

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO PLENA UFSCAR/UNESP

**“Mecanismos fisiológicos como efetores da variação individual na
tolerância a fatores abióticos (temperatura e hipóxia) nos
teleósteos de água doce pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia-
do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)”**

FELIPE ROCCO BLASCO

SÃO CARLOS
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO PLENA UFSCAR/UNESP

“Mecanismos fisiológicos como efetores da variação individual na tolerância a fatores abióticos (temperatura e hipóxia) nos teleósteos de água doce pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*)”

FELIPE ROCCO BLASCO

Tese de doutorado apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/UNESP, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin

Co-orientador: Dr. David J. McKenzie

SÃO CARLOS

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Felipe Rocco Blasco, realizada em 14/12/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin (UFSCar)

Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda Garcia Sampaio (EMBRAPA)

Prof. Dr. Wilfried Klein (USP)

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo (UNESP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia da nossa palavra.

O professor, assim, não morre jamais.

Rubem Alves

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa Interinstitucional Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) pela infraestrutura e aprendizados proporcionados. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida.

Ao professor Dr. Francisco Tadeu Rantin, pela orientação ao longo de todos esses anos, foi um prazer ter feito parte de seu laboratório desde a minha IC. Ao Dr. David J. McKenzie, pela ímpar contribuição na elaboração dos experimentos, discussões dos dados, oportunidade em conhecer e trabalhar em seu laboratório na França e conversas sobre a vida. Meus sinceros agradecimentos!

A todos os profissionais, professores, técnicos e colegas pesquisadores que tanto contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Aos professores do PIPGCF pelas disciplinas ministradas e à toda equipe do PIPGCF e DCF pelo apoio, em especial, ao Alexandre Prata, Carmem Velasco e Angelo Carnelosi.

A todos os meus colegas de trabalho, sem os quais os anos seriam muito mais apáticos e difíceis: Nathan, Lara, Carol, Michelly, Israel, Dri, Livia, Mari, Gustavo, Renato, Samanta, Zê, Nicolas, Priscila, Fabrício, Eliton, William, Henrique, Karina.

A todos os membros da banca de qualificação (Prof.^a Dra. Marisa Narciso Fernandes, Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo e Prof.^a Dra. Diana Amaral Monteiro) e todos os membros defesa, pelas estimadas contribuições para a melhoria deste trabalho.

Ao meu porto seguro e base, meus pais Loreni e Eduardo, e meu irmão Gustavo por todo o amor, apoio, carinho e estrutura para que tal jornada pudesse ser trilhada. Vocês são parte dela, sem dúvidas! Ao meu irmão e cunhada Priscila por me proporcionarem a linda sensação de ser tio de duas belezuras, Manu e Rafa. Amo vocês todos!

À toda minha família, avós (presentes de alma), tias(os) e primos (as). Em especial, aos meus padrinhos Irê e Doglinha e à minha Tia Lucia pelas ótimas ideias trocadas e vibrações positivas durante toda a minha caminhada.

À Marina, pelo companheirismo e amizade. Juntos nós descobrimos que existem diferentes formas de estarmos ao lado de quem amamos, obrigado por tamanha troca. À toda a sua família pelo enorme carinho, em especial à Edna, Afonso, Livia e Bruno. Aos meus três amores felinos, Negresco, Tapioca e Nacho, e ao amor canino, Pagu.

A todos os amigos que fiz em São Carlos: galera da Pedra 90, aos parceiros da banda mais divertida em se fazer parte, As Veia Loka, aos amigos da calistenia, pelas risadas, amizade e carinho de sempre. Aos amigos de São Paulo que apesar da

distância os elos se mantêm firmes e fortes, minhas amizades de infância e adolescência que levo com muito carinho.

À direção e funcionários do colégio Objetivo São Carlos, em especial Naira Cavichioli e Ariane Barros. Aos meus amigos de docência e aos meus alunos, por me lembrarem a cada encontro quão prazeroso é estar em uma sala de aula e poder ajudar na formação da nossa juventude.

Ciência e Educação caminham lado a lado na base de uma sociedade mais justa e igualitária. Me sinto lisonjeado em poder dar a minha singela contribuição em ambas. Seguimos na luta!

RESUMO

A influência antrópica no ambiente aquático será responsável por um aumento na frequência e intensidade de exposição dos peixes a dois agentes estressores muito importantes na viabilidade desses animais: temperatura e hipóxia. A temperatura já é bem estabelecida como o principal fator abiótico a influenciar na viabilidade dos animais ectotérmicos. Por conta da eficiente troca de calor que acontece entre o epitélio branquial e a superfície corpórea com o ambiente que os circundam e a relativa baixa produção de calor por esses animais, usualmente a temperatura ambiental irá ditar a temperatura corpórea, o que inevitavelmente irá influenciar na taxa metabólica. A hipóxia tem por característica limitar a disponibilidade de oxigênio (O_2) para a realização das funções essenciais para a manutenção da vida, bem como para a realização de atividades que assegurariam um maior sucesso evolutivo e aptidão dos animais ao ambiente em que vivem. Considerando que ambos estressores estão relacionados à disponibilidade e consumo de O_2 , o estudo das três variáveis que compreendem o fenótipo metabólico aeróbico de um indivíduo (taxa metabólica padrão – TMP; taxa metabólica ativa – TMA e aumento aeróbico – AA) tem se mostrado uma ferramenta eficiente a fim de compreender os mecanismos relacionados à variação individual na tolerância a tais estressores. Usando como modelos experimentais duas espécies abundantes na ictiofauna brasileira, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*), estudamos se as premissas citadas estão relacionadas à tolerância. No experimento I desenvolvemos um novo protocolo para testar a tolerância ao aquecimento agudo (CT_{swim}). Tal teste visa ser uma alternativa ecologicamente mais relevante e cujos fatores associados ao limite térmico tolerado sejam bem compreendidos, diferente do atual teste CT_{max} . Para ambas as espécies estudadas, o CT_{swim} foi aproximadamente 2°C menor do que o CT_{max} . Além disso, a fadiga apresentada durante o protocolo de natação aquecida se mostrou um interessante “endpoint” uma vez que esse comportamento foi precedido pela adoção de um perfil anaeróbico de natação. Tal fato nos leva a acreditar em uma inabilidade em prover O_2 aos tecidos em funcionamento, indicando que a viabilidade dos animais é possivelmente comprometida a temperaturas menores das reportadas pelo CT_{max} . No experimento II, utilizando o pacu como espécie experimental, investigamos a correlação entre o fenótipo metabólico individual e a tolerância ao aquecimento agudo e à hipóxia, além de tentar descobrir uma possível tolerância cruzada entre ambos estressores. A tolerância ao aquecimento agudo foi medida por meio dos protocolos CT_{swim} e CT_{max} e a tolerância à hipóxia foi medida por meio do cálculo do S_{crit} , ou seja, a saturação de O_2 na água na qual o animal perde a habilidade em oxirregular. Encontramos que a tolerância ao aquecimento agudo, em ambos os protocolos, não foi dependente do fenótipo metabólico dos indivíduos, bem como a tolerância à hipóxia não foi dependente da TMM. Em relação à tolerância cruzada entre os estressores, encontramos correlação entre tolerância à hipóxia e CT_{swim} , indo ao encontro do estudo anterior sobre a importância no suprimento de O_2 nesse novo teste de tolerância térmica. No experimento III estudamos a hipótese que afirma que os indivíduos de maior massa são os mais suscetíveis ao aquecimento devido a limitações na capacidade em prover O_2 para as atividades aeróbicas. Para isso usamos exemplares de tilápia-do-Nilo que variaram em mais de uma ordem de magnitude na massa corporal e os expusemos aos testes CT_{max} e CT_{swim} . Encontramos que o AA calculado na temperatura de aclimação não teve correlação com a massa corpórea do animal, assim como a tolerância térmica no CT_{max} . Entretanto a tolerância ao aquecimento agudo no CT_{swim} se mostrou inversamente proporcional à massa do animal, bem como a TMM calculada durante o teste. Tais achados nos mostram que quando expostos ao aquecimento agudo, os animais maiores têm a sua habilidade em nadar prejudicada a temperaturas inferiores do que os animais menores. Esse caráter pode vir a atrapalhar a sobrevivência e aptidão desses indivíduos em um cenário onde tais situações poderão ser mais frequentes.

ABSTRACT

The anthropic influence on the aquatic environment will be responsible for an increase in the frequency and intensity of exposure of fish to two very important stressors in the viability of these animals: temperature and hypoxia. Temperature is already well established as the main abiotic factor to influence the viability of ectothermic animals. Due of the efficient heat exchange that takes place between the branchial epithelium and the body surface with the surrounding environment and the relative low heat production by these animals, usually the ambient temperature will dictate the body temperature, which will inevitably influence the metabolic rate. Hypoxia has the characteristic of limiting the availability of oxygen (O_2) for the performance of essential functions for the maintenance of life, as well as for the performance of activities that would ensure greater evolutionary success and fitness of the animals to the environment in which they live. Considering that both stressors are related to the availability and consumption of O_2 , the study of the three variables that comprise an individual's aerobic metabolic phenotype (standard metabolic rate - SMR; active metabolic rate – AMR and aerobic scope - AS) has proved to be an efficient tool in order to better understand the mechanisms related to individual variation in tolerance to such stressors. Using as experimental models two abundant species in the Brazilian ichthyofauna, Nile-tilapia (*Oreochromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*), we studied whether the premises mentioned are related to tolerance. In experiment 1 we developed a new protocol to test the acute heating tolerance (CT_{swim}). Such test aims to be an ecologically more relevant alternative and whose factors associated with the tolerated thermal limit are well understood, different from the current CT_{max} test. For both studied species, CT_{swim} was approximately 2°C lower than CT_{max} . In addition, the fatigue presented during the heated swimming protocol proved to be an interesting “endpoint” since this behavior was preceded by the adoption of an anaerobic swimming profile. This fact leads us to believe in an inability to provide O_2 to the tissues in operation, indicating that the viability of the animals is possibly compromised at temperatures lower than those reported by CT_{max} . In experiment 2, using pacu as an experimental species, we investigated the correlation between the individual metabolic phenotype and the tolerance to acute heating and hypoxia, in addition to trying to discover a possible cross-tolerance between both stressors. The tolerance to acute heating was measured using the protocols CT_{swim} and CT_{max} and the tolerance to hypoxia was measured using the S_{crit} calculation, that is, the O_2 saturation in the water in which the animal loses the ability to oxirregulate. We found that the tolerance to acute heating, in both protocols, was not dependent upon the metabolic phenotype of the individuals, as well as the tolerance to hypoxia was not dependent upon SMR. Regarding the cross tolerance between stressors, we found a correlation between tolerance to hypoxia and CT_{swim} , in line with the founds from our previous study about the importance of O_2 supply in this new thermal tolerance test. In experiment 3, we studied the hypothesis that states that individuals of greater mass are more susceptible to heating due to limitations in the ability to provide O_2 for aerobic activities. With this aim we used individuals of Nile-tilapia that varied by more than one order of magnitude in body mass and exposed them to the CT_{max} and CT_{swim} tests. We found that the AS calculated at the acclimatization temperature had no correlation with the animal's body mass, as well as for thermal tolerance at CT_{max} . However, the acute heating tolerance in the CT_{swim} proved to be inversely proportional to the animal's mass, as well as the MMR calculated during the test. Such findings show us that when exposed to acute warming, bigger animals have their ability to swim impaired at lower temperatures than the conspecifics smaller ones. This character can come to hinder the survival and fitness of these individuals in a scenario where such situations may be more frequent.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Polígono da tolerância térmica. A temperatura de aclimação irá interferir na temperatura incipiente letal máxima (TILMax - IULT) e na temperatura incipiente letal mínima (TILMin - ILLT). A área do polígono A (preto) representa a tolerância térmica de uma espécie euritérmica, enquanto a área do polígono B (vermelho) representa a tolerância térmica de uma espécie estenotérmica (Adaptada Moyes & Schulte, 2010). 17
- Figura 2.** Ilustração esquemática do protocolo CT_{max} . Partindo de uma temperatura de aclimação, promove-se aumentos a uma taxa constante até o animal perder a capacidade em manter o equilíbrio dorsoventral - CT_{max} Endpoint. (Adaptada de Beitinger & Lutterschmidt, 2011). 18
- Figura 3.** Curva de Tolerância/Desempenho térmico (Adaptada de Schulte, 2011). 19
- Figura 4.** Relação hipotética entre a taxa de consumo de O_2 ($\dot{M}O_2$) e a concentração de O_2 ambiental (PO_2). A linha laranja representa o comportamento apresentado por um animal oxirregulador e a linha vermelha representa o comportamento apresentado por um animal oxiconformista. A seta preta indica o P_{crit} , ou seja, a PO_2 na qual o animal não consegue mais sustentar a sua MO_2 (baseada em Ultsch & Regan, 2019 e cedida por FT RANTIN). 21

3 RESULTADOS

3.1 Artigo 1

- Figura 1.** Diagrama de caixa dos dados para CT_{swim} (pontos em laranja) ou CT_{max} (pontos em vermelho) nas duas espécies de peixes, tilápia-do-Nilo (painel esquerdo) e pacu (painel direito). As dobradiças inferior e superior do diagrama de caixa representam o 25th e 75th percentis, respectivamente; a linha horizontal dentro da caixa é a mediana; o comprimento dos whisker representa o intervalo de pontos de dados entre cada dobradiça e $1,5 \times$ a diferença entre o 25º e o 75º percentis. Os dados além desses limites são os outliers. Cada ponto é um peixe, $n = 8$ em todos os casos. 48
- Figura 2.** Consumo de oxigênio durante o protocolo CT_{swim} , quando tilápia-do-Nilo (painel esquerdo) ou pacu (painel direito) nadavam aerobicamente e eram aquecidos em $1^\circ C$ a cada 30 min, partindo da temperatura de aclimação de $26^\circ C$ (pontos em vermelho e curva), ou quando os mesmos peixes nadaram aerobicamente pelo mesmo período apenas na temperatura de aclimação (pontos em azul e curva). A velocidade de natação em ambas as situações foi a de 85% da U_{GT} de cada indivíduo. A área sombreada corresponde ao intervalo de 95% de confiança em cada temperatura. Cada ponto corresponde a um peixe medido na respectiva temperatura, ou o intervalo de tempo correspondente no protocolo controle a $26^\circ C$. 50

3.2 Artigo 2

- Figura 1.** Relação entre SMR_{swim} e SMR_{static} encontrada em exemplares de *Piaractus mesopotamicus*. Resultados são $y=0,57711x+1,0855$ ($r = 0,61$; $p=0,001$), $n=24$. 71

Figura 2. Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$) em *Piaractus mesopotamicus* em relação a reduções graduais na % O_2 da água. A linha tracejada indica o SMR calculado para a espécie. Os valores são apresentados como apresentados como média \pm EPM, $n=24$. 72

Figura 3. Relação entre S_{crit} e CT_{max} (círculos pretos) e S_{crit} e CT_{swim} (triângulos vermelhos) em *Piaractus mesopotamicus*. Resultados são $y = -0,0122x + 39,884$ ($r = -0,216$; $p = 0,310$) e $y = -0,0599x + 39,075$ ($r = -0,47$; $p = 0,021$), respectivamente, $n=24$. 73

Figura 4. Relação entre SMR_{swim} e CT_{swim} e AMR e CT_{swim} em *Piaractus mesopotamicus*. Resultados são $y = -0,2139x + 38,767$ ($r = -0,161$; $p = 0,453$) e $y = -0,0478x + 39,036$ ($r = -0,295$; $p = 0,162$), respectivamente, $n=24$ 74

Figura 5. Relação entre SMR_{static} e S_{crit} em *Piaractus mesopotamicus*. Resultados são $y = 2,001x + 12,055$ ($r = 0,182$; $p = 0,394$), $n=24$. 75

3.3 Artigo 3

Figura 1. Coeficiente de regressão linear de mínimos quadrados para as relações log:log entre (A) massa corpórea e variáveis metabólicas massa-específica, SMR (símbolos roxos, linha pontilhada), AMR (símbolos azuis, linha tracejada) e AS (símbolos vermelhos); (B) massa corpórea e os dois protocolos de tolerância térmica (CT), CT_{max} (símbolos verdes) e CT_{swim} (símbolos amarelos, linha pontilhada). Dados coletados em exemplares de tilápia-do-Nilo aclimatadas a 26°C, $n=18$ e massa variando de 21 a 313g. As linhas de regressão são apresentadas nas variáveis que possuíram relação significativa, as linhas denotam o melhor ajuste, ver Tabela 1. 94

Figura 2. (A) Coeficiente de regressão linear de mínimos quadrados para as relações log:log entre a massa corpórea a máxima taxa de captação de oxigênio durante o CT_{swim} massa-específico ($\dot{M}O_{2,max}$, ver tabela 1 para informação na regressão) e (B) Correlação de Pearson entre temperatura crítica para a fadiga durante a natação (CT_{swim}) e $\dot{M}O_{2,max}$, linha pontilhada é descrita por $\log CT_{swim} = (\log \dot{M}O_{2,max}) \times 0,061 + 1,491$ ($r = 0,637$, $P = 0,004$). Dados coletados em exemplares de tilápia-do-Nilo aclimatadas a 26°C, $n=18$ e massa variando de 21 a 313g. 95

Figura S1. Regressões log:log das taxas metabólicas ($mmolO_2 \cdot h^{-1}$) independente da massa contra a massa (g) em tilápia-do-Nilo, $n=18$. SMR – taxa metabólica padrão; AMR – taxa metabólica ativa; AS – aumento aeróbico e $\dot{M}O_{2,max}$ - taxa máxima de captação de oxigênio obtida durante o teste de temperatura crítica para fadiga durante o protocolo de natação aeróbica (CT_{swim}) $SMR = 0,581 \times massa - 1,451$ ($R^2 = 0,873$); $AMR = 0,881 \times massa - 1,474$ ($R^2 = 0,958$); $AS = 1,006 \times massa - 1,878$ ($R^2 = 0,927$), e $\dot{M}O_{2,max} = 0,671 \times massa - 0,923$ ($R^2 = 0,983$). Considerado significativo $P < 1 \times 10^{-7}$. 99

LISTA DE TABELAS

3 RESULTADOS

3.1 Artigo 1

Tabela 1. Valores da média (\pm SE) calculadas para a massa (g), o comprimento (mm), a taxa metabólica padrão (SMR), a taxa metabólica ativa (AMR), o aumento aeróbico (AS), a velocidade máxima de natação aeróbica (U_{GT}) e a velocidade máxima de natação (U_{MAX}) em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, e pacu, *Piaractus mesopotamicus*. 47

Tabela 2. Resultados gerais do modelo linear para fatores que afetam os limites térmicos críticos. 48

Tabela 3. Valores da média (\pm SE) da $\dot{M}O_2$ calculadas em dois momentos diferentes durante o protocolo CT_{swim} : $\dot{M}O_2$ na temperatura de aclimação (26°C) e a $\dot{M}O_2$ máxima calculado durante o protocolo ($\dot{M}O_2$ Max CT_{swim}), e a diferença entre eles, CT_{swim} scope metabólica. Valores obtidos em exemplares de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, e pacu, *Piaractus mesopotamicus*. 49

Tabela 4. Resultados do modelo de efeitos mistos lineares para fatores que afetam o consumo de oxigênio durante o CT_{swim} . 49

3.2 Artigo 2

Tabela 1. Variáveis morfológicas, de desempenho de natação, do fenótipo metabólico, de tolerância ao aquecimento agudo e de tolerância à hipóxia em *Piaractus mesopotamicus*. 70

3.3 Artigo 3

Tabela 1. Coeficiente de regressão linear de mínimos quadrados para as relações log:log entre massa corpórea (g) e as variáveis do fenótipo metabólico, de desempenho de natação, de tolerância térmica e de desempenho respiratório em exemplares de tilápia-do-Nilo (n=18; massa variando de 23 até 313g). 93

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

$\dot{M}O_2$ = Taxa de consumo de oxigênio

$\dot{M}O_{2max}$ = Taxa máxima de consumo de oxigênio

AA = Aumento metabólico aeróbico

AMR = Active metabolic rate

AS = Aerobic scope

ATP = Adenosina trifosfato

CO₂ = Gás carbônico

CT_{max} = Temperatura crítica máxima

CT_{min} = Temperatura crítica mínima

CT_{swim} = Temperatura crítica máxima durante a natação aeróbica

GOL = Gill oxygen limitation (Brânquias limitando a captação de oxigênio)

ILLT = Temperatura letal incipiente mínima

ILT = Temperatura letal incipiente

IULT = Temperatura letal incipiente máxima

LOE = Perda do equilíbrio dorsoventral

O₂ = Gás oxigênio

OCLTT = Oxygen capacity limited thermal tolerance (Tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio)

P_{crit} = Pressão parcial crítica de oxigênio

PO₂ = Pressão parcial de O₂

RMR = Routine Metabolic rate

S_{crit} = Saturação crítica de oxigênio

SMR = Standard metabolic rate

T_c = Temperatura corporal

TMA = Taxa metabólica ativa

TMP = Taxa metabólica padrão

TPC = Curva de desempenho térmico

U_{GT} = Velocidade máxima de natação aeróbica

U_{MAX} = Velocidade máxima de natação

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 Temperatura	16
1.2 Hipóxia	20
1.3 Fenótipo metabólico	22
1.4 Espécie estudada 1: O pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i>	26
1.5 Espécie estudada 2: A tilápia-do-Nilo, <i>Oreochromis niloticus</i>	27
1.6 Referências Bibliográficas	28
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo Geral	37
2.2 Objetivos Específicos	37
3 RESULTADOS	38
3.1 Artigo 1	38
O uso do exercício aeróbico para avaliar a tolerância subletal ao aquecimento agudo em peixes.	
3.2 Artigo 2	61
A variação individual na tolerância ao aquecimento agudo e hipóxia não está relacionada ao fenótipo metabólico no pacu, <i>Piaractus mesopotamicus</i> .	
3.3 Artigo 3	86
A tolerância à exposição ao aquecimento agudo diminui com a massa corporal em tilápia-do-Nilo: evidências de uma ligação na capacidade de captação de oxigênio.	
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	104

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho se insere na área da fisiologia da conservação, com ênfase no estudo das variações individuais no fenótipo metabólico como uma ferramenta para prever uma possível tolerância a determinados estressores ambientais. Considerando o cenário vigente de mudanças ambientais, escolhemos dois estressores que serão cada vez mais comuns em frequência e intensidade para os peixes: temperatura e hipóxia. Os experimentos foram conduzidos utilizando exemplares de duas espécies de relevância ecológica local, *Oreochromis niloticus* (tilápia-do-Nilo) e *Piaractus mesopotamicus* (pacu). Este estudo envolveu a realização de testes a fim de caracterizar o fenótipo metabólico, tolerância ao aquecimento agudo e tolerância à hipóxia. Esta tese foi estruturada com uma introdução geral acerca dos assuntos envolvidos, seguida dos objetivos do trabalho e, como resultados, os três artigos originados da pesquisa. Todos os artigos são expostos em português e com formatação referente às principais gerenciadoras de periódicos almejadas.

O primeiro artigo trata sobre o desenvolvimento de um novo protocolo para se testar a tolerância ao aquecimento agudo, bem como caracterizar o perfil das duas espécies estudadas.

O segundo artigo aborda os efeitos da variabilidade individual no fenótipo metabólico de exemplares de *Piaractus mesopotamicus* e a tolerância ao aquecimento agudo e à hipóxia. Além disso também estudamos a possibilidade de ocorrência de tolerância cruzada entre ambos estressores.

Já o terceiro artigo expõe os resultados obtidos após experimentos de tolerância ao aquecimento agudo realizados com exemplares de *Oreochromis niloticus* com tamanhos diversos.

A tese se encerra com as considerações finais acerca dos três trabalhos desenvolvidos.

1 INTRODUÇÃO GERAL

A fisiologia da conservação pode ser definida como o ramo da biologia que se incumbem de compreender as respostas funcionais de organismos em decorrência das mudanças no ambiente em que vivem e utilizá-las com o propósito de conservação das espécies (WIKELSKI & COOKE, 2006). Mudanças ambientais podem causar ou contribuir para o declínio populacional de uma dada espécie em um dado local (WIKELSKI & COOKE, 2006). Esse campo de estudo possui como trunfo apresentar não apenas uma descrição de padrões, mas uma visão mecanicista detalhada dos motivos que levam ao insucesso de uma espécie em um ambiente (STEVENSON et al., 2005). Os parâmetros fisiológicos usualmente utilizados como ferramentas são aqueles associados com a função do organismo inteiro, como, respostas metabólicas/respostas endócrinas às variações ambientais e mudanças no perfil imune dos indivíduos (RICKLEFS & WIKELSKI, 2002).

Podemos definir como “estressor”, o estímulo nocivo ao qual um organismo é submetido e como “resposta ao estresse”, o conjunto de mecanismos fisiológicos e comportamentais para lidar com esse estímulo (ROMERO, 2004). As respostas encontradas dependerão da intensidade e do tempo de exposição ao estressor (WIKELSKI & COOKE, 2006). Em relação ao tempo de exposição, podemos classificar os agentes em: estressores agudos (curta duração) e estressores crônicos (longa duração) (WIKELSKI & COOKE, 2006).

Devido às diferenças físico-químicas naturais entre os ambientes aéreo e aquático, algumas atividades são mais desafiadoras para os organismos viventes no segundo ambiente citado. A uma mesma temperatura (20 °C) a viscosidade da água é de cerca de 1 cP (centipoise) e a do ar é de 0,02 cP, correspondendo a uma viscosidade da água 50 vezes maior que a do ar. Assim, como o trabalho necessário para movimentar a massa inerte aumenta proporcionalmente à viscosidade, a ventilação aquática se torna mais dispendiosa em relação à aérea (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). Outra diferença física entre tais ambientes envolve a velocidade de difusão de oxigênio (O₂), onde, a uma mesma pressão parcial de O₂ (PO₂), esta ocorre cerca de 10.000 vezes mais rápido no ar do que na água (SCHMIDT-NIELSEN, 2002). Por fim, a

capacitância de O₂ nos dois meios também é diferente. O volume de qualquer gás dissolvido na água depende tanto de sua pressão parcial quanto de sua constante de solubilidade (α), como descrito pela lei de Henry. A constante de solubilidade do O₂ na água é baixa e diminui com o aumento da temperatura e salinidade (DEJOURS, 1981). Assim, a maior difusibilidade do O₂ no ar em relação à água, bem como sua solubilidade e concentração, que é de aproximadamente 30 vezes maior no ar do que na água, são algumas características importantes para compreender a sua disponibilidade para os organismos que habitam tais meios. Outra diferença importante é a alta condutividade térmica da água, sendo um grande desafio para os organismos ectotérmicos manterem uma temperatura interna que difere da temperatura ambiental (JOBLING, 1996).

Associada às diferenças acima citadas, também se tem relatado que a influência antrópica em habitats aquáticos tem aumentado continuamente nas últimas décadas, aumentando dessa forma as situações de estresse aos quais os animais são submetidos (WIKELSKI & COOKE, 2006). Os impactos causados pelas alterações climáticas podem ser classificados em duas classes: diretos e indiretos. Impactos diretos são aqueles que levam à acidificação do meio aquático, aos eventos de hipóxia e às mudanças na temperatura da água. E os impactos indiretos usualmente estão associados a mudanças na composição da rede alimentar (PÖRTNER & PECK, 2010). Ambas classes de impactos possuem potencial de afetar os indivíduos em qualquer fase do estágio de vida, assim, influenciando desde populações até ecossistemas (PÖRTNER & PECK, 2010).

No Brasil muitos dos recursos utilizados a partir dos ecossistemas de água doce estão associados aos peixes, os quais compreendem um componente muito valioso da biota. As mudanças globais devido à atividade humana deverão afetar esses ecossistemas e, inevitavelmente, os peixes (COSTA & BARLETTA, 2016). Nos dias atuais um dos maiores problemas nos ambientes tropicais de água doce é a hipóxia (DIAZ & BREITBURG, 2009; COSTA & BARLETTA, 2016). Apesar da ocorrência de episódios hipóxicos de forma natural nos ambientes de água doce, o aumento das atividades industriais e poluição causadas pelo homem tem promovido o enriquecimento orgânico e nutricional dos corpos d'água (DIAZ & BREITBURG, 2009; COSTA & BARLETTA, 2016).

O meio torna-se, assim, eutrofizado, propiciando um aumento na exposição a eventos de hipóxia para os seres que ali habitam (DIAZ & BREITBURG, 2009; COSTA & BARLETTA, 2016). Além disso, os peixes também serão desafiados por aumentos significativos das temperaturas médias anuais e um aumento na frequência de eventos extremos, tais como exposição não usual a temperaturas elevadas, secas ou inundações. Esses eventos podem agravar os riscos de exposição à hipóxia e também causar estresse térmico (IPCC 2014; BUCKLEY & HUEY, 2016).

1.1 Temperatura

De acordo com o Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, 2014), até o final desse século as temperaturas nos ambientes aquáticos poderão aumentar em até 4°C. Considerando a eficiente troca de calor que acontece nas brânquias e na superfície corpórea dos peixes com o ambiente e a baixa produção de calor oriunda de uma baixa taxa metabólica, a temperatura corporal (T_c) da maioria das espécies de peixes é altamente dependente da temperatura ambiental (HAZEL & PROSSER, 1974; BEITINGER & LUTTERSCHMIDT, 2011). As consequências do aumento na temperatura e os seus efeitos sobre um organismo ectotérmico vão desde o nível molecular, impactando as taxas de reações químicas e a estabilidade de ligações químicas fracas, o que afetará as funções das proteínas e membranas biológicas, até o nível macro, influenciando em padrões comportamentais, tal como a locomoção (SCHULTE, 2011; OJANGUREN & BRANA, 2000).

Assim, já foi estabelecido que a temperatura é o principal fator abiótico que irá influenciar na viabilidade dos peixes no ambiente em que vivem (FRY & HART, 1948; FRY, 1958). Muito embora todos os peixes sejam sensíveis à temperatura, as espécies possuem diferentes respostas comportamentais e fisiológicas a essa variável. As espécies que conseguem sobreviver em um amplo espectro térmico são chamadas de “euritérmicas”, enquanto as espécies que apenas conseguem sobreviver em um intervalo térmico restrito são chamadas “estenotérmicas” (SCHULTE, 2011).

Os primeiros protocolos experimentais a fim de testar a tolerância térmica em diferentes espécies datam de aproximadamente 70 anos. Em 1942 Fry e

colaboradores desenvolveram o protocolo intitulado “temperatura letal incipiente” (ILT). Esse protocolo consiste basicamente em, após um período de aclimação a uma dada temperatura, transferir grupos de peixes para tanques com temperaturas diferentes e constantes, e observar após um período estabelecido em qual tanque ocorrerá uma taxa de letalidade correspondente a 50% de uma amostra de animais (BEITINGER & LUTTERSCHMIDT, 2011). Tanto a temperatura mínima (ILLT), quanto a temperatura máxima (IULT) toleradas por uma espécie são dependentes da temperatura de aclimação. Assim, ao calcular ILLT e IULT referentes a um amplo espectro de temperaturas de aclimação é possível construir o polígono da tolerância térmica (Figura 1) (BEITINGER & LUTTERSCHMIDT, 2011).

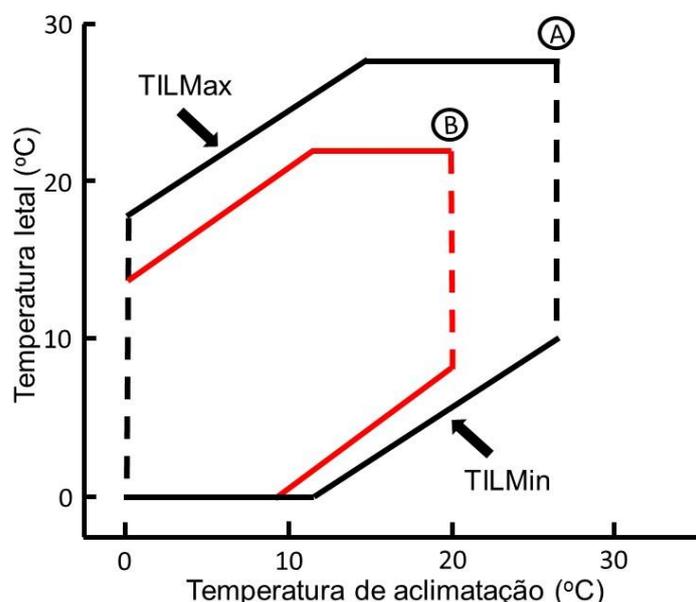


Figura 1: Polígono da tolerância térmica. A temperatura de aclimação irá interferir na temperatura incipiente letal máxima (TILMax - IULT) e na temperatura incipiente letal mínima (TILMin - ILLT). A área do polígono A (preto) representa a tolerância térmica de uma espécie euritérmica, enquanto a área do polígono B (vermelho) representa a tolerância térmica de uma espécie estenotérmica (Adaptada Moyes & Schulte, 2010).

Um segundo protocolo utilizado em testes de tolerância térmica é o intitulado “temperatura crítica” (CT), e assim como o ILT também testa as temperaturas máximas e mínimas toleradas por uma dada espécie, CT_{max} e CT_{min} respectivamente. Esse foi desenvolvido em 1944 por Cowles e Bogert e as diferenças entre ambos residem no fato do CT ser um protocolo subletal e

dinâmico, ou seja, partindo de uma temperatura inicial de aclimação, os animais serão expostos, em um intervalo de tempo estabelecido, a um aumento progressivo na temperatura da água até se chegar a um “endpoint” (LUTTERSCHMIDT & HUTCHISON, 1997) (Figura 2). Usualmente dois padrões comportamentais são utilizados como “endpoint” durante o protocolo CT: a perda de equilíbrio dorsoventral (LOE) e o aparecimento de espasmos musculares (TERBLANCHE et al., 2007; LUTTERSCHMIDT & HUTCHISON, 1997). Considerando que a habilidade de um indivíduo em se manter ativo em condições extremas é um bom indicativo de aptidão ao ambiente em que vive (LOESCHKE & HOFFMANN, 2007), o protocolo CT é considerado ecologicamente mais relevante por prover uma indicação de qual temperatura o indivíduo perde a capacidade em escapar de uma dada condição que o levará à morte (TERBLANCHE et al., 2007; LUTTERSCHMIDT & HUTCHISON, 1997). Há, porém, sérias limitações com esse protocolo, uma vez que o mecanismo por trás da perda de equilíbrio é desconhecido (LUTTERSCHMIDT & HUTCHISON, 1997; ANTTILA et al., 2013, 2014; WANG et al., 2014).

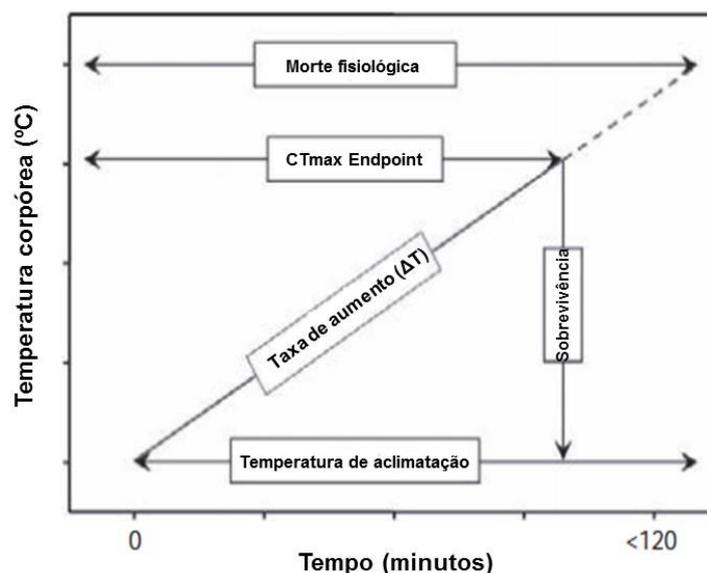


Figura 2: Ilustração esquemática do protocolo CT_{max} . Partindo de uma temperatura de aclimação, promove-se aumentos a uma taxa constante até o animal perder a capacidade em manter o equilíbrio dorsoventral - CT_{max} Endpoint. (Adaptada de Beitinger & Lutterschmidt, 2011).

Ambos os protocolos acima citados permitem acessar a sensibilidade térmica de uma espécie e essa pode ser expressa por meio de uma “curva de

desempenho térmico” (TPC – thermal performance curve). Usualmente a TPC é utilizada para descrever o desempenho de alguma característica importante na aptidão do animal, por exemplo, natação e crescimento, e a resposta da mesma mediante a exposição a um espectro de diferentes temperaturas que compreendem a faixa de tolerância da espécie estudada (SCHULTE, 2011). A TPC nos fornece importantes informações, tais como: a temperatura ótima de desempenho ($T_{\text{ótima}}$), a amplitude térmica e as temperaturas máxima e mínima toleradas para sobrevivência a curta exposição, $T_{\text{máxima}}$ e $T_{\text{mínima}}$ respectivamente (Figura 3) (SCHULTE, 2011).

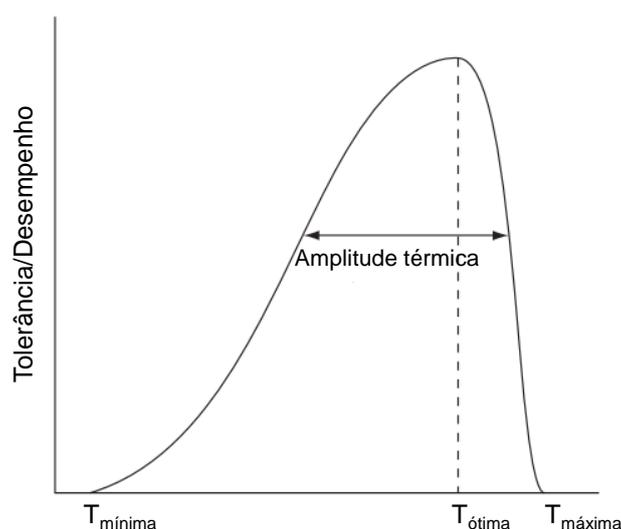


Figura 3: Curva de Tolerância/Desempenho térmico (Adaptada de Schulte, 2011).

A hipótese da Tolerância Térmica Limitada pela Capacidade de Oxigênio (OCLTT) foi proposta como um mecanismo geral pelo qual os danos fisiológicos ocorrem quando ectotérmicos são aquecidos (PÖRTNER, 2010). Assim, o aquecimento faz com que a taxa de metabolismo aeróbico aumente, bem como a demanda por O_2 , que só será atingida por meio de aumentos nas atividades dos sistemas respiratório e cardiovascular. Desta forma, o fator que definirá o limiar de temperatura na qual o peixe começará a sofrer prejuízos na capacidade de atuar em seu ambiente, até eventualmente morrer, será a efetividade do sistema cardiorrespiratório em prover o O_2 aos diversos tecidos (FARRELL, 2008; PÖRTNER, 2010; ELIASON et al., 2011; SCHULTE, 2015). Acredita-se que os limiares de temperatura sejam espécie-específicos e dependentes da

ecologia e história evolutiva das espécies, mas o mecanismo de ação é proposto como sendo universal (FRY, 1947, 1971; PÖRTNER, 2010; FARRELL, 2016).

1.2 Hipóxia

O O_2 dissolvido na água é essencial para a manutenção da vida dos peixes e invertebrados aquáticos que o utilizam para a respiração aeróbica (DIAZ & BREITBURG, 2009). Quando há um desequilíbrio entre a disponibilidade e o consumo, os níveis de oxigênio dissolvido (OD) podem atingir valores abaixo do mínimo necessário para a maioria dos animais, e a essa condição ambiental estressante damos o nome de hipóxia (DIAZ & BREITBURG, 2009). Além das baixas taxas de solubilidade e difusão do O_2 na água, citadas anteriormente, podemos afirmar que as situações de hipóxia são favorecidas pela ação em conjunto com outros dois eventos, sendo eles: a estratificação do O_2 na coluna d'água e a decomposição de matéria orgânica, a qual tem sido amplificada pela influência antrópica nos ambientes aquáticos e pode levar a uma pronunciada depleção da concentração de O_2 em tais ambientes (DIAZ & BREITBURG, 2009; COSTA & BARLETTA, 2016).

A hipóxia tem como característica limitar a capacidade dos animais em obter o O_2 para realizarem os processos mínimos para a manutenção da vida, bem como para as atividades aeróbicas essenciais, tais quais, locomoção (fuga de predadores, forrageio, interação social e migração), digestão, crescimento somático e gonadal (FRY, 1971; CLAIREAUX & CHABOT, 2016). Os peixes apresentam diversas estratégias para otimizar a captação de O_2 do meio aquático ou até mesmo evitar exposições a situações de hipóxia, havendo respostas estruturais, funcionais e comportamentais (DIAZ & BREITBURG, 2009; CHAPMAN & MCKENZIE, 2009). Dentre as respostas comportamentais, pode-se destacar três principais: 1-) respiração aquática de superfície (RAS), evento no qual os animais emergem até a superfície e respiram na fina camada de água em contato com o ar; 2-) migração para uma região que não esteja em hipóxia e 3-) diminuição da atividade a fim de diminuir o consumo de O_2 (CHAPMAN & MCKENZIE, 2009; URBINA et al., 2011; DOMENICI et al., 2012).

As respostas fisiológicas, por exemplo, alteração na taxa de ventilação, modulação da atividade cardíaca e mudanças na afinidade hemoglobina - O_2 ,

têm por finalidade primária a manutenção da captação de O_2 do ambiente aquático a fim de manter a produção de ATP por vias aeróbicas (RICHARDS, 2009; ROGERS et al., 2016). Esses ajustes permitem, à grande maioria dos peixes, manter estável o consumo de O_2 mesmo em face a variações ambientais na PO_2 , uma característica conhecida como “oxirregulação” (PERRY et al., 2009). Contudo, quando a PO_2 reduz a um limiar no qual o peixe não consegue manter constante o consumo de O_2 , observamos uma redução linear no mesmo, em paralelo a decréscimos na PO_2 , uma resposta conhecida como “oxiconformação” (CLAIREAUX & CHABOT, 2016). Esse limiar de PO_2 onde o animal passa a se comportar como um organismo oxiconformista, é usualmente intitulado de “ PO_2 crítico” (P_{crit}) (Figura 4), podendo ser intitulado de S_{crit} quando o teor de O_2 no ambiente é medido como % de saturação. Por ser um parâmetro que elucida a capacidade de extração de O_2 , a qual varia entre as espécies e populações, tem sido amplamente utilizado para descrever a tolerância à hipóxia em peixes (ULTSCH et al., 1978; CHAPMAN et al., 2002; CHAPMAN & MCKENZIE, 2009; ROGERS et al., 2016).

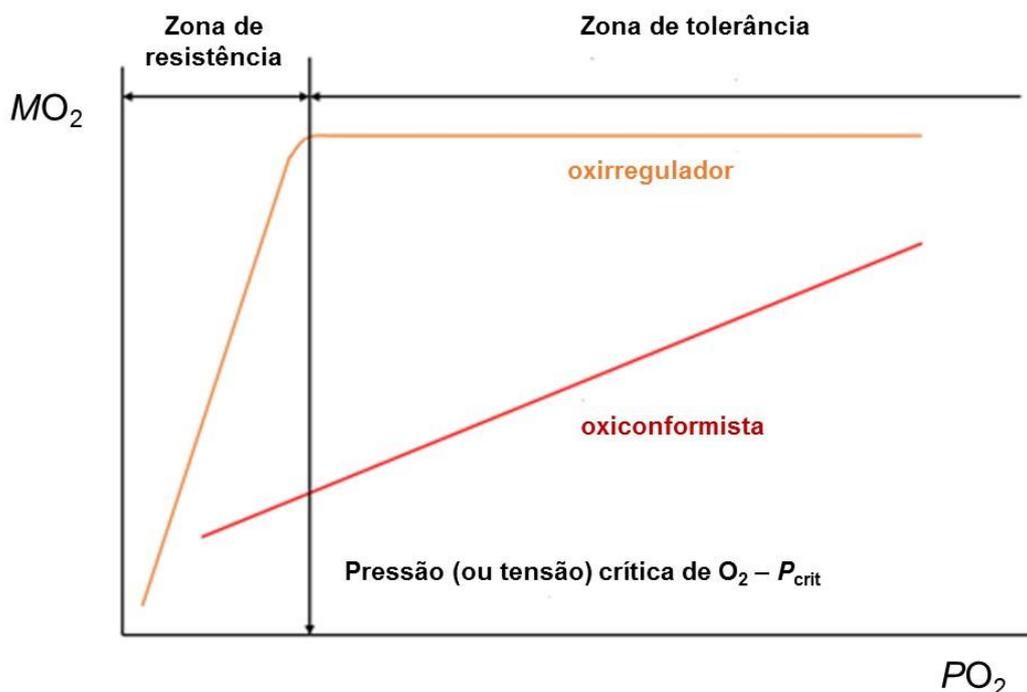


Figura 4: Relação hipotética entre a taxa de consumo de O_2 (MO_2) e a concentração de O_2 ambiental (PO_2). A linha laranja representa o comportamento apresentado por um animal oxirregulador e a linha vermelha representa o comportamento apresentado por um animal oxiconformista. A seta preta indica o P_{crit} , ou seja, a PO_2 na qual o animal não consegue mais sustentar a sua MO_2 (baseada em Ultsch & Regan, 2019 e cedida por F.T. RANTIN).

Uma vez atingido esse limiar, a sobrevivência dos animais em tal ambiente passa a ser dependente de dois fatores: 1) capacidade de reduzir a sua necessidade energética por meio de uma controlada redução da taxa metabólica e 2) habilidade em produzir ATP por vias independentes de O_2 (RICHARDS, 2009). É estimado que em condições de normóxia cerca de 95% do O_2 respirado pelo peixe seja utilizado como aceptor final de elétrons na cadeia transportadora mitocondrial para a produção de ATP (RICHARDS, 2009). Considerando que essa molécula é de suma importância para a ocorrência de reações essenciais à homeostase celular, por exemplo, manutenção do bombeamento de íons pelas membranas celulares e que a interrupção desse evento pode levar a mecanismos de apoptose celular, fica explícita a necessidade do organismo em prover vias alternativas na produção de ATP quando a P_{O_2} leva a um quadro de hipoxemia (LIPTON, 1999; NILSSON & ÖSTLUND-NILSSON, 2008). A principal e mais duradoura via alternativa na produção de ATP é por meio da utilização das reservas de glicogênio (HOCHACHKA & SOMERO, 2002). As características negativas dessa via, além da reduzida produção de ATP, são a depleção dos estoques de glicogênio e a produção de lactato como subproduto do metabolismo anaeróbico, fato que pode levar a um quadro de acidose, uma alteração fisiológica que também está associada à mortalidade dos peixes quando expostos à hipóxia (NILSSON & ÖSTLUND-NILSSON, 2008). Tais características estão relacionadas à massa dos peixes, sendo que quanto maior o tamanho, menor será o seu gasto energético por kg de massa corpórea e, conseqüentemente, menor será a produção de lactato. Em contrapartida, quanto maior o tamanho, maior será o seu estoque de glicogênio, o que permitirá uma eficiente produção de ATP. Dessa forma, ambas características podem configurar uma relação diretamente proporcional entre massa corpórea e resistência à hipóxia (NILSSON & ÖSTLUND-NILSSON, 2004).

1.3 Fenótipo Metabólico

Podemos definir metabolismo como o montante de energia consumida, manipulada e estocada por um organismo (NELSON, 2011; NELSON, 2016). Parte da energia contida nas macromoléculas e obtida por meio da dieta é utilizada para a manutenção de processos essenciais à vida, como, por exemplo,

o bombeamento de íons/moléculas contra o gradiente de concentração, o transporte de compostos polares através da membrana apolar e a manutenção do funcionamento de órgãos vitais (NELSON, 2011; NELSON & CHABOT, 2011). O excedente energético, quando presente, pode ser alocado para outros fins, tais quais crescimento e reprodução, características que podem otimizar o sucesso evolutivo e também alocada para a locomoção – forrageio, migração etc. (NELSON, 2011).

Por conta da ineficiência termodinâmica na utilização de energia pelos organismos vivos, onde estima-se que aproximadamente dois terços da energia contida nos reagentes é perdida na forma de calor, e da inviabilidade em se medir *in vivo* a ciclagem de ATP, a principal metodologia utilizada a fim de acessar a atividade metabólica é a calorimetria direta, ou seja, quantificar o calor liberado por um organismo e assim inferir a sua taxa metabólica (NELSON & CHABOT, 2011). Porém, devido ao alto calor específico da água e à relativa baixa atividade metabólica dos peixes, essa metodologia não é capaz de fazer medições precisas sobre a atividade metabólica desses animais, sendo a calorimetria indireta o principal protocolo utilizado a fim de quantificar tal parâmetro (NELSON & CHABOT, 2011). A calorimetria indireta baseia-se no fato de que na via aeróbica de síntese de ATP há o consumo e produção de alguns compostos passíveis de serem calculados, por exemplo o oxigênio (O_2) e o gás carbônico (CO_2), respectivamente (NELSON & CHABOT, 2011). Por praticidade metodológica, adotou-se a taxa de consumo de O_2 ($\dot{M}O_2$) como protocolo para acessar a taxa metabólica em peixes, muitas vezes desconsiderando qual substrato que está sendo oxidado (proteína, gordura ou carboidrato) e qualquer participação do metabolismo anaeróbico e sua contribuição energética, sendo, dessa forma, uma medição aproximada da verdadeira taxa metabólica (NELSON & CHABOT, 2011).

Define-se como taxa metabólica padrão (TMP), apresentada nos artigos subsequentes como SMR devido à sua denominação em inglês (*standard metabolic rate*), o gasto energético calculado em indivíduos em condições de repouso, pós digestão, aclimatados à temperatura experimental, isolados de qualquer estímulo externo e durante a parte do dia na qual o ciclo circadiano corresponde à menor $\dot{M}O_2$ (BRETT, 1962; NELSON & CHABOT, 2011). Dentre

os fatores que contribuem para diferenças individuais na TMP, pode-se destacar a massa corpórea como um fator de grande relevância (NELSON & CHABOT, 2011). Há uma relação inversamente proporcional entre a taxa metabólica de um animal e a sua massa corpórea, onde, quanto maior o peso do animal, menor será o seu consumo de energia por kg de massa, consequentemente apresentando uma menor taxa metabólica quando comparados a animais menores (NELSON & CHABOT, 2011). Mesmo após efetuada a correção para a massa corpórea, ainda é encontrada uma variação inter e intraespecífica na TMP. As variações interespecíficas podem estar associadas aos diferentes estilos de vida dos animais (pelágico x bêntico), sendo que, quanto mais ativa a espécie, maior será a densidade mitocondrial no tecido muscular e maior será a superfície de área branquial, característica essa, que ocasiona um maior gasto energético na regulação do equilíbrio iônico e osmótico (KILLEN et al., 2010; NELSON & CHABOT, 2011; KILLEN et al., 2016). Em relação às variações intraespecíficas na TMP, alguns experimentos testaram a influência do tamanho de órgãos metabolicamente muito ativos (fígado, coração e cérebro) e a relação dos mesmos com a taxa metabólica do indivíduo. Em experimentos com *Anguilla anguilla*, BOLDSSEN et al (2013) encontraram uma relação entre tamanho do fígado e TMP, em contrapartida o mesmo padrão não foi encontrado em experimentos com *Salmo trutta* (NORIN & MALTE, 2012). Nessa última espécie, a variação na TMP entre os indivíduos se mostrou positivamente correlacionada com a atividade de duas enzimas ligadas ao funcionamento aeróbico mitocondrial: citocromo C oxidase e citrato sintase (NORIN & MALTE, 2012).

Outra variável importante quanto ao fenótipo metabólico de um indivíduo é a sua taxa metabólica ativa (TMA), apresentada nos artigos subsequentes como AMR devido à sua denominação em inglês (*active metabolic rate*). A TMA representa a taxa máxima de respiração aeróbica de um indivíduo aclimatado a uma determinada temperatura, sendo assim, associada à habilidade máxima do mesmo em extrair O₂ do ambiente e transporta-lo até os tecidos em intensa atividade (NORIN & CLARK, 2016). Dois protocolos experimentais são comumente utilizados a fim de se atingir a taxa máxima de consumo de O₂ $\dot{M}O_2$ _{max} de um indivíduo. O primeiro consiste na utilização de um respirômetro de natação, onde o peixe é forçado a nadar contra um intenso fluxo de água até

fadigar (BRETT, 1964; BEAMISH, 1979; FARREL, 2007). Pode-se medir a $\dot{M}O_2$ durante o protocolo ou imediatamente após a fadiga (NORIN & CLARK, 2016). O segundo protocolo consiste em realizar distúrbios manuais no peixe até que o mesmo se torne não responsivo a esses estímulos e, em seguida, transferi-lo para um respirômetro estático, onde será medida a sua $\dot{M}O_{2\max}$ (REIDY et al., 1995; ROCHE et al., 2013). Assim como a TMP, a TMA também está sob modulação de diversos fatores, destacando-se a influência do tamanho corpóreo, da temperatura ambiental, que irá afetar a temperatura corpórea na maioria das espécies de peixes, e da disponibilidade de O_2 no ambiente (NORIN & CLARK, 2016). Uma vez tendo-se calculado a TMP e a TMA de um indivíduo a uma determinada temperatura, é possível inferir a terceira variável do fenótipo metabólico. Chamado de aumento metabólico aeróbico (AA), apresentado nos artigos subsequentes como AS devido à sua denominação em inglês (*aerobic scope*), ele é calculado pela subtração da TMA a partir da TMP e é utilizado como uma medida da capacidade aeróbica de um indivíduo aclimatado a uma determinada temperatura (CHABOT et al., 2016).

Há evidências de uma possível correlação entre as três variáveis do fenótipo metabólico, mas não há um padrão na direção dessa correlação entre as diferentes espécies. Enquanto experimentos com *Ctenopharyngodon idella* e *S. trutta* encontraram correlações positivas entre a TMP e a TMA (ZHANG et al., 2014; NORIN & MALTE, 2012), a TMP e o AA foram negativamente correlacionados em *Phoxinus phoxinus* e juvenis de *Salmo salar* (KILLEN et al., 2014; CUTTS et al., 2002).

Além da realização de estudos a fim de elucidar uma possível correlação entre as variáveis do fenótipo metabólico, também se tem estudado como as variações individuais podem estar associadas a uma maior resistência ou susceptibilidade a diferentes estressores ambientais. Uma vez que os estressores ambientais agem sobre cada indivíduo em uma população, a variabilidade na tolerância de todos os indivíduos é que será determinante para compreendermos o potencial de sobrevivência da população, de espécies, da comunidade e do ecossistema (LE QUESNE & PINNEGAR, 2012; CHAVE, 2013; COOKE et al., 2014; HEFFERNAN et al., 2014). Se as medidas do fenótipo metabólico são feitas em um único momento, pode-se elucubrar que as

variações individuais observadas são devido a algum erro metodológico ou flutuações temporais no metabolismo; por essa razão, é importante repetir as análises (METCALFE et al., 2016).

Experimentos com *S. salar* e *Salvelinus alpinus* evidenciaram que medidas da TMP de um mesmo indivíduo em intervalos de tempo diferentes são significativamente correlacionadas, evidenciando que a variação individual é consistente e repetida ao longo do tempo (MCCARTHY, 2000; O'CONNOR et al., 2000; CUTTS et al., 2001). Embora haja essa repetibilidade, foi observado que quão mais distantes temporalmente são as medidas, menor é a correlação entre os valores da TMP de um dado indivíduo (NORIN & MALTE, 2011). O mesmo padrão (repetibilidade e dependência temporal) também foi reportado para a TMA e AS (NORIN & MALTE, 2011).

Assim, a compreensão dos possíveis impactos das mudanças climáticas nas populações naturais de peixes pode ser melhor estabelecida mediante um foco específico na variação individual do fenótipo metabólico e uma possível correlação dessas variações com a tolerância a agentes estressores, como o aquecimento e a hipóxia (ROZE et al., 2013; NORIN et al., 2015; OZOLINA et al., 2015; METCALFE et al., 2016). Por exemplo, em experimentos com *Lates calcarifer*, NORIN et al (2015) encontraram que indivíduos com menores valores de TMM e AA eram mais resistentes à hipóxia do que aqueles com maiores valores, evidenciando que indivíduos com maior capacidade aeróbica eram mais suscetíveis a situações de decréscimo de O₂ ambiental. Enquanto OZOLINA et al (2015) encontraram que, em indivíduos de *Dicentrarchus labrax*, aqueles que apresentavam menores valores de TMP eram mais resistentes à temperatura e não encontraram correlações entre variações individuais na TMA e AA e resistência ao estresse térmico.

1.4 Espécie estudada 1: O pacu, *Piaractus mesopotamicus*

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), é um peixe *Characiformes* da família *Serrasalminidae*, largamente distribuído em território brasileiro, sendo originalmente encontrado na Bacia do Prata e no Pantanal do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (BORGHETTI & CANZI, 1993; MATEUS et al., 2004; PEIXER & PRETERE JR, 2007). No estado de São Paulo a espécie é

encontrada no rio Paranapanema e nos rios Paraná, Mogi-Guaçu, Paraíba e baixo Tietê (SOUZA et al., 2003; JOMORI et al., 2005). Apresenta hábito alimentar onívoro, alimentando-se desde frutos, detritos orgânicos até crustáceos, moluscos e pequenos peixes. Nos últimos anos observou-se um aumento na sua criação comercial devido à saborosa carne, o baixo custo de manutenção, a boa resistência a patógenos, a baixa exigência quanto à qualidade da água e alta adaptabilidade ao cultivo em tanques e viveiros, além de ser uma espécie apreciada na pesca esportiva (ABIMORAD & CARNEIRO, 2004; JOMORI et al., 2008).

A ictiofauna dos ambientes tropicais geralmente apresenta adaptações que permitem a sobrevivência em habitats que frequentemente estão sujeitos a variações sazonais e diárias de O_2 e temperatura (SAINT PAUL & BERNARDINO, 1988). Exemplares de pacu são encontrados em um espectro de temperatura de 15 a 35°C, com intervalo ótimo para a cultura de 20 a 28°C (SAINT PAUL & BERNARDINO, 1988). Adicionalmente, a espécie estudada apresenta um comportamento típico em situações onde a demanda de O_2 se torna insuficiente, a respiração aquática de superfície (RAS) por meio de edemas dérmicos na maxila (KRAMER & MCCLURE, 1982; SAINT PAUL & BERNARDINO, 1988). Em um estudo visando compreender os efeitos da ASR na função cardiorrespiratória em situações de hipóxia progressiva, RANTIN et al. (1998) encontraram que a S_{crit} para a espécie foi de 20% de saturação de O_2 , valor considerado alto uma vez que é usualmente encontrado em espécies que habitam ambientes bem oxigenados. Outra resposta encontrada foi que a RAS só passou a ser exercida de forma efetiva em valores abaixo da S_{crit} (RANTIN et al., 1998).

1.5 Espécie estudada 2: A tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758), é um peixe *Perciformes* pertencente à família *Cichlidae*, espécie oriunda do continente africano e introduzida no Brasil na década de 1950, apresentando uma ampla distribuição por todo território nacional (FITZSIMMONS, 2000). Possui hábito alimentar onívoro, rápido crescimento, resistência ao manejo e a doenças e alta tolerância a variação nos parâmetros abióticos ambientais, um dos fatores

responsáveis por sua larga distribuição ao redor do mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais (PHILIPPART & RUWET, 1982). Por conta dessa característica é considerada, por vezes, um problema em reservatórios brasileiros e o controle das populações desta espécie já foi sugerido (STARLING et al., 2002; LAZZARO et al., 2003).

O. niloticus é consideravelmente tolerante a altas temperaturas e a baixos níveis de O₂ dissolvido na água (FERNANDES & RANTIN, 1989). A S_{crit} encontrada para a espécie varia de acordo com a temperatura à qual está exposta. Por exemplo, a 25°C foi encontrado uma S_{crit} em torno de 13% de saturação de O₂, um valor baixo, evidenciando a capacidade em habitar ambientes tropicais, normalmente submetidos a hipóxia (FERNANDES & RANTIN, 1987). O gradiente de temperatura na qual a espécie apresenta desenvolvimento, crescimento e taxa de reprodução ideais é de 20 a 35°C, com um ótimo entre 25 e 30°C (BALARIN & HALLER, 1982).

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIMORAD, E.G; CARNEIRO, D.J. Métodos de coleta de fezes e determinação dos coeficientes de digestibilidade da fração protéica e da energia de alimentos para o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 5, p. 1101-1109, 2004.

ANTTILA, K. et al. 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**, v. 216, n. 7, p. 1183–1190, 2013.

BALARIN, J. D; HALLER, R.D. The intensive culture of tilapia in tanks, raceways and cages. **Recent advances in aquaculture**. p. 266-355, 1982.

BEAMISH, F. W. H. Swimming capacity. In HOAR, W. S. & RANDALL, D. J. (Eds) **Fish Physiology**, Vol. 7, New York, NY: Academic Press, Inc, p. 101–187, 1979.

BEITINGER, T.L; LUTTERSCHMIDT, W.L. Measures of Thermal tolerance. In FARRELL, A. P. et al. (Eds.). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. London ; Waltham, MA: Academic Press, an imprint of Elsevier, v.3, p.1695-1702, 2011.

- BOLDSEN, M. M.; NORIN, T.; MALTE, H. Temporal repeatability of metabolic rate and the effect of organ mass and enzyme activity on metabolism in European eel (*Anguilla anguilla*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 165, n. 1, p. 22–29, 2013.
- BORGHETTI, J. R.; CANZI, C. The effect of water temperature and feeding rate on the growth rate of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) raised in cages. **Aquaculture**, v. 114, n. 1, p. 93-101, 1993.
- BRETT, J. R. Some considerations in the study of respiratory metabolism in fish, particularly salmon. **Journal of the Fisheries Board of Canada**, v.19, p. 1025-1038, 1962.
- BRETT, J. R. The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 21, n. 5, p. 1183–1226, 1964.
- BUCKLEY, L. B.; HUEY, R. B. Temperature extremes: geographic patterns, recent changes, and implications for organismal vulnerabilities. **Global Change Biology**, p. n/a-n/a, 2016.
- CHABOT, D.; MCKENZIE, D. J.; CRAIG, J. F. Metabolic rate in fishes: definitions, methods and significance for conservation physiology: editorial. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 1–9, 2016.
- CHAPMAN, L. J. et al. Physiological refugia: swamps, hypoxia tolerance and maintenance of fish diversity in the Lake Victoria region. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 3, p. 421–437, 2002.
- CHAPMAN, L. J.; MCKENZIE, D. J. Behavioral Responses and Ecological Consequences. In: RICHARDS, J. G.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). **Fish Physiology. Hypoxia**. [s.l.] Academic Press, 2009. v. 27. Cap.2. p. 25–77, 2009.
- CHAVE, J. The problem of pattern and scale in ecology: What have we learned in 20 years? **Ecology Letters**, v. 16, n. SUPPL.1, p. 4–16, 2013.
- CLAIREAUX, G.; CHABOT, D. Responses by fishes to environmental hypoxia: Integration through Fry's concept of aerobic metabolic scope. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 232–251, 2016.
- COOKE, S. J. et al. Conservation Physiology Across Scales : Insights from the marine realm. **Conservation Physiology**, v. 2, n.1, 2014.

- COSTA, M. F.; BARLETTA, M. Special challenges in the conservation of fishes and aquatic environments of South America. **Journal of Fish Biology**, p. 4–11, 2016.
- COWLES, R.B., BOGERT, C.M. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. **Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.** v. 83, p. 265–296, 1944.
- CUTTS, C. J.; ADAMS, C. E.; CAMPBELL, A. Stability of physiological and behavioural determinants of performance in Arctic char (*Salvelinus alpinus*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.58, p.961-968, 2001.
- CUTTS, C. J.; METCALFE, N. B.; TAYLOR, A. C. Juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) with relatively high standard metabolic rates have small metabolic scopes. **Functional Ecology**, v. 16, n. 1, p. 73–78, 2002.
- DEJOURS, P. **Principles of Comparative Respiratory Physiology**, Amsterdam: Elsevier/North-Holland, 2 ed., p.265, 1981.
- DIAZ, R. J.; BREITBURG, D. L. The Hypoxic Environment. In: RICHARDS, J. G.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). **Hypoxia, Fish Physiology** Volume 27. Fish Physiology. [s.l.] Elsevier, v. 27p. 1–23, 2009.
- DOMENICI, P. et al. The Effect of Hypoxia on Fish Swimming Performance and Behaviour. In: PALSTRA, A. P.; PLANAS, J. V. (Eds.). **Swimming Physiology of Fish: Towards Using Exercise to Farm a Fit Fish in Sustainable Aquaculture**. Berlin, Heidelberg: Springer, p. 129–159, 2012.
- ELIASON, E. J. et al. Differences in thermal tolerance among sockeye salmon populations. **Science** (New York, N.Y.), v. 332, n. 6025, p. 109–12, 1 abr. 2011.
- FARRELL, A. P. Cardiorespiratory performance during prolonged swimming tests with salmonids: a perspective on temperature effects and potential analytical pitfalls. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 362, n. 1487, p. 2017–2030, 29, 2007.
- FARRELL, A. P. Comparisons of swimming performance in rainbow trout using constant acceleration and critical swimming speed tests. **Journal of Fish Biology**, v. 72, n. 3, p. 693–710, 2008.
- FARRELL, A. P. Pragmatic perspective on aerobic scope: Peaking, plummeting, pejus and apportioning. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 322–343, 2016.
- FERNANDES, M.N; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish Biol.**, v. 35, p. 509-519, 1989.

- FERNANDES, M.N; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental reductions of dissolved oxygen. **Biol. Fisiol. Anim.**, v. 35, p. 51-60, 1987.
- FITZSIMMONS, K. Tilapia aquaculture in Mexico. **Tilapia aquaculture in the Americas**, v. 2, p. 171-183, 2000.
- FRY, F. E. J. Temperature Compensation. **Annual Review of Physiology**, v. 20, n. 1, p. 207–224, 1958.
- FRY, F. E. J. The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish Physiology** Volume 6. New York: Academic Press, p. 1–98, 1971.
- FRY, F. E. J. The effects of the environment on animal activity. **Univ. Toronto Stud. Biol. Ser.**, v. 55, p. 1–62, 1947.
- FRY, F. E. J.; HART, J. S. The relation of temperature to oxygen consumption in the goldfish. **The Biological Bulletin**, v. 94, n. 1, p. 66–77, 1948.
- FRY, F.E.J.; BRETT, J.R., CLAWSON, G.H. Lethal limits of temperature for young goldfish. **Rev. Canad. Biol.** v. 1, p. 50–56, 1942.
- HAZEL, J. R.; PROSSER, C. L. Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. **Physiological Reviews**, v. 54, n. 3, p. 620–677, 1974.
- HEFFERNAN, J. B. et al. Macrosystems ecology: Understanding ecological patterns and processes at continental scales. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 12, n. 1, p. 5–14, 2014.
- HOCHACHKA, P.W; SOMERO, G.N. **Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution**. Oxford University Press, New York, 2002.
- IPCC. Climate Change 2014: Synthesis Report. **Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** [Core Writing Team, Pachauri R.K. and Meyer L.A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp, 2014.
- JOBLING M. Temperature and growth modulation of growth rate via temperature change. In WOOD, C.M; MCDONALD, D.G (Eds) **Global warming implications for freshwater and marine fish**, pp. 229–281. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1996.

- JOMORI, R. K. et al. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, v. 243, n. 1, p. 175-183, 2005.
- JOMORI, R.K. et al. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and nitrogen ($\delta^{15}\text{N}$) isotopes as natural indicators of live and dry food in *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) larval tissue. **Aquaculture Research**, v. 39, n. 4, p. 370-381, 2008.
- KILLEN, S. S. et al. Ecological influences and morphological correlates of resting and maximal metabolic rates across teleost fish species. **The American Naturalist**, v. 187, n. 5, p. 592–606, 2016.
- KILLEN, S. S., et al. Aerobic scope predicts dominance during early life in a tropical damselfish. **Functional Ecology** 28, p.1367–1376., 2014.
- KILLEN, S. S.; ATKINSON, D.; GLAZIER, D. S. The intraspecific scaling of metabolic rate with body mass in fishes depends on lifestyle and temperature. **Ecology Letters**, v. 13, n. 2, p. 184–193, 2010.
- KRAMER, D.L; MCCLURE, M. Aquatic surface respiration, a widespread adaptation response to hypoxia in tropical freshwater fishes. **Environ. Biol. Fish**, v. 7; p. 47-55, 1982.
- LAZZARO, X. et al. Do fish regulate phytoplankton in shallow eutrophic Northeast Brazilian reservoirs? **Freshwater Biology**, v. 48, n. 4, p. 649-668, 2003.
- LE QUESNE, W. J. F.; PINNEGAR, J. K. The potential impacts of ocean acidification: scaling from physiology to fisheries. **Fish and Fisheries**, v. 13, n. 3, p. 333–344, 14 set. 2012.
- LIPTON, P. Ischemic Cell Death in Brain Neurons. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 4, p. 1431–1568, 1999.
- LOESCHCKE, V.; HOFFMANN, A. A. Consequences of heat hardening on a field fitness component in *Drosophila* depend on environmental temperature. **Am. Nat.** 169, 175–183, 2007.
- LUTTERSCHMIDT, W. I.; HUTCHISON, V. H. The critical thermal maximum: history and critique. **Canadian Journal of Zoology**, v. 75, n. 10, p. 1561–1574, 1997.
- MATEUS, L. et al. Fishing resources in the rio Cuiabá basin, Pantanal do Mato Grosso, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 2, n. 4, p. 217-227, 2004.

MCCARTHY, I. D. Temporal repeatability of relative standard metabolic rate in juvenile Atlantic salmon and its relation to life history variation. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 1, p. 224–238, 2000.

METCALFE, N. B.; VAN LEEUWEN, T. E.; KILLEN, S. S. Does individual variation in metabolic phenotype predict fish behaviour and performance? **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 298–321, 2016.

MOYES, C.D.; SCHULTE, P.M. **Princípios de Fisiologia Animal**, 2º Edição. Porto Alegre: Editora Artmed. p.756, 2010.

NELSON, J. A. Oxygen consumption rate v. rate of energy utilization of fishes: a comparison and brief history of the two measurements: oxygen consumption and metabolic rate. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 10–25, 2016.

NELSON, J.A. Energetics: An Introduction. In FARRELL, A. P. et al. (Eds.). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. London ; Waltham, MA: Academic Press, an imprint of Elsevier, v.3, p.1563-1566, 2011.

NELSON, J.A; CHABOT, D. General Energy Metabolism. In FARRELL, A. P. et al. (Eds.). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. London ; Waltham, MA: Academic Press, an imprint of Elsevier, v.3, p.1566-1572, 2011.

NILSSON, G. E.; ÖSTLUND-NILSSON, S. Hypoxia in paradise: widespread hypoxia tolerance in coral reef fishes. **Proceedings of the Royal Society Series B (Biology Letters Supplement)** 271, S30–S33, 2004.

NILSSON, G. E.; ÖSTLUND-NILSSON, S. Does size matter for hypoxia tolerance in fish? **Biological Reviews**, v. 83, n. 2, p. 173–189, 2008.

NORIN, T.; CLARK, T. D. Measurement and relevance of maximum metabolic rate in fishes: maximum metabolic rate in fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 122–151, 2016.

NORIN, T.; MALTE, H. Intraspecific variation in aerobic metabolic rate of fish: relations with organ size and enzyme activity in brown trout. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 85, n. 6, p. 645–656, 2012.

NORIN, T.; MALTE, H. Repeatability of standard metabolic rate, active metabolic rate and aerobic scope in young brown trout during a period of moderate food availability. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 10, p. 1668–1675, 2011.

- NORIN, T.; MALTE, H.; CLARK, T. D. Differential plasticity of metabolic rate phenotypes in a tropical fish facing environmental change. **Functional Ecology**, v. 30, n. 3, p. 369–378, 2015.
- O'CONNOR, K. I.; TAYLOR, A. C.; METCALFE, N. B. The stability of standard metabolic rate during a period of food deprivation in juvenile Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 1, p. 41–51, 2000.
- OJANGUREN, A. F.; BRANTA, F. Thermal dependence of swimming endurance in juvenile brown trout. **Journal of Fish Biology**, v. 56, n. 6, p. 1342–1347, 2000.
- OZOLINA, K. et al. Intraspecific individual variation of temperature tolerance associated with oxygen demand in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Conservation Physiology**, v. 4, p. 1–10, 2015.
- PEIXER, J.; PETRERE JR, M. Hook selectivity of the pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) in the Pantanal, the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 2, p. 339-345, 2007.
- PERRY, S.F.; JONZ, M. G; GILMOUR, K.M. Oxygen Sensing and the Hypoxic Ventilatory Response. In: RICHARDS, J. G.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). **Fish Physiology. Hypoxia**. [s.l.] Academic Press, 2009. v. 27. Cap.5. p. 193–253, 2009.
- PHILIPPART, J.C; RUWET, J.C. Ecology and distribution of tilapias. **The biology and culture of tilapias**, v. 7, p. 15-60, 1982.
- PÖRTNER, H. O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. 6, p. 881–93, 2010.
- PÖRTNER, H. O; PECK, M. A. Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. **Journal of Fish Biology**, v. 77, n. 8, p. 1745–1779, 2010.
- RANTIN, F. T. et al. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A**, v. 119, p. 991–997, 1998.
- REIDY, S. P. et al. Post-exercise metabolic rate in Atlantic cod and its dependence upon the method of exhaustion. **Journal of Fish Biology**, v. 47, n. 3, p. 377–386, 1995.

- RICHARDS, J. G. Metabolic and Molecular Responses of Fish to Hypoxia. In: RICHARDS, J. G.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). **Fish Physiology. Hypoxia**. [s.l.] Academic Press, v. 27, cap. 10, p. 443–485, 2009.
- RICKLEFS, R.E.; WIKELSKI, M. The physiology/life-history nexus. **Trends Ecol. Evol.** 17, 462–468, 2002.
- ROCHE, D. G. et al. Finding the best estimates of metabolic rates in a coral reef fish. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 11, p. 2103–2110, 2013.
- ROGERS, N. J. et al. A new analysis of hypoxia tolerance in fishes using a database of critical oxygen level (P_{crit}). **Conservation Physiology**, v. 4, p. 1-19, 2016.
- ROMERO, L.M. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. **Trends Ecol. Evol.**, v.19, p. 249–255, 2004.
- ROZE, T. et al. Trade-off between thermal sensitivity, hypoxia tolerance and growth in fish. **Journal of Thermal Biology**, v. 38, n. 2, p. 98–106, 2013.
- SAINT-PAUL, U.; BERNARDINHO, G. Behavioural and ecomorphological responses of the neotropical pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalminidae) to oxygen-deficient waters. **Experimental Biology**, v. 48, n. 1, p. 19–26, 1988.
- SCHIMIDT-NIELSEN, K. **Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente**, 5 ed. São Paulo: Editora Santos, 611 pp, 2002.
- SCHULTE, P. M. The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 12, p. 1856–1866, 2015
- SCHULTE, P.M. Effects of temperature: An introduction. In FARRELL, A. P. et al. (Eds.). **Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment**. London ; Waltham, MA: Academic Press, an imprint of Elsevier, v.3, p.1688-1694, 2011.
- SOUZA, V.L. et al. Avaliação do crescimento e do custo da alimentação do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) submetido a ciclos alternados de restrição alimentar e realimentação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 19-28, 2003.

STARLING, F. et al. Contribution of omnivorous tilapia to eutrophication of a shallow tropical reservoir: evidence from a fish kill. **Freshwater Biology**, v. 47, n. 12, p. 2443-2452, 2002.

STEVENSON, R.D. et al. Ecophysiology and conservation: the contribution of endocrinology and immunology – introduction to the symposium. **Integr. Comp. Biol.** v.45, p.1–3, 2005.

TERBLANCHE, J. S. et al. Critical thermal limits depend on methodological context. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 274, n. 1628, p. 2935–2943, 2007.

ULTSCH, G. R.; BOSCHUNG, H.; ROSS, M. J. Metabolism, Critical Oxygen Tension, and Habitat Selection in Darters (*Etheostoma*). **Ecology**, v. 59, n. 1, p. 99–107, 1978.

ULTSCH, G. R.; REGAN, M. D. The utility and determination of P_{crit} in fishes. **The Journal of Experimental Biology**, v. 222, n. 22, p. jeb203646, 2019.

URBINA, M. A.; FORSTER, M. E.; GLOVER, C. N. Leap of faith: Voluntary emersion behaviour and physiological adaptations to aerial exposure in a non-aestivating freshwater fish in response to aquatic hypoxia. **Physiology & Behavior**, v. 103, n. 2, p. 240–247, 2011.

WANG, T. et al. Anaemia only causes a small reduction in the upper critical temperature of sea bass: is oxygen delivery the limiting factor for tolerance of acute warming in fishes? **The Journal of Experimental Biology**, v. 217, p. 4275–4278, 2014.

WIKELSKI, M.; COOKE, S. J. Conservation physiology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 21, n. 1, p. 38–46, 2006.

ZHANG, Y. et al. Intraspecific mass scaling of metabolic rates in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Journal of Comparative Physiology B**, v. 184, n. 3, p. 347–354, 2014.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo investigar a variação individual na tolerância à temperatura e hipóxia e como tal característica está relacionado à fisiologia cardiorrespiratória intrínseca do indivíduo.

2.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um protocolo experimental para testar a tolerância ao aquecimento agudo cujo limiar subletal seja mais preciso e os mecanismos fisiológicos relacionados à tolerância sejam passíveis de serem elucidados;

- Avaliar a correlação entre fenótipo metabólico e a tolerância ao aquecimento agudo e à hipóxia, e a presença de tolerância cruzada entre ambos estressores;

- Compreender como a tolerância individual ao aquecimento agudo é influenciada pelo tamanho corpóreo.

3 RESULTADOS

3.1 Artigo 1

O uso do exercício aeróbico para avaliar a tolerância subletal ao aquecimento agudo em peixes.

(Artigo publicado no *Journal of Experimental Biology* (2020) 223, jeb218602. doi:10.1242/jeb.218602).

Resumo

Foi investigado se a fadiga apresentada durante a natação aeróbica sustentada pode ser utilizada como um limiar subletal em testes que visam definir a tolerância ao aquecimento agudo em peixes. Tal metodologia visa ser uma alternativa ao protocolo vigente, “temperatura crítica máxima” (CT_{max}), que utiliza a perda de equilíbrio (LOE) como um limiar subletal. No presente estudo, os testes de tolerância ao aquecimento agudo foram realizados em duas espécies, tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Anterior aos testes de tolerância, cada peixe foi submetido a um teste de desempenho de natação para determinar a velocidade em que adotavam um perfil anaeróbico de natação (U_{GT}), bem como a velocidade em que fadigaram (U_{MAX}). Após um período adequado de recuperação, cada peixe foi submetido a um teste de natação cuja velocidade correspondia a 85% da sua própria U_{GT} e aquecido em 1°C a cada 30 min, até fadigarem. Tal protocolo foi intitulado de CT_{swim} . Os peixes também foram submetidos ao teste CT_{max} padrão, o qual consistiu em taxas de aquecimento idênticas à do CT_{swim} , sob condições estáticas e utilizando a LOE como limiar subletal de tolerância. Todos os indivíduos fadigaram no CT_{swim} a uma temperatura média aproximadamente 2°C inferior à sua CT_{max} . Dessa forma, pode-se inferir que, se expostos a um aquecimento agudo na natureza, a habilidade em realizar alguma atividade aeróbica será afetada em temperaturas significativamente abaixo daquelas que ameaçam diretamente a sobrevivência. O colapso no desempenho natatório durante o CT_{swim} foi precedido por uma transição no perfil natatório, adotando-se uma natação anaeróbica indistinguível da observada durante o teste de desempenho de natação. Isso sugere que a fadiga no CT_{swim} está associada a uma incapacidade do animal em atender às altas demandas teciduais por oxigênio promovidas pelo exercício aeróbico e o aquecimento. Esses resultados são consistentes com a hipótese da tolerância térmica limitada pela capacidade de oxigênio (OCLTT), em relação ao mecanismo ligado à tolerância ao aquecimento em peixes. No geral, a fadiga em CT_{swim} fornece um limiar subletal ecologicamente relevante e mais sensível a eventos extremos do que LOE em CT_{max} .

Palavras-chave: CT_{max} , *Oreochromis niloticus*, *Piaractus mesopotamicus*

Introdução

A influência antrópica alterando a qualidade dos ambientes aquáticos se faz cada vez mais presente, especialmente as alterações relacionadas ao aquecimento global. Projeções indicam a possibilidade de um aumento gradual nas temperaturas sazonais de até 4°C até 2100, o que poderá acarretar uma maior frequência de exposição a aquecimentos extremos e agudos em escalas localizadas (Frölicher and Laufkötter, 2018; IPCC, 2014, 2019). Isso desafiará os animais, particularmente os ectotérmicos, como os peixes, cuja fisiologia é profundamente influenciada pela temperatura, com consequências em características importantes na aptidão, tais quais sobrevivência, crescimento e reprodução (Perry et al., 2005; Pörtner and Knust, 2007; Smale et al., 2019). Portanto, é essencial compreender a capacidade dos peixes na tolerância ao aquecimento.

Uma metodologia muito utilizada para avaliar os limites térmicos superiores em peixes é o protocolo “temperatura crítica máxima” (CT_{max}) (Lutterschmidt and Hutchison, 1997). Basicamente esse protocolo consiste em aquecer o peixe progressivamente, por meio de taxas fixas no aumento da temperatura na água, até que o animal apresente uma perda na capacidade em manter o equilíbrio dorsoventral (LOE). Tal comportamento é adotado como base para identificar o limiar máximo de tolerância térmica. Embora o CT_{max} não cause mortalidade, a LOE pode ser entendida como um limiar letal incipiente uma vez que, na natureza, o animal seria incapaz de escapar das condições térmicas desfavoráveis e conseqüentemente sua sobrevivência estaria ameaçada (Lutterschmidt and Hutchison, 1997). Além disso, as causas que levam à LOE em peixes durante o CT_{max} ainda não são completamente compreendidas (Ern et al., 2016, 2017; Jutfelt et al., 2019; Wang et al., 2014). É essencial entender os mecanismos fisiológicos que fundamentam a tolerância ao aquecimento, uma vez que isso possibilitará melhorias na capacidade de modelagem e projeção dos efeitos do aquecimento global em populações e comunidades de peixes (Jørgensen et al., 2012; McKenzie et al., 2016).

As hipóteses dominantes para o mecanismo fisiológico relacionado à tolerância ao aquecimento em peixes são o paradigma de Fry (Fry, 1947, 1957, 1971) e sua derivação, a hipótese da tolerância térmica limitada pela capacidade

de oxigênio (OCLTT) (Pörtner, 2010; Pörtner et al., 2017). O conceito central em ambas é que a tolerância térmica é limitada pela capacidade do sistema cardiorrespiratório em atender às demandas de oxigênio (O_2) dos tecidos (Fry, 1971; Pörtner, 2010; Pörtner and Farrell, 2008). Ou seja, quando os peixes são aquecidos, o seu metabolismo padrão é progressivamente aumentado até que, a uma certa temperatura, as demandas de O_2 para a simples manutenção de atividades vitais recrutem toda a capacidade cardiorrespiratória para o fornecimento desse gás. Nessa temperatura, o aumento aeróbico (AS) para as atividades vitais além da manutenção (por exemplo, natação, crescimento e reprodução) é zero. Dessa forma, ao exceder esse limiar, rapidamente ocorrerá o colapso fisiológico geral (Eliason et al., 2011; Pörtner, 2010; Pörtner and Farrell, 2008; Schulte, 2015). Imagina-se que esses limiares de temperatura sejam espécie-específicos e também dependentes da ecologia e história evolutiva das espécies. Em contrapartida, o mecanismo fisiológico por trás da OCLTT é compreendido como universal (Fry, 1971; Pörtner, 2010), embora este seja atualmente tema de debate (Farrell, 2016; Jutfelt et al., 2018; Lefevre, 2016; Schulte, 2015), particularmente devido à existência de evidências de que a LOE em CT_{max} possa não estar relacionada às limitações no fornecimento tecidual de oxigênio (Ern et al., 2016, 2017; Wang et al., 2014).

Desse modo, há a necessidade da elaboração de protocolos alternativos para avaliar a sensibilidade subletal ao aquecimento agudo em peixes, especialmente que se baseiem em limiares ecologicamente relevantes, que sejam menos extremos que a LOE e que os mecanismos fisiológicos relacionados à tolerância sejam passíveis de compreensão. Se as limitações ao suprimento tecidual de O_2 estão realmente relacionadas ao colapso do desempenho durante o aquecimento, esta poderia ser testada por meio da imposição de uma atividade aeróbica ao peixe e seguida pela avaliação na sua capacidade em mantê-la mesmo frente a uma maior necessidade de O_2 pelos tecidos em decorrência dos aumentos progressivos na temperatura da água. Em experimentos com salmões-vermelhos, *Oncorhynchus nerka*, Steinhausen et al (2008) encontraram que quando expostos a aumentos progressivos na temperatura da água em paralelo a uma natação aeróbica sustentada, os animais adotaram um perfil anaeróbico de natação ao atingir uma dada temperatura e, em seguida, fadigaram.

Investigamos, portanto, a hipótese de que fadiga apresentada durante a natação aeróbica sustentada fornece um limiar subletal para a tolerância ao aquecimento agudo em peixes, o qual é mais sensível (ocorre em uma temperatura mais baixa) do que a LOE no CT_{max} . Estudamos duas espécies tropicais de água doce de ampla distribuição, um ciclídeo original da África, a tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758), e um serrasalmídeo da América do Sul, o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg 1887). Para cada peixe individualmente, primeiro realizamos um teste de natação para identificar a velocidade na qual adotavam um perfil anaeróbico de natação (U_{GT}), perceptível por conta da transição de uma natação aeróbica constante para uma natação anaeróbia instável (Marras et al., 2013). Após um período de recuperação adequado, os desafiamos a nadar a uma velocidade de natação correspondente a 85% de sua própria U_{GT} e os aquecemos em etapas para identificar a temperatura na qual fadigaram, a qual denominamos CT_{swim} . Em seguida, comparamos a CT_{swim} de todos os peixes com sua própria CT_{max} , a temperatura em que apresentaram LOE quando aquecidos na mesma taxa de aumento, porém sob condições estáticas. Também esperávamos obter evidências qualitativas de que o colapso no desempenho em CT_{swim} estava relacionado a uma incapacidade em atender a demanda tecidual de O_2 , em particular de que a fadiga seria precedida por uma transição de um perfil aeróbico de natação constante para uma natação anaeróbia instável. Tal resposta serve como um indício de que o protocolo CT_{swim} pode ser muito útil na testagem das premissas da OCLTT. Finalmente, medimos as taxas de consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$) durante o teste de natação inicial e durante o CT_{swim} , dessa forma podemos compreender como o aquecimento agudo influenciou na capacidade geral de fornecimento de O_2 , quando comparado à capacidade na temperatura inicial de aclimatação.

Materiais e Métodos

Aprovação ética

Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), o protocolo foi

aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR), protocolo número CEUA 3927151016.

Animais

As tilápias e pacus juvenis de ambos os sexos foram fornecidos pela Piscicultura Poletini em Mogi Mirim (Estado de São Paulo) e transportados até o Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP). Nas dependências do laboratório, cada espécie foi mantida em tanques de 500 L, com aeração constante, recirculação de água decolorizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e alimentadas *ad libitum* a cada dois dias com pellets comerciais. Após um período de pelo menos duas semanas, os animais foram anestesiados ($0,1 \text{ g l}^{-1}$ de benzocaína) e marcados (PIT tag) para identificação individual. Possibilitou-se que se recuperassem em condições de manutenção de rotina por pelo menos uma semana antes do uso nos experimentos.

Desempenho de natação e fenótipo metabólico na temperatura de aclimação

Cada peixe foi medido quanto à massa (com precisão de 0,1g) e quanto ao comprimento, altura e largura (com precisão de milímetros). Essa medição permitiu o cálculo do bloqueio no fluxo de água no túnel de natação causado pelo corpo do animal e o cálculo das velocidades de natação relativas ao comprimento do corpo (BL s^{-1}) (Bell and Terhune, 1970). A respirometria de natação foi realizada utilizando-se um respirômetro de natação do tipo Steffensen, construído em Plexiglass (volume 13,4 l) e projetado para exercitar os peixes em uma condição cujo o fluxo de água não seja turbulento e com um perfil uniforme de velocidade (McKenzie et al., 2007; McKenzie et al., 2012).

Cada peixe foi alocado no respirômetro no dia anterior ao experimento e exposto a uma velocidade de natação equivalente a 1 BL s^{-1} . As condições térmicas e de oxigenação do respirômetro foram mantidas estáveis por meio do fornecimento constante de um fluxo de água aerada e à 26°C . Na manhã seguinte, os peixes foram submetidos a aumentos progressivos de 1 BL s^{-1} a cada 30 minutos na velocidade de natação, até que atingisse a velocidade de 5 BL s^{-1} . Após atingi-la, foram expostos a uma aceleração constante de $0,1 \text{ BL s}^{-1}$

a cada 10s até a fadiga, sendo essa velocidade anotada como a velocidade máxima de natação (U_{max}) (Marras et al., 2013). Durante a etapa de aceleração constante, a U_{GT} foi identificada quando os peixes começaram a apresentar um perfil anaeróbico de natação, levando-os rapidamente à fadiga (Marras et al., 2013). A natação aeróbica corresponde a um tipo de natação corpo caudal constante (batimento rítmico da cauda) e altamente dependente dos músculos oxidativos de contração lenta. A natação anaeróbica instável corresponde a contrações caudais potentes e intermitentes, capazes de impulsionar o peixe para a frente do túnel de natação, após o qual ele retornava para o final do túnel, antes de repetir a contração caudal. Esse tipo de natação é intitulado de 'burst and coast' e se configura por ser dependente do recrutamento de músculos glicolíticos de contração rápida (Marras et al., 2013; Webb, 1998). Quando um peixe atingia a fadiga e retornava para o fundo do túnel de natação, apoiando-se na tela traseira presente no mesmo, a velocidade era imediatamente reduzida para 1 BL s^{-1} e possibilitada a recuperação por 30 min. Após esse período, o peixe era retirado do respirômetro e transferido para os tanques de retenção a fim de completar a recuperação. Nenhum peixe foi submetido a outro protocolo experimental sem que tenha decorrido o tempo mínimo de 96h entre cada experimento.

As medidas na captação de O_2 ($\dot{M}O_2$ expresso em $\text{mmol kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foram feitas a cada velocidade de natação entre 1 e 5 BL s^{-1} , por meio da respirometria intermitente de fluxo interrompido (Steffensen, 1989). Utilizando-se ciclos de 15 min foi possível calcular duas medidas de $\dot{M}O_2$ para cada velocidade. A concentração de oxigênio na água foi continuamente registrada utilizando-se de uma sonda ótica de oxigênio e medidor (Fibox, Pre-sens GmbH, Regensburg, Germany, www.presens.de) e o software associado ao equipamento (Pre-sens Oxyview). A $\dot{M}O_2$ foi calculada considerando-se a taxa de declínio na concentração de oxigênio, o volume de água no túnel e a massa do peixe (McKenzie et al., 2003; McKenzie et al., 2007). Para cada teste de natação, uma regressão exponencial foi aplicada à relação entre as velocidades de natação e as medidas de $\dot{M}O_2$. A extrapolação para o eixo y, considerada especulativamente como uma velocidade de natação de zero, foi utilizada para corrigir a contribuição da atividade locomotora muscular na $\dot{M}O_2$ (Brett, 1964; Fry,

1971). Isso foi considerado uma estimativa da taxa metabólica padrão (SMR). A taxa metabólica ativa (AMR) também foi calculada com base na regressão exponencial, por meio da inferência da possível $\dot{M}O_2$ na velocidade máxima de natação aeróbica (U_{GT}). O aumento aeróbico (AS) foi calculado como AMR menos SMR.

Protocolo do máximo térmico crítico para natação (CT_{swim})

Testes controle foram realizados para assegurar que os peixes poderiam nadar ininterruptamente por pelo menos 9h a uma velocidade de natação correspondente a 85% de sua própria U_{GT} e em sua temperatura de aclimação, ou seja, a 26°C. Escolheu-se esse intervalo de tempo pelo fato de exceder a duração do protocolo CT_{swim} . As medidas de $\dot{M}O_2$ foram realizadas por 10 min a cada 30 min até o final do protocolo experimental, utilizando os mesmos métodos descritos acima.

Após a eficácia nos experimentos controle, os peixes foram então desafiados a nadar a 85% de sua U_{GT} e expostos a um aquecimento gradual a uma taxa de 1°C a cada 30 min. A variável de resposta no CT_{swim} foi a fadiga, a temperatura na qual os peixes se recusavam a nadar e retornavam para o final do túnel de natação, posicionando-se contra a tela traseira. A temperatura final no CT_{swim} foi calculada usando-se a última temperatura completada mais uma proporção do período de tempo exposto na temperatura em que o peixe apresentou a fadiga. Imediatamente após a fadiga, os peixes foram transferidos para o tanque de recuperação, o qual apresentava água a 26 °C. Uma vez recuperado o comportamento normal de natação, eles eram movidos para os tanques de contenção para se recuperarem por pelo menos 96h antes de qualquer protocolo subsequente. As medidas de $\dot{M}O_2$ foram feitas durante os últimos 10 min de cada etapa de temperatura. A maior medida de $\dot{M}O_2$ foi identificada para cada peixe e denominada como $\dot{M}O_{2max-CT_{swim}}$.

Protocolo do máximo térmico estático crítico (CT_{max})

Quatro indivíduos de cada espécie foram selecionados aleatoriamente e colocados em um tanque de 68 l contendo água aerada e à 26°C. Foi disponibilizado um período de no mínimo 12h para se recuperarem do manuseio. Na manhã seguinte, aqueceu-se a água do tanque em etapas de 1°C a cada 30 min. O tanque foi bem aerado para manter os níveis de oxigênio adequados e evitar a estratificação térmica. A perda de equilíbrio (LOE) foi usada como indicador na tolerância térmica, envolvendo a completa perda de capacidade em manter a orientação dorsoventral. A CT_{max} foi calculada usando-se a última temperatura completada mais uma proporção do período de tempo exposto na temperatura em que o peixe apresentou a LOE. Atingida a LOE, cada peixe foi rapidamente transferido para o tanque de recuperação de 68 l, o qual continha água a 26°C. Após pelo menos 30 min e total recuperação do comportamento normal de natação, eles foram transferidos para os tanques de contenção para se recuperarem por pelo menos 96 h antes de novos protocolos experimentais.

Análise estatística

Todas as análises estatísticas e modelos foram realizadas usando o software R v. 3.4.0 (<http://www.R-project.org/>) por meio da função lmer no pacote lme4 (Bates et al., 2016). As variáveis metabólicas e de desempenho foram comparadas entre as espécies por meio do teste T e dentro de cada espécie por meio do teste T, com $P < 0.05$ tomado como limite de significância. Os valores térmicos críticos (CT) foram examinados usando um modelo linear geral com CT como a variável de resposta e espécies e protocolos (CT_{max} versus CT_{swim}) como as variáveis de resposta. Uma interação entre espécies e protocolo foi inicialmente incluída, mas se mostrou não significativa, sendo excluída e o modelo executado novamente. Modelos lineares de efeitos mistos (LMEs) foram construídos para examinar o efeito do aquecimento no consumo de oxigênio durante a natação, sendo o consumo de oxigênio a variável de resposta, a espécie como a variável explicativa categórica, o tratamento (aquecimento versus temperatura constante a 26°C) como a variável explicativa categórica, a temperatura como uma variável explicativa contínua e a ID do peixe como um

efeito aleatório. O modelo completo foi ajustado pela primeira vez usando a estimativa da máxima verossimilhança restrita (REML) para comparar possíveis estruturas aleatórias por meio de teste de razão de verossimilhança. Comparamos o modelo de interceptação aleatória, com a identidade do peixe aninhada dentro do grupo como um fator aleatório, com modelos de declive aleatórios, onde as estimativas de declives foram permitidas variar entre indivíduos para a disponibilidade de oxigênio. Inclinações aleatórias não melhoraram a parcimônia do modelo e, deste modo, somente as interceptações aleatórias foram usadas para a ID dos peixes aninhados dentro dos grupos. Interações do tipo Two-way entre as espécies, os tratamentos e temperatura foram inicialmente incluídas no modelo completo, mas removidas quando não significativas, e os modelos executados novamente. Pressupostos do modelo de linearidade, normalidade e homogeneidade dos resíduos foram confirmados por meio da inspeção dos gráficos de resíduos do modelo versus os valores ajustados. Os valores modelos de r^2 foram computados usando o pacote MuMIn 1.9.13 para R (Barton, 2013). Para LMEs isso incluiu r^2 marginal (r^2 m) e condicional (r^2 c), os quais indicam a variância explicada por fatores fixos, e por fatores fixos e aleatórios, respectivamente (Nakagawa and Schielzeth, 2010). Os dados usados para as análises estão depositados em Dryad (doi:10.5061/dryad.cjsxksn2v).

Resultados

Desempenho de natação e fenótipo metabólico na temperatura de aclimatação

As duas espécies mostraram uma diferença significativa em seus desempenhos de natação, sendo as médias da U_{GT} e da U_{max} maiores no pacu do que na tilápia (tabela 1). A média da SMR foi menor no pacu do que na tilápia, mas não houve diferenças na AMR ou no AS (tabela 1).

Tabela 1: Valores da média (\pm SE) calculadas para a massa (g), o comprimento (mm), a taxa metabólica padrão (SMR), a taxa metabólica ativa (AMR), o aumento aeróbico (AS), a velocidade máxima de natação aeróbica (U_{GT}) e a velocidade máxima de natação (U_{MAX}) em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, e pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

	Nile tilapia	Pacu
Mass (g)	62 \pm 5	77 \pm 8
Forklength (mm)	127 \pm 4	131 \pm 5
SMR (mmolO ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	7.1 \pm 0.8	4.0 \pm 0.3*
AMR (mmolO ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	24.4 \pm 2.1	19.9 \pm 1.4
AS (mmolO ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	17.4 \pm 2.3	15.9 \pm 1.3
U_{GT} (BL s ⁻¹)	6.1 \pm 0.2	7.1 \pm 0.1*
U_{MAX} (BL s ⁻¹)	7.1 \pm 0.2	7.7 \pm 0.2*

n=8 por espécie. O asterisco indica diferença significativa entre as espécies ($p \leq 0.05$, pelo teste-T).

Tolerância ao aquecimento agudo: CT_{swim} versus CT_{max}

Na temperatura de aclimação, todos os peixes nadaram por pelo menos 9h a 85% de seu U_{GT} , usando o perfil aeróbico de natação constante e sem qualquer sinal de fadiga. Durante o protocolo CT_{swim} todos os peixes nadaram usando o perfil aeróbico constante até uma determinada temperatura de aquecimento. Uma vez atingida tal temperatura limite, eles passaram a exibir a “natação anaeróbica de explosão” (burst and coast) e logo em seguida fatigaram. A fadiga foi facilmente identificada tanto pelo posicionamento dos peixes no final do túnel, apoiando-se contra a tela traseira, quanto simplesmente pela recusa a nadar. A transição no perfil de natação foi qualitativamente indistinguível daquela observada durante o teste de aceleração constante. Nenhum peixe perdeu o equilíbrio durante o protocolo CT_{swim} e, em ambas as espécies, o CT_{swim} foi significativamente menor do que o CT_{max} , em aproximadamente 2°C (Tabela 2, Fig. 1). Durante o CT_{max} , os peixes mostraram sinais de comportamento errático e rolaram lateralmente antes de completarem a LOE. Nenhum dos protocolos de aquecimento causou alguma mortalidade e

todos os peixes recuperaram o comportamento normal em torno de 30 min após o retorno à água a 26°C. Não houve diferenças na média de CT_{swim} ou CT_{max} entre as duas espécies (Tabela 2, Fig. 1).

Tabela 2: Resultados gerais do modelo linear para fatores que afetam os limites térmicos críticos.

		Estimate	s.e.	<i>t</i>	<i>P</i>
Intercept		39.9291	0.2048	195.002	<0.0001
Species	Pacu	-0.3619	0.2364	-1.531	0.137
Type	CT_{swim}	-1.6219	0.2364	-6.860	<0.0001

Nível de referência para espécie é a tilápia-do-Nilo; nível de referência para tipo é CT_{max} . Modelo $r^2 = 0.641$.

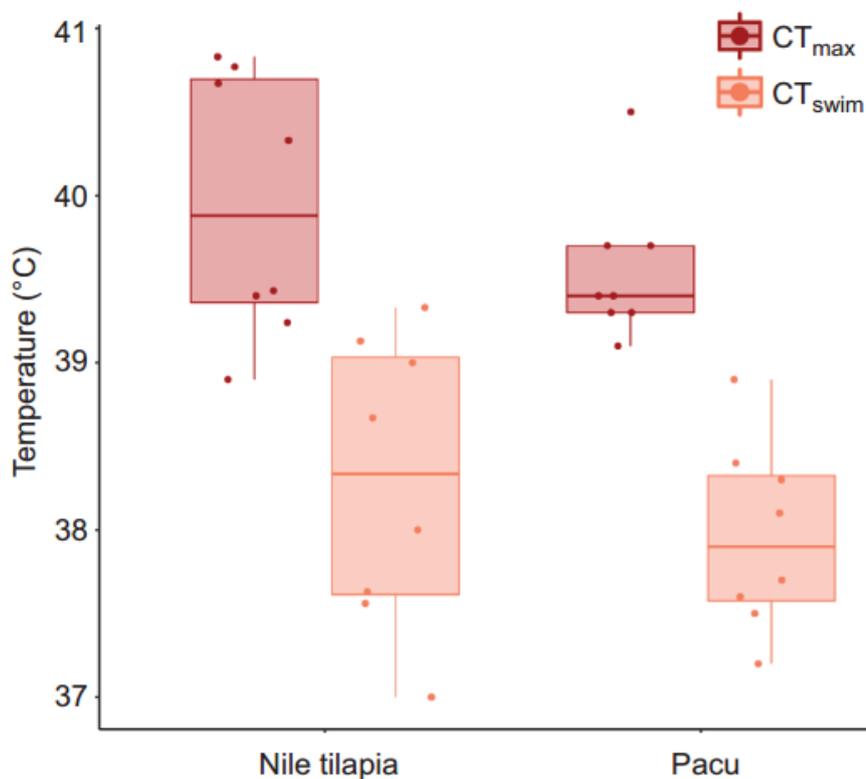


Figura 1: Diagrama de caixa dos dados para CT_{swim} (pontos em laranja) ou CT_{max} (pontos em vermelho) nas duas espécies de peixes, tilápia-do-Nilo (painel esquerdo) e pacu (painel direito). As dobradiças inferior e superior do diagrama de caixa representam o 25th e 75th percentis, respectivamente; a linha horizontal dentro da caixa é a mediana; o comprimento dos whisker representa o intervalo de pontos de dados entre cada dobradiça e $1,5 \times$ a diferença entre o 25º e o 75º percentis. Os dados além desses limites são os outliers. Cada ponto é um peixe, $n = 8$ em todos os casos.

Efeitos do aquecimento agudo na taxa metabólica

Durante a natação no protocolo controle, nenhuma espécie apresentou mudanças na $\dot{M}O_2$ nas 9h de experimento (Fig. 2) e a média da $\dot{M}O_2$ (Tabela 3) foi cerca de 75% de sua média para a AMR (Tabela 1). O aquecimento durante o CT_{swim} levou a um pronunciado aumento na $\dot{M}O_2$ em ambas as espécies (Fig 1, Tabela 4). A $\dot{M}O_{2max} - CT_{swim}$ (Tabela 3) foi significativamente maior do que a média da AMR de cada espécie em sua temperatura de aclimação (Tabela 1). As espécies não diferiram em sua $\dot{M}O_2$ a 26°C no início do CT_{swim} , ou em sua $\dot{M}O_{2max} - CT_{swim}$. Como resultado, o aumento aeróbico devido ao aquecimento agudo foi similar em ambas as espécies (Tabela 3). Essas diferenças das espécies se refletiram em seu efeito nos modelos LME (Tabela 4).

Tabela 3: Valores da média (\pm SE) da $\dot{M}O_2$ calculadas em dois momentos diferentes durante o protocolo CT_{swim} : $\dot{M}O_2$ na temperatura de aclimação (26°C) e a $\dot{M}O_2$ máxima calculado durante o protocolo ($\dot{M}O_2$ Max CT_{swim}), e a diferença entre eles, CT_{swim} scope metabólica. Valores obtidos em exemplares de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, e pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

	Nile tilapia	Pacu
$\dot{M}O_2$ 26 °C	18.0 \pm 1.0	16.8 \pm 1.8
$\dot{M}O_2$ Max CT_{swim}	32.6 \pm 2.1*	30.6 \pm 1.2*
CT_{swim} scope	14.7 \pm 1.4	13.8 \pm 1.0

$\dot{M}O_2$ expresso em mmol O_2 h^{-1} kg^{-1} , n= 8 por espécie. O asterisco indica diferença significativa entre $\dot{M}O_2$ 26°C e a $\dot{M}O_2$ Max CT_{swim} ($P < 0.05$; teste- T).

Tabela 4: Resultados do modelo de efeitos mistos lineares para fatores que afetam o consumo de oxigênio durante o CT_{swim} .

	Estimate	s.e.	d.f.	t	P
Intercept species	17.669	2.366	124.155	7.468	<0.0001
Pacu treatment	-1.342	1.551	11.005	-0.865	0.406
Warming temperature	-20.478	2.899	320.019	-7.064	<0.0001
Treatment x temperature	0.001	0.063	320.004	0.021	0.983
Warming x temperature	0.812	0.090	320.022	9.017	<0.0001

Nível de referência para espécie é a tilápia-do-Nilo; nível de referência para tratamento é temperatura constante a 26°C. O modelo inclui os indivíduos como um efeito aleatório. Modelo marginal $r^2 = 0.430$, conditional $r^2 = 0.673$.

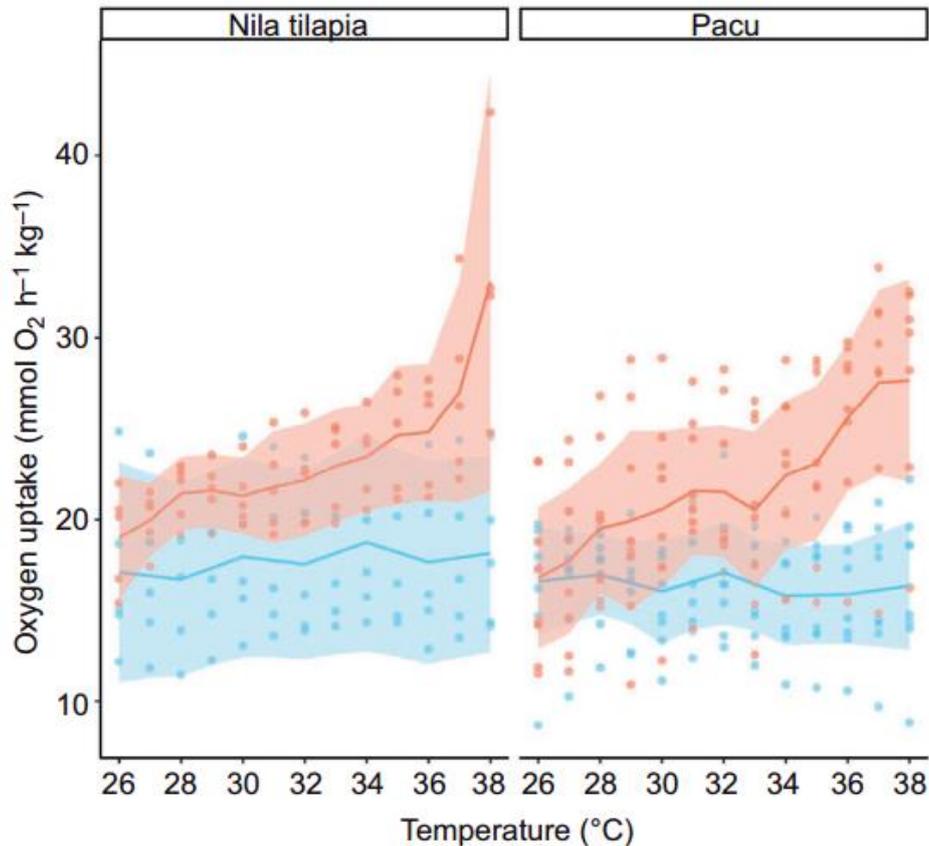


Figura 2: Consumo de oxigênio durante o protocolo CT_{swim} , quando tilápia-do-Nilo (painel esquerdo) ou pacu (painel direito) nadavam aerobicamente e eram aquecidos em $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ a cada 30 min, partindo da temperatura de aclimação de $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pontos em vermelho e curva), ou quando os mesmos peixes nadaram aerobicamente pelo mesmo período apenas na temperatura de aclimação (pontos em azul e curva). A velocidade de natação em ambas as situações foi a de 85% da U_{GT} de cada indivíduo. A área sombreada corresponde ao intervalo de 95% de confiança em cada temperatura. Cada ponto corresponde a um peixe medido na respectiva temperatura, ou o intervalo de tempo correspondente no protocolo controle a 26°C .

Discussão

Os resultados demonstram que, em ambas as espécies estudadas, o CT_{swim} pode ser utilizado para se definir a tolerância ao aquecimento agudo e a fadiga como um importante limiar subletal. Tal metodologia faz frente ao protocolo CT_{max} e o uso da LOE como um limiar extremo de tolerância térmica (Mauduit et al., 2016; Rezende et al., 2014). Os resultados indicam também que, se expostos a eventos agudos de aquecimento na natureza, a habilidade dos peixes em realizarem alguma atividade aeróbica seria restringida em temperaturas significativamente abaixo daquelas nas quais sua sobrevivência foi diretamente ameaçada, o que representa profundas implicações ecológicas. É

importante ressaltar também que a probabilidade de as duas espécies experimentarem eventos de aquecimento extremo acima de 38°C, a temperatura aproximada de seu CT_{swim} , é muito maior do que para eventos de até 40°C, a temperatura de seu CT_{max} (Wong et al., 2014; Collins et al., 2019; Frölicher and Lauffkötter, 2018). Este protocolo precisa ser estendido a mais espécies de peixes, mas o estudo atual estabelece que a CT_{swim} pode fornecer um limite ecologicamente relevante e que é significativamente mais sensível do que o CT_{max} .

Além de ser mais sensível do que o CT_{max} , o protocolo CT_{swim} se faz interessante pois os mecanismos associados à fadiga parecem estar claramente relacionados à capacidade de suprimento de O_2 . Vários estudos demonstraram uma desconexão entre o CT_{max} e a capacidade de suprimento de O_2 : se o CT_{max} é dependente do oxigênio parece ser específico de cada espécie. Os mecanismos fisiológicos independentes de O_2 do CT_{max} não são compreendidos e talvez estejam ligados aos efeitos do aquecimento agudo na integridade das membranas e na função nervosa. Todos esses pontos foram levantados para se argumentar contra a universalidade do sistema OCLTT (Ern et al., 2014; Ern et al., 2016; Ern et al., 2017; Jutfelt et al., 2019; Wang et al., 2014). Em contraste, o protocolo CT_{swim} visa especificamente as restrições metabólicas causadas pelo aquecimento. O protocolo de natação controle a 85% do U_{GT} provou que ambas as espécies foram capazes de realizar atividade aeróbica sustentada por um período prolongado, com uma taxa metabólica constante e sem qualquer demonstração de fadiga. Portanto, a fadiga durante o CT_{swim} não ocorreu devido ao gasto metabólico da natação por si, e sim por conta de um aumento metabólico imposto pelo aquecimento. É muito interessante ressaltar que, a uma alta temperatura próxima do seu CT_{swim} , os indivíduos de ambas as espécies começaram a praticar a “natação de explosão instável” (burst and coast) para se manterem posicionados na corrente de água e rapidamente após a adoção desse comportamento apresentaram os sinais de fadiga. Essa resposta foi qualitativamente indistinguível da mudança de perfil natatório observada durante o desafio de natação, o que indica que em ambas as situações o mecanismo envolvido é semelhante.

O coração dos peixes teleósteos é um órgão aeróbico e obtém grande parte do O_2 necessário para o seu funcionamento via retorno venoso na

circulação simples. Dessa forma, o aporte sanguíneo que retorna ao coração é composto por um sangue que forneceu parte do O_2 para tecidos em atividade (Farrell and Jones, 1992; Jones and Randall, 1978). Foi sugerido que durante um desafio de natação, os peixes realizam a transição para um perfil anaeróbico quando os níveis de O_2 no sangue venoso, que retorna ao coração, caem abaixo de um nível crítico. Ao recrutar a musculatura branca, o peixe reduz as taxas de extração de oxigênio pela musculatura vermelha ativa e, assim, possibilita o suprimento de sangue venoso com um teor adequado de O_2 para o funcionamento cardíaco (Farrell and Clutterham, 2003; McKenzie and Claireaux, 2010; McKenzie et al., 2004). A transição no perfil de natação observada antes da fadiga durante o CT_{swim} pode sugerir um declínio semelhante nos níveis de O_2 venoso, o que pode comprometer o suprimento de O_2 para o coração ativo (McKenzie and Claireaux, 2010). Ou seja, o sistema cardiorrespiratório poderia não mais ser capaz de atender as demandas combinadas de O_2 oriundos da aceleração térmica do metabolismo e do exercício aeróbico sustentado. Em experimentos com salmão rei, Steinhausen et al. (2008) evidenciaram que quando submetidos a um protocolo de aquecimento e natação, a fadiga apresentada pelos animais coincidia com a capacidade de bombeamento cardíaco atingindo valores máximos. Há outras evidências de que a capacidade do coração em manter o suprimento de O_2 tecidual possa ser um elemento crítico na tolerância aos aquecimentos agudo e crônico em peixes (Clark et al., 2008; Sandblom et al., 2016), então esta é uma questão interessante para pesquisas futuras com o protocolo CT_{swim} .

A metodologia para explorar adequadamente o paradigma de Fry e a hipótese OCLTT seria medir o SMR e o AMR em peixes mantidos sob um espectro de temperatura, a fim de elaborar uma curva de desempenho AS. Isso consome muito tempo e é muito difícil de se realizar em um único indivíduo (Claireaux et al., 2006; Claireaux and Lefrançois 2007; Eliason et al., 2011), o que restringe seriamente a exploração da universalidade dos mecanismos entre as espécies e a exploração de questões relativas à variação individual e à plasticidade fenotípica dentro das espécies. Embora não possamos ter certeza do mecanismo que levou à fadiga no teste CT_{swim} , a evidência claramente indica que estaria ligado a problemas com o atendimento da demanda metabólica por O_2 . Isso é consistente com a hipótese OCLTT. Portanto, o CT_{swim} pode ser

diretamente usado para explorar os mecanismos relacionados à fadiga induzida pelo aquecimento, a fim de confirmar se realmente reflete alguma restrição ao atendimento da demanda metabólica por O_2 e estabelecer se há uma resposta universal dentre as espécies de peixes. O protocolo CT_{swim} poderia ser usado para explorar questões relativas à plasticidade e resiliência das espécies de peixes às mudanças climáticas e estresses térmicos. A taxa de mudanças ambientais associadas ao aquecimento global é rápida demais para ser enfrentada por respostas evolutivas adaptativas e, portanto, a resiliência das espécies dependerá da migração, da existência de genótipos tolerantes e da plasticidade fenotípica (Bell, 2013; Gonzalez and Bell, 2013). O protocolo CT_{swim} é ideal para avaliar a variação individual na sensibilidade térmica, com base na capacidade de fornecimento de O_2 e no potencial da plasticidade fenotípica em compensar quaisquer restrições.

É interessante que a $\dot{M}O_{2max} - CT_{swim}$ foi significativamente maior do que o AMR de cada espécie em sua temperatura de aclimação. O aumento exponencial na $\dot{M}O_2$ durante o CT_{swim} ocorreu estritamente devido aos efeitos da temperatura no metabolismo, uma vez que a $\dot{M}O_2$ não mudou quando os peixes nadaram a 26°C por 9h. Isso mostra que o aquecimento agudo aumenta a capacidade cardiorrespiratória dessas duas espécies tropicais de um modo rápido e imediato. Claireaux et al. (2006) em experimentos com robalo europeu, *Dicentrarchus labrax*, mediram a U_{GT} (chamado de U_{max} naquele estudo) e o metabolismo respiratório associado em animais aclimatados sazonalmente a temperaturas entre 7 e 30°C. Eles descobriram que o aquecimento estava associado a um aumento na capacidade do metabolismo aeróbico, fluxo de energia e aumento metabólico. Os dados do presente artigo indicam que esses efeitos também podem ser vistos durante o aquecimento agudo. Quando Steinhausen et al. (2008) expuseram o salmão-rei ao aquecimento agudo e a uma velocidade de natação correspondente a 75% de sua velocidade crítica de natação (U_{crit}), os efeitos térmicos no consumo de O_2 foram muito menos pronunciados do que o aumento exponencial na taxa metabólica observado na tilápia-do-Nilo e no pacu. O fato dos Salmonídeos serem classificados como espécies estenotérmicas pode estar associado a essa resposta (Eliason et al., 2011). A impressionante plasticidade cardiorrespiratória em resposta ao

aquecimento agudo demonstrada por ambas as espécies tropicais estudadas pode refletir uma história evolutiva de exposição a um ambiente com altas temperaturas e com grande variação. Os mecanismos subjacentes a essa plasticidade ainda precisam ser explorados, mas uma liberação de catecolaminas e aumento no desempenho do bombeamento cardíaco podem ser de grande importância (Jayasundara and Somero, 2013; Nyboer and Chapman, 2018).

Em conclusão, a fadiga apresentada durante o protocolo CT_{swim} fornece um limiar subletal para a tolerância ao aquecimento agudo. A adoção desse parâmetro é relevante devido à importância ecológica da natação para os peixes e por ser mais sensível a potenciais eventos extremos do que a LOE no CT_{max} . Esse protocolo também apresenta a vantagem de que o mecanismo relacionado à fadiga no CT_{swim} parece estar ligado a restrições no fornecimento de O_2 tecidual, de forma que isso pode agora ser investigado explicitamente. O protocolo tem aplicações no teste de hipóteses como o OCLTT (Jutfelt et al., 2018; Pörtner, 2010) e a limitação de oxigênio branquial (GOL) (Lefevre et al., 2017; Lefevre et al., 2018; Pauly and Cheung, 2017), ou em explorar como e por que indivíduos, populações e espécies podem diferir em suas tolerâncias subletais ao aquecimento (Anttila et al., 2013; Fanguie et al., 2009; Mauduit et al., 2016; Roze et al., 2013; Schulte et al., 2011).

Referências Bibliográficas

- Anttila, K., Dhillon, R. S., Boulding, E. G., Farrell, A. P., Glebe, B. D., Elliott, J. A. K., Wolters, W. R. and 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. **J. Exp. Biol.** **216**, 1183–1190.
- Barton, K. (2015). MuMIn: multi-model inference. R package version 1.15.1.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H. and Bolker, M. B. (2016). Package ‘lme4’. R Package Version 1.1–10.
- Bell, G. (2013). Evolutionary rescue and the limits of adaptation. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.** **368**,
- Bell, W. H. and Terhune, L. D. B. (1970). Water tunnel design for fisheries research. **Fish. Resour. Board Canada Tech. Rep.** **195**, 1–69.

- Brett, J. R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. **J. Fish. Res. Board Canada** **21**, 1183–1226.
- Claireaux, G., Couturier, C. and Groison, A.-L. (2006). Effect of temperature on maximum swimming speed and cost of transport in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **J. Exp. Biol.** **209**, 3420–8.
- Clark, T. D., Sandblom, E., Cox, G. K., Hinch, S. G. and Farrell, A. P. (2008). Circulatory limits to oxygen supply during an acute temperature increase in the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.** **295**, R1631–R1639.
- Collins M., Sutherland, M., Bouwer, L., Cheong, S.-M., Frölicher, T., Jacot Des Combes, H., Koll Roxy, M., Losada, I., McInnes, K., Ratter, B., et al. (2019). Extremes, Abrupt Changes and Managing Risk. In: **IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate** (eds. Pörtner, H.-O., Roberts, D. C., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Tignor, M., Poloczanska, E., Mintenbeck, K., Alegría, A., Nicolai, M., Okem, A., et al.), in press. Cambridge and New York: Cambridge University Press.
- Eliason, E. J., Clark, T. D., Hague, M. J., Hanson, L. M., Gallagher, Z. S., Jeffries, K. M., Gale, M. K., Patterson, D. A., Hinch, S. G. and Farrell, A. P. (2011). Differences in thermal tolerance among sockeye salmon populations. **Science** **332**, 109–12.
- Ern, R., Huong, D. T. T., Phuong, N. T., Wang, T. and Bayley, M. (2014). Oxygen delivery does not limit thermal tolerance in a tropical eurythermal crustacean. **J. Exp. Biol.** **217**, 809–14.
- Ern, R., Johansen, J. L., Rummer, J. L. and Esbaugh, A. J. (2017). Effects of hypoxia and ocean acidification on the upper thermal niche boundaries of coral reef fishes. **Biol. Lett.** **13**,.
- Ern, R., Norin, T., Gamperl, A. K. and Esbaugh, A. J. (2016). Oxygen dependence of upper thermal limits in fishes. **J. Exp. Biol.** **219**, 3376–3383.
- Fangue, N. A., Richards, J. G. and Schulte, P. M. (2009). Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? **J. Exp. Biol.** **212**, 514–22.
- Farrell, A. P. (2016). Pragmatic perspective on aerobic scope: Peaking, plummeting, pejus and apportioning. **J. Fish Biol.** **88**, 322–343.

- Farrell, A. P. and Clutterham, S. M. (2003). On-line venous oxygen tensions in rainbow trout during graded exercise at two acclimation temperatures. **J. Exp. Biol.** **206**, 487–496.
- Farrell, A. P. and Jones, D. R. (1992). The heart. In **Fish Physiology Volume 12A** (ed. Hoar, W. S., Randall, D. J. and Farrell, A. P.), pp. 1–88. San Diego: Academic Press.
- Frölicher, T. L. and Laufkötter, C. (2018). Emerging risks from marine heat waves. **Nat. Commun.** **9**, 2015–2018.
- Fry, F. E. J. (1947). The effects of the environment on animal activity. **Univ. Toronto Stud., Biol. Ser.** **55**, 1–62.
- Fry, F. E. J. (1957). The aquatic respiration of fish. In **The Physiology of Fishes Volume 1** (ed. Brown, M. E.), pp. 1–63. New York: Academic Press.
- Fry, F. E. J. (1971). The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish. In **Fish Physiology Volume 6** (ed. Hoar, W. S. and Randall, D. J.), pp. 1–98. New York: Academic Press.
- Gonzalez, A. and Bell, G. (2013). Evolutionary rescue and adaptation to abrupt environmental change depends upon the history of stress. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.** **368**, .
- IPCC (2014). Climate Change 2014: Synthesis Report. *Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Core Writing Team, Pachauri R.K. and Meyer L.A. (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 151 pp.
- IPCC (2019). Summary for Policymakers. In: *IPCC Special Report on the Ocean and Cryosphere in a Changing Climate* (eds. Pörtner H.-O., Roberts, D. C., Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Tignor, M., Poloczanska, E., Mintenbeck, K., Alegría, A., Nicolai, M., Okem, A., et al.). IPCC, Geneva, Switzerland, In press.
- Jayasundara, N. and Somero, G. N. (2013). Physiological plasticity of cardiorespiratory function in a eurythermal marine teleost, the longjaw mudsucker, *Gillichthys mirabilis*. **J. Exp. Biol.** **216**, 2111–21.
- Jones, D. R. and Randall, D. J. (1978). The respiratory and circulatory systems during exercise. In **Fish Physiology Volume 7** (ed. Hoar, W. S. and Randall, D. J.), pp. 1–59. New York: Academic Press.
- Jørgensen, C., Peck, M. A., Antognarelli, F., Azzurro, E., Burrows, M. T., Cheung, W. W. L., Cucco, A., Holt, R. E., Huebert, K. B., Marras, S., et al. (2012).

Conservation physiology of marine fishes: advancing the predictive capacity of models. **Biol. Lett.** **8**, 900–3.

Jutfelt, F., Norin, T., Ern, R., Overgaard, J., Wang, T., McKenzie, D. J., Lefevre, S., Nilsson, G. E., Metcalfe, N. B., R Hickey, A. J., et al. (2018). Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: blurring ecology and physiology. **J. Exp. Biol.** **221**, 2016–2019.

Jutfelt, F., Roche, D. G., Clark, T. D., Norin, T., Binning, S. A., Speers-Roesch, B., Amcoff, M., Morgan, R., Andreassen, A. H. and Sundin, J. (2019). Brain cooling marginally increases acute upper thermal tolerance in Atlantic cod. **J. Exp. Biol.** **222**, jeb208249.

Lefevre, S. (2016). Are global warming and ocean acidification conspiring against marine ectotherms? A meta-analysis of the respiratory effects of elevated temperature, high CO₂ and their interaction. **Conserv. Physiol.** **4**, 10.1093/conphys/cow009.

Lefevre, S., McKenzie, D. J. and Nilsson, G. E. (2017). Models projecting the fate of fish populations under climate change need to be based on valid physiological mechanisms. **Glob. Chang. Biol.** 1–12.

Lefevre, S., McKenzie, D. J. and Nilsson, G. E. (2018). In modelling effects of global warming, invalid assumptions lead to unrealistic projections. **Glob. Chang. Biol.** **24**, 553–556.

Lutterschmidt, W. I. and Hutchison, V. H. (1997). The critical thermal maximum: history and critique. **Can. J. Zool.** **75**, 1561–1574.

Marras, S., Killen, S. S., Domenici, P., Claireaux, G. and McKenzie, D. J. (2013). Relationships among Traits of Aerobic and Anaerobic Swimming Performance in Individual European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. **PLoS One** **8**, e72815.

Mauduit, F., Domenici, P., Farrell, A. P., Lacroix, C., Le Floch, S., Lemaire, P., Nicolas-Kopec, A., Whittington, M., Zambonino-Infante, J. L. and Claireaux, G. (2016). Assessing chronic fish health: An application to a case of an acute exposure to chemically treated crude oil. **Aquat. Toxicol.** **178**, 197–208.

McKenzie, D. J. and Claireaux, G. (2010). The Effects of Environmental Factors on the Physiology of Aerobic Exercise. In **Fish Locomotion: an Etho-ecological Perspective**, pp. 296–332.

McKenzie, D. J., Axelsson, M., Chabot, D., Claireaux, G., Cooke, S. J., Corner, R. A., Boeck, G. De, Domenici, P., Guerreiro, P. M., Hamer, B., et al. (2016).

Conservation physiology of marine fishes: state of the art and prospects for policy. **Conserv. Physiol.** **4**, 1–20.

McKenzie, D. J., Garofalo, E., Winter, M. J., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N., Hayes, R., van der Oost, R., Butler, P. J., Chipman, J. K., et al. (2007). Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** **362**, 2043–59.

McKenzie, D. J., Martinez, R., Morales, A., Acosta, J., Morales, R., Taylor, E. W., Steffensen, J. F. and Estrada, M. P. (2003). Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. **J. Fish Biol.** **63**, 398–409.

McKenzie, D. J., Steffensen, J. F., Taylor, E. W. and Abe, A. S. (2012). The contribution of air breathing to aerobic scope and exercise performance in the banded knifefish *Gymnotus carapo* L. **J. Exp. Biol.** **215**, 1323–30.

McKenzie, D. J., Wong, S., Randall, D. J., Egginton, S., Taylor, E. W. and Farrell, A. P. (2004). The effects of sustained exercise and hypoxia upon oxygen tensions in the red muscle of rainbow trout. **J. Exp. Biol.** **207**, 3629–37.

Nakagawa, S. and Schielzeth, H. (2010). Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: A practical guide for biologists. **Biol. Rev.** **85**, 935–956.

Nyboer, E. A. and Chapman, L. J. (2018). Cardiac plasticity influences aerobic performance and thermal tolerance in a tropical, freshwater fish at elevated temperatures. **J. Exp. Biol.** **221**, jeb178087.

Pauly, D. and Cheung, W. W. L. (2017). Sound physiological knowledge and principles in modeling shrinking of fishes under climate change. **Glob. Chang. Biol.** 1–13.

Perry, A. L., Low, P. J., Ellis, J. R. and Reynolds, J. D. (2005). Climate change and distribution shifts in marine fishes. **Science** **308**, 1912–5.

Pörtner, H. O. and Knust, R. (2007). Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. **Science** **315**, 95–7.

Pörtner, H. O., Bock, C. and Mark, F. C. (2017). Oxygen- & capacity-limited thermal tolerance: Bridging ecology & physiology. **J. Exp. Biol.** **220**, 2685–2696.

Pörtner, H.-O. (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. **J. Exp. Biol.** **213**, 881–93.

- Pörtner, H.-O. and Farrell, A. P. (2008). Physiology and climate change. **Science** **322**, 690–692.
- Rezende, E. L., Castañeda, L. E. and Santos, M. (2014). Tolerance landscapes in thermal ecology. **Funct. Ecol.** **28**, 799–809.
- Roze, T., Christen, F., Amerand, A. and Claireaux, G. (2013). Trade-off between thermal sensitivity, hypoxia tolerance and growth in fish. **J. Therm. Biol.** **38**, 98–106.
- Sandblom, E., Clark, T. D., Gräns, A., Ekström, A., Brijs, J., Sundström, L. F., Odelström, A., Adill, A., Aho, T. and Jutfelt, F. (2016). Physiological constraints to climate warming in fish follow principles of plastic floors and concrete ceilings. **Nat. Commun.** **7**, 11447.
- Schulte, P. M. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. **J. Exp. Biol.** **218**, 1856–1866.
- Schulte, P. M., Healy, T. M. and Fanguie, N. A. (2011). Thermal performance curves, phenotypic plasticity, and the time scales of temperature exposure. **Integr. Comp. Biol.** **51**, 691–702.
- Smale, D. A., Wernberg, T., Oliver, E. C. J., Thomsen, M., Harvey, B. P., Straub, S. C., Burrows, M. T., Alexander, L. V., Benthuyzen, J. A., Donat, M. G., et al. (2019). Marine heatwaves threaten global biodiversity and the provision of ecosystem services. **Nat. Clim. Chang.** **9**, 306–312.
- Steffensen, J. F. (1989). Some errors in respirometry of water breathers: how to avoid and correct for them. **Fish Physiol. Biochem.** **6**, 49–59.
- Steinhausen, M. F., Sandblom, E., Eliason, E. J., Verhille, C. and Farrell, A. P. (2008). The effect of acute temperature increases on the cardiorespiratory performance of resting and swimming sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). **J. Exp. Biol.** **211**, 3915–3926.
- Wang, T., Lefevre, S., Iversen, N. K., Findorf, I., Buchanan, R. and McKenzie, D. J. (2014). Anaemia only causes a small reduction in the upper critical temperature of sea bass: is oxygen delivery the limiting factor for tolerance of acute warming in fishes? **J. Exp. Biol.** **217**, 4275–4278.
- Webb, P. W. (1998). Swimming. In **The Physiology of Fishes** (ed. Evans, D. D.), pp. 1–38. Boca Raton: CRC Press.

Wong, P. P., Losada, I. J., Gattuso, J.-P., Hinkel, J., Khattabi, A., McInnes, K. L., Saito, Y. and Sallenger, A. (2014). Coastal systems and low-lying areas. In: **Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change** (eds. Field, C. B., Barros, V. R., Dokken, D. J., Mach, K. J., Mastrandrea, M. D., Bilir, T. E., Chatterjee, M., Ebi, K. L., Estrada, Y. O., Genova, R. C., et al.), pp. 361-409. Cambridge and New York: Cambridge University Press.

3.2 Artigo 2

A variação individual na tolerância ao aquecimento agudo e hipóxia não está relacionada ao fenótipo metabólico no pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

(Artigo a ser submetido no periódico *Conservation Physiology*).

Resumo

Os peixes residentes em habitats tropicais de água doce serão desafiados tanto por aumentos significativos nas temperaturas médias anuais, quanto na frequência de temperaturas extremas. Além disso, espera-se que os eventos de hipóxia, um estressor comum em águas doces tropicais, também aumente em frequência e gravidade. Apesar das respostas fisiológicas de diversas espécies de peixes ao aquecimento e à hipóxia terem sido estudadas extensivamente, compreender a relevância da variação individual em tais tolerâncias é de valor primordial para prospectar os potenciais impactos das mudanças globais nas populações naturais. Portanto, investigamos a correlação entre a tolerância ao aquecimento progressivo agudo e à hipóxia em um peixe serrasalmídeo sul americano, *Piaractus mesopotamicus*. Analisamos o papel do fenótipo metabólico intrínseco em tal tolerância. Medimos o fenótipo metabólico intrínseco como taxa metabólica padrão (SMR), taxa metabólica máxima (AMR) e aumento aeróbico (AS). Encontramos evidências de tolerância cruzada, onde os peixes tolerantes ao aquecimento também eram tolerantes à hipóxia. No entanto, a tolerância ao aquecimento agudo não se mostrou dependente das variáveis que compreendem o fenótipo metabólico. Além disso, a saturação crítica de oxigênio (S_{crit}), parâmetro de tolerância à hipóxia, não foi dependente da taxa metabólica padrão. A ausência de qualquer relação entre o fenótipo metabólico intrínseco e a tolerância a ambos os estressores é curiosa e indica que, se esses estressores ambientais se tornarem mais prevalentes, eles não selecionarão fenótipos metabólicos específicos em populações naturais.

Palavras-chave: variabilidade, metabolismo, estressores ambientais

Introdução

As diversas espécies de peixes presentes nos habitats dulcícolas tropicais, que constituem um componente muito importante da biota local, serão cada vez mais expostas a alterações em seu habitat devido a mudanças oriundas do aquecimento global. Espera-se que tal processo cause aumentos significativos nas temperaturas médias globais e, em particular, na frequência de exposição a temperaturas extremas (IPCC 2014; Buckley and Huey, 2016). A temperatura exerce uma grande influência na fisiologia dos peixes devido a sua relação com todos os processos metabólicos (Fry 1947; 1971) e o aumento na demanda por O₂ deve ser atendido via alterações nas atividades dos sistemas respiratório e cardiovascular. Dessa forma, a capacidade de ajustes cardiorrespiratórios é de primordial relevância, pois definem os limiares superiores de temperatura em que os peixes sofrem danos na capacidade de desempenho em seu ambiente ou, eventualmente, morrem (Portner 2010; Portner and Farrell 2010; Eliason et al. 2011; Schulte 2015).

A metodologia comumente utilizada a fim de se avaliar a tolerância térmica superior em peixes é o protocolo intitulado de “temperatura crítica máxima” (CT_{max}) (Beitinger and Lutterschmidt, 2011). O CT_{max} é medido experimentalmente por meio de aumentos gradativos na temperatura da água até que se atinja a temperatura letal incipiente, definida como aquela em que os animais perdem a capacidade em manter o equilíbrio dorsoventral (LOE). A alta severidade e a não elucidação dos mecanismos fisiológicos relacionados à tolerância durante o CT_{max} são temas em vigente pauta acerca da eficácia de tal metodologia (Beitinger and Lutterschmidt, 2011; Wang et al., 2014; Lefevre 2016; Jutfelt et al. 2018).

Além do aquecimento, os peixes de ambientes dulcícolas também serão mais frequentemente expostos a situações de hipóxia (Diaz and Breitburg, 2009; Costa and Barletta, 2016). Apesar da ocorrência natural em tais habitats, se pode afirmar que o aumento nas atividades industriais, a poluição antropogênica e a alteração do meio ambiente têm promovido o enriquecimento orgânico e nutricional dos corpos de água, o que leva à eutrofização da água e conseqüentemente a recorrentes exposições de hipóxia ambiental (Diaz and Breitburg, 2009; Costa and Barletta, 2016). A hipóxia limita a habilidade de

desempenho dos peixes em seus ambientes naturais, uma vez que se tornam incapazes de atender as demandas por O_2 e de possivelmente realizarem atividades aeróbicas (Fry 1947; 1971).

Quando expostos à hipóxia, os peixes usam uma variedade de respostas cardiorrespiratórias e comportamentais visando otimizar a captação de O_2 e o seu transporte aos tecidos (Perry et al., 2009; Farrell and Richards, 2009). O limiar para a deficiência fisiológica ocorre quando nível de O_2 na água é tão baixo que, apesar das respostas fisiológicas e comportamentais, os peixes não conseguem atender os requerimentos basais de O_2 tecidual e se tornam dependentes do metabolismo anaeróbico. Abaixo desse limiar, a taxa metabólica “conforma-se” diretamente com a disponibilidade de O_2 na água como uma estratégia de resistência transitória. Nesse nível, se a situação persistir, a maioria das espécies eventualmente colapsam e morrem (Perry et al., 2009; Farrell and Richards, 2009; Claireaux and Chabot 2016). Os protocolos de respirometria são usados para avaliar esse limiar subletal. A taxa de captação de oxigênio ($\dot{M}O_2$) é medida durante reduções progressivas, graduais e contínuas nos níveis de O_2 da água, para definir o nível em que a captação cai abaixo da taxa metabólica padrão (SMR) (Claireaux & Chabot 2016). Esse limite subletal, chamado de pressão parcial crítica de O_2 (P_{crit}) ou saturação crítica de O_2 (S_{crit}), varia significativamente entre as espécies de peixes, estando intimamente associado à fisiologia, ecologia e estilo de vida das mesmas (Claireaux & Chabot 2016; Rogers et al., 2016).

Dado que ambos os estressores acima citados agem de forma semelhante, ou seja, alterando a capacidade de suprimento de O_2 , vários estudos têm investigado se a variação individual na tolerância a tais agentes é positivamente correlacionada (Antilla et al., 2013; 2014; Claireaux et al., 2013; Healy et al., 2018). É importante ressaltar que há evidências de que a variação individual no fenótipo metabólico intrínseco esteja relacionada com a tolerância ao aquecimento agudo e à hipóxia (Ozolina et al., 2016; Norin et al., 2015).

Dessa forma, o presente estudo avaliou a variação individual na tolerância ao aquecimento agudo e à hipóxia. Especificamente, investigou-se se a variação no fenótipo metabólico intrínseco poderia estar relacionada com a tolerância a tais estressores e também testou-se a hipótese de que a tolerância a ambos agentes seja positivamente correlacionada. A espécie escolhida foi um

serrasalmídeo da América do Sul, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Tal escolha é adequada para a investigação já que se trata de uma espécie migratória e amplamente distribuída no Brasil, abrangendo o território desde o Amazonas até a bacia do Paraná-Paraguai (Severi, 1991). Em relação às características ambientais vivenciadas pelo pacu, foi relatado que são comumente expostos em seu habitat natural a temperaturas que variam de 15°C a 35°C (Milstein, 2000) e são caracteristicamente resistentes à hipóxia (Rantin et al., 1998). Para melhor compreender os mecanismos subjacentes à tolerância térmica, usamos o protocolo desenvolvido por Blasco et al., 2020, que consiste em expor o peixe a aumentos gradativos na temperatura da água enquanto nadam a uma alta velocidade aeróbica sustentada. Esse protocolo tem a vantagem de parecer estar ligado à capacidade do sistema cardiovascular em fornecer O₂, assim como o protocolo S_{crit} usado nos testes de tolerância à hipóxia.

Materiais e Métodos

Animais

Para o presente estudo foram utilizados exemplares juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*, n = 24), de ambos os sexos e fornecidos pela Piscicultura Poletini, localizada em Mogi Mirim (Estado de São Paulo). Os peixes foram transportados para o Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos (São Carlos-SP), e mantidos em tanques presentes em um ambiente fechado. Os tanques (500L) que continham os peixes foram abastecidos continuamente com água bem aerada, dentro de um sistema recirculante biofiltrado, com temperatura média de 25 ±1°C e expostos a fotoperíodo natural. Os peixes foram alimentados *ad libitum* a cada dois dias com pellets comerciais. Após três semanas de aclimatação, os animais foram anestesiados (0.1 g l⁻¹ de benzocaína) e marcados (PIT tag) para a identificação individual. Cada peixe foi submetido a todos os protocolos experimentais abaixo descritos e a inserção da TAG permitiu a identificação individual. Entre os protocolos experimentais possibilitou-se a cada indivíduo um tempo hábil para a recuperação (pelo menos 1 semana) e em condições de manutenção de rotina.

Antes do uso em experimentos os peixes foram submetidos a jejum por 24h. O estudo foi conduzido sob a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA / UFSCar).

Desempenho de natação e fenótipo metabólico

Foram utilizados diferentes protocolos (natação e respirometria estática) para medir o desempenho de natação e os fenótipos metabólicos de cada indivíduo. A respirometria de natação foi usada para medir os elementos de desempenho de exercício e do metabolismo intrínseco, e também para estabelecer a velocidade de natação usada no teste “temperatura crítica máxima de natação” (CT_{swim} , ver abaixo). A respirometria estática foi usada para obter uma medida adicional da taxa metabólica padrão (SMR), com o intuito de utilizá-la no cálculo da tensão crítica de O_2 nos mesmos respirômetros (S_{crit} , ver abaixo).

Respirometria de natação

A respirometria de natação foi realizada em respirômetro de natação do tipo Steffensen, construído em Plexiglass (volume 13,4l) e projetado para exercitar os peixes em um fluxo de água não turbulento e com um perfil de velocidade uniforme (McKenzie et al., 2007).

Previamente ao protocolo de natação, mediu-se cada peixe em relação à sua massa (com precisão de 0,1g), comprimento, altura e largura (com precisão do mm mais próximo), a fim de estimar o efeito do bloqueio no fluxo de água causado pelo corpo do animal dentro túnel de natação (Bell and Terhune, 1970). Tal medição também foi necessária para a posterior exposição dos animais a velocidades de natação expressas em comprimentos corporais. s^{-1} (“body length. s^{-1} ” - $BL.s^{-1}$). Em seguida, cada peixe foi alocado no respirômetro de natação a uma velocidade equivalente a 1 $BL.s^{-1}$ e foi permitido que se recuperassem ao longo da noite. O respirômetro foi continuamente abastecido por fluxo de água a 26°C e mantido sob aeração constante. Na manhã seguinte, os animais foram expostos a aumentos progressivos na velocidade de natação, de 1 $BL.s^{-1}$ a cada 30 minutos, até um máximo de 5 $BL.s^{-1}$. Ao atingir essa velocidade, foram expostos a aceleração constante de 0,1 $BL.s^{-1}$ a cada 10 s até

a fadiga, sendo essa velocidade denominada como a “velocidade máxima de natação” (U_{max} , Blasco et al., 2020). Durante a aceleração constante, cada peixe fez a transição de um perfil de natação aeróbica constante para uma natação de explosão anaeróbica - ‘burst-and-coast’ (Webb 1998; Marras et al., 2013; Blasco et al., 2020). A velocidade imediatamente anterior à transição no perfil de natação constante para a ‘burst-and-coast’ foi considerada como a velocidade aeróbica máxima, também conhecida como a velocidade de transição (U_{GT} , Blasco et al., 2020). Após a fadiga, a velocidade do respirômetro era imediatamente reduzida para $1 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$ e os animais ficavam em recuperação por 30 min. O peixe era então removido do túnel e colocado em seu tanque de contenção para se recuperar por pelo menos 96h antes de qualquer protocolo subsequente.

A captação de O_2 ($\dot{M}\text{O}_2$, $\text{mmolO}_2\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) foi calculada em cada velocidade de natação de 1 a $5 \text{ BL}\cdot\text{s}^{-1}$, por meio da respirometria intermitente de fluxo interrompido - ‘stopped flow’ (Steffensen et al., 1989) ao longo de um ciclo de 15 min. Uma vez que os animais permaneceram 30 min em cada velocidade, foi possível realizar duas medidas de $\dot{M}\text{O}_2$ para cada aumento de velocidade. A concentração de O_2 na água foi medida continuamente por meio de uma sonda ótica de oxigênio e medidor (Fibox. Pre-sens GmbH. www.presens.de) e o software correspondente (Pre-sens Oxyview). A $\dot{M}\text{O}_2$ foi então calculada considerando a taxa de declínio na concentração de O_2 ($r^2 \geq 0.9$), o volume de água no tanque de natação e a massa do peixe (McKenzie et al., 2007, 2003). Para cada peixe e teste de natação individual, uma regressão exponencial foi aplicada à relação entre a velocidade de natação e às medidas de $\dot{M}\text{O}_2$. A extrapolação para o eixo y, uma velocidade hipotética de zero, foi empregada para corrigir a contribuição da atividade muscular locomotora para a $\dot{M}\text{O}_2$ (Brett, 1964; Fry, 1971). Essa foi usada como uma estimativa confiável da taxa metabólica padrão (SMR_{swim}). A taxa metabólica ativa (AMR) também foi calculada baseada na regressão exponencial, extrapolando a possível $\dot{M}\text{O}_2$ na velocidade máxima de natação aeróbica (U_{GT}). O aumento aeróbico (AS) foi calculado como $\text{AMR} - \text{SMR}$.

Respirometria estática

Durante o protocolo de respirometria estática, a $\dot{M}O_2$ foi medida por meio da técnica de fluxo interrompido intermitente automatizado - 'stopped-flow' (Steffensen et al., 1989; McKenzie et al., 2014). Foram utilizadas quatro câmaras respirométricas de plástico (vol. 4,4 l) que ficaram imersas em 20 cm de água dentro de um tanque raso. O tanque recebeu um fluxo de água biofiltrada à temperatura constante de 26°C e sob um fotoperíodo natural. A fim de manter um baixo nível de perturbação durante a execução do protocolo experimental, a iluminação do ambiente era baixa e uma película opaca de plástico preto foi posicionada acima do tanque para minimizar qualquer estímulo visual dos peixes, além disso foi evitado que os animais pudessem ver ou interagir uns com os outros enquanto estivessem em seus respirômetros (McKenzie et al., 2014). Todos os peixes foram colocados dentro dos respirômetros no mesmo horário (entre às 16h e 17h), dessa forma os efeitos dos ritmos circadianos na taxa metabólica deveriam ser comparáveis entre as execuções experimentais.

Usando o ciclo de fluxo interrompido intermitente 'stopped-flow', a $\dot{M}O_2$ foi registrada a cada 20 min durante 36h (McKenzie et al., 2014). Os níveis de O_2 no interior dos respirômetros foram medidos e registrados a cada 15s por meio do uso de optodos (PreSens Oxy-4 mini) e o software correspondente (Pre-Sens Oxy 4v2). As taxas de captação de O_2 foram então calculadas em $mmolO_2.kg^{-1}.h^{-1}$, usando a regressão linear de mínimos quadrados durante cada fase do fluxo interrompido, como descrito anteriormente (McKenzie et al. 2013; 2014). O consumo de O_2 oriundo da respiração bacteriana ('background') foi medido ao final de cada protocolo experimental, após a remoção dos peixes de seus respectivos respirômetros. Tal consumo nunca excedeu 5% do $\dot{M}O_2$ dos peixes e uma vez que foi demonstrado como sendo insignificante, nenhuma correção foi aplicada.

Nesse protocolo, a SMR foi estimada pelo método quantil (Dupont-Prinet et al., 2010; Chabot et al., 2016). Este pressupõe que uma certa proporção de todas as taxas medidas de RMR estejam abaixo da verdadeira SMR devido à variabilidade temporal e possíveis erros de medição. O quantil divide o conjunto de dados entre valores do menor q e maior $1 - q$. Para o presente protocolo

experimental, q foi fixado em 0,15 (according Chabot et al., 2016), tanto que 15% dos valores caíram abaixo da verdadeira SMR.

Tolerância ao aquecimento e hipóxia

Protocolo da Temperatura crítica máxima de natação (CT_{swim})

Neste protocolo, os peixes foram desafiados a nadar a 85% de seu próprio U_{GT} e então expostos a aquecimento gradual a uma taxa de 1 °C a cada 30 min. A uma certa temperatura, cada peixe fez a transição de um perfil aeróbico de natação estável para uma natação anaeróbica de explosão (burst and coast) e, logo em seguida, posicionou-se na porção final do respirômetro. Portanto, a variável de resposta no CT_{swim} foi a fadiga (Blasco et al., 2020). A $\dot{M}O_2$ foi medida ao longo dos últimos 10 min de cada etapa de temperatura, como descrito para a respirometria de natação acima (Blasco et al., 2020). A CT_{swim} foi calculada usando-se a última temperatura completada mais uma proporção do período de tempo em que o peixe ficou exposto na temperatura que fadigou. Imediatamente após a fadiga, os peixes foram colocados em um tanque contendo água a 26°C. Uma vez recuperado o comportamento normal de natação, foram transferidos para os tanques de contenção para se recuperarem por pelo menos 96h antes de qualquer protocolo subsequente.

Protocolo do Máximo Térmico Crítico (CT_{max})

A fim de estimar o CT_{max} , seis peixes foram colocados em um tanque de 68L a 26°C e deixados ao longo da noite para se recuperarem do estresse do manuseio. Na manhã seguinte, a água do tanque foi gradualmente aquecida em 1 °C a cada 30 min. A água foi vigorosamente aerada, o que também serviu para evitar estratificação térmica. O CT_{max} foi marcado pela perda de equilíbrio (LOE), a qual envolve a perda da orientação dorsoventral. A CT_{max} foi calculada usando-se a última temperatura completada mais uma proporção do período de tempo exposto na temperatura em que o peixe apresentou a LOE. Ao atingir LOE, cada peixe foi rapidamente transferido para um tanque de recuperação, o qual continha água a 26°C. Assim que retomaram o comportamento normal de

natação, foram transferidos de volta para seus tanques de contenção para se recuperarem por pelo menos 96h antes de qualquer protocolo subsequente.

Exposição à hipóxia

Após 36h de respirometria estática, os peixes foram expostos à hipóxia progressiva sob respirometria fechada (Rogers et al., 2016). Para tal, desligou-se a bomba de renovação, interrompendo a entrada de água em normóxia, e os peixes consumiram o O₂ de sua câmara até atingir a saturação de 5%. Uma vez atingido tal nível de saturação de O₂ no interior dos respirômetros, os peixes foram removidos das caixas experimentais e alocados pelo período de 30 min em um tanque com água aerada, a fim de se recuperarem da exposição à hipóxia. Decorrido esse período de tempo, foram transferidos para os tanques de contenção. As medidas de $\dot{M}O_2$ foram então calculadas de 95 a 5% de saturação de oxigênio, em etapas de 5 (95, 90, 85, 80 etc) ao longo do declínio progressivo na saturação de O₂. O S_{crit} foi calculado por uma regressão linear dos valores de $\dot{M}O_2$ hipóxico que ficaram abaixo da SMR dos indivíduos.

Análise estatística

Um teste T pareado foi usado para comparar CT_{swim} e CT_{max}. O Coeficiente de Variação (CV) foi aplicado para verificar a variabilidade individual dentro das variáveis. O Coeficiente de Correlação de Pearson foi usado para descrever as correlações entre as variáveis medidas. Todas as análises foram realizadas com o Sigma Plot 13.0 (Systat Software Inc.). Devido às múltiplas comparações no teste de correlação, uma Taxa de Detecção Falsa (FDR) foi aplicada para correções, e os efeitos foram considerados estatisticamente relevantes para $p \leq 0,05$. Os resultados são apresentados como médias \pm SEM.

Resultados

O coeficiente de variação (CV) pode ser utilizado como uma interessante ferramenta quando deseja-se descrever a variabilidade dentro de uma dada população. Como evidenciado, este diferiu bastante entre todas as variáveis medidas, apresentando menores valores para as variáveis relacionadas ao

desempenho de natação e também para as medidas de tolerância térmica. Em contrapartida, tanto as variáveis que compreendem o fenótipo metabólico intrínseco, quanto a variável usada como medida de tolerância à hipóxia apresentaram maiores valores de CV (Tabela 1).

Tabela 1: Variáveis morfológicas, de desempenho de natação, do fenótipo metabólico, de tolerância ao aquecimento agudo e de tolerância à hipóxia em *Piaractus mesopotamicus*.

		Mean \pm SE	Maximum	Minimum	CV
Morphological variables	Mass (g)	80.9 \pm 4.9	138.2	47.3	29.3
	Forklength (mm)	132.6 \pm 3.4	160	110	12.1
Swimming performance	U _{GT} (BL s ⁻¹)	7.0 \pm 0.1	8.0	5.9	7.8
	U _{MAX} (BL s ⁻¹)	7.8 \pm 0.1	9.1	6.7	9.0
Metabolic phenotype	SMR _{swim} (mmolO ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	3.8 \pm 0.2	5.1	2.3	20.0
	AMR (mmolO ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	22.4 \pm 1.3	39.5	15.0	27.5
	AS (mmolO ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	18.6 \pm 1.3	35.8	10.3	33.3
	SMR _{static} (mmolO ₂ h ⁻¹ kg ⁻¹)	3.3 \pm 0.1	5.1	2.4	21.8
Warming tolerance	CT _{swim} (°C)	38.0* \pm 0.2	39.2	35.2	2.6
	MO ₂ Max CT _{swim}	29.5 \pm 0.6	34.63	25.14	10.3
	MO ₂ 26°C CT _{swim}	16.5 \pm 0.8	23.21	6.67	24.5
	Scope for MO ₂	13.0 \pm 0.8	22.53	6.20	30.5
	CT _{max} (°C)	39.7* \pm 0.1	40.6	39.1	1.1
Hypoxia tolerance	Scrit (%O ₂)	18.6 \pm 1.6	31.8	9.0	42.0

Valores apresentados como média \pm SE, Máximo, Mínimo e Coeficiente de variação (CV); $n=24$.
(*) indica diferença significativa CT_{swim} and CT_{max}.

Fenótipo metabólico e de desempenho de natação

Durante a parte de aceleração constante do protocolo de natação, cada peixe fez a transição de um perfil de aeróbico estável para um perfil anaeróbico instável. Ao calcular a diferença entre U_{GT} e U_{max} evidencia-se que essa foi menor do que 1 BL (Tabela 1), indicando que a natação anaeróbica não pôde ser sustentada por um longo período, o que levou rapidamente à fadiga. As três variáveis do metabolismo intrínseco medidas durante o teste de natação variaram bastante (Tabela 1). Houve, entretanto, uma forte correlação entre SMR_{swim} e SMR_{static} (Figura 1) (Tabela 1), o que indica que a variação individual para essa característica é repetível e relativamente estável ao longo do tempo.

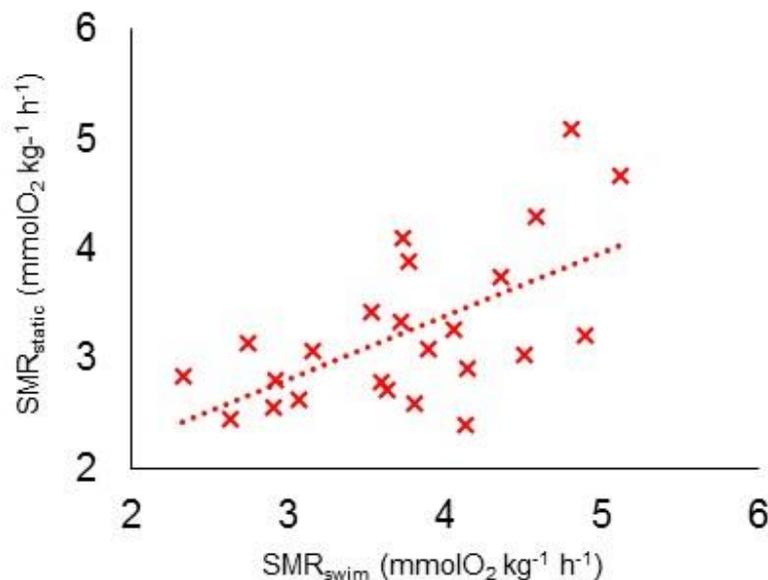


Figura 1: Relação entre SMR_{swim} e SMR_{static} encontrada em exemplares de *Piaractus mesopotamicus*. Resultados são $y=0,57711x+1,0855$ ($r=0,61$; $p=0,001$), $n=24$.

Tolerância ao aquecimento e à hipóxia

Aquecimento como CT_{swim} e CT_{max}

O CV referente aos protocolos de tolerância térmica foi muito menor do que para todas as outras variáveis (Tabela 1). O CT_{swim} foi significativamente menor do que o CT_{max} , em quase $2^{\circ}C$ (Tabela 1). A média do $\dot{M}O_2$ a $26^{\circ}C$ CT_{swim} , ou seja, a 85% do U_{GT} no início do CT_{swim} , foi notavelmente próxima à média do

AMR medido no teste de desempenho de natação (Tabela 1). O valor médio para o $\dot{M}O_{2\max}CT_{swim}$ foi muito maior do que o AMR (Tabela 1).

Durante o protocolo CT_{swim} , a uma certa temperatura de aquecimento, cada peixe fez a transição de um perfil aeróbico estável para um perfil anaeróbico de explosão instável -'burst-and-coast', seguida da fadiga. Não houve qualquer evidência de LOE durante este protocolo. No protocolo CT_{max} , a uma certa temperatura elevada, cada peixe demonstrou comportamento errático anteriormente ao LOE. Não houve mortalidade em nenhum dos protocolos de aquecimento e todos os peixes recuperaram seu comportamento normal em menos de 1 hora em um tanque a 26°C.

Hipóxia

Durante o protocolo de hipóxia, os exemplares de *P. mesopotamicus* apresentaram a resposta esperada. Por se tratar de uma espécie oxirreguladora, a média no $\dot{M}O_2$ se manteve constante desde a normóxia até um amplo espectro de reduções na PO_2 . Ao atingir uma determinada saturação de O_2 na água, foi observada uma evidente redução no $\dot{M}O_2$ (Figura 2). O S_{crit} médio foi de 18,6% e o CV foi o maior entre todas as variáveis medidas (Tabela 1).

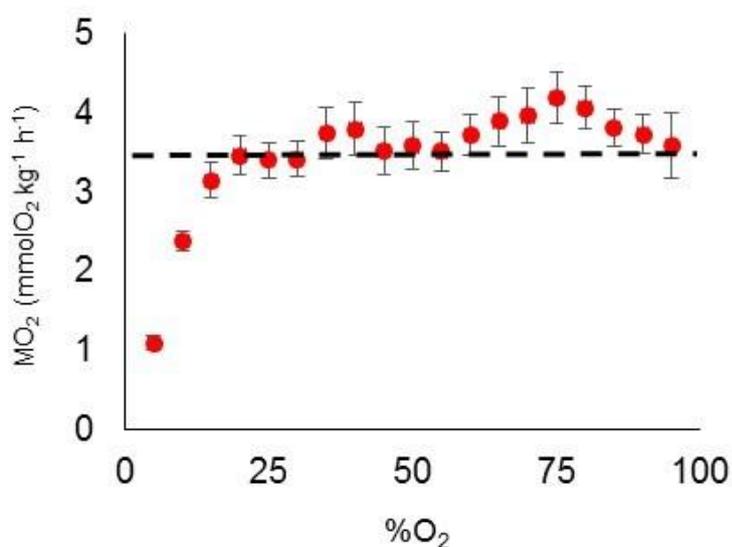


Figura 2: Consumo de oxigênio ($\dot{M}O_2$) em *Piaractus mesopotamicus* em relação a reduções graduais na % O_2 da água. A linha tracejada indica o SMR calculado para a espécie. Os valores são apresentados como apresentados como média \pm EPM, $n=24$.

Tolerância cruzada entre aquecimento agudo e hipóxia

Não houve qualquer evidência de correlação entre CT_{max} e S_{crit} , em contrapartida foi encontrada uma correlação entre CT_{swim} e S_{crit} (Figura 3). Essa última se apresentou de forma negativa, ou seja, os indivíduos com que tiveram os menores valores no protocolo de tolerância à hipóxia (S_{crit}) foram os mesmos que apresentaram os maiores valores no protocolo de tolerância ao aquecimento agudo (CT_{swim}). Tal achado é uma robusta evidência de tolerância cruzada, na qual os indivíduos tolerantes à hipóxia também eram tolerantes ao aquecimento.

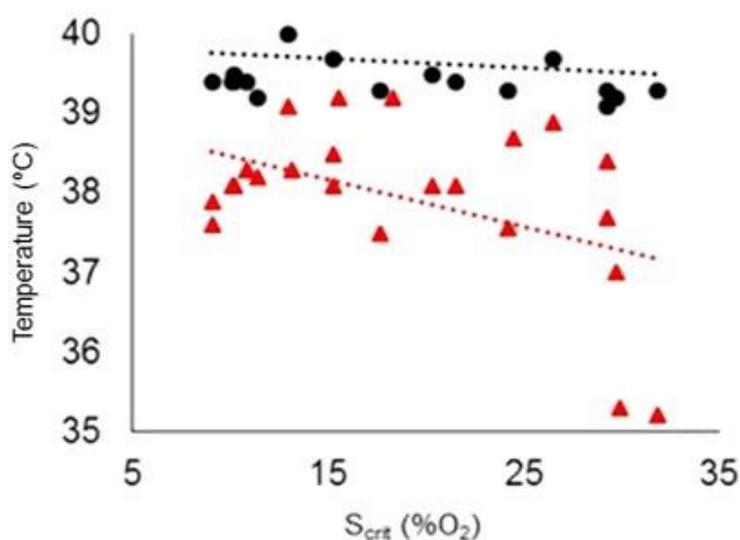


Figura 3: Relação entre S_{crit} e CT_{max} (círculos pretos) e S_{crit} e CT_{swim} (triângulos vermelhos) em *Piaractus mesopotamicus*. Resultados são $y = -0,0122x + 39,884$ ($r = -0,216$; $p = 0,310$) e $y = -0,0599x + 39,075$ ($r = -0,47$; $p = 0,021$), respectivamente, $n = 24$.

Dependência do fenótipo intrínseco de tolerância ao aquecimento e hipóxia

Nenhuma das três variáveis de tolerância apresentaram dependência em relação à massa ou comprimento. A tolerância ao aquecimento, seja o CT_{max} ou CT_{swim} , não foi dependente do metabolismo padrão intrínseco ou da capacidade de fornecimento de oxigênio. Ou seja, não houve relação significativa entre essas características de tolerância e as variáveis do fenótipo metabólico calculadas no protocolo de natação- SMR, AMR ou AS (Figura 4). Além disso,

a tolerância à hipóxia não estava correlacionada à demanda padrão de oxigênio, uma vez que S_{crit} não foi dependente de SMR_{static} (Figura 5).

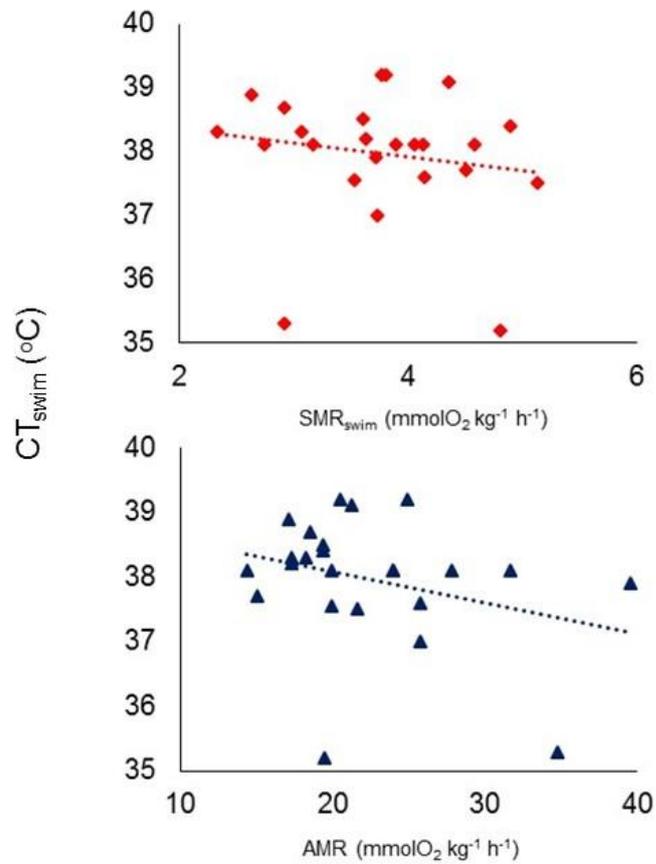


Figura 4: Relação entre SMR_{swim} e CT_{swim} e AMR e CT_{swim} em *Piaractus mesopotamicus*. Resultados são $y = -0,2139x + 38,767$ ($r = -0,161$; $p = 0,453$) e $y = -0,0478x + 39,036$ ($r = -0,295$; $p = 0,162$), respectivamente, $n = 24$.

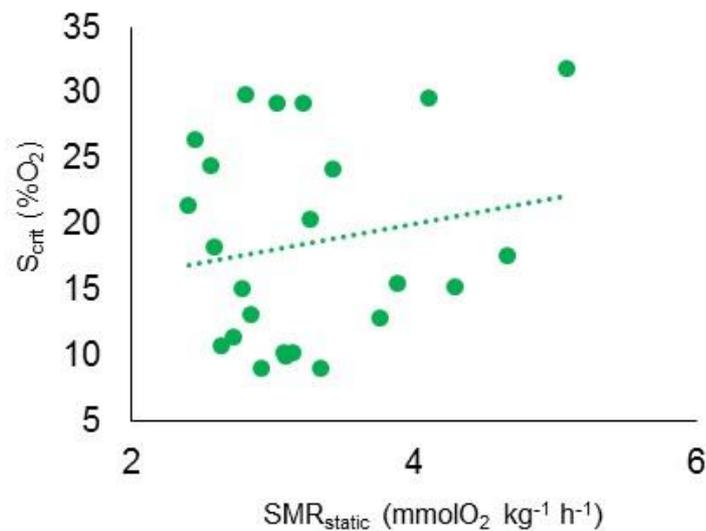


Figura 5: Relação entre SMR_{static} e S_{crit} em *Piaractus mesopotamicus*. Resultados são $y=2,001x+12,055$ ($r=0,182$; $p=0,394$), $n=24$.

Correlações gerais

A tabela de correlação para todas as variáveis está disponível em materiais suplementares, Tabela S1. Baseado nessas últimas correlações, o limite de significância com base na taxa de falsa descoberta é $q \geq 0,05$ (Pike, 2010). A tabela S1 revela que algumas correlações esperadas, como uma relação negativa entre massa corporal e SMR, não foram encontradas. Outras correlações interessantes que surgiram foram a positiva entre massa e U_{GT} (mas não U_{max}), e a negativa entre massa e $\dot{M}O_2$ MAX CT_{swim}.

Discussão

A fim de melhor compreender os potenciais impactos das mudanças globais nas populações naturais de peixes, há a necessidade de focar o estudo na variação individual quanto à tolerância a estressores como o aquecimento e a hipóxia (McKenzie et al., 2016; Norin et al., 2015). Isso se faz necessário uma vez que os fatores ambientais agem sobre cada indivíduo de uma dada população e a faixa de tolerância exibida pelos integrantes será determinante em garantir a sobrevivência e os efeitos que se estendem ao nível das espécies ou

comunidades (Le Quesne and Pinnegar 2012; Chave, 2013; Cooke et al., 2014; Heffernan et al., 2014; McKenzie et al., 2016).

A descoberta de tolerância cruzada entre o aquecimento agudo e a hipóxia é um achado muito interessante em termos de conservação, uma vez que a ocorrência de ambos os estressores se tornará mais frequente e vigorosa (IPCC, 2014). Tal resposta permite inferir que os indivíduos que são capazes de lidar com um estressor, também parecem ser capazes de lidar com o outro. Entretanto, a tolerância parece não estar ligada ao fenótipo metabólico intrínseco, o que nos faz considerar que a exposição a tais estressores não levará à seleção de um fenótipo metabólico em particular. Esses aspectos tornam a pesquisa sobre variabilidade individual na tolerância a estressores, como o aquecimento e a hipóxia, um campo bastante promissor. Ou seja, se os mecanismos subjacentes à variabilidade individual na tolerância forem conhecidos, eles poderão fornecer informações importantes quanto às consequências ecológicas e evolucionárias dos estressores.

Variação na tolerância

A tolerância ao aquecimento agudo foi medida de modo diferente nos dois protocolos usados. A descoberta que o CT_{swim} era aproximadamente 2°C menor do que o CT_{max} vai ao encontro com as respostas obtidas em um estudo anterior da espécie (Blasco et al., 2020). Além da diferença nos valores médios entre os protocolos de aquecimento, é interessante ressaltar que o CV no CT_{max} tenha sido menor do que o CV no CT_{swim} .

Pode-se elucubrar que os mecanismos relacionados à LOE em CT_{max} desempenhem um papel neste baixo CV apresentado. Uma vez que o mecanismo subjacente à LOE em CT_{max} é desconhecido (Antilla et al., 2013; 2014), podemos hipotetizar que este evento esteja relacionado a alguma característica altamente conservada na espécie, como por exemplo a temperatura extrema que causa desnaturação enzimática ou espasmos musculares e perda de coordenação motora, refletindo assim uma tolerância térmica máxima que é bastante similar entre indivíduos.

Algumas evidências experimentais indicam que a LOE não está relacionada ao transporte sanguíneo de oxigênio. A fim de compreender o papel

do fornecimento e distribuição de O₂ durante o protocolo CT_{max}, Wang et al (2014) induziram anemia no robalo-europeu *Dicentrarchus labrax* e expuseram os peixes ao aquecimento agudo. Curiosamente, eles descobriram uma redução muito pequena (0,7 °C) na tolerância à temperatura entre os grupos controle e anêmico. Além disso, eles reportaram que a função cardiovascular também não pareceu estar comprometida nas temperaturas mais altas (Wang et al., 2014). De modo similar, Ern et al (2016) expuseram *Cyclopterus lumpus* e *Sciaenops ocellatus* a uma ampla faixa de P_{W_O2} e descobriram que os valores de CT_{max} eram independentes da disponibilidade de oxigênio ao longo de uma larga faixa de níveis de O₂, concluindo que a tolerância térmica nas espécies estudadas não estava ligada à capacidade de fornecimento de O₂.

Outros estudos relataram uma pronunciada variação individual na tolerância ao aquecimento agudo (Antilla et al., 2013; 2014; Claireaux et al., 2013; Ozolina et al., 2016), porém sem avanços em identificar de maneira eficiente o mecanismo associado a tal resposta.

No presente estudo a média para a S_{crit} foi de 18,6% (equivalente a 27mmHg P_{crit}), sendo um valor levemente menor do que o reportado anteriormente para a espécie (34 torr - Rantin et al., 1998). Enquanto a maioria dos estudos (84%) focam no P_{crit} para RMR (Rogers et al., 2016), alguns autores têm reportado que o P_{crit} para o SMR é fisiologicamente e ecologicamente mais relevante (Ultsch and Regan, 2019; Claireux and Chabot, 2016). O fato de que o CV para S_{crit} foi tão alto é interessante, especialmente porque ele é tão maior que o CV para a tolerância térmica. Não há estudo algum publicado que tenha, no entanto, investigado a variação individual em S_{crit} para SMR em qualquer espécie (Rogers et al., 2016).

Tolerância cruzada

O presente estudo é um dos poucos a investigar a tolerância cruzada entre o aquecimento agudo e à hipóxia em peixes (Antilla et al., 2013; 2014; Claireaux et al., 2013; Healy et al., 2018), e o primeiro a usar a variação individual em CT_{swim} e S_{crit} como medidas comparativas para tolerância cruzada.

Nossos resultados confirmaram a hipótese de que haveria uma correlação positiva entre a variabilidade individual na tolerância ao aquecimento agudo e à

hipóxia. A presente descoberta é similar ao que foi reportado por Antilla et al (2013; 2014), onde em experimentos com famílias de salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*), evidenciaram que os limites para a LOE, durante CT_{max} e hipóxia aguda, eram positivamente correlacionados. Em contraste, Claireaux et al. (2013) não encontraram tal correlação em LOE dentro de uma população experimental de robalo-europeu (*Dicentrarchus labrax*). Em um estudo com *Fundulus heteroclitus*, usando a LOE como limiar de tolerância ao CT_{max} e à hipóxia, Healy et al (2018) encontraram um componente genético para a tolerância térmica e hipóxica, mas não evidenciaram a presença de genes ligados a ambos estressores. O caráter genético e sua influência na tolerância térmica e na tolerância à hipóxia já havia sido reportado anteriormente em *S.salar*. Antilla et al (2013) encontraram que os indivíduos de uma dada família ou indivíduos de famílias relacionadas possuíam maior similaridade nos valores de tolerância térmica e hipóxica quando comparados a indivíduos de famílias não relacionadas, sugerindo uma base genética para a variação em ambas as características.

O fato de termos encontrado uma tolerância cruzada entre o aquecimento agudo durante CT_{swim} - fadiga como limite - e S_{crit} é bastante interessante já que é consistente com a ideia de que ambos os protocolos, CT_{swim} e hipóxia progressiva, compartilham um modo de ação semelhante, o qual baseia-se na capacidade do peixe de atender às demandas metabólicas por O_2 . É interessante notar que nenhuma relação foi encontrada entre CT_{max} - LOE como limite - e S_{crit} e entre CT_{swim} e CT_{max} . A ausência de correlação pode estar relacionada ao fato de não compartilharem um mecanismo de ação em comum.

Metabolismo intrínseco

Em experimentos a fim de compreender a variação individual na tolerância térmica em exemplares de *D. labrax* durante o protocolo CT_{max} , Ozolina et al (2016) encontraram que os indivíduos que apresentavam baixos valores no SMR eram os mais resistentes ao aquecimento agudo. Porém, como no presente estudo, não encontraram correlação entre a tolerância ao aquecimento agudo e AMR ou AS, sugerindo que a capacidade aeróbica na temperatura de aclimação não pode ser usada como ferramenta a fim de prever a tolerância

nessa espécie (Ozolina et al., 2016). A repetibilidade em relação ao SMR reportada no presente estudo sugere que os dados são confiáveis e que a ausência de relação entre essa variável e as medidas de tolerância ao aquecimento agudo e hipóxia não está atrelada a problemas metodológicos e sim por se tratar de uma característica da espécie.

A ausência de qualquer relação entre o fenótipo metabólico intrínseco (SMR, AMR e AS) e a tolerância ao aquecimento agudo foi um achado interessante e requer alguma consideração. Ozolina et al. (2016) encontraram uma relação positiva entre a massa ventricular relativa (RVM) e a tolerância à temperatura. Da mesma forma, em experimentos com *S. salar*, Antilla et al (2013) além de reportarem a relação entre RVM e tolerância térmica, também encontraram uma correlação positiva entre a mioglobina cardíaca (Mb) e a tolerância à temperatura. Sabe-se que altos valores de RVM estão associados a um volume sistólico elevado (Farrell et al., 1991), então é possível que peixes com alto RVM sejam mais tolerantes ao aquecimento agudo devido a um melhor suprimento de sangue e O₂ aos tecidos (Ozolina et al., 2016). Por outro lado, Anelli et al (2004) em experimentos visando compreender a resposta cardíaca *in vitro* em um espectro de temperatura e usando pacu como modelo experimental, encontraram um padrão de cronotropismo positivo em resposta ao aquecimento agudo, em temperaturas variando de 25°C a 35°C, essa última apresentando os maiores valores de frequência cardíaca (f_H). Esses achados sugerem que o aumento em f_H é o principal ajuste desencadeado para manter o desempenho cardíaco durante aumentos agudos na temperatura. Pode-se argumentar que a tolerância térmica máxima durante os protocolos de aquecimento agudo esteja associada à incapacidade do coração de fornecer O₂ aos tecidos ativos.

Estudos prévios reportaram que a variação individual encontrada no SMR está associada à variação em respostas comportamentais à hipóxia em peixes (Killen et al. 2012; McKenzie et al., 2015). No robalo-europeu, indivíduos com alto SMR apresentaram maiores taxas de respiração de superfície aquática (Killen et al., 2012) enquanto que no bagre-africano, *Clarias gariepinus*, indivíduos com maior SMR subiram mais vezes à superfície para realizarem a respiração aérea (McKenzie et al., 2015).

As investigações até o momento examinaram os efeitos da hipóxia no RMR ao invés do SMR (Richards, 2009). No presente estudo, encontramos o

mesmo padrão de resposta em ambos os parâmetros (dados de RMR não apresentados). A ausência de relação entre SMR e S_{crit} foi inicialmente estranha já que esperávamos que indivíduos com menor SMR fossem mais tolerantes à hipóxia (Killen et al., 2012; 2016). Ou seja, se eles defendem uma menor demanda de O_2 , deveriam apresentar um S_{crit} menor.

Joyce et al (2016) em experimentos com *D.labrax* encontraram uma relação entre força de contração cardíaca e tolerância à hipóxia, sendo que os indivíduos tolerantes à hipóxia apresentaram uma maior força de contração quando comparados aos indivíduos sensíveis à hipóxia. A evidência de que a função cardíaca não está somente associada com a tolerância à temperatura, juntamente com as respostas encontradas no presente estudo, permite aferir projeções sobre a importância de novos estudos a fim compreender a importância de possíveis relações entre RVM ou força de contração e a tolerância ao aquecimento agudo e hipóxia na espécie em questão.

Referências Bibliográficas

- Anttila, K. et al. 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**, v. 216, n. 7, p. 1183–1190, 2013
- Anttila, K. et al. Association between swimming performance, cardiorespiratory morphometry and thermal tolerance in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). **Frontiers in Marine Science**, v. 1, n. December, p. 1–10, 2014
- Beitinger, T.L; Lutterschmidt, W.I. Measures of thermal tolerance. **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**, edited by Farrell, AP. San Diego, CA: Academic Press, p. 1695–1702, 2011.
- Bell, W. H. and Terhune, L. D. B. Water tunnel design for fisheries research. **Fisheries Research Board of Canada Technical Reports**, v. 195, p.1–69, 1970.
- Blasco FR, Esbaugh AJ, Killen S, Rantin FT, Taylor EW, McKenzie DJ. 2020 Using aerobic exercise to evaluate sub-lethal tolerance of acute warming in fishes. *J. Exp. Biol.* **223**, jeb218602. (doi:10.1242/jeb.218602).

- Brett, J. R. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**, v. 21, p. 1183–1226, 1964
- Buckley, L. B.; Huey, R. B. Temperature extremes: geographic patterns, recent changes, and implications for organismal vulnerabilities. **Global Change Biology**, p. n/a-n/a, 2016.
- Chabot, D.; Steffensen, J. F.; Farrell, A. P. The determination of standard metabolic rate in fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 81–121, 2016.
- Chave, J. The problem of pattern and scale in ecology: What have we learned in 20 years? **Ecology Letters**, v. 16, n. SUPPL.1, p. 4–16, 2013.
- Claireaux, G.; Chabot, D. Responses by fishes to environmental hypoxia: Integration through Fry's concept of aerobic metabolic scope. **Journal of Fish Biology**, v. 88, n. 1, p. 232–251, 2016
- Claireaux, G. et al. Effects of oil exposure and dispersant use upon environmental adaptation performance and fitness in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, v. 130–131, p. 160–170, 2013.
- Cooke, S. J. et al. Conservation Physiology Across Scales : Insights from the Marine Realm. **Conservation Physiology**, v. 2, n. May, p. 10.1093/conphys/cou024, 2014.
- Costa, M. F.; Barletta, M. Special challenges in the conservation of fishes and aquatic environments of South America. **Journal of Fish Biology**, p. 4–11, 2016.
- Diaz, R. J.; Breitburg, D. L. Hypoxia. In: RICHARDS, J. G.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (Eds.). . **Hypoxia, Fish Physiology Volume 27**. Fish Physiology. [s.l.] Elsevier, 2009. v. 27p. 1–23, 2009.
- Dupont-Prinet, A; Chatain, B; Grima, L; Vandeputte, M; Claireaux, G; Mckenzie, D.J. Physiological mechanisms underlying a trade-off between growth rate and tolerance of feed deprivation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **J Exp Biol**. v. 213. p.1143–1152, 2010.
- Eliason, E. J. et al. Differences in thermal tolerance among sockeye salmon populations. **Science (New York, N.Y.)**, v. 332, n. 6025, p. 109–12, 1 abr. 2011.
- Ern, R; Norin, T; Gamperl, A.K, Esbaugh, A.J. Oxygen dependence of upper thermal limits in fishes. **J Exp Biol** 219: 3376–3383, 2016.
- Farrell, A.P; Richards, J.G. Defining Hypoxia. In: Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ, editors. **Fish Physiology**. v.27. Elsevier, p. 487–503, 2009.

Fry, F. E. J. The effects of the environment on animal activity. **Univ. Toronto Stud., Biol. Ser.**, v. 55, p. 1–62, 1947.

Fry, F. E. J. The Effect of Environmental Factors on the Physiology of Fish. In: Hoar, W. S.; RANDALL, D. J. (Eds.). **Fish Physiology Volume 6**. New York: Academic Press, 1971. p. 1–98.

Healy TM, Brennan RS, Whitehead A, Schulte PM. Tolerance traits related to climate change resilience are independent and polygenic. **Glob Change Biol** 24: 5348–5360, 2018.

Heffernan, J. B. et al. Macrosystems ecology: Understanding ecological patterns and processes at continental scales. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 12, n. 1, p. 5–14, 2014.

Holt, R. E.; Jørgensen, C. Climate change in fish: effects of respiratory constraints on optimal life history and behaviour. **Biology letters**, v. 11, p. 20141032., 2015.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 2014, Summary for policymakers, in Core Writing Team, RK Pachauri, LA Meyer (eds) Climate Change 2014: Synthesis Report, Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change Geneva, Switzerland.

Joyce, W. et al. Individual variation in whole-animal hypoxia tolerance is associated with cardiac hypoxia tolerance in a marine teleost. **Biol Lett**, v. 12, n. 1, p. 20150708-, 2016.

Jutfelt, F et al. Oxygen-and capacity-limited thermal tolerance: blurring ecology and physiology. **Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 1, p. jeb169615, 2018.

Killen, S. S. et al. A relationship between metabolic rate and risk-taking behaviour is revealed during hypoxia in juvenile European sea bass. **Functional Ecology**, v. 26, n. 1, p. 134–143, 2012.

Killen, S. S. et al. Ecological Influences and Morphological Correlates of Resting and Maximal Metabolic Rates across Teleost Fish Species. **The American Naturalist**, v. 187, n. 5, p. 592–606, 2016.

Le Quesne, W. J. F.; Pinnegar, J. K. The potential impacts of ocean acidification: scaling from physiology to fisheries. **Fish and Fisheries**, v. 13, n. 3, p. 333–344, 14 set. 2012.

- Lefevre, S. Are global warming and ocean acidification conspiring against marine ectotherms? A meta-analysis of the respiratory effects of elevated temperature, high CO₂ and their interaction. **Conservation Physiology**, v. 4, n. 1, p. 10.1093/conphys/cow009, 2016.
- Marras, S. et al. Relationships among Traits of Aerobic and Anaerobic Swimming Performance in Individual European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e72815, 2013.
- Mckenzie, D. J. et al. Effects of growth hormone transgenesis on metabolic rate, exercise performance and hypoxia tolerance in tilapia hybrids. **Journal of Fish Biology**, v. 63, n. 2, p. 398–409, 2003.
- Mckenzie, D. J.; Pedersen, P. B.; Jokumsen, A. Aspects of respiratory physiology and energetics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) families with different size-at-age and condition factor. **Aquaculture**, v. 263, n. 1–4, p. 280–294, 2007.
- Mckenzie, D.J; Estivales, G; Svendsen, J.C; Steffensen, J.F; Agnese, J.F. Local Adaptation to Altitude Underlies Divergent Thermal Physiology in Tropical Killifishes of the Genus *Aphyosemion*. **PloS one** 8: e54345, 2013.
- Mckenzie, D.J; Vergnet, A; Chatain, B; Vandeputte, M; Desmarais, E; Steffensen, J.F; Guinand, B. Physiological mechanisms underlying individual variation in tolerance of food deprivation in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **J Exp Biol**, v.217: p.3283–3292, 2014.
- Mckenzie, D. J. et al. To boldly gulp: standard metabolic rate and boldness have context-dependent influences on risk-taking to breathe air in a catfish. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 23, p. 3762–3770, 2015.
- Mckenzie, D.J et al. Conservation physiology of marine fishes: state of the art and prospects for policy. **Conserv Physiol** 4: cow046, 2016.
- Norin, T.; Malte, H.; Clark, T. D. Differential plasticity of metabolic rate phenotypes in a tropical fish facing environmental change. **Functional Ecology**, p. n/a-n/a, 2015.
- Ozolina, K. et al. Intraspecific individual variation of temperature tolerance associated with oxygen demand in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Conservation Physiology**, v. 4, p. 1–10, 2016.
- Perry, S. F.; Jonz, M. G.; Gilmour, K. M. Oxygen sensing and the hypoxic ventilatory response. In: RICHARDS, J. G.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J.

(Eds.). . **Hypoxia, Fish Physiology Volume 27**. [s.l.] Academic Press/Elsevier, 2009. p. 194–255.

Pike N. Using false discovery rates for multiple comparisons in ecology and evolution: False discovery rates for multiple comparisons. **Methods Ecol Evol** 2: 278–282, 2011.

Pörtner, H. O. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. **The Journal of experimental biology**, v. 213, n. 6, p. 881–93, 2010.

Pörtner, H. O.; Farrell, A. P. Physiology and climate change. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, p. 690–692, 2008.

Rantin, F.T; Guerra ,C.D.R.; Kalinin, A.L; Glass, M.L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol** 119: 991–997, 1998.

Richards, J.G. Metabolic and molecular responses of fish to hypoxia. In: Richards JG, Farrell AP, Brauner CJ, editors. **Fish physiology**. Vol. 27. Elsevier Inc. p. 443–485, 2009.

Rogers, N.J; Urbina, M.A; Reardon, E.E; Mckenzie, D.J; Wilson, R.W. A new analysis of hypoxia tolerance in fishes using a database of critical oxygen level (P_{crit}). **Conserv Physiol**. v 4: cow012, 2016.

Saint-Paul, U.; Bernardinho, G. Behavioural and ecomorphological responses of the neotropical pacu *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalmidae) to oxygen-deficient waters. **Experimental Biology**, v. 48, n. 1, p. 19–26, 1988.

Schulte, P. M. The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 12, p. 1856–1866, 2015

Steffensen, J. F. Some errors in respirometry of water breathers: how to avoid and correct for them. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 6, p. 49–59, 1989.

Wang, T. et al. Anaemia only causes a small reduction in the upper critical temperature of sea bass: is oxygen delivery the limiting factor for tolerance of acute warming in fishes? **The Journal of Experimental Biology**, v. 217, p. 4275–4278, 2014.

Webb, P. W. Swimming. In "The Physiology of Fishes" (Evans, D. H., Ed.), CRC Press Marine Science Series, Boca Raton, FL, p. 3–24. 1998.

3.3 Artigo 3

A tolerância à exposição ao aquecimento agudo diminui com a massa corporal em tilápia-do-Nilo: evidências de uma ligação na capacidade de captação de oxigênio.

(Artigo a ser submetido no periódico Journal of Experimental Biology)

Resumo

Propõe-se que em peixes os indivíduos com maior massa possam ser os mais sensíveis ao aquecimento global devido às suas limitações na capacidade de fornecer oxigênio para as atividades metabólicas. Considerando o vigente cenário de mudanças climáticas, essa tolerância diferenciada poderia afetar as distribuições dos tamanhos dentro das populações, mas faltam evidências concretas acerca de tal ocorrência. No presente estudo, ao avaliar tal dependência em exemplares de tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*; n=18, massa variando de 21-313g), encontrou-se que a capacidade em fornecer oxigênio para as atividades aeróbicas (aumento aeróbico - AS) na temperatura de aclimação (26°C) foi independente da massa. No entanto, a tolerância ao aquecimento agudo diminuiu significativamente com a massa, quando avaliada como a temperatura crítica para a fadiga durante os testes de natação aeróbica (CT_{swim}). O protocolo CT_{swim} desafia o peixe a atender as demandas teciduais por oxigênio impostas pelo exercício aeróbico constante enquanto o metabolismo padrão é acelerado por conta aquecimento gradual na temperatura da água, culminando na fadiga. O CT_{swim} provocou aumentos pronunciados na captação de oxigênio, mas as taxas máximas alcançadas antes da fadiga diminuíram significativamente com a massa. A variação relacionada à massa no CT_{swim} e as taxas de consumo máximo de oxigênio foram positivamente correlacionadas, indicando uma relação causal. Quando confrontados com o estresse térmico agudo, os peixes com maior massa podem ficar restritos em sua capacidade de nadar a temperaturas mais baixas do que os coespecíficos de menor massa. Em um mundo com ondas de calor mais frequentes e severas, tal ocorrência poderia afetar a sobrevivência e aptidão de peixes maiores, gerando possíveis consequências para a produtividade da população e ecossistema.

Palavras-chave: GOL, alterações climáticas, metabolismo aeróbico.

Introdução

Há evidências de que o aquecimento global em curso esteja associado a uma progressiva redução no tamanho corpóreo final assintótico de muitas espécies de peixes (Daufresne et al., 2009; Baudron et al., 2014; Audzijonyte et al., 2020; Gardner et al., 2011). Os mecanismos relacionados a esse fenômeno ainda são desconhecidos, mas podem ser fisiológicos, e a sua investigação poderia aprimorar a capacidade de modelos de projeção das consequências das mudanças climáticas, em especial do aquecimento (Audzijonyte et al., 2019; Lefevre et al., 2017). Diversos estudos, a fim de melhor compreender tais mecanismos em peixes, têm direcionado as pesquisas para a eficiência nas trocas dos gases respiratórios em relação ao tamanho corpóreo e à temperatura. Tal direcionamento se faz adequado uma vez que a água é relativamente pobre em O₂ e, portanto, alcançar os requerimentos para o metabolismo aeróbico pode ser desafiador (Audzijonyte et al., 2019; Lefevre et al., 2017; Cheung et al., 2011).

O modelo intitulado de “brânquias limitando a captação de oxigênio” (GOL) postula que, conforme os peixes crescem, em geral a superfície das brânquias diminui em relação ao tamanho do corpo devido a limitações geométricas. A capacidade na captação de O₂, portanto, diminui com o aumento da massa e o tamanho corpóreo máximo é atingido no momento em as brânquias são capazes de apenas atender às necessidades do metabolismo padrão (SMR). Ou seja, os peixes de maior massa eventualmente apresentam uma incapacidade em promover o aumento aeróbico (AS) e, portanto, não conseguem fornecer O₂ para manter as diversas atividades aeróbicas, incluindo o anabolismo e o crescimento (Cheung et al., 2011; Pauly, 1981). Os peixes são animais ectotérmicos, portanto, quando aquecidos, a sua taxa metabólica e a associada demanda por O₂ aumentam (Fry, 1957; Schulte, 2015). Considerando a premissa contida no modelo GOL, pode-se inferir que um aumento na demanda metabólica padrão causaria uma limitação na capacidade das brânquias em obter O₂ em tamanhos próximos dos máximos. Dessa forma, o modelo tem sido usado para projetar possíveis reduções generalizadas no tamanho dos peixes devido ao aquecimento global (Cheung et al., 2011; Cheung

et al., 2012; Pauly & Cheung, 2017). No momento não há evidências de que em uma dada espécie de peixe o AS diminua com a massa, assim, o modelo GOL não é sustentado pelo conhecimento fisiológico ou pelos dados coletados (Audzijonyte et al., 2019; Lefevre et al., 2017; Killen et al., 2016).

A tolerância ao aquecimento agudo, no entanto, diminui com a massa em algumas espécies de peixes (Leiva et al., 2019; Mckenzie et al., 2020). Porém, os estudos não investigaram a fundo se essa relação (tamanho x tolerância ao aquecimento agudo) está associada a uma capacidade na captação de O₂ (Messmer et al., 2017; Christensen et al., 2020). A tilápia-do-Nilo *Oreochromis niloticus* é um teleósteo relativamente euritérmico (faixa térmica habitável 12-33°C) e com importante valor comercial em países tropicais e subtropicais (De Silva et al., 2004; Schofield et al., 2011). Dessa forma, utilizando exemplares de tilápia-do-Nilo que variaram em mais de uma ordem de magnitude em sua massa corporal, foram realizados uma série de testes a fim de investigar: (1) como a tolerância aos desafios de aquecimento agudo variava com a massa e (2) se isso poderia estar relacionado à variação na capacidade de captação de O₂ em decorrência da massa.

A fim de melhor interpretar qualquer efeito da massa na tolerância térmica, primeiramente mediu-se, por meio do uso da respirometria de natação, as principais características do metabolismo respiratório e do desempenho à temperatura de aclimatação (26°C). Em seguida, usando dois protocolos experimentais de tolerância térmica, investigou-se os efeitos da massa na tolerância ao aquecimento agudo. O protocolo intitulado “temperatura crítica máxima” (CT_{max}) é o método padrão para avaliar a tolerância. Nesse protocolo, o recinto onde os peixes estão alocados é aquecido gradativamente até que os animais apresentem a perda na capacidade em manter o equilíbrio dorsoventral (LOE), tal comportamento é usado para definir o limiar de tolerância (Beitinger & Lutterschmidt, 2011). No protocolo intitulado de “temperatura crítica para a natação aeróbica” (CT_{swim}) os peixes são alocados em um respirômetro de natação e desafiados a desempenharem um exercício aeróbico constante em paralelo a um aumento gradual na temperatura da água (na mesma taxa em que foram aquecidos durante o CT_{max}). Tal metodologia utiliza a fadiga apresentada durante a natação como o limiar de tolerância térmica (Blasco et al., 2020). Pode-se afirmar que o CT_{swim} avalia a capacidade de captação de O₂ uma vez que esta

metodologia desafia o peixe a alcançar as demandas combinadas por O₂ impostas tanto pelo exercício aeróbico (carga metabólica constante) quanto pelo aquecimento progressivo (carga metabólica incremental). O aquecimento causa um progressivo aumento na captação de O₂ até atingir uma taxa máxima, onde os peixes realizam a transição para uma natação anaeróbica insustentável que antecede a iminente fadiga (Blasco et al., 2020). Investigou-se, portanto, se a variação apresentada no CT_{swim} em peixes com diferente massa estava correlacionada com a captação máxima de O₂ anterior à fadiga, possivelmente evidenciando uma relação causal entre ambas as variáveis

Materiais e Métodos

Os animais utilizados no presente estudo são oriundos de populações de tilápia-do-Nilo e apresentam diferentes classes de tamanho e idade. Os indivíduos (n=18, faixa de massa de 20,6g a 313,0g) foram divididos em três grupos sequenciais compostos por seis indivíduos com tamanhos relativamente correspondentes em cada grupo. Os peixes foram mantidos no Departamento de Ciências Fisiológicas, UFSCar (São Carlos-SP) em tanques (vol. 1000L) com recirculação de água biofiltrada a 25±1°C. Após um período de pelo menos duas semanas, foram anestesiados (0.1g.l⁻¹ de benzocaína) e marcados (PIT Tag) para a identificação individual. Foi concedido o tempo de recuperação de pelo menos uma semana em um tanque interno (vol. 100L) com uma circulação de água oriunda do mesmo sistema e alimentados normalmente. Os animais jejuaram por 24h antes da experimentação e pesados no dia anterior à realização dos experimentos. Os animais não apresentaram mudanças na massa corpórea entre os testes subsequentes. Os protocolos experimentais foram aprovados pela CEUA/UFSCAR, número CEUA 3927151016.

O fenótipo metabólico e o desempenho de natação, na temperatura de aclimatação, foram medidos utilizando-se um respirômetro de natação do tipo Steffensen (volume 13,4L), abastecido com água biofiltrada, vigorosamente aerado e a uma temperatura de 26±1°C, como descrito em (Blasco et al., 2020). No dia anterior aos experimentos, os peixes foram transferidos para o respirômetro e expostos ao longo da noite a uma baixa velocidade de natação, equivalente a 1 comprimento corporal.s⁻¹ “bodylength.s⁻¹” (BL.s⁻¹, corrigida para

o efeito de bloqueio sólido) (Blasco et al., 2020). Na manhã seguinte, a cada 30 min aumentou-se a velocidade de natação em etapas de 1BL (faixa de massa de 20,6 a 86,5g, n=12) ou 0,5BL (204 a 313g, n=6), até que fosse atingido no máximo 5 ou 2.5 BL·s⁻¹, respectivamente. Todos os peixes praticaram natação corpo caudal aeróbica constante em todas essas velocidades. As medidas na captação de O₂ ($\dot{M}O_2$, mmol·kg⁻¹·h⁻¹) foram feitas por respirometria de fluxo interrompido “stopped-flow” em cada velocidade, a fim de permitir a inferência da taxa metabólica padrão (SMR) (Chabot et al., 2016) e da taxa metabólica ativa AMR (Norin & Clark, 2016), e calcular o AS como AMR-SMR (Blasco et al., 2020). Posteriormente, a velocidade de natação foi aumentada em 0,1 BL a cada 10s para identificar a velocidade correspondente à adoção de um perfil anaeróbico de natação (U_{GT}), velocidade na qual o peixe passava a apresentar uma natação instável de explosão (“burst-and-coast”), a qual então aumentava em intensidade conforme se aproximava da velocidade máxima de natação (U_{max}) e, por fim, a fadiga (Blasco et al., 2020; Marras et al., 2013). Imediatamente após apresentarem a fadiga, a velocidade foi reduzida para 1 BL·s⁻¹ e, após 30 min, os peixes foram transferidos ao segundo tanque de contenção, onde permaneceram por pelo menos 96h sob condições de rotina antes de serem submetidos aos testes de tolerância térmica (50% testados para CT_{swim} ou CT_{max} primeiro). O CT_{max} foi medido em grupos de tilápia que haviam sido aclimatados durante a noite em um tanque de 68L contendo água vigorosamente aerada a 26°C. Na manhã seguinte, a água foi aquecida em 1°C a cada 30 min até que os peixes apresentassem a perda de equilíbrio (LOE) (Blasco et al., 2020). O CT_{max} individual foi então calculado como a maior temperatura totalmente concluída mais a proporção de tempo em que o animal permaneceu na temperatura onde apresentou a LOE (Norin & Clark, 2016). Imediatamente atingido o LOE, os peixes foram transferidos para um tanque de recuperação (68L) que continha água aerada e a uma temperatura 26°C. Permaneceram em tais tanques por pelo menos 30 min e então retornados ao tanque de contenção por pelo menos 96h antes de novas experimentações.

Para o CT_{swim} , cada indivíduo foi alocado no respirômetro no dia anterior ao experimento e exposto ao longo da noite a uma velocidade de natação a 1 BL·s⁻¹. No dia seguinte, ao longo de 30 min promoveu-se aumentos na velocidade de natação até que fosse atingida aquela correspondente a 85% de sua própria

U_{GT} . Após 30 minutos nesta velocidade, a temperatura foi aumentada em 1°C a cada 30 min até que os peixes apresentassem o sinal de fadiga, evidenciada pelo posicionamento dos animais contra a tela traseira de proteção. O CT_{swim} foi calculado da mesma maneira que o CT_{max} , mas utilizou a fadiga como limiar de tolerância (Blasco et al., 2020). Os peixes foram imediatamente transferidos para um tanque de recuperação que continha água aerada e à 26°C por 30 min e, então, retornados ao tanque de contenção por pelo menos 96h antes de novos experimentos.

As medidas de $\dot{M}O_2$ foram realizadas durante os últimos 20 minutos de cada temperatura e a maior taxa de consumo alcançada foi intitulada de $\dot{M}O_{2max}$ (Blasco et al., 2020). Na temperatura de aclimação de 26°C, a tilápia-do-Nilo consegue nadar por pelo menos 9h a 85% do U_{GT} sem apresentar sinais de fadiga e com um $\dot{M}O_2$ constante, tempo esse que excede a duração do CT_{swim} (Blasco et al., 2020).

As análises estatísticas foram realizadas no SigmaPlot 11. As relações da massa corporal com as variáveis do fenótipo metabólico, de desempenho de natação e de tolerância ao aquecimento foram analisadas por regressão de mínimos quadrados de dados logaritmizados. As correlações entre as variáveis (CT_{max} vs CT_{swim} ; CT_{swim} vs $\dot{M}O_{2max}$) foram analisadas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Os CT_{max} e CT_{swim} médios foram comparados pelo teste T pareado. $P < 0,05$ foi o limite da significância estatística.

Resultados

À temperatura de aclimação de 26°C, tanto o log de SMR massa-específico quanto o log de AMR massa-específico mostraram uma relação significativa com a massa corporal, sendo essa apresentada de forma negativa (Tabela 1, Figura 1A). As inclinações negativas dessas relações log:log (Tabela 1, Figura 1A) foram os recíprocos das inclinações positivas log:log independentes da massa para cada variável (Fig. S1, Material Suplementar Eletrônico). Ou seja, os gráficos log:log das diversas medidas de taxas metabólicas independentes da massa (R) escalaram contra a massa corporal (M) como uma função do tipo potência, onde $R = aM^b$ (Figure S1). Nesta função,

a é a interceptação do gráfico log:log e b é a inclinação positiva, o expoente do aumento metabólico (Killen et al., 2010; Glazier, 2020). As inclinações negativas de log de SMR massa-específico e AMR massa-específico contra o log da massa (Tabela 1) foram iguais a $1-b$ (Fig S1) (Lefevre et al., 2017). O log de AS massa-específico não mudou com a massa (Tabela 1, Figura 1A) e b foi 1,0 (Figura S1). Os logs de U_{GT} e de U_{max} ambos caíram significativamente com a massa, mas a diferença entre eles ($U_{max}-U_{GT}$), um potencial indicador de capacidade de natação anaeróbica, se mostrou independente da massa (Tabela 1).

Durante o protocolo CT_{max} , à medida que os peixes eram aquecidos, eles passavam a exibir um comportamento errático, rolando de lado e seguido pela completa LOE. Durante o protocolo CT_{swim} os peixes nadaram até certa temperatura usando um perfil aeróbico constante, além da qual eles progressivamente iniciavam uma natação anaeróbica instável de explosão (“burst-and-coast”) que inevitavelmente os levava à fadiga. Nenhum peixe perdeu o equilíbrio durante o CT_{swim} . Todos os peixes, de ambos os protocolos, recuperaram o comportamento de natação normal em aproximadamente 10 min após a transferência para os tanques de recuperação (26°C). Os dois limiares térmicos não se correlacionaram ($r=0.371$, $P=0.129$), mas a média geral (\pm SEM) CT_{max} - $40.7\pm 0.23^\circ\text{C}$ - foi significativamente maior do que a encontrada no CT_{swim} - $38.1\pm 0.29^\circ\text{C}$.

O log de CT_{max} não teve relação com o log da massa corporal, enquanto que o log do CT_{swim} diminuiu significativamente com a massa (Figura 1B, Tabela 1). A redução em CT_{swim} com a massa se mostrou associada com uma relação log:log negativa altamente significativa entre o $\dot{M}O_{2max}$ específico da massa e a massa (Figura 2A, Tabela 1). Apresentando a inclinação negativa equivalente a $1-b$, o expoente escalonar alométrico relevante para $\dot{M}O_{2max}$ (Figura S1) (Lefevre et al., 2017; Cheung et al., 2011). O $\dot{M}O_{2max}$ sempre ocorreu na penúltima ou última temperatura do CT_{swim} , exceto para um indivíduo. Houve uma correlação positiva significativa entre log de CT_{swim} e log de $\dot{M}O_{2max}$ (Figura 2B).

Tabela 1: Coeficiente de regressão linear de mínimos quadrados para as relações log:log entre massa corpórea (g) e as variáveis do fenótipo metabólico, de desempenho de natação, de tolerância térmica e de desempenho respiratório em exemplares de tilápia-do-Nilo (n=18; massa variando de 23 até 313g).

Variable	Unit	Intercept	Slope	R ²	P
SMR	mmol O ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹	1.548	-0.419	0.782	1.1x10 ⁻⁶
AMR	mmol O ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹	1.526	-0.119	0.293	0.020
AS	mmol O ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹	1.122	-0.006	<0.001	0.922
U_{GT}	BL.s ⁻¹	1.149	-0.237	0.689	2.0x10 ⁻⁵
U_{max}	BL.s ⁻¹	1.212	-0.228	0.736	5.3x10 ⁻⁵
U_{max}-U_{GT}	BL.s ⁻¹	0.270	-0.151	0.134	0.134
CT_{max}	°C	1.623	-0.007	0.090	0.226
CT_{swim}	°C	1.624	-0.023	0.501	0.001
MO_{2max}	mmol O ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹	2.076	-0.329	0.932	9.1x10 ⁻¹¹

SMR, taxa metabólica padrão; AMR, taxa metabólica ativa; AS, aumento aeróbico; U_{GT}, máxima velocidade aeróbica; U_{max}, velocidade máxima de natação; CT_{max}, temperatura crítica máxima; CT_{swim}, temperatura crítica para fadiga durante a natação aeróbica; MO_{2max}, máxima taxa de captação de oxigênio durante o CT_{swim}.

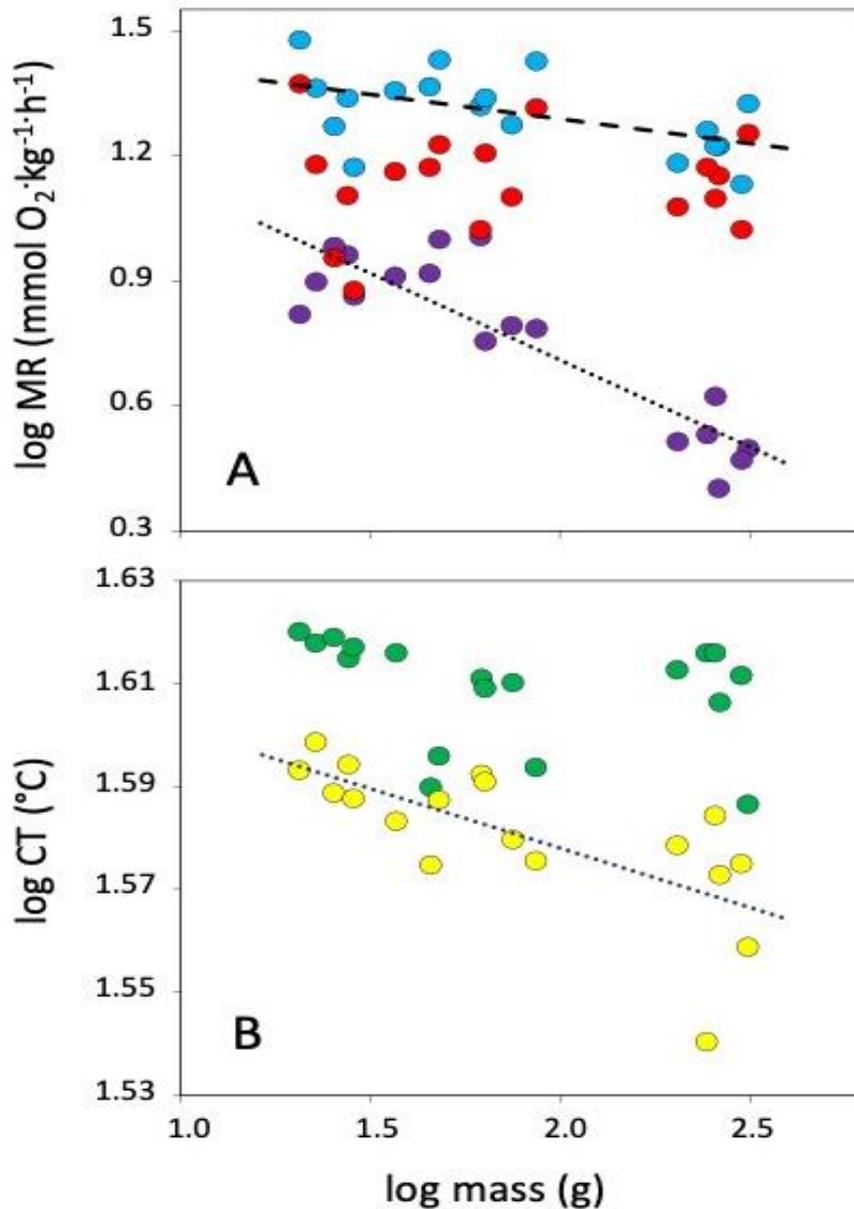


Figura 1: Coeficiente de regressão linear de mínimos quadrados para as relações log:log entre (A) massa corpórea e variáveis metabólicas massa-específica, SMR (símbolos roxos, linha pontilhada), AMR (símbolos azuis, linha tracejada) e AS (símbolos vermelhos); (B) massa corpórea e os dois protocolos de tolerância térmica (CT), CTmax (símbolos verdes) e CTswim (símbolos amarelos, linha pontilhada). Dados coletados em exemplares de tilápia-do-Nilo aclimatadas a 26°C, n=18 e massa variando de 21 a 313g. As linhas de regressão são apresentadas nas variáveis que possuíram relação significativa, as linhas denotam o melhor ajuste, ver Tabela 1.

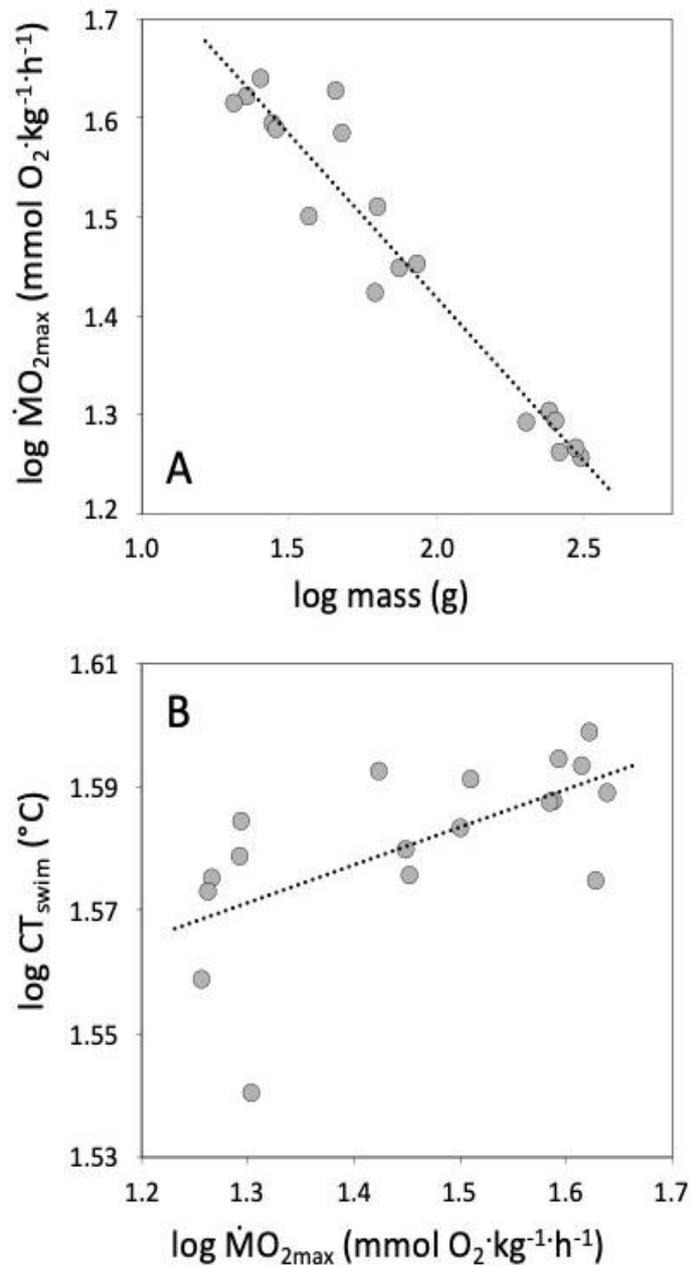


Figura 2: (A) Coeficiente de regressão linear de mínimos quadrados para as relações log:log entre a massa corpórea a máxima taxa de captação de oxigênio durante o CT_{swim} massa-específico ($\dot{M}O_{2max}$, ver tabela 1 para informação na regressão) e (B) Correlação de Pearson entre temperatura crítica para a fadiga durante a natação (CT_{swim}) e $\dot{M}O_{2max}$, linha pontilhada é descrita por $\log CT_{swim} = (\log \dot{M}O_{2max}) \times 0.061 + 1.491$ ($r = 0.637$, $P = 0.004$). Dados coletados em exemplares de tilápia-do-Nilo aclimatadas a 26°C, $n=18$ e massa variando de 21 a 313g.

Discussão

Os resultados demonstram que durante o aquecimento (CT_{swim}) a habilidade em executar exercício aeróbico sustentado diminuiu significativamente com a massa corporal em um peixe teleósteo. Essa redução se mostrou significativamente correlacionada com um declínio em $\dot{M}O_{2max}$ massa-específico com a massa, sugerindo uma possível relação causal. Esse declínio no $\dot{M}O_{2max}$ com a massa durante o CT_{swim} não refletiu diferenças no AS na temperatura de aclimação, o qual foi independente da massa. Essa última descoberta está em direta oposição ao preceito central do modelo GOL, o qual prevê que o AS diminuirá com o aumento no tamanho corpóreo (Cheung et al., 2011; Pauly, 1981). No entanto, houve reduções em SMR e AMR massa-específicos com a massa na temperatura de aclimação, o que representa um reflexo direto das relações alométricas no aumento da massa. Essas últimas relações ocorrem em todos os peixes, mas os mecanismos subjacentes permanecem uma questão de debate (Glazier, 2020; Killen et al., 2016; Killen et al., 2010).

A descoberta de que o CT_{max} não diminuiu com o aumento na massa corporal é consistente com um estudo anterior em tilápia-do-Nilo (Recsetar et al., 2012). Em estudos que investigaram se o CT_{max} depende do tamanho em peixes, alguns reportaram nenhum efeito, mas outros reportaram uma significativa redução com o tamanho (McKenzie et al., 2016). Os mecanismos fisiológicos subjacentes ao LOE em CT_{max} em peixes são desconhecidos, mas é notável que, quando há uma dependência do tamanho em peixes pós-larvais, ela é consistentemente negativa (McKenzie et al., 2016). Dada a ausência de qualquer dependência da massa para o CT_{max} , foi interessante descobrir uma dependência negativa tão forte do CT_{swim} .

É intrigante que o $\dot{M}O_{2max}$ tenha declinado tão profundamente com a massa corporal durante o CT_{swim} , se assumirmos que ele representa a máxima capacidade para a captação de O_2 durante o aquecimento agudo (Blasco et al., 2020). A significativa correlação de $\dot{M}O_{2max}$ com o CT_{swim} é uma boa evidência de que a capacidade para a captação de O_2 é um mecanismo associado às respostas tamanho-dependentes encontradas no CT_{swim} . Isso é digno de uma investigação mais aprofundada. O fato de que as variações no $\dot{M}O_{2max}$ relativas

ao tamanho somente representaram aproximadamente 60% da variação no CT_{swim} indica, entretanto, que outros mecanismos estão envolvidos na fadiga. A tilápia adotou um perfil anaeróbico de natação antes da fadiga (Blasco et al., 2020) e é sabido que a capacidade para a manutenção de exercícios anaeróbicos varia entre os indivíduos das diferentes espécies de peixes (Marras et al., 2010; Marras et al., 2013). Na temperatura de aclimação o U_{max} diminuiu significativamente com o aumento da massa, uma vez que nessa espécie a massa estava relacionada ao comprimento e o desempenho de natação relativo diminuiu com o comprimento na maioria das espécies de peixes (Beamish, 1978; Bainbridge, 1958). Se considerarmos a diferença entre U_{max} e U_{GT} como um indicador de capacidade metabólica anaeróbica em peixes (Marras et al., 2013), essa foi independente da massa.

O declínio no $\dot{M}O_{2max}$ com a massa, presumivelmente reflete, em algum grau, as limitações relacionadas ao efeito do tamanho na captação de O_2 na temperatura de aclimação, evidenciada pelo declínio em AMR massa-específico com a massa. Tais limitações ficaram bastante evidentes pelo profundo desafio à captação de O_2 que o protocolo CT_{swim} impôs. Interessantemente, o expoente escalar ($1-b$) para o declínio no log de $\dot{M}O_{2max}$ massa-específico com o log da massa, de -0,33, é exatamente o expoente que o modelo GOL postula para o declínio na capacidade de captação de O_2 como função da massa em peixes, baseado nas limitações geométricas de superfície - volume (Cheung et al., 2012; Cheung et al., 2011; Glazier, 2020; Pauly, 1981). No presente estudo, um coeficiente de regressão de 0,92 em 18 peixes indica que o expoente de massa estimado é improvável que não seja verdadeiro. Uma restrição revelada pelo protocolo CT_{swim} pode ser a área de superfície respiratória funcional das brânquias, a qual diminuiu com a massa na tilápia-do-Nilo, com um expoente de -0,30 (Kisia & Hughes, 1992). Essa redução na área de superfície das brânquias pode estar ligada à redução no SMR massa-específico, pelo qual os custos basais diminuem e as brânquias dos peixes são “adaptadas” para manter o AS constante em qualquer massa, como observado neste estudo. A manutenção de uma área de superfície respiratória branquial maior do que a necessária para o AS, em qualquer temperatura de aclimação, poderia levar a custos em termos de, por exemplo, manutenção do equilíbrio hídrico e iônico (Lefevre et al., 2017; Taylor, 1998). Podem haver outras

restrições de superfície - volume que surjam conforme os peixes cresçam e este é um interessante tópico para futuros estudos, incluindo em outras espécies de peixes.

Espera-se que os eventos de aquecimento extremos se tornem mais frequentes e severos em habitats aquáticos ao redor do mundo devido à aceleração da mudança climática (Frölicher et al., 2018; Stillman, 2019). A natação é uma atividade essencial para a maioria das espécies de peixes, incluindo a tilápia-do-Nilo, então há claras implicações ecológicas o fato de que, caso as suas populações experimentem um evento de aquecimento agudo, a habilidade dos peixes de maior tamanho em realizar exercícios aeróbicos for restringida a temperaturas abaixo daquela tolerada pelos co-específicos de menor tamanho. A lei das médias prevê que peixes de maior tamanho têm maior probabilidade de encontrar temperaturas suficientemente altas para limitar seu desempenho (Field et al., 2012; Stillman, 2019). Portanto, eventos aleatórios de aquecimento extremo poderiam ameaçar a aptidão e sobrevivência dos peixes de uma maneira dependente do tamanho, inclusive pela limitação na capacidade dos indivíduos maiores em buscarem refúgios termais (Stillman, 2019; Habary et al., 2017). Se a aptidão e sobrevivência dos animais maiores é comprometida mais frequentemente, isso poderia ter consequências importantes para a pesca da tilápia-do-Nilo, uma importante fonte de proteína dietética em muitos países (De Silva et al., 2004).

No geral, os dados indicam que o aquecimento global em ecossistemas aquáticos poderia certamente “favorecer os pequenos” (Daufresne et al., 2009). Mais trabalhos são necessários para entender se esta dependência do tamanho na tolerância à temperatura pode estar ligada a declínios constantes no tamanho corporal final de peixes globalmente (Audzijonyte et al., 2019; Baudron et al., 2014; Daufresne et al., 2009). A taxa de mudanças ambientais associadas ao aquecimento global é rápida demais para respostas evolucionárias adaptativas na maioria das espécies de peixes, então a sobrevivência e resiliência dependerão de opções de migração, plasticidade e tolerância, e da existência de genótipos tolerantes (Bell, 2013; Gunderson & Stillman, 2015; Habary et al., 2017; Stillman, 2019). Os dados atuais indicam que a capacidade de migração é mais provável de ser prejudicada em peixes maiores, e que peixes menores

são mais tolerantes. Uma das potenciais consequências para gerações futuras pode certamente ser a redução no tamanho do corpo assintótico.

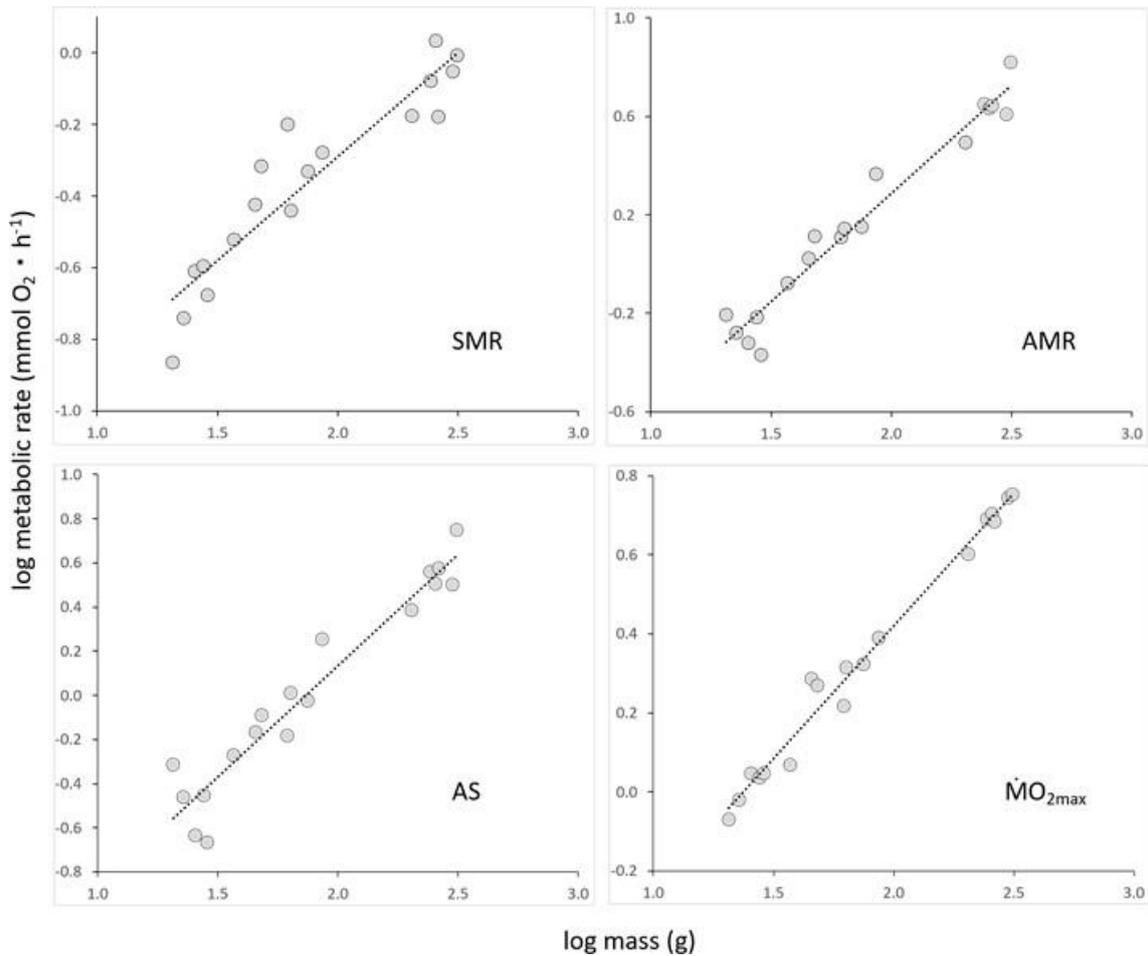


Figura S1: Regressões log:log das taxas metabólicas (mmolO₂.h⁻¹) independente da massa contra a massa (g) em tilápia-do-Nilo, n=18. SMR – taxa metabólica padrão; AMR – taxa metabólica ativa; AS – aumento aeróbico e $\dot{M}O_{2max}$ - taxa máxima de captação de oxigênio obtida durante o teste de temperatura crítica para fadiga durante o protocolo de natação aeróbica (CT_{swim}) SMR = 0.581 x massa - 1.451 (R² = 0.873); AMR = 0.881 x massa - 1.474 (R² = 0.958); AS = 1.006 x massa - 1.878 (R² = 0.927), e $\dot{M}O_{2max}$ = 0.671 x massa - 0.923 (R² = 0.983). Considerado significativo P < 1 x 10⁻⁷.

Referências Bibliográficas

- Audzijonyte A, Barneche DR, Baudron AR, Belmaker J, Clark TD, Marshall CT, Morrongiello JR, van Rijn I. (2019). Is oxygen limitation in warming waters a valid mechanism to explain decreased body sizes in aquatic ectotherms? **Glob. Ecol. Biogeogr.** **28**, 64–77. (doi:10.1111/geb.12847).
- Audzijonyte A, Richards SA, Stuart-Smith RD, Pecl G, Edgar GJ, Barrett NS, Payne N, Blanchard JL. (2020). Fish body sizes change with temperature but not all species shrink with warming. **Nat. Ecol. Evol.** **1**, 1–6. (doi:10.1038/s41559-020-1171-0).
- Bainbridge R. (1958). The speed of swimming of fish as related to size and to the frequency and amplitude of the tail beat. **J. Exp. Biol.** **35**, 109–133.
- Baudron AR, Needle CL, Rijnsdorp AD, Tara Marshall C. (2014). Warming temperatures and smaller body sizes: Synchronous changes in growth of North Sea fishes. **Glob. Chang. Biol.** **20**, 1023–1031. (doi:10.1111/gcb.12514).
- Beamish FWH. (1978). Swimming capacity. In **Fish Physiology Volume 7** (eds WS Hoar, DJ Randall), pp. 101–187. New York: Academic Press.
- Bell G. 2013 Evolutionary rescue and the limits of adaptation. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.** **368**. (doi:10.1098/rstb.2012.0080).
- Beitinger T, Lutterschmidt W. (2011). Temperature| Measures of thermal tolerance. In **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment** (ed AP Farrell), pp. 1695–1702. Elsevier Ltd.
- Blasco FR, Esbaugh AJ, Killen S, Rantin FT, Taylor EW, McKenzie DJ. (2020). Using aerobic exercise to evaluate sub-lethal tolerance of acute warming in fishes. **J. Exp. Biol.** **223**, jeb218602. (doi:10.1242/jeb.218602).
- Blasco FR, Taylor EW, Leite CAC, Monteiro DA, Rantin FT, McKenzie DJ. (2020). Data from: Tolerance of an acute warming challenge declines with size in Nile tilapia: evidence of a link to capacity for oxygen uptake. **Dryad Digital Repository**. (doi:https://doi.org/10.5061/dryad.m905qftz0).
- Chabot D, Steffensen JF, Farrell AP. (2016). The determination of standard metabolic rate in fishes. **J. Fish Biol.** **88**, 81–121. (doi:10.1111/jfb.12845).
- Cheung WWL, Dunne J, Sarmiento JL, Pauly D. (2011). Integrating ecophysiology and plankton dynamics into projected maximum fisheries catch

potential under climate change in the Northeast Atlantic. **ICES J. Mar. Sci.** **68**, 1008–1018. (doi:10.1093/icesjms/fsr012).

Cheung WWL, Sarmiento JL, Dunne J, Frölicher TL, Lam VWY, Deng Palomares ML, Watson R, Pauly D. (2012). Shrinking of fishes exacerbates impacts of global ocean changes on marine ecosystems. **Nat. Clim. Chang.** **2**, 1–5. (doi:10.1038/nclimate1691).

Christensen EAF, Svendsen MBS, Steffensen JF. (2020). The combined effect of body size and temperature on oxygen consumption rates and the size-dependency of preferred temperature in European perch *Perca fluviatilis*. **J. Fish Biol.** JFB.14435. (doi:10.1111/jfb.14435).

Daufresne M, Lengfellner K, Sommer U. (2009). Global warming benefits the small in aquatic ecosystems. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** **106**, 12788–12793. (doi:10.1073/pnas.0902080106).

De Silva SS, Subasinghe RP, Bartley DM, Lowther A. (2004). Tilapias as alien aquatics in Asia and the Pacific: A Review. **FAO Fish. Tech. Pap.** **453**, 65.

Field CB *et al.* (2012). Managing the risks of extreme events and disasters to advance climate change adaptation: **Special Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge and New York: Cambridge University Press. (doi:10.1017/CBO9781139177245).

Frölicher TL, Fischer EM, Gruber N. (2018). Marine heatwaves under global warming. **Nature** **560**, 360–364. (doi:10.1038/s41586-018-0383-9).

Fry FEJ. (1957). The aquatic respiration of fish. In **The Physiology of Fishes Volume 1** (ed ME Brown), pp. 1–63. New York: Academic Press.

Gardner JL, Peters A, Kearney MR, Joseph L, Heinsohn R. (2011). Declining body size: A third universal response to warming? **Trends Ecol. Evol.** **26**, 285–291. (doi:10.1016/j.tree.2011.03.005).

Glazier DS. (2020). Activity alters how temperature influences intraspecific metabolic scaling: testing the metabolic-level boundaries hypothesis. **J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.** **190**, 445–454. (doi:10.1007/s00360-020-01279-0).

Gunderson AR, Stillman JH. (2015). Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. **Proc. R. Soc. B Biol. Sci.** **282**, 20150401. (doi:10.1098/rspb.2015.0401).

- Habary A, Johansen JL, Nay TJ, Steffensen JF, Rummer JL. (2017). Adapt, move or die – how will tropical coral reef fishes cope with ocean warming? **Glob. Chang. Biol.** **23**, 566–577. (doi:10.1111/gcb.13488)
- Killen SS, Atkinson D, Glazier DS. (2010). The intraspecific scaling of metabolic rate with body mass in fishes depends on lifestyle and temperature. **Ecol. Lett.** **13**, 184–193. (doi:10.1111/j.1461-0248.2009.01415.x).
- Killen SS, Glazier DS, Rezende EL, Clark TD, Atkinson D, Willener AST, Halsey LG. (2016). Ecological Influences and Morphological Correlates of Resting and Maximal Metabolic Rates across Teleost Fish Species. **Am. Nat.** **187**, 592–606. (doi:10.1086/685893).
- Kisia SM, Hughes GM. (1992). Estimation of oxygen-diffusing capacity in the gills of different sizes of a tilapia, *Oreochromis niloticus*. **J. Zool.** **227**, 405–415. (doi:10.1111/j.1469-7998.1992.tb04403.x)
- Lefevre S, McKenzie DJ, Nilsson GE. (2018). In modelling effects of global warming, invalid assumptions lead to unrealistic projections. **Glob. Chang. Biol.** **24**, 553–556. (doi:10.1111/gcb.13978).
- Lefevre S, McKenzie DJ, Nilsson GE. (2017). Models projecting the fate of fish populations under climate change need to be based on valid physiological mechanisms. **Glob. Chang. Biol.** **23**, 3449–3459. (doi:10.1111/gcb.13652).
- Leiva FP, Calosi P, Verberk WCEP. (2019). Scaling of thermal tolerance with body mass and genome size in ectotherms: A comparison between water- And air-breathers. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.** **374**. (doi:10.1098/rstb.2019.0035)
- Marras S, Claireaux G, McKenzie DJ, Nelson JA. (2010). Individual variation and repeatability in aerobic and anaerobic swimming performance of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **J. Exp. Biol.** **213**, 26–32. (doi:10.1242/jeb.032136).
- Marras S, Killen SS, Domenici P, Claireaux G, McKenzie DJ. (2013). Relationships among Traits of Aerobic and Anaerobic Swimming Performance in Individual European Sea Bass *Dicentrarchus labrax*. **PLoS One** **8**, e72815. (doi:10.1371/journal.pone.0072815).
- McKenzie DJ, Zhang Y, Eliason EJ, Schulte PM, Blasco FR, Claireaux G, Nati JJH, Farrell AP. (2020). Intraspecific variation in tolerance of warming in fishes. **J. Fish Biol.** **In review**.

- Messmer V, Pratchett MS, Hoey AS, Tobin AJ, Coker DJ, Cooke SJ, Clark TD. (2017). Global warming may disproportionately affect larger adults in a predatory coral reef fish. **Glob. Chang. Biol.** **23**, 2230–2240. (doi:10.1111/gcb.13552).
- Norin T, Clark TD. (2016). Measurement and relevance of maximum metabolic rate in fishes. **J. Fish Biol.** **88**, 122–151. (doi:10.1111/jfb.12796)
- Pauly D. (1981). The relationships between gill surface area and growth performance in fish: a generalization of von Bertalanffy's theory of growth. **Berichte der Dtsch. Wissenschaftlichen Kommission fur Meeresforsch.** **28**, 32.
- Pauly D, Cheung WWL. (2017). Sound physiological knowledge and principles in modeling shrinking of fishes under climate change. **Glob. Chang. Biol.** **24**, e15–e26. (doi:10.1111/gcb.13831).
- Recsetar MS, Zeigler MP, Ward DL, Bonar SA, Caldwell CA. (2012). Relationship between fish size and upper thermal tolerance. **Trans. Am. Fish. Soc.** **141**, 1433–1438. (doi:10.1080/00028487.2012.694830).
- Schofield PJ, Peterson MS, Lowe MR, Brown-Peterson NJ, Slack WT. (2011). Survival, growth and reproduction of non-indigenous Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus 1758). I. Physiological capabilities in various temperatures and salinities. **Mar. Freshw. Res.** **62**, 439. (doi:10.1071/MF10207).
- Schulte PM. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: Towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. **J. Exp. Biol.** **218**, 1856–1866. (doi:10.1242/jeb.118851).
- Stillman JH. (2019). Heat waves, the new normal: Summertime temperature extremes will impact animals, ecosystems, and human communities. **Physiology** **34**, 86–100. (doi:10.1152/physiol.00040.2018).
- Taylor EW. (1998). Gills of water-breathers: Structures with multiple functions. In **Principles of Animal Design: The Optimisation and Symmorphosis Debate** (eds ER Weibel, CR Taylor, CL Bolis), pp. 186–194. Cambridge: Cambridge University Press.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo traz informações de grande relevância acerca dos mecanismos fisiológicos envolvidos na tolerância ao aquecimento agudo e à hipóxia, além da criação de um protocolo alternativo para testes de tolerância térmica. A compreensão de como a variabilidade individual encontrada em determinado caráter fisiológico (por exemplo, no fenótipo metabólico), se relaciona com a tolerância apresentada pelo animal a um estressor ambiental ainda é um campo de pesquisa a ser adequadamente explorado, especialmente quando tratamos de espécies da ictiofauna tropical.

Analisando de forma geral os resultados encontrados, podemos concluir que o teste de tolerância térmica proposto no presente estudo (CT_{swim}) é altamente eficiente em seus propósitos: ser um teste mais sensível e passível de estabelecer os motivos que limitam a tolerância térmica. A sensibilidade do CT_{swim} é percebida quando o comparamos com os valores obtidos no teste tradicional, CT_{max} , sendo aproximadamente 2°C mais baixo. Tal resposta foi encontrada em ambas as espécies estudadas. Em relação aos motivos, pode-se concluir que o limite térmico tolerado no CT_{swim} está associado a uma inabilidade no fornecimento de O_2 aos tecidos em atividade. Essa conclusão foi possível analisando-se desde respostas comportamentais até fisiológicas. Ao observar o perfil de natação apresentado pelos indivíduos durante o teste CT_{swim} , nota-se que todos os indivíduos estudados apresentaram uma transição para um perfil anaeróbico de natação em temperaturas próximas das quais eles fadigaram, ou seja, da temperatura que representa o limiar térmico subletal. Em relação às respostas fisiológicas, nos experimentos envolvendo a influência da massa corporal na tolerância térmica em exemplares de tilápia-do-Nilo, encontramos uma relação inversamente proporcional entre massa e temperatura máxima alcançada no CT_{swim} . De forma muito interessante, foi observado que o $\dot{M}O_{2max}$ calculado nesse teste também foi inversamente proporcional à massa. A presente correlação entre $\dot{M}O_{2max}$ e CT_{swim} é uma forte evidência de que capacidade em captar O_2 é um possível mecanismo envolvido na diferença de tolerância térmica encontrada entre indivíduos de tamanhos diferentes. Adicionalmente, outra resposta encontrada, e que corrobora tal conclusão, foi a evidência de tolerância cruzada entre aquecimento agudo e hipóxia. Nos

experimentos com pacu observou-se uma tolerância cruzada entre ambos os estressores somente na comparação entre os testes S_{crit} e CT_{swim} . Tal resultado indica que ambos os protocolos compartilham um mesmo modo de ação, que seria a capacidade do peixe em manter o fornecimento de O_2 para suprir a demanda aeróbica. O mesmo padrão não foi encontrado entre S_{crit} e CT_{max} . Todas essas respostas evidenciam a viabilidade e funcionamento do CT_{swim} , podendo este ser utilizado em diversos protocolos experimentais a fim de melhor compreender a hipótese mais debatida acerca dos mecanismos envolvidos na tolerância térmica, a OCLTT.

Em relação às variáveis do fenótipo metabólico (SMR, AMR e AS) e à ausência de relação entre tolerância ao aquecimento agudo e hipóxia, não há um consenso acerca de como e se, necessariamente em todas as espécies, essas variáveis podem ser usadas como uma ferramenta eficiente para prever uma possível tolerância a tais estressores. Ao que parece, na espécie estudada, os indivíduos não serão selecionados por conta de um determinado fenótipo metabólico. Sendo assim, se faz necessário o desenvolvimento de outros experimentos a fim de melhor compreender os mecanismos envolvidos na variabilidade, como, por exemplo, estudos que visem entender o funcionamento cardíaco.

Por fim, pode-se perceber quão relevantes são os estudos que se debruçam em desvendar os motivos por trás da variabilidade individual ao aquecimento agudo e hipóxia. Ao compreender os mecanismos envolvidos em tais respostas, podemos utilizá-los de forma a auxiliar no desenvolvimento de medidas de conservação e prever possíveis consequências ecológicas e evolutivas quando houver a exposição natural a esses agentes.