance, ventricle size and myoglobin level. *The Journal of Experimental Biology*, 216: 1183-1190.
- Barton, B. A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3): 517-525.

- Becker, C. D.; Genoway, R. G. 1979. Evaluation of the critical thermal maximum for determining thermal tolerance of freshwater fish. *Environmental Biology of Fishes*, 4(3): 245-256.
- Beitinger, T. L.; Bennett, W. A. 2000. Quantification of the role of acclimation temperature in temperature tolerance of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 58: 277-288.
- Beitinger, T. L.; Bennett, W. A.; McCauley, R. W. 2000. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. *Environmental Biology of Fishes*, 58: 237-275.
- Bennett, W. A.; Beitinger, T. L. 1997. Temperature tolerance of the sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists*, 1: 77-87.
- Botté, E. S.; Smith-Keune, C.; Jerry, D. R. 2013. Temperature: A prolonged confounding factor on cholinesterase activity in the tropical reef fish *Acanthochromis polyacanthus*. *Aquatic Toxicology*, 140-141: 337-339.
- Brett, J. R. 1969. Temperature and fish. *Chesapeake Science*, 10(3): 275-276.
- Caudill, C. C.; Keefer, M. L.; Clabough, T. S.; Naughton, G. P.; Burke, B. J.; Peery, C. A. 2013. Indirect effects of impoundment on migrating fish: Temperature gradients in fish ladders slow dam passage by adult Chinook salmon and steelhead. *Plos One*, 8(12): 1-13.
- Cember, H.; Curtis, E. H. 1978. Mercury bioconcentration in fish: Temperature and concentration effects. *Environmental Pollution*, 17: 311-319.
- Chippari-Gomes, A. R.; Gomes, L. C.; Baldisserotto, B. 2000. Lethal temperatures for *Rhamdia quelen* larvae (Pimelodidae). *Ciência Rural*, 30(6): 1069-1071.
- Currie, R. J.; Bennett, W. A.; Beitinger, T. L. 1998. Critical thermal minima and maxima of three freshwater game-fish species acclimated to constant temperatures. *Environmental Biology of Fishes*, 51: 187-200.
- Donelson, J. M.; Munday, P. L.; McCormick, M. I.; Pankhurst, N. W.; Pankhurst, P. M. 2010. Effects of elevated water temperature and food availability on the

- reproductive performance of a coral reef fish. *Marine Ecology Progress Series*, 401: 233-243.
- Donelson, J. M.; Munday, P. L. 2012. Thermal sensitivity does not determine acclimation capacity for a tropical reef fish. *Journal of Animal Ecology*, 81(5): 1126-1131.
- Elliott, J. M. 1991. Tolerance and resistance to thermal stress in juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Freshwater Biology*, 25: 61:70.
- Eme, J.; Bennett, W. A. 2009. Critical thermal tolerance polygons of tropical marine fishes from Sulawesi, Indonesia. *Journal of Thermal Biology*, 34(5): 220-225.
- Fé, L. M. L. 2014. *Expressão gênica e atividade enzimática da L-Lactato Desidrogenase (LDH) de Paracheirodon axeroldi (Shultz 1956) e Paracheirodon simulans (Géry 1963) expostos aos cenários climáticos previstos pelo IPCC para o ano de 2100*. Dissertação de mestrado para o Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 74p.
- Ford, T; Beitinger, T. L. 2005. Temperature tolerance in the goldfish, *Carassius auratus*. *Journal of Thermal Biology*, 30: 147-152.
- Gale, M. K.; Hinch, S. G.; Donaldson, M. R. 2013. The role of temperature in the capture and release of fish. *Fish and Fisheries*, 14: 1-33.
- Gomes, L. C.; Simões, L. N.; Araújo-Lima, C. A. R. M. 2010. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). IN: Baldisserotto, B.; Gomes, L.C. (Eds.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2ª. Ed. Editora UFSM, Santa Maria, p.175-204.
- Green, B. S.; Fisher, R. 2004. Temperature influences swimming speed, growth and larval duration in coral reef fish larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 299: 115-132.
- Hernández, R. M.; Buckle, R. L. F. 1998. Critical thermal maximum and minimum of *Poecilia sphenops* acclimated to different temperatures. *Rivista Italiana di Acquacoltura*, 33: 61–71.

- Hernández, R. M.; Buckle, R. L. F. 2002. Temperature tolerance polygon of *Poecilia sphenops valenciennes* (Pisces: Poeciliidae). *Journal of Thermal Biology*, 27: 1-5.
- Hochachka, P. W.; Somero, G. N. 2002. *Biochemical Adaptation*. Oxford University Press, New York, 466 p.
- Houde, E. D. 1989. Comparative growth, mortality, and energetic of marine fish larvae: Temperature and implied latitudinal effects. *Fishery Bulletin*, 87(3): 471-495.
- Ituassu, D. R.; Santos, G. R. S.; Roubach, R.; Pereira-Filho, M. 2004. Desenvolvimento de tambaqui submetido a períodos de privação alimentar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 39(12): 1199-1203.
- Le, Y.; Sheng-Yun, Y; Xiao-Ming, Z.; Min, L.; Jing-Yi, L.; Kai-Chang, W. 2011. Effects of temperature on survival, development, growth and feeding of larvae of Yellowtail clownfish *Amphiprion Clarkii* (Pisces: Perciformes). *Acta Ecologica Sinica*, 31: 241-245.
- Martins, Y. S.; Melo, R. M. C.; Campos-Junior, P. H. A.; Santos, J. C. E.; Luz, R. K.; Rizzo, E.; Bazzoli, N. 2014. Salinity and temperature variations reflecting on cellular PCNA, IGF-I and II expressions, body growth and muscel cellularity of freshwater fish larvae. *General and Comparative Endocrinology*, 202: 50-58.
- Moyes, C. P.; Schulte, P. M. 2010. *Princípios de Fisiologia Animal*. 2ª ed. Editora Artmed, 792p.
- Odum, E. P. 2010. *Ecologia*. 23ª ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 434p.
- Ostrensky, A.; Borguetti, J. R.; Soto, D. 2008. *Aquicultura no Brasil: O desafio é crescer*. 1ª ed. Editora Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, Brasília, 276p.
- Pezato, L. E.; Scorvo-Filho, J. D. 2000. Situação atual da aquicultura na região sudeste. IN: Valenti, W. C.; Poli, C. R.; Pereira, J. A.; Borghetti, J. R. (Eds.) *Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília, CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, p.303-322.

- Pidcock, R. 2010. The role of adaptive physiology in a changing climate. *Society for Experimental Biology Bulletin*, 1:34-35.
- Pörtner, H. O.; Peck, M. A. 2010. Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *Journal of Fish Biology*, 77: 1745-1779.
- Schmidt-Nielsen, K. 2010. *Fisiologia animal*. 5ª ed. Editora Santos, São Paulo, 611 p.
- Seebacher, F.; Holmes, S.; Roosen, N. J.; Nouvian, M.; Wilson, R. S.; Ward, A. J. W. 2012. Capacity for thermal acclimation differs between population and phylogenetic lineages within a species. *Functional Ecology*, 26: 1418-1428.
- Somero, G. N. 2005. Linking biogeography to physiology: Evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. *Frontiers in Zoology*, 2:1.
- Somero, G. N. 2009. The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *The Journal of Experimental Biology*, 213: 912-920.
- Sunday, J. M.; Bates, A. E.; Dulvy, N. K. 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proceedings of the Royal Society B*, 278: 1823-1830.
- Terblanche, J. S.; Hoffmann, A. A.; Mitchell, K. A.; Rako, L.; Roux, P. C.; Chown, S. L. 2011. Ecological relevant measures of tolerance to potentially lethal temperatures. *The Journal of Experimental Biology*, 214: 3713-3725.
- Wetzel, R. G. 1993. *Limnologia*. 2ª ed. Editora Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 111p.
- Wilson, S. M.; Nagler, J. J. 2006. Age, but not salinity, affects the upper lethal temperature limits for juvenile walleye (*Sander vitreus*). *Aquaculture*, 257: 187-193.
- Wootton, R. J. 1990. *Ecology of Teleost Fishes*. 1ª ed. Editora Chapman and Hall, London, 404p.
- Zar, J.K. 1984. *Biostatistical analysis*. 2ª ed. Prentice-Hall, New Jersey, 718p.

**Capítulo II- Efeito de diferentes cenários climáticos sobre a LDH do
tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818)**

INTRODUÇÃO

1.1 Efeito da temperatura e CO₂ sobre os peixes

As mudanças climáticas podem provocar diversas alterações no bioma, bem como a relação entre as espécies e a estabilidade de uma comunidade (Parmesan & Yohe, 2003). A gravidade das consequências geradas pelas mudanças climáticas nas relações entre espécies irá depender de diversos fatores, tais como o nível de especialização das espécies envolvidas, do efeito direto das mudanças climáticas nas espécies e do potencial para a composição de novas comunidades, entre outros (Gilman *et al.*, 2010).

Essas alterações ocorrem devido à inserção de agentes físicos estressores no ambiente como a elevação da temperatura e da concentração de CO₂ dissolvido para níveis inadequados (Val *et al.*, 2004). O alto calor específico da água garante que a mesma tenha variações graduais ao longo do dia, promovendo uma estabilidade térmica maior que a do ar para o ecossistema aquático (Esteves, 1998). No entanto, por serem ectotermos, os peixes tem sua temperatura corpórea, salvo exceções, acompanhando a temperatura da água, de modo que qualquer mudança gradual na água pode provocar mudanças na temperatura do animal (Helfman *et al.*, 2009). Isso significa que as taxas dos processos biológicos realizados por eles são influenciadas por uma faixa normal de temperatura, onde situações de temperaturas extremas podem levar a distúrbios graves ou letais (Crawford, 2002).

As respostas apresentadas pelos organismos, em função dos agentes estressores, podem ser consideradas de baixa ou alta relevância ecológica. Determinados fatores estressores podem ser característicos de um habitat, impondo a necessidade de adaptações nas espécies (Val *et al.*, 2004; Araújo-Lima & Gomes, 2005). Alguns ajustes garantem, em curto prazo, a sobrevivência do animal ao fator estressante; no entanto, se o estresse for de longo prazo, as medidas

compensatórias tornam-se disfuncionais, influenciando negativamente o indivíduo, a espécie e sua comunidade (Val *et al.*, 2006).

Com o aumento da temperatura da água, mudanças fisiológicas ocorrem devido a alterações no metabolismo dos animais por promover modificações nas taxas de atividade enzimática (Schmidt-Nielsen, 2010). Os peixes, assim como outros organismos, tem uma tolerância térmica que varia de acordo com o habitat em que vive. A faixa de tolerância térmica de uma determinada espécie pode se alterar em determinadas fases da vida do indivíduo, tornando-se mais estreita (Odum, 2010).

Assim como a temperatura, o CO₂ possui grande influência sobre os organismos aquáticos (Ishimatsu *et al.*, 2004). A dissolução do CO₂ na água salgada, além de aumentar a concentração de H⁺ no oceano, promovendo sua acidificação, também altera o equilíbrio de carbonato (Ishinatsu & Dissanayake, 2010). Em águas continentais ocorre o mesmo processo, no qual o pH dos corpos de água varia conforme a concentração de CO₂ e carbonato (Fivelstad *et al.*, 1999). Estudos em ambientes marinhos demonstraram que muitas espécies não são afetadas por altos níveis de CO₂, no entanto são prejudicadas ao incluir o aumento da temperatura (Pörtner *et al.*, 2004).

Quando ao aumento de temperatura, questionava-se se as espécies tropicais de peixes teriam a capacidade de sobreviver ao aquecimento das águas, pois vivem em regiões mais estáveis termicamente que as espécies em regiões temperadas. No entanto, Donelson *et al.* (2011) comprovaram a capacidade de aclimação que as espécies tropicais marinhas tem, mediante o aumento de temperatura. Segundo Baldisserotto (2009), o aumento da temperatura da água pode estimular o crescimento de peixes de água doce mas, após atingir um determinado limite, a temperatura elevada poderá levar os animais à morte. Outra constante ecológica que pode ser afetada em função do aumento da temperatura é a interação predador-presa, levando a uma alteração nos padrões de alimentação e reprodução das espécies (Lampert & Sommer, 2007).

As especulações quanto ao efeito e impacto das mudanças climáticas sobre as espécies são possíveis conforme são realizados experimentos baseados na fisiologia e ecologia de cada uma (Kodas *et al.*, 2011)

1.2 Lactato Desidrogenase (LDH)

As enzimas são moléculas proteicas cuja função é promover a redução da energia de ativação de reações de transformação de um substrato em produto (Nelson & Cox, 2008). Com isso, o aumento da temperatura corporal pode levar a um deslocamento do equilíbrio de reações enzimáticas, gerando um distúrbio na estabilidade da membrana plasmática e influenciando o funcionamento dos órgãos (Hochachka & Somero, 2002).

A quebra da molécula de glicose tem como resultado a produção de ATP. Ao todo existem três vias possíveis para o final da glicólise, a via aeróbica (via do ácido cítrico), e duas vias anaeróbicas (via da fermentação do ácido láctico com ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) e da fermentação alcoólica com a ação da enzima álcool desidrogenase) (Nelson & Cox, 2008). Em todas as vias o piruvato é o substrato chave do metabolismo (Zakhartsev *et al.*, 2004).

A LDH é um tetrâmero formado por duas cadeias polipeptídicas distintas, codificadas por dois genes na maioria dos vertebrados (Nelson & Cox, 2008). Esta enzima apresenta cinco isoformas distintas (isoenzimas) (LDH-1; LDH-2; LDH-3; LDH-4 e LDH-5) distribuídas no miocárdio, eritrócitos, cérebro, músculo esquelético, fígado e outros órgãos e tecidos, regulando suas atividades conforme o tecido onde se encontram (Motta, 2011). Em sua maioria, as espécies de peixes dispõem de duas ou mais isoenzimas de LDH, onde a combinação dos genes A e B permitem a formação de A_4 , A_3B_1 , A_2B_2 , A_1B_3 e B_4 (Markert & Faulhaber, 1965), sendo a isoforma A_4 predominante em tecidos anaeróbicos como músculo esquelético branco e a B_4 predominante em tecidos aeróbicos como o coração e fígado (Somero, 1973). Essa variação de isoformas em cada tecido é uma mudança adaptativa às restrições fisiológicas e ambientais. Espécies de peixes que comumente tem acesso a ambientes em hipóxia e, portanto, dependem frequentemente do sistema anaeróbico, apresentam, muitas vezes, mudanças na predominância de uma das isoformas da LDH em seus tecidos (Almeida-Val *et al.*, 1993).

Já foram vastamente explorados os efeitos que variações do ambiente podem ter tanto na expressão das isoformas da LDH, quanto sua atividade e parâmetros cinéticos. Muitos dos estudos que avaliam os efeitos de mudanças ambientais tem como foco o efeito da temperatura sobre a atividade da LDH (Moyes & Schulte, 2010).

A atividade catalítica de uma enzima normalmente é interrompida quando esta é desnaturada (Nelson & Cox, 2008; Angilletta-Junior, 2011) e já foi comprovado que o calor tem a capacidade de inativar diferencialmente as isoenzimas da LDH (Ferreira *et al.*, 1991), uma vez que as proteínas possuem uma faixa de tolerância térmica dentro da qual sua estrutura se mantém íntegra (Argos *et al.*, 1979).

Um ponto chave deste estudo é o entendimento do mecanismo de reação da catálise das enzimas, conhecido por cinética enzimática, onde podemos utilizar a constante de Michaelis-Menten (K_m). A equação de Michaelis-Menten permite calcular os limites máximos das reações catalisadas enzimaticamente (V_{max}), bem como a concentração na qual a enzima apresenta metade da velocidade máxima (Nelson & Cox, 2008). Esta constante, denominada K_m , identifica a relação da enzima com seu substrato. Quanto maior o K_m , menor a afinidade da enzima pelo substrato e vice-versa (Moyes & Schulte, 2010). O K_m mínimo da LDH tende a ocorrer na temperatura ambiente em que a espécie está aclimatizada (Hochachka & Somero, 1968).

1.3 Efeito da temperatura e CO₂ sobre o sangue dos peixes

Os organismos aquáticos encontram dificuldades em realizar a regulação ácido-base do sangue devido à alta quantidade de partículas em suspensão presentes na água. A regulação iônica realizada nas brânquias é diretamente influenciada pelas características iônicas da água, e mudanças na composição da mesma podem provocar o desbalanceamento da regulação osmótica e de ácido-base, podendo, inclusive, interferir nas trocas gasosas (Heisler, 1993).

Outros fatores que podem influenciar na regulação ácido-base são alterações na temperatura, oxigênio e na concentração de CO₂ da água (Evans *et al.*, 2005). A atividade muscular e a hipóxia extremas contribuem para alterar o controle ácido-

base do sangue dos peixes, devido à produção de ácido láctico pelo metabolismo anaeróbico em função da liberação de íons H^+ (Harper & Glass, 1965). A hipóxia ambiental ocorre com frequência em alguns ambientes amazônicos (Val *et al.*, 1998) e é um dos fatores mais comuns responsáveis pela anóxia nos tecidos (Harper & Glass, 1965).

O aumento do CO_2 no sangue pode levar à acidose sanguínea devido ao acúmulo de H^+ liberado na conversão de HCO_3^- (íons bicarbonato) em CO_2 (Perry & McDonald, 1993). O pH sanguíneo é inversamente proporcional ao CO_2 sanguíneo, enquanto o fluxo sanguíneo é proporcional à concentração de pCO_2 (Harper & Glass, 1965). Sendo assim, em eventos de hipercapnia o pH torna-se ácido rapidamente, mas recupera-se com o aumento da concentração de bicarbonato (Heisler, 1993). Outro fator importante é a influência que o pH e o CO_2 exercem sobre a afinidade do O_2 pela hemoglobina denominado efeito Root (Jensen, 2004; Schmidt-Nielsen, 2010).

Com relação às mudanças térmicas variações na temperatura corpórea podem interferir nas funções fisiológicas (Somero, 2010). Uma das consequências do aumento da temperatura da água é o aumento no débito cardíaco (Farrell, 1993). Temperaturas elevadas enfraquecem as ligações do oxigênio com a hemoglobina, conseqüentemente o oxigênio é liberado mais facilmente (Schmidt-Nielsen, 2010). Por outro lado, o aumento da temperatura na água diminui a dissolução de oxigênio, tornando-o menos disponível aos peixes.

Dados hematológicos costumam proporcionar diversas informações relevantes sobre o indivíduo estudado, como exemplo podemos afirmar que alterações na concentração de hemoglobina podem ser indicadoras de estresse ambiental (Cazenave *et al.*, 2005) e baixos valores de hematócrito podem indicar uma dificuldade na excreção de CO_2 (Perry & McDonald, 1993).

Considerando o exposto, o presente trabalho visa o estudo do efeito dos diferentes cenários climáticos preconizados pelo IPCC para 2100, sobre o metabolismo do tambaqui (*Colossoma macropomum*).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência dos cenários climáticos sobre os parâmetros metabólicos, fisiológicos e enzimáticos do tabaqui.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar a influência de tais cenários sobre parâmetros fisiológicos do tabaqui, em particular, glicose sanguínea e hematócrito;

Avaliar a influência de tais cenários sobre os parâmetros cinéticos da enzima LDH do tabaqui.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos animais e aclimação

Os exemplares de tabaqui foram obtidos na Fazenda Tajá (Km 101- BR174) e transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), onde foram aclimatados em tanque de 2000 L de água do poço artesiano do INPA com circulação e aeração constante, mantendo alimentação diária *ad libitum* por duas semanas.

3.2 Delineamento Experimental

3.2.1 Cenários climáticos em microcosmos

Os microcosmos são ambientes criados para a simulação de cenários climáticos descritos no Quarto Relatório do IPCC (2007). Sua estrutura constitui-se em quatro salas climatizadas cujas temperaturas, umidades relativas do ar, luminosidades e concentrações de dióxido de carbono são controladas 24 horas por

dia. A sala 1 é considerada o cenário controle, onde as variáveis seguem, em tempo real, as condições encontradas na parte externa do laboratório, sendo elas temperatura, umidade do ar e concentração de dióxido de carbono (CO₂). A sala 2 é o ambiente que reflete o cenário brando (B1) com um aumento de 1,5 °C na temperatura do ar e um aumento de 200 ppm de CO₂; a sala 3 reflete o cenário intermediário (A1B) com um aumento de 2,5 °C na temperatura do ar e um aumento de 400 ppm de CO₂; a sala 4 reflete o cenário extremo (A2) com um aumento de 4,5 °C na temperatura do ar e um aumento de 850 ppm de CO₂. As salas 2, 3 e 4 tem seus parâmetros variando sempre com relação à sala 1. As quatro salas apresentam, em tempo real, a umidade relativa do ar encontrada na parte externa do laboratório. As salas possuem um *timer* que controla automaticamente as luzes, estabelecendo um regime de 12 horas com luz e 12 horas sem luz, conforme as características ambientais da região onde estão localizados os microcosmos. As salas possuem um sistema interno que capta os valores reais dos três parâmetros controlados a cada 2 minutos e os armazena em um computador exclusivo para esta finalidade.

3.2.2 Exposição aos cenários climáticos em microcosmos

Os peixes foram colocados em tanques de plástico com capacidade para 80 L. Dentro do tanque foi colocada uma estrutura feita com cano de PVC de 2,5 polegadas com furos ao longo da base e três torres, dentro das quais foram colocadas mangueiras de aeração. Cada um dos quatro grupos amostrais foram divididos em seis tanques com capacidade para 80 L e os tanques foram numerados de 1 a 6. Em cada caixa foram colocados 19 juvenis de tambaqui.

Foram montadas 6 baterias de 4 tanques de 80 L cada, com um intervalo de 3 dias entre as baterias. Todas foram montadas no mesmo horário e sob as mesmas condições. Após montar uma bateria, esta permaneceu por 5 dias no galpão de experimentos do LEEM, sendo transferidos em seguida para os cenários climáticos onde os 4 tanques da bateria foram distribuídos entre os 4 cenários. Ao final da montagem das 6 baterias, cada cenário passou a conter 6 tanques, cada um pertencendo a uma bateria diferente. (Figura 1.)

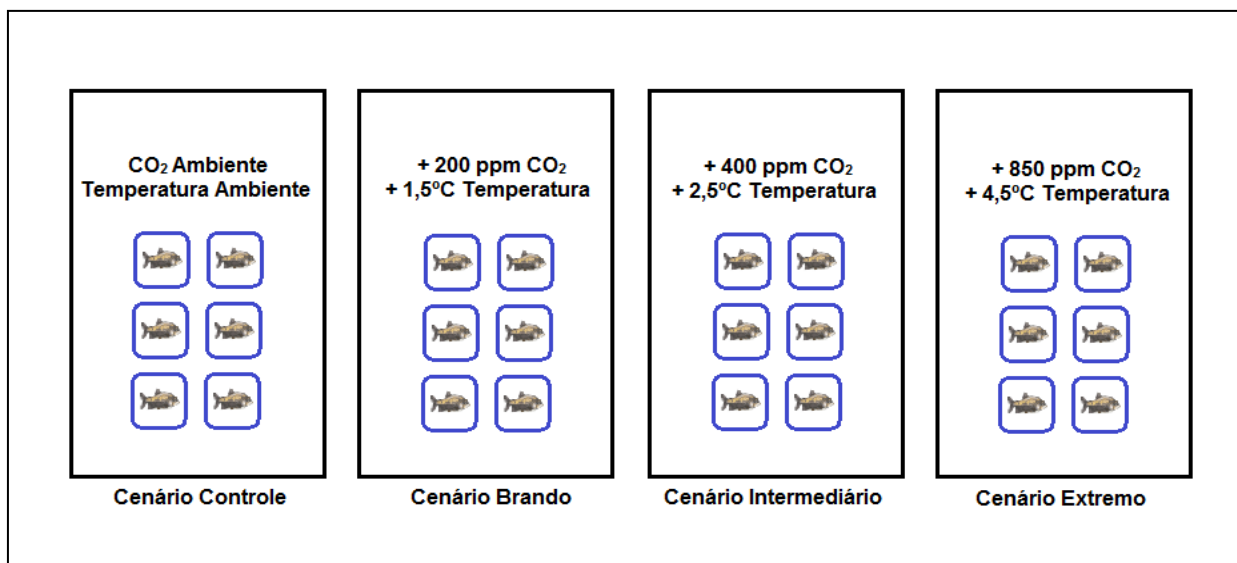


Figura 1. Representação das condições de cada cenário simulado pelos microcosmos. As coletas foram realizadas por bateria, retirando de cada tanque 2 peixes por coleta, totalizando 8 peixes por coleta. Foram retirados peixes nos tempos zero, 5, 15 e 30 dias, sendo que o tempo zero foi coletado 48 horas após a entrada dos peixes nos cenários.

Durante o experimento os animais foram alimentados com ração comercial com 45% de proteína bruta uma vez ao dia, pela manhã, inclusive nos dias de coleta. Foi realizada a troca parcial da água dos tanques a cada dois dias. Quando a troca coincidiu com dias de coleta, a mesma foi realizada após a coleta dos animais.

3.3 Acompanhamento da qualidade da água

Foi realizado o acompanhamento das características físico-químicas da água ao longo de toda a fase experimental. Para a determinação dos níveis de CO_2 foi utilizado ensaio colorimétrico por meio de titulação em seringa (Boyd & Tucker, 1992) no qual foi avaliada a reação do carbonato de sódio (Na_2CO_3) tendo como indicador a fenolftaleína. O pH da água foi medido com pHmetro PG 1800 e oxigênio e temperatura utilizando oxímetro YSI-85.

3.4 Obtenção das amostras

Cada animal foi medido e pesado conforme procedimento padrão do laboratório. Em seguida, foi realizada a coleta do sangue, para então ser realizada a secção medular para amostragem dos outros tecidos. As amostras de sangue total foram coletadas por meio de punção da veia caudal com seringas previamente heparinizadas. O sangue coletado foi colocado em microtubos estéreis de 1,5 mL

mantidos no gelo enquanto eram retiradas as alíquotas para as análises hematológicas. Foram retirados coração e músculo branco para a realização das análises enzimáticas. Os tecidos foram prontamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C até a realização das análises.

O manuseio e eutanásia dos animais obedecem as normas das diretrizes brasileiras para ética no uso de animais de laboratório, publicadas pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal) (CONCEA, 2013 a; b). O experimento realizado no presente trabalho foi aprovado pelo CEUA do INPA e tem por numero de protocolo 023/2012.

3.5 Análise dos Parâmetros sanguíneos

Com o sangue total coletado foram realizadas, conforme protocolos já utilizados no laboratório, as seguintes análises:

a) Glicose, por meio do dosador comercial portátil Accu-check Advantage Blood Glucose meter (Roche Diagnostics GmbH, D-68305, Mannheim, Alemanha) utilizando sangue total. O resultado é apresentado em mg/dl.

b) Hematócrito (Ht), que foi determinado utilizando a técnica de microhematócrito, usando tubos capilares com sangue total em uma centrífuga FANEM 211N, Brasil, a 12000 rpm por 10 minutos. A leitura da taxa de sedimentação dos eritrócitos foi realizada em cartão padronizado. O resultado é apresentado em porcentagem.

3.6 Atividade e Cinética da LDH

A cinética da LDH foi realizada com os tecidos muscular e cardíaco. Para estas análises foi utilizado o tampão de homogeneização contendo 150 mM de imidazol; 1 mM de EDTA e 1% de triton X-100, pH 7,4. Foram utilizados 0,003 g de músculo branco e 0,0015 g de coração. Os tecidos foram homogeneizados manualmente com pistilo em microtubo imerso em gelo fundente e centrifugados durante 15 minutos a 15.300 g em uma centrífuga Eppendorf 5430R a 4 °C para retirar o material particulado. A diluição para a preparação do homogeneizado foi

previamente testada e variou conforme o tecido: para o músculo branco foi de 1:9 e para músculo cardíaco 1:24. A determinação da cinética enzimática foi realizada a 25 °C em espectrofotômetro da marca SpectraMax Plus. As reações foram realizadas em cubetas de 1000 µL. Para a cinética do músculo branco foram utilizados 5 µL de homogeneizado e para músculo cardíaco 2 µL de homogeneizado. O volume da solução tampão e do substrato (solução de piruvato) variaram conforme a concentração medida (Driedzic & Almeida-Val, 1996).

Solução tampão da LDH: 0,15mM de NADH e 50mM de imidazol, pH 7,4 a 25°C. Foram utilizadas as concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 5,0 e 10,0mM de piruvato (substrato). As medidas foram realizadas no comprimento de onda 340nm.

Substrato: foram feitas duas soluções de Piruvato, uma na concentração 1 molar e outra na concentração 10 molar. As concentrações finais foram obtidas na cubeta por diluição.

A atividade enzimática da LDH foi calculada por meio da fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{fd (cubeta)} \times \text{vol. tampão (ml)}}{6,22 \times \text{peso tecido (g)}}$$

Onde:

$\Delta\text{OD}/\text{min}$ = variação na densidade óptica por minuto em 340 nm

Fd= Fator de diluição

6,22= coeficiente de extinção molar da coenzima NADH

A cinética enzimática foi calculada por meio da utilização do gráfico duplo recíproco segundo a equação de Lineweaver-Burk. Nesta representação da equação de Michaelis-Menten obtemos uma reta, cujos eixos do gráfico são formados pelos valores de $1/V_0$ versus $1/[S]$. A inclinação da reta dá-se por Km/V_{max} , tendo um intercepto de $-1/Km$ no eixo da coordenada e outro intercepto de $1/V_{\text{max}}$ no eixo da abcissa (Nelson & Cox, 2008).

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (SEM). As análises estatísticas hematológicas e enzimáticas foram realizadas utilizando a análise de variância com dois fatores (*Two way ANOVA*) admitindo a comparação cenário climático *versus* tempo, seguido do pós-teste de Tukey. As análises dos parâmetros físico-químicos da água foram realizadas utilizando a análise de variância com um fator (*One way ANOVA*), seguido do pós-teste de Dunnett (Zar, 1984). O nível de significância admitido foi 95% ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram executadas utilizando o pacote estatístico SigmaPlot 11.0.

4. RESULTADOS

4.1 Microcosmos

Durante o período experimental foram registrados os valores diários de CO_2 e temperatura do ar de cada cenário, sendo apresentados como media diária nas figuras 2 e 3, respectivamente. Na figura 4 podemos observar a variação real dos cenários ao longo de 24 horas. A variação observada, assim como a constância na diferença entre os cenários, demonstra a capacidade do sistema de simular os cenários conforme o preconizado pelo 4º Relatório do IPCC (2007).

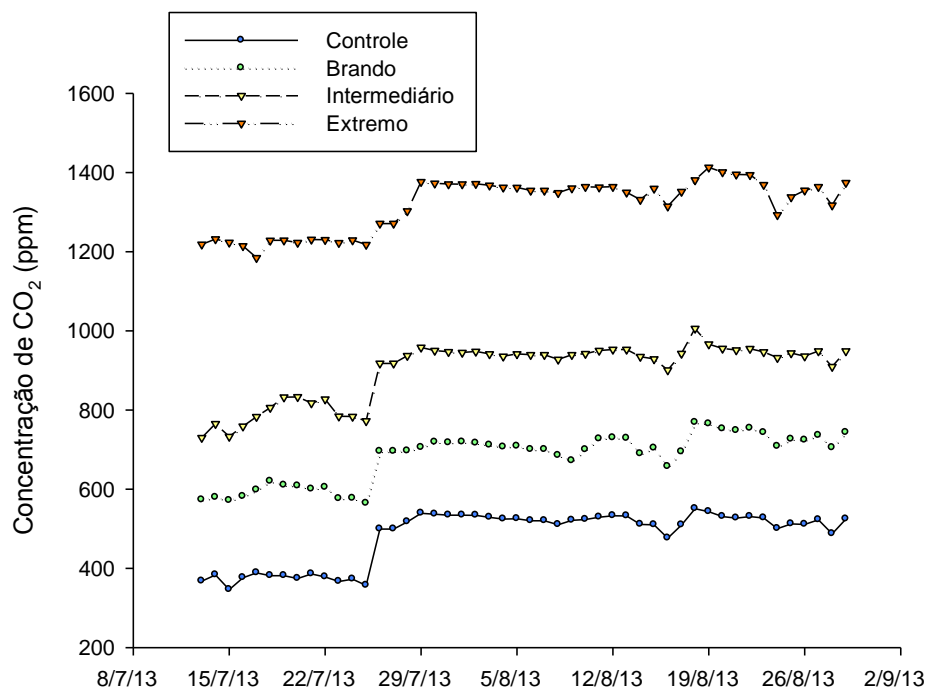


Figura 2. Valores das médias diárias da concentração de CO₂ no ar nos diferentes cenários ao longo do período experimental em microcosmos.

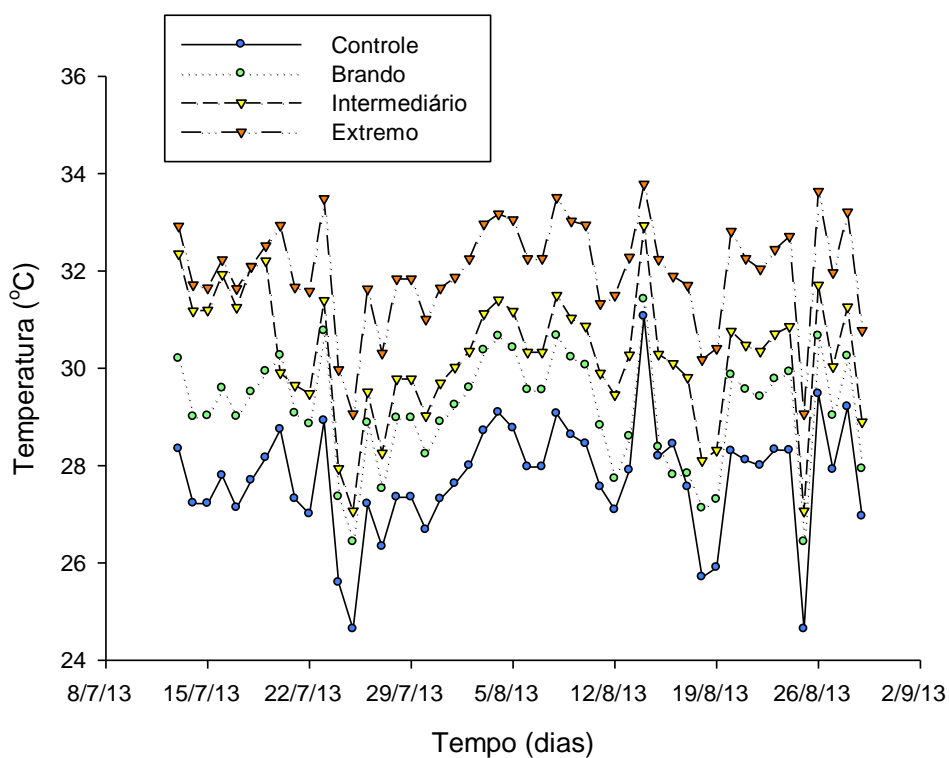


Figura 3. Valores das médias diárias da temperatura do ar nos diferentes cenários ao longo do período experimental em microcosmos.

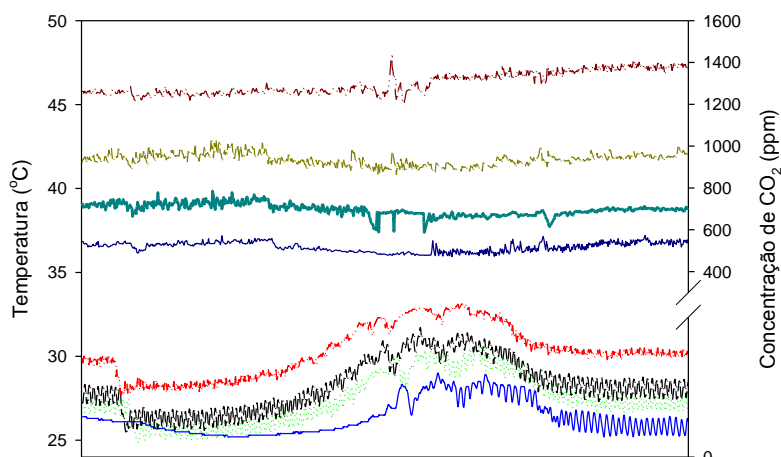


Figura 4. Valores de temperatura e concentração de CO₂ do ar no período de 24 horas nos cenários climáticos.

Valores das características físicas e químicas das salas estão dispostos na tabela 1. Não foram observadas diferenças estatísticas no oxigênio dissolvido e pH entre os cenários. Em contrapartida, ocorreu variação da temperatura entre os cenários, tendo diferença significativa entre o cenário controle em relação a cada um dos demais cenários. Já com relação a concentração de CO₂ na água, ocorreu diferença significativa entre os cenários controle e extremo. Durante a exposição dos juvenis de tambaqui em microcosmos não foi observada mortalidade.

Tabela 1. Parâmetros físico-químicos da água utilizada no experimento com tambaqui em microcosmos. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão.

Cenário	O ₂ (mg/L)	Temperatura (°C)	pH	[CO ₂] (ppm)
Controle	7.28 ± 0.17	25.18 ± 0.26	5.95 ± 0.2	14.84 ± 1.52
Brando	7.13 ± 0.19	26.78 ± 0.31*	5.52 ± 0.17	15.02 ± 1.2
Intermediário	7.16 ± 0.19	26.47 ± 0.21*	5.66 ± 0.14	15.32 ± 0.86
Extremo	7.2 ± 0.19	28.12 ± 0.4*	5.54 ± 0.13	17.43 ± 1.29*

(*) Representa diferença estatística significativa em relação ao cenário controle. (p<0,05)

4.2 Parâmetros sanguíneos

Os resultados obtidos apresentaram diferenças tanto entre os cenários (p<0,05) como entre os diferentes tempos de coleta (p<0,05). Ao analisarmos, primeiramente, o ocorrido em cada cenário ao longo do tempo de exposição, foi

possível verificar que os dados indicam que a glicose sanguínea dos animais submetidos ao cenário controle no tempo zero foi significativamente menor ($p < 0,05$) que a dos animais coletados nos demais tempos. No cenário brando, em 5 dias de exposição, os animais apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) de glicose sanguínea com relação aos animais coletados no tempo zero. Se compararmos os resultados dos cenários entre si, os dados mostram que a glicose dos animais no tempo zero foi significativamente menor ($p < 0,05$) no cenário controle que no cenário intermediário (Figura 5).

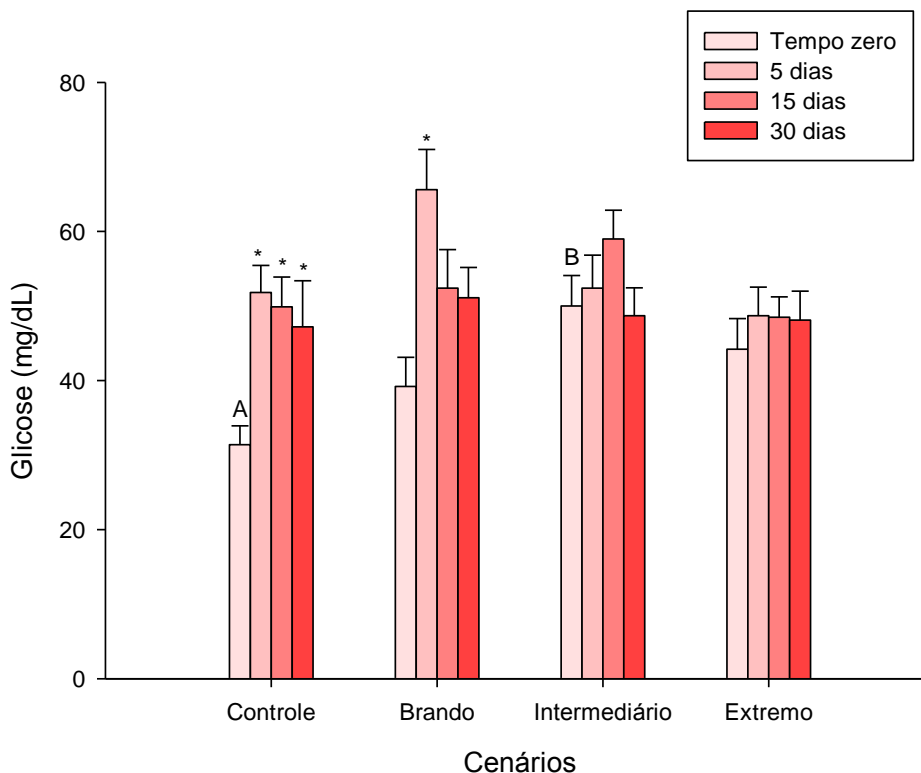


Figura 5. Glicose dos indivíduos de tabaqui expostos por 30 dias em microcosmos. (*) indica diferença estatística em relação ao controle em um mesmo cenário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tempos iguais de cenários diferentes. ($p < 0,05$).

O hematócrito dos indivíduos expostos ao cenário controle por 30 dias aumentou significativamente ($p < 0,05$) quando comparados aos dos indivíduos expostos por 5 dias. No cenário intermediário os animais apresentaram após 30 dias de exposição um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos outros tempos, assim como o cenário extremo. Os animais dos cenários intermediário e extremo, após 30 dias, apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao cenário brando (Figura 6).

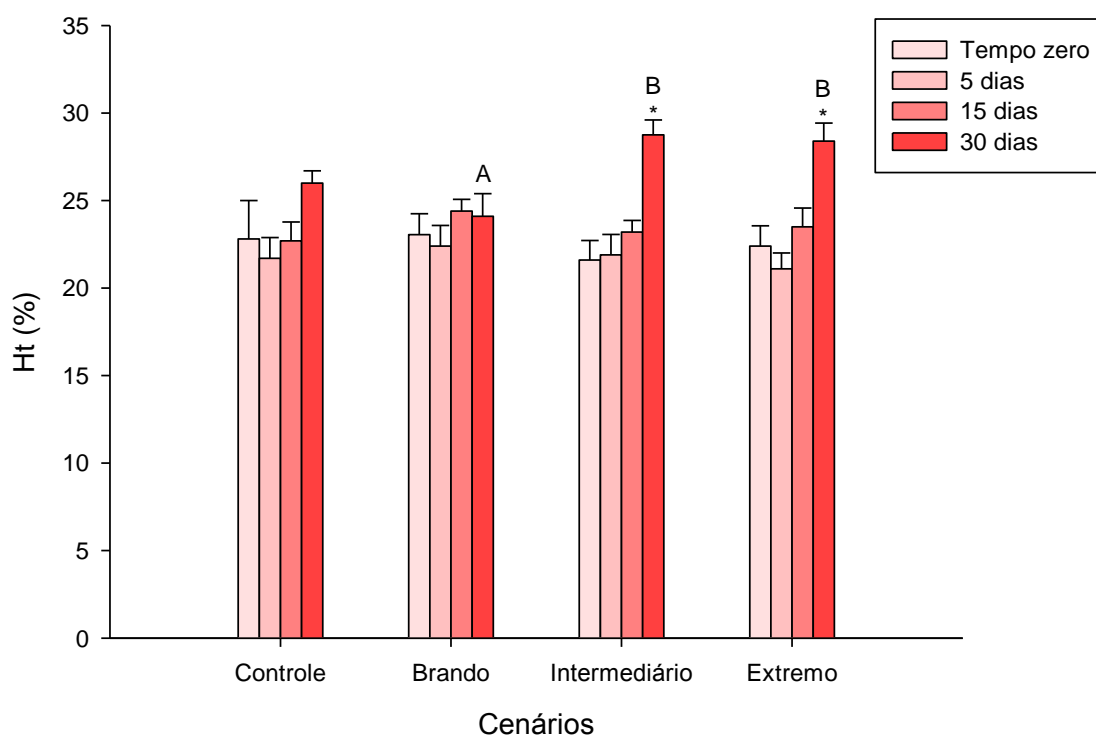


Figura 6. Hematócrito dos indivíduos de tabaqui expostos por 30 dias em microcosmos. (*) indica diferença estatística em relação ao controle em um mesmo cenário. Letras diferentes indicam diferença estatística entre tempos iguais de cenários diferentes. ($p < 0,05$).

4.3 Atividade da LDH

Para dados obtidos para a atividade da LDH no coração dos juvenis de tambaqui em 1mM de piruvato só houve diferença significativa ($p < 0,05$) nos indivíduos expostos por 30 dias no cenário intermediário, em relação ao tempo zero (Figura 7.).

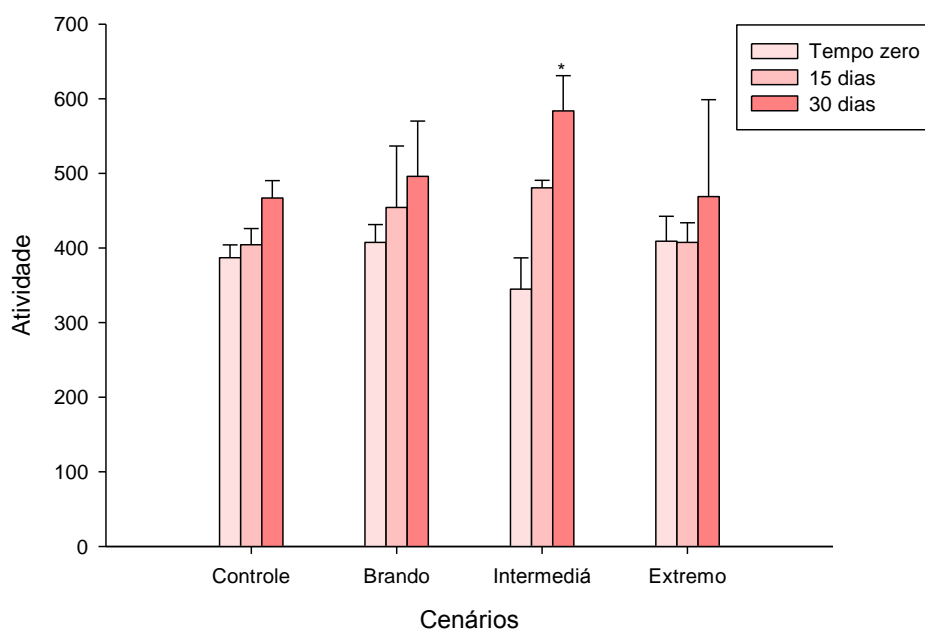


Figura 7. Atividade da LDH do tambaqui presente no coração. (*) Indica diferença estatística em relação ao controle em tempos iguais. ($p < 0,05$).

A atividade da LDH no músculo esquelético para 1mM de piruvato dos animais expostos por 30 dias aos cenários brando, intermediário e extremo apresentaram valor significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero de seus respectivos cenários (Figura 8.).

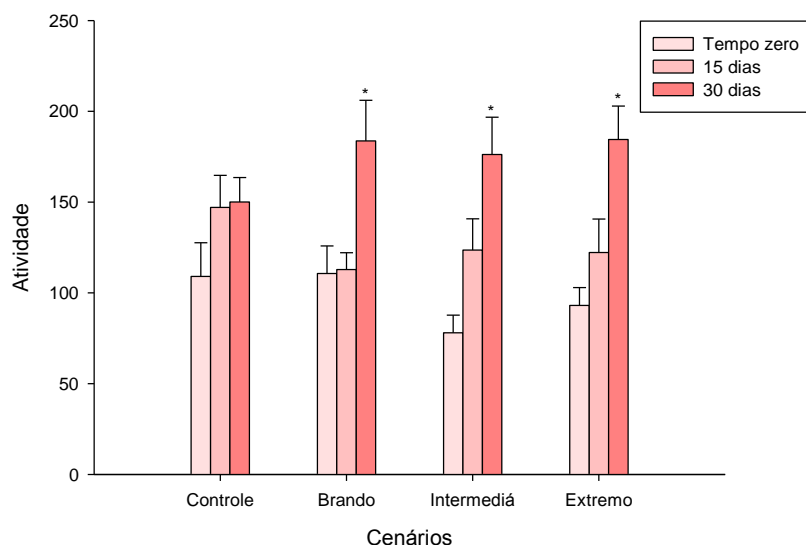


Figura 8. Atividade da LDH do tabaqui presente no músculo esquelético. (*) Indica diferença estatística em relação ao controle em tempos iguais. ($p < 0,05$).

A razão enzimática da LDH do coração do tabaqui demonstra que ocorreu inibição da LDH no tecido (Tabela 2). Também foi observada inibição, embora menor, da LDH no músculo dos animais expostos aos cenários (Tabela 3).

Tabela 2. Razão enzimática da LDH do coração de tabaqui.

Cenários	Tempo	Atividade 1mM	Atividade 10mM	Taxa de inibição
Controle	Zero dias	387,02	175,48	2,21
	15 dias	404,27	122,22	3,31
	30 dias	466,9	121,64	3,84
Brando	Zero dias	407,43	259,8	1,57
	15 dias	454,28	138,95	3,27
	30 dias	496,04	59,75	8,30
Intermediário	Zero dias	344,82	100,46	3,43
	15 dias	480,64	197,63	2,43
	30 dias	583,81	180,37	3,24
Extremo	Zero dias	409,13	166,57	2,46
	15 dias	407,48	197,06	2,07
	30 dias	468,91	68,9	6,81

Tabela 3. Razão enzimática da LDH do músculo esquelético de tabaqui.

Cenários	Tempo	Atividade 1mM	Atividade 10mM	Taxa de inibição
Controle	Zero dias	109,07	48,13	2,26
	15 dias	147,05	68,63	2,14

4.4 Cinética Enzimática da LDH

O perfil de saturação com piruvato da LDH do coração dos animais do cenário controle não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo dos 30 dias de exposição (Figura 9.). Os animais expostos por 30 dias ao cenário brando apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero nas concentrações de 0,25mM e 10mM de piruvato (Figura 10.). No cenário intermediário, após 30 dias de exposição, o perfil de saturação da LDH do coração dos indivíduos apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao tempo zero para as concentrações de 0,1 mM ; 0,25 mM; 1 mM e 5 mM de piruvato (Figura 11.). Os animais do cenário extremo não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no perfil de saturação da LDH do coração ao longo dos 30 dias de exposição (Figura 12.).

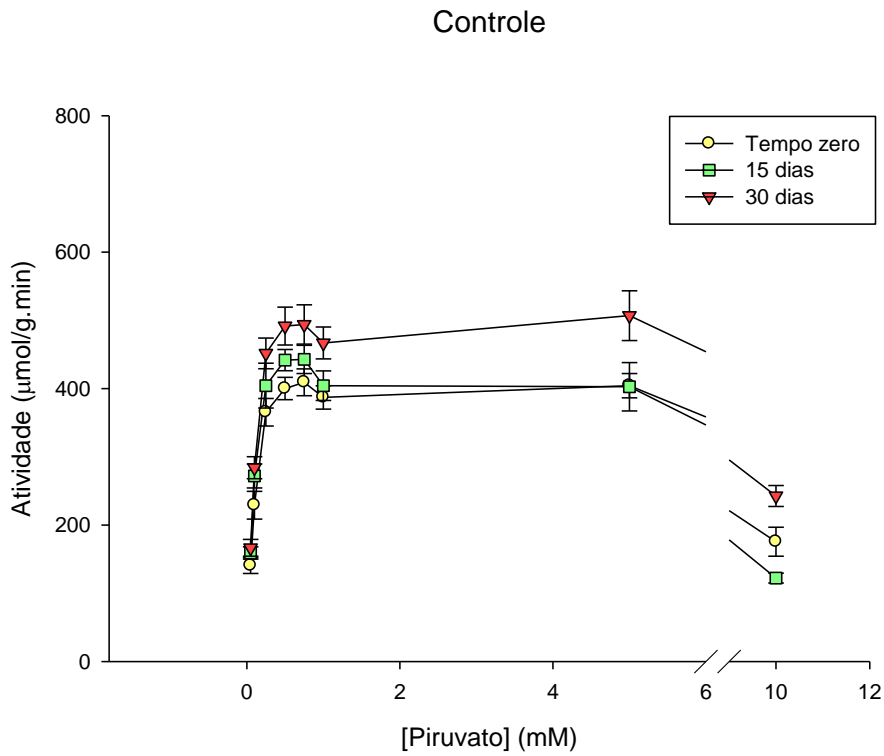


Figura 9. Perfil de saturação da LDH do coração de tambaqui ao piruvato dos animais expostos ao cenário controle.

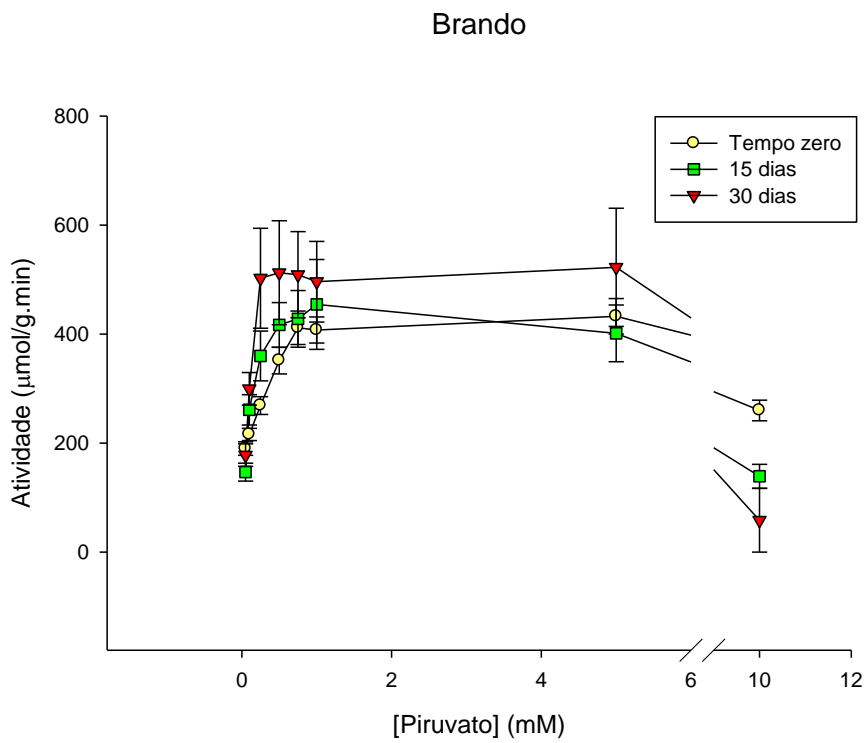


Figura 10. Perfil de saturação da LDH do coração de tambaqui ao piruvato dos animais expostos ao cenário brando.

Intermediário

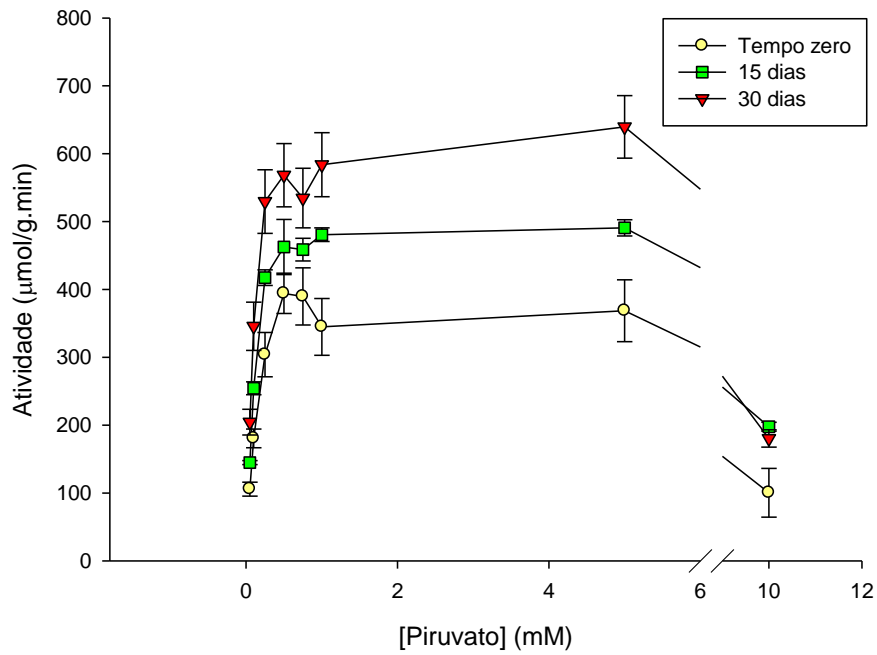


Figura 11. Perfil de saturação da LDH do coração de tambaqui ao piruvato dos animais expostos ao cenário Intermediário.

Extremo

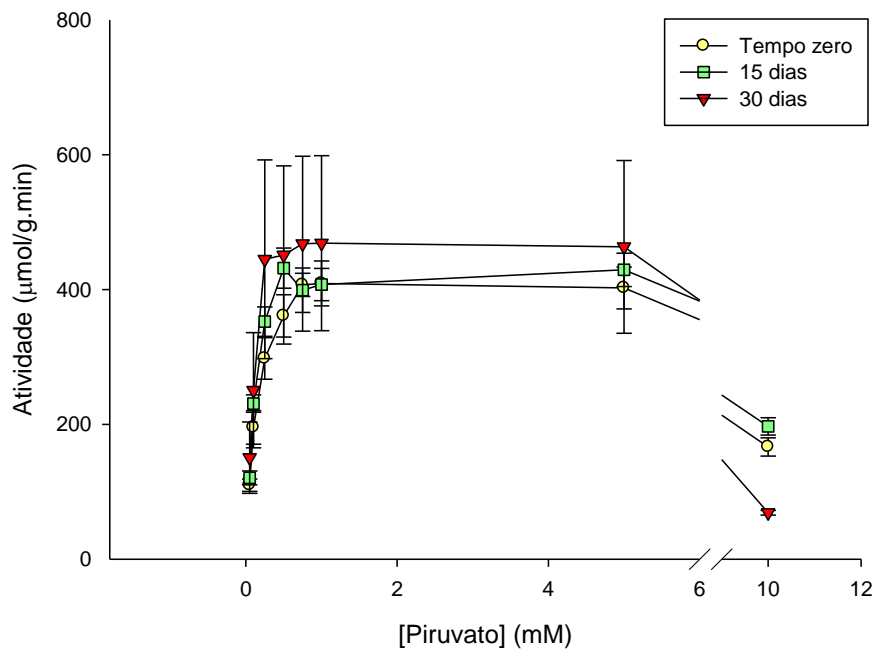


Figura 12. Perfil de saturação da LDH do coração de tambaqui ao piruvato dos animais expostos ao cenário extremo.

O perfil de saturação com piruvato da LDH do músculo esquelético nos animais do cenário controle não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo dos 30 dias de exposição (Figura 13.). Os animais do cenário brando apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no perfil de saturação da LDH do músculo para as concentrações de 0,1 mM; 0,25 mM; 0,5 mM; 0,75 mM; 1 mM; 5 mM e 10 mM de piruvato (Figura 14.). No cenário intermediário, assim como no cenário extremo, o perfil de saturação da LDH do músculo dos animais após 30 dias de exposição aumentou significativamente ($p < 0,05$) em relação ao perfil do tempo zero (Figuras 15 e 16, respectivamente).

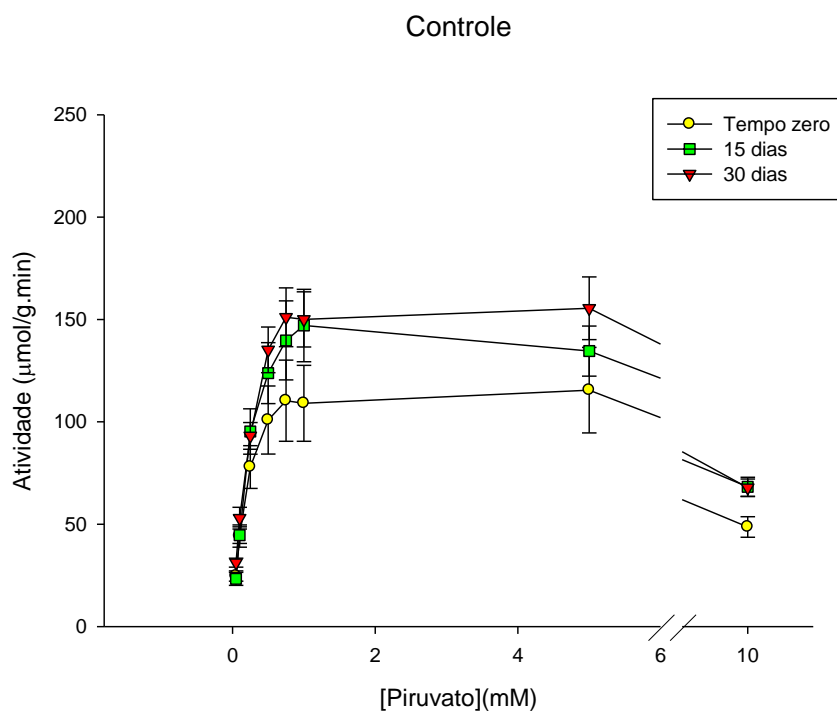


Figura 13. Perfil de saturação da LDH do músculo esquelético de tambaqui ao piruvato dos animais expostos ao cenário controle.

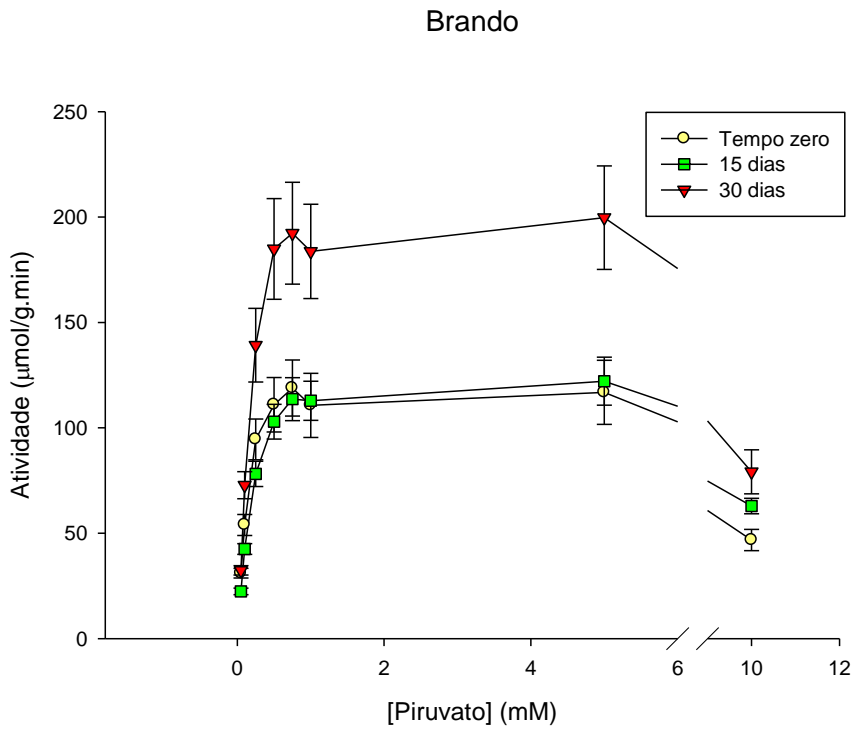


Figura 14. Perfil de saturação da LDH do músculo esquelético de tambaqui ao piruvato dos animais expostos ao cenário brando.

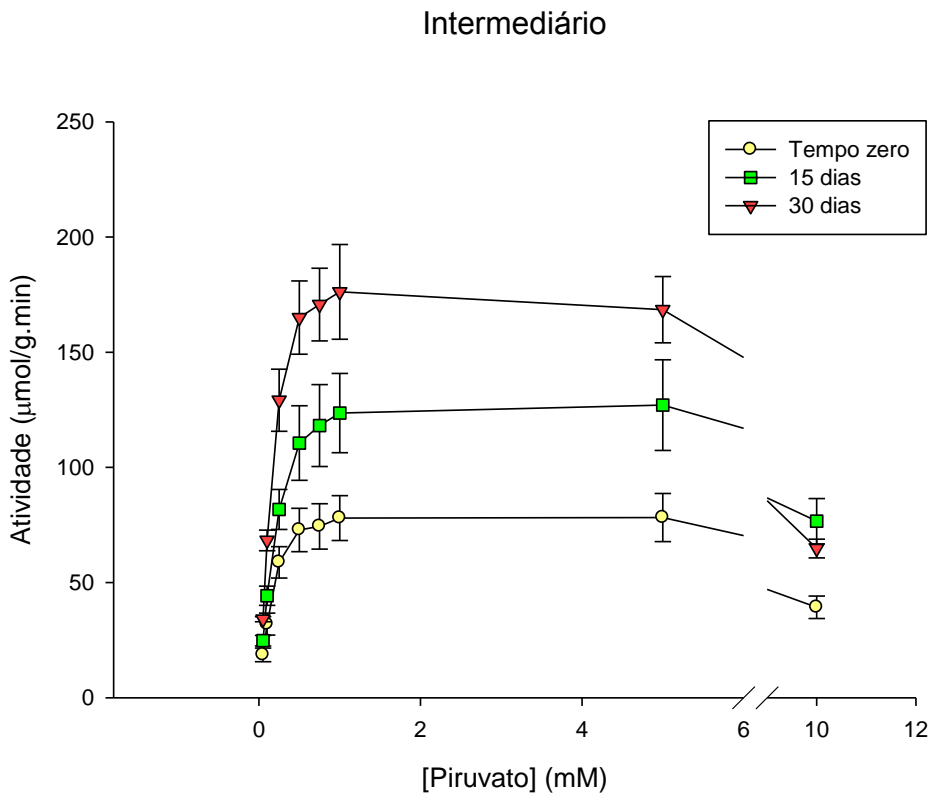


Figura 15. Perfil de saturação da LDH do músculo esquelético de tambaqui ao piruvato dos animais expostos ao cenário intermediário.

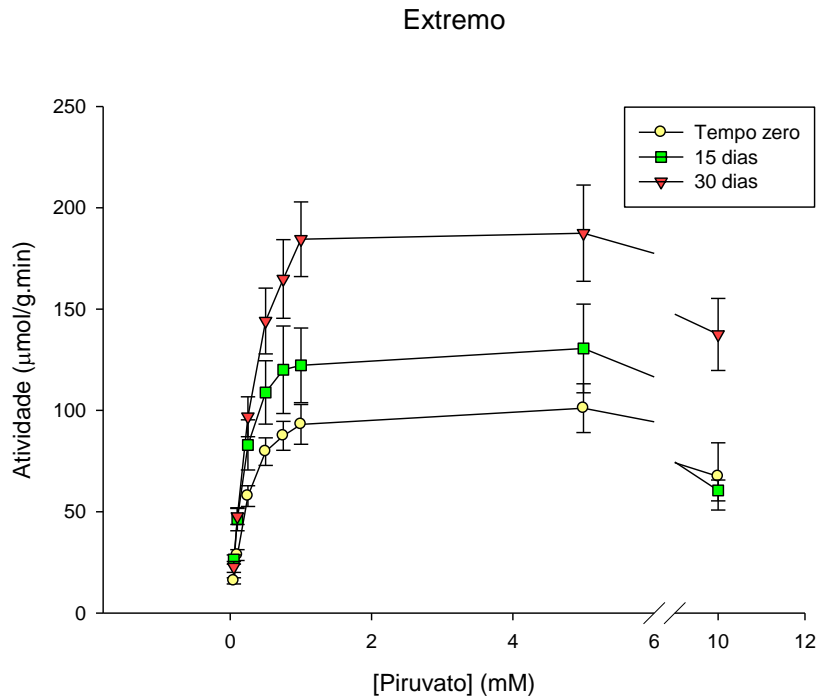


Figura 16. Perfil de saturação da LDH do músculo esquelético de tambaqui ao piruvato dos animais expostos ao cenário extremo.

Os resultados obtidos para o K_m da LDH no coração dos animais coletados apresentaram diferença significativa após 30 dias de exposição, onde o K_m dos animais do cenário extremo apresentou aumento em relação aos cenários controle e brando (Figura 17). Já as análises da LDH do músculo branco dos mesmos indivíduos apresentaram diferença ao longo do experimento ($p < 0,05$).

O K_m da LDH de músculo branco dos animais no cenário brando, aumentou significativamente ($p < 0,05$) após 15 dias de exposição. Os valores do K_m da LDH de músculo branco dos animais do cenário extremo reduziram significativamente ($p < 0,05$) após 15 dias de exposição, mas aumentaram significativamente ($p < 0,05$) após 30 dias de exposição. O K_m da LDH de músculo branco dos animais coletados no tempo zero no cenário extremo foi significativamente maior ($p < 0,05$) que os coletados no tempo zero nos demais cenários. Os indivíduos do cenário extremo coletados após 30 dias obtiveram um valor significativamente maior ($p < 0,05$) de K_m da LDH de músculo branco em relação aos indivíduos coletados nos demais cenários após 30 dias (Figura 18).



Figura
microc

30 dias em

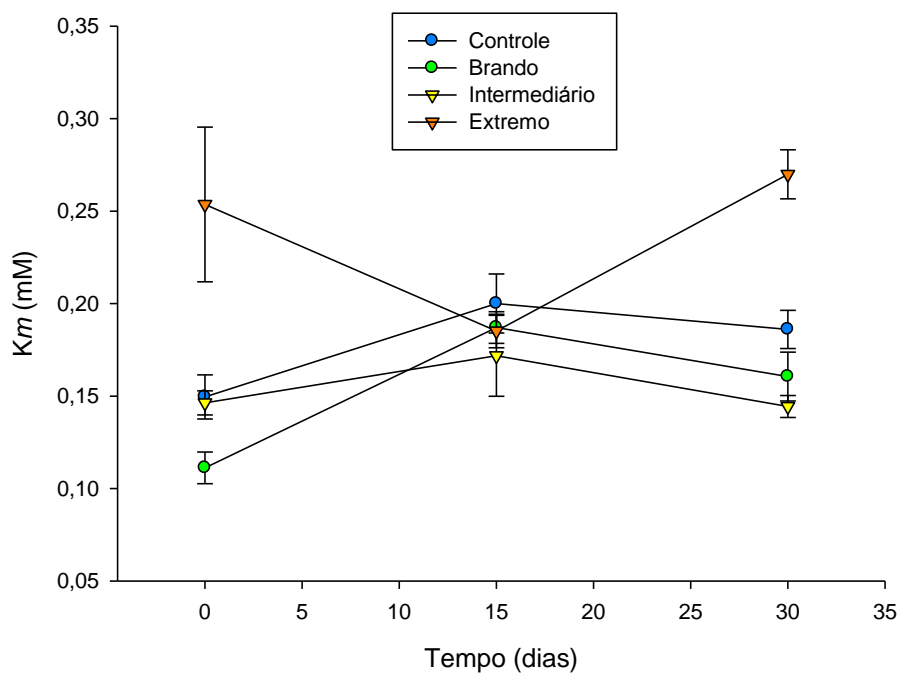


Figura 18. Cinética enzimática da LDH de músculo dos indivíduos de tabaqui expostos por 30 dias em microcosmos. ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros físico-químicos da água

Os valores para os parâmetros da água sofreram variação entre os diferentes cenários, no entanto, eles permaneceram dentro do padrão de qualidade de água para os peixes (Wetzel, 1993; Arana, 1997). Conforme demonstrado no capítulo anterior, o tambaqui possui a capacidade de suportar a variação de temperatura da água desde que a mesma se mantenha entre 12 °C e 43 °C. Levando isto em consideração, apesar da diferença de temperatura do ar pré-estabelecida entre os cenários, a temperatura da água dos tanques permaneceu dentro da faixa de tolerância térmica estabelecida para o tambaqui.

5.2 Estresse do tambaqui exposto aos cenários climáticos

O progresso das mudanças climáticas é monitorado atentamente por diversas organizações nos mais diferentes países. A reunião destas informações permitiu a consolidação do 4º Relatório do IPCC, disponibilizado em 2007, cujo âmago foi discriminar as consequências para as ações antrópicas. Somero (2005) ressalta a importância de se averiguar a fisiologia dos animais mediante as mudanças climáticas, permitindo que estejamos preparados para as consequências que tais alterações podem gerar.

Conforme o polígono de tolerância térmica explanado no capítulo 1, o tambaqui possui uma baixa plasticidade térmica. No entanto, tolera o aumento da temperatura da água até $43,48 \pm 0,21$ °C. O valor máximo registrado para a temperatura da água durante o experimento nos microcosmos é inferior ao valor máximo registrado no polígono. Este fato não exclui a possibilidade dos indivíduos estarem sob estresse nos cenários climáticos e corrobora com a ausência de mortalidade durante os experimentos nos microcosmos.

Os parâmetros sanguíneos dos peixes estão sujeitos a alterações conforme os parâmetros da água variam (Seriani *et al.*, 2013); exposição a poluentes (Martins *et al.*, 2004; Avilez *et al.*, 2012); nutrientes disponíveis na alimentação (Chagas & Val, 2003) e conforme a idade do animal (Ranzani-Paiva *et al.*, 1999; Drumond *et al.*, 2010). No caso de variáveis sanguíneas como hematócrito, estas podem ser utilizadas como indicadores de estresse em peixes (Tavares-Dias & Moraes, 2004).

Em um estudo com *Oncorhynchus kisutch*, o salmão apresentou redução nos valores de hematócrito após 4 horas sob estresse de natação (Cech-Junior *et al.*, 2004). Em situações de estresse de captura de tambaqui apresentadas por Tavares-Dias *et al.* (2001) foi induzida a redução nos valores do hematócrito. Já, em experimentos com tambaqui exposto à hipóxia e fadiga, foi verificado um aumento dos valores do hematócrito (Ferreira, 2006). Também foi observado por Fiúza *et al.* (2013), em experimentos com aumento da salinidade da água, valores de hematócrito significativamente maiores que os iniciais. A injeção de agentes irritantes na bexiga de tambacu promoveu aumento no hematócrito, sem alterar a glicose dos indivíduos (Martins *et al.*, 2001). Em contra partida, Souza-Netto (2012) em estudo com aumento de temperatura e concentrações extremas de CO₂, não verificou alterações no hematócrito de tambaqui. No presente estudo, foi verificado um aumento significativo ($p < 0,05$) do hematócrito nos animais expostos aos cenários intermediário e extremo após 30 dias.

O aumento da temperatura tem a capacidade de provocar aumento do hematócrito, podendo ser explicado devido à uma hemoconcentração em razão da disfunção osmorregulatória (Tavares-Dias & Moraes, 2004). Os resultados obtidos no presente trabalho para o hematócrito indicam que os animais estavam sob situação de estresse. Seibert *et al.* (2001) ressalta a importância de se verificar a influência de fatores ambientais sobre o tambaqui, para melhor entendimento de sua fisiologia e mecanismos de adaptação.

5.3 Efeito dos cenários climáticos na atividade da LDH

Uma ampla variedade de estudos, com relação à LDH, foi realizada nas últimas décadas acerca de fatores capazes de influenciar sua atividade e sua cinética. Suas isoformas estão presentes nos mais variados tecidos dos peixes, comumente com ocorrência de predominância de uma isoenzima em cada tecido (Almeida-Val & Val, 1993). As isoenzimas da LDH contribuem para um melhor ajuste metabólico do animal (Almeida-Val *et al.*, 1991). Embora todas as isoenzimas da LDH tenham como finalidade a realização da mesma reação de oxido-redução, são moléculas especializadas cujas cinéticas diferem umas das outras (Markert & Faulhaber, 1965) permitindo a identificação da isoenzima predominante no tecido, assim como é feito por meio de eletroforese (Markert & Møller, 1959).

No presente estudo foram utilizados os músculos esquelético branco e cardíaco, em função da diferença que possuem quanto ao tipo de metabolismo predominante e, por tanto, ao tipo de isoenzima com maior atividade no tecido. O músculo branco tem atividade predominantemente anaeróbico, apresentando, em geral, predominância da isoenzima A₄. O tecido cardíaco é um músculo liso sendo basicamente aeróbico com predominância da isoenzima B₄ (Almeida-Val & Val, 1993). As diferentes isoenzimas da LDH possuem suscetibilidades diferentes à inativação por temperatura em muitos organismos (Ferreira *et al.*, 1991). A distribuição e predominância das isoenzimas da LDH nos tecidos reflete as características funcionais de cada isoforma, assim como o tipo de metabolismo predominante em cada tecido (Almeida-Val & Val, 1993).

Dentre as funções da LDH no coração está a remoção do lactato durante a recuperação aeróbica (Ferreira *et al.*, 1991; Ahmad & Hasnain, 2005). Já foi observado em diversas espécies que altas temperaturas não afetam a LDH-B, presente no coração (Almeida-Val *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1991). Embora a predominância da LDH-B no coração seja comum para os peixes da Amazônia, sete espécies de ciclídeos mostraram redução da LDH-B no coração, com aumento concomitante da LDH-A, quando encontradas em ambientes hipóxicos, o que foi explicado por Almeida-Val *et al.* (1995) como produto da regulação gênica no tecido, revelando uma grande plasticidade fenotípica. Tais respostas sugerem que a LDH predominante no coração apresenta tolerância a variação de temperatura e, é inibida em situações de hipóxia, prevenindo acúmulo de ácido láctico no coração de várias espécies, em particular, no tambaqui. Schulte *et al.* (2000) verificaram que águas mais quentes permitem uma maior habilidade na regulação da LDH-B na resposta ao estresse. Mesmo ao comparar a atividade da LDH do coração de espécies tropicais com espécies temperadas do hemisfério norte e antárticas, Driedzic & Almeida-Val (1996) não verificaram diferenças substanciais nas atividades das enzimas. No presente estudo apenas os animais expostos ao cenário intermediário por 30 dias apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) da LDH do coração.

Variações na temperatura, portanto, não são um desafio tão extremo aos peixes se não forem acompanhadas de mudanças nas taxas metabólicas e no oxigênio disponível para o animal. Em *Rhinelepis strigosa* aclimatado a diferentes

temperaturas, não foi observada variação da atividade da LDH do coração em animais expostos a normóxia e hipóxia (Panepucci *et al.*, 2000). Em tambaquis coletados da natureza, as atividades da subunidade-B mostraram variação sazonal no coração por consequência da variação de parâmetros ambientais como a temperatura e oxigênio (Almeida-Val *et al.*, 1990) e em *Cichlasoma amazonarum* exposto a hipóxia durante 50 dias, a atividade da LDH no fígado, coração e cérebro sofreu diminuição (Almeida-Val *et al.*, 1995).

A isoenzima A₄ tem melhor desempenho em altas concentrações de lactato ou piruvato que o tetrâmero B₄ (Markert & Holmes, 1969), sendo predominante em tecidos anaeróbicos (Somero, 1973). Exposição a determinados fatores promovem o aumento da LDH no músculo como a anóxia em juvenis de *Astronotus crassipinis* (Almeida-Val *et al.*, 2011). Já, em estudo com a diminuição da temperatura, Zakhartsev *et al.* (2004) obtiveram uma diminuição da LDH no músculo de *Gadus morhua*. Somero & Hochachka (1969), também verificaram uma diminuição da LDH de truta arco-íris quando exposta à diminuição de temperatura, possivelmente porque a baixa temperatura permite que algumas isoenzimas sejam ativadas, enquanto o aumento de temperatura provocaria uma inativação das mesmas. Coquelle *et al.* (2007) demonstram que a atividade enzimática da LDH é altamente influenciada por alterações no pH, sendo este fator influenciado pelas concentrações de CO₂ em água doce (Fivelstad *et al.*, 1999).

O aumento da atividade da LDH do músculo esquelético observado nos animais expostos a 30 dias nos cenários brando, intermediário e extremo corrobora os dados obtidos para *Trematomus bernacchii* por Jayasundara *et al.* (2013). Em outros estudo com diferentes temperaturas de aclimatação da espécie *Carassius auratus gibelio*, a atividade da LDH-B não sofreu alterações significativas (Zeng *et al.*, 2013), o que corrobora os dados obtidos no presente estudo para a atividade da LDH do coração. Amtyaz *et al.* (2013) não observaram alteração na atividade da LDH do músculo esquelético de tambaqui exposto a 32°C e hipercapnia por 96 horas, corroborando com os dados obtidos para os tempo zero e 15 dias de exposição. Almeida-Val *et al.* (1990) relacionou o aumento da LDH-A a um aumento do metabolismo glicolítico anaeróbico em momentos de hipóxia. Após 30 dias de exposição, os animais expostos aos diferentes cenários podem ter entrado em

estresse, necessitando maior atividade do metabolismo anaeróbico no músculo esquelético. De fato, estudos *in vitro* mostraram que a LDH-A presente no tambaqui é termolábil e é influenciada por alterações no pH (Almeida-Val *et al.*, 1991; Almeida-Val *et al.*, 1993).

5.4 Taxa de inibição da LDH

Em estudos com três espécies de siluriformes da Amazônia coletadas na seca e na cheia (Lopes, 2003), a razão LDH1/LDH10 do coração de *Liposarcus pardalis*, *Colophysus macropterus* e *Pimelodus blochii* apresenta menores valores que os obtidos no presente estudo para o tambaqui. O mesmo ocorre quando comparamos a razão LDH1/LDH10 do músculo esquelético das três espécies em relação aos dados obtidos no presente estudo para o tambaqui. Em músculo esquelético de *Cichlasoma amazonarum*, assim como em músculo cardíaco, a razão LDH1/LDH10 de animais em normóxia e hipóxia, não apresentam diferença e os valores descritos para músculo são semelhantes aos obtidos para tambaqui, embora os valores para músculo cardíaco sejam inferiores aos obtidos no presente estudo (Almeida-Val *et al.*, 1995).

Os valores da razão LDH1/LDH10 de músculo branco obtidos para *Rhinelepis strigosa* aclimatado em diferentes temperaturas e exposto a normóxia e hipóxia são menores que os obtidos no presente estudo, sendo todos inferiores a 1, ou seja, a LDH desta espécie não foi inibida por altas concentrações de substrato. Os altos valores da razão LDH1/LDH10 representam um alto nível de inibição da enzima (Kaplan & Goodfriend, 1964). No presente estudo foi observado em músculo esquelético, assim como em músculo cardíaco valores superiores a 1, indicando inibição, embora a maior inibição tivesse ocorrido no coração dos animais estudados, o que é esperado pela predominância da isoforma LDH-B.

5.5 Cinética da LDH VS cenários climáticos

A LDH é a enzima final da glicólise anaeróbica e seu sistema de isoenzimas é regulado de acordo com a demanda metabólica (Val *et al.*, 1998). A curva de

saturação de músculo branco de *Rhinelepis strigosa* expostos a hipóxia teve uma diminuição com relação ao controle (Panepucci *et al.*, 2000), enquanto no presente estudo, a curva de saturação dos animais do cenário extremo apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle, indicando uma ativação do metabolismo anaeróbico nos animais daquele cenário.

Hochachka & Lewis (1971) demonstram que o K_m da LDH pode ser afetado por modificações na temperatura e no pH. Almeida-Val *et al.* (1991) verificaram a dependência do pH que a LDH do tambaqui possui, influenciando nos valores do seu K_m . No presente estudo, foram verificadas alterações nos valores do K_m da LDH do músculo branco ao longo dos 30 dias de exposição, assim como entre os diferentes cenários, sendo que as alterações nos valores do K_m representam modificações na afinidade da enzima pelo substrato (Nelson & Cox, 2008; Moyes & Schulte, 2010). Farias (1992) não observou variação nos valores de K_m da LDH do coração de tambaqui exposto a diferentes temperaturas de aclimação. Os resultados obtidos para o K_m da LDH do coração de tambaqui corroboram a literatura já existente, uma vez que não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os cenários climáticos e nem ao longo do período de exposição.

Estudos comprovaram que a cinética da LDH em cada tecido difere quando os animais são expostos a diferentes temperaturas de aclimação (Zakhartsev *et al.*, 2004). Os animais do cenário extremo apresentaram uma variação de K_m da LDH de músculo ao longo dos 30 dias de exposição, oposto ao registrado no cenário controle, mas que corrobora os resultados encontrados por Ozernyuk *et al.* (1994) em animais expostos a temperaturas mais altas. O aumento do K_m no músculo esquelético nos cenários brando, intermediário e extremo após 30 dias corroboram os dados de Farias (1992) para tambaqui e os de Hochachka & Somero (1968) para espécies de Salmonidae expostas ao aumento de temperatura.

O K_m da LDH-A de barracudas apresenta variação como forma de compensar diferenças térmicas ambientais (Crawford, 2002). Em *Rhinelepis strigosa*, o K_m da LDH de músculo branco variou conforme a temperatura de aclimação e conforme a exposição a normóxia e hipóxia (Panepucci *et al.*, 2000). Os valores de K_m da LDH de músculo esquelético para tambaqui aclimatados a 35°C e 40°C por Farias (1992) são semelhantes aos resultados do presente estudo,

enquanto os valores de K_m da LDH de coração são menores que os observados. Os valores de K_m da LDH de tambaqui para coração e para músculo esquelético obtidos são maiores que os valores apresentados por Almeida-Val (1986) de exemplares capturados na natureza. Tal diferença pode representar diferenças no processo de aclimatização dos animais bem como seu resultado de um processo adaptativo ao ambiente artificial, uma vez que os animais analisados no presente estudo foram adquiridos em fazendas e são advindos de tanques de cultivo, cujas condições são muito diferentes das condições naturais.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os resultados hematológicos indicam que os indivíduos de tambaqui estavam sob situação de estresse, particularmente após 30 dias em exposição aos cenários;
- A LDH do coração manteve-se inalterada, reafirmando sua resistência a mudanças térmicas;
- Tanto a LDH do músculo esquelético, quanto a do músculo cardíaco sofreram inibição por altas concentrações de substrato, mostrando predominância do metabolismo aeróbico nos dois tecidos, embora a LDH do coração tenha apresentado inibição bem mais acentuada;
- As alterações nos valores de K_m do músculo esquelético sugerem que os indivíduos estavam sob situação de estresse metabólico;

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS GERAIS

- O tambaqui, como esperado para uma espécie tropical, possui baixa plasticidade térmica;
- O aumento da temperatura em conjunto ao aumento da concentração de CO₂ induzem estresse metabólico no tambaqui;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, R.; Hasnain, A. 2005. Ontogenetic changes and developmental adjustments in lactate dehydrogenase isozymes of an obligate air-breathing fish *Channa punctatus* during deprivation of air access. *Comparative Biochemistry and Physiology* 140(B): 271-278.
- Almeida-Val, V. M. F. 1986. Lactat desidrogenase de duas espécies de peixes da Amazônia, *Mylossoma duriventris* e *Colossoma macropomum* (Characiformes): Aspectos Adaptativos. Tese de Doutorado para o Programa de Pós-Graduação INPA/FUA. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Fundação Universidade do Amazonas. Manaus, Amazonas. 141p.
- Almeida-Val, V. M. F.; Schwantes, M. L. B.; Val, A. L. 1990. LDH isozymes in amazona fish-I. Electrophoretic studies on two species from serrasalmidae family: *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 95(1): 77-84.
- Almeida-Val, V. M. F.; Schwantes, M. L. B.; Val, A. L. 1991. LDH isozymes in Amazon fish-II. Temperature and pH effects on LDH kinetic properties from *Mylossoma duriventris* and *Colossoma macropomum* (Serrasalmidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 98(B): 79-86.
- Almeida-Val, V. M. F.; Val, A. L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 105B(1): 21-28.
- Almeida-Val, V. M. F.; Val, A. L.; Hochachka, P.W. 1993. Hypoxia tolerance in amazon fishes: status of na under-explored biological “goldmine”. IN:

- Hochachka, P. W.; Lutz, P. L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Thillart, G. V. den. (Eds). *Surviving hypoxia: mechanisms of control and adaptation*. Boca Raton, CRC Press, p. 435-445.
- Almeida-Val, V. M. F.; Farias, I. P.; Paula-Silva, M. N.; Duncan, W. P.; Val, A. L. 1995. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlid. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 28: 1257-1263.
- Almeida-Val, V. M. F.; Oliveira, A. R.; Paula-Silva, M. N.; Ferreira-Nozawa, M. S.; Araújo, R. M.; Val, A. L.; Nozawa, S. R. 2011. Anoxia- and hypoxia-induced expression of LDH-A in the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinis*. *Genetics and Molecular Biology*, 34(2): 315-322.
- Amtyaz; Baptista, R. B.; Almeida-Val, V. M. F. 2013. The effects of increased temperature and CO₂ on the Amazon fish, tambaqui (*Collossoma macropomum*, Cuvier, 1818). *International Journal of Biological Research*, 1(2): 41-47.
- Angilletta-Junior, M. J. 2011. *Thermal Adaptation: A theoretical and empirical synthesis*. 2ª reimpressão. Editora Oxford, New York, 289p.
- Arana, L. V. 1997. *Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura*. 1ª edição. UFSC, Florianópolis, 166p.
- Araújo-Lima, C. A. R. M.; Gomes, L. C. 2005. Tambaqui (*Collossoma macropomum*). IN: Baldisserotto, B.; Gomes, L. C. (Eds.). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. UFSM, Santa Maria, p.175-202.
- Argos, P.; Rossmann, M. G.; Grau, U. M.; Zuber, H.; Frank, G.; Tratschin, J. D. 1979. Thermal stability and protein structure. *Biochemistry*, 18(25): 5698-5703.
- Avilez, I. M.; Soares, C. A. P.; Venturini, F. P.; Moraes, F. D.; Rossi, P. A.; Almeida, L. C.; Moraes, G. 2012. Anemia hemolítica em matrinxã (*Brycon amazonicus*) exposto ao piretroide deltametrina. *XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, 1: 318.
- Baldisserotto, B. 2009. *Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura*. 2ª ed. UFSM, Santa Maria, 350p.

- Boyd, C. E.; Tucker, C. S. 1992. *Water quality and pond soil analyses for aquaculture*. Auburn, Auburn University, 183 p.
- Brow, B. A. 1976. *Hematology: principles and procedures*. 2ª ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1976, 504 p.
- Cazenave, J.; Wunderlin, D. A.; Hued, A. C.; Bistoni, M. A. 2005. Haematological parameters in a neotropical fish, *Corydoras paleatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Callichthyidae), captures from pristine and polluted water. *Hydrobiologia*, 537: 25-33.
- Cech-Junior, J. J.; McEnroe, M.; Randall, D. J. 2004. Coho salmon haematological, metabolic and acid-base changes during exercise and recovery in sea water. *Journal of Fish Biology*, 65: 1223-1232.
- Chagas, E. C.; Val, A. L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 38(3): 397-402.
- CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). 2013a. *Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA*. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 54p.
- CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). 2013b. *Diretrizes brasileiras para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos*. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 50p.
- Coquelle, N.; Fioravanti, E.; Weik, M.; Vellieux, F.; Madern, D. 2007. Activity, stability and structural studies of lactate dehydrogenase adapted to extreme thermal environments. *Journal of Molecular Biology*, 374: 547-562.
- Crawford, D. L. 2002. Evolution of Physiological Adaptation. IN: Storey, K. B.; Storey, J. M. (Eds). *Sensing, Signaling and Cell Adaptation*. Elsevier Science, p.297-314.

- Donelson, J. M.; Munday, P. L.; McCormick, M. I.; Pitcher, C. R. 2011. Rapid transgenerational acclimation of a tropical reef fish to climate change. *Nature*, 2: 30-32.
- Driedzic, W. R., Almeida-Val, V. M. F. 1996. Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and the fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *Journal of Experimental Zoology*, 274(6): 327–333.
- Drumond, G. V. F.; Caixeiro, A. P. A.; Tavares-Dias, M.; Marcon, J. L.; Affonso, E. G. 2010. Características bioquímicas e hematológicas do pirarucu *Arapaima gigas* Schinz, 1822 (Arapaimidae) de cultivo semi-intensivo na Amazônia. *Acta Amazonica*, 40(3): 591-596.
- EPA (*United States Environmental Protection Agency*), 2012. Climate Change. (www.epa.gov). Acesso em: 02/11/2013.
- Esteves, F. A. 1998. *Fundamentos de Limnologia*. 2ª ed. Editora Interciência, Rio de Janeiro, 602 p.
- Evans, D. H.; Piermarini, P. M.; Choe, K. P. 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85: 97-177.
- Farias, I. P. 1992. Efeitos da aclimação térmica da LDH em *Colossoma macropomum* e *Hoplosternus litoralis*. Dissertação de Mestrado para o Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas, 72p.
- Farrell, A. P. 1993. Cardiovascular System. IN: Evans, D. H. (Eds.). *The physiology of fishes*. Boca Raton, Marine Science Series, p. 219-250.
- Ferreira, N. C. D'A.; Almeida-Val, V. M. F.; Schwantes, M. L. B. 1991. Lactate dehydrogenase (LDH) in 27 species of amazon fish: Adaptative and evolutive aspects. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 100(2): 391-398.

- Ferreira, M. S. 2006. *Certificado de vigor físico para o tambaqui (Colossoma macropomum, Cuvier 1818)*. Dissertação de Mestrado para o Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical de Recursos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas. 62p.
- Fiúza, L. S.; Aragão, N. M.; Junior, H. P. R.; Moraes, M. G.; Rocha, I. R. C. B.; Neto, A. D. L.; Sousa, R. R.; Madrid, R. M. M.; Oliveira, E. G.; Costa, F. H. F. 2013. Effects of salinity on the growth, survival, haematological parameters and osmoregulation of tambaqui *Colossoma macropomum* juveniles. *Aquaculture Research*, 1-9.
- Fivelstad, S.; Olsen, A. B.; Kløften, H.; Ski, H.; Stefansson, S. 1999. Effects of carbon dioxide on Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts at constant pH in bicarbonate rich freshwater. *Aquaculture*, 178: 171-187.
- Fivelstad, S.; Olsen, A. B.; Asgard, T.; Baeverfjord, G.; Rasmussen, T.; Vindheim, T.; Stefansson, S. 2003. Long-term sublethal effects of carbon dioxide on Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.): ion regulation, haematology, element composition, nephrocalcinosis and growth parameters. *Aquaculture*, 215: 301-319.
- Gilman, S. E.; Urban, M. C.; Tewksbury, J.; Gilchrist, G. W.; Holt, R. D. 2010. A framework for community interactions under climate change. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(6): 325-331.
- Harper, A. M.; Glass, H. I. 1965. Effect of alterations in the arterial carbon dioxide tension on the blood flow through the cerebral cortex at normal and low arterial blood pressures. *Journal Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 28: 449-452.
- Heisler, N. 1993. Acid-Base Regulation. IN: Evans, D. H. (Eds.). *The physiology of fishes*. Boca Raton, Marine Science Series, p. 342-378.
- Helfman, G. S.; Collette, B. B.; Facey, D. E., Bowen, B. W. 2009. *Diversity of fishes*. 2ª ed. Editora Wiley-Blackwell, Malasia, 720 p.

- Henderson-Sellers, A., McGuffie, K. 2012. *The future of the world's climate*. 2^a ed. Editora Elsevier, New York, 666 p.
- Hochachka, P. W.; Lewis, J. K. 1971. Interacting effects of pH and temperature on the Km values for tissue lactate dehydrogenases. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 39(B): 925-933.
- Hochachka, P. W.; Somero, G. N. 1968. The adaptation of enzymes to temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 27: 659-668.
- Hochachka, P. W.; Somero, G. N. 2002. *Biochemical Adaptation*. Oxford University Press, New York, 466 p.
- IPCC (*International Panel on Climate Change*). 2007. *Fourth Assessment Report: Climate Change 2007: Synthesis Report*. Geneva, Switzerland, 52 p.
- IPCC (*Intergovernmental Panel on Climate Change*). 2013. (www.ipcc.ch). Acesso em: 28/01/2014.
- Ishimatsu, A.; Kikkawa, T.; Hayashi, M.; Lee, K.; Kita, J. 2004. Effects of CO₂ on marine fish: Larvae and adults. *Journal of Oceanography*, 60: 731-741.
- Ishinatsu, A; Dissanayake, A. 2010. Life threatened in acidic coastal waters. IN: Ishumatsu, A.; Lie, H. J. (Eds.) *Coastal Environmental and Ecosystem Issues of the East China Sea*, Terrapub & Nagasaki University, p.283-303.
- Jayasundara, N.; Healy, T. M.; Somero, G. N. 2013. Effects of temperature acclimation on cardiorespiratory performance of the Antarctic notothenioid *Trematomus bernacchii*. *Polar Biology*, 36: 1047-1057.
- Jensen, F. B. 2004. Red blood cell pH, the Borh effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiologica Scandinavica*, 182: 215-227.
- Kampen, E. J.; Zijlstra, W. G. 1964. Erythrocytometric methods and their standardization. *Clinica Chimica Acta*, 6: 538-542.

- Kodas, R. L.; Harley, C. D. G.; O'Connor, M. I. 2011. Community ecology in a warming world: The influence of temperature on interspecific interactions in marine systems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 400: 218-226.
- Lampert, W.; Sommer, U. 2007. *Limnoecology*. Oxford University Press Inc., Nova Iorque, 324 p.
- Lopes, N. P. 2003. *Ajustes metabólicos em sete espécies de siluriformes sob condições hipóxicas: Aspectos adaptativos*. Tese de Doutorado para o Programa Integrado de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Amazonas, 168p.
- Manzi, A. O. 2008. Aquecimento global, mudanças climáticas e o futuro da Amazônia. IN: Val, A. L.; Santos, G. M. (Eds.). *GEEA: TOMO I*. Editora INPA, Manaus, Amazonas, p. 31-52.
- Markert, C. L.; Faulhaber, I. 1965. Lactate dehydrogenase isoenzymes patterns of fish. *Journal of Experimental Zoology*, 159: 319-332.
- Markert, C. L.; Holmes, R. S. 1969. Lactate dehydrogenase isozymes of the flatfish Pleuronectiformes: Kinetic, molecular and immunochemical analysis. *Journal of Experimental Zoology*, 171: 85-104.
- Markert, C. L.; Møller, F. 1959. Multiple forms of enzymes: Tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Biochemistry*, 45: 753-763.
- Martins, M. L.; Onaka, E. M.; Tavares-Dias, M.; Bozzo, F. R.; Malheiros, E. B. 2001. Características hematológicas do híbrido tambacu, seis e 24 horas após a injeção de substâncias irritantes na bexiga natatória. *Revista de Ictiologia*, 9(1/2): 25-31.
- Martins, M. L.; Pilarsky, F.; Onaka, E. M.; Nomura, D. T.; Fenerick Jr. J.; Ribeiro, K.; Myiazaki, D. M. Y.; Castro, M. P. de; Malheiros, E. B. 2004. Hematologia e resposta inflamatória aguda em *Oreochromis niloticus* (Osteichthyes: Cichlidae) submetida aos estímulos único e consecutivo de estresse de captura. *Boletim do Instituto de Pesca*, 30(1): 71-80.

- Motta, V. T. 2011. *Bioquímica*. 2ª ed. Editora Medbook, 488 p.
- Moyes, C. P.; Schulte, P. M. 2010. *Princípios de Fisiologia Animal*. 2ª ed. Editora Artmed, 792p.
- NASA (a) (*National Aeronautics and Space Administration*), 2012. Climate Change (<http://earthobservatory.nasa.gov>). Acesso em: 01/12/2012.
- NASA (b) (*National Aeronautics and Space Administration*), 2012 Carbon Dioxide Concentration (<http://climate.nasa.gov>). Acesso em: 01/06/2012.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. 2008. *Lehninger's Principles of Biochemistry*. 5ª edição, Editora W. H. Freeman and Company, New York, 1294p.
- NSIDC (*National Snow and Ice Data Center*). (<http://nsidc.org>). Acesso em: 20/10/2012.
- Odum, E. P. 2010. *Ecologia*. 23ª ed. Editora Guanabara, Rio de Janeiro, 434p.
- Ozernyuk, N. D.; Klyachko, O. S.; Polosukhina, E. S. 1994. Acclimation temperature effects the functional and structural properties of lactate dehydrogenase from fish (*Misgurnus fossilis*) skeletal muscles. *Comparative Biochemistry Physiology*, 107(B1): 141-145.
- Panepucci, L.; Fernandes, M. N.; Sanches, J. R.; Rantin, F. T. 2000. Changes in lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase activities during hypoxia and after temperature acclimation in the armored fish, *Rhinelepis strigosa* (Siluriformes, Loricariidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 60(2): 353-360.
- Parmesan, C.; Yohe, G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421: 37-42.
- Perry, S. F.; McDonald, G. 1993. Gas exchange. IN: Evans, D. H. (Eds.). *The physiology of fishes*. Boca Raton, Marine Science Series, p.251-278.
- Petit, J. R.; Jouzel, J.; Raynaud, D.; Barkov, N. I.; Barnola, J. M.; Basile, I.; Bender, M.; Chappellaz, J.; Davis, M.; Delaygue, G.; Delmotte, M.; Kotlyakov, V. M.; Legrand, M; Lipenkov, V. Y.; Lorius, C.; Pépin, L.; Ritz, C.; Saltzman, E.;

- Stievenard, M. 1999. Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399: 429-436.
- Pörtner, H. O.; Langenbuch, M.; Reipschlag, A. 2004. Biological Impact of Elevated Ocean CO₂ Concentrations: Lessons from Animal Physiology and Earth History. *Journal of Oceanography*, 60: 705-718.
- Ranzani-Paiva, M. J. T.; Salles, F. A.; Eiras, J. C.; Eiras, A. C.; Ishikawa, C. M.; Alexandrino, A. C. 1999. Análises hematológicas de curimatã (*Prochilodus scrofa*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) das estações de piscicultura do Instituto de Pesca, Estado de São Paulo. *Boletim do Instituto de Pesca*, 25: 77-83.
- Schmidt-Nielsen, K. 2010. *Fisiologia animal*. 5ª ed. Editora Santos, São Paulo, 611 p.
- Schulte, P. M.; Glemet, H. C.; Fiebig, A. A.; Powers, D. A. 2000. Adaptive variation in lactate dehydrogenase-B gene expression: Role of a stress-response regulatory element. *PNAS*, 97(12): 6597-6602.
- Seibert, C. S.; Guerra-Shinohara, E. M.; Carvalho, E. G.; Marques, E. E. 2001. Red blood cell parameters and osmotic fragility curve of *Colossoma macropomum* (Pisces, Osteichthyes, Mileinae) in captivity. *Acta Scientiarum*, 23(2): 515-520.
- Seriani, R.; Abessa, D. M. S.; Pereira, C. D. S.; Kirschbaum, A. A.; Assunção, A.; Ranzani-Paiva, M. J. T. 2013. Influence of seasonality and pollution on the hematological parameters of the estuarine fish *Centropomus parallelus*. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61(2): 105-111.
- Somero, G. N.; Hochachka, P. W. 1969. Isoenzymes and short-term temperature compensation in poikilotherms: Activation of Lactate Dehydrogenase isozymes by temperature decreases. *Nature*, 223: 194-195.
- Somero, G. N. 1973. Thermal modulation of pyruvate metabolism in the fish *G. mirabilis*: The role of lactate dehydrogenases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 44(1): 205-206.
- Somero, G. N. 2005. Linking biogeography to physiology: Evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. *Frontiers in Zoology*, 2:1.

- Somero, G. N. 2010. The physiology of climate change: How potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *The Journal of Experimental Biology*, 213: 912-920.
- Souza-Netto, J. G. 2012. *Respostas fisiológicas de Colossoma macropomum (Cuvier 1818) ao aumento de temperatura e CO₂*. Dissertação de mestrado para o Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. Manaus, Amazonas. 59p.
- Tavares-Dias, M.; Sandrim, E. F. S.; Moraes, F. R.; Carneiro, P. C. F. 2001. Physiological responses of "tambaqui" *Colossoma macropomum* (Characidae) to acute stress. *Boletim do Instituto de Pesca*, 27(1): 43-48.
- Tavares-Dias, M.; Moraes, F. R. 2004. *Hematologia de peixes teleósteos*. 1ª Ed. Villimpress Complexo Gráfico, Ribeirão Preto, São Paulo, 144p.
- Val, A. L.; Paula-Silva, M. N.; Almeida-Val, V. M. F. 1998. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. *South African Journal of Zoology*, 33(2): 107-114.
- Val, A. L.; Paula-Silva, M. N.; Almeida-Val, V. M. F. 2004. Estresse em Peixes – Ajustes Fisiológicos e Distúrbios Orgânicos. IN: Ranzani-Paiva, M. J. T.; Takemoto, R. M.; Lizama, M. A. P. (Eds.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Editora Varela, São Paulo, p.75-88.
- Val, A. L.; Menezes, A. C. L.; Ferreira, M. S.; Paula-Silva, M. N.; Araújo, R. M.; Almeida-Val, V. M. F. 2006. Estresse em peixes: respostas integradas para a sobrevivência e a adaptação. IN: Silva-Souza, A. T. (Ed.). *Sanidade de organismos aquáticos no Brasil*. ABRAPOA, Maringá, p. 211-228.
- Wetzel, R. G. 1993. *Limnologia*. 2ª ed. Editora Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 111p.
- Zakhartsev, M.; Johansen, T.; Pörtner, H. O.; Blust, R. 2004. Effects of Temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. *The Journal of Experimental Biology*, 207: 95-112.

Zar, J.K. 1984. *Biostatistical analysis*. 2^a ed. Prentice-Hall, New Jersey, 718p.

Zeng, P.; Chen, T.; Shen, J. 2013. Effects of cold acclimation and storage temperature on crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) in a waterless preservation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 1-10.