

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

**O efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica em duas espécies de peixes de
respiração bimodal: mudanças fisiológicas e comportamentais**

MAYARA CRISTINA MORAES DE LIMA

Manaus, Amazonas

Setembro, 2022

MAYARA CRISTINA MORAES DE LIMA

**O efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica em duas espécies de peixes de
respiração bimodal: mudanças fisiológicas e comportamentais**

ORIENTADOR: ADALBERTO LUIS VAL, Dr.

Coorientador: Derek Felipe de Campos, Dr.

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

Manaus, Amazonas

Setembro, 2022

Relação da banca julgadora

TITULARES

Lúcia Helena Rapp Py-Daniel - INPA

Carolina Arruda de Oliveira Freire – UFPR

Rui Rosa – Universidade de Lisboa

SUPLENTE

André Luis Cruz - UFBA

Eduardo Martins – University of Northern British
Columbia

Catalogação na Publicação (CIP-Brasil)

L732e Lima, Mayara Cristina Moraes de
O efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica em duas espécies de peixes de respiração bimodal: mudanças fisiológicas e comportamentais / Mayara Cristina Moraes De Lima; orientador Adalberto Luis Val.; coorientador Derek Felipe de Campos; - Manaus:[s. l.], 2023.

738 KB

58 p. : il. color.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior – BADPI) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Peixes . 2. Concentração de oxigênio. I. Brondani, Adalberto Luis Val. II. Campos, Derek Felipe de. III. Título

CDD 597

Aos meus queridos pais, Miriam Cristina Silva de Moraes e Mário Sergio de Lima por todo esforço para que nunca que me faltasse amor, sustento, dedicação e forças para entender que a educação é a única porta que pode mudar vidas. Meus irmãos Maira, Maison e Daniel por tudo que a mim representam e *in memoriam* ao meu amado irmão Mairon Sales Moraes de Almeida.
Dedico essa dissertação

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, Pai Amado que sempre me amparou nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai e minha mãe por serem minha maior força e incentivo para alcançar meus objetivos, por nunca duvidarem da minha capacidade e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Aos meus irmãos e queridos sobrinhos por me tirarem risadas, grandes abraços e bons momentos sempre. O carinho da família me fez ter forças nos momentos difíceis.

Ao meu orientador Adalberto Luis Val, por abrir as portas do laboratório para que iniciasse um grande sonho profissional, pelas discussões e debates sempre que necessário, por acreditar no meu potencial e me incentivar a nunca desistir de fazer ciência. Ao senhor minha maior admiração.

Meu coorientador Derek Felipe Campos, que abraçou meu trabalho, colocou a mão na massa, me corrigiu inúmeras vezes e junto com meu orientador me ensinou a enxergar a ciência em cada passo que dava. Minha gratidão pela paciência, esforço, dedicação e incentivo para que novas etapas da minha vida fossem alcançadas.

As amigas feitas no laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM), aos momentos de descontração no almoço e no horário sagrado do cafezinho da tarde, à dona Val e Carequinha por alegrarem nossos momentos de frustração e desespero quando algo dava errado com boas risadas, cafés e palavras de motivação. Aos caros colegas que tornaram a pós-graduação mais leve com esses momentos.

Ao meu amor, Lucas Tribuzy, obrigada por ser um raio de sol em dias nublados, pelo amor, carinho, companheirismo e incentivo.

Às queridas Nazaré, Raimunda e Raquel pela ajuda com toda parte administrativa, com os prazos (às vezes apertadíssimos), compras e logísticas de tudo que estavam ao seu alcance, meu muito obrigada.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia de Água Doce e Pesca Interior do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela infraestrutura fornecida para realização do projeto.

Ao projeto INCT-ADAPTA, fomentado pelo CNPQ, pela Fundação de Amparo à Pesquisa da Amazônia (FAPEAM) e pela CAPES, pelo recurso para a elaboração deste trabalho.

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

“Educação não transforma o mundo, educação muda
às pessoas. Pessoas transformam o mundo!”

Paulo Freire

RESUMO

A capacidade de tolerar condições adversas determina o quão vulnerável as espécies vão estar frente às mudanças ambientais. Diversos estudos demonstram uma redução nos níveis de tolerância ao calor das espécies de peixes de respiração aquática quando expostos à hipóxia. No entanto, não há informações sobre o efeito da hipóxia sobre a tolerância térmica em espécies de peixes de respiração bimodal. Diversos grupos de peixes amazônicos apresentam a capacidade de respirar ar de forma facultativa, dentre eles os loricariídeos que utilizam o estômago adaptado para respirar ar. Na família Loricariidae existem estômagos com diferentes configurações morfológicas, as quais podem determinar a habilidade das espécies de maximizar a capacidade de captação de oxigênio do ar e, possivelmente, estender seus limites térmicos, como discutidos pela teoria da capacidade de tolerância térmica limitada pelo oxigênio (OCLTT). Sendo assim, objetivamos avaliar o efeito da hipóxia sobre os limites térmicos e os mecanismos fisiológicos e comportamentais de dois respiradores aéreos facultativos, *Pterygoplichthys pardalis* e *Ancistrus dolichopterus*. *Pterygoplichthys pardalis* apresenta estômago maior, mais irrigado e com capacidade maximizada de captar oxigênio aéreo contrastando com a morfologia encontrada em *A. dolichopterus*, que possui um estômago menos eficiente para captação de oxigênio, sendo assim tais estruturas possuem diferentes capacidades de extrair oxigênio do ar. Para *P. pardalis*, os limites de tolerância térmica independem da concentração de oxigênio. Entretanto, ao limitar o acesso a superfície verificamos uma diminuição da CT_{max} em condições hipóxicas. Por outro lado, em *A. dolichopterus* a CT_{max} é limitada pela concentração de oxigênio a partir de concentrações abaixo do P_{crit} quando o acesso à superfície é disponível e não difere entre animais com e sem acesso ao ar. Portanto, nossos resultados demonstram que a respiração aérea aumenta a capacidade de tolerância ao calor em espécies que possuem a capacidade de maximizar a tomada de oxigênio aéreo. Sendo assim, tais espécies apresentam maior vantagem adaptativa quando comparadas com espécies de respiração aquática ou espécies com menor eficiência na captação de oxigênio.

ABSTRACT

The ability to tolerate adverse conditions determines how vulnerable the species will be to environmental changes. Several studies demonstrate a reduction in the heat tolerance levels of aquatic breathing fish species when exposed to hypoxia. However, there is no information about the effect of hypoxia on thermal tolerance in bimodal breathing fish species. Several groups of Amazonian fish can breathe air in a facultative way, among them the loricariids that use the stomach adapted to breathe air. In the family Loricariidae there are stomachs with different morphological configurations, which may determine the ability of the species to maximize the oxygen uptake from the air and possibly extend its thermal limits, as discussed by the theory of oxygen-limited thermal tolerance capacity (OCLTT). Therefore, we aimed to evaluate the effect of hypoxia on the thermal limits and the physiological and behavioral mechanisms of two facultative air breathers, *Pterygoplichthys pardalis* and *Ancistrus dolichopterus*. *Pterygoplichthys pardalis* has a larger, more irrigated stomach with maximized capacity to capture oxygen from the air, contrasting with the morphology found in *A. dolichopterus*, which has a less efficient stomach for oxygen uptake. For *P. pardalis*, the thermal tolerance limits are independent of oxygen concentration. However, by limiting access to the surface, we found a decrease in CTmax under hypoxic conditions. On the other hand, in *A. dolichopterus* CTmax is limited by oxygen concentration from concentrations below the Pcrit when surface access is available and does not differ between animals with and without access to air. Therefore, our results demonstrate that air breathing increases heat tolerance capacity in species that can maximize oxygen uptake from air. Thus, such species have a greater adaptive advantage when compared with aquatic breathing species or species with less efficiency in oxygen uptake.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Diversidade de morfologias estomacais encontrada na família Loricariidae (adaptado de Armbruster, 1998). Região em preto demonstra a extensão do peritônio. A = ramo da artéria celíaca; D = divertículo; DV1 = seção muscular de divertículo; DV2 = seção cheia de ar do divertículo; ES = esôfago; HPV = veia porta hepática; V = veia no estômago; INT = intestino; PY = piloro; S = estômago. Escala = 5 mm.

Figura 2. Morfologias estomacais de *P. pardalis* (A) e *A. dolichopterus* (B) (Acervo pessoal). Escala= 2cm e 3cm, respectivamente

Figura 3. Curva típica de desempenho térmico. As curvas de desempenho térmico resumem os efeitos de temperatura nos processos biológicos. O desempenho térmico de um indivíduo sobe juntamente com a temperatura a partir de um mínimo térmico crítico, CT_{min} , para uma temperatura ótima, T_{opt} , e depois cai rapidamente para máximo térmico crítico, CT_{max} (revisto por Schulte, 2011).

Figura 4. Modelo conceitual de como a temperatura molda a janela térmica de desempenho de uma espécie em um estágio específico da vida, com base no conceito de OCLTT. (A) o suprimento de oxigênio para o tecido é ideal entre altas e baixas temperaturas de pejus (“pior” em latim), temperatura de perda, quando se inicia um declínio no escopo aeróbico (B) onde o suprimento de oxigênio para os tecidos é dependente da temperatura para sustentar o metabolismo do animal. Temperaturas críticas (T_C) caracterizam o início do metabolismo anaeróbico e temperaturas de desnaturação (T_d), a perda de integridade das estruturas moleculares. Máximos e mínimos térmicos críticos (CT_{max} e CT_{min}) demonstram os limites extremos onde as funções de todo o organismo cessam. A estimulação cinética do desempenho pelo aquecimento leva a uma curva inclinada com um ótimo funcional próximo à temperatura superior do pejus. A curva de desempenho demonstra a função da capacidade funcional e o escopo aeróbico associado nos processos no nível do ecossistema, como competição, forrageamento, resposta imune, crescimento e comportamento. A hipóxia ambiental e os níveis elevados de dióxido de carbono causam um estreitamento das janelas térmicas e, possivelmente,

no desempenho ótimo por meio de diminuições das capacidades funcional e tensões sistêmicas de oxigênio (de acordo com Pörtner, 2010).

CAPÍTULO I

Figura 1. Representação gráfica do desenho experimental de tolerância térmica para *Pterygoplichthys pardalis* e *Ancistrus dolichopterus* com e sem acesso ao ar.

Figura 2. Efeito da concentração ambiental de oxigênio no consumo de oxigênio de (A) *Pterygoplichthys pardalis* ($H = 10,176$; $P = 0,038$) e de (B) *Ancistrus dolichopterus* ($H = 22,947$, $P = <0,001$) em cinco concentrações ambientais de oxigênio 100% (20,630 kPa), 50% (10,315 kPa), 25% (5,157 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas pelo teste *post hoc* de Tukey.

Figura 3. Efeito da concentração ambiental de oxigênio sobre a temperatura de agitação (T_{ag}) em (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco concentrações ambientais de oxigênio 100% (20,630 kPa), 50% (10,315 kPa), 25% (5,157 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas pelo teste *post hoc* de Tukey para *A. dolichopterus* e Dunn para *P. pardalis*.

Figura 4. Frequência de respiração aérea (FRA) antes e depois da temperatura de agitação (T_{ag}) em (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco concentrações de oxigênio 100% (20,630 kPa), 50% (10,315 kPa), 25% (5,157 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Os valores dos testes foram corrigidos através da análise de Bonferroni. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre as concentrações.

Figura 5. Efeito da concentração ambiental de oxigênio sobre a temperatura de início de respiração aérea ($T_{air-breathing}$) e tolerância térmica máxima (CT_{max}) em (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco concentrações de oxigênio 100% (20,630 kPa), 50% (10,315 kPa), 25% (5,157 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas pelo teste de Dunn ($T_{air-breathing}$) e *post hoc* de Tukey (CT_{max}) para *P. pardalis* e teste de Dunn para ambas as análises em *A. dolichopterus*.

Figura 6. Efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica com e sem acesso ao ar em (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em três concentrações de oxigênio

100% (20,630 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Diferentes letras indicam diferenças estatísticas pelo teste Holm-Sidak.

Figura 7: Próton (H^+) leak em fibras cardíacas de (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco temperaturas: 28°, 31°, 34°, 37° e 40°C. Os dados foram logaritmizados para teste de normalidade. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas pelo teste post hoc de Tukey.

Figura 8. Atividade do CI em fibras cardíacas de (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco temperaturas: 28°, 31°, 34°, 37°, 40°C. Os dados foram logaritmizados para teste de normalidade. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis e post hoc de Tukey.

Figura 9. Atividade do CI+CII em fibras cardíacas de de (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco temperaturas: 28°, 31°, 34°, 37°, 40°C. Os dados foram logaritmizados para teste de normalidade. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis e post hoc de Tukey.

Figura 10. Razão de Controle Respiratório (RCR) em fibras cardíacas de de (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco temperaturas: 28°, 31°, 34°, 37°, 40°C. Os dados foram logaritmizados para teste de normalidade. Diferentes letras indicam diferenças estatísticas pelo teste de Kruskal-Wallis e post hoc de Tukey.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Objetivos	9
1.2	Hipóteses.....	9
2	CAPÍTULO I – O efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica em duas espécies de peixes de respiração bimodal: mudanças fisiológicas e comportamentais ...	11
2.1	Introdução	13
2.2	Material e Métodos.....	16
2.2.1	Coleta e manutenção dos indivíduos.....	16
2.2.2	Experimento I: Taxa metabólica e Pressão crítico de O ₂ (P _{crit})	16
2.2.3	Experimento II: respostas fisiológicas e comportamentais ao aumento da temperatura.....	17
2.2.4	Experimento III: respiração mitocondrial em tecido cardíaco <i>in vitro</i>	19
2.2.5	Análises estatísticas	20
2.3	Resultados	21
2.3.1	Taxa de consumo de oxigênio e Pressão Crítica de O ₂ (PO ₂ Crit)	21
2.3.2	Análise comportamental e tolerância térmica máxima (CTmax).....	21
2.3.3	Respiração mitocondrial em tecido cardíaco <i>in vitro</i>	25
2.4	Discussão	28
2.5	Referências.....	34
3	CONCLUSÕES GERAIS E PESPECTIVAS	38
4	REFERÊNCIAS GERAIS	39

1. INTRODUÇÃO

O ambiente amazônico apresenta uma ampla gama de particularidades ambientais, devido à grande extensão dos rios e as distintas propriedades químicas e físicas das águas de suas bacias hidrográficas. Em decorrência destas características, além de um ambiente diverso, a Amazônia é um ecossistema desafiador para as espécies que nele habitam (Val, 2019). As águas ácidas, pobre em íons, com altas temperaturas e baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido são algumas das condições extremas que os organismos encontram nos diferentes ambientes aquáticos amazônicos (Val et al., 2015; Val and Wood, 2022).

A hipóxia, ou seja, a baixa concentração de oxigênio, é uma condição ambiental que exerceu, e continua exercendo, forte influência no desenvolvimento de adaptações dos organismos aquáticos. Diversos fatores ambientais contribuem para o aparecimento da hipóxia aquática. O pulso de inundação dos rios que é a principal força motriz que influencia os parâmetros químicos, físicos e biológicos das águas é um deles (Val and Wood, 2022). De acordo com Val et al. (2015), as variações na concentração de oxigênio dissolvido nas várzeas podem acontecer em curtos períodos de tempo, podendo ocorrer anóxia durante o período noturno, e concentrações variáveis durante o dia em função da influência de diversos fatores bióticos, como profundidade, cobertura vegetal e entrada de luz (Almeida-Val et al., 2006). Durante o período da seca, os níveis de oxigênio diminuem e podem atingir concentrações abaixo de 1 ppm em algumas regiões da várzea (Almeida-Val et al., 2006).

A capacidade de um animal de adquirir O_2 de seu meio ambiente tem sido considerado determinante da tolerância à hipóxia (Hughes, 1973). Organismos que possuem uma maior capacidade de extração de O_2 são capazes manter uma taxa metabólica de rotina em tensões de O_2 mais baixas e, assim, explorar habitats com menor disponibilidade de O_2 . Deste modo, modificações na cascata respiratória, que aumenta a capacidade de extração de O_2 de ambiente com baixas concentrações de oxigênio, levam a um aumento na tolerância à hipóxia. A absorção de oxigênio através de superfícies respiratórias é o primeiro passo para desencadear a cascata de O_2 , a qual é constituída de quatro processos fundamentais: ventilação, difusão de oxigênio do ambiente para o sangue, circulação e difusão do oxigênio para o interior das células (Wang and Hicks, 2002). A eficiência desses processos é de extrema importância, uma vez que os animais evoluíram de forma a utilizar o oxigênio comoceptor final de elétrons da cadeia respiratória, tornando-o essencial para geração de energia e manutenção de todo metabolismo do animal (Lehninger et al., 2014). Portanto, este mecanismo de extração e entrega de oxigênio

pode ser um alvo potencial da seleção natural em ambientes caracterizados por períodos extremos e intermitentes de hipóxia.

Para lidar com a complexidade de variações ambientais, as espécies amazônicas adquiriram adaptações ao longo do processo evolutivo, as quais podem ser genéticas, fisiológicas, morfológicas ou comportamentais, que as permitem ocorrerem nestes ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio (Hochachka and Somero, 2002; Schulte et al., 2015; Gonçalves et al., 2018; Kochhann et al., 2021). Essas adaptações incluem processos de depressão metabólica caracterizados por diminuir a demanda de ATP ou mecanismos que auxiliam no aumento da eficiência energética por meio de alterações na respiração mitocondrial (Hochachka et al., 1997; Guppy and Withers, 1999); algumas espécies ainda fazem o uso de ambas as estratégias para lidar com a baixa disponibilidade de oxigênio (Almeida-Val et al., 1993). Além disso, há também uma grande diversidade de peixes que apresentam modificações morfológicas para extrair oxigênio do ar quando expostos a baixas concentrações de oxigênio na água. Por exemplo, *Hoplerythrinus unitaeniatus* usa a bexiga natatória como órgão de respiração aérea (Cruz-Landim and Cruz-Höfling, 1979), *Hoplosternum littorale* respira ar através do intestino (Affonso and Rantin, 2005), e os membros da família Loricariidae, popularmente conhecidos como cascudo ou acari, utilizam o estômago para captar oxigênio aéreo (Carter and Beadle, 1931; Armbruster, 1998).

O aparecimento de diversas linhagens de peixes que apresentam respiração aérea tem sido ligado com períodos de grandes pressões ambientais, como é o caso dos peixes pulmonados (Dipnoi), Osteoglossomorpha e Ostariophysii, estando inclusos nessa última superordem os Siluriformes (Pough, 2003). Dentro dos Siluriformes, a família Loricariidae é a mais diversa, com mais de 1000 espécies válidas (Eschmeyer and Fong, 2020). Estes peixes podem ser encontrados desde regiões baixas até riachos de fluxo rápido localizadas a 3.000 m de altitude (Nelson, 2006) ocupando os mais diversos ambientes, que podem ou não estar propensos à hipóxia (Nelson, 2014). A vasta variedade de nichos que esse grupo ocupa exige que cada espécie tenha uma série de adaptações para lidar com diferentes características que eles encontram em seus ambientes.

A respiração aérea não é uma característica sinapomórfica do grupo, embora esses animais tendam a fazer o uso desse mecanismo quando expostos à ambientes com baixas concentrações de oxigênio dissolvido, usando principalmente o estômago como órgão de respiração aérea (ABO) (Armbruster, 1998). Evolutivamente, as características morfológicas do estômago propiciaram que o mesmo se tornasse um órgão acessório de respiração, com conexão com o meio externo por meio do tubo digestivo, alta vascularização e conexão do

órgão com as demais áreas da cavidade abdominal, o que facilita o transporte de gases para outros tecidos (Gee, 1976). Na família Loricariidae há uma diversidade morfológica nos órgãos de respiração aérea, podendo ser encontrados até nove tipos de estômagos de acordo com Armbruster (1998). Dentre os diferentes tipos morfológicos, o autor relata que em indivíduos do gênero *Ancistrus*, o estômago representa de metade a três quartos da cavidade abdominal, tendo uma menor irrigação quando comparado com outros órgãos respiratórios. Essa característica contrasta com a morfologia encontrada no gênero *Pterygoplichthys*, em que o órgão acaba preenchendo grande parte da cavidade abdominal. Além de apresentar um aumento na vascularização do órgão de respiração aérea, no gênero *Pterygoplichthys* há um aumento na camada de tecido conjuntivo que reveste a parede do estômago ligando-o à parede do corpo, o que facilita o esvaziamento do gás (Armbruster, 1998).

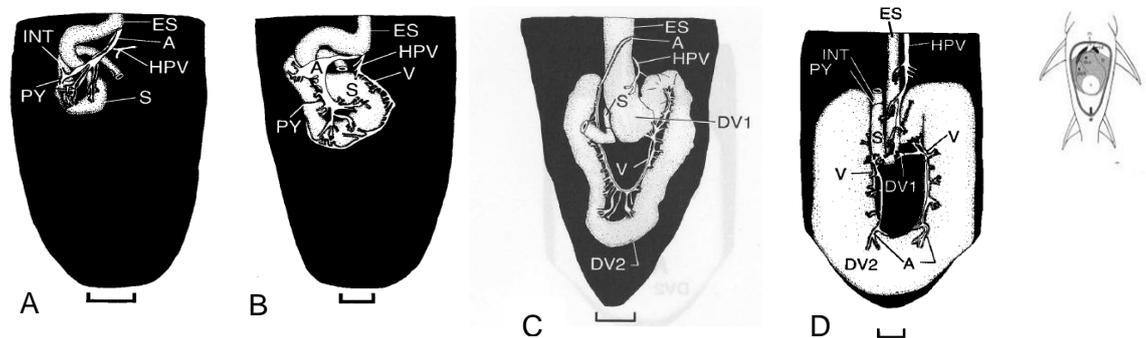


Figura 1. Diversidade de morfologias estomacais encontrada na família Loricariidae (adaptado de Armbruster, 1998). Região em preto demonstra a extensão do peritônio. A = ramo da artéria celíaca; D = divertículo; DV1 = seção muscular de divertículo; DV2 = seção cheia de ar do divertículo; ES = esôfago; HPV = veia porta hepática; V = veia no estômago; INT = intestino; PY = piloro; S = estômago. Escala = 5 mm.



Figura 2. Morfologias estomacais de *Pterygoplichtys pardalis* (A) e *Ancistrus dolichopterus* (B) (Acervo pessoal). Escala= 2cm e 3cm, respectivamente.

Em peixes de respiração aérea, a capacidade de extração de oxigênio do ar é determinada pela habilidade do órgão de respiração acessória em realizar o processo de captação e extração do oxigênio do meio aéreo. Desse modo, para sobreviver em um ambiente hipóxico é necessário um aumento da extração de oxigênio do ar. Entretanto, ao limitar o acesso ao ar, as espécies podem passar a fazer o uso do metabolismo anaeróbico a fim de suprir a demanda energética e, ao mesmo tempo, reduzir a demanda por oxigênio, como demonstrado por da Cruz et al. (2013). Porém, quando o acesso ao ar é permitido não ocorrem tais modificações fisiológicas e o metabolismo aeróbico é mantido, mostrando uma preferência pela manutenção da atividade aeróbica nesses peixes.

Deste modo, ao entender como os peixes que respiram ar respondem a diferentes concentrações de oxigênio, será possível compreender como indivíduos, evolutivamente aparentados, respondem às pressões ambientais. As adaptações dos peixes da Amazônia a essas variações ambientais são de grande importância, ocasionando um impacto tanto na economia quanto em toda biota aquática.

Além da hipóxia, outra variável que causa grandes perturbações homeostáticas em animais ectotérmicos é a variação na temperatura. Os animais ectotérmicos têm a sua temperatura corporal determinada pela temperatura do ambiente e, portanto, possuem mecanismos adquiridos evolutivamente que os ajudam a lidar com tais variações térmicas. Esses ajustes podem envolver comportamento termorregulador (Pépin et al., 2015; Kochhann et al., 2021), expressão diferenciada de genes relacionados à adaptação térmica (Schulte, 2004; Park et al., 2015; Gonçalves et al., 2018), mudanças nas taxas metabólicas (Campos et al., 2018), nas atividades enzimáticas (Braz-Mota et al., 2017), na hierarquia social (Kochhan et al., 2015) e no crescimento e taxa de reprodução (Salomão et al., 2018; Pörtner and Peck, 2010).

A capacidade de um organismo ectotérmico para desenvolver suas atividades em diferentes temperaturas é descrita por uma curva de desempenho térmico em forma de sino inclinada para a esquerda, que sobe juntamente com a temperatura de um mínimo térmico crítico, CT_{min} , para uma temperatura ótima, T_{opt} , e depois cai rapidamente para o máximo térmico crítico, CT_{max} (figura 1) (revisto por Pörtner et al., 2010 e por Schulte, 2011).

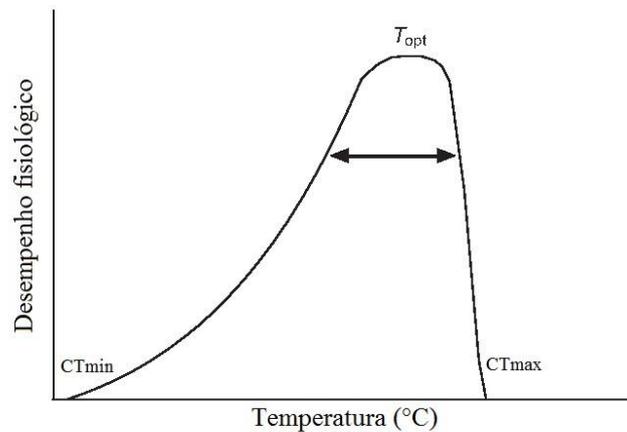


Figura 3. Curva típica de desempenho térmico. As curvas de desempenho térmico resumem os efeitos de temperatura nos processos biológicos. O desempenho térmico de um indivíduo sobe juntamente com a temperatura a partir de um mínimo térmico crítico, CT_{min} , para uma temperatura ótima, T_{opt} , e depois cai rapidamente para máximo térmico crítico, CT_{max} (revisto por Schulte, 2011).

De maneira geral, a temperatura exerce influência nas reações químicas e biológicas dos organismos aquáticos. Dessa forma, um aumento na temperatura corporal dos organismos causa uma elevação no seu metabolismo, o que ocasiona mudanças nas taxas metabólicas do animal. Sendo assim, as altas temperaturas tendem a acelerar as reações enzimáticas, aumentando o gasto energético e modificando diversos outros mecanismos homeostáticos nesses animais, como velocidade de natação e atividade espontânea (Pough, 2003). A tolerância térmica tem sido relacionada com a capacidade aeróbica por meio da hipótese “Oxygen and Capacity Limited Thermal Tolerance” (OCLTT), que prediz que uma redução no escopo aeróbico está relacionada com a tolerância térmica das espécies, observando que escopo aeróbico reflete a diferença entre taxa metabólica máxima e taxa metabólica basal, devido à incapacidade de extrair oxigênio e entregá-lo efetivamente aos tecidos em altas temperaturas (Pörtner and Knust, 2007; Pörtner, 2010). A capacidade funcional dos sistemas de suprimento de oxigênio, especialmente do sistema cardiovascular, para atender totalmente à demanda e sustentar o

escopo aeróbico é limitada a uma janela térmica característica de cada espécie. Portanto, uma vez que as espécies se aproximam dos seus limites térmicos, restrições na capacidade de fornecer oxigênio aos tecidos para atender à demanda causam uma ativação do metabolismo anaeróbico e do sistema de combate ao estresse oxidativo que resulta em um declínio progressivo no desempenho (figura 2).

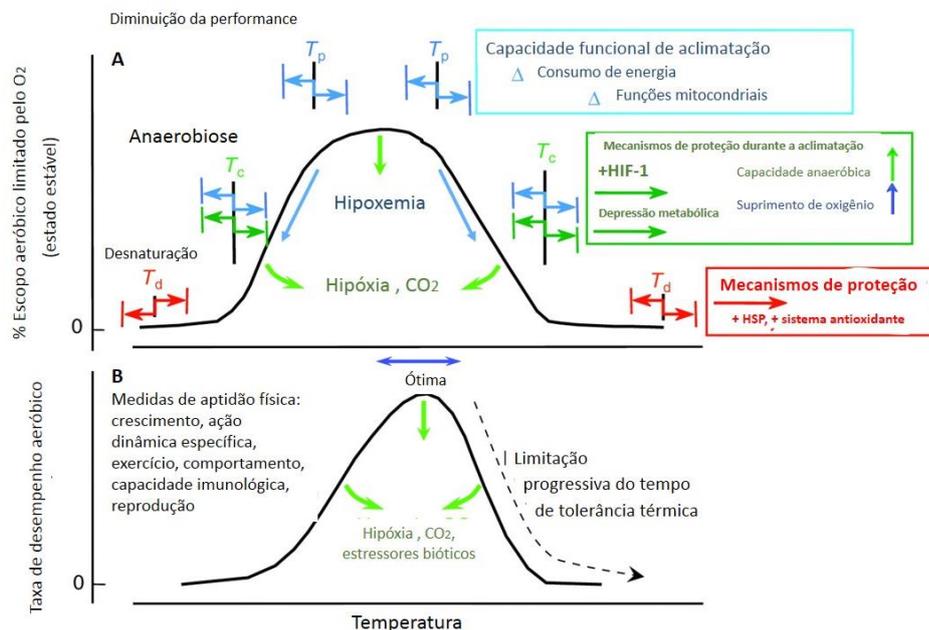


Figura 4. Modelo conceitual de como a temperatura molda a janela térmica de desempenho de uma espécie em um estágio específico da vida, com base no conceito de OCLTT. (A) o suprimento de oxigênio para o tecido é ideal entre altas e baixas temperaturas de pejus ("pior" em latim), temperatura de perda, quando se inicia um declínio no escopo aeróbico (B) onde o suprimento de oxigênio para os tecidos é dependente da temperatura para sustentar o metabolismo do animal. Temperaturas críticas (T_c) caracterizam o início do metabolismo anaeróbico e temperaturas de desnaturação (T_d), a perda de integridade das estruturas moleculares. Máximos e mínimos térmicos críticos (CT_{max} e CT_{min}) demonstram os limites extremos onde as funções de todo o organismo cessam. A estimulação cinética do desempenho pelo aquecimento leva a uma curva inclinada com um ótimo funcional próximo à temperatura superior do pejus. A curva de desempenho demonstra a função da capacidade funcional e o escopo aeróbico associado nos processos no nível do ecossistema, como competição, forrageamento, resposta imune, crescimento e comportamento. A hipóxia ambiental e os níveis elevados de dióxido de carbono causam um estreitamento das janelas térmicas e, possivelmente, no desempenho ótimo por meio de diminuições das capacidades funcional e tensões sistêmicas de oxigênio (de acordo com Pörtner, 2010).

A hipóxia aquática progressiva afeta a taxa metabólica por meio de reduções no gradiente e taxa de difusão de oxigênio através do epitélio branquial, do conteúdo de oxigênio no sangue, e da capacidade de transporte de oxigênio do sistema cardiorrespiratório. Portanto, quando expostos a condições de hipóxia aquática, abaixo de um nível em que a capacidade de transporte de oxigênio possa ser mantida, ocorre uma diminuição do suprimento de oxigênio tecidual que pode sustentar as funções de manutenção basal por meio do metabolismo aeróbico. Deste modo, em ambientes hipóxicos, os peixes de respiração aquática apresentam uma diminuição de sua janela térmica (Ern et al., 2016).

A hipóxia aquática é defendida por pesquisadores como sendo um dos principais eventos responsáveis pelo aparecimento de órgãos especializados em respiração aérea (Almeida-Val et al., 2006). Giomi et al. (2014) relatam que eventos de hipóxia podem ter agregado condições para o desenvolvimento de adaptações para respirar ar; porém, as altas temperaturas devem ter tido um efeito importante no surgimento da respiração aérea. Restrições causadas por temperaturas elevadas influenciam no metabolismo aeróbico e no gasto energético, associada à diminuição do desempenho fisiológico, o que pode ter exercido pressão evolutiva para o surgimento da respiração aérea.

A relação entre concentração de oxigênio e tolerância térmica, descrita por Pörtner (2010), deve ter sido a força motriz para a evolução de estruturas respiratórias em distintos grupos de animais. Isto está de acordo com o fato de que, embora uma grande diversidade de ambientes hipóxicos e anóxicos ocorra em regiões temperadas, uma maior diversidade de peixes de respiração aérea é encontrada em ambientes tropicais onde a temperatura é mais elevada. Portanto, o aparecimento das estruturas de respiração aérea que estão ligadas aos mecanismos circulatórios que facilitam a captação e transporte de oxigênio, como por exemplo, proximidade do órgão acessório de respiração ao coração, dupla entrega de sangue oxigenado ao tecido cardíaco, aumento da frequência de respiração aérea, bradicardia, aumento da eficiência cardíaca durante eventos de hipercardia, dentre outros (Oliveira et al., 2004; Farrell et al., 2009; Bojink et al., 2010; da Cruz et al., 2013; MacCormack et al., 2017), possibilitaram estes organismos explorar os ambientes com baixa concentração de oxigênio e alta temperatura, como os que ocorrem na região amazônica.

Apesar de todos os mecanismos adquiridos pelos peixes da Amazônia para lidar com as variações ambientais que são extremamente recorrentes, as condições ambientais tendem a se tornar muito mais críticas devido ao aumento das atividades antropogênicas, e causar efeitos deletérios em muitas espécies. Diversos estudos relatam que desde a revolução industrial os

níveis de dióxido de carbono sobem de forma exponencial, e as atividades antrópicas vem contribuindo cada vez mais para o agravamento da emissão dos gases causadores do efeito estufa, principalmente o CO₂. Previsões do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas alertam para um aumento de até 6°C na temperatura e 850ppm de CO₂ até o ano de 2100 (IPCC, 2022). Em 2007 o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) publicou um relatório com os modelos regionais dos impactos das mudanças climáticas, demonstrando que para a região amazônica haverá aumento de 2 a 8 °C na temperatura, diminuições no volume das chuvas, além de risco de desertificação e aumento nos períodos e intensidade de baixas concentrações de oxigênio (Ambrizzi et al. 2007).

De forma geral, os aumentos de temperatura previstos decorrentes do aumento da emissão de gases do efeito estufa na Amazônia atuam como um feedback positivo elevando a vulnerabilidade dos ecossistemas amazônicos às mudanças climáticas globais devido ao aumento do efeito estufa regional em função do desmatamento, o qual exerce influência significativa nas mudanças climáticas na Amazônia – um verdadeiro efeito bumerangue. Essas alterações tem impacto direto no ambiente aquático, sendo responsável por modificações intensas no ciclo hidrológico, elevando a temperatura da água, diminuindo o pH e a concentração de oxigênio e colocando em risco espécies que vivem na região (Nobre et al., 2007; Pörtner and Knust, 2007; Val, 2019). Em recente trabalho, Jung et al. (2020) demonstraram que um aumento na temperatura leva a uma redução na capacidade de tolerância à hipóxia em espécies de respiração aquática. Portanto, é esperado que o agravamento das condições ambientais existentes na região leve a um declínio populacional e da biodiversidade.

Levando em consideração que as espécies tropicais estão vivendo perto dos seus limites térmicos, e que várias espécies de peixes amazônicos aparentemente não possuem tolerância cruzada para a hipóxia e altas temperaturas, é possível que a intensificação das altas temperaturas e baixas concentrações de oxigênio cause o desaparecimento dessas espécies (Campos et al., 2018; Jung et al., 2020). Entretanto, uma melhora na captação de oxigênio por meio do uso de respiração aérea, além de ser um importante determinante na tolerância à hipóxia, tende a ser um dos principais mecanismos na amplitude de tolerância térmica, o que pode levar a um sucesso adaptativo em espécies de respiração aérea facultativa (Hughes et al., 1986; Pörtner, 2010).

Tendo em vista o ambiente adverso e as previsões dadas pelo IPCC (2022) a otimização dos mecanismos respiratórios e o aumento da disponibilidade de oxigênio podem trazer um aumento na janela de tolerância térmica (Pörtner, 2010), o que pode ser uma adaptação extraordinária para os peixes que respiram ar, uma vez que o ar possui uma maior

disponibilidade de oxigênio quando comparado ao ambiente aquático. Entretanto, a amplitude de tolerância térmica em animais que respiram ar tende a ser influenciada pela capacidade de extração e suprimento de oxigênio, o que está relacionada com as modificações morfológicas e adaptações fisiológicas de cada espécie (Rohr et al., 2018; Sunday et al., 2011). Deste modo, uma maior eficiência na captação de oxigênio por meio da respiração aérea pode trazer além de um aumento na tolerância à hipóxia uma amplitude na tolerância térmica de tais animais. Portanto, os peixes que fazem o uso da respiração bimodal podem ser afetados de forma distinta, tanto no que diz respeito a sua amplitude térmica quanto aos mecanismos de aclimação à hipóxia, dependendo da sua capacidade de captar oxigênio do ar e transferi-lo aos demais tecidos.

Sendo assim, o presente trabalho objetiva investigar o efeito da hipóxia sobre a tolerância térmica e os mecanismos fisiológicos e comportamentais de duas espécies de peixes de respiração aérea facultativa com estruturas diferentes para a tomada de oxigênio do ar, *Pterygoplichthys pardalis* e *Ancistrus dolichopterus*. É esperado que *A. dolichopterus*, tenha menor habilidade para condições hipóxicas tendo em vista que o órgão de respiração acessória possui uma menor capacidade de extrair oxigênio do ar comparado ao *P. pardalis*; dessa forma, uma menor amplitude de tolerância térmica também é esperada para *A. dolichopterus* em maiores concentrações de oxigênio.

1.1 Objetivos

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da concentração de oxigênio sobre a tolerância térmica e os mecanismos fisiológicos e comportamentais de *Pterygoplichthys pardalis* e *Ancistrus dolichopterus* duas espécies de peixes de respiração bimodal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Verificar o efeito da concentração de oxigênio dissolvido na água sobre a frequência de respiração aérea e temperatura para o início da respiração aérea.
- 2) Avaliar o efeito da concentração de oxigênio dissolvido na água sobre os limites térmicos das espécies com e sem acesso ao ar.
- 3) Investigar o efeito do estresse térmico na respiração mitocondrial em tecido cardíaco *in vitro*.

1.2 Hipóteses

H1: *Pterygoplichthys pardalis* tem tolerância térmica maior que *A. dolichopterus*

H2: A tolerância térmica é independente da concentração de oxigênio em *P. pardalis* e dependente da concentração de oxigênio em *A. dolichopterus*

H3: A interrupção do acesso ao ar diminui a tolerância térmica em ambas as espécies.

Capítulo I

Lima, M. C. M.; Campos, D. F.; Kochhann, D; Val, A. L. V. O efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica em duas espécies de peixes de respiração bimodal: mudanças fisiológicas e comportamentais. Artigo a ser submetido para o periódico *Journal of Experimental Biology*.

O efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica em duas espécies de peixes de respiração bimodal: mudanças fisiológicas e comportamentais

Mayara Cristina Moraes de Lima¹; Derek Felipe de Campos¹; Daiani Kochhann²; Adalberto Luis Val¹

¹Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Coordenação de Biodiversidade, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

²Universidade Estadual Vale do Acaraú

Corresponding author*

maycmdl@gmail.com (LIMA, M. C. L.)

Resumo

A capacidade de tolerar condições adversas determina o quão vulnerável as espécies vão estar frente às mudanças ambientais. Diversos estudos demonstram uma redução nos níveis de tolerância ao calor das espécies de peixes de respiração aquática quando expostos à hipóxia. No entanto, não há informações sobre o efeito da hipóxia sobre a tolerância térmica em espécies de peixes de respiração bimodal. Diversos grupos de peixes amazônicos apresentam a capacidade de respirar ar de forma facultativa, dentre eles os loricariídeos que utilizam o estômago adaptado para respirar ar. Na família Loricariidae existem estômagos com diferentes configurações morfológicas, as quais podem determinar a habilidade das espécies de maximizar a capacidade de captação de oxigênio do ar e estender seus limites térmicos, como discutidos pela teoria da capacidade de tolerância térmica limitada pelo oxigênio (OCLTT). Sendo assim, objetivamos avaliar o efeito da hipóxia sobre os limites térmicos e os mecanismos fisiológicos e comportamentais de dois respiradores aéreos facultativos, *Pterygoplichthys pardalis* e *Ancistrus dolichopterus*, que possuem diferentes capacidades de extrair oxigênio do ar. Para *Pterygoplichthys pardalis*, os limites de tolerância térmica independem da concentração de oxigênio. Entretanto, ao limitar o acesso a superfície verificamos uma diminuição da CT_{max} em condições hipóxicas. Por outro lado, em *Ancistrus dolichopterus* a CT_{max} é limitada pela concentração de oxigênio a partir de concentrações abaixo do P_{crit} quando o acesso à superfície é disponível e não difere entre animais com e sem acesso ao ar. Portanto, nossos resultados demonstram que a respiração aérea aumenta a capacidade de tolerância ao calor em espécies que possuem a capacidade de maximizar a tomada de oxigênio aéreo. Sendo assim, tais espécies

apresentam maior vantagem adaptativa quando comparadas com espécies de respiração aérea facultativa com menor eficiência na captação de oxigênio.

2.1 Introdução

Os limites de tolerâncias fisiológicas determinam a capacidade de sobrevivência das espécies frente ao conjunto de desafios ambientais. A temperatura crítica máxima (CT_{max}), temperatura na qual os animais exibem uma perda de equilíbrio (LOE) (Beitinger et al., 2000), define o limite superior do nicho térmico fundamental. A CT_{max} tem sido utilizada recentemente para prever o grau de susceptibilidade das espécies ao aumento da temperatura e tem sido correlacionada com mudanças populacionais e migração de espécies de peixes marinhos em direção aos pólos (Sunday et al., 2012; Pörtner et al., 2017; Campos et al., 2021)

A relação entre o aumento da temperatura da água e a maior demanda de oxigênio para lidar com o aquecimento é um ponto fundamental para entender a vulnerabilidade de animais ectotérmicos a eventos climáticos extremos, tendo em vista que as mudanças climáticas estão intensificando o aparecimento de extremos térmicos e limitando a disponibilidade de oxigênio nos ambientes aquáticos. Pörtner (2010), na teoria da “Oxygen and Capacity Limited Thermal Tolerance” (OCLTT), propôs que a CT_{max} é determinada pela capacidade de suprimento eficiente de oxigênio aos tecidos. Isto ocorre porque, ao se aproximar da CT_{max} , as espécies apresentam redução na frequência cardíaca e ventilatória, débito cardíaco diminuído, redução na concentração de oxigênio no sangue e acúmulo de metabólitos anaeróbicos. Portanto, próximo aos níveis de tolerância térmica máxima as espécies são incapazes de manter o suprimento eficiente de oxigênio devido a um colapso no sistema cardiorrespiratório.

Deste modo, uma diminuição da disponibilidade de oxigênio poderia ter um efeito direto na redução dos limites térmicos, por meio de falhas na entrega de oxigênio pelo sistema cardiorrespiratório. Assim, hipotetiza-se que os limites térmicos seriam dependentes de oxigênio. Entretanto, estudos recentes demonstram que uma redução dos limites térmicos só ocorre quando a pressão de oxigênio na água (P_{WO_2}) está abaixo da pressão crítica de oxigênio (P_{crit}). Isto ocorre porque a partir deste ponto, a capacidade de manutenção do metabolismo basal é comprometida, fator esse que determina a temperatura crítica e posteriormente a CT_{max} das espécies (Ern et al., 2014, 2016, 2017). Sendo assim, para essas espécies a CT_{max} não é determinada pelo suprimento de oxigênio em P_{WO_2} acima do P_{crit} , e os limites térmicos são independentes do oxigênio em uma ampla faixa de concentração de oxigênio.

Segundo Campos et al. (2021) as espécies amazônicas estão entre as mais vulneráveis ao aumento da temperatura decorrentes das alterações climáticas, uma vez que vivem próximas aos seus limites térmicos. Contudo, o efeito da concentração de oxigênio dissolvido para espécies amazônicas tem sido negligenciado. Para as espécies amazônicas isso pode ser particularmente importante, pois elas podem ser mais suscetíveis a reduções na janela térmica caso esta característica seja dependente de oxigênio, já que as águas amazônicas são caracterizadas por apresentarem eventos hipóxicos sazonais e diários (Almeida-Val et al., 2006).

Para lidar com a complexidade de variações ambientais, as espécies amazônicas adquiriram adaptações genéticas, fisiológicas, morfológicas e comportamentais, que lhes permitem ocorrer nestes ambientes com baixa disponibilidade de oxigênio (Almeida-Val et al., 2000; Hochachka and Somero, 2002; Schulte, 2015; Gonçalves et al., 2018; Campos et al., 2019; Heinrichs-Caldas et al., 2019; Pelster et al., 2020; Heinrichs-Caldas and Almeida-Val, 2021;; Kochhann et al., 2021). Além dessa variedade de adaptações, também podemos encontrar uma grande diversidade de peixes que apresentam modificações morfológicas especializadas para extrair oxigênio do ar quando expostos a baixas concentrações de oxigênio na água. Como exemplo, tem-se *Hoplerythrinus unitaeniatus* que usa a bexiga natatória como órgão de respiração aérea (ABO – *air breathing organ*) (Cruz-Landim and Cruz-Höfling, 1979), *Hoplosternum littorale* que usa uma porção modificada do intestino (Brauner et al., 1995, 1999; Affonso and Rantin, 2005), e os membros da família Loricariidae, popularmente conhecidos como cascudos ou acari, que utilizam o estômago para usar o oxigênio aéreo engolido (Armbruster, 1998; Val, 1995). Essas adaptações podem ser extremamente vantajosas para que essas espécies enfrentem o desafio das mudanças climáticas, uma vez que elas podem extrair o oxigênio do ar aumentando o suprimento de oxigênio aos tecidos e ampliando a janela térmica. Além disso, podem apresentar uma tolerância térmica independente da concentração de oxigênio. No entanto, o potencial efeito da respiração aérea sobre a tolerância térmica em espécies amazônicas ainda não foi estudado.

Na família Loricariidae há uma diversidade morfológica nos órgãos de respiração aérea, podendo ser encontrados até nove tipos de estômagos (Armbruster, 1998). Dentre os diferentes tipos morfológicos, o estômago do gênero *Ancistrus* representa de metade a três quartos da proporção da cavidade abdominal, tendo uma menor irrigação quando comparado com outros órgãos acessórios. Essa característica contrasta com a morfologia encontrada no gênero *Pterygoplichthys* em que o órgão acaba preenchendo grande parte da cavidade abdominal. Além de apresentar um aumento na vascularização do órgão de respiração aérea, no gênero

Pterygoplichthys há um aumento na camada de tecido conjuntivo que reveste a parede do estômago, ligando-o à parede do corpo, o que facilita o esvaziamento do gás (Armbruster, 1998). Em peixes de respiração aérea, a capacidade de extração de oxigênio do ar é determinada pela habilidade do órgão de respiração acessória em realizar o processo de captação e extração do oxigênio do meio aéreo. Desse modo, para sobreviver em um ambiente hipóxico é necessário um aumento da extração de oxigênio do ar. Entretanto, se as necessidades fisiológicas não forem sustentadas pela respiração aérea, as espécies podem passar a fazer o uso do metabolismo anaeróbico a fim de suprir a demanda energética ocasionada pela baixa tensão de oxigênio, como demonstrado por Cruz et al. (2013) para *Pterygoplichthys anisitsi*. Porém, quando o acesso ao ar é permitido não ocorrem tais modificações fisiológicas e o metabolismo aeróbico é mantido, mostrando uma preferência pela manutenção da atividade aeróbica nesses peixes.

O comportamento respiratório de peixes de respiração aérea pode sofrer influência da pressão de oxigênio ambiental. Para o tamoatá (*Hoplosternum littorale*) a diminuição do oxigênio abaixo do P_{crit} aumentou a frequência de respiração aérea (Affonso and Rantin, 2005). O aumento da frequência de respiração aérea em condições hipóxicas também foi relatado para *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Oliveira et al., 2004) e *Hypostomus regani* (Mattias et al., 1998). Pelster et al. (2018) associaram o aumento da ventilação da bexiga natatória de *Hoplerythrinus unitaeniatus* ao aumento do número de subidas à superfície em condições hipóxicas, considerando esse comportamento um mecanismo fundamental para elevar o fornecimento de oxigênio aos tecidos. O estresse ocasionado por modificações ambientais também desencadeia respostas comportamentais de evitação ocasionando um aumento da agitação. Para o respirador aéreo *Polypterus* sp., o comportamento de evitação (fugir ou evitar exposição à situação desagradável) não foi visto em situações hipóxicas quando a espécie teve acesso ao ar, porém quando o acesso ao ar foi negado a espécie demonstrou apresentar maior agitação (Jew and Hicks, 2018). Isso sugere que o mecanismo de respiração aérea é fundamental para aumentar a captação de oxigênio e manter o metabolismo aeróbico quando o animal é exposto a condições hipóxicas.

Tendo em vista a ampla variedade de adaptações morfológicas para captação de oxigênio aéreo nós iremos investigar o efeito da concentração de oxigênio em duas espécies de respiração bimodal que apresentam diferentes morfologias do órgão de respiração acessória *Pterygoplichthys pardalis* e *Ancistrus dolichopterus*. Nós hipotetizamos que espécies que apresentam órgãos de respiração acessória capazes de maximizar a tomada de oxigênio aéreo, aumentando o fornecimento de oxigênio aos tecidos, e mantêm a atividade do metabolismo aeróbico em uma ampla faixa de oxigênio, terão uma vantagem adaptativa quando comparadas

com espécies de respiração aérea com baixa habilidade de extração de oxigênio do ar ou espécies de respiração aquática. Sendo assim, nós esperamos que: i) *Pterygoplichthys pardalis* tenha tolerância térmica maior que *Ancistrus dolichopterus* ii) a tolerância térmica é independente da concentração de oxigênio em *Pterygoplichthys pardalis* e dependente da concentração de oxigênio em *Ancistrus dolichopterus*, e iii) a interrupção do acesso ao ar diminui a tolerância térmica em ambas as espécies.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Coleta e manutenção dos indivíduos

Para o desenvolvimento do trabalho, noventa indivíduos de *P. pardalis* obtidos no setor de aquicultura do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - Campus III (INPA III) e noventa indivíduos de *A. dolichopterus* coletados na foz do Rio Demini (0°53'4.98"S- 62°50'39.28"O) em Barcelos, localizada a 401 km de distância da cidade de Manaus, foram transportados ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução molecular (LEEM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). No laboratório os animais foram aclimatados em tanques de 1000L com temperatura de 28°C e aeração constante até o início das séries experimentais. Durante este período foi obedecido o fotoperíodo natural da região amazônica (12h luz/12h escuro) e a alimentação foi feita com ração comercial oferecida uma vez ao dia, exceto 24h antes das análises experimentais. As análises experimentais foram divididas em três etapas, descritas a seguir. Todo o experimento foi realizado seguindo as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA aprovada sob protocolo 011/2021, SEI 01280.000185/2021-59.

2.2.2 Experimento I: Taxa metabólica e Pressão crítico de O₂ (P_{crit})

A taxa metabólica foi medida em cinco indivíduos de *P. pardalis* e seis indivíduos de *A. dolichopterus* expostos a 5 diferentes concentrações de oxigênio (100%, 50%, 25%, 12,5% e 5%). Os indivíduos de *P. pardalis* foram transferidos individualmente para câmara de acrílico de 1700ml e os indivíduos de *A. dolichopterus* em câmaras de 70ml. As câmaras foram imersas em aquários experimentais de 50L e temperatura controlada em 28°C. O consumo de oxigênio (MO₂) foi determinado utilizando um sistema automatizado de respirometria de fluxo intermitente (Oxy-4; Loligo Systems, Viborg, Denmark). Os indivíduos foram colocados 24 horas antes da tomada de medidas para a adaptação às câmaras. Neste período, uma bomba conectada a um sistema de aquisição de dados DAQ-M (sistema Loligo) foi utilizada para controlar o ciclo de medição, o qual era dividido em três fases: fluxo (180 segundos), espera

(120 segundos) e medição (600 segundos para *P. pardalis* e 300 segundos para *A. dolichopterus*). No estágio de fluxo, bombas reoxigenaram e recircularam a água dentro da câmara com a água do tanque externo, que era continuamente aerado. Nessa etapa se deu a medição da taxa metabólica de rotina em 100% de O₂. Para realizar a medição nas demais concentrações (50%, 25%, 12,5% e 5%) o sistema foi modificado para fluxo (1 segundo), espera (1 segundo) e medição (600 segundos para *P. pardalis* e 300 segundos para *A. dolichopterus*). Dessa forma a reoxigenação da câmara foi cessada, havendo assim a diminuição da PO₂ à medida que o oxigênio era consumido no interior da câmara. O consumo de oxigênio foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\dot{M}O_2 = \Delta O_2 * V_{resp} * B^{-1}$$

Sendo: ΔO_2 a taxa de variação na concentração de oxigênio (mg O₂ h⁻¹), V_{resp} o volume da câmara de respirometria e B a massa do indivíduo (kg)

Após os experimentos, os animais foram transferidos ao tanque de recuperação e foram utilizados, posteriormente, para as demais análises fisiológicas de tolerância térmica e respiração mitocondrial.

2.2.3 Experimento II: respostas fisiológicas e comportamentais ao aumento da temperatura

2.2.3.1 Tolerância Térmica Máxima (CT_{max}) e análise comportamental

Para determinar o efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica e comportamento de respiração aérea, grupos de três indivíduos foram aleatoriamente distribuídos em cinco aquários experimentais de 50 litros. Cada grupo experimental foi exposto a uma das cinco concentrações de oxigênio, sendo elas 100%, 50%, 25%, 12,5% e 5% de oxigênio. Este procedimento foi repetido três vezes em cada concentração de oxigênio (n=9). A concentração de oxigênio foi diminuída de forma gradual, aproximadamente de 1mgO₂.L⁻¹.h⁻¹, por meio do borbulhamento de N₂ diretamente na água. Durante a estabilização da concentração de oxigênio a temperatura foi mantida em 28°C com auxílio de termostatos. Após atingir a concentração desejada, aguardou-se um período de 1 minuto para estabilização da concentração de oxigênio no aquário. Em seguida, a temperatura da água foi elevada a uma taxa de 0.3°C/min com o auxílio de um aquecedor com termostato digital (TIC-17RGT, FullGauge, ±0,01 de precisão) para determinar a tolerância térmica máxima (CT_{max}) de acordo com a metodologia descrita por Lutterschmidt and Hutchison (1997). A CT_{max} foi considerada a temperatura em que os peixes atingiram a perda de equilíbrio, que é determinada como a

incapacidade de manter a orientação dorso ventral por pelo menos 1 min, de acordo com Beitinger et al. (2000).

A atividade dos peixes foi registrada durante todo o experimento de tolerância térmica com acesso ao ar, com auxílio de uma webcam - Microsoft LifeCam HD-5000. A fim de determinar os efeitos comportamentais do aumento da temperatura, foi avaliada a temperatura em que a respiração aérea era iniciada ($T_{\text{air-breathing}}$), a temperatura de agitação (T_{ag}), designada como a temperatura onde os animais começaram a nadar mais vigorosamente em busca de um ambiente mais termoe estável, e a frequência de respiração aérea (FRA) antes e depois da temperatura de agitação. A FRA foi calculada por meio da seguinte fórmula:

$$\text{FRA} = N/T$$

Sendo N o número de subidas à superfície e T, o tempo de gravação.

Além disso, para determinar o efeito da suspensão da respiração aérea sobre a CT_{max} , foi também analisada a tolerância térmica de indivíduos sem acesso ao ar. Para isto, grupos de três indivíduos foram distribuídos de forma aleatória em três aquários com acesso a superfície vetado por meio de uma folha de isopor aderida à área superior da água. Cada grupo experimental foi exposto a uma de três concentrações de oxigênio, sendo elas 100%, 12,5% e 5% de oxigênio. Essas concentrações foram determinadas a partir das análises experimentais do consumo de oxigênio que indicam uma diminuição na taxa metabólica após 12,5% para ambas as espécies (para detalhes ver seção “Resultados”). Ao atingir a concentração de oxigênio pré-determinada, foi medida a tolerância térmica máxima seguindo os mesmos protocolos descritos acima (fig. 1). Este procedimento foi repetido 3x, para cada concentração de oxigênio (n=9).

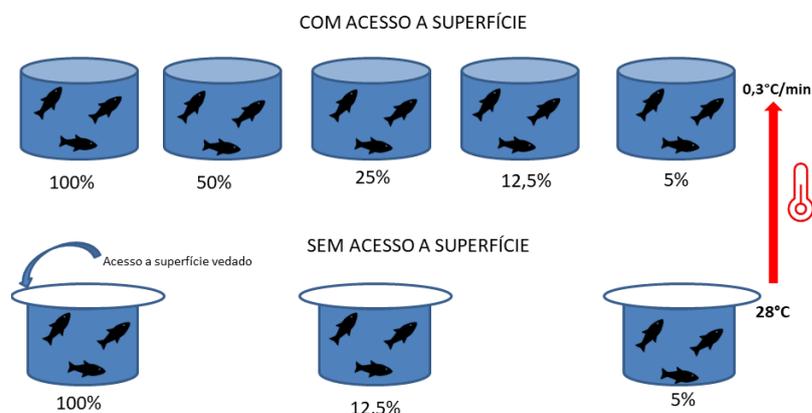


Figura 1. Representação gráfica do desenho experimental de tolerância térmica para *Pterygoplichthys pardalis* e *Ancistrus dolichopterus* com e sem acesso ao ar.

2.2.4 Experimento III: respiração mitocondrial em tecido cardíaco *in vitro*

2.2.4.1 Respiração mitocondrial

Para a análise da respiração mitocondrial, foram avaliadas as respostas em indivíduos de ambas as espécies (n= 5-7) os quais foram retirados do tanque de aclimação externa e eutanasiados por corte na medula espinhal, de acordo com protocolo do CEUA descrito acima. Para cada indivíduo amostrado, a análise da respiração mitocondrial do tecido cardíaco foi realizada em cinco diferentes temperaturas (28°C, 31°C, 33°C, 37°C e 40°C). O consumo de oxigênio foi medido utilizando oxígrafo de alta resolução (Oroboros Oxygraph-2k™, O2K). Após a retirada do coração, o tecido foi dividido em cinco partes iguais, uma para cada temperatura, e adicionados individualmente a 1ml de tampão BIOPS gelado (2,8 mM CaK₂EGTA, 7,2 mM K₂EGTA, 5,8 mM Na₂ATP, 6,6 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM taurina, 20 mM imidazol, 0,5 mM ditiotreitol, KMES 50 mM, Na fosfocreatina 15 mM e sacarose 50 mM, pH 7,2 (Gnaiger et al., 2000)) e reservado por 1 hora. Posteriormente, cada segmento foi levado à lupa e dissecado com auxílio de agulhas, a fim de separar as fibras musculares. Em seguida, o tecido foi imerso em uma solução de 1mL de BIOPS acrescido de 10 μ l de Saponina, que foi reservado por 30 minutos para que houvesse a degradação química das membranas lipídicas da parede celular. Após 30 minutos, as fibras foram lavadas três vezes durante 10 min em 2ml de meio respiratório mitocondrial modificado (MiRO5, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂·6H₂O, 60 mM K-lactobionato, 20 mM taurina, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 160 sacarose mM e 1g/l de BSA, ácido graxo essencialmente livre, pH 7,2 a 25°C; Gnaiger et al. (2000)). As fibras foram secas em papel de filtro e pesadas em feixes de 5–8 mg.

Para iniciar a medida da taxa de consumo de oxigênio, foram adicionadas às câmaras do oxígrafo, as amostras de o tecido cardíaco imerso em 2ml de tampão MIRO 05, e antes de iniciar cada análise foi realizada a supersaturação de oxigênio (200%). Para ativar o Complexo I (CI) foram adicionados 10 μ l de glutamato, 5 μ l de malato e 5 μ l de piruvato. Nessa etapa verificou-se o extravasamento de H⁺ pela membrana mitocondrial (H⁺ Leak), uma vez que não havia ADP para o funcionamento da ATP sintase. Posteriormente, adicionou-se 15 μ l de ADP para ativar o processo de fosforilação oxidativa (OXF). A integridade da membrana mitocondrial externa foi avaliada adicionando 5 μ l de citocromo c, o funcionamento do CI e complexo II (CII) foi verificado através da adição de 20 μ l de Succinato (OXF I – II). Para medir a capacidade de transporte de elétrons (ETS) foi adicionado 1 μ l do desacoplador mitocondrial Carbonilcianeto m-clorofenil hidrazona (CCCP). O CI e CII foram inibidos adicionando-se 1 μ l de Rotenona (0.5 μ M) e 1 μ l (2.5 μ M) de Antimicina, respectivamente.

Para medir a respiração do complexo IV (Citocromo C oxidase - CIV) foram adicionados 5 μ l de ascorbato e 5 μ l de TMPD (dicloridrato de N,N,N',N'- tetrametil-p-fenilenodiamina) para o meio mitocondrial. A taxa de acoplamento (RCR) foi calculada como razão CI/H⁺ Leak.

2.2.5 Análises estatísticas

Os dados são aqui apresentados com média \pm erro padrão. A homogeneidade das variâncias foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para análises paramétricas com apenas uma variável independente utilizou-se a ANOVA ONE WAY e para testes em que havia duas variáveis independentes foi realizada uma ANOVA TWO WAY. Alternativamente para dados não paramétricos utilizou-se uma ANOVA não paramétrica seguida de teste de Kruskal-Wallis, o qual também realiza comparações entre os grupos amostrais. Para as análises de temperatura de agitação, CT_{max} e $T_{airbreathing}$ em *A. dolichopterus* foi usado o teste Dunn para comparações entre os tratamentos, o mesmo teste de comparações foi usado para as análises de temperatura de agitação e $T_{airbreathing}$ em *P. pardalis* e nessa espécie para avaliar a FRA usou-se a análise de Bonferroni para correção de valores. A fim de avaliar as diferenças estatísticas na análise de CT_{max} com e sem acesso ao ar, os dados foram submetidos ao teste de Holm-Sidak. As demais análises presentes nesse estudo foram seguidas de um teste Tukey de comparação múltipla para realizar comparações entre os tratamentos. Em todos os testes, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados das análises de respiração mitocondrial foram logaritimizados para, se possível, gerar dados de distribuição normal. As análises foram feitas com o auxílio do software SigmaPlot v. 12.0 .9 (Systat Software, Inc)."

2.3. Resultados

2.3.1 Taxa de consumo de oxigênio e Pressão Crítica de O₂ (PO₂Crit)

A taxa de consumo de oxigênio (MO₂) em *P. pardalis* não apresentou diferenças entre 100% de oxigênio e 12,5% de oxigênio (66,75 mgO₂.kg⁻¹.h⁻¹), havendo uma diferença significativa somente em 5% de oxigênio (23,75 mgO₂.kg⁻¹.h⁻¹) (Figura 2A). Enquanto, *A. dolichopterus* não apresentou diferenças entre as concentrações de 100% e 25%, houve uma redução significativa na MO₂ a partir de 12,5% chegando a 18,16 mgO₂.kg⁻¹.h⁻¹ em 5% de oxigênio (Figura 2B). Portanto, *P. pardalis* é capaz de manter o suprimento de oxigênio para atender a demanda metabólica em um intervalo maior de disponibilidade de oxigênio ambiental.

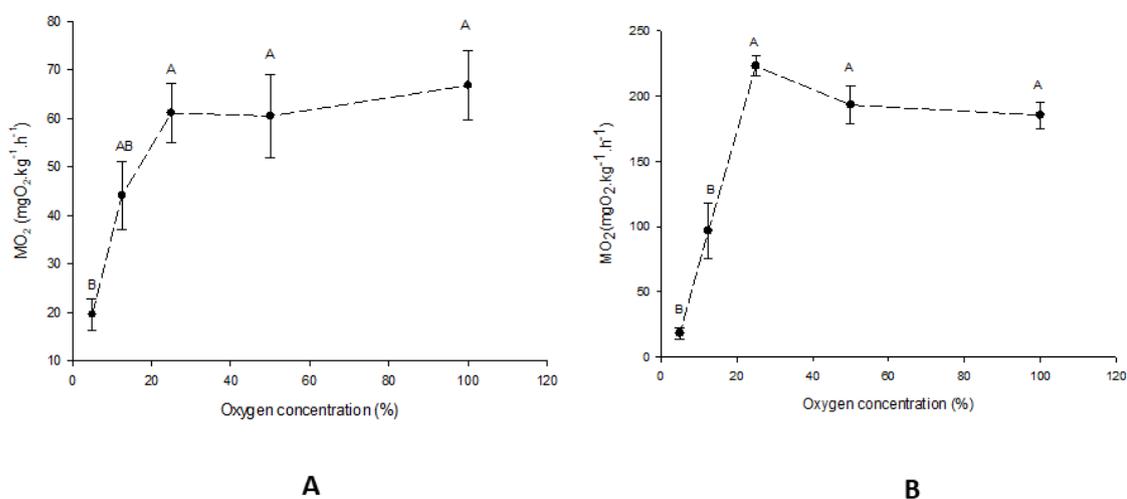


Figura 2. Efeito da concentração ambiental de oxigênio no consumo de oxigênio de (A) *Pterygoplichthys pardalis* ($H = 10,176$; $P = 0,038$) e de (B) *Ancistrus dolichopterus* ($H = 22,947$, $P < 0,001$) em cinco concentrações ambientais de oxigênio 100% (20,630 kPa), 50% (10,315 kPa), 25% (5,157 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as concentrações analisadas ($p < 0,05$).

2.3.2 Análise comportamental e tolerância térmica máxima (CT_{max})

No início do teste de tolerância térmica, os indivíduos das duas espécies encontravam-se preferencialmente no fundo do aquário, imóveis, comportamento característico das espécies. A temperatura de agitação (T_{ag}) foi caracterizada como temperatura na qual os indivíduos deixaram o fundo do aquário e aumentaram a atividade natatória, adotando muitas vezes um hábito pelágico, comportamento que não é típico dessas espécies. Essa mudança no comportamento pode ser interpretada como uma tentativa de encontrar refúgios com temperaturas mais frias, muitas das vezes sendo também observado um comportamento de natação nas extremidades dos aquários (comportamento de evitação) (McDonnell et al., 2019; Kochhann et al., 2021). Para *P. pardalis* em 100% de oxigênio a temperatura de agitação foi de 38,03°C, sendo visto um declínio em 12,5%, onde a T_{ag} diminuiu 0,82°C ($p = 0,011$) (fig. 3A). Todavia, *A. dolichopterus* mostrou-se mais sensível ao aumento da temperatura, apresentando uma T_{ag} em 100% de 34,87°C e diminuição na temperatura de agitação a partir de 25% de oxigênio, sendo constatada uma diminuição de 1,86°C em 25% e 5% de oxigênio ambiental ($p = 0,004$) (fig 3 B). Vale ressaltar que em 100% de oxigênio, *P. pardalis* apresenta T_{ag} próxima a sua CT_{max} , com uma diferença de apenas 2,31°C, enquanto para *A. dolichopterus* a T_{ag}

acontece a aproximadamente 4°C antes da CT_{max} , demonstrando haver um maior gasto energético em atividade natatória quando a temperatura se eleva. Isso pode estar associado a maior sensibilidade desta espécie, isto é, maior consumo de oxigênio e menor CT_{max} da espécie.

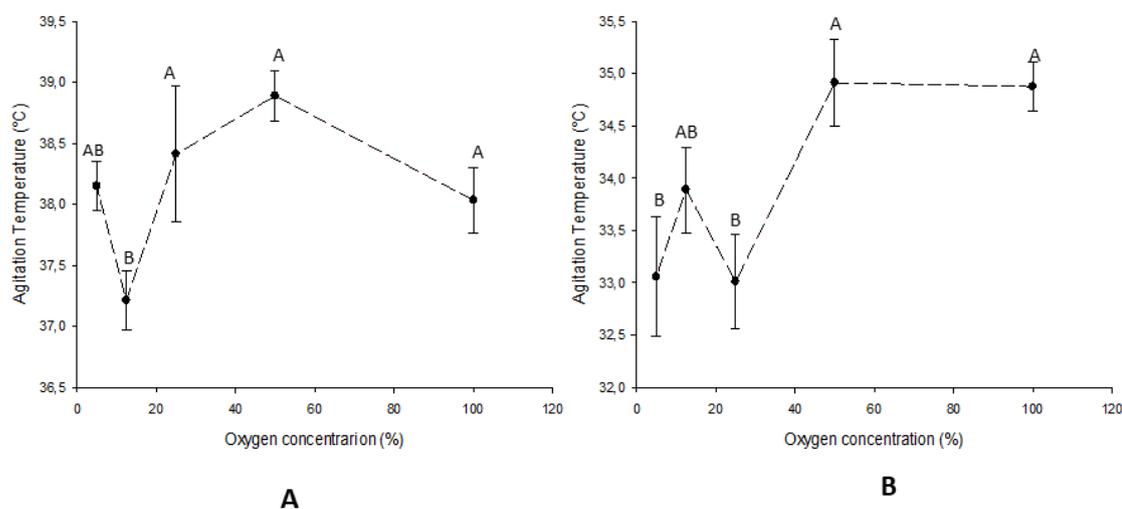


Figura 3. Efeito da concentração ambiental de oxigênio sobre a temperatura de agitação (T_{ag}) em (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco concentrações ambientais de oxigênio 100% (20,630 kPa), 50% (10,315 kPa), 25% (5,157 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as concentrações analisadas ($p < 0,05$).

A análise de frequência de respiração aérea (FRA) foi medida antes e depois da T_{ag} . Antes da T_{ag} nenhuma das espécies apresentou diferença na frequência de respiração aérea em todas as concentrações de oxigênio testadas. Após a T_{ag} , *A. dolichopterus* apresentou um aumento na FRA em 5% de oxigênio. A comparação da FRA nas duas condições medidas demonstrou que *P. pardalis* nas concentrações 50, 25, 12,5, 5% de oxigênio apresenta uma elevação na FRA após a T_{ag} ($p = <0,001$), enquanto essa diferença para a T_{ag} é vista apenas em 5% para *A. dolichopterus* ($p = 0,029$) (fig. 4). As análises pós-experimentais das gravações mostraram mudanças no comportamento natatório para ambas as espécies após a elevação da temperatura em todas as concentrações de oxigênio testadas, sendo que tais mudanças ficaram mais intensas nas concentrações mais baixas de oxigênio. Para *P. pardalis* observou-se dificuldades em se fixar no fundo do aquário subindo para próximo da superfície, enquanto para *A. dolichopterus* observou-se elevação na atividade natatória nadando livremente por toda a coluna d'água.

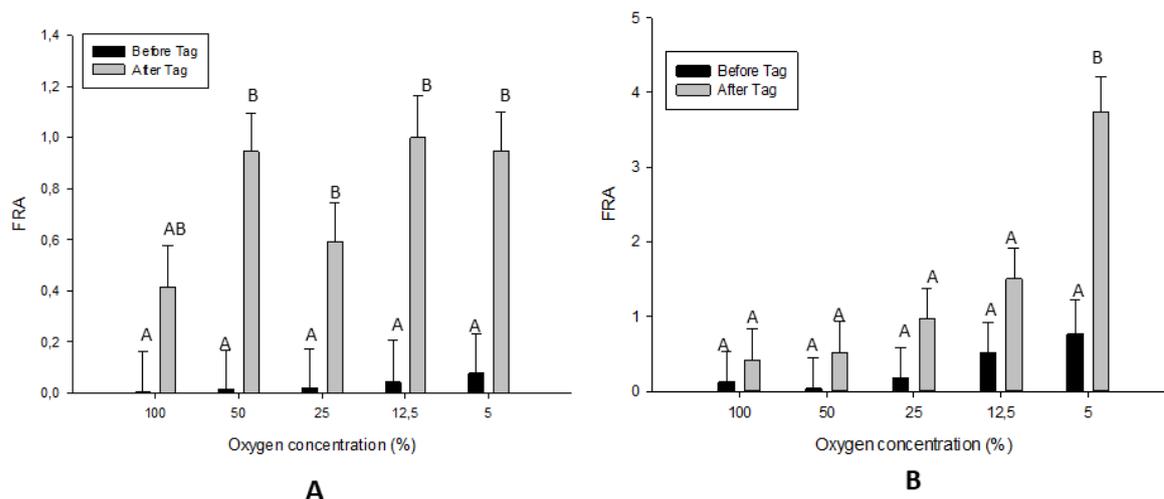


Figura 4. Frequência de respiração aérea (FRA) antes e depois da temperatura de agitação (T_{ag}) em (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco concentrações de oxigênio 100% (20,630 kPa), 50% (10,315 kPa), 25% (5,157 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Os valores dos testes foram corrigidos por meio da análise de Bonferroni. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as concentrações analisadas ($p < 0,05$).

A $T_{air-breathing}$ de *P. pardalis* foi significativamente reduzida na concentração de 5% ($H = 20,953$, $p < 0,001$) enquanto a $T_{air-breathing}$ de *A. dolichopterus* foi reduzida a partir de 25% ($H = 31,198$, $p < 0,001$). Além disso, a $T_{air-breathing}$ de *A. dolichopterus* foi menor do que a $T_{air-breathing}$ de *P. pardalis*, indicando uma maior sensibilidade térmica sobre o metabolismo energético nesta espécie (fig. 5A e 5B).

As espécies apresentaram diferentes respostas para tolerância térmica em relação à concentração de oxigênio. Em *P. pardalis*, a concentração de oxigênio na água não influenciou a tolerância térmica em peixes com acesso ao ar ($40,05 \pm 0,16^{\circ}\text{C}$) (figura 5A). Por outro lado, mesmo com uma FRA maior e um $T_{air-breathing}$ em temperaturas menores, *A. dolichopterus* apresentou uma diminuição da tolerância térmica em função da redução da concentração de oxigênio a partir de 12,5% ($35,9 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$), sendo visto uma redução de mais de 3°C na concentração de oxigênio 5% em peixes com acesso ao ar ($H = 21,692$, $p < 0,001$) (figura 2B), sugerindo uma incapacidade de tomada de oxigênio aéreo para a manutenção das necessidades fisiológicas, acarretando em perda de desempenho.

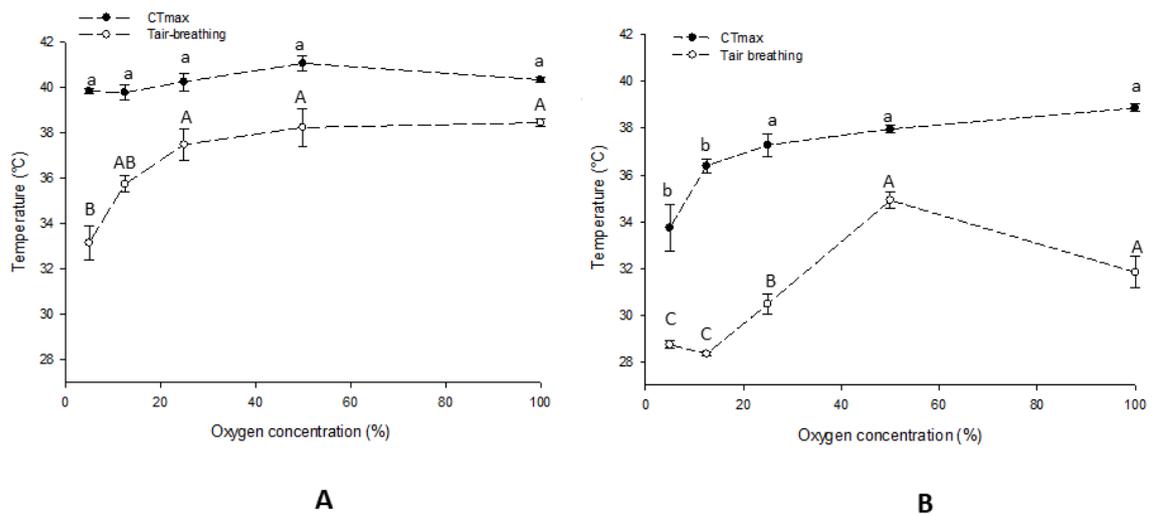


Figura 5. Efeito da concentração ambiental de oxigênio sobre a temperatura de início de respiração aérea ($T_{\text{air-breathing}}$) e tolerância térmica máxima (CT_{max}) em (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco concentrações de oxigênio 100% (20,630 kPa), 50% (10,315 kPa), 25% (5,157 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as concentrações analisadas ($p < 0,05$).

Todavia, com acesso limitado à superfície, *P. pardalis* apresentou uma diminuição acentuada nos limites térmicos na concentração de 5%, o que nos mostra que a pressão de oxigênio em que a CT_{max} é mantida (PCT_{max}) é próximo de 12,5% ($H = 12,421$, $p = 0,014$) (fig. 6A), corroborando os dados de redução na tomada de oxigênio (P_{crit}). Para a espécie *A. dolichopterus*, em contraste, verificou-se uma redução progressiva na tolerância térmica nas três concentrações analisadas, apresentando CT_{max} de 38,6°C em 100%, 35,5°C em 12,5% e 32,6°C em 5% de oxigênio. Nossos dados demonstram que para essa espécie, o PCT_{max} acontece em elevadas concentrações de oxigênio. Além disso, há uma redução na tolerância térmica em todas as concentrações testadas para *P. pardalis*; porém, não há diferença na tolerância térmica nas condições com e sem acesso à superfície nas três concentrações analisadas em *A. dolichopterus* ($p = 0,816$) (fig. 6B).

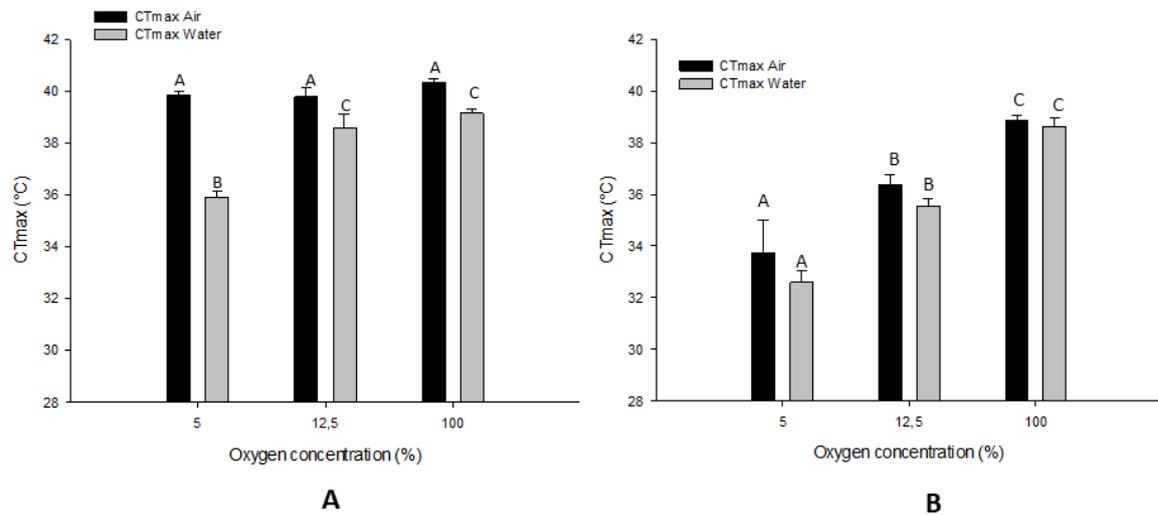


Figura 6. Efeito da concentração de oxigênio na tolerância térmica com e sem acesso ao ar em (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em três concentrações de oxigênio 100% (20,630 kPa), 12,5% (2,578 kPa) e 5% (1,031 kPa). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as concentrações analisadas ($p < 0,05$).

2.3.3 Respiração mitocondrial em tecido cardíaco *in vitro*

Ambas as espécies apresentaram um aumento do extravasamento de prótons (H^+ Leak) em função do aumento da temperatura. Em *P. pardalis*, o aumento do leak foi observado em 40°C (fig. 7A), enquanto *A. dolichopterus* apresentou tecido cardíaco mais sensível ao aumento da temperatura, sendo visto uma elevação do H^+ leak em temperaturas acima de 34°C (fig. 7B).

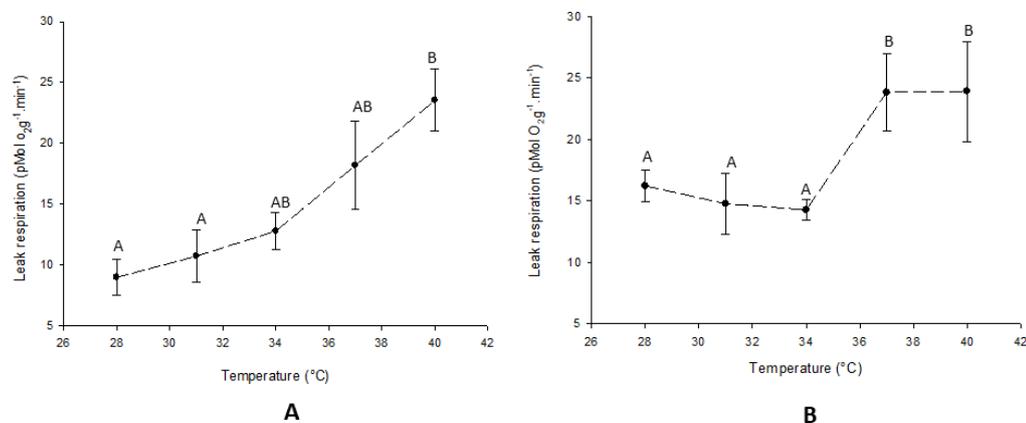


Figura 7: Próton (H^+) leak em fibras cardíacas de (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco temperaturas: 28°, 31°, 34°, 37° e 40°C. Os dados foram logaritmizados para teste de normalidade). Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as temperaturas analisadas ($p < 0,05$).

As temperaturas testadas não causaram alterações na atividade do complexo I em ambas as espécies (fig. 8A e 8B). A atividade do CI+CII foi aumentada em *A. dolichopterus* em 37°C, seguida de uma diminuição em 40°C (fig. 9B). Não foram observadas diferenças estatísticas na atividade dos complexos I+II em tecido cardíaco de *P. pardalis* (fig.9A).

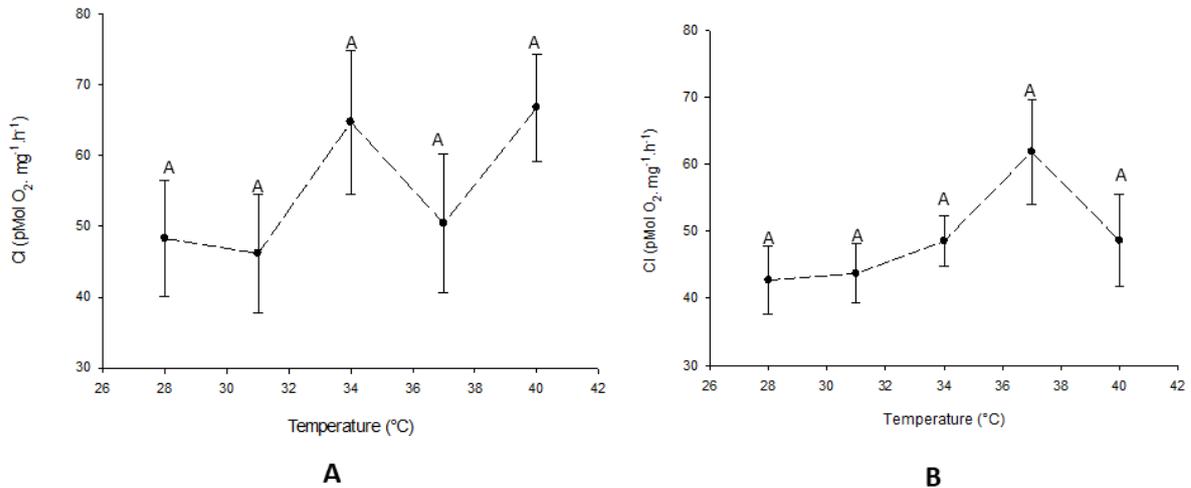


Figura 8. Atividade do CI em fibras cardíacas de (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco temperaturas: 28°, 31°, 34°, 37°, 40°C. Os dados foram logaritmizados para teste de normalidade. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as temperaturas analisadas ($p < 0,05$).

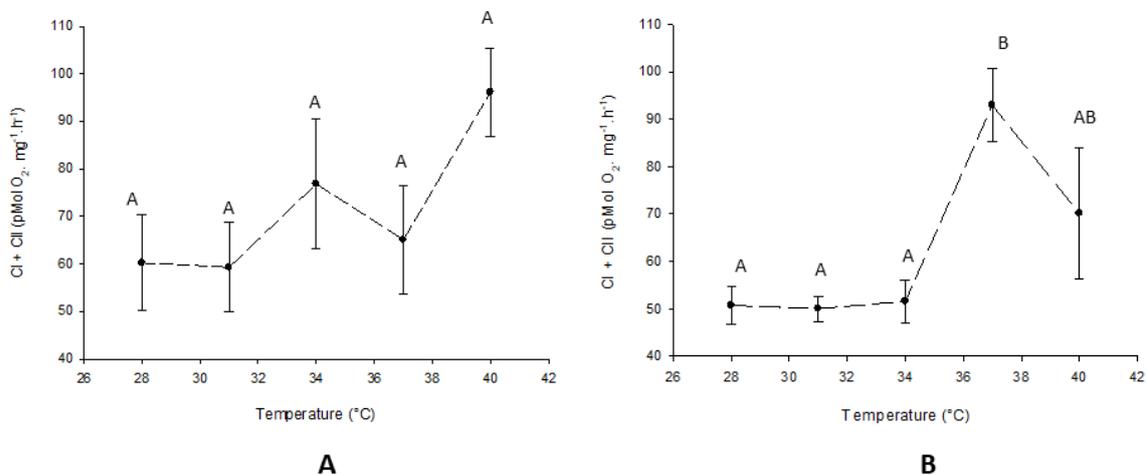


Figura 9. Atividade do CI+CII em fibras cardíacas de de (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco temperaturas: 28°, 31°, 34°, 37°, 40°C. Os dados foram logaritmizados para teste de normalidade. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as temperaturas analisadas ($p < 0,05$).

O RCR é uma medida de controle respiratório mitocondrial que está diretamente relacionado com a taxa de acoplamento e consequente eficiência energética. A análise de acoplamento mitocondrial em tecido cardíaco em *P. pardalis* não apresentou diferença estatística em todas as temperaturas testadas (fig. 10A), embora haja uma redução nas temperaturas mais elevadas, demonstrando uma alta resistência cardíaca e eficiente acoplamento mitocondrial mesmo na temperatura mais elevada ($3,07 \pm 0,46$). Entretanto, *A. dolichopterus* demonstra ter uma menor taxa de acoplamento, e uma diminuição significativa na taxa de acoplamento em 40°C ($2,12 \pm 0,12$) (fig.10B).

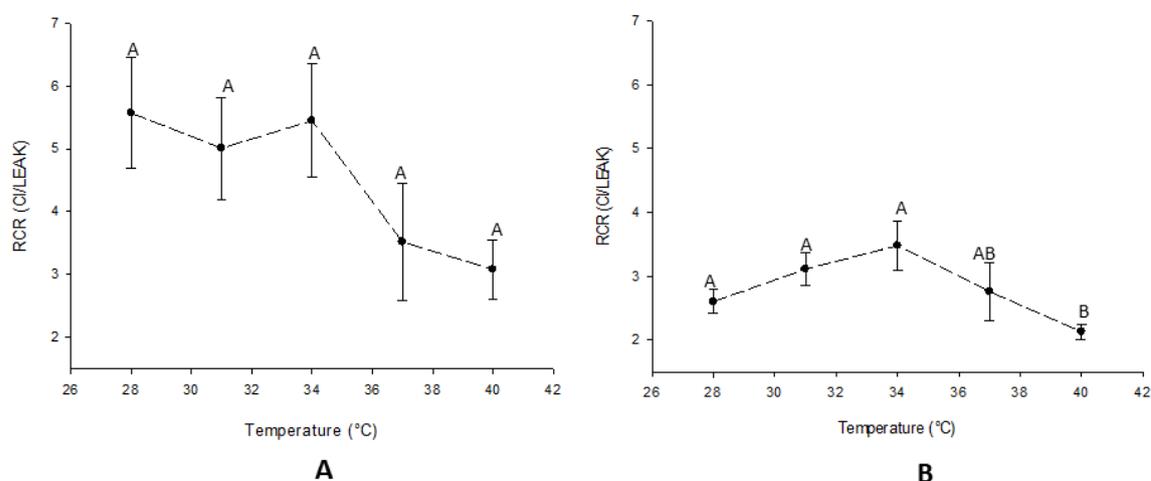


Figura 10. Razão de Controle Respiratório (RCR) em fibras cardíacas de de (A) *Pterygoplichthys pardalis* e (B) *Ancistrus dolichopterus* em cinco temperaturas: 28°, 31°, 34°, 37°, 40°C. Os dados foram logaritimizados para teste de normalidade Diferentes letras indicam diferenças significativas entre as temperaturas analisadas ($p < 0,05$).

2.4 Discussão

Este estudo apresenta as primeiras relações de capacidade de tomada de oxigênio aéreo e os limites de tolerância térmica em peixes de respiração bimodal. Nossos dados demonstram que espécies de peixes de respiração aérea facultativa, que possuem adaptações em seu sistema gastrointestinal para tomada de oxigênio aéreo, apresentam uma ampliação na janela térmica quando comparadas com espécies com baixa capacidade de extrair oxigênio do ar. Mostramos que a espécie *A. dolichopterus*, que possui menor capacidade de captar oxigênio do ar através

do estômago (Graham et al., 1981; Armbruster, 1998), não apresenta diferenças na CT_{max} com e sem acesso ao ar. Por outro lado, em *P. pardalis* que, segundo Armbruster (1998) apresenta adaptações morfológicas para maximizar a respiração aérea, há um aumento na CT_{max} quando a espécie tem acesso ao ar. Estes dados indicam que a capacidade de captação de oxigênio por meio da respiração aérea em espécies de respiração aérea facultativa pode determinar a susceptibilidade das espécies frente às alterações ambientais decorrentes das mudanças climáticas.

Quando expostas a uma diminuição na concentração de oxigênio as espécies amazônicas apresentam uma série de ajustes fisiológicos para enfrentar a limitação da disponibilidade de oxigênio, causa principal da redução da taxa metabólica de rotina (revisado por Braz-Mota and Almeida-Val, 2021). A capacidade de sobreviver aos eventos de hipóxia vem sendo ligada ao maior controle da taxa metabólica. A espécie *P. pardalis* apresentou baixa taxa metabólica de rotina (RMR) em 100% de oxigênio (de $66,75 \text{ mgO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) o que é característico de espécies bentônicas (Duncan, 2020). Além disso, o efeito da pressão de oxigênio na água (PwO_2) sobre o consumo de oxigênio (MO_2) só foi visto em 5% de O_2 , apresentando uma diminuição de 64,4% de MO_2 quando comparado com 100%, o que indica uma baixa dependência do metabolismo aeróbico e alta resistência à hipóxia (Ultsch and Regan, 2019). Nossos dados de RMR e P_{crit} corroboram os encontrados para essa espécie por Duncan (2020) e Braz-Mota and Almeida-Val (2021), respectivamente. Em contrapartida, *A. dolichopterus* apresentou elevado consumo de oxigênio em 100% ($197,5 \text{ mgO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e uma diminuição gradual no MO_2 em 12,5% e 5% representando uma queda de 48,2% e 90,3% do MO_2 , respectivamente. A alta dependência do metabolismo aeróbico e a acentuada diminuição no consumo de oxigênio em função da disponibilidade de O_2 nos traz indícios de uma maior sensibilidade dessa espécie a baixas concentrações de oxigênio, uma vez que uma maior redução indica um maior comprometimento das funções fisiológicas.

Nossos dados estão de acordo com os achados para outras espécies amazônicas que demonstram haver uma relação entre a alta RMR e maior sensibilidade à hipóxia (Almeida-Val et al., 2000; Sloman et al., 2006; Braz-Mota and Almeida-Val, 2021). Ter uma taxa metabólica alta requer um custo energético elevado, o que pode comprometer o escopo aeróbico e, como consequência, limitar as funções fisiológicas de tais animais. A espécie *A. dolichopterus* apresenta atividade natatória elevada quando comparada com *P. pardalis*, o que desencadeia maior demanda energética e consequente maior consumo de oxigênio. Assim, o estilo de vida é um fator que pode estar relacionado com a tolerância das espécies às mudanças ambientais,

onde espécies mais ativas são mais suscetíveis a terem suas atividades fisiológicas comprometidas (Campos et al., 2018; Fu et al., 2022; Val and Wood, 2022).

O aumento da temperatura pode desencadear diversas respostas em animais ectotérmicos, dentre elas genéticas (Gonçalves et al., 2018a), bioquímicas (Hochachka and Somero, 2002), fisiológicas (Schulte, 2015) e comportamentais (McDonnell and Chapman, 2015; McDonnell et al., 2019; Kochhann et al., 2021). A T_{ag} é um importante indicador das alterações comportamentais, pois indica uma alteração nos padrões de movimentação do indivíduo, podendo ser ecologicamente mais relevante para a espécie. Recentemente, Kochhann e colaboradores (2021) demonstraram diferentes T_{ag} em espécies amazônicas que vivem em diferentes habitats térmicos. Os autores observaram que *Apistograma agassizii*, que ocorre em habitats de temperaturas mais amenas, apresenta menores T_{ag} , sendo, portanto, mais suscetível ao aumento da temperatura. A T_{ag} foi menor em *A. dolichopterus* em todas as concentrações de oxigênio testadas, sendo a temperatura que desencadeia alteração no comportamento natatório é mais baixa nessa espécie quando comparada com *P. pardalis*. Estes resultados indicam que *A. dolichopterus* apresenta uma maior sensibilidade térmica. Além disso, a espécie *A. dolichopterus* apresentou uma maior diferença entre a T_{ag} e a CT_{max} , ou seja, há uma menor variação térmica para que a espécie consiga realizar comportamentos normais antes de demonstrar comportamento de agitação em temperaturas crescentes. Estes resultados sugerem maior sensibilidade fisiológica em *A. dolichopterus*, uma vez que essas alterações comportamentais estão ligadas ao aumento de demanda energética. A maior sensibilidade térmica e menor T_{ag} pode deixar a espécie mais vulnerável, podendo afetar a quantidade de energia disponível para forrageamento e busca de refúgio além de aumentar o risco de predação (McDonnell and Chapman, 2015; Kochhann et al., 2021).

Pterygoplichthys pardalis não apresentou diferença na FRA nas cinco concentrações de oxigênio testadas antes da T_{ag} ; entretanto, aumentou a FRA após a T_{ag} . Esses dados demonstram um aumento na necessidade de captação de oxigênio para suprir o aumento da demanda energética em altas temperaturas. Além disso, esse aumento na FRA é importante para que haja manutenção do suprimento energético e da janela térmica em condições hipóxicas. Contudo, *A. dolichopterus*, apesar de apresentar elevada FRA nas duas condições analisadas quando comparada com *P. pardalis*, apresentou aumento na FRA somente em 5% após a T_{ag} , que pode ser interpretado muito mais como uma resposta de estresse do que tentativa de tomada de oxigênio, uma vez que T_{ag} e CT_{max} foram muito próximas. Estes dados sugerem que para *A. dolichopterus* o oxigênio captado não é suficiente para suprir a demanda energética causada pelo aumento da temperatura, gerando uma baixa oxigenação tecidual e, conseqüentemente,

redução nos limites térmicos. Isto ocorre por que segundo Graham et al. (1981) e Armbruster (1998), espécies do gênero *Ancistrus* apresentam uma área estomacal menor e menos eficiente para captar oxigênio aéreo. Portanto, não apenas o comportamento de tomada de oxigênio, mas, também, uma morfologia estomacal adaptada para a extração do oxigênio aéreo é importante para manutenção do suprimento de oxigênio.

Os limites máximos de tolerância térmica vêm sendo muito estudados para estimar a sensibilidade térmica no mundo animal. Tais limites são desencadeados por um colapso nas funções fisiológicas vitais em função do aumento da temperatura (Beitinger et al., 2000). Descobertas recentes demonstram que esse colapso acontece devido à incapacidade de suprimento energético sistêmico desencadeado, principalmente, por uma falha no sistema cardiorrespiratório, mais especificamente no tecido cardíaco (Iftikar and Hickey, 2013; Iftikar et al., 2014). As funções fisiológicas são dependentes do suprimento de oxigênio aos tecidos e, dessa forma, de acordo com a teoria da OCLTT, a capacidade de suprimento de oxigênio é fator determinante da janela térmica de peixes (Pörtner, 2010). Portanto, uma redução na concentração de oxigênio da água pode levar a uma diminuição na tolerância térmica de peixes de respiração aquática em decorrência da baixa disponibilidade de oxigênio para o suprimento energético eficiente.

Por outro lado, espécies de respiração aérea facultativa devem apresentar tolerâncias térmicas independente da concentração de oxigênio na água, uma vez que utilizam a tomada de oxigênio do ar, que possui disponibilidade constante, com exceção das altas altitudes, para suprir suas demandas energéticas. De fato, nossos dados corroboram com tais informações, pois demonstram que *P. pardalis* apresenta CT_{max} independente da disponibilidade de oxigênio na água. Contudo, ao limitar o acesso à superfície é observada uma redução na CT_{max} em 5% de oxigênio, o que não acontece quando o acesso a superfície é disponível. Em *A. dolichopterus* foi observada redução na CT_{max} a partir de 12,5% tanto com como sem acesso ao ar. As reduções da CT_{max} em ambas as espécies, só foram observadas em concentrações abaixo do P_{crit} das espécies. Estes resultados indicam que uma limitação de entrega de oxigênio devido a sua baixa disponibilidade pode limitar a tolerância térmica. O efeito da pressão de oxigênio ambiental sob a CT_{max} também foi avaliada por Rutledge and Beitinger (1989) para 3 espécies de peixes em hipóxia com e sem acesso para avaliar o efeito da respiração na superfície aquática (aquatic surface respiration - ASR). Assim como os dados aqui encontrados para *P. pardalis*, a CT_{max} foi maior em todos os espécimens que usaram a ASR quando comparada com aqueles com acesso negado, demonstrando que a capacidade de extração de oxigênio por meio de estratégias respiratórias é um fator fundamental na determinação dos limites térmicos quando a

disponibilidade de oxigênio é baixa. Para *Notropis lutrensis* com acesso a respiração na superfície da água, a CT_{max} só foi reduzida em $1,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ demonstrando não ter limites térmicos dependente de oxigênio, o mesmo foi demonstrado por Ern et al. (2017) em que somente a pressão de oxigênio ambiental abaixo do P_{crit} limita tolerância térmica em peixes de respiração aquática.

Nossos dados de CT_{max} com e sem acesso ao ar corroboram com os achados de Armbuster (1998), demonstrando que respiração aérea em *A. dolichopterus* não deve ser considerado um mecanismo de adaptação a temperaturas elevadas, devido reduzida habilidade na captação de oxigênio através do estômago e consequente diminuição da janela térmica. Sendo assim, o aumento da captação de oxigênio por meio da respiração aérea, em espécies adaptadas a utilizar o órgão de respiração aérea, determinam os limites térmicos dessas espécies. Em concordância, *P. pardalis* reduziu a CT_{max} quando teve o acesso ao ar negado. A redução na CT_{max} sem acesso ao ar sugere capacidade limitada da extração de oxigênio no meio aquático. De fato, a disponibilidade de oxigênio é muito menor na água do que no ar devido ao baixo coeficiente de difusão e solubilidade do oxigênio na água; portanto, o oxigênio é muito mais limitante na água, um problema exacerbado em altas temperaturas. Esses dados também corroboram os trabalhos realizados com insetos aquáticos (Verberk and Bilton, 2013, 2015) e moluscos (Koopman et al., 2016), entre os quais espécies de respiração aérea apresentam CT_{max} maiores do que espécies de respiração aquática. Essa é a primeira vez que tal relação é estudada com espécies de peixes de respiração bimodal. Entender quais mecanismos estão associados à adaptação térmica é um dos grandes questionamentos da literatura atual. A flexibilidade mitocondrial vem sendo muito debatida como mecanismo fundamental nesse processo (Iftikar et al., 2014; Chung and Schulte, 2020; Menail et al., 2022). Nossos dados demonstram que mitocôndrias cardíacas de *A. dolichopterus* e *P. pardalis* apresentam diferentes respostas ao aumento da temperatura. Relembrando, *P. pardalis* apresenta tecido cardíaco mais tolerante, caracterizado por um aumento do H^+ Leak apenas em 40°C , alta taxa de acoplamento mitocondrial em temperaturas acima da sua CT_{max} e atividade funcional dos complexos respiratórios I e II em todas as temperaturas testadas. Driedzic et al. (2021) demonstraram que sob hipoxia o tecido cardíaco de *P. pardais* apresenta elevada resistência à hipóxia tecidual e ao acúmulo de lactato, o que justifica a alta flexibilidade mitocondrial dessa espécie em um gradiente de temperatura, pois temperaturas elevadas aumentam a demanda de oxigênio fazendo com que haja, assim como na hipóxia ambiental, um quadro de hipóxia tecidual em temperaturas extremas. Tais informações demonstram haver uma alta eficiência no uso de oxigênio para geração de energia mesmo em condições estressantes. Todavia uma tendência a

diminuir o RCR é visto a partir de 37°C, temperatura abaixo da CT_{max} do animal em condições normóxicas, dando indícios de que o aumento da temperatura gera desbalanço energético no tecido cardíaco que pode estar, mesmo que de forma indireta, limitando a janela térmica da espécie. Em contrapartida, *A. dolichopterus* apresentou maior sensibilidade ao aumento da temperatura, sendo que as mitocôndrias cardíacas da espécie apresentam diminuição na funcionalidade a 37°C, quando há um pico no vazamento de prótons. O baixo acoplamento mitocondrial indica que a eficiência energética é comprometida em temperaturas abaixo da CT_{max} da espécie, dados esses que corroboram os trabalhos de Iftikar et al. (2014); ; Pichaud et al. (2019) e Chung and Schulte (2020) com diversos grupos de animais, os quais demonstram que um desacoplamento mitocondrial gera uma falha na geração de energia no tecido cardíaco levando a um colapso do sistema cardiorrespiratório que está associada à determinação dos limites térmicos das espécies.

Dessa forma, nossos dados demonstram haver uma relação entre a maior eficiência na captação de oxigênio e a limitação na janela térmica de peixes de respiração bimodal. O aumento do consumo de oxigênio decorrente da maior eficiência da respiração aérea atribui a essas espécies uma vantagem frente ao aumento da temperatura. Apesar dessa relação, nossos dados não corroboram integralmente a hipótese da OCLTT, tendo em vista que a tolerância térmica para essas espécies não parece estar limitada tão somente pela disponibilidade de oxigênio ambiental, pois uma manutenção da CT_{max} é observada em uma ampla faixa de variação de oxigênio. Dessa forma, o aumento da captação de oxigênio por meio da respiração aérea auxilia na disponibilidade de oxigênio tecidual e, conseqüentemente, na manutenção do escopo aeróbico em temperaturas acima da T_{crit} . Para esses organismos a CT_{max} só é atingida em tensões de oxigênio abaixo do P_{crit} (PCT_{max}) onde o escopo aeróbico é igual a zero e conseqüentemente a demanda energética excede a capacidade de suprimento, limitando assim a janela térmica desses organismos (Ern et al., 2016).

Em conclusão, a CT_{max} é maior em *P. pardalis* do que em *A. dolichopterus* de acordo com nossa hipótese I. Além disso, com acesso ao ar, a CT_{max} em *P. pardalis* não é afetada pela concentração de oxigênio, e a CT_{max} de *A. dolichopterus* diminuiu apenas em concentrações de oxigênio abaixo do P_{crit} . Portanto, essas espécies têm o CT_{max} independente da concentração de oxigênio em uma ampla faixa de concentração de oxigênio, validando a hipótese II. Contudo, ao limitar o acesso ao ar, nós observamos que *P. pardalis* diminuiu a CT_{max} , enquanto *A. dolichopterus* não alterou a CT_{max} , mostrando que a capacidade de aumentar a CT_{max} pela respiração aérea é espécie-específica em contraposição à hipótese III. Em resumo, a maior sensibilidade nos padrões comportamentais e na respiração mitocondrial do tecido cardíaco,

bem como a menor CT_{max} , indicam uma maior sensibilidade à hipóxia e à temperatura em *A. dolichopterus*. Portanto, essa espécie, de acordo com os dados, seria mais vulnerável às alterações decorrentes das mudanças climáticas.

2.5 Referências

- Affonso, E.G., Rantin, F.T.** (2005). Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **141**, 275–280.
- Almeida-Val., V. M. F., Val, A. L., Hochachka, P. W.** (1993). Hypoxia tolerance in Amazon fishes: Status of a under-explored biological “goldmine”. In *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. pp. 435-445. CRC Press, Boca Raton.
- Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Duncan, W.P., Souza, F.C.A., Paula-Silva, M.N., Land, S.** (2000). Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **125**, 219–226.
- Almeida-Val, V. M. F., Gomes, A. R. C., Lopes, N. P.** (2006). Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon. *Fish physiology*, 21, pp 443-500.
- Armbruster, J.** (1998). Modifications of the Digestive Tract for Holding Air in Loricariid and Scoloplacid Catfishes. *Copeia*. **1998(3)**, 663-667.
- Beitinger, T.L., Bennett, W.A., McCauley, R.W.** (2000). Temperature Tolerances of North American Freshwater Fishes Exposed to Dynamic Changes in Temperature. *Environ. Biol. Fishes.* **58**, 237–275.
- Braz-Mota, S., Almeida-Val, V.M.F.** (2021). Ecological adaptations of Amazonian fishes acquired during evolution under environmental variations in dissolved oxygen: A review of responses to hypoxia in fishes, featuring the hypoxia-tolerant *Astronotus* spp. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* **335**, 771–786.
- Campos, D.F., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F.** (2018). The influence of lifestyle and swimming behavior on metabolic rate and thermal tolerance of twelve Amazon forest stream fish species. *J. Therm. Biol.* **72**, 148–154.
- Campos, D.F., Amanajás, R.D., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L.** (2021). Climate vulnerability of South American freshwater fish: Thermal tolerance and acclimation. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* **335**, 723–734.
- Chung, D.J., Schulte, P.M.** (2020). Mitochondria and the thermal limits of ectotherms. *J. Exp. Biol.* **223**, jeb227801.
- Cruz-Landim, C., Cruz-Höfling, M.A.** (1979). Diferenças ultra-estruturais entre bexigas natatórias de peixes teleósteos de respiração aquática e respiração aérea facultativa. *Acta Amaz.* **9**, 317–323.

- da Cruz, A.L., da Silva, H.R., Lundstedt, L.M., Schwantes, A.R., Moraes, G., Klein, W., Fernandes, M.N.** (2013). Air-breathing behavior and physiological responses to hypoxia and air exposure in the air-breathing loricariid fish, *Pterygoplichthys anisitsi*. *Fish Physiol. Biochem.* **39**, 243–256.
- Driedzic, W.R., MacCormack, T.J., Lamarre, S.G.** (2021). Contrasting strategies of hypoxic cardiac performance and metabolism in cichlids and armoured catfish. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* **335**, 787–800.
- Duncan, W.** (2020). Interspecific Differences in the Metabolic Rate, Gill Dimension and Hematology of Fish in an Amazonian Floodplain Lake. *Aquat. Sci. Technol.* **8**, 38.
- Ern, R., Huong, D.T.T., Phuong, N.T., Wang, T., Bayley, M.** (2014). Oxygen delivery does not limit thermal tolerance in a tropical eurythermal crustacean. *J. Exp. Biol.* **217**, 809–814.
- Ern, R., Norin, T., Gamperl, A.K., Esbaugh, A.J.** (2016). Oxygen dependence of upper thermal limits in fishes. *J. Exp. Biol.* **219**, 3376–3383.
- Ern, R., Johansen, J.L., Rummer, J.L., Esbaugh, A.J.** (2017). Effects of hypoxia and ocean acidification on the upper thermal niche boundaries of coral reef fishes. *Biol. Lett.* **13**, 20170135.
- Fu, S.-J., Dong, Y.-W., Killen, S.S.** (2022). Aerobic scope in fishes with different lifestyles and across habitats: Trade-offs among hypoxia tolerance, swimming performance and digestion. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **272**, 111277.
- Gonçalves, L.M.F., Silva, M.N.P., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F.** (2018). Differential survivorship of congeneric ornamental fishes under forecasted climate changes are related to anaerobic potential. *Genet. Mol. Biol.* **41**, 107–118.
- Graham, J. B.; Baird, T. A.** (1982). The Transition to Air Breathing in Fishes:: I. Environmental Effects on the Facultative Air Breathing of *Ancistrus Chagresi* and *Hypostomus Plecostomus* Loricariidae. *Journal of Experimental Biology.* **96**, 53-67.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N.** (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Iftikar, F.I., Hickey, A.J.** (2013). Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus*. *PLoS One.* **8**, e64120.
- Iftikar, F. I., Macdonald, J. R., Baker, D. W., Renshaw, G. M., Hickey, A. J.** (2014). Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? *J. Exp. Biol.* **217**, 2348–2357.

- Jew, C., Hicks, J.W.** (2018). Hypoxia Avoidance Behavior in two Air-breathing Fishes. *The FASEB Journal*. **32**, 602.10-602.10.
- Kochhann, D., Sarmiento, C. G., Oliveira, J. C., Queiroz, H. L., Val, A.L., Chapman, L.J.** (2021). Take time to look at the fish: Behavioral response to acute thermal challenge in two Amazonian cichlids. *J. Exp. Zool*, **335**, 735–74.
- Koopman, K.R., Collas, F.P.L., Van der Velde, G., Verberk, W. C.** (2016). Oxygen can limit heat tolerance in freshwater gastropods: differences between gill and lung breathers. *Hydrobiologia*. **763**, 301–312.
- Lutterschmidt, W.I., Hutchison, V.H.**, 1997. The critical thermal maximum: history and critique. *Can. J. Zool*. **75**, 1561–1574.
- Mattias, A.T., Rantin, F.T., Fernandes, M.N.** (1998). Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **120**, 311–315.
- McDonnell, L.H., Chapman, L.J.** (2015). At the edge of the thermal window: effects of elevated temperature on the resting metabolism, hypoxia tolerance and upper critical thermal limit of a widespread African cichlid. *Conserv. Physiol.* **3**, cov050.
- McDonnell, L.H., Reemeyer, J.E., Chapman, L.J.** (2019). Independent and Interactive Effects of Long-Term Exposure to Hypoxia and Elevated Water Temperature on Behavior and Thermal Tolerance of an Equatorial Cichlid. *Physiol. Biochem. Zool.* **92**, 253–265.
- Menail, H.A., Cormier, S.B., Ben Youssef, M., Jørgensen, L.B., Vickruck, J.L., Morin, P.J., Boudreau, L.H., Pichaud, N.** (2022). Flexible Thermal Sensitivity of Mitochondrial Oxygen Consumption and Substrate Oxidation in Flying Insect Species. *Front. Physiol.* **13**, 789.
- Oliveira, R.D., Lopes, J.M., Sanches, J.R., Kalinin, A.L., Vidro, Glass, M.L., Rantin, F.T.** (2004). Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae), exposed to graded ambient hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **139**, 479–485.
- Pelster, B., Wood, C.M., Jung, E., Val, A.L.** (2018). Air-breathing behavior, oxygen concentrations, and ROS defense in the swimbladders of two erythrinid fish, the facultative air-breathing jeju, and the non-air-breathing traira during normoxia, hypoxia and hyperoxia. *J. Comp. Physiol. B.* **188**, 437–449.
- 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**, 881–893.

- Pörtner, H.O., Bock, C., Mark, F.C.** (2017). Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *J. Exp. Biol.* **220**, 2685–2696.
- Rutledge, C.J., Beitinger, T.L.** (1989). The effects of dissolved oxygen and aquatic surface respiration on the critical thermal maxima of three intermittent-stream fishes. *Environ. Biol. Fishes.* **24**, 137–143.
- 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.
- Sloman, K.A., Wood, C.M., Scott, G.R., Wood, S., Kajimura, M., Johannsson, O.E., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L.** (2006). Tribute to R. G. Boutilier: the effect of size on the physiological and behavioural responses of oscar, *Astronotus ocellatus*, to hypoxia. *J. Exp. Biol.* **209**, 1197–1205.
- Sunday, J.M., Bates, A.E., Dulvy, N.K.** (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nat. Clim. Change.* **2**, 686–690.
- Ultsch, G.R., Regan, M.D.** (2019). The utility and determination of Pcrit in fishes. *J. Exp. Biol.* **222**, jeb203646.
- Val, A.L.** (1995). Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**, 1119–1127.
- Val, A., Wood, C.M.** (2022). Global change and physiological challenges for fish of the Amazon today and in the near future. *J. Exp. Biol.* **225**, jeb216440.
- Verberk, W.C., Bilton, D. T.** (2015). Oxygen limited thermal tolerance is seen in a plastron breathing insect, and can be induced in a bimodal gas exchanger. *J. Exp. Biol.* **218**, 2083–2088.
- Verberk, W.C., Bilton, D.T.** (2013). Respiratory control in aquatic insects dictates their vulnerability to global warming. *Biol. Lett.* **9**, 20130473.

3. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo contribui para compreender como espécies de respiração aéreas evolutivamente aparentadas que possuem distintas capacidades de tomada de ar responderão a eventos hipóxicos e de alta temperatura. Além de auxiliar no entendimento da vulnerabilidade das espécies frente às mudanças climáticas ambientais. Adaptações que auxiliam na maximização da tomada de oxigênio aéreo contribuem para um aumento da janela térmica, quando comparadas com espécies com baixa capacidade de extrair oxigênio do ar, tendo em vista que os limites térmicos estão atrelados à disponibilidade de oxigênio tecidual.

A flutuabilidade das condições limnológicas dos rios da Amazônia tornam-no um ambiente desafiador para os organismos que vivem na região uma vez que as espécies de regiões tropicais tem se mostrado mais sensíveis a variações ambientais pois vivem muito próximas de seus limites térmicos máximos, entretanto nossos resultados nos mostram que as adaptações adquiridas ao longo do processo evolutivo que aumentam a captação de oxigênio podem tornar as espécies mais resistentes a variações de temperatura e oxigênio tendo em vista que a respiração aérea contribui para a manutenção das atividades metabólicas aeróbicas, minimizando assim o efeito variação de oxigênio e temperatura das águas amazônicas.

Além disso, é necessário estudos que visem entender a evolução da respiração aérea na família Loricariidae, para que possamos compreender em um aspecto mais amplo como as pressões ambientais influenciaram no aparecimento de distintas adaptações morfológicas no órgão de respiração acessória e como tais espécies responderão aos eventos hipóxicos e de altas temperaturas previstas para as próximas décadas. Nosso trabalho levanta questionamentos sobre quais mecanismos determinam os limites térmicos máximos para respiradores bimodais, uma vez que tais espécies apresentam CT_{max} independente da disponibilidade de oxigênio ambiental.

4. REFERÊNCIAS GERAIS

- Affonso, E.G., Rantin, F.T.** (2005). Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **141**, 275–280.
- Almeida-Val, V. M. F., Val, A. L., Hochachka, P. W.** (1993). Hypoxia tolerance in Amazon fishes: Status of a under-explored biological “goldmine”. *In Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. pp. 435-445. CRC Press, Boca Raton.
- Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Duncan, W.P., Souza, F.C.A., Paula-Silva, M.N., Land, S.** (2000). Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **125**, 219–226.
- Almeida-Val, V. M. F., Gomes, A. R. C., Lopes, N. P.** (2006). Metabolic and physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon. *Fish physiology*, 21, pp 443-500.
- Ambrozzi, T., Rocha, R.P, Marengo, J.A., Pishnitchenko, I., Nunes, L.A., Fernandez, J.P.R.** (2007). Cenários regionalizados de clima no Brasil e América do Sul para o século XXI: Projeções de clima futuro usando três modelos regionais. *Relatório 3*. São Paulo, BR, p. 180.
- Armbruster, J.** (1998). Modifications of the Digestive Tract for Holding Air in Loricariid and Scoloplacid Catfishes. *Copeia*. **1998(3)**, 663-667.
- Beitinger, T.L., Bennett, W.A., McCauley, R.W.** (2000). Temperature Tolerances of North American Freshwater Fishes Exposed to Dynamic Changes in Temperature. *Environ. Biol. Fishes.* **58**, 237–275.
- Boijink, C.L., Florindo, L.H., Leite, C.A.C., Kalinin, A.L., Milsom, W.K., Rantin, F.T.** (2010). Hypercarbic cardiorespiratory reflexes in the facultative air-breathing fish jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*): the role of branchial CO₂ chemoreceptors. *J. Exp. Biol.* **213**, 2797–2807.
- Brauner, C.J., Ballantyne, C.L., Randall, D.J., Val, A.L.** (1995). Air breathing in the armoured catfish (*Hoplosternum littorale*) as an adaptation to hypoxic, acidic, and hydrogen sulphide rich waters. *Can. J. Zool.* **73**, 739–744.
- Brauner, C.J., Ballantyne, C.L., Vijayan, M.M., Val, A.L.** (1999). Crude oil exposure affects air-breathing frequency, blood phosphate levels and ion regulation in an air-breathing teleost fish, *Hoplosternum littorale*. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **123**, 127–134.

- Braz-Mota, S., Fé, L.M.L., Delunardo, F.A.C., Sadauskas-Henrique, H., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L.** (2017). Exposure to waterborne copper and high temperature induces the formation of reactive oxygen species and causes mortality in the Amazonian fish *Hoplosternum littorale*. *Hydrobiologia* **789**, 157–166.
- Braz-Mota, S., Almeida-Val, V.M.F.** (2021). Ecological adaptations of Amazonian fishes acquired during evolution under environmental variations in dissolved oxygen: A review of responses to hypoxia in fishes, featuring the hypoxia-tolerant *Astronotus* spp. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* **335**, 771–786.
- Campos, D.F., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F.** (2018). The influence of lifestyle and swimming behavior on metabolic rate and thermal tolerance of twelve Amazon forest stream fish species. *J. Therm. Biol.* **72**, 148–154.
- Campos, D.F., Braz-Mota, S., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F.** (2019). Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. *Ecol. Indic.* **101**, 533–540.
- Campos, D.F., Amanajás, R.D., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L.** (2021). Climate vulnerability of South American freshwater fish: Thermal tolerance and acclimation. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* **335**, 723–734.
- Carter, G. S., Ph.D., Beadle, F.L.S., L. C.** (1931) Reports of an Expedition to Brazil and Paraguay in 1926–7, supported by the Trustees of the Percy Sladen Memorial Fund and by the Executive Committee of the Carnegie Trust for the Universities of Scotland. The Fauna of the Swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its Environment.—II. Respiratory Adaptations in the Fishes, *Zoological Journal of the Linnean Society*, Volume 37, Issue 252, Pages 327–368. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.1930.tb02072.x>
- Chung, D.J., Schulte, P.M.** (2020). Mitochondria and the thermal limits of ectotherms. *J. Exp. Biol.* **223**, jeb227801.
- Cruz-Landim, C., Cruz-Höfling, M.A.** (1979). Diferenças ultra-estruturais entre bexigas natatórias de peixes teleósteos de respiração aquática e respiração aérea facultativa. *Acta Amaz.* **9**, 317–323.
- da Cruz, A.L., da Silva, H.R., Lundstedt, L.M., Schwantes, A.R., Moraes, G., Klein, W., Fernandes, M.N.** (2013). Air-breathing behavior and physiological responses to hypoxia and air exposure in the air-breathing loriciid fish, *Pterygoplichthys anisitsi*. *Fish Physiol. Biochem.* **39**, 243–256.
- Driedzic, W.R., MacCormack, T.J., Lamarre, S.G.** (2021). Contrasting strategies of hypoxic cardiac performance and metabolism in cichlids and armoured catfish. *J. Exp. Zool. Part Ecol. Integr. Physiol.* **335**, 787–800.

- Duncan, W.** (2020). Interspecific Differences in the Metabolic Rate, Gill Dimension and Hematology of Fish in an Amazonian Floodplain Lake. *Aquat. Sci. Technol.* **8**, 38.
- Ern, R., Huong, D.T.T., Phuong, N.T., Wang, T., Bayley, M.** (2014). Oxygen delivery does not limit thermal tolerance in a tropical eurythermal crustacean. *J. Exp. Biol.* **217**, 809–814.
- Ern, R., Norin, T., Gamperl, A.K., Esbaugh, A.J.** (2016). Oxygen dependence of upper thermal limits in fishes. *J. Exp. Biol.* **219**, 3376–3383.
- Ern, R., Johansen, J.L., Rummer, J.L., Esbaugh, A.J.** (2017). Effects of hypoxia and ocean acidification on the upper thermal niche boundaries of coral reef fishes. *Biol. Lett.* **13**, 20170135.
- Farrell, A.P., Eliason, E.J., Sandblom, E., Clark, T.D.** (2009). Fish cardiorespiratory physiology in an era of climate change. *Canadian Journal of Zoology.* **87**, 835-851.
- Fu, S.-J., Dong, Y.-W., Killen, S.S.** (2022). Aerobic scope in fishes with different lifestyles and across habitats: Trade-offs among hypoxia tolerance, swimming performance and digestion. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **272**, 111277.
- Gee, J.H.** (1976). Buoyancy and aerial respiration: factors influencing the evolution of reduced swim-bladder volume of some Central American catfishes (Trichomycteridae, Callichthyidae, Loricariidae, Astroblepidae). *Can. J. Zool.* **54**, 1030–1037.
- Giomi, F., Fusi, M., Barausse, A., Mostert, B., Pörtner, H.O., Cannicci, S.** (2014). Improved heat tolerance in air drives the recurrent evolution of air-breathing. *Proc. R. Soc. B Biol.* **281**, 20132927.
- Gonçalves, L.M.F., Silva, M.N.P., Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F.** (2018). Differential survivorship of congeneric ornamental fishes under forecasted climate changes are related to anaerobic potential. *Genet. Mol. Biol.* **41**, 107–118.
- Graham, J. B.; Baird, T. A.** (1982). The Transition to Air Breathing in Fishes:: I. Environmental Effects on the Facultative Air Breathing of *Ancistrus Chagresi* and *Hypostomus Plecostomus* Loricariidae. *Journal of Experimental Biology.* **96**, 53-67.
- Guppy, M., Withers, P.** (1999). Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Rev.* **74**, 1-40.
- Heinrichs-Caldas, W., Campos, D.F., Paula-Silva, M.N., Almeida-Val, V.M.F.** (2019). Oxygen-dependent distinct expression of hif-1 α gene in aerobic and anaerobic tissues of the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinnis*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **227**, 31–38.
- Heinrichs-Caldas, W., Almeida-Val, V.M.F.** (2021). Hypoxia tolerance in two amazon cichlids: mitochondrial respiration and cellular metabolism adjustments are result of

species environmental preferences and distribution. *Fish Physiol. Biochem.* **47**, 1759–1775.

Hochachka, P.W., Land, S.C., Buck, L.T. (1997). Oxygen Sensing and Signal Transduction in Metabolic Defense Against Hypoxia: Lessons from Vertebrate Facultative Anaerobes. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.* **118**, 23–29.

Hochachka, P.W., Somero, G.N. (2002). *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford, UK: Oxford University Press.

Hughes, G.M., Perry, S.F., Piiper, J. (1986). Morphometry of the Gills of the Elasmobranch *Scyliorhinus Stellaris* in Relation to Body Size. *J. Exp. Biol.* **121**, 27–42.

Iftikar, F.I., Hickey, A.J. (2013). Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus*. *PLoS One.* **8**, e64120.

Iftikar, F. I., Macdonald, J. R., Baker, D. W., Renshaw, G. M., Hickey, A. J. (2014). Could thermal sensitivity of mitochondria determine species distribution in a changing climate? *J. Exp. Biol.* **217**, 2348–2357.

Intergovernmental Panel on Climate Change – IPCC. (2022). IPCC Sixth Assessment Report (AR6). [https:// www.ipcc.ch/assessment-report/ar6/](https://www.ipcc.ch/assessment-report/ar6/)

Jew, C., Hicks, J.W. (2018). Hypoxia Avoidance Behavior in two Air-breathing Fishes. *The FASEB Journal.* **32**, 602.10-602.10.

Jung, E.H., Brix, K.V., Richards, J.G., Val, A.L., Brauner, C.J. (2020). Reduced hypoxia tolerance and survival at elevated temperatures may limit the ability of Amazonian fishes to survive in a warming world. *Science of the Total Environment*, **748**, 141349.

Kochhan, D.F., Campos, D.F., Val, A.L. (2015). Experimentally increased temperature and hypoxia affect stability of social hierarchy and metabolism of the Amazonian cichlid *Apistogramma agassizii*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **190**, 54–60.

Kochhann, D., Sarmiento, C. G., Oliveira, J. C., Queiroz, H. L., Val, A.L., Chapman, L.J. (2021). Take time to look at the fish: Behavioral response to acute thermal challenge in two Amazonian cichlids. *J. Exp. Zool.* **335**, 735– 74.

Koopman, K.R., Collas, F.P.L., Van der Velde, G., Verberk, W. C. (2016). Oxygen can limit heat tolerance in freshwater gastropods: differences between gill and lung breathers. *Hydrobiologia.* **763**, 301–312.

Lehninger, T.M., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2014). *Princípios de Bioquímica*. 6. Ed. São Paulo: Artmed.

- Lutterschmidt, W.I., Hutchison, V.H.** (1997). The critical thermal maximum: history and critique. *Can. J. Zool.* **75**, 1561–1574.
- MacCormack, T.J., Robinson, J.L., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L., Driedzic, W.R.** (2017). Acclimation to hypercarbia protects cardiac contractility and alters tissue carbohydrate metabolism in the Amazonian armored catfish *Pterygoplichthys pardalis*. *Hydrobiologia.* **789**, 91–106.
- Mattias, A.T., Rantin, F.T., Fernandes, M.N.** (1998). Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **120**, 311–315.
- McDonnell, L.H., Chapman, L.J.** (2015). At the edge of the thermal window: effects of elevated temperature on the resting metabolism, hypoxia tolerance and upper critical thermal limit of a widespread African cichlid. *Conserv. Physiol.* **3**, cov050.
- McDonnell, L.H., Reemeyer, J.E., Chapman, L.J.** (2019). Independent and Interactive Effects of Long-Term Exposure to Hypoxia and Elevated Water Temperature on Behavior and Thermal Tolerance of an Equatorial Cichlid. *Physiol. Biochem. Zool.* **92**, 253–265.
- Menail, H.A., Cormier, S.B., Ben Youssef, M., Jørgensen, L.B., Vickruck, J.L., Morin, P.J., Boudreau, L.H., Pichaud, N.** (2022). Flexible Thermal Sensitivity of Mitochondrial Oxygen Consumption and Substrate Oxidation in Flying Insect Species. *Front. Physiol.* **13**, 789.
- Nelson, J.A.** (2014). Breaking wind to survive: fishes that breathe air with their gut. *J. Fish Biol.* **84**, 554–576.
- Nobre, C.A., Sampaio, G., Salazar, L.** (2007). Mudanças climáticas e Amazônia. *Ciência e Cultura.* **59**, 22-27.
- Oliveira, R.D., Lopes, J.M., Sanches, J.R., Kalinin, A.L., Vidro, Glass, M.L., Rantin, F.T.** (2004). Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae), exposed to graded ambient hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **139**, 479–485.
- Park, K., Lee, J.S., Kang, J.C., Kim, J.W., Kwak, I.S.** (2015). Cascading effects from survival to physiological activities, and gene expression of heat shock protein 90 on the abalone *Haliotis discus hannai* responding to continuous thermal stress. *Fish Shellfish Immunol.* **42**, 233–240.
- Pelster, B., Wood, C.M., Jung, E., Val, A.L.** (2018). Air-breathing behavior, oxygen concentrations, and ROS defense in the swimbladders of two erythrinid fish, the facultative air-breathing jeju, and the non-air-breathing traira during normoxia, hypoxia and hyperoxia. *J. Comp. Physiol. B.* **188**, 437–449.

- Pelster, B., Wood, C.M., Campos, D.F., Val, A.L.** (2020). Cellular oxygen consumption, ROS production and ROS defense in two different size-classes of an Amazonian obligate air-breathing fish (*Arapaima gigas*). *Plos One*. **15**, e0236507.
- Pépino, M., Goyer, K., Magnan, P.** (2015). Heat transfer in fish: are short excursions between habitats a thermoregulatory behaviour to exploit resources in an unfavourable thermal environment? *J. Exp. Biol.* **218**, 3461–3467.
- Pörtner, H.O., Knust, R.** (2007). Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. *Science*. **315**, 95–97.
- 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**, 881–893.
- Pörtner, H.O., Peck, M.A.** (2010). Climate change effects on fishes and fisheries: towards a cause-and-effect understanding. *J. Fish Biol.* **77**, 1745–1779.
- Pörtner, H.O., Bock, C., Mark, F.C.** (2017). Oxygen- and capacity-limited thermal tolerance: bridging ecology and physiology. *J. Exp. Biol.* **220**, 2685–2696.
- Pough, H., Janis, C.M.; Heiser, J.B.** (2003). A vida dos vertebrados. 3^{ed}. São Paulo: Atheneu.
- Rohr, J.R., Civitello, D.J., Cohen, J.M., Roznik, E.A., Sinervo, B., Dell, A.I.** (2018). The complex drivers of thermal acclimation and breadth in ectotherms. *Ecol. Lett.* **21**, 1425–1439.
- Rutledge, C.J., Beitinger, T.L.** (1989). The effects of dissolved oxygen and aquatic surface respiration on the critical thermal maxima of three intermittent-stream fishes. *Environ. Biol. Fishes.* **24**, 137–143.
- Salomao, R.A.S., Santos, V.B.D., Mareco, E.A.** (2018). Influence of rearing temperature on muscle growth and adipose tissue in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains. *Acta Sci. Anim. Sci.* **40**.
- Schulte, P.M.** (2004). Changes in gene expression as biochemical adaptations to environmental change: a tribute to Peter Hochachka. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **139**, 519–529.
- 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, K., Kunter, U., Moeller, M.J.** (2015). The evolution of blood pressure and the rise of mankind. *Nephrol. Dial. Transplant.* **30**, 713–723.

- Sloman, K.A., Wood, C.M., Scott, G.R., Wood, S., Kajimura, M., Johannsson, O.E., Almeida-Val, V.M.F., Val, A.L.** (2006). Tribute to R. G. Boutilier: the effect of size on the physiological and behavioural responses of oscar, *Astronotus ocellatus*, to hypoxia. *J. Exp. Biol.* **209**, 1197–1205
- Sunday, J.M., Bates, A.E., Dulvy, N.K.**, 2011. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **278**, 1823–1830. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.1295>
- Sunday, J.M., Bates, A.E., Dulvy, N.K.** (2012). Thermal tolerance and the global redistribution of animals. *Nat. Clim. Change.* **2**, 686–690.
- Ultsch, G.R., Regan, M.D.** (2019). The utility and determination of Pcrit in fishes. *J. Exp. Biol.* **222**, jeb203646.
- Val, A.L.** (1995). Oxygen transfer in fish: morphological and molecular adjustments. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **28**, 1119–1127.
- Val, A.L., Gomes, K.R.M., Almeida-Val, V.M.F.** (2015). Rapid regulation of blood parameters under acute hypoxia in the Amazonian fish *Prochilodus nigricans*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **184**, 125–131.
- Val, A.L.** (2019). Conservação da biota aquática da Amazônia. *Rev. Estud. Bras.* **6**, 79–89.
- Val, A.L., Wood, C.M.** (2022). Global change and physiological challenges for fish of the Amazon today and in the near future. *J. Exp. Biol.* **225**, jeb216440.
- Verberk, W.C., Bilton, D.T.** (2013). Respiratory control in aquatic insects dictates their vulnerability to global warming. *Biol. Lett.* **9**, 20130473.
- Verberk, W.C., Bilton, D. T.** (2015). Oxygen limited thermal tolerance is seen in a plastron breathing insect, and can be induced in a bimodal gas exchanger. *J. Exp. Biol.* **218**, 2083–2088.
- Wang, T., Hicks, J.** (2002). An integrative model to predict maximum O₂ uptake in animals with central vascular shunts. *Zool.* **105**, 45–53.