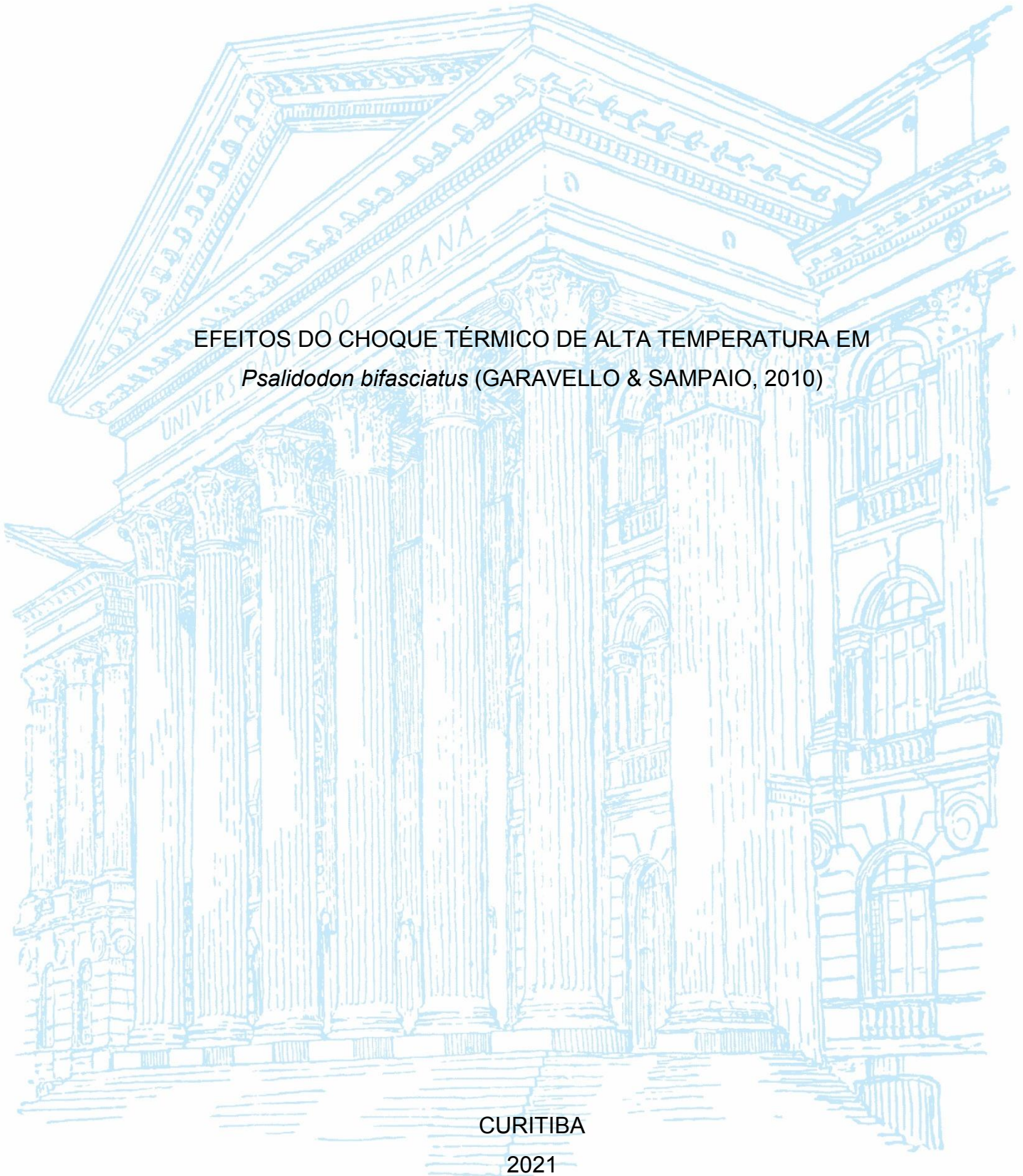


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANNA CAROLINA RESENDE

EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM  
*Psilidodon bifasciatus* (GARAVELLO & SAMPAIO, 2010)



CURITIBA

2021

ANNA CAROLINA RESENDE

EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM  
*Psalidodon bifasciatus* (GARAVELLO & SAMPAIO, 2010)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucélia Donatti

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria Rosa Dmengen Pedreiro de Souza

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Resende, Anna Carolina.

Efeitos de choque térmico de alta temperatura em *Psalidodon bifasciatus*  
(Garavello & Sampaio, 2010). / Anna Carolina Resende. – Curitiba, 2021.  
86 f. : il.

Orientadora: Lucélia Donatti.

Coorientadora: Maria Rosa Dmengeon Pedreiro de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e  
Conservação.

1. Ecofisiologia. 2. Estresse oxidativo. 3. Metabolismo energético. 4.  
Peixes. I. Título. II. Donatti, Lucélia. III. Souza, Maria Rosa Dmengeon  
Pedreiro de. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação.

CDD (20. ed.) 597.092981



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ECOLOGIA E  
CONSERVAÇÃO - 40001016048P6

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de ANNA CAROLINA RESENDE intitulada: *Efeitos do choque térmico de alta temperatura em *Psaltidodon bifasciatus* (Garavito & Sampalo, 2010)*, sob orientação da Profa. Dra. LUCÉLIA DONATTI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as Indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

29/03/2021 18:59:39.0

LUCÉLIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

30/03/2021 11:17:25.0

SILVIA ROMÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

Assinatura Eletrônica

30/03/2021 10:44:52.0

TATIANA HERRERIAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)

---

Centro Politécnico - Setor de Ciências Biológicas - CURITIBA - Paraná - Brasil  
CEP 81531980 - Tel: (41) 3361-1595 - E-mail: [ecologia@ufpr.br](mailto:ecologia@ufpr.br)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 85869

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>  
e insira o código 85869

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a CAPES pela bolsa, que me deu a possibilidade de realizar essa pesquisa e corroborar com a ciência do país. E, ao CNPq pelo apoio financeiro na compra de material para as análises laboratoriais.

Agradeço à minha namorada, Rafaela Alessi, pela paciência e palavras de apoio e incentivo durante todo esse período.

Agradeço à minha mãe, pela força durante momentos difíceis e o carinho constante.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Biologia Adaptativa, Diego, Ananda, Guilherme e Ieda por toda ajuda durante as análises do material, além da amizade que pretendo levar por muitos anos.

Agradeço a todo pessoal do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, sem a ajuda deles todas as análises laboratoriais não seriam possíveis.

Agradeço à minha amiga Larissa Olarte, que mesmo longe se fez perto e me ajudou muito com a bioquímica do trabalho.

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Lucélia Donatti e coorientadora Dr<sup>a</sup>. Maria Rosa Dmengen Pedreiro de Souza pelos ensinamentos e por acreditarem em mim durante esse período.

Agradeço à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sílvia Romão, pelos imensuráveis ensinamentos laboratoriais e paciência em repetir sobre a bioquímica em toda análise enzimática.

Agradeço aos amigos que fiz da minha turma do mestrado (PPGECO/UFPR), do que sempre aliviaram a barra pelas conversas mútuas.

Agradeço, por último, mas não menos importante, aos meus cães, Abóbora e Beterraba, que fazem grande parte do apoio emocional de minha vida.

## RESUMO

A temperatura é um fator abiótico que afeta diretamente a fisiologia dos peixes. Um aumento agudo na temperatura (choque térmico) pode iniciar o processo de estresse oxidativo e consequente ativação de defesas antioxidantes, podendo também desencadear variações nas atividades de enzimas do metabolismo energético. Neste estudo investigamos a resposta do sistema de defesa antioxidante e do metabolismo energético de carboidratos e proteínas em *Psalidodon bifasciatus* frente ao choque térmico de 31°C nos tempos de 2, 6, 12, 24 e 48h nas brânquias, fígado e rim. Os peixes apresentaram sinais de estresse em todos os tecidos testados, mostrado pelo aumento na concentração de LPO em 2h e atividade de PFK, HK e MDH em 48h nas brânquias, no aumento da atividade de GST em 12h e CS em 24h e concentração de GSH em 12 e 48h no fígado e maiores atividades de SOD em 48h, GR em 24h, G6PDH em 48h e concentração de GSH em 24h no rim. No rim o sistema de defesa antioxidante foi o mais alterado, enquanto nas brânquias o metabolismo de carboidrato foi o mais alterado. Os resultados indicam a importância da via da glicólise e do metabolismo aeróbico nas brânquias, do metabolismo aeróbico no fígado e da via pentose fosfato no rim na tentativa de retornar a homeostase. As respostas dos biomarcadores apresentaram-se tecido-específico, com mais biomarcadores alterados na ordem decrescente de brânquias, rim e fígado.

Palavras-chave: Characidae. Ecofisiologia. Estresse Oxidativo. Metabolismo Energético.

## ABSTRACT

Temperature is an abiotic factor that directly affects the physiology of fishes. An acute increase in temperature (thermal shock) can initiate the oxidative stress process and consequently activation of antioxidant defense enzymes, also triggering variations in enzyme activities from the energy metabolism. In this study, we investigated the antioxidant defense system and the energy metabolism of carbohydrates and proteins response in *Psalidodon bifasciatus* when facing thermal shock of 31°C in the exposure times of 2, 6, 12, 24, and 48h in the tissues of gills, liver and kidneys. The fish presented signs of stress in all tissues tested, showed through the increase in the concentration of LPO in 2h and PFK, HK and MDH activity in 48h in the gills, the increase in GST activity in 12h and CS activity in 24h and the concentration of GSH in 12 and 48h in the liver and also through higher activities in SOD in 48h, GR in 24h, G6PDH in 48h and concentration of GSH in 24h in the kidney. In kidneys the antioxidant system was highly altered, while in the gills the carbohydrate metabolism presented greater alterations. The results indicate the importance of the glycolysis pathway and the aerobic metabolism in the gills, the aerobic metabolism in the liver and the pentose-phosphate pathway in kidneys in attempt to returning to homeostasis. The biomarkers response presented to be tissue-specific, with more biomarkers altered in the decreasing order of gills, kidney and liver.

Keywords: Characidae. Ecophysiology. Oxidative stress. Energy Metabolism.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS.....	16
FIGURA 2 - ESQUEMA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS.	16
FIGURA 3 - ESQUEMA DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE .....	18
FIGURA 4 - MAPA DA ÁREA DE COLETA DOS PEIXES.....	21
FIGURA 5 - FOTO DOS PROCEDIMENTOS DE DISSECAÇÃO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	23
FIGURA 6 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NAS BRÂNQUIAS DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	29
FIGURA 7 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NAS BRÂNQUIAS DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	31
FIGURA 8 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NAS BRÂNQUIAS DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	33
FIGURA 9 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NO FÍGADO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	35
FIGURA 10 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO FÍGADO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	37
FIGURA 11 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NO FÍGADO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	39
FIGURA 12 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NO RIM DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	41
FIGURA 13 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO RIM DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	43
FIGURA 14 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NO RIM DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	45
FIGURA 15 - BILOT DE PCA DE ENZIMAS E CONCENTRAÇÃO DE GSH DO SISTEMA ANTIOXIDANTE NOS TRÊS ÓRGÃOS AVALIADOS.....	46
FIGURA 16 - BILOT DE PCA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NOS TRÊS ÓRGÃOS AVALIADOS .....	47

FIGURA 17 - BILOT DE PCA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NOS TRÊS ÓRGÃOS AVALIADOS .....	48
--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - EFEITO DO TEMPO NA ATIVIDADE DOS BIOMARCADORES DAS BRÂNQUIAS DE *Psalidodon bifasciatus* EM 2, 6, 12, 24 E 48H DE EXPOSIÇÃO ..... **Erro! Indicador não definido.**

TABELA 2 - EFEITO DO TEMPO NA ATIVIDADE DOS BIOMARCADORES DO FÍGADO DE *Psalidodon bifasciatus* EM 2, 6, 12, 24 E 48H DE EXPOSIÇÃO ..... **Erro! Indicador não definido.**

TABELA 3 - EFEITO DO TEMPO NA ATIVIDADE DOS BIOMARCADORES DO RIM DE *Psalidodon bifasciatus* EM 2, 6, 12, 24 E 48H DE EXPOSIÇÃO... **Erro! Indicador não definido.**

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
2.1	COLETA E ACLIMATAÇÃO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	20
2.2	EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO .....	22
2.3	ANÁLISES ENZIMÁTICAS .....	23
2.3.1	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E NÍVEIS DE GSH E MARCADORES DE DANO .....	24
2.3.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS .....	25
2.3.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS .....	26
2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	27
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
3.1	EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NAS BRÂNQUIAS DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	28
3.1.1	BRÂNQUIAS - DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANO.....	28
3.1.2	BRÂNQUIAS – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS.....	30
3.1.3	BRÂNQUIAS – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS.....	32
3.2	EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO FÍGADO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	34
3.2.1	FÍGADO – BIOMARCADORES DE DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANO .....	34
3.2.2	FÍGADO – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS.....	36
3.2.3	FÍGADO – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS.....	38
<b>3.3</b>	<b>EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO RIM DE <i>Psalidodon bifasciatus</i>.....</b>	<b>40</b>

3.3.1 RIM – BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANO .....	40
3.3.2 RIM – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS.....	42
3.3.3 RIM – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS.....	44
3.4 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM <i>Psalidodon bifasciatus</i> : VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS .....	46
3.4.1 BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANO .....	46
3.4.2 BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS	47
3.4.3 BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS ...	48
<b>4 DISCUSSÃO.....</b>	<b>49</b>
4.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NAS BRÂNKUIAS DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	50
4.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO FÍGADO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	53
4.3 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO RIM DE <i>Psalidodon bifasciatus</i> .....	57
4.4 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM <i>Psalidodon bifasciatus</i> : VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS .....	60
<b>5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>63</b>
<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nas décadas recentes, mudanças climáticas globais têm causado grande preocupação pois espera-se que resultarão em efeitos devastadores em ecossistemas de água doce (DUTTA et al., 2018; LI et al., 2019). Alterações do ambiente aquático, como poluentes, aumentos de temperatura e eventos extremos podem alterar a biodiversidade e o funcionamento do ecossistema de rios e consequentemente impactar organismos aquáticos, afetando seu comportamento e sobrevivência (PAINE et al., 1998; LAPOINTE et al., 2011; JONES, 2013). Além disso, animais aquáticos são profundamente afetados pelas condições ambientais de seus habitats e podem ter sua habilidade de resistir a estresses fisiológicos alterada (CHANG et al., 2001; LI et al., 2019). Peixes são bons indicadores ecológicos e podem ser usados para monitorar o status de ambientes aquáticos por apresentarem sinais de estresse frente a alterações climáticas (MCQUATTERS-GOLLOP, 2012; QUEIRÓS et al., 2018).

O estresse nos peixes pode ser definido como a gama de respostas fisiológicas a algum distúrbio negativo, que ocorre com o intuito de reestabelecer a homeostase (LOGAN; BUCKLEY, 2015; SCHRECK; TORT, 2016). O estresse em peixes pode ser desencadeado por: (a) estressores abióticos: quantidade de oxigênio dissolvido, pH, pressão parcial e variações de temperatura; (b) estressores químicos: contaminantes e poluentes que alteram a qualidade da água e (c) estressores bióticos: espécies invasoras, predadores e parasitas, dos quais tem se tornado preocupações crescentes para populações de peixes selvagens e cultivados (IWAMA, 1999; SCHINEGGER et al., 2012; PETITJEAN et al., 2019).

Um fator primário que influencia o estado fisiológico de peixes e é altamente variado em ambientes naturais e de piscicultura é a temperatura (LASKOWSKI et al., 2010), visto que a maioria das espécies de peixes é ectotérmica e apresentam a temperatura corpórea diretamente afetada pela temperatura da água (BELLGRAPH et al., 2010). As mudanças climáticas estão aumentando a média de temperatura e a frequência de eventos térmicos extremos (GUNDERSON; STILLMAN, 2015), principalmente em ecossistemas de água doce que estão mais propensos aos efeitos das mudanças climáticas, tais como alterações de temperatura, precipitação e regimes de água (IPCC, 2014). Variações sazonais ou agudas de temperatura, como movimento vertical na coluna de água através da termoclina podem causar uma

significante e rápida oscilação na temperatura corporal de peixes, e substancialmente influenciar em suas funções cardiovasculares e fisiológicas (BALDISSEROTTO et al., 2019).

Consequentemente, peixes habitando ecossistemas impactados podem encontrar temperaturas que estão fora do seu intervalo ótimo de temperatura (GAGNÉ et al., 2007; LAPOINTE et al., 2011). Esses organismos devem se adaptar não somente ao aumento médio de temperatura, mas também para eventos de altas temperaturas mais acentuadas (CULUMBER; MONKS, 2014; MADEIRA et al., 2017).

Dentro da extensão de temperaturas não letais, os peixes são geralmente capazes de lidar com mudanças graduais, no entanto, um aumento rápido da temperatura ambiente pode resultar em uma resposta generalizada de estresse nos indivíduos, como foram caracterizadas em espécies de peixes de clima temperado e antárticos (VINAGRE et al., 2012, NAKANO et al., 2014, FORGATI et al., 2017, SOUZA et al., 2018). Os limites de tolerância térmica variam entre as espécies de peixes e são dependentes da genética, estágio de desenvolvimento e histórico térmico, sendo mais amplos em espécies de regiões tropicais e temperadas do que polares (PECK; CONWAY, 2000; PORTNER, 2002; DONALDSON et al., 2008). Um aumento agudo na temperatura é conhecido como choque térmico de alta temperatura e pode induzir numerosas mudanças bioquímicas e fisiológicas nos peixes na tentativa de lidar com o desafio imposto pelo estresse, chamado de “respostas generalizadas ao estresse”, que é amplamente caracterizado entre respostas primárias, secundárias e terciárias (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 1997; IWAMA et al., 1999).

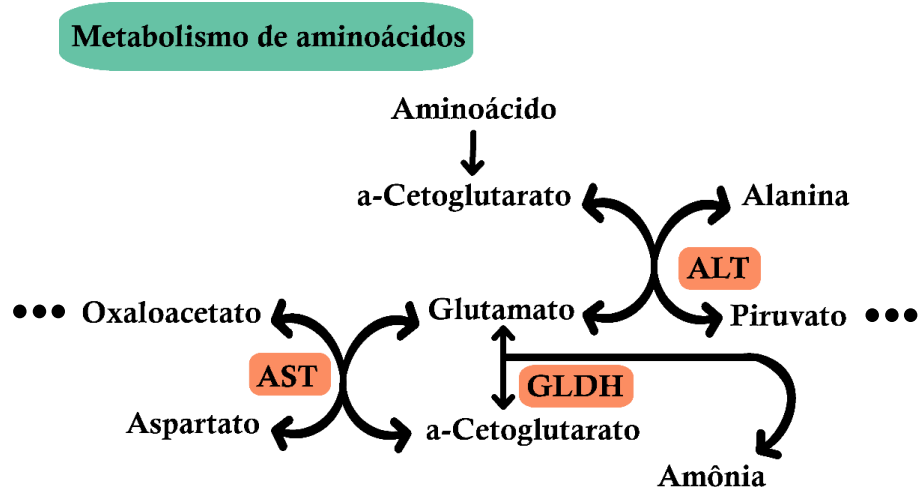
A resposta primária representa a percepção de um estado alterado e início da resposta endócrina e neuroendócrina, que inclui uma cascata de respostas envolvendo a secreção e síntese de hormônios corticosteroides e catecolaminas, que possuem o papel principal de tornar disponível a energia para sistemas envolvidos em luta, fuga ou lidar com o estresse (WENDELAAR BONGA, 1997; PANKHURST, 2011). A resposta secundária inclui vários ajustes bioquímicos e fisiológicos associados, que demandam o aumento da mobilização de substratos energéticos para lidar com o estresse, pois é um processo de alta demanda energética (BARTON; SCHRECK, 1987; SCHRECK; TORT, 2016) acarretando mudanças nas taxas respiratória e cardiovascular (RODNICK; PLASNA, 2016). A resposta terciária geralmente ocasiona um prejuízo para o peixe, pois representa mudanças a níveis individuais e

populacionais, afetando seu comportamento, crescimento e reprodução (BARTON, 1997; PANKHURST, 2016; SADOUL; VIJAYAN, 2016).

Dentre as respostas secundárias ao estresse frente a exposições a temperaturas altas, modular a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo energético é fundamental para garantir o fornecimento de energia aos tecidos e pode resultar em mudanças em concentrações enzimáticas ou nas expressões de isoformas com diferentes propriedades cinéticas (HOCHACHK, 2002, SOUZA et al., 2017).

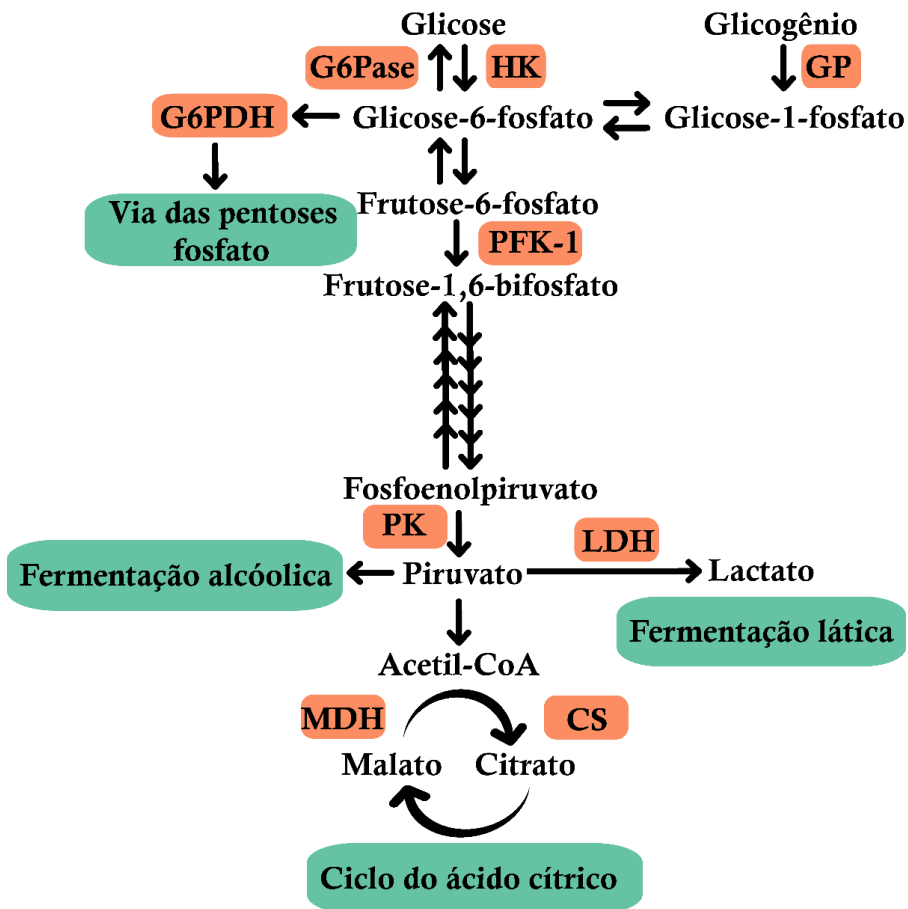
Conseqüentemente, essas respostas fisiológicas resultam em mudanças na taxa metabólica e diferentes ajustes bioquímicos podem ocorrer na tentativa de retornar à homeostase (LERMEN et al., 2004, PRZEPIURA et al., 2019). Antes que a homeostase possa ser atingida, a capacidade de resposta dos tecidos para manter a taxa metabólica é afetada, portanto a disponibilidade de substratos energéticos e, conseqüentemente, funções como crescimento e locomoção podem ser comprometidos (STROBEL et al., 2013). Algumas enzimas chaves, chamadas de biomarcadores, são usadas para avaliar as alterações no metabolismo energético, escolhidas em pontos estratégicos das vias metabólicas. No metabolismo de proteínas, destacam-se as enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e glutamato desidrogenase (GLDH) (FIGURA 1). Nas vias do metabolismo de carboidratos (FIGURA 2) destacam-se: citrato sintase (CS) e malato desidrogenase (MDH) no ciclo do ácido cítrico (TCA), lactato desidrogenase (LDH) na fermentação láctica, glicose-6-fosfatase (G6Pase) e glicogênio fosforilase (GP) na gliconeogênese e glicogenólise, hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK) na glicólise e glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) na via das pentoses fosfato.

FIGURA 1 - ESQUEMA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS



NOTA: Enzimas chave do metabolismo de proteínas em laranja e nome da via em verde. Os três pontinhos ao lado de oxaloacetato e piruvato indicam que eles seguem para a via do TCA. GLDH – glutamato desidrogenase; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase. FONTE: adaptado de Nelson & Cox, 2017.

FIGURA 2 - ESQUEMA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS



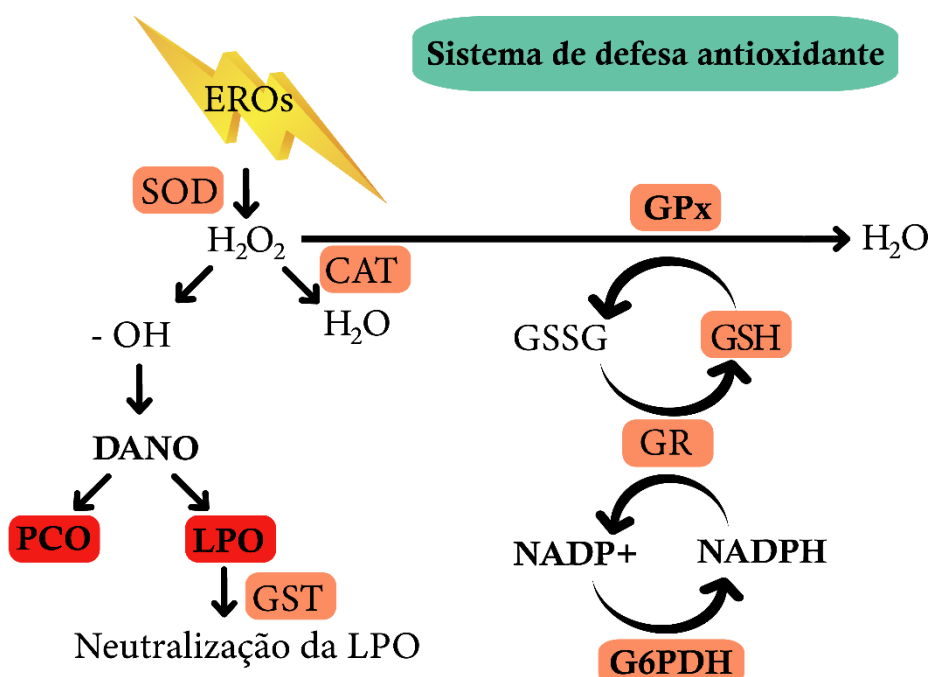
NOTA: Enzimas chave do metabolismo de carboidratos em laranja e nomes das vias envolvidas em verde. GP – glicogênio fosforilase; G6Pase – glicose-6-fosfatase; HK – hexoquinase; PFK – fosfofrutoquinase; PK – piruvato quinase; G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase; LDH - lactato desidrogenase; CS – citrato sintase; MDH – malato desidrogenase. FONTE: adaptado de Nelson & Cox, 2017.

Além disso, um aumento na temperatura ambiente gera ativação metabólica com um aumento no consumo de oxigênio, que pode gerar formação de radicais livres e outras espécies reativas que iniciam o processo chamado de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984, HELLOU et al., 2012). O termo estresse oxidativo é usado para estados fisiológicos onde o balanço entre a geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs), como o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, é desequilibrado, favorecendo a geração e desfavorecendo a eliminação de EROs (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006, MADEIRA et al., 2016a).

Os organismos se adaptam ao estresse oxidativo aumentando seu potencial antioxidante (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1984; STOREY, 1996; HERMES-LIMA, 2004; BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). As principais enzimas antioxidantes (FIGURA 3) consistem em superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-s-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPx), e outras moléculas como o tiol não proteico (GSH) que desintoxicam diretamente as EROs e outros compostos envolvidos na geração de EROs e danos oxidativos para componentes celulares (HELLOU et al., 2012; BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). Existem enzimas auxiliares que também participam da resposta ao estresse oxidativo, que ajudam as anteriores produzindo equivalentes redutores, como a glutationa redutase (GR) e a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006; KHARE et al., 2019). As enzimas antioxidantes são consideradas potenciais biomarcadores para quantificar e qualificar o estresse oxidativo e são frequentemente usadas como ferramentas de triagem para avaliar os impactos de estresses ambientais em peixes (FAHEEM; LONE, 2017).

O estresse oxidativo causa danos às macromoléculas, causando mudanças como carbonilação de proteínas (PCO), inativação de enzimas, liperoxidação (LPO) e danos ao DNA, que comprometem suas funções biológicas e podem resultar em morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007, FORGATI et al., 2017). É possível investigar o dano oxidativo através da análise de conteúdo de PCO e LPO (VERGAUWEN et al., 2013).

FIGURA 3 - ESQUEMA DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE



NOTA: Enzimas chave do sistema de defesa antioxidante em laranja e medidores de dano em vermelho. SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutaciona peroxidase. Tióis não-proteicos: GSH - glutaciona reduzida; GR - glutaciona redutase; GST - glutaciona-s-transferase. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação; PCO - carbonilação de proteínas. FONTE: adaptado de Nelson & Cox, 2017.

Esses padrões de respostas de antioxidantes à produção de EROs e de biomarcadores do metabolismo energético de carboidratos e de proteínas podem ser observadas em peixes nas brânquias (LUSHCHAK et al., 2006b; FORGATI et al., 2017; JAVED et al., 2017; MADEIRA et al., 2017; WEN et al., 2018; GUILLEN et al., 2019), fígado (SOENGAS; ANDRES, 1995; LUSHCHAK et al., 2006; LOPEZ-PATINO et al., 2014; MADEIRA et al., 2016a; FAHEEM; LONE, 2017; HASSAN et al., 2017) e rim (KAUR et al., 2005; JOSE, 2014; FAHEEM; LONE, 2017, FORGATI et al., 2017; JESUS et al., 2018; YANG et al., 2020; ZEBRAL et al., 2020). O fígado dos peixes tem um papel importante em funções vitais do metabolismo básico e é o maior órgão de acumulação, biotransformação e excreção (HINTON; LAUREN, 1990; FIGUEIREDO-FERNANDES et al., 2006; BHAT 2017). Os rins e as brânquias estão envolvidos em osmorregulação e excreção e suas funções requerem a ação de numerosas enzimas e transportadores, o que demanda grande quantidade de energia (TSENG et al., 2008; BASIRUN et al., 2019). Devido à sua função fisiológica e contato próximo com a água, as brânquias são diretamente afetadas por fatores químicos e físicos, como drásticas mudanças na temperatura ambiente (HWANG et al., 2011).

Dentre os peixes subtropicais, destaca-se *Psalidodon bifasciatus* (anteriormente *Astyanax bifasciatus*) (Garavello & Sampaio, 2010), que possuem uma distribuição geográfica ampla, habitam os mais diversos ambientes, como regiões montanhosas, trechos lóticos e leitos de rios, porções lênticas ou lagunares e nascentes (KAVALKO et al., 2008), além de serem o grupo dominante em algumas bacias hidrográficas e na bacia do rio Iguaçu, devido ao seu potencial reprodutivo e oportunismo trófico (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015). Estudos de ecotoxicologia e biomonitoramento tem amplamente utilizado essa espécie como modelo (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015; NIMET et al., 2017; TINCANI et al., 2019; NIMET et al., 2020), por ser sensível a mudanças físico-químicas do ambiente e possui grande adaptabilidade à diferentes habitats, considerado como bom bioindicador de alterações ambientais (NAVARRO, 2010, BUENO-KRAWCZYK et al., 2015).

Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho é avaliar a atividade e concentrações dos biomarcadores do metabolismo energético de carboidratos e de proteínas e do sistema de defesas antioxidantes em *Psalidodon bifasciatus* frente ao choque térmico de alta temperatura (31°C) nas brânquias, fígado e rim, durante 2, 6, 12, 24 e 48 horas de exposição. Levantamos a hipótese de que o estresse térmico irá alterar (i.e. aumentar ou diminuir) as atividades de enzimas e concentrações de biomarcadores do sistema de defesa antioxidante, metabolismo energético de carboidratos e de proteínas ao longo dos tempos de exposição e os órgãos avaliados apresentarão diferentes respostas devido à suas diferentes capacidades metabólicas.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

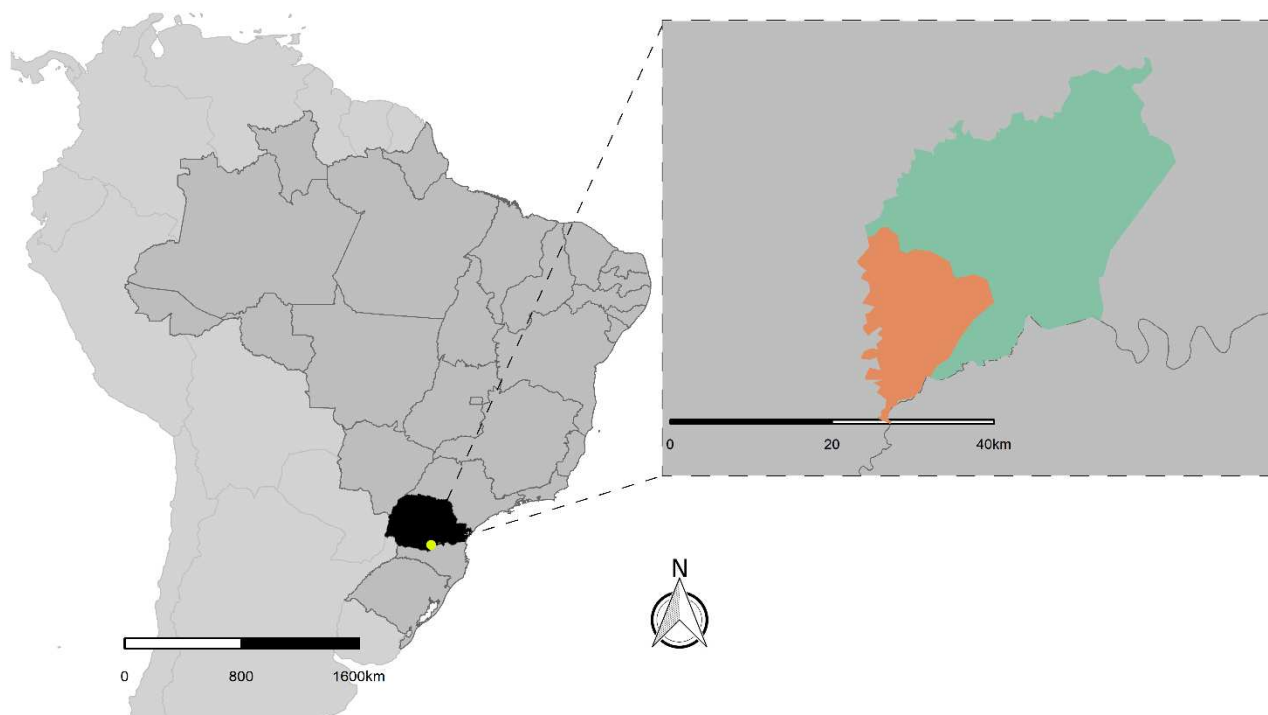
As temperaturas utilizadas levaram em consideração literatura existente. No estudo de Bueno-Krawczyk (2015), com *Psalidodon bifasciatus* coletados na região do médio rio Iguaçu, as temperaturas nos pontos de coleta tiveram média entre 19 e 20°C, portanto o grupo controle foi mantido a temperatura próxima de 21°C, assumindo que os peixes estariam adaptados a mesma e consequentemente mantendo a homeostase sem alterações nas atividades enzimáticas. A habilidade de tolerar um estressor como o aquecimento depende não somente da intensidade do estressor, mas também da duração da exposição (REZENDE et al., 2014). Os tempos de coleta utilizados neste estudo (2 a 48 horas) simulam situações de estresse agudo e geram uma mudança transiente das atividades metabólicas, que ocorrem a fim de reestabelecer a homeostase (FORGATI et al., 2017; SOUZA et al., 2018; PRZEPIURA et al., 2019).

### 2.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO DE *Psalidodon bifasciatus*

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA – BIO/UFPR) emitiu a licença para experimentação animal sob n° 1228. A licença ambiental de coleta de animais foi obtida por meio do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio), sob número 63551-1, emitida em 27/06/2018.

*P. bifasciatus* (Comprimento Padrão:  $8,75 \pm 0,75$  cm; Peso:  $15 \pm 4,5$  g) foram coletados na região do médio Iguaçu, no município de União da Vitória-PR (Sul: 26° 14' 58.50" / Oeste: 51° 6' 33.07") e Porto Vitória-PR (Sul: 26° 10' 46.66" / Oeste: 51° 10' 25.09"), com o auxílio de vara de pesca, linhas e anzol e mantidos experimentalmente no Centro de Pesquisas e Extensões em Aquicultura Ildo Zago, em União da Vitória/PR (26° 13' 12.15"S; 51° 7' 51.07"O) (FIGURA 4).

FIGURA 4 - MAPA DA ÁREA DE COLETA DOS PEIXES



NOTA: Mapa da área de coleta dos indivíduos de *P. bifasciatus*, estado do Paraná (em preto), União da Vitória (em verde) e Porto Vitória (em laranja), no estado do Paraná, Brasil. FONTE: A autora, 2021.

Nos tanques de 830 L, os peixes foram mantidos durante três dias em temperatura controlada de  $21 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015) com fotoperíodo natural de aproximadamente 11 horas luz/13 horas escuro e aeração constante, visando a sua aclimação (PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2017). Os tanques configuravam sistemas estáticos, limpos por sucção diária, com aproximadamente 50% da água renovada diariamente (LERMEN et al., 2004) com água originária de nascente própria.

Os peixes foram alimentados (média: 1% peso corporal) diariamente com ração comercial para peixes (Supra<sup>®</sup> Aqua Line, com teor de proteína de 42%) (CHUNG, 2000; LERMEN, et al., 2004). Parâmetros físico-químicos da água como oxigênio dissolvido ( $7,5 \pm 0,58$  mg/L), amônia ( $1,75 \pm 0,29$  mg/L), pH ( $7,53 \pm 0,05$ ), nitrato (0,00mg/L), nitrito (0,00mg/L), dureza (71,6 mg/L de  $\text{CaCo}_3$ ) e sem presença de cloro residual foram mensurados durante a aclimação e experimentação.

## 2.2 EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO

*P. bifasciatus* (n = 120), após aclimação, foram transferidos diretamente para aquários contendo água a  $31^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (choque térmico) (LERMEN et al., 2004; VIEIRA, 2015), com tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 48 horas nessa condição. Para cada situação experimental houve um controle, em que os animais foram mantidos a  $21 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ . Foram utilizados 12 indivíduos por experimento e a densidade máxima de peixes por aquário foi de 3,6g/L de água em *P. bifasciatus* (CHUNG, 2000; VIEIRA et al., 2013). Os bioensaios foram realizados em duplicata. A temperatura da água dos aquários foi rigorosamente controlada por termostatos (Aqua One<sup>®</sup>, VigoAr<sup>®</sup> e Atman<sup>®</sup>, com potência de 100W).

A troca de água nos experimentos acima de 24 horas foram idênticas as da aclimação. Para todos os grupos, o primeiro dia de aclimação foi o primeiro dia do fornecimento de alimentos e a última alimentação foi fornecida em aproximadamente 22 - 24 horas antes da eutanásia (VINAGRE et al., 2014; MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016).

Após o período experimental, os animais foram anestesiados com benzocaína 0,1% (p v-1) e foram imediatamente dissecados (FIGURA 5). As amostras das brânquias, fígado e rim foram armazenadas em nitrogênio líquido e destinadas para os diversos procedimentos analíticos realizados no Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – Setor de Ciências Biológicas – UFPR.

FIGURA 5 - FOTO DOS PROCEDIMENTOS DE DISSECAÇÃO DE *Psalidodon bifasciatus*

NOTA: Equipe de laboratório realizando procedimentos de anestesia e dissecação dos animais após o período do experimento

FONTE: Ieda Scheleger, 2019.

### 2.3 ANÁLISES ENZIMÁTICAS

As determinações das atividades enzimáticas e níveis de biomarcadores de estresse oxidativo foram realizados em triplicata por espectrofotometria em leitora de microplacas (EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA). Em todas as análises a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se soro de albumina bovina (BSA) para o estabelecimento da curva padrão e a absorbância das amostras foi analisada em 595 nm.

O número de amostras utilizada para cada análise foi diferente devido às limitações laboratoriais e de material biológico e podem ser visualizados em mais detalhes no Apêndice 1. As atividades enzimáticas estão expressas em nmol ou  $\mu\text{mol}$  de substrato convertido em produto por minuto ( $\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$ , mU; e  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ , U; respectivamente). Atividades específicas expressos de acordo com a concentração de proteína em cada amostra (mU/mg or U/mg).

### 2.3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E NÍVEIS DE GSH E MARCADORES DE DANO

As amostras de brânquias, fígado e rim foram pesadas, homogeneizadas (homogeneizador Potter-Elvehjem) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), sequentemente centrifugadas em 12.000 g a 4°C durante 20 min e os sobrenadantes foram separados em alíquotas em microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram congelados e armazenados à -80°C para conservação das amostras e posteriormente utilizados para as determinações das atividades enzimáticas e níveis de biomarcadores do estresse oxidativo.

A atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foi avaliada segundo Crouch et al. (1981), que consiste em avaliar a capacidade da SOD em inibir a redução do NBT para azul *formazan* pelo  $O_2$  –gerado pela hidroxilamina em solução alcalina, medida à 560 nm no espectrofotômetro.

A atividade da catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) foi avaliada segundo Beutler (1975), no qual o princípio baseia-se em medir a degradação de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, reação que pode ser acompanhada pelo decréscimo da absorbância em 240 nm.

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx, E.C. 1.11.1.9) foi medida segundo o método descrito por Wendel (1981), baseado na oxidação de glutathiona reduzida (GSH) na redução acoplada de peróxido de hidrogênio a água, no qual ocorre o decréscimo de absorbância promovido durante a redução de GSSG, catalisada pela GR, na presença de NADPH medido à 340 nm.

A atividade da glutathiona-S-transferase (GST, E.C. 2.5.1.18) foi determinada de acordo com a metodologia de Keen et al. (1976), que consiste em monitorar a atividade de GST na reação na qual o tioéter é formado através do substrato CDNB com o tripeptídeo glutathiona (GSH), mensurado a 340 nm.

A atividade da glutathiona redutase (GR, E.C. 1.6.4.2) foi avaliada segundo os autores Carlberg e Mannervik (1985), medida pela atividade da GR na oxidação do NADPH à 340 nm na conversão de GSSG em GSH.

Os níveis de tióis não proteicos (GSH e outros) foram determinados através da metodologia de Sedilak e Lindsay (1968), baseado na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não protéicos com o DTNB, gerando um produto que absorve luz a 415 nm.

Peroxidação lipídica (LPO) foi estimada pelo método de TBARS (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007 com modificações), fundamentada em medir MDA, que é um produto de endoperóxido de ácidos graxos insaturados resultados da oxidação de substratos lipídicos. O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) formando um cromógeno rosa (TBARS), que é medido à 535 nm.

O dano oxidativo em proteínas (PCO) foi determinado pela medida de grupos carbonil conforme previamente descrito por Levine et al. (1994), no qual a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) reage com proteínas carboniladas de tipo aldeído e cetona e forma dinitrofenil hidrazonas que foram detectadas a 360 nm.

### **2.3.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS**

As amostras de brânquias, fígado e rim foram pesadas, homogeneizadas (homogeneizador Potter-Elvehjem) em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) (proporção de 1:5) e sonicadas durante 15 segundos para ruptura de estruturas subcelulares, sob banho de gelo nas duas etapas. Seguidamente, foram centrifugadas em 11.790 g a 4°C durante 10 min e os sobrenadantes foram separados em alíquotas em microtubos de 1,5 ml. Os microtubos foram congelados e armazenados à -80°C para conservação e posteriormente utilizados para as determinações das atividades enzimáticas.

A atividade da glicose-6-fosfatase (G6Pase, E.C. 3.1.3.9) foi determinada seguindo o método de Fathi et al (2002), que tem como princípio a quantificação de fosfato inorgânico liberado pela formação de um complexo colorado com verde malaquita e molibdato de amônia, medida pela absorbância a 600 nm.

A determinação da variação de absorbância com relação a atividade da glicogênio-fosforilase (GP, E.C. 2.4.1.1) foi mensurada de acordo com a metodologia de Chang et al. (2007), na qual a atividade da GP na reação em que a mesma catalisa a quebra de glicogênio para entrada na via glicolítica foi mensurada a 340 nm.

A atividade da hexoquinase (HK, E.C. 2.7.1.1) foi avaliada segundo Baldwin et al. (2007), através da atividade de HK na reação de regulação na conversão de glicose em glicose-6-fosfato, medida a 340 nm.

A determinação da atividade da fosfofrutoquinase (PFK, E.C. 2.7.1.11) foi realizada segundo Baldwin et al. (2007), na qual a atividade é medida a 340 nm

através da reação irreversível de transferência de um grupo fosfato do ATP para a posição 1 de frutose-6-fosfato, formando frutose 1,6-difosfato, a qual PFK catalisa.

A atividade da lactato-desidrogenase (LDH, E.C. 1.1.1.27) foi determinada de acordo com Thuesen, Mccullough e Childress (2005), através do decréscimo da absorvância de NADH a 340 nm devido a oxidação de NAD<sup>+</sup>, decorrente da conversão do piruvato presente no sistema de reação a lactato, reação catalisada pela LDH.

A atividade da piruvato quinase (PK, E.C. 2.7.1.40) foi determinada segundo a metodologia de Levesque et al. (2002), através da reação irreversível, catalisada pela PK, de transferência do grupo fosfopiruvato para o ADP, gerando uma molécula de piruvato e uma de ATP, medida a 340 nm.

A atividade de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH, E.C. 1.1.1.49) foi determinada pelo método descrito por Glock e Mcclean (1953), na qual a atividade de G6PDH é mensurada a 340 nm, pela redução de NADP<sup>+</sup> a NADPH enquanto oxida glicose-6-fosfato.

A atividade da citrato-sintase (CS, E.C. 4.1.3.7) foi determinada segundo Saborowski e Buchholz (2002), mensurada pelo método cinético a partir da formação de CoA-SH em complexo com o DTNB e pode ser detectado a 412 nm.

A atividade da malato-desidrogenase (MDH, E.C. 1.1.1.37) foi avaliada segundo o método descrito por Childress e Somero (1979) e Almeida et al. (2016), determinada com base na sua reação reversa de conversão de oxaloacetato em malato, com conseqüente oxidação do NADH a NAD<sup>+</sup>, avaliada por método cinético com a 340 nm.

### **2.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS**

As alíquotas preparadas para o metabolismo energético de carboidratos também foram utilizadas para a determinação da atividade dos biomarcadores do metabolismo energético de proteínas.

A atividade de glutamato desidrogenase (GLDH, E.C. 1.4.1.3) foi determinada segundo Ciardiello et al. (2000) e Syed et al. (1990), por meio do método cinético a 340 nm a partir da formação de NADH ou NADPH, na reação que ela converte glutamato em  $\alpha$ -cetoglutarato.

A atividade de alanina aminotransferase (AST, E.C. 2.6.1.2) foi determinada a partir de kit comercial (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, referência: 353, MS 80022230150), no qual a formação de glutamato e piruvato é medida em uma absorbância de 505 nm.

A atividade de aspartato aminotransferase (ALT, E.C. 2.6.1.1) foi determinada a partir de kit comercial (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, referência: 352, MS 80022230149) no qual a formação de glutamato e oxaloacetato é medida em uma absorbância de 505 nm.

## 2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O efeito das variáveis independentes, temperatura (21°C e 31°C) e tempo de exposição (2, 6, 12, 24 e 48 horas) e suas interações foram analisadas usando a análise de variância bi-fatorial (ANOVA) para cada biomarcador. Os valores finais dos biomarcadores analisados foram normalizados para realização do teste estatístico, e o contraste *a posteriori* foi realizado pelo pacote *emmeans* (LENTH, 2020) usando o método de Tukey. Os valores estão apresentados como a média e o erro padrão da média nos gráficos montados através do pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2016). A análise MANOVA foi utilizada para testar a diferença de resposta enzimática entre os três órgãos avaliados. Uma análise multivariada, *principal components analysis* (PCA), foi realizada com os pacotes *factoextra* (KASSAMBARA; MUNDT, 2019) e *FactoMineR* (LE; JOSSE; HUSSON, 2008) para investigar quais biomarcadores do estresse oxidativo e do metabolismo energético de carboidratos e de proteínas foram importantes descritores os três órgãos analisados. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa R (R CORE TEAM, 2020).

### 3 RESULTADOS

Houve a mortalidade de cinco indivíduos durante o experimento, três em 2h, um em 6h e um em 12h quando submetidos ao choque térmico de 31°C.

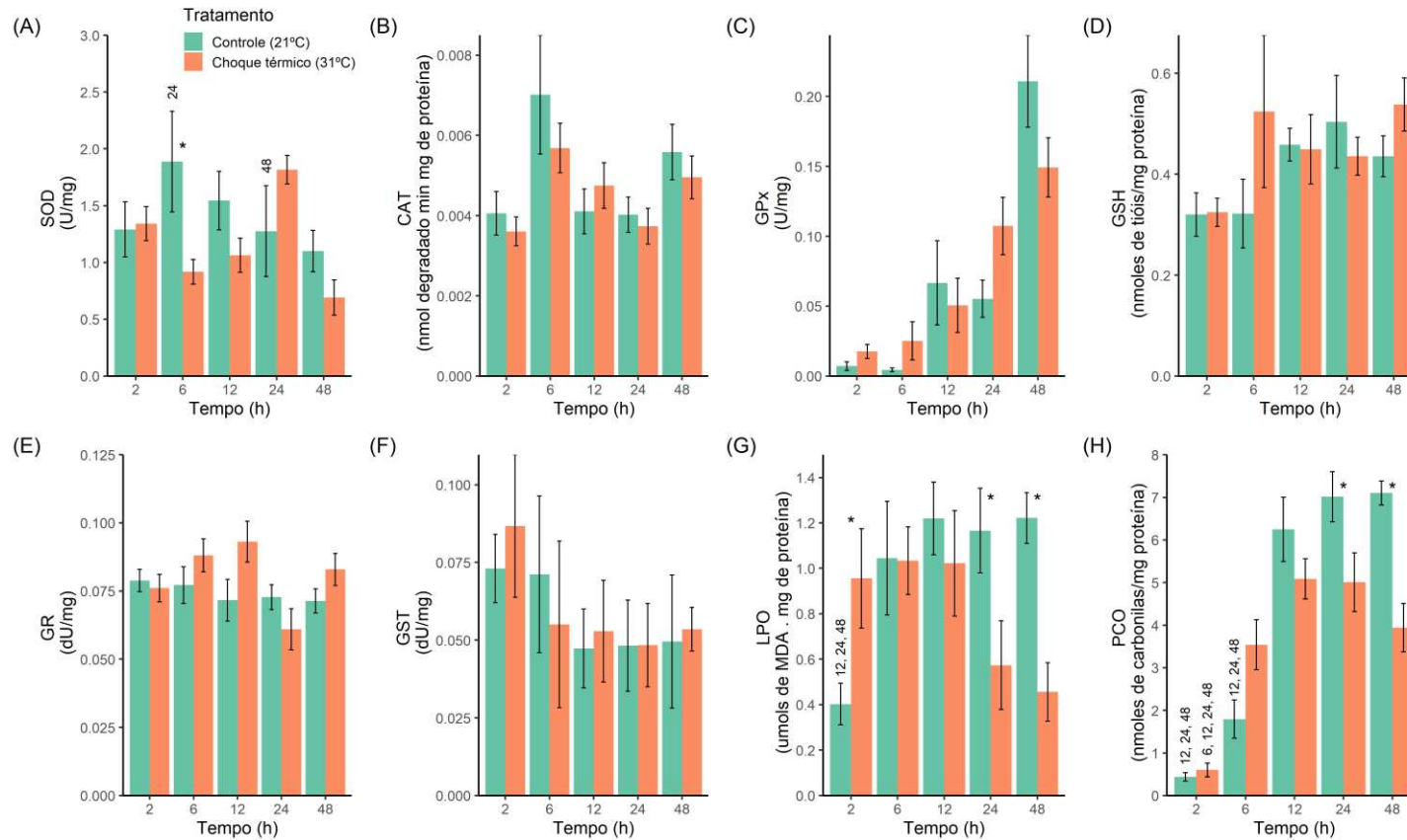
Os resultados serão apresentados inicialmente por tecido no qual as enzimas foram avaliadas, seguida de uma apresentação conjunta realizando uma abordagem sistêmica das enzimas entre os tecidos. Os resultados discutidos neste trabalho são preferencialmente sobre a interação das duas variáveis independentes (tempo e temperatura), que efetivamente avalia nossa hipótese.

#### 3.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NAS BRÂNQUIAS DE *Psalidodon bifasciatus*

##### 3.1.1 BRÂNQUIAS - DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANO

A atividade de SOD em *P. bifasciatus* foi menor em 6h ( $F_{2,48} = 3,00$ ,  $p = 0,0044$ ) (FIGURA 6A) a 31°C em comparação 21°C, bem como variações ao longo do tempo em cada tratamento. As atividades de CAT (FIGURA 6B), GPx (FIGURA 6C), GR (FIGURA 6E) e GST (FIGURA 6F) e concentração de GSH (FIGURA 6D) nas brânquias não apresentaram diferença significativa na interação das variáveis independentes (tempo e temperatura). O biomarcador de dano LPO em *P. bifasciatus* mostrou maior concentração a 31°C em 2h ( $F_{2,47} = 4,59$ ,  $p = 0,035$ ) em relação a 21°C, porém em 24h ( $F_{2,47} = 5,55$ ,  $p = 0,0206$ ) e 48h ( $F_{2,47} = 9,28$ ,  $p = 0,003$ ) apresentou menor concentração em 31°C quando comparado ao controle, e houve diferenças entre os tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 6G. O biomarcador de dano PCO mostrou uma menor concentração em 24h ( $F_{2,49} = 7,57$ ,  $p = 0,0073$ ) e 48h ( $F_{2,49} = 18,80$ ,  $p < 0,001$ ) a 31°C quando comparada ao controle. Além disso, a PCO apresentou diferenças entre os tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 6H.

FIGURA 6 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NAS BRÂNKUIAS DE *Psalidodon bifasciatus*

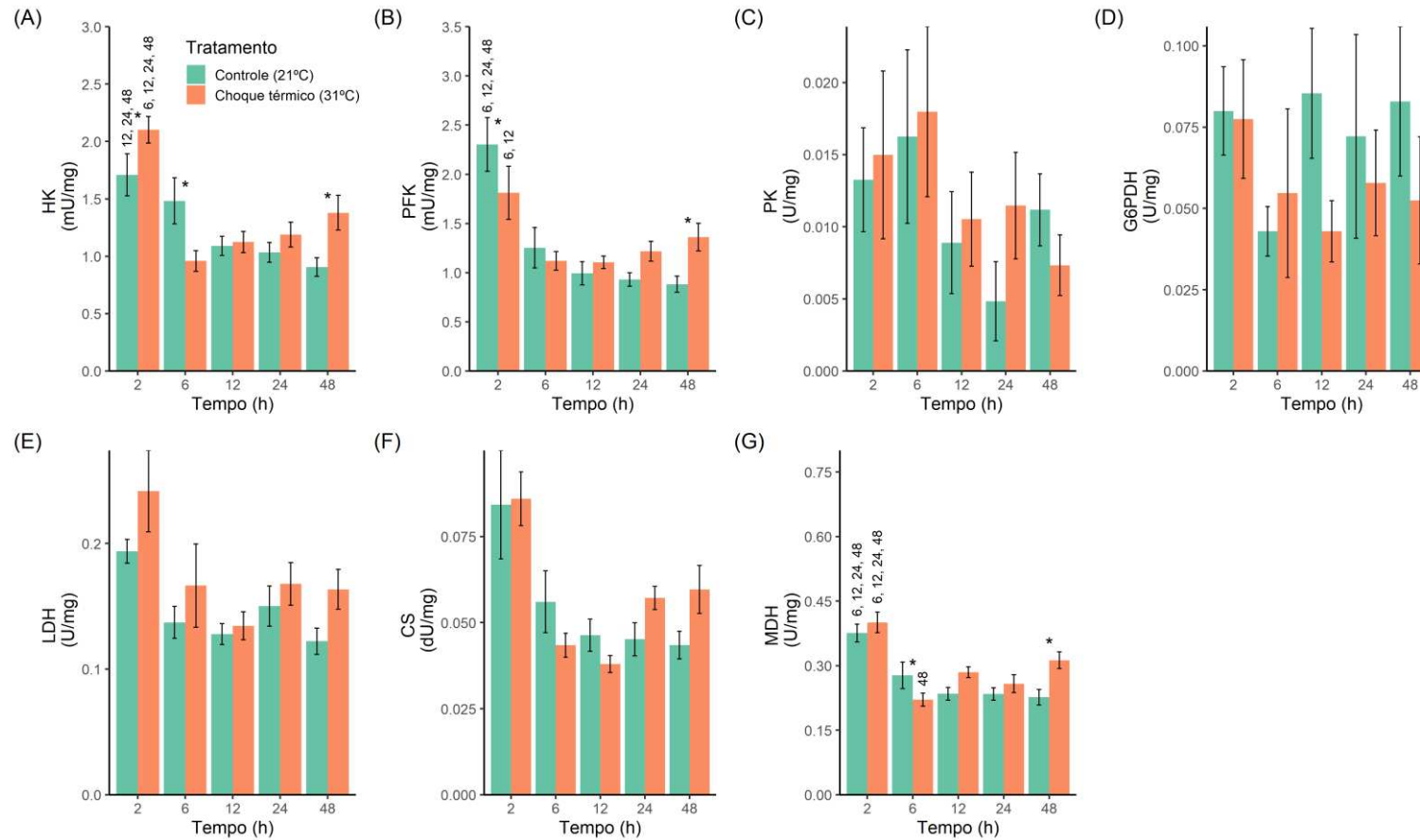


NOTA: Os asteriscos (\*) representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. Os números acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição dentro de cada condição experimental (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutatona peroxidase; GR - glutatona redutase; GST - glutatona-s-transferase. Tióis não-proteicos: GSH - glutatona reduzida. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação; PCO - carbonilação de proteínas.  
 FONTE: A autora, 2021.

### 3.1.2 BRÂNQUIAS – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS

A HK em *P. bifasciatus* apresentou maior atividade a 31°C em 2h ( $F_{2,47} = 4,60$ ,  $p = 0,034$ ) e 48h ( $F_{2,47} = 7,0$ ,  $p = 0,0093$ ) quando comparada à 21°C, enquanto em 6h ( $F_{2,47} = 8,63$ ,  $p = 0,0041$ ) à 31°C, a atividade foi menor quando comparada à 21°C, e apresentou variação entre os tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 7A. A atividade de PFK foi menor em 2h ( $F_{2,47} = 4,78$ ,  $p = 0,03$ ) à 31°C e maior em 48h ( $F_{2,47} = 4,76$ ,  $p = 0,03$ ) em comparação à 21°C, e apresentou variação entre os tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 7B. As atividades de PK (FIGURA 7C), G6PDH (FIGURA 7D), LDH (FIGURA 7E) e CS (FIGURA 7F) nas brânquias não apresentaram diferenças significativa na interação das variáveis independentes (tempo e temperatura). A atividade em MDH apresentou-se menor a 31°C em 6h ( $F_{2,47} = 4,22$ ,  $p = 0,0042$ ) quando comparada à 21°C, enquanto em 48h ( $F_{2,47} = 9,64$ ,  $p = 0,0025$ ) a atividade foi maior a 31°C quando comparada ao controle, e apresentou variação entre os tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que podem ser observadas na FIGURA 7G.

FIGURA 7 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NAS BRÂNQUIAS DE *Psalidodon bifasciatus*

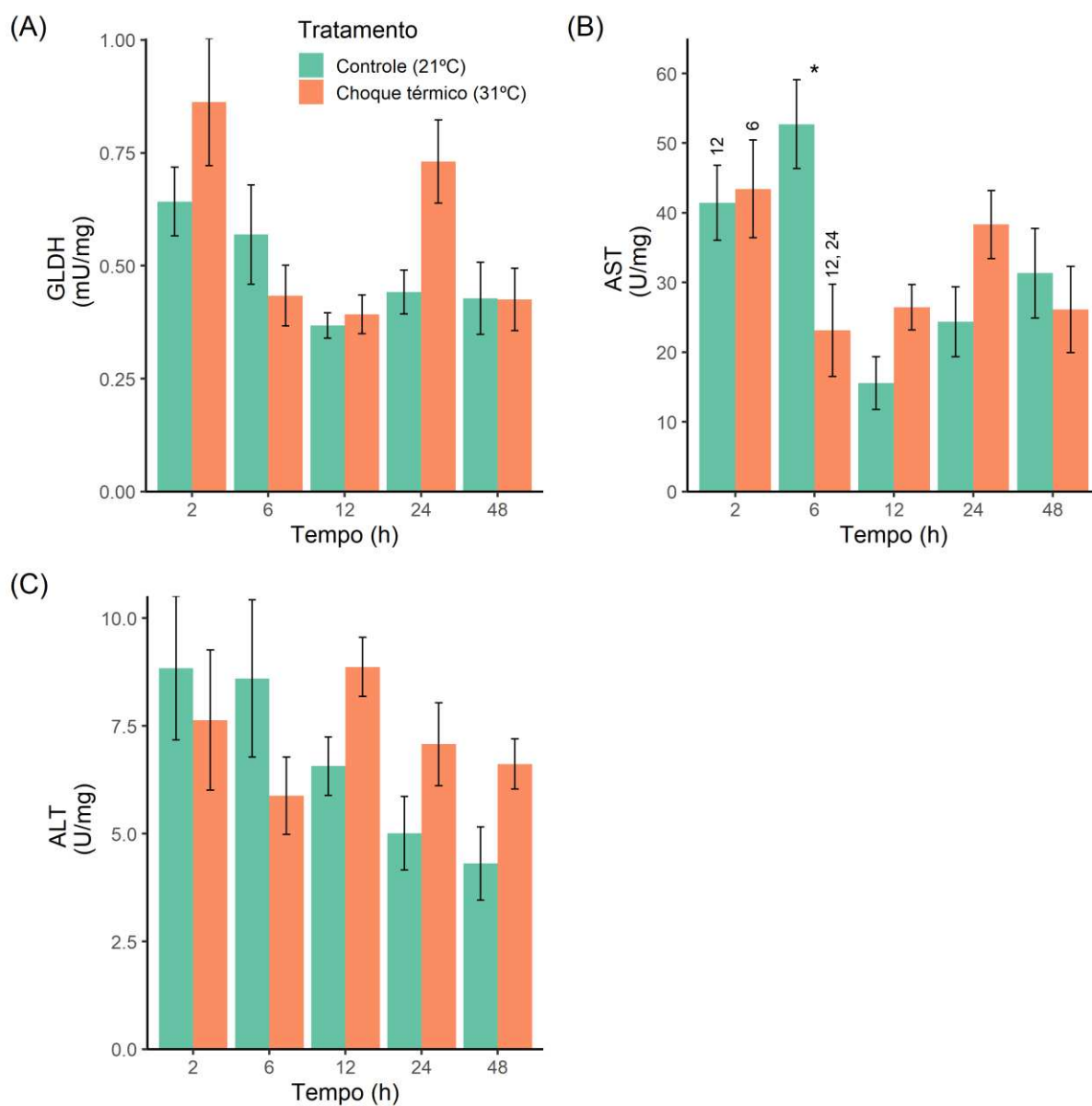


NOTA: Os asteriscos (\*) representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. Os números acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição dentro de cada condição experimental (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: HK – hexoquinase; PFK – fosfofrutoquinase; PK – piruvato quinase; G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase; LDH - lactato desidrogenase; CS – citrato sintase; MDH – malato desidrogenase. FONTE: A autora, 2021.

### 3.1.3 BRÂNQUIAS – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS

As atividades de GLDH (FIGURA 8A) e ALT (FIGURA 8C) nas brânquias de *P. bifasciatus* não apresentaram diferença significativa na interação das variáveis independentes. A única enzima do metabolismo energético de proteínas nas brânquias de *P. bifasciatus* que apresentou diferença significativa em sua atividade na interação das variáveis independentes (tempo e temperatura) foi AST no tempo de exposição de 6h ( $F_{2,48} = 9,64$ ,  $p = 0,00029$ ), que foi menor a 31°C em relação a 21°C, que também apresentou variação entre os tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 8B.

FIGURA 8 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NAS BRÂNKIAS DE *Psalidodon bifasciatus*



NOTA: Os asteriscos (\*) representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. Os números acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: GLDH – glutamato desidrogenase; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase. FONTE: A autora, 2021.

## 3.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO FÍGADO DE *Psalidodon bifasciatus*

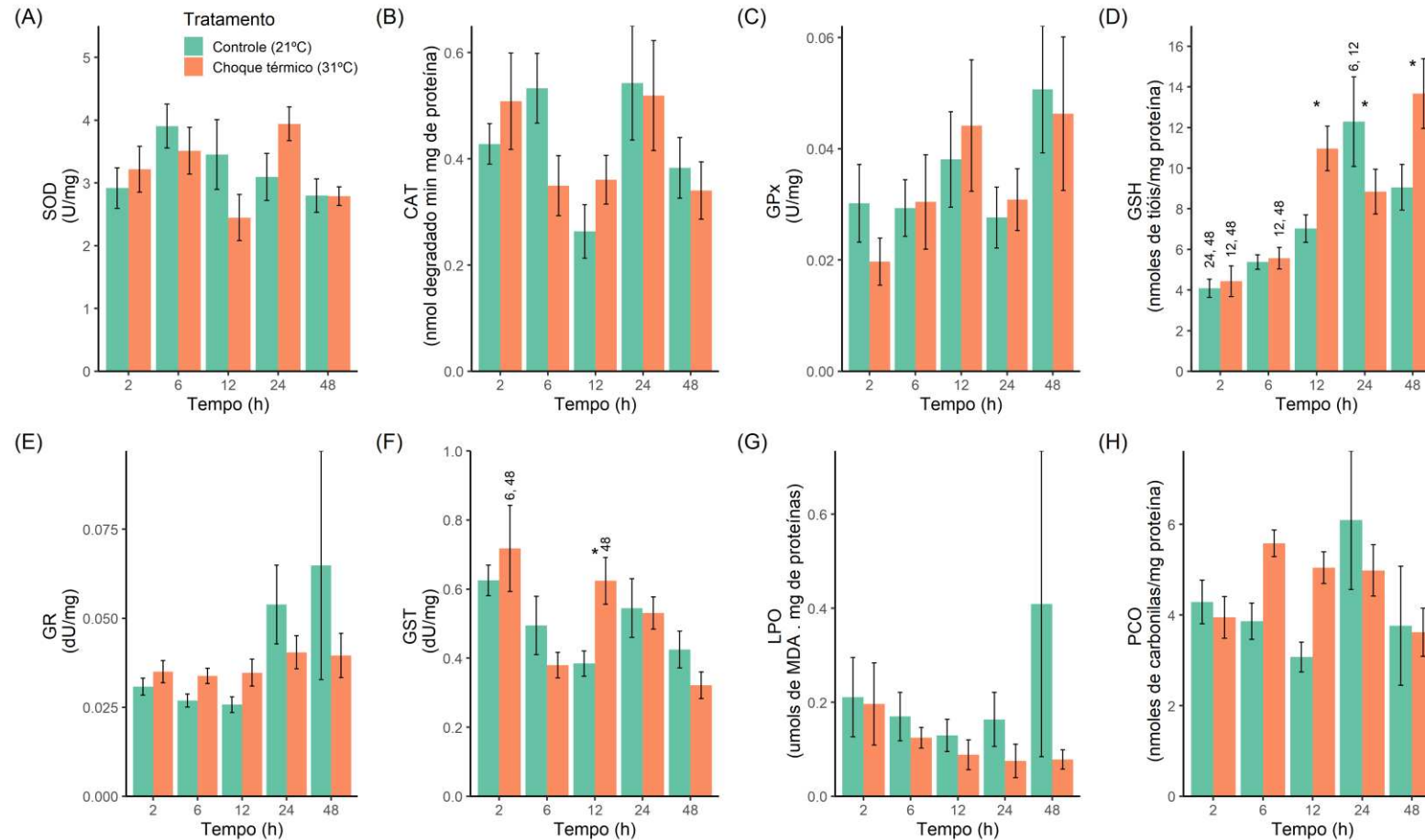
### 3.2.1 FÍGADO – BIOMARCADORES DE DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANO

As enzimas SOD (FIGURA 9A), CAT (FIGURA 9B), GPx (FIGURA 9C), GR (FIGURA 9E), e concentração de LPO (FIGURA 9G) e PCO (FIGURA 9H) no fígado de *P. bifasciatus* não apresentaram diferenças significativas na interação das variáveis independentes.

A concentração de GSH apresentou variação em 12h ( $F_{2,48} = 6,04$ ,  $p = 0,016$ ), 24h ( $F_{2,48} = 4,10$ ,  $p = 0,046$ ) e 48h ( $F_{2,48} = 7,85$ ,  $p = 0,0063$ ), sendo maior em 31°C para 12 e 48h com relação a 21°C e menor em 31°C em 24h com relação a 21°C, e apresentou variação ao longo dos tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 9D.

A GST (FIGURA 9F) no fígado de *P. bifasciatus* foi maior em 12h ( $F_{2,48} = 6,64$ ,  $p = 0,0116$ ) a 31°C em comparação a 21°C, e apresentou variação entre os tempos de exposição dentro de cada condição experimental.

FIGURA 9 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NO FÍGADO DE *Psalidodon bifasciatus*



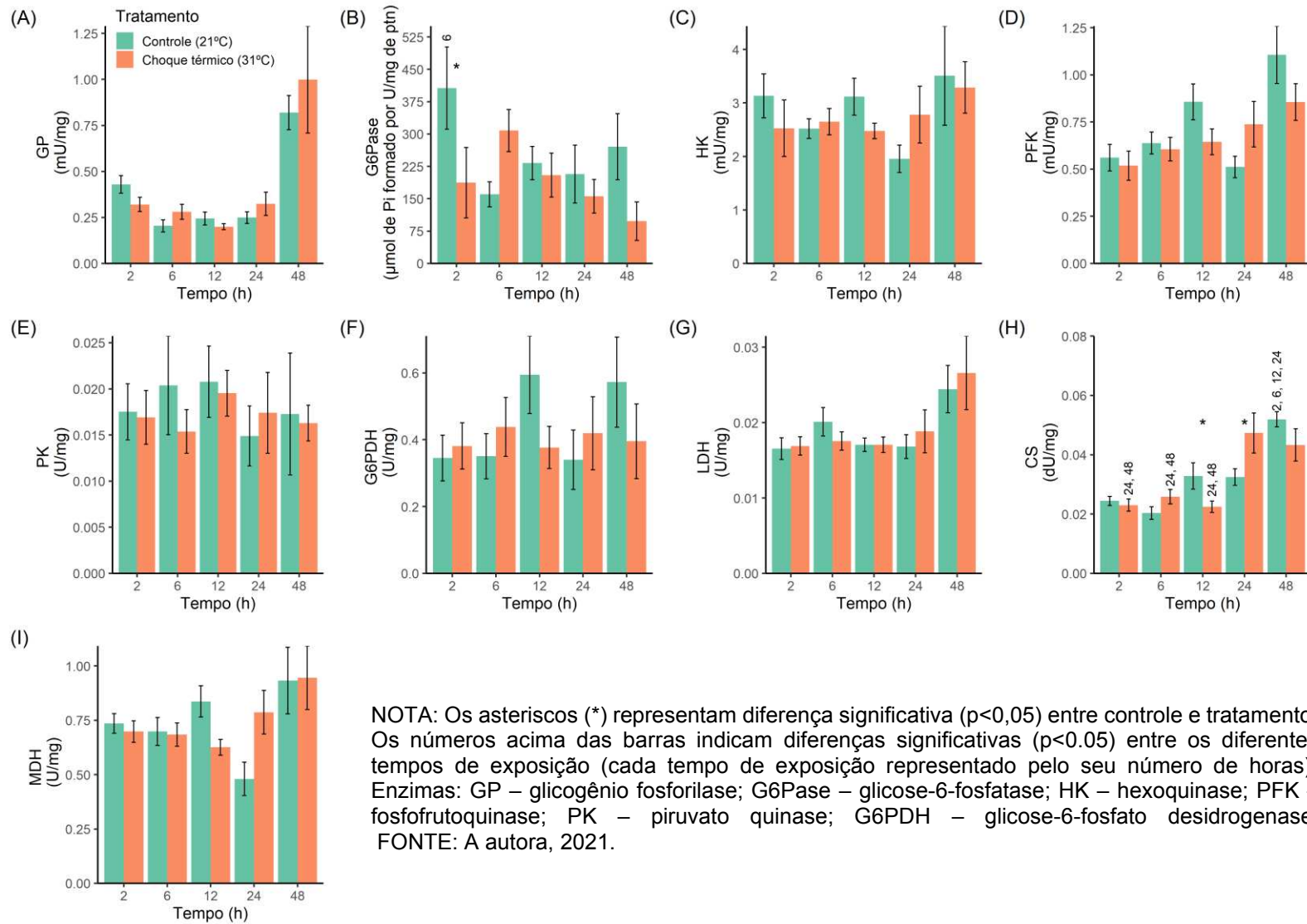
NOTA: Os asteriscos (\*) representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. Os números acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutathiona peroxidase; GR - glutathiona redutase; GST - glutathiona-s-transferase. Tióis não-proteicos: GSH - glutathiona reduzida. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação, PCO - carbolinção de proteínas. FONTE: A autora, 2021.

### 3.2.2 FÍGADO – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS

As enzimas GP (FIGURA 10A), HK (FIGURA 10C), PFK (FIGURA 10D), PK (FIGURA 10E), G6PDH (FIGURA 10F), LDH (FIGURA 10G) e MDH (FIGURA 10I) não apresentaram diferenças significativas na interação das variáveis independentes no fígado de *P. bifasciatus*.

A atividade de G6Pase foi menor em 2h ( $F_{2,49} = 5,86$ ,  $p = 0,017$ ) a 31°C em relação a 21°C, e variou ao longo dos tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 10B.

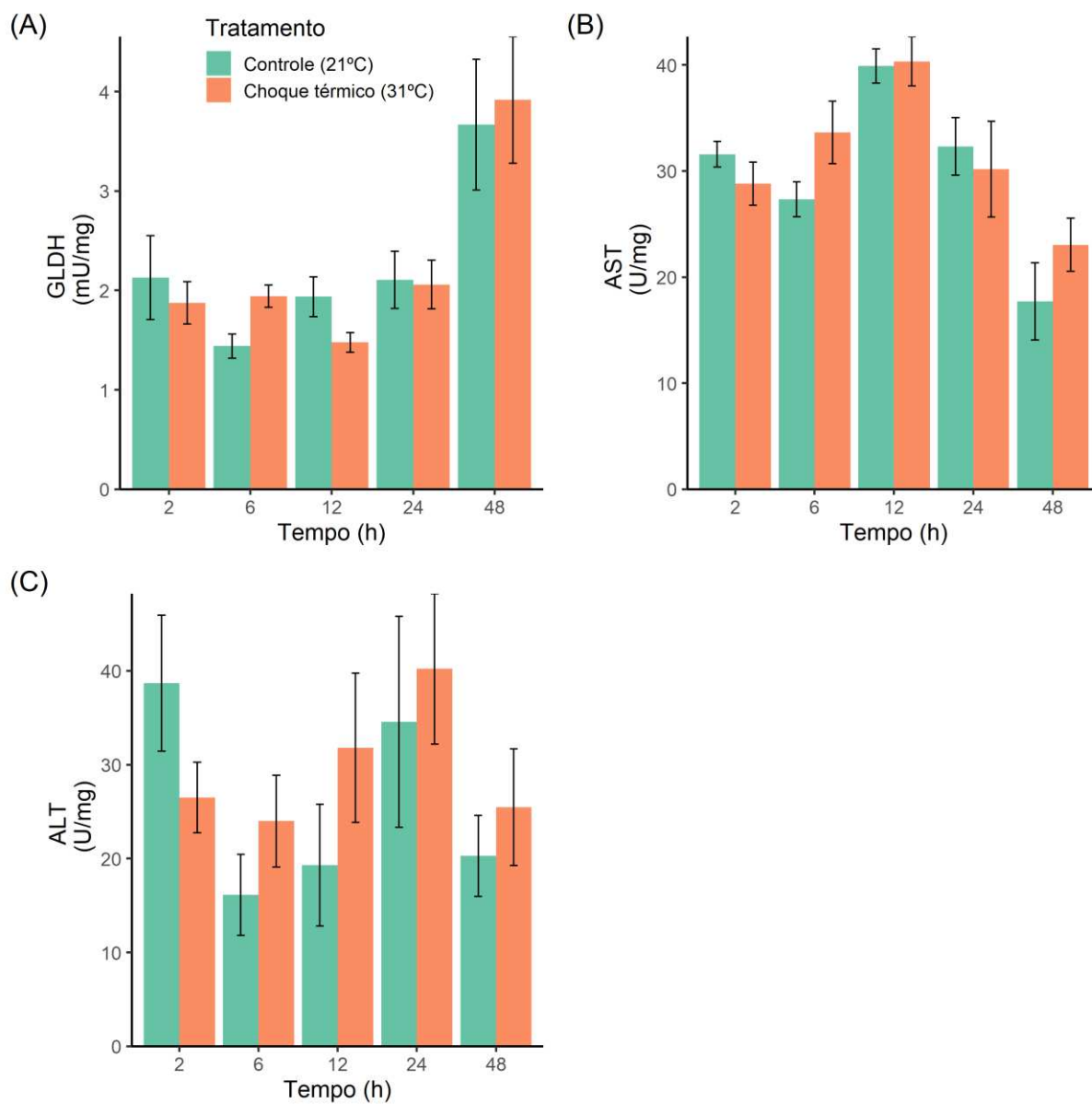
A CS apresentou menor atividade em 12h ( $F_{2,47} = 4,62$ ,  $p = 0,034$ ) e maior em 24h ( $F_{2,47} = 8,45$ ,  $p = 0,0046$ ) à 31°C em comparação a 21°C, e variou ao longo dos tempos de exposição dentro de cada condição experimental, como pode ser observado na FIGURA 10H.

FIGURA 10 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO FÍGADO DE *Psalidodon bifasciatus*

### **3.2.3 FÍGADO – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS**

Nenhuma enzima do metabolismo energético de proteínas apresentou alteração em relação a interação das variáveis independentes (tempo e temperatura) no fígado de *P. bifasciatus*.

FIGURA 11 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NO FÍGADO DE *Psalidodon bifasciatus*



NOTA: Os asteriscos (\*) representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. Os números acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: GLDH – glutamato desidrogenase; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase. FONTE: A autora, 2021.

### 3.3 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO RIM DE

#### *Psalidodon bifasciatus*

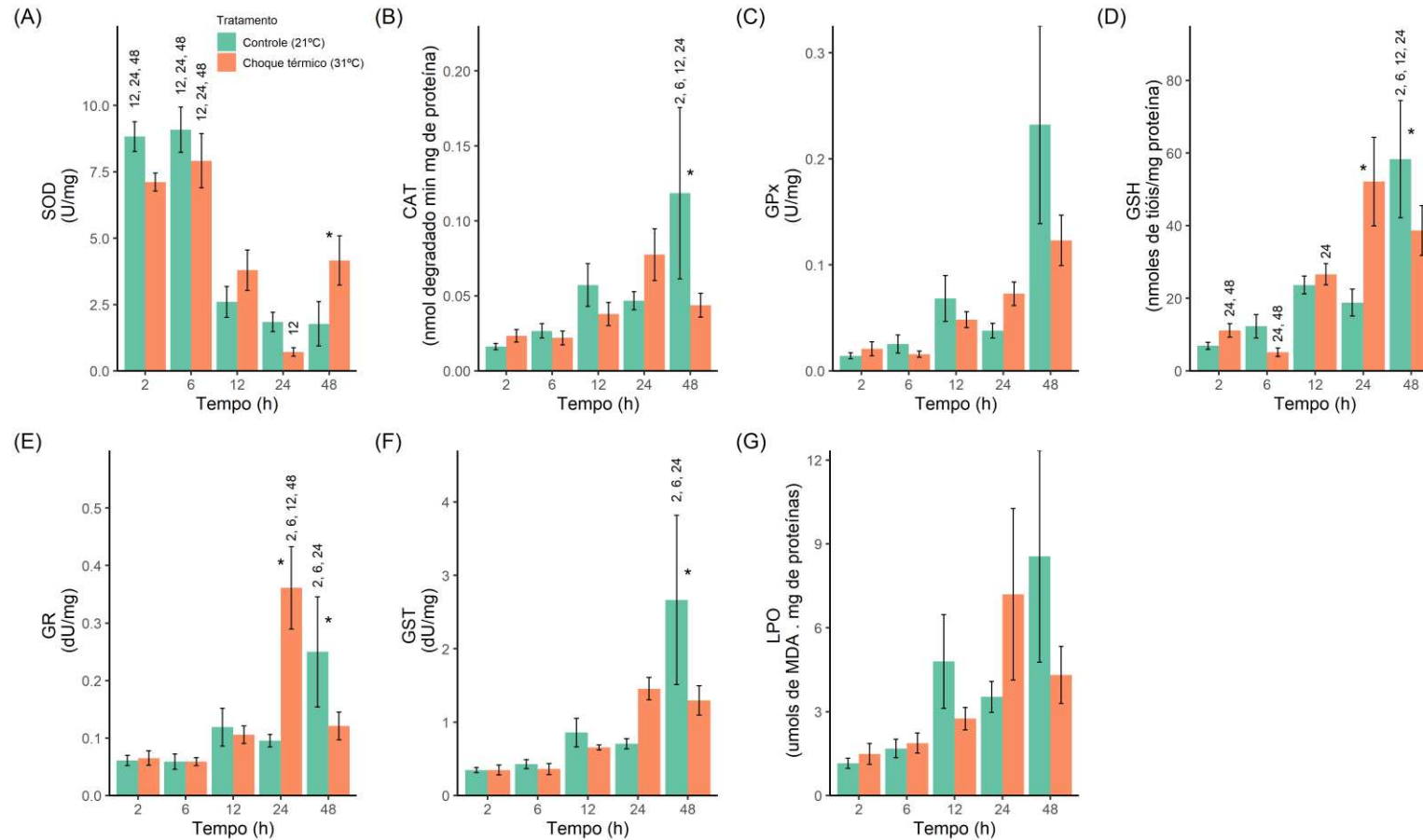
#### 3.3.1 RIM – BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANO

A SOD no rim de *P. bifasciatus* 48h apresentou maior atividade a 31°C em relação a 21°C ( $F_{2,49} = 5,11$ ,  $p = 0,026$ ) e apresentou variação ao longo dos tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 12A. Enquanto a CAT em 48h ( $F_{2,49} = 12,32$ ,  $p = 0,0007$ ) foi menor a 31°C em relação ao controle e apresentou variação ao longo dos tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 12B.

A atividade da enzima GPx (FIGURA 12C) e a concentração de LPO (FIGURA 12G) no rim não apresentaram diferenças significativas na interação das variáveis independentes.

A concentração de GSH apresentou maior atividade a 31°C quando comparada à 21°C em 24h ( $F_{2,47} = 15,17$ ,  $p = 0,0002$ ) e em 48h ( $F_{2,47} = 5,26$ ,  $p = 0,024$ ) a atividade foi menor a 31°C com relação a 21°C, e apresentou variação ao longo dos tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 12D. O mesmo comportamento pode ser observado na GR (FIGURA 12E) em 24 ( $F_{2,49} = 28,94$ ,  $p = <0,0001$ ) e 48h ( $F_{2,49} = 7,32$ ,  $p = 0,0084$ ), bem como a variação ao longo do tempo dentro de cada condição experimental. A GST em 48h ( $F_{2,49} = 10,43$ ,  $p = 0,0018$ ) apresentou maior atividade a 21°C com relação a 31°C e variou ao longo dos tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 12F.

FIGURA 12 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NO RIM DE *Psalidodon bifasciatus*



NOTA: Os asteriscos (\*) representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. Os números acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutatona peroxidase; GR - glutatona redutase; GST – glutatona-s-transferase. Tióis não-proteicos: GSH – glutatona reduzida. Medidores de dano: LPO – lipoperoxidação. FONTE: A autora, 2021.

### 3.3.2 RIM – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS

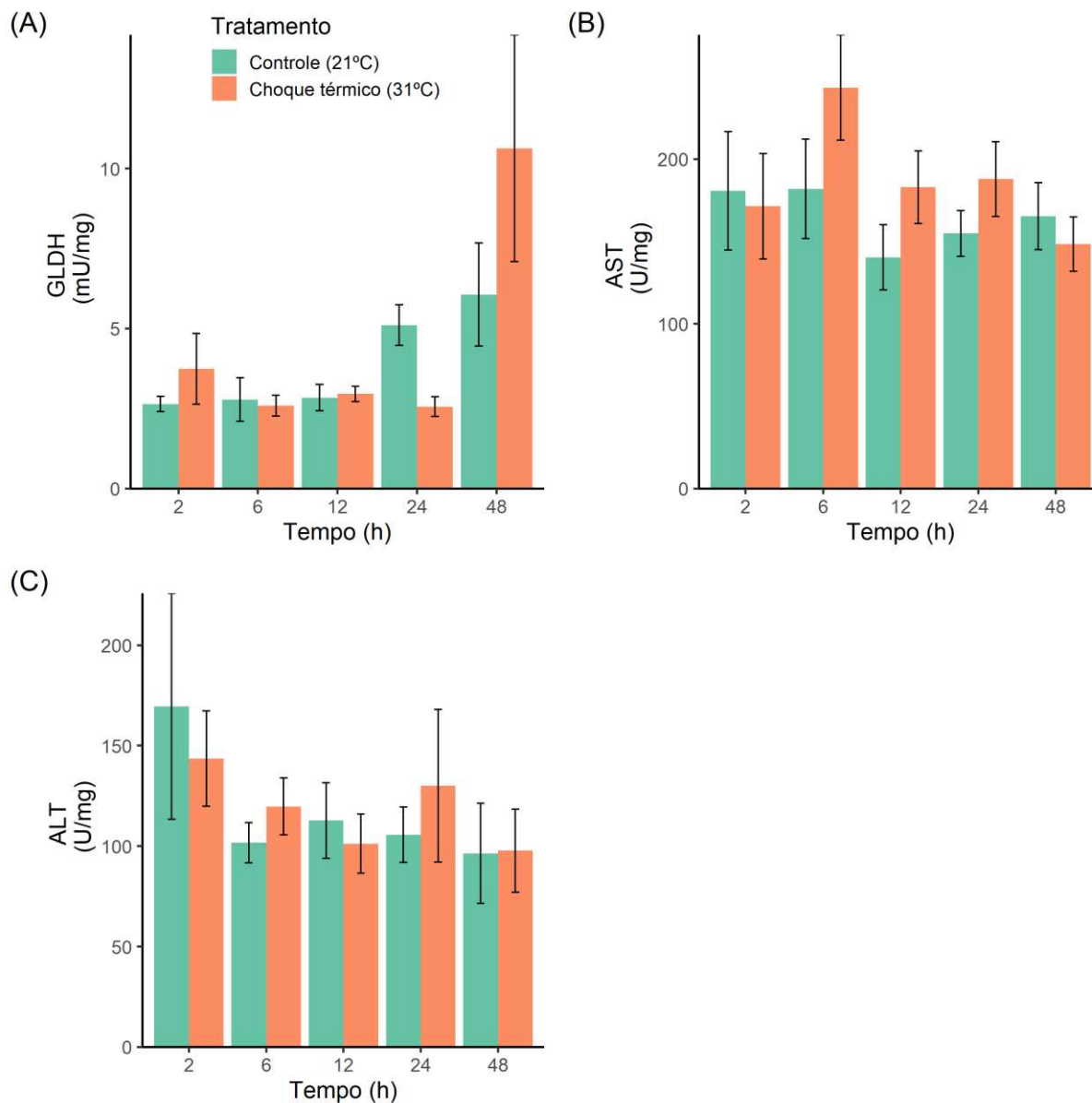
As atividades das enzimas G6Pase (FIGURA 13A), HK (FIGURA 13B), PFK (FIGURA 13C), PK (FIGURA 13D), LDH (FIGURA 13F), CS (FIGURA 13G) e MDH (FIGURA 13H) não apresentaram diferenças significativas na interação das variáveis independentes no rim de *P. bifasciatus*. A atividade de G6PDH foi maior em 48h ( $F_{2,48} = 25,09$ ,  $p < 0,05$ ) a 31°C em relação a 21°C e apresentou variação ao longo dos tempos de exposição dentro de cada condição experimental, que pode ser observado na FIGURA 13E.



### **3.3.3 RIM – BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS**

Nenhuma enzima do metabolismo energético de proteína apresentou alteração no rim de *P. bifasciatus*. A GLDH (FIGURA 14A) não apresentou diferenças significativas na interação das variáveis independentes (tempo e temperatura).

FIGURA 14 - ATIVIDADE DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NO RIM DE *Psalidodon bifasciatus*



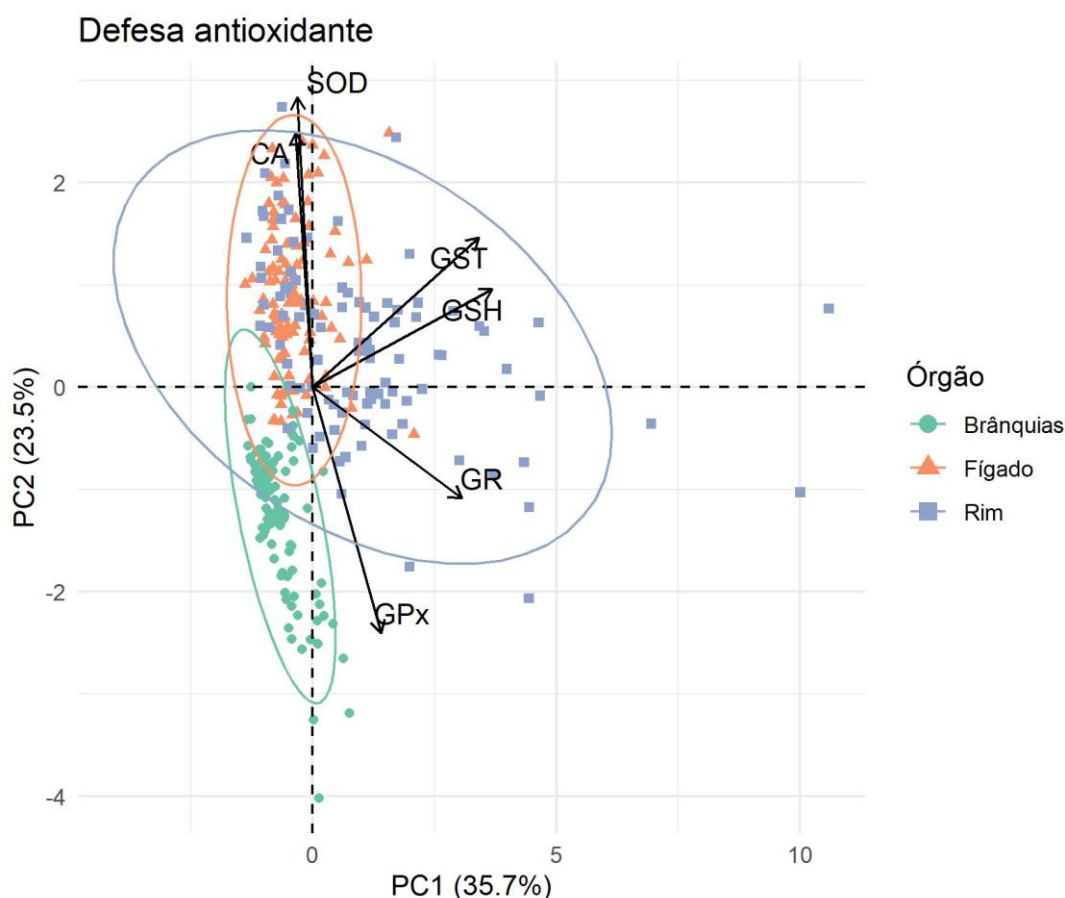
NOTA: Os asteriscos (\*) representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre controle e tratamento. Os números acima das barras indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diferentes tempos de exposição (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: GLDH – glutamato desidrogenase; AST – aspartato aminotransferase; ALT – alanina aminotransferase.  
 FONTE: A autora, 2021.

### 3.4 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM *Psalidodon bifasciatus*: VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS

#### 3.4.1 BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANO

Todos os biomarcadores avaliados associados ao sistema de defesa antioxidante em *P. bifasciatus* apresentaram diferença significativa entre os três órgãos ( $p < 0.05$ ). A diferença de enzimas antioxidantes entre brânquias, fígado e rim pode ser observada na FIGURA 15. O primeiro eixo da PCA explica 35,7% da variação entre os órgãos, representada pela enzima GST. O segundo eixo explica 23,5% da variação entre os órgãos, representada pela concentração de GSH. O terceiro eixo explica 17,4% da variação entre os órgãos, representado pela enzima GR. Juntos, os três primeiros eixos explicam 76,6% da diferença de respostas do sistema de defesa antioxidante entre os órgãos.

FIGURA 15 - BIPLLOT DE PCA DE ENZIMAS E CONCENTRAÇÃO DE GSH DO SISTEMA ANTIOXIDANTE NOS TRÊS ÓRGÃOS AVALIADOS



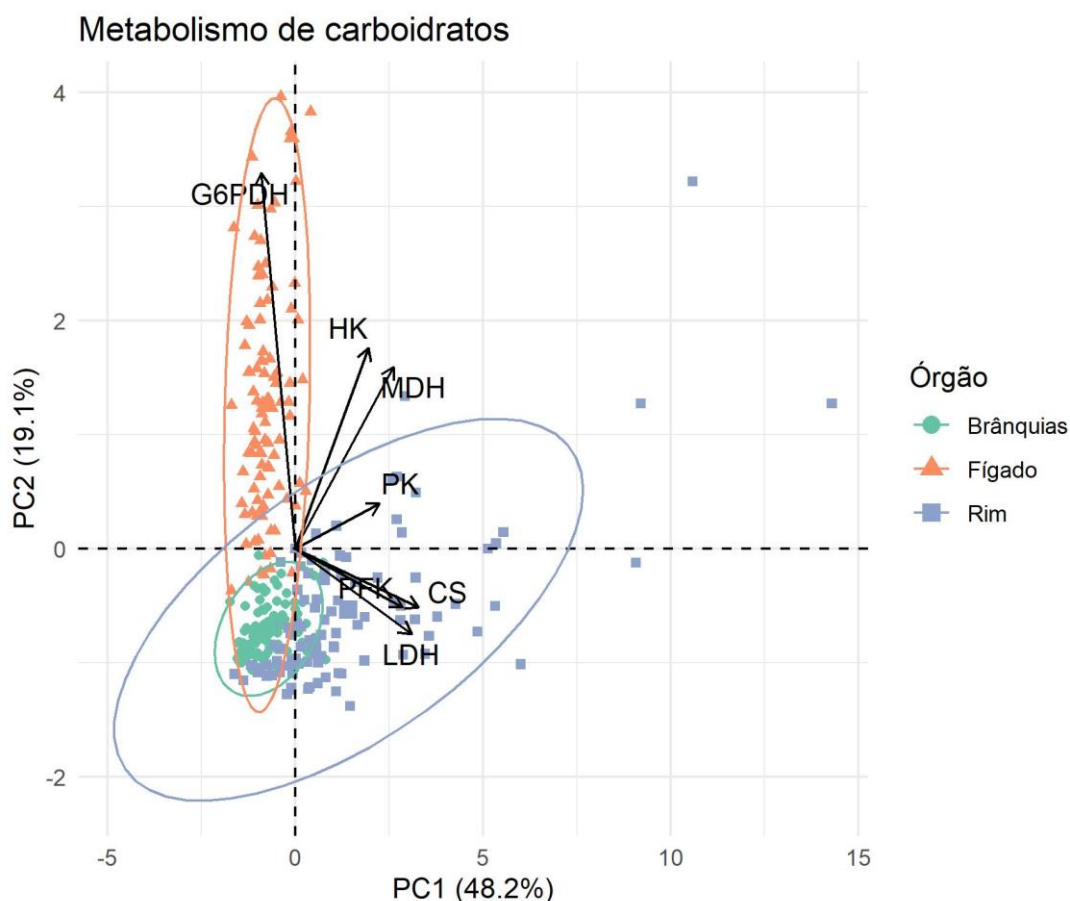
NOTA: Os valores das enzimas foram normalizados para essa análise multivariada devido à sua alta variação. As elipses foram demarcadas no intervalo de confiança de 95%.

FONTE: A autora, 2021.

### 3.4.2 BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE CARBOIDRATOS

Todos os biomarcadores avaliados do metabolismo energético de carboidratos em *P. bifasciatus* apresentaram diferença significativa entre os três órgãos ( $p < 0.05$ ). A diferença de enzimas do metabolismo de carboidrato entre brânquia, fígado e rim pode ser observada na FIGURA 16. O primeiro eixo da PCA explica 48,2% da variação entre os órgãos, representada pela enzima G6PDH. O segundo eixo explica 19,1% da variação entre os órgãos, representada pela enzima CS. O terceiro eixo explica 12,7% da variação entre os órgãos, representado pela enzima LDH. Juntos, os três primeiros eixos explicam 80% da diferença de respostas do metabolismo energético de carboidratos entre os órgãos.

FIGURA 16 - BIPLLOT DE PCA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NOS TRÊS ÓRGÃOS AVALIADOS



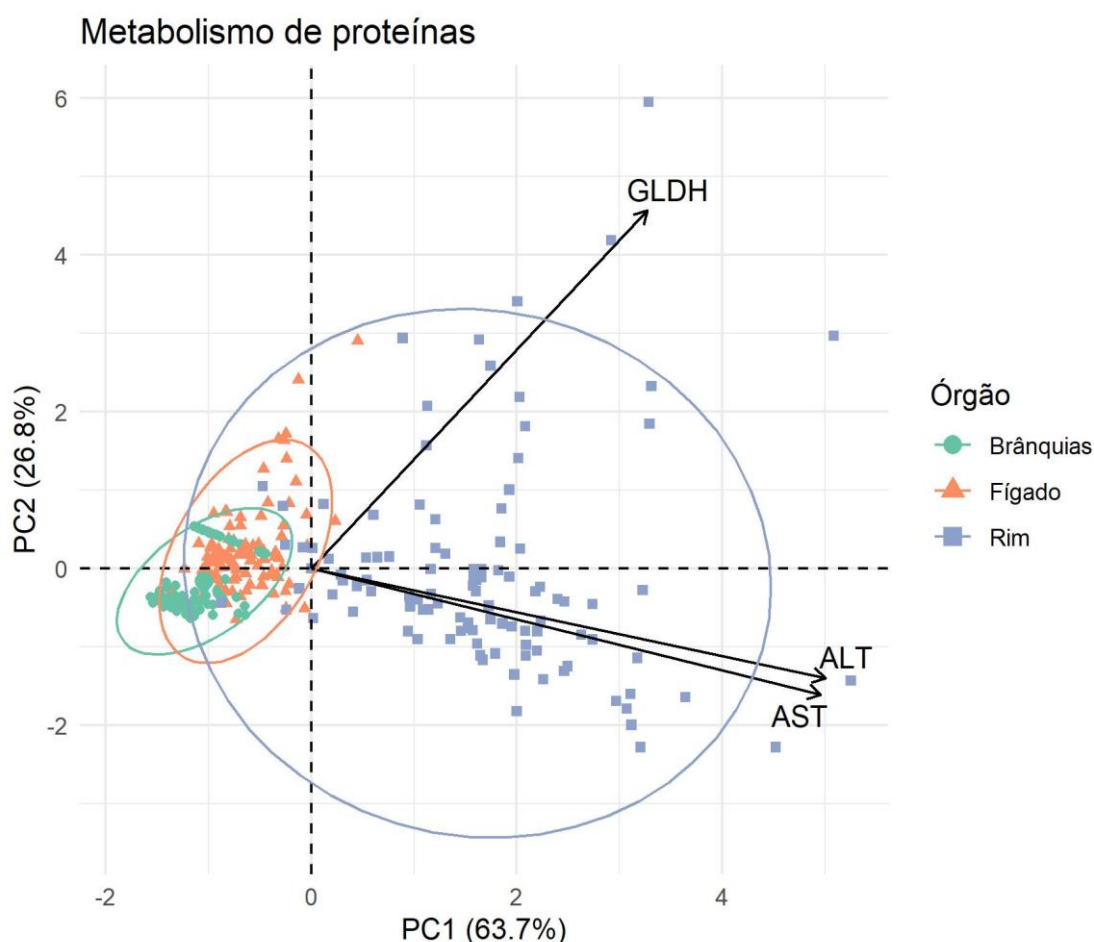
NOTA: Os valores das enzimas foram normalizados para essa análise multivariada devido à sua alta variação. As elipses foram demarcadas no intervalo de confiança de 95%.

FONTE: A autora, 2021.

### 3.4.3 BIOMARCADORES DO METABOLISMO ENERGÉTICO DE PROTEÍNAS

Todos os biomarcadores avaliados do metabolismo energético de proteínas em *P. bifasciatus* apresentaram diferença significativa entre os três órgãos ( $p < 0.05$ ). A diferença de enzimas do metabolismo de carboidrato entre brânquia, fígado e rim pode ser observada na FIGURA 17. O primeiro eixo da PCA explica 63,7% da variação entre os órgãos, representada pela enzima GLDH. O segundo eixo explica 26,8% da variação entre os órgãos, representada pela enzima AST. O terceiro eixo explica 9,5% da variação entre os órgãos, representado pela enzima ALT. Juntos, os três primeiros eixos explicam 100% da diferença de respostas do metabolismo energético de proteínas entre os órgãos.

FIGURA 17 - BIPLLOT DE PCA DE ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS NOS TRÊS ÓRGÃOS AVALIADOS



NOTA: Os valores das enzimas foram normalizados para essa análise multivariada devido à sua alta variação. As elipses foram demarcadas no intervalo de confiança de 95%.

FONTE: A autora, 2021.

## 4 DISCUSSÃO

Experimentos laboratoriais utilizando peixes têm fornecido um *insight* no potencial de resposta de indivíduos aos curtos e/ou longos estresses térmicos. Esses experimentos geram informações sobre a capacidade de resposta fisiológica de populações e espécies, principalmente sobre a sua plasticidade de adaptação e potencial de sobrevivência frente a mudanças nos regimes ambientais (OOMEN; HUTCHINGS, 2017).

Neste trabalho, algumas atividades enzimáticas de *P. bifasciatus* não foram moduladas frente ao estressor térmico, mostrando variação apenas ao longo do tempo de exposição. Os peixes foram alimentados diariamente durante a manhã por todo o período de aclimatação e experimentação, portanto, supõe-se que seu relógio interno se flexibilizou para o comportamento diurno, corroborado pela variação de resposta (i.e. aumento ou redução) na atividade enzimática que não variaram frente ao choque de temperatura, em sua grande maioria, durante o fotoperíodo de luz. O ritmo diário de atividade enzimática tem sido reportado de estar sob o controle circadiano, tanto no metabolismo energético de carboidratos e (HERNÁNDEZ-PEREZ et al. 2015, 2017), no metabolismo energético de proteínas (NAVARRO-GUILLÉN et al., 2017) quanto no sistema de defesa antioxidante (LAZADO et al. 2015; VERA; MIGAUD, 2016).

Os peixes exibem uma característica rítmica única, pois possuem um sistema circadiano flexível, que permite que alterem seu comportamento de diurno para noturno, e vice-versa, dependendo de fatores como o horário de alimentação (MADRID et al. 2001, LÓPEZ-OLMEDA et al. 2012). Esse comportamento também foi observado em um estudo feito por Hernández-Pérez et al. (2019) no fígado de *Oncorhynchus mykiss* onde houve a redução de atividades de enzimas do metabolismo energético de carboidrato frente à um estresse crônico, com variações diárias. Similarmente, outro estudo feito em brânquias de *Salmo salar* por Lazado et al. (2020) frente à estressores químicos foi mostrado a forte relação do sistema de defesa antioxidante e o ciclo circadiano.

#### 4.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NAS BRÂNQUIAS DE *Psalidodon bifasciatus*

Em peixes, as brânquias são responsáveis pela captação de  $O_2$  e conseqüentemente são um órgão chave no qual ajustes para manter a performance metabólica em temperaturas elevadas devem ser esperadas (BOWDEN et al. 2014). No sistema de defesa antioxidante, a SOD está geralmente entre as primeiras enzimas a agir contra o estresse oxidativo (CHANDRA et al., 2000; IGHODARO & AKINLOYE, 2018). É responsável pela dismutação do radical  $O_2$ , em  $H_2O_2$ , uma molécula menos prejudicial que é então decomposta pela CAT e GPx. As brânquias de *P. bifasciatus* apresentaram redução na atividade da SOD em 6h frente ao choque térmico porém sua atividade foi posteriormente reestabelecida. Esse padrão também foi reportado por Lushchak et al. (2006b) na SOD no cérebro, CAT e GPx no fígado e G6PDH no rim de *Carassius auratus (goldfish)* em ensaios de choque térmico. Os autores sugerem que este comportamento pode estar relacionado a inativação térmica que ocorreu inicialmente ao longo do tempo de exposição e conseqüentemente à síntese de novas moléculas devido a regulação ascendente do sistema de defesa antioxidante, e a mesma situação pode ter ocorrido com *P. bifasciatus* frente o choque térmico.

Também foi observado em *P. bifasciatus* o aumento de LPO em 2h, seguido de uma redução de sua atividade em 24h e 48h. Em um estudo realizado por Cui et al. (2014) avaliando estresse térmico em células hepáticas de *Ctenopharyngodon idellus*, os autores verificaram aumento na concentração de LPO seguida de redução na atividade de SOD depois da hipertermia, e consideraram que poderia estar havendo um déficit em alguns componentes do sistema de defesa antioxidante. Em outro estudo, realizado por Madeira et al. (2017) que avalia o estresse térmico em dois peixes tropicais, *Abudefduf saxatilis* e *Scartella cristata*, também foi observado aumento inicial na concentração de LPO nas brânquias das duas espécies, porém, diferentemente do presente trabalho, não foi observada redução de sua concentração no último tempo de exposição avaliado. O aumento inicial da concentração de LPO pode estar relacionado às alterações fisiológicas iniciais de resposta ao estresse, que apesar de não terem sido suficientes para desencadear aumento de resposta das enzimas antioxidante nas brânquias de *P. bifasciatus*, comprova o estado de estresse oxidativo naquele momento. O padrão de redução dos níveis de LPO foi observado

por Rossi et al. (2017) em brânquias de *Hoplosternum littorale* após 21 dias frente a aclimação térmica de 33°C. Segundo as autoras, essa redução pode indicar que mecanismos de degradação de lipídios danificados estão ocorrendo (ROSSI et al., 2017), visto que sinais de estresse podem desencadear mecanismos de reparo (CUI et al., 2014).

As brânquias de *P. bifasciatus* também apresentaram redução na concentração de PCO. Em um estudo feito por Madeira et al. 2016 com aclimação térmica de alta temperatura em larvas de *Spaurus aurata*, a PCO reduziu drasticamente em altas temperaturas e os autores sugerem que isso pode ter ocorrido pois o dano oxidativo estava sendo contrabalanceado com a ativação das enzimas do sistema de defesa antioxidante, visto que a redução de oxidação proteica está relacionada a aumentos em funções fisiológicas (LEBLANC et al. 2012). No entanto, não foi isso que ocorreu no presente estudo. As enzimas CAT, GPx, GR, GST e o tióis (GSH) em *P. bifasciatus* não apresentaram alteração em sua atividade e concentração frente ao choque térmico. Alguns autores sugerem que o aumento de temperatura pode resultar em um aumento do estado reativo de enzimas, e que esse aumento pode ser suficiente para metabolizar EROs, sem que a síntese *de novo* das enzimas precise ocorrer (ALMROTH et al., 2015; ROSSI et al. 2017). Sugere-se que esse padrão pode ter ocorrido nas brânquias de *P. bifasciatus* em 24h e 48h de exposição ao choque térmico.

Em enzimas do metabolismo energético de carboidrato deste estudo, ocorreu um aumento na atividade de HK em 2h seguida de redução em 6h, e redução de PFK em 2h com posterior aumento de sua atividade em 48h nas brânquias frente ao choque térmico de alta temperatura. O aumento da atividade de HK e a concomitante redução da atividade de PFK em 2h pode indicar a ativação da via Pentose Fosfato, uma rota alternativa de catabolismo de glicose, na primeira resposta frente ao choque térmico nas brânquias de *P. bifasciatus* mesmo que a G6PDH não tenha mostrado aumento de atividade. Visto que é comum em células que são constantemente expostas a EROs ativar a via das pentoses afim de gerar grandes quantidades de NADPH necessária para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo (NELSON; COX, 2017). Isso foi observado em um estudo realizado por Wen et al. (2018) em brânquias de *Symphysodon aequifasciatus* frente a choque térmico de baixa temperatura e por Abdel-Tawwab & Wafeek (2017) no fígado de *Oreochromis niloticus* que apresentou predominância da via pentose fosfato frente à altas

temperaturas. A diminuição da atividade da HK em 6h pode estar relacionada com o acúmulo de glicose-6-fosfato, que é o próprio produto de HK que inibe sua atividade de através de um feedback negativo de regulação. Ademais, HK detecta a disponibilidade de glicose através da regulação para utilizar como umnexo crítico de integração do estado metabólico, garantindo a homeostase e fornecimento energético (TAN & MIYAMOTO, 2015).

O aumento na atividade de PFK nas brânquias em 48h pode indicar a necessidade de adenosina 5'-trifosfato (ATP) devido ao estresse causado pela temperatura nesse tempo de exposição. A PFK aumenta sua atividade sempre que o suprimento de ATP da célula é comprometido devido à um aumento de demanda de oxigênio em situações de estresse, como pode ser observado para altas temperaturas (ABELE et al. 1998; GUILLEN et al. 2019). Em um estudo realizado no peixe antártico *Notothenia rossi* por Guillen et al. (2019) foi identificado que quando submetidos à aumentos graduais de temperatura, a atividade de PFK aumentou também em tempos tardios nas brânquias. O concomitante aumento de HK também em 48h indica que a glicólise aumentou seu potencial para gerar substrato para o ciclo de Krebs ou fermentação, indicando aumento da glicólise e respiração celular, corroborado pelo aumento de MDH no mesmo horário.

Em peixes, os aminoácidos constituem um dos maiores substratos de produção de energia, que são derivados ou da dieta ou da quebra de tecidos de proteína (BEVER et al. 1981; JIA et al. 2017; YANG et al. 2020). A transaminação ou deaminação de aminoácidos facilita a via de gliconeogênese. (DALVI et al., 2017). Portanto, uma mobilização de aspartato e alanina pela gliconeogênese para produção de glicose para cooperar com o estresse era esperado. No entanto, as brânquias de *P. bifasciatus* não apresentaram aumento na atividade de ALT e GLDH frente ao choque térmico e em 6h de exposição houve redução da atividade de AST, concomitante com a redução da atividade de MDH. Isso pode ter ocorrido devido a função de MDH no ciclo de TCA na conversão de oxalacetato, o subproduto da transaminação de aspartato para piruvato no citoplasma, que posteriormente é utilizado como substrato para a gliconeogênese (CHATTERJEE et al. 2006; KUMAR et al. 2012). No último tempo de exposição avaliado (48h) houve um aumento na atividade de MDH frente ao choque térmico. A MDH pode ser citosólica, sendo importante na gliconeogênese, lipogênese e na lançadeira de malato-aspartato, ou mitocondrial, atuando no ciclo do TCA (BASAGLIA, 1989; RIBEIRO et al., 2015).

BEECKMANS & KANAREK (2005) observaram que quando havia aumento de AST, o oxaloacetato era desviado para lançadeira de malato-aspartato, e quando ocorria o aumento de CS o oxaloacetato era desviado para o ciclo do TCA. O aumento de MDH sem o aumento concomitante de AST pode, então, indicar maior utilização do produto do ciclo do ácido cítrico para produção de energia requerida para outras atividades fisiológicas, mesmo que a CS não tenha se alterado. Esse comportamento em MDH também foi observado por Dalvi et al. (2017) em um estudo no fígado de *Horabagrus brachysoma* submetidos a aumentos de temperatura. Similarmente, Kumar et al. (2012) também encontrou elevadas atividades de MDH em *Labeo rohita* devido ao estresse térmico, e citou que uma alta atividade de MDH indica maior atividade do ciclo de TCA devido à altas demandas de energia.

#### **4.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO FÍGADO DE *Psalidodon bifasciatus***

O fígado possui extrema importância em ajustes metabólicos frente a estressores, como tem sido observado em estudos de estresse térmico de alta temperatura (PUROHIT et al. 2014; AKBARZADEH; LEDER, 2016; GALLANT et al. 2017). Peixes possuem tanto defesas antioxidantes enzimáticas quanto defesas não enzimáticas frente ao estresse oxidativo, e dentre as não enzimáticas, GSH é um dos maiores reguladores do estado de redox intracelular e tem papel essencial em neutralizar EROS e LPO geradas no meio intracelular (ARRIGO, 1999; NAKANO et al. 2014). No presente estudo, foi observado alta concentração de glutatona reduzida no fígado de *P. bifasciatus* submetido ao choque térmico nos tempos de exposição de 12 e 48h à 31°C, devido a sua síntese *de novo*. A GSH é oxidada em GSSG, e GR catalisa a regeneração de GSH a partir de GSSG usando NADPH como doador de elétron, sua síntese *de novo* parece ter sido ativada pelo aumento na atividade de GST (LUSHCHAK et al., 2006<sup>a</sup>; MCCARTHY, 2014, SUN et al., 2020). No entanto, houve redução de GSH no tempo de 24h, que pode ser explicada pelo fato de que o fígado é a principal fonte de glutatona em vertebrados (HERMES-LIMA, 2004; NAKANO et al. 2014), e pode ter sido reduzida nesse tempo devido ao fornecimento de GSH para outros órgãos. Esse comportamento foi observado por Nakano et al. (2014) em *Oncorhynchus kisutch* (salmão) frente ao choque térmico de alta temperatura, no qual os autores sugerem que os níveis de glutatona foram

reestabelecidos em plasma e outros órgãos devido à síntese e transporte a partir do fígado.

Dentre as enzimas antioxidantes, GSTs são uma super família multigênica de enzimas diméricas e estão envolvidas na detoxificação de poluentes e componentes endógenos reativos do metabolismo celular. Certas isoenzimas de GST podem agir a fim de conjugar metabólitos que surgem a partir de danos oxidativos e tem a habilidade de reduzir hidroperóxidos lipídicos (REGOLI et al., 2011), o que também pode explicar o fato de não ter ocorrido aumento de LPO no fígado de *P. bifasciatus*. A ativação dessa enzima sugere um incremento na capacidade de *P. bifasciatus* de suportar estresse oxidativo em 12h de exposição ao choque térmico, corroborado pelo concomitante aumento de GSH em 12h que garantiu o aumento de GST. Isso também foi sugerido por Madeira et al. (2016a) sobre o aumento de GST no fígado de *Sparus aurata* frente a aclimatação térmica à 34°C. Hassan et al. (2017) avaliaram expressões de enzimas frente ao estresse térmico sazonal em *Oreochromis niloticus*, e verificaram que no verão à 36°C os peixes apresentaram um aumento na atividade de GST no fígado quando comparado com o inverno à 14°C. Os autores sugerem que esse aumento é um ajuste de defesa antioxidante presente em peixes subtropicais em áreas com uma ampla variação de temperatura (AMADO et al., 2006; CARVALHO-NETA 2013).

Os resultados do presente estudo mostram que as enzimas HK, PFK, PK e G6PDH não se alteraram no fígado de *P. bifasciatus* frente ao choque térmico. O fato de que o potencial glicolítico no fígado não se alterou corrobora com o papel principal do fígado em respostas frente à um estresse agudo, que é mobilizar glicose rapidamente para ser exportada para a corrente sanguínea para ser usada em outros tecidos ao invés de ser usada *in situ*, como foi observado por Lopez-Patino et al. (2014) em enzimas da via da glicólise no fígado de *Oncorhynchus mykiss* (*rainbow trout*) após um curto período de choque térmico de alta temperatura.

No fígado, a degradação e síntese de glicogênio tem papel essencial em regular a glicose do sangue e suprir energia para outros tecidos. O catabolismo de glicogênio ocorre através da ação GP, que fornece glicose para energia requerida pelos organismos (VORNANEN; HAVERINEN, 2011; POLAKOF et al., 2012). No presente estudo, a GP no fígado não apresentou diferenças em sua atividade frente ao choque térmico. A estabilidade na atividade dessa enzima pode estar relacionada à uma maior tolerância da espécie a variações de temperatura, como foi observado

no fígado de *Chanos chanos* (*milkfish*) frente à uma aclimatação térmica para baixa temperatura por Chang et al. (2018).

A G6Pase, enzima utilizada para avaliar a capacidade exportadora de glicose do fígado para outros tecidos, reduziu no tempo de 2h de exposição frente ao choque térmico no fígado de *P. bifasciatus*. Apesar de carboidratos não serem a principal fonte de energia de peixes (WILSON 1994; REN et al. 2015), a redução de G6Pase no período inicial de choque térmico à alta temperatura pode indicar uma redução do potencial gliconeogênico que pode levar à uma redução na demanda de metabólitos de não-carboidratos, como proteínas, e conseqüentemente uma mobilização de fontes de carboidrato para produção de glicose (LEUNG; WOO, 2012), que servem como fonte de energia instantânea durante condições de estresse agudo (JAVED; USMANI, 2015). O contrário foi observado por Dalvi et al. (2017), em maiores temperaturas de aclimatação para *Horabagrus brachysoma*, houve aumento na atividade de G6Pase e frutose 1,6-bisfosfatase (FBpase), que indica maior uso da via de gliconeogênese, e os autores sugerem que a principal fonte de energia para *H. brachysoma* foram aminoácidos. No entanto, essa divergência pode ter ocorrido pois a habilidade de utilizar fontes de carboidrato varia entre espécies de peixes e pode ser afetada pela diferença na quantidade e fonte de carboidrato na dieta (NRC, 2011; REN et al., 2015).

Carboidratos são as formas de energia menos custosas para se utilizar em animais, e peixes de água quente são capazes de utilizar maiores níveis de carboidratos provenientes da dieta, no entanto, a utilização dos mesmos por peixes pode variar e permanece indefinida (WILSON 1994; REN et al., 2015). A LDH é a enzima inicial da via anaeróbica em qual reversivelmente converte piruvato em lactato e está envolvida também na gliconeogênese no fígado. É considerada um bom indicador de estresse pois geralmente sua atividade aumenta frente à um estressor (MOON; FOSTER, 1995; DALVI et al., 2017). Enquanto a LDH tem função no metabolismo anaeróbico, a CS é usada no metabolismo aeróbico e, portanto, essas enzimas tendem a estar inversamente relacionadas, geralmente quando uma está mais ativa a outra estará menos (ORREGO et al., 2011, CAMPOS et al., 2017).

A CS é a primeira enzima no ciclo do TCA, localizada no citoplasma da mitocôndria, utilizada como um biomarcador enzimático para o conteúdo de capacidade aeróbica da mitocôndria e produção de energia (KONRADT; BRAUNBECK, 2001; TUGIYONO; GAGNON, 2002), tem função de catalisar a conversão de oxalacetato em citrato. A redução em 12h da atividade de CS no fígado

de *P. bifasciatus* pode indicar condição anaeróbica à nível celular, apesar de não ter ocorrido concomitante aumento na atividade de LDH. Em um estudo realizado em *Squalius carolitertii* por Jesus et al. (2018) foi observado que frente ao choque térmico e acidificação, houve aumento da atividade de LDH e redução da atividade de CS. Os autores sugerem que a atividade de LDH aumentou para compensar o aumento da taxa metabólica devido ao aumento de temperatura, visto que a atividade de LDH geralmente aumenta frente a condições de estresse e a atividade de CS diminui quando o oxigênio está escasso (CAMPOS et al., 2017). No fígado, o metabolismo aeróbico é predominante (HINTON et al. 2009), então, no tempo de 24h de exposição, quando houve um aumento na atividade de CS em *P. bifasciatus*, sugere-se uma compensação de recuperação pela redução inicial e maior utilização tardia do metabolismo aeróbico. Orrego et al. (2011) observaram um comportamento diferente (i. e. aumento de LDH e não alteração de CS) no fígado de *Oncorhynchus mykiss* submetidos à anoxia e os autores sugerem um aumento na taxa de glicólise devido às limitações de oxigênio, como em situações de estresse.

Apesar de serem diferentes condições, a resposta de aumento de LDH pode não ser viável em um período mais longo de choque térmico agudo, visto que o metabolismo anaeróbico requer um número finito de substratos fermentados e pode gerar toxicidade (ROSA et al., 2016). Portanto, a resposta de *P. bifasciatus* em CS em 24h frente ao choque térmico parece ser capaz de manter a homeostase a longo prazo, devido a ativação da via metabólica aeróbica ao invés da anaeróbica. Similarmente, Campos et al. (2019) analisaram peixes amazônicos em diferentes cenários de mudanças climáticas e observaram que *Hyphessobrychon melazonatus* também aumentou a oxidação aeróbica no músculo (detectado pelo aumento da atividade de CS) frente ao aumento de temperatura, porém outras duas espécies avaliadas não mostraram esse comportamento. Os autores sugerem que essa divergência em respostas enzimáticas para suprir a demanda energética pode estar firmemente relacionada ao estilo de vida e comportamento natatório do peixe.

Diferente de animais terrestres, os peixes são eficientes em utilizar fontes diferentes de carboidrato para produção de energia (MOON; FOSTER, 1995), como aminoácidos, que constituem um dos maiores substratos para produção de energia em peixes (BEVER et al., 1981; DALVI et al. 2017). A importante função de GLDH é de transferir o grupo amino dos aminoácidos para  $\alpha$ -cetoglutarato para produzir glutamato. A oxidação de glutamato no ciclo do TCA gera um aumento de energia,

apesar de pequeno (NAVEED et al. 2010). Hari & Neeraja (2011) avaliaram a atividade de GLDH no fígado de *Cyprinus carpio* frente a amônia como estressor, e observaram um aumento em sua atividade, que os autores assumem ter ocorrido devido ao fato da GLDH ajudar em fornecer cetoácidos para o ciclo de TCA para compensar a crise energética frente ao estressor. Madeira et al. (2017) observaram no teleósteo *Sparus aurata* que após o 21º dia frente à onda de calor os peixes apresentaram uma redução na atividade de GLDH, e os autores sugerem que essa redução está relacionada à ativação de diferentes vias para suprir a demanda energética. Diferentemente, no presente estudo não houve alterações na atividade enzimática de GLDH. Isso pode ter ocorrido porque exposições à altas temperaturas induzem um desvio metabólico em direção ao metabolismo de carboidratos e a formação de depósitos de glicogênio, como sugerem alguns estudos (BRODTE et al., 2006; WINDISCH et al., 2011, 2014; MADEIRA et al. 2017).

Várias descobertas indicam que estressores ambientais podem aumentar também a atividade de AST e ALT em peixes, enzimas importantes do metabolismo de aminoácidos capazes de monitorar a variação na fisiologia de peixes teleósteos frente a estressores (CHENG et al. 2017; CHENG et al. 2018). No presente estudo, no entanto, não houve alteração de AST e ALT no fígado de *P. bifasciatus*. Wang et al. (2019) verificaram em *Sander lucioperca* (*pikeperch*) submetidos ao estresse térmico de aumento gradual até atingir 29°C, que em tempos de exposição iniciais houve um aumento de AST e ALT, porém, depois de 3h de exposição as atividades dessas enzimas reduziram para valores próximos ao grupo controle do experimento. Os autores sugeriram que esse fato estaria relacionado à uma disfunção do tecido hepático frente ao estresse térmico. Como não houve alteração nos níveis dessas enzimas em nenhum dos tempos de exposição ao choque térmico e nem diferença quando comparado ao controle no fígado de *P. bifasciatus*, sugerimos que os níveis presentes de AST e ALT sejam suficientes para suprir a demanda energética.

#### **4.3 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO RIM DE *Psalidodon bifasciatus***

O rim de *P. bifasciatus* foi o órgão avaliado que apresentou maior variação nas atividades enzimáticas do sistema antioxidante frente ao choque térmico. A redução da atividade de CAT após 48h de exposição ao choque térmico no rim pode ser

atribuída ao aumento do influxo de radicais superóxido, que é reportado por inibir a atividade da CAT (KONO; FRIDOVICH, 1982; WILHELM, 1996; ATLI et al. 2006; MADEIRA et al. 2013). Essa indicação também é coerente com o simultâneo aumento da atividade de SOD neste mesmo período, provavelmente induzido pelo aumento de superóxido no ambiente celular, comportamento sugerido por Kaur et al. (2005) conforme foi observado no rim de *Channa punctate* submetido ao choque térmico. Similarmente, Madeira et al. (2013) observaram inibição da atividade de CAT no músculo de *Diplodus vulgaris* uma frente ao aumento de temperatura.

A redução da atividade de outras enzimas, como GST, GR e concentração de GSH também pode ser observada no rim de *P. bifasciatus* em alguns tempos de exposição. O estresse térmico pode causar alterações enzimáticas que levam a diminuição da capacidade do órgão de responder a situações de estresse oxidativos, podendo causar profundas perturbações nas funções principais do órgão, como funções osmorregulatórias e hematopoiéticas em peixes, logo, a resposta do sistema de defesa antioxidante para neutralização de EROs em organismos submetidos ao estresse oxidativo pode falhar (ELIA et al., 2003; SHERIFF et al. 2014). Por outro lado, antes da diminuição da atividade de GR e da concentração de GSH em 48 horas, houve um aumento em relação ao controle no tempo imediatamente anterior (24 horas), que indica que o aumento de GR garantiu maior ciclagem de GSH e consequentemente aumento da concentração dessa molécula. Portanto, é possível que a capacidade de eliminação de EROs tenha sido aumentada suficientemente em 24 horas, sem necessidade de um aumento subsequente. Seguindo este pensamento, em 48h a redução de GR pode ter causado imediata redução de GSH que levou também a redução de GST.

A ideia de que a capacidade foi suprida de maneira suficiente no rim pelo aumento das atividades de SOD, GR e GSH pode ser corroborada pelo fato de que não houve aumento de dano lipídico, como pode ser observado pelos níveis constantes de LPO. Costa-Silva et al. (2015) também observaram um aumento na atividade de SOD no músculo de *Astyanax sp.* expostos a efluentes urbanos e confirmaram que esse aumento protege macromoléculas de danos devido ao fato de sua função de remoção de radicais livres.

O rim nos peixes representa um tecido crucial envolvido em respostas de estresse (YANG et al., 2020). Além disso, é sabido que uma compensação fisiológica frente a estressores é um processo de demanda de energia que requer mobilização

de substratos energéticos para lidar com o estresse (COSTAS et al., 2011; ZHOU et al., 2011). No entanto, o rim de *P. bifasciatus* não apresentou variação em HK, PFK, PK e LDH (metabolismo de carboidratos) e MDH e CS (metabolismo aeróbico) frente ao aumento agudo de temperatura. Um comportamento similar foi observado por Jesus et al. 2018 no músculo de *S. torgalensis* em resposta à aumentos de 3 graus de temperatura, no qual as atividades de LDH e de CS não se alteraram, mostrando que a espécie parece ser capaz de manter a homeostase metabólica frente ao estressor. Contrariamente, Li et al. (2020) avaliaram a atividade de HK, PK, MDH e LDH no fígado de *Ctenopharyngodon idella* com relação ao estresse térmico de alta temperatura juntamente à exposição a Hg<sup>2+</sup>, no qual observou-se um aumento das atividades dessas enzimas conforme a temperatura aumentava, o que atesta a maior necessidade de energia para manter a homeostase. No rim de um peixe tropical, *Poecilia vivipara*, foi constatado por Zebral et al. (2020) que um aumento gradual de 6°C na temperatura não causou um desbalanço nas atividades das enzimas do metabolismo energético avaliadas (PK, CS e LDH). Os autores afirmam que essa espécie demonstra ter uma marcante habilidade para compensar os efeitos do estresse térmico e manter a homeostase sem necessidade de ajustes bioquímicos. Pode se inferir, portanto, que *P. bifasciatus* demonstra-se capaz de manter a demanda energética no rim sem a necessidade de alteração nas atividades enzimáticas tanto do metabolismo aeróbico quanto do metabolismo anaeróbico de carboidratos.

A única enzima do metabolismo de carboidratos que aumentou sua atividade no rim de *P. bifasciatus* foi a G6PDH, no tempo de exposição de 48h frente ao choque térmico. A G6PDH catalisa a primeira reação da via de pentose fosfato, uma via importante para produção de NADPH celular. A NADPH é usada para a regeneração de glutathiona reduzida (GSH), que tem papel importante na regulação do estado *redox* intracelular por fornecer reduzidos equivalentes para as vias antioxidantes (LEOPOLD; LOSCALZO, 2000). O aumento de G6PDH no rim de *P. bifasciatus* sugere a ativação da via de pentose fosfato. Não obstante, sugere-se que essa maior atividade pode ser uma resposta à maior demanda de NADPH nas células para tentar reduzir os efeitos oxidativos causados pelo aumento de temperatura, visto que NADPH é utilizado pela GR para produzir GSH, que é um importante tiol não proteico envolvido na defesa celular (ARRIGO, 1999; LUSHCHAK et al., 2006b; HELLOU et al., 2012). Essa hipótese é corroborada pela concomitante redução na concentração de GSH no rim neste mesmo tempo de exposição.

As enzimas AST e ALT ligam o metabolismo de carboidratos com o metabolismo de proteínas. Neste estudo, as enzimas do metabolismo de proteínas avaliadas, GLDH, AST e ALT também não apresentaram mudanças em sua atividade frente ao choque térmico. Diferentemente, a espécie *Scophthalmus maximus* avaliada por Yang et al. (2020) apresentou aumento de AST e ALT nos rins frente a altas temperaturas, o que atestam representar uma mobilização de aminoácidos livres para produção energética. Em outro estudo realizado por Jose (2014) em *Oreochromis mossambicus* frente ao aumento agudo de temperatura, foi observado um aumento nas atividades de GLDH, AST e ALT no rim, do qual os autores sugerem ter ocorrido para suprir a demanda de energia necessária frente ao estresse. Estudos indicam que o aumento de temperatura pode afetar o metabolismo de aminoácidos de maneiras diferentes, bem como alterar a importância geral de aminoácidos como fonte de energia (JURSS, 1979; JURSS, 1981; JOSE 2014). Portanto, para o rim de *P. bifasciatus* há dois cenários possíveis: o estresse térmico pode não ter sido o suficiente para afetar a atividade das enzimas do metabolismo de proteínas ou o peixe pode ter ativado outras fontes de energia diferente de aminoácidos frente ao estressor de aumento de temperatura, como lipídeos, que não foram avaliados neste estudo.

#### **4.4 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM *Psalidodon bifasciatus*: VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS**

As atividades e os níveis dos biomarcadores apresentaram-se tecido-específico (KAMMER et al., 2011; VINAGRE et al., 2014, MADEIRA et al., 2016b, ROSSI et al., 2017) e podem estar relacionados a diferenças de disponibilidade e sistemas de entrega de oxigênio, bem como a função e metabolismo predominante no tecido (aeróbico vs. anaeróbico) (PAVLOVIĆ et al., 2010; FALFUSHYNSKA et al., 2014). Um estudo de avaliação completa da biologia térmica feito em brânquias, músculo e pele nas espécies de peixes tropicais *Abudefduf saxatilis* e *Scartella cristata* por Madeira et al. (2017) também mostrou respostas enzimáticas tecido-específicas. Os autores sugerem que o estresse térmico e oxidativo observado para cada tecido parece estar diretamente relacionado a taxa de difusão de oxigênio e consequente produção de EROs, gerando diferentes sensibilidades e respostas dos biomarcadores enzimáticos. Rossi et al. (2017) observaram que as respostas no metabolismo

energético de carboidrato e proteínas em *Hoplosternum littorale* também foi diferente nos tecidos de fígado, cérebro, músculo e brânquias avaliados.

A ordem de respostas ao estresse térmico induzido neste estudo, ou seja, o tecido que mais enzimas apresentaram atividade alterada frente ao choque térmico, foi na ordem decrescente: brânquias > rim > fígado. A maior resposta nas brânquias pode estar relacionada à sua posição no corpo, como estão em contato direto com o ambiente e então se mantem continuamente expostas a variação física e química da água (MADEIRA et al., 2016a). Além disso, as brânquias se mostraram como um bom órgão para avaliação de efeitos térmicos na fisiologia de peixes, principalmente para alterações no metabolismo energético de carboidratos. Diferentemente, o rim dos peixes é parte do eixo hipotálamo-pituitária-intrarrenal (HPI) e sua ativação é essencial para manutenção de funções vitais como resposta à eventos estressantes (YANG et al., 2020; ZIMMERMANN, 2013), que apresentou grandes alterações no sistema de defesa antioxidante, podendo ser usado como órgão alvo para avaliação de efeitos térmicos nessa via. A menor resposta no fígado em todos os marcadores avaliados pode estar relacionado ao fato de que a função vital que esse órgão performa faz com que ele possua mecanismos efetivos de manter as atividades e níveis metabólicos com poucas alterações, ainda fornecendo combustível metabólico essenciais para órgãos extra-hepáticos (MADEIRA et al., 2016a; RUI 2014).

Após a análise de 3 órgãos vitais de *P. bifasciatus* podemos inferir que essa espécie apresenta seus níveis enzimáticos do metabolismo de carboidratos, de proteínas e defesa antioxidante afetada pelo aumento agudo da temperatura, porém, o peixe se mostra capaz de modular a atividade das enzimas para suprir a demanda energética na situação de aumento agudo de 10°C de temperatura.

## 5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os resultados indicam a ativação do sistema de defesa antioxidante de *P. bifasciatus* frente ao choque térmico de 31°C, como mostrado pelo aumento nas atividades de GST e na concentração de GSH no fígado e atividades de SOD e GR e concentração de GSH no rim. Porém, as oscilações na concentração de GSH e nas enzimas dependente de glutathiona, hepáticas e renais indicam o importante papel desta via nos ajustes finos ainda necessários, mesmo após 24 e 48 horas de exposição a alta temperatura.

O aumento nas atividades de enzimas do metabolismo de carboidratos, como mostrado pela modulação de PFK, HK e MDH nas brânquias, G6Pase e CS no fígado e G6PDH no rim, mesmo com oscilações, indicam a importância da via da glicólise e do metabolismo aeróbico nas brânquias, do metabolismo aeróbico no fígado e da via pentose fosfato no rim na tentativa de manter a homeostase frente ao estressor de choque térmico de alta temperatura.

O peixe tropical *P. bifasciatus* apresentou sinais de estresse em todos os órgãos testados (brânquias, fígado e rim), que mostraram diferentes respostas frente ao choque térmico de alta temperatura. No rim o sistema de defesa antioxidante foi o mais alterado, enquanto nas brânquias o metabolismo de carboidrato foi o mais alterado. Os ajustes bioquímicos que ocorreram mostram que *P. bifasciatus* pode ser capaz de lidar com o estresse agudo de alta temperatura visto que a maioria dos indivíduos sobreviveram, porém como foram avaliados só até 48h de exposição, estudos avaliando maior tempo de exposição devem ser considerados para avaliar sua capacidade de sobrevivência frente ao choque térmico de alta temperatura.

Esses resultados são significativos no contexto de eventos extremos frente a mudanças climáticas e seus impactos em pisciculturas e partes de fluxo lento de rios, no entanto, estudos futuros deveriam avaliar o limiar térmico em populações selvagens para desvendar os limites dos quais mudanças negativas ocorrem no desempenho e adaptação de peixes, potencialmente gerando alterações ecológicas. Além disso, essas descobertas demonstram a importância de estudos de biologia termal no contexto de avaliações de saúde ecológica frente à eventos extremos de mudanças climáticas.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, M.; WAFEEK, M. Fluctuations in water temperature affected waterborne cadmium toxicity: Hematology, anaerobic glucose pathway, and oxidative stress status of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 477, p. 106–111, ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.05.007>.
- ABELE, D.; BURLANDO, B.; VIARENGO, A.; PÖRTNER, H.-O. Exposure to elevated temperatures and hydrogen peroxide elicits oxidative stress and antioxidant response in the Antarctic intertidal limpet *Nacella concinna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 2, p. 425–435, jun. 1998. [https://doi.org/10.1016/S0305-0491\(98\)10028-7](https://doi.org/10.1016/S0305-0491(98)10028-7).
- AKBARZADEH, A.; LEDER, E. H. Acclimation of killifish to thermal extremes of hot spring: Transcription of gonadal and liver heat shock genes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 191, p. 89–97, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.10.008>.
- ALMEIDA, M. E. DE et al. Atividade da malato desidrogenase muscular de *Astyanax bimaculatus* da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadora de impacto ambiental. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 11, p. 1096–1108, 2016
- ALMROTH, B. C.; ASKER, N.; WASSMUR, B.; ROSENGREN, M.; JUTFELT, F.; GRÄNS, A.; SUNDELL, K.; AXELSSON, M.; STURVE, J. Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 468, p. 130–137, jul. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.02.018>.
- AMADO, L. L.; ROSA, C. E. da; LEITE, A. T. M.; MORAES, L.; PIRES, W. V.; PINHO, G. L. L.; MARTINS, C. D. M. G.; ROBALDO, R. B.; NERY, L. E. M.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A.; MARTÍNEZ, P. E.; MONSERRAT, L. A. G. Biomarkers in croakers *Micropogonias furnieri* (Teleostei: Sciaenidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): Evidences of genotoxic and immunological effects. 2006. Disponível em: <http://repositorio.furg.br/handle/1/752>. Acesso em: 6 jan. 2021.
- ARRIGO, A.-P. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 936–944, nov. 1999. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00175-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00175-6).
- ATLI, G.; ALPTEKIN, Ö.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cr<sup>6+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 2, p. 218–224, jun. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.003>.
- BALDISSEROTTO, B.; URBINATI, E.; CYRINO, J. (Orgs.). **Biology and physiology of freshwater neotropical fishes**. 1. ed. Waltham: Elsevier, 2019.

BALDWIN, J.; ELIAS, J. P.; WELLS, R. M. G.; DONOVAN, D. A. Energy metabolism in the tropical abalone, *Haliotis asinina* Linné: Comparisons with temperate abalone species. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 342, n. 2, p. 213–225, 2007.

BARTON, B. A. Stress in finfish: Past, present and future—a historical perspective. In G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, and C. B. Schreck (eds.), *Fish stress and health in aquaculture*, pp. 1–33. Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. 62, **Cambridge Univ. Press**, Cambridge, U.K. 1997.

BARTON, B. A.; SCHRECK, C. B. Metabolic Cost of Acute Physical Stress in Juvenile Steelhead. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 116, n. 2, p. 257–263, 1987. [https://doi.org/https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1987\)116<257:MCOAPS>2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1577/1548-8659(1987)116<257:MCOAPS>2.0.CO;2).

BASIRUN, A. A.; AHMAD, S. A.; YASID, N. A.; SABULLAH, M. K.; DAUD, H. M.; SHA'ARANI, S.; KHALID, A.; SHUKOR, M. Y. Toxicological effects and behavioural and biochemical responses of *Oreochromis mossambicus* gills and its cholinesterase to copper: a biomarker application. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 887–898, 1 fev. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13762-018-1711-1>.

BEECKMANS, S.; KANAREK, L. Demonstration of Physical Interactions between Consecutive Enzymes of the Citric Acid Cycle and of the Aspartate-Malate Shuttle: A Study Involving Fumarase, Malate Dehydrogenase, Citrate Synthase and Aspartate Aminotransferase. **European Journal of Biochemistry**, v. 117, n. 3, p. 527–535, 3 mar. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb06369.x>.

BELLGRAPH, B. J.; MCMICHAEL, G. A.; MUELLER, R. P.; MONROE, J. L. Behavioural response of juvenile Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* during a sudden temperature increase and implications for survival. **Journal of Thermal Biology**, p. 6-10, Volume 35, Issue 1, January. 2010.

BEVER, K.; CHENOWETH, M.; DUNN, A. Amino acid gluconeogenesis and glucose turnover in kelp bass (*Paralabrax* sp.). **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 240, n. 3, p. R246–R252, 1 mar. 1981a. <https://doi.org/10.1152/ajprequ.1981.240.3.R246>.

BEVER, K.; CHENOWETH, M.; DUNN, A. Amino acid gluconeogenesis and glucose turnover in kelp bass (*Paralabrax* sp.). **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 240, n. 3, p. R246–R252, 1 mar. 1981b. <https://doi.org/10.1152/ajprequ.1981.240.3.R246>.

BHAT, I. A. Histopathological changes due to induced biopesticide Kethrin in the liver of freshwater fish, *Labeo rohita* (Hamilton). **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 5, n. 2, p. 412–415, 2017.

BIRNIE-GAUVIN, K.; COSTANTINI, D.; COOKE, S. J.; WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, v. 18, n. 5, p. 928–942, set. 2017. <https://doi.org/10.1111/faf.12215>.

BOROWIEC, B. G.; SCOTT, G. R. Hypoxia acclimation alters reactive oxygen species homeostasis and oxidative status in estuarine killifish (*Fundulus heteroclitus*). **Journal of Experimental Biology**, v. 223, n. 13, 1 jul. 2020. DOI 10.1242/jeb.222877.

BOWDEN, A. J.; GARDINER, N. M.; COUTURIER, C. S.; STECYK, J. A. W.; NILSSON, G. E.; MUNDAY, P. L.; RUMMER, J. L. Alterations in gill structure in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 175, p. 64–71, set. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.011>.

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

BRODTE, E.; KNUST, R.; PÖRTNER, H. O. Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (Zoarcidae). **Polar Biology**, v. 30, n. 1, p. 95–107, 28 nov. 2006. <https://doi.org/10.1007/s00300-006-0165-y>.

BUENO-KRAWCZYK, A.C.D.; GUILOSKI, I.C.; PIANCINI, L.D.S.; et al. Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply. **Chemosphere**, v. 135, p. 257–264, 2015.

CAMPOS, D. F. et al. Metabolic rate and thermal tolerance in two congeneric Amazon fishes: *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 1956 and *Paracheirodon simulans* Géry, 1963 (Characidae). **Hydrobiologia**, v. 789, n. 1, p. 133–142, 1 mar. 2017.

CAMPOS, D. F.; BRAZ-MOTA, S.; VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. **Ecological Indicators**, v. 101, p. 533–540, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.051>.

CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione Reductase. *Methods in Enzymology*, 113, 484-490. 1985.

CARVALHO-NETA, R. N. F.; ABREU-SILVA, A. L. Glutathione S-Transferase as biomarker in *Sciades herzbergii* (Siluriformes: Ariidae) for environmental monitoring: the case study of São Marcos Bay, Maranhão, Brazil. **Latin american journal of aquatic research**, v. 41, n. 2, p. 217–225, abr. 2013. <https://doi.org/10.3856/vol41-issue2-fulltext-2>.

CHANDRA, J; SAMALI, A; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, n. 3–4, p. 323–333, 2000. CHANG, C.-H. et al. Salinity Effects on Strategies of Glycogen Utilization in Livers of Euryhaline Milkfish (*Chanos chanos*) under Hypothermal Stress. **Frontiers in Physiology**, v. 9, p. 81, 2018.

CHANG, J. C.-H.; WU, S.-M.; TSENG, Y.-C.; et al. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during

acclimation to seawater. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 19, p.3494–3504, 2007

CHANG, Y.-L.; LEE, Y.-C.; SHIH, J.-Y.; WU, C.-T. Pulmonary pleomorphic (spindle) cell carcinoma: peculiar clinicopathologic manifestations different from ordinary non-small cell carcinoma. **Lung Cancer**, v. 34, n. 1, p. 91–97, 1 out. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-5002\(01\)00224-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5002(01)00224-0).

CHATTERJEE, N. et al. Secondary stress responses in Indian major carps *Labeo rohita* (Hamilton), *Catla catla* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) fry to increasing packing densities. **Aquaculture Research**, v. 37, n. 5, p. 472–476, mar. 2006.

CHENG, C.-H.; GUO, Z.-X.; LUO, S.-W.; WANG, A.-L. Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish ( *Takifugu obscurus* ). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 150, p. 190–198, abr. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.045>.

CHENG, C.-H.; YE, C.-X.; GUO, Z.-X.; WANG, A.-L. Immune and physiological responses of pufferfish ( *Takifugu obscurus* ) under cold stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 64, p. 137–145, maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.003>.  
CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273–283, 1979.

CHUNG, K. S. Heat Resistance and Thermal Acclimation Rate in Tropical Tetra *Astyanax bimaculatus* of Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, v. 57, n. 4, p. 459–463, 1 abr. 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1007696027169>.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. L- Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1543, n. 1, p. 11–23, 2000.

COOKE, S.J., SACK, L., FRANKLIN, C.E., FARRELL, A.P., BEARDALL, J., WIKELSKI, M., CHOWN, S.L. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. **Conservation Physiology** 1. 2013.  
COSTAS, B. et al. Physiological responses of *Senegalese sole* (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: Effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. **Aquaculture**, v. 316, n. 1, p. 68–76, 15 jun. 2011.

COSTA-SILVA, D. G.; NUNES, M. E. M.; WALLAU, G. L.; MARTINS, I. K.; ZEMOLIN, A. P. P.; CRUZ, L. C.; RODRIGUES, N. R.; LOPES, A. R.; POSSER, T.; FRANCO, J. L. Oxidative stress markers in fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15526–15535, out. 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4737-7>.

CROUCH RK, GANDY SE, KIMSEY G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**; 35:235-41. 1981.

CUI, Y.; LIU, B.; XIE, J.; XU, P.; HABTE-TSION, H.-M.; ZHANG, Y. Effect of heat stress and recovery on viability, oxidative damage, and heat shock protein expression in hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 3, p. 721–729, jun. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9879-2>.

CULUMBER, Z. W.; MONKS, S. Resilience to extreme temperature events: acclimation capacity and body condition of a polymorphic fish in response to thermal stress: Effects of Acute Thermal Stress on Freshwater Fish. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 111, n. 3, p. 504–510, mar. 2014. <https://doi.org/10.1111/bij.12230>.

DALVI, R.S.; DAS, T.; DEBNATH, D.; et al. Metabolic and cellular stress responses of catfish, *Horabagrus brachysoma* (Günther) acclimated to increasing temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 65, p. 32–40, 2017.

DHILLON, R. S.; MANDIC, M.; YAO, L.; CAO, Z.-D.; FU, S.-J.; BRAUNER, C. J.; WANG, Y. S.; RICHARDS, J. G. Ethanol metabolism varies with hypoxia tolerance in ten cyprinid species. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 2, p. 283–293, mar. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1131-4>.

DONALDSON, M. R.; COOKE, S. J.; PATTERSON, D. A.; MACDONALD, J. S. Cold shock and fish. **Journal of Fish Biology**, v. 73, n. 7, p. 1491–1530, 2008. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02061.x>.

DOS SANTOS CARVALHO, C.; FERNANDES, M. N. Effects of copper toxicity at different pH and temperatures on the in vitro enzyme activity in blood and liver of fish, *Prochilodus lineatus*. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 5, p. 4933–4942, 1 out. 2019.

DUTTA, S. M.; MUSTAFI, S. B.; RAHA, S.; CHAKRABORTY, S. K. Biomonitoring role of some cellular markers during heat stress-induced changes in highly representative fresh water mollusc, *Bellamya bengalensis*: Implication in climate change and biological adaptation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 157, p. 482–490, 15 ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.001>.

EARLY, J. O.; MENON, D.; WYSE, C. A.; CERVANTES-SILVA, M. P.; ZASLONA, Z.; CARROLL, R. G.; PALSSON-MCDERMOTT, E. M.; ANGIARI, S.; RYAN, D. G.; CORCORAN, S. E.; TIMMONS, G.; GEIGER, S. S.; FITZPATRICK, D. J.; O'CONNELL, D.; XAVIER, R. J.; HOKAMP, K.; O'NEILL, L. A. J.; CURTIS, A. M. Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 $\beta$  in macrophages via NRF2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 36, p. E8460–E8468, <https://doi.org/10.1073/pnas.1800431115>. 4 set. 2018.

ELIA, A. C; GALARINI, R.; TATICCHI, M. I.; et al. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 55, n. 2, p. 162–167, 2003.

FAHEEM, K. P. Lone, Oxidative stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. **Braz. J. Pharm. Sci.** 2017;53(3):e17003. 2017.

FATHI, A.-R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; JUERGEN.STEINFELDER, H. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208–214, 2002.

FEDERICI, G; SHAW, B; HANDY, R. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 415–430, 2007.

FÉ-GONÇALVES, L. M. et al. How will farmed populations of freshwater fish deal with the extreme climate scenario in 2100? Transcriptional responses of *Colossoma macropomum* from two Brazilian climate regions. **Journal of Thermal Biology**, v. 89, p. 102487, abr. 2020.

FIGUEIREDO-FERNANDES et al. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 85:97–103, 2006.

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; et al. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 187, n. 8, p. 1137–1154, 2017.

FRANKLIN, C.E., SEEBACHER, F. Conservation physiology: integrating physiological mechanisms with ecology and evolution to predict responses of organisms to environmental change. **Philosophical Transactions of the Royal Society** 367:1605–1779. 2012.

GAGNÉ, F.; BLAISE, C.; ANDRÉ, C.; PELLERIN, J. Implication of site quality on mitochondrial electron transport activity and its interaction with temperature in feral *Mya arenaria* clams from the Saguenay Fjord. **Environmental Research**, v. 103, n. 2, p. 238–246, 1 fev. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.05.006>.

GAGNON, M. M. Metabolic disturbances in fish exposed to sodium pentachlorophenate (NaPCP) and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126), individually or combined. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132, n. 4, p. 425–435, ago. 2002.

GALLANT, M. J.; LEBLANC, S.; MACCORMACK, T. J.; CURRIE, S. Physiological responses to a short-term, environmentally realistic, acute heat stress in Atlantic salmon, *Salmo salar*. **FACETS**, v. 2, n. 1, p. 330–341, 1 maio 2017. <https://doi.org/10.1139/facets-2016-0053>.

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem. J.**, v.55, p.400–408, 1953.

GUILLEN, A. C. et al. Effect of gradual temperature increase on the carbohydrate energy metabolism responses of the Antarctic fish *Notothenia rossii*. **Marine Environmental Research**, v. 150, p. 104779, set. 2019.

GUNDERSON, A. R.; STILLMAN, J. H. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1808, p. 20150401, 7 jun. 2015.

GUNDERSON, A. R.; STILLMAN, J. H. Plasticity in thermal tolerance has limited potential to buffer ectotherms from global warming. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1808, p. 20150401, 7 jun. 2015. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0401>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4th ed ed. Oxford; New York: **Oxford University Press**, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, JOHN M. C. Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. **The Lancet**, v. 323, n. 8391, p. 1396–1397, 1984.

HASSAN, A. THERMAL STRESS OF AMBIENT TEMPERATURE MODULATE EXPRESSION OF STRESS AND IMMUNE-RELATED GENES AND DNA FRAGMENTATION IN NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS* (LINNAEUS, 1758)). **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 15, n. 3, p. 1343–1354, 2017. [https://doi.org/10.15666/aer/1503\\_13431354](https://doi.org/10.15666/aer/1503_13431354).

HELLOU, J.; ROSS, N. W.; MOON, T. W. Glutathione, glutathione S-transferase, and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, n. 6, p. 2007–2023, jul. 2012. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-0909-x>.

HERMES-LIMA, M., Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. **WileyLiss, Hoboken**, pp. 319–368. 2004.

HERMES-LIMA, M., Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), **Functional Metabolism: Regulation and Adaptation**. **Wiley-Liss, Hoboken**, pp. 319–368. 2004.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, J.; MÍGUEZ, J. M.; LIBRÁN-PÉREZ, M.; OTERO-RODIÑO, C.; NADERI, F.; SOENGAS, J. L.; LÓPEZ-PATIÑO, M. A. Daily rhythms in activity and mRNA abundance of enzymes involved in glucose and lipid metabolism in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Influence of light and food availability. **Chronobiology International**, v. 32, n. 10, p. 1391–1408, <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1100633>. 26 nov. 2015.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, J.; MÍGUEZ, J. M.; NADERI, F.; SOENGAS, J. L.; LÓPEZ-PATIÑO, M. A. Influence of light and food on the circadian clock in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Chronobiology International**, v. 34, n. 9, p. 1259–1272, <https://doi.org/10.1080/07420528.2017.1361435>. 21 out. 2017.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, J.; NADERI, F.; CHIVITE, M.; SOENGAS, J. L.; MÍGUEZ, J. M.; LÓPEZ-PATIÑO, M. A. Influence of Stress on Liver Circadian Physiology. A Study in Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, as Fish Model. **Frontiers in Physiology**, DOI 10.3389/fphys.2019.00611. v. 10, 2019.

HEUTON, M.; AYALA, L.; BURG, C.; DAYTON, K.; MCKENNA, K.; MORANTE, A.; PUENTEDURA, G.; URBINA, N.; HILLYARD, S.; STEINBERG, S.; VAN BREUKELEN, F. Paradoxical anaerobism in desert pupfish. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 23, p. 3739–3745, 1 dez. 2015. <https://doi.org/10.1242/jeb.130633>.

HINTON D. E, LAUREN D.J., Liver structural alterations accompanying chronic toxicity in fishes: potential biomarkers of exposure, in: J.F. McCarthy, L.R. Shugart (Eds.), **Biomarkers of Environmental Contamination**, Lewis, Boca Raton, pp. 17–57. 1990. HOCHACHKA P.W., G.N. Somero, Biochemical Adaptation, **Oxford University Press**, New York, 2002.

HWANG PP, LEE TH, LIN LY Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 301:R28–R47. doi:10.1152/ajpregu.00047. 2011.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 1 dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.

IWAMA GK et al., Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish, **AMER. ZOOL.**, 39:901-909. 1999.

JAVED, M., AHMAD, M. I., USMANI, N., & AHMAD, M. Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in *Channa punctatus* exposed to heavy metal loaded waste water. **Scientific Reports**, 7(1).doi:10.1038/s41598-017-01749-6. 2017.

JAVED, M.; USMANI, N. Stress response of biomolecules (carbohydrate, protein and lipid profiles) in fish *Channa punctatus* inhabiting river polluted by Thermal Power Plant effluent. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 2, p. 237–242, mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.09.021>.

JESUS, T. F.; ROSA, I. C.; REPOLHO, T.; LOPES, A. R.; PIMENTEL, M. S.; ALMEIDA-VAL, V. M. F.; COELHO, M. M.; ROSA, R. Different ecophysiological responses of freshwater fish to warming and acidification. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 216, p. 34–41, 1 fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.11.007>.

JIA, S. et al. Amino acids are major energy substrates for tissues of hybrid striped bass and zebrafish. **Amino Acids**, v. 49, n. 12, p. 2053–2063, dez. 2017.

JÜRSS, K. Effects of temperature, salinity, and feeding on aminotransferase activity in the liver and white muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Comparative Biochemistry and Physiology. B, Comparative Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 213–218, 1979. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(79\)90163-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(79)90163-9).

JÜRSS, Karl. Influence of temperature and ratio of lipid to protein in diets on aminotransferase activity in the liver and white muscle of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 527–533, 1 jan. 1981. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(81\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0305-0491(81)90070-5).

KAMMER, A. R.; ORCZEWSKA, J. I.; O'BRIEN, K. M. Oxidative stress is transient and tissue specific during cold acclimation of threespine stickleback. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 8, p. 1248–1256, 2011.

KAUR, M.; ATIF, F.; ALI, M.; et al. Heat stress-induced alterations of antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* Bloch. **Journal of Fish Biology**, v. 67, n. 6, p. 1653–1665, 2005.

KAVALCO, K. F. Estudos evolutivos no gênero *Astyanax* (Pisces, Characidae), Doutorado em Biologia, São Paulo: Universidade de São Paulo, 3. out. 2008.

KEEN, J. H., W. H. HABIG & W. B. JAKOBY. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal Biology Chemistry**, 20: 6183-6188. 1976.

KHARE, A.; CHHAWANI, N.; KUMARI, K. Glutathione reductase and catalase as potential biomarkers for synergistic intoxication of pesticides in fish. **Biomarkers**, v. 24, n. 7, p. 666–676, 3 out. 2019. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1651902>.

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 257, n. 10, p. 5751–5754, 1982

KONRADT, J.; BRAUNBECK, T. Alterations of selected metabolic enzymes in fish following long-term exposure to contaminated streams. **Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery**, v. 8, n. 3, p. 299–318, 1 set. 2001.

KUMAR, N. et al. Methyl donors potentiates growth, metabolic status and neurotransmitter enzyme in *Labeo rohita* fingerlings exposed to endosulfan and temperature. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1343–1353, out. 2012.

LASKOWSKI, R.; BEDNARSKA, A. J.; KRAMARZ, P. E.; LOUREIRO, S.; SCHEIL, V.; KUDŁEK, J.; HOLMSTRUP, M. Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors--a meta-analysis and case studies. **The Science of the Total Environment**, v. 408, n. 18, p. 3763–3774, 15 ago. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.01.043>.

LAZADO, C. C.; LUND, I.; PEDERSEN, P. B.; NGUYEN, H. Q. Humoral and mucosal defense molecules rhythmically oscillate during a light–dark cycle in permit, *Trachinotus falcatus*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 47, n. 2, p. 902–912, <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.10.037>. dez. 2015.

LE, S. JOSSE, J. HUSSON, F. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1), 1-18. 10.18637/jss.v025.i01. 2008

LEBLANC, S.; HÖGLUND, E.; GILMOUR, K. M.; CURRIE, S. Hormonal modulation of the heat shock response: insights from fish with divergent cortisol stress responses. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 1, p. R184–R192, jan. 2012. <https://doi.org/10.1152/ajprequ.00196.2011>.

LENTH, R. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.4.5. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>, 2020.

LEOPOLD, J. A.; LOSCALZO, J. Cyclic strain modulates resistance to oxidant stress by increasing G6PDH expression in smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 5, p. H2477–H2485, 1 nov. 2000.

LERMEN CL, LAPPE R, CRESTANI M, VIEIRA VP, GIODA CR, SCHETINGER MRC, BALDISSEROTTO B, MORAES G, MORSCH VM. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture** 239:497-507. 2004.

LEUNG, L. Y.; WOO, N. Y. S. Influence of dietary carbohydrate level on endocrine status and hepatic carbohydrate metabolism in the marine fish *Sparus sarba*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 543–554, abr. 2012. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9534-8>.

LEVESQUE, H. M.; et al. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 60, n. 3-4, p. 257-267. 2002.

LEVINE, R.L.; WILLIAMS, J.A.; STADTMAN, E.P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.**, v.233, p.346-357, 1994.

LI, C.; WANG, Y.; WANG, G.; CHEN, Y.; GUO, J.; PAN, C.; LIU, E.; LING, Q. Physicochemical changes in liver and Hsc70 expression in pikeperch *Sander lucioperca* under heat stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 181, p. 130–137, out. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.05.083>.

LIU, B.; XIE, J.; GE, X.; XU, P.; WANG, A.; HE, Y.; ZHOU, Q.; PAN, L.; CHEN, R. Effects of anthraquinone extract from *Rheum officinale* Bail on the growth performance and physiological responses of *Macrobrachium rosenbergii* under high temperature stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 29, n. 1, p. 49–57, jul. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2010.02.018>.

LOGAN, C. A.; BUCKLEY, B. A. Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 12, p. 1915–1924, 2015.

LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; NOBLE, C.; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J. Does feeding time affect fish welfare? **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 1, p. 143–152, <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9523-y>. fev. 2012.

LÓPEZ-PATIÑO, M. A. et al. Short-term time course of liver metabolic response to acute handling stress in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 168, p. 40–49, 1 fev. 2014.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 36–41, 2006b.

LUSHCHAK, V.I, T.V. BAGNYUKOVA. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 143. 30–35 Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: **Toxicology & Pharmacology**, 2006a

LUSHCHAK, V.I, T.V. BAGNYUKOVA. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 143. 30–35 Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. **1. Indices of oxidative stress**. 2006.

MADEIRA, C.; MENDONÇA, V.; LEAL, M. C.; et al. Thermal stress, thermal safety margins and acclimation capacity in tropical shallow waters—An experimental approach testing multiple end-points in two common fish. **Ecological Indicators**, v. 81, p. 146–158, 2017.

MADEIRA, C.; MENDONÇA, V.; LEAL, M. C.; FLORES, A. A. V.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. S.; VINAGRE, C. Thermal stress, thermal safety margins and acclimation capacity in tropical shallow waters—An experimental approach testing multiple end-points in two common fish. **Ecological Indicators**, v. 81, p. 146–158, out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.05.050>.

MADEIRA, C; MADEIRA, D; DINIZ, M. S.; et al. Thermal acclimation in clownfish: An integrated biomarker response and multi-tissue experimental approach. **Ecological Indicators**, v. 71, p. 280–292, 2016b.

MADEIRA, D.; ARAÚJO, J. E.; VITORINO, R.; COSTA, P. M.; CAPELO, J. L.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Molecular Plasticity under Ocean Warming: Proteomics and Fitness Data Provides Clues for a Better Understanding of the Thermal Tolerance in Fish. **Frontiers in Physiology**, v. 8, 2017. DOI 10.3389/fphys.2017.00825.

MADEIRA, D.; COSTA, P. M.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. When warming hits harder: survival, cellular stress and thermal limits of *Sparus aurata* larvae under global change. **Marine Biology**, v. 163, n. 4, p. 91, abr. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2856-4>.

MADEIRA, D.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 324–331, abr. 2016a.

MCCARTHY, M. J. Oxidative stress: a link between cardiovascular disease and psychiatric illness. **Acta Psychiatrica Scandinavica**, v. 130, n. 3, p. 161–162, 2014.

MCQUATTERS-GOLLOP, A. Challenges for implementing the Marine Strategy Framework Directive in a climate of macroecological change. **Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 370, n. 1980, p. 5636–5655, 13 dez. 2012. <https://doi.org/10.1098/rsta.2012.0401>.

MOON, T. W.; FOSTER, G. D. Chapter 4 Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**. [s.l.] Elsevier, v. 4p. 65–100. 1995.

MORAN, D.; SOFTLEY, R.; WARRANT, E. J. **Data from: Eyeless Mexican cavefish save energy by eliminating the circadian rhythm in metabolism**. [S. l.]: Dryad, DOI 10.5061/DRYAD.3SF6G. 2015.

NAKANO, K.; IWAMA, G. K. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 133, n. 1, p. 79–94, 2002.

NAKANO, T.; KAMEDA, M.; SHOJI, Y.; et al. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. **Redox Biology**, v. 2, p. 772–776, 2014.

NAKANO, T.; KAMEDA, M.; SHOJI, Y.; HAYASHI, S.; YAMAGUCHI, T.; SATO, M. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. **Redox Biology**, v. 2, p. 772–776, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.007>.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.) (Org.). **Nutrient requirements of fish and shrimp**. Washington, D.C: National Academies Press, 2011.

NAVARRO, F. K. S. P. Efeito do fotoperíodo na atividade locomotora e parâmetros fisiológicos em fêmeas de lambari (*Astyanax bimaculatus*) / Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras (UFLA), 2010.

NAVARRO-GUILLÉN, C.; YÚFERA, M.; ENGROLA, S. Daily feeding and protein metabolism rhythms in *Senegalese sole* post-larvae. **Biology Open**, v. 6, n. 1, p. 77–82, 15 jan. 2017. <https://doi.org/10.1242/bio.021642>.

NAVEED, A.; VENKATESHWARLU, P.; JANAI AH, C. Impact of sublethal concentration of triazophos on regulation of protein metabolism in the fish *Channa punctatus* (Bloch). 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry**. Seventh edition. New York, NY: Houndmills, Basingstoke: W.H. Freeman and Company ; Macmillan Higher Education, 2017.

NEWTON, J. R.; SANTIS, C. D.; JERRY, D. R. The gene expression response of the catadromous perciform barramundi *Lates calcarifer* to an acute heat stress. **Journal of Fish Biology**, v. 81, n. 1, p. 81–93, 2012.

NIMET, J.; GUIMARÃES, A. T. B.; DELARIVA, R. L. Use of Muscular Cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a Biomarker in Biomonitoring of Rural Streams. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 232–238, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2111-9>.

NIMET, J.; NEVES, M. P.; VIANA, N. P.; DE ARRUDA AMORIM, J. P.; DELARIVA, R. L. Histopathological alterations in gills of a fish (*Astyanax bifasciatus*) in neotropical streams: negative effects of riparian forest reduction and presence of pesticides. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 1, p. 58, 19 dez. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8030-y>.

NINAWA, A. S.; INDULKAR, S. T.; AMIN, A. Impact of Climate Change on Fisheries. In: **Biotechnology for Sustainable Agriculture**. [s.l.] Elsevier, p. 257–280. 2018.

NORRIS, C. E.; DIORIO, P. J.; SCHULTZ, R. J.; HIGHTOWER, L. E. Variation in heat shock proteins within tropical and desert species of poeciliid fishes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1048–1062, 1995.

OOMEN, R. A.; HUTCHINGS, J. A. Transcriptomic responses to environmental change in fishes: Insights from RNA sequencing. **FACETS**, v. 2, n. 2, p. 610–641, 1 set. 2017.

ORREGO, R. et al. Effects of pulp and paper mill effluent extracts on liver anaerobic and aerobic metabolic enzymes in rainbow trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 761–768, maio 2011.

PAINE, R. T.; TEGNER, M. J.; JOHNSON, E. A. Compounded Perturbations Yield Ecological Surprises. **Ecosystems**, v. 1, n. 6, p. 535–545, 1 nov. 1998. <https://doi.org/10.1007/s100219900049>.

PANKHURST, N. W. 8 - Reproduction and Development. In: SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (orgs.). **Fish Physiology**. Biology of Stress in Fish. [S. l.]: Academic Press, 2016. v. 35, p. 295–331. DOI 10.1016/B978-0-12-802728-8.00008-4.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, Profiles in Comparative Endocrinology: Glen Van Der Kraak. v. 170, n. 2, p. 265–275, 15 jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>.

PETITJEAN, Q.; JEAN, S.; GANDAR, A.; CÔTE, J.; LAFFAILLE, P.; JACQUIN, L. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. **Science of The Total Environment**, v. 684, p. 371–380, 20 set. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>.

POLAKOF, S. et al. Glucose metabolism in fish: a review. **Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 182, n. 8, p. 1015–1045, dez. 2012.

PRZEPIURA, T. DE C. S.; HERRERIAS, T.; KANDALSKI, P. K.; et al. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress. **Brain Research**, v. 1708, p. 126–137, 2019.

PUROHIT, G. K.; MAHANTY, A.; SUAR, M.; SHARMA, A. P.; MOHANTY, B. P.; MOHANTY, S. Investigating hsp Gene Expression in Liver of *Channa striatus* under Heat Stress for Understanding the Upper Thermal Acclimation. 9 jun. 2014. **BioMed Research International**. DOI <https://doi.org/10.1155/2014/381719>.

QUEIRÓS, A. M.; FERNANDES, J.; GENEVIER, L.; LYNAM, C. P. Climate change alters fish community size-structure, requiring adaptive policy targets. **Fish and Fisheries**, v. 19, n. 4, p. 613–621, jul. 2018. <https://doi.org/10.1111/faf.12278>.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.Rproject.org/>. 2020.

REGOLI, F.; GIULIANI, M. E.; BENEDETTI, M; et al. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 56–66, 2011.

REITMAN, S., AND FRANKEL, S. A. Colorimetric method for tile determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. **A in. J. Clin. Path**, v.28, n. 56, p. 53-63, 1957.

REN, M.; HABTE-TSION, H.-M.; XIE, J.; LIU, B.; ZHOU, Q.; GE, X.; PAN, L.; CHEN, R. Effects of dietary carbohydrate source on growth performance, diet digestibility and liver glucose enzyme activity in blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. **Aquaculture**, v. 438, p. 75–81, 1 mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.01.008>.

REZENDE, E. L.; CASTAÑEDA, L. E.; SANTOS, M. Tolerance landscapes in thermal ecology. **Functional Ecology**, v. 28, n. 4, p. 799–809, ago. 2014.

RIBEIRO, A. C.; BATISTA, M. T. O.; RODRIGUES JUNIOR, E.; FEIJÓ DE OLIVEIRA, M.; VANI, G. S.; RODRIGUES, E.; SUDA, C. N. K. Atividades de lactato desidrogenase e malato desidrogenase de *Astyanax bimaculatus* (lambari) da bacia hidrográfica do rio Una como biomarcadoras de impacto ambiental. **Ambiente e Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 10, n. 4, p. 793–803, 28 out. 2015. <https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1615>.

RODNICK, K. J.; GAMPERL, A. K.; LIZARS, K. R.; et al. Thermal tolerance and metabolic physiology among redband trout populations in south-eastern Oregon. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 2, p. 310–335, 2004.

ROSA, R. et al. Neuro-oxidative damage and aerobic potential loss of sharks under elevated CO<sub>2</sub> and warming. **Marine Biology**, v. 163, n. 5, p. 119, 25 abr. 2016.

ROSSI, A; BACCHETTA, C; CAZENAVE, J. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). **Ecological Indicators**, v. 79, p. 361–370, 2017.

ROSSI, A; BACCHETTA, C; CAZENAVE, J. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). **Ecological Indicators**, v. 79, p. 361–370, 2017.

SABOROWSKI, R., BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of Northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, v. 140, n. 3, p. 557–565, 2002.

SADOUL, B.; VIJAYAN, M. M. 5 - Stress and Growth. In: SCHRECK, C. B.; TORT, L.; FARRELL, A. P.; BRAUNER, C. J. (orgs.). **Fish Physiology**. Biology of Stress in Fish. [S. l.]: Academic Press, 2016. v. 35, p. 167–205. DOI 10.1016/B978-0-12-802728-8.00005-9.

SCHAEFER, J.; RYAN, A. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 3, p. 722–734, 2006.

SCHINEGGER, R.; TRAUTWEIN, C.; MELCHER, A.; SCHMUTZ, S. Multiple human pressures and their spatial patterns in European running waters. **Water and Environment Journal**, v. 26, n. 2, p. 261–273, jun. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1747-6593.2011.00285.x>.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. **Fish Physiology**. v. 35, p. 1–34. DOI 10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1

SEDILAK, J. LINDSAY, R.H.C. Estimation of total, protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellmann's reagent, **Anal. Biochem.** 25, P. 192-205 (1968).

SEMSAR-KAZEROUNI, M.; BOERRIGTER, J. G. J.; VERBERK, W. C. E. P. Changes in heat stress tolerance in a freshwater amphipod following starvation: The role of oxygen availability, metabolic rate, heat shock proteins and energy reserves. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 245, p. 110697, jul. 2020.

SHERIFF, S. A.; SUNDARAM, B; RAMAMOORTHY, B; et al. Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic enzymes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, n. 1, p. 19–26, 2014.

SOENGAS, J. L.; AND, M. A.; ANDRES, M. D. Gradual transfer to sea water of rainbow trout: effects on liver carbohydrate metabolism. **Journal of Fish Biology**, v. 47, n. 3, p. 466–478, 1995.

SONG, M.; ZHAO, J.; WEN, H.-S.; LI, Y.; LI, J.-F.; LI, L.-M.; TAO, Y.-X. The impact of acute thermal stress on the metabolome of the black rockfish (*Sebastes schlegelii*). **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. e0217133, 24 maio 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217133>.

SOUZA, M. R. D. P. DE; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; et al. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, v. 146, p. 43–55, 2018

SPICER, J.I., GASTON, K.J. Physiological Diversity and its Ecological Implications. **Blackwell Science**, Oxford. 1999.

STOREY, K.B., Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 29, 1715–1733. 1996.

STROBEL A., E. LEO, H.O. PORTNER, F.C. MARK, Elevated temperature and PCO<sub>2</sub> shift € metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *Notothenia rossii*, **Comp. Biochem. Physiol. B** 166. 2013.

SUN, X. et al. Effects of selenium on serotonin synthesis and the glutathione redox cycle in plum leaves. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 4, p. 2212–2221, dez. 2020.

SYED, S. E. H.; ENGEL, P. C. A pH-dependent activation-inactivation equilibrium in glutamate dehydrogenase of *Clostridium symbiosum*. **Biochemical Journal**, v. 271, n. 2, p. 351–355, 1990.

TAKAHASHI, K.; YAMADA, T.; TSUKITA, S.; KANEKO, K.; SHIRAI, Y.; MUNAKATA, Y.; ISHIGAKI, Y.; IMAI, J.; UNO, K.; HASEGAWA, Y.; SAWADA, S.; OKA, Y.; KATAGIRI, H. Chronic mild stress alters circadian expressions of molecular clock genes in the liver. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 304, n. 3, p. E301–E309, <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00388.2012>. 4 dez. 2012.

TAN, V. P.; MIYAMOTO, S. HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. **Autophagy**, v. 11, n. 6, p. 963–964, 3 jun. 2015. <https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1042195>.

THUESEN, E. V.; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, n. 3, p. 603–611, 2005

TINCANI, F. H.; SANTOS, G. S.; AZEVEDO, A. C. B.; MARQUES, A. E. M. L.; PEREIRA, L. S.; CASTELLANO, G. C.; DA SILVA, T. A.; GALVAN, G. L.; CHIMENTÃO, F. G.; SILVA, C. P.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C.; CAMPOS, S. X.; RAMSDORF, W. A.; CESTARI, M. M. Climbing the taxonomic ladder: Could a genus be used as bioindicator? The ecotoxicological relationship between biomarkers of *Astyanax altiparanae*, *Astyanax bifasciatus* and *Astyanax*

*ribeirae*. **Ecological Indicators**, v. 106, p. 105474, 1 nov. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.105474>.

ULTSCH, G. R. ECOLOGY AND PHYSIOLOGY OF HIBERNATION AND OVERWINTERING AMONG FRESHWATER FISHES, TURTLES, AND SNAKES. **Biological Reviews**, v. 64, n. 4, p. 435–515, nov. 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1989.tb00683.x>.

VAN WAARDE, A. Alcoholic Fermentation in Multicellular Organisms. **Physiological Zoology**, v. 64, n. 4, p. 895–920, jul. 1991. <https://doi.org/10.1086/physzool.64.4.30157948>.

VERA, L. M.; MIGAUD, H. Hydrogen peroxide treatment in Atlantic salmon induces stress and detoxification response in a daily manner. **Chronobiology International**, v. 33, n. 5, p. 530–542, <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1131164>. 27 maio 2016.

VERGAUWEN, L., HAGENAARS, A., BLUST, R., & KNAPEN, D. Temperature dependence of long-term cadmium toxicity in the zebrafish is not explained by liver oxidative stress: Evidence from transcript expression to physiology. **Aquatic Toxicology**, 126, 52–62. doi:10.1016/j.aquatox.2012.10.004. 2013.

VIEIRA, V. A. R. O.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 1–8, jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.08.003>.

VIEIRA, V. A. R. O.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 2013.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**, v. 23, p. 274–279, 2012.

VINAGRE, C; MADEIRA, D; MENDONÇA, V; et al. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. **Marine Environmental Research**, v. 97, p. 10–14, 2014.

VORNANEN, M.; HAVERINEN, J. Seasonality of glycogen phosphorylase activity in crucian carp (*Carassius carassius* L.). **Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 181, n. 7, p. 917–926, out. 2011.

WEN, B.; JIN, S.-R.; CHEN, Z.-Z.; GAO, J.-Z. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics. **Science of The Total**

**Environment**, v. 640–641, p. 1372–1381, nov. 2018.  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.401>.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.** 77:325-333. 1981.

WENDELAAR BONGA, S. E. (1997). The stress response in fish. **Physiological Reviews** 77, 591– 625. 1997.

WICKHAM, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016. KASSAMBARA, A. MUNDT, F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.6. <https://CRAN.Rproject.org/package=factoextra>. 2019.

WILHELM FILHO, D. Fish antioxidant defenses--a comparative approach. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 29, n. 12, p. 1735–1742, 1996.

WILSON, R. P. Utilization of dietary carbohydrate by fish. **Aquaculture**, v. 124, n. 1–4, p. 67–80, jul. 1994. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90363-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90363-8).

WINDISCH, H. S.; FRICKENHAUS, S.; JOHN, U.; KNUST, R.; PÖRTNER, H.-O.; LUCASSEN, M. Stress response or beneficial temperature acclimation: transcriptomic signatures in Antarctic fish (*Pachycara brachycephalum* ). **Molecular Ecology**, v. 23, n. 14, p. 3469–3482, jul. 2014. <https://doi.org/10.1111/mec.12822>.

WINDISCH, Heidrun Sigrid; KATHÖVER, R.; PÖRTNER, H.-O.; FRICKENHAUS, S.; LUCASSEN, M. Thermal acclimation in Antarctic fish: transcriptomic profiling of metabolic pathways. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 301, n. 5, p. R1453–R1466, nov. 2011. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00158.2011>.

ZEBRAL, Y. D.; DA SILVA FONSECA, J.; ROZA, M.; COSTA, P. G.; ROBALDO, R. B.; BIANCHINI, A. Combining elevated temperature with waterborne copper: Impacts on the energy metabolism of the killifish *Poecilia vivipara*. **Chemosphere**, v. 253, p. 126631, 1 ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126631>.

ZHOU, M.; WANG, A.-L.; XIAN, J.-A. Variation of free amino acid and carbohydrate concentrations in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Effects of continuous cold stress. **Aquaculture**, v. 317, n. 1, p. 182–186, 4 jul. 2011.

## APÊNDICE 1 – Número de amostras utilizadas para análises enzimáticas

**TABELA S1** - Número de amostras utilizada para cada análise de biomarcadores do sistema de defesa antioxidante e marcadores de dano para os três órgãos (brânquias, fígado e rim) nos tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 48h nas temperaturas de controle (21°C) e choque térmico (31°C). SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutathiona peroxidase; GSH – glutathiona reduzida; GR - glutathiona redutase; GST – glutathiona-s-transferase; LPO – lipoperoxidação e PCO – carbolinação de proteínas.

Biomarcador	Tempo (h)	Brânquias		Fígado		Rim	
		21°C	31°C	21°C	31°C	21°C	31°C
SOD	2	8	9	10	9	10	7
	6	8	10	10	10	8	8
	12	10	10	10	9	11	11
	24	8	10	10	8	10	5
	48	9	10	10	10	7	12
CAT	2	9	7	10	8	11	8
	6	10	10	10	10	10	9
	12	10	10	9	8	11	11
	24	10	10	8	8	12	7
	48	10	10	9	10	6	12
GPx	2	3	7	7	6	11	8
	6	8	9	10	8	10	10
	12	9	10	9	4	11	11
	24	10	10	5	9	12	7
	48	10	10	6	7	7	12
GSH	2	10	9	10	9	11	8
	6	10	9	10	10	9	9
	12	10	10	10	10	10	11
	24	10	10	10	8	12	7
	48	10	10	9	10	7	12
GR	2	10	9	10	9	9	8
	6	10	10	10	10	10	9
	12	10	10	10	9	7	9
	24	10	10	10	8	10	7
	48	10	10	10	10	7	12
GST	2	10	7	10	9	9	8
	6	9	9	10	10	10	10
	12	7	8	10	10	10	11
	24	6	10	10	8	11	7
	48	5	10	9	10	7	12
LPO	2	10	9	10	7	11	8
	6	10	10	8	9	10	10
	12	10	10	10	9	11	11
	24	10	10	5	5	12	7
	48	10	10	7	8	7	11
PCO	2	5	8	10	9	-	-
	6	8	6	10	10	-	-
	12	10	10	10	10	-	-
	24	10	10	10	8	-	-
	48	10	10	10	10	-	-

**TABELA S2** - Número de amostras utilizada para cada análise do metabolismo energético de carboidrato para os três órgãos (brânquias, fígado e rim) nos tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 48h nas temperaturas de controle (21°C) e choque térmico (31°C). GP – glicogênio fosforilase; G6Pase – glicose-6-fosfatase; HK – hexoquinase. PFK – fosfofrutoquinase; PK – piruvato quinase; G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase; LDH – lactato desidrogenase; CS – citrato sintase e MDH – malato desidrogenase.

Biomarcador	Tempo (h)	Brânquias		Fígado		Rim	
		21°C	31°C	21°C	31°C	21°C	31°C
GP	2	-	-	7	5	-	-
	6	-	-	7	9	-	-
	12	-	-	9	10	-	-
	24	-	-	10	5	-	-
	48	-	-	8	10	-	-
G6Pase	2	-	-	10	7	6	4
	6	-	-	10	10	6	4
	12	-	-	10	10	6	7
	24	-	-	7	8	6	7
	48	-	-	10	5	9	7
HK	2	10	9	5	4	10	8
	6	10	10	8	10	10	8
	12	10	10	6	7	11	10
	24	10	10	7	9	12	10
	48	10	10	5	9	9	9
PFK	2	10	9	10	9	10	8
	6	9	10	10	10	10	10
	12	10	10	10	10	11	10
	24	10	9	10	8	12	9
	48	10	10	8	10	10	9
PK	2	9	8	9	9	9	8
	6	8	8	10	9	10	9
	12	7	7	10	9	11	10
	24	5	8	10	8	12	9
	48	8	8	6	10	10	9
G6PDH	2	10	9	10	9	9	7
	6	10	10	10	10	10	9
	12	9	8	10	10	10	8
	24	8	9	10	10	12	8
	48	8	10	8	10	9	9
LDH	2	9	9	9	8	11	8
	6	10	10	10	10	10	8
	12	10	10	10	9	10	10
	24	10	10	10	8	12	9
	48	10	10	8	10	10	9
CS	2	10	8	10	9	11	8
	6	10	10	10	10	10	10
	12	10	9	10	10	11	10
	24	10	10	10	8	12	10
	48	10	9	8	10	10	9
MDH	2	10	9	10	9	10	8

<b>6</b>	10	10	10	10	10	8
<b>12</b>	10	10	10	10	11	10
<b>24</b>	10	10	10	10	12	9
<b>48</b>	10	10	8	10	10	9

**TABELA S3** - Número de amostras utilizada para cada análise do metabolismo energético de proteínas para os três órgãos (brânquias, fígado e rim) nos tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 48h nas temperaturas de controle (21°C) e choque térmico (31°C). GLDH – glutamato desidrogenase; AST – aspartato aminotransferase e ALT – alanina aminotransferase.

<b>Biomarcador</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Brânquias</b>		<b>Fígado</b>		<b>Rim</b>	
		21°C	31°C	21°C	31°C	21°C	31°C
<b>GLDH</b>	<b>2</b>	8	7	9	9	11	8
	<b>6</b>	8	9	10	10	10	8
	<b>12</b>	6	9	9	10	10	10
	<b>24</b>	4	5	10	10	12	10
	<b>48</b>	4	5	8	10	10	9
<b>AST</b>	<b>2</b>	10	9	10	9	10	8
	<b>6</b>	10	9	10	10	9	9
	<b>12</b>	6	10	10	10	11	10
	<b>24</b>	9	10	10	10	12	10
	<b>48</b>	7	9	10	10	10	12
<b>ALT</b>	<b>2</b>	10	9	10	8	10	8
	<b>6</b>	10	10	9	10	7	8
	<b>12</b>	10	10	8	10	11	9
	<b>24</b>	10	10	7	9	12	10
	<b>48</b>	9	10	10	9	9	9