

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO MAURO CARNEIRO PEREIRA

A VARIAÇÃO NA TEMPERATURA DA ÁGUA AFETA O SUPRIMENTO DE
ENERGIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM MÚSCULO DE *Astyanax lacustris*
(LÜTKEN, 1875)?

CURITIBA

2021

DIEGO MAURO CARNEIRO PEREIRA

A VARIAÇÃO NA TEMPERATURA DA ÁGUA AFETA O SUPRIMENTO DE
ENERGIA E ESTRESSE OXIDATIVO EM MÚSCULO DE *Astyanax lacustris*
(LÜTKEN, 1875)?

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Rosa Dmengeon Pedreiro de Souza

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Pereira, Diego Mauro Carneiro

A variação na temperatura da água afeta o suprimento de energia e estresse oxidativo em músculo de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)? / Diego Mauro Carneiro Pereira. – Curitiba, 2021.

91 p.: 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 Biologia Celular e Molecular.

1. Biomarcadores. 2. Metabolismo energético. 3. Enzimas. 4. Resposta ao choque térmico. I. Título. II. Donatti, Lucélia, 1964-. III. Pedreiro, Maria Rosa Dmengeon, 1987-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 572.43



ATA Nº490

**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE MESTRADO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

No dia vinte e cinco de agosto de dois mil e vinte e um às 14:00 horas, na sala online, defesa remota, foram instaladas as atividades pertinentes ao rito de defesa de dissertação do mestrando **DIEGO MAURO CARNEIRO PEREIRA**, intitulada: **A variação na temperatura da água afeta o suprimento de energia e estresse oxidativo em músculo de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)?**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI. A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: LUCELIA DONATTI (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ), SILVIA ROMÃO (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL), TATIANA HERRERIAS (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE). A presidência iniciou os ritos definidos pelo Colegiado do Programa e, após exarados os pareceres dos membros do comitê examinador e da respectiva contra argumentação, ocorreu a leitura do parecer final da banca examinadora, que decidiu pela APROVAÇÃO. Este resultado deverá ser homologado pelo Colegiado do programa, mediante o atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca dentro dos prazos regimentais definidos pelo programa. A outorga de título de mestre está condicionada ao atendimento de todos os requisitos e prazos determinados no regimento do Programa de Pós-Graduação. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, LUCELIA DONATTI, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão Examinadora.

CURITIBA, 25 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 12:17:53.0

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/08/2021 21:38:55.0

SILVIA ROMÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

Assinatura Eletrônica

27/08/2021 10:21:16.0

TATIANA HERRERIAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)



1 TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **DIEGO MAURO CARNEIRO PEREIRA** intitulada: **A variação na temperatura da água afeta o suprimento de energia e estresse oxidativo em músculo de *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875)?**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI, que após terem inquirido o aluno 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, 25 de Agosto de 2021.

Assinatura Eletrônica

26/08/2021 12:17:53.0

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

27/08/2021 21:38:55.0

SILVIA ROMÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

Assinatura Eletrônica

27/08/2021 10:21:16.0

TATIANA HERRERIAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE)

Dedico este trabalho para algum cientista do futuro, que ao ler se cativa ao perceber que amontoados de moléculas fazem muito mais do que elas por si só significariam. Este verá que, o significado da realidade, se ela existir, não está nas características isoladas, mas sim em suas interações.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família, essencialmente aos meus pais que me apoiaram nessa nova jornada, sem saber muito o que isso significava. Minha mãe que no início relutava em ver seu filho saindo da cidade, mas que depois gostou da ideia e esteve comigo me inspirando a continuar e a fazer o meu melhor.

À minha orientadora Lucélia Donatti, que me proporcionou essa oportunidade nesta linha de pesquisa, que confiou e acreditou em mim, que me fez ver que eu sempre pude um pouco mais. Acho que ela viu mais potencial em mim do que eu mesmo e sou grato por isso. Isso me motivou a correr atrás de tudo aquilo que eu queria aprender e tornar essa jornada uma caminhada de imenso aprendizado.

À minha coorientadora Maria Rosa Dmengeon Pedreiro de Souza e a professora Sílvia Romão, que me ensinaram o que eu ia precisar para conduzir as análises do mestrado. Me passaram diversas dicas e ensinamentos, que tornaram a minha pesquisa muito mais clara.

A meus amigos do laboratório, que passaram comigo árduas jornadas que incluíam ficar até tarde no laboratório, repetir análises que não deram certo e aprender coisas as novas todo o tempo. Mas o mais importante, os bons momentos que me proporcionaram além do laboratório, as risadas, as brincadeiras, o companheirismo e tudo mais, me mostrando que a vida no laboratório vai além do pipetar. Obrigado Anna Resende, Ananda Neundorf, Guilherme Carster e Ieda Scheleger, fico feliz em saber que tive uma ótima equipe para me apoiar.

Aos amigos que a Universidade me proporcionou, Matheus Zazula que sempre foi um companheiro desde a primeira disciplina que fizemos juntos. Hanna da Justa, a menina ex-brava, Nayane Polli e Pedro Schluga que forneceram o gelo essencial para as nossas análises, entendendo a nossa demanda e auxiliando com muita parceria.

Aos meus amigos que vieram desde a graduação e continuaram presentes no meu mestrado. Meu parceiro Alessandro Sloty, que esteve presente durante a

realização dos experimentos de bioensaios e Jonathan Ratko, que me deu suporte quando precisei em vários momentos durante a construção da dissertação.

Ao Centro de Pesquisas e Extensão em Aquicultura Ildo Zago, situado no município de União da Vitória-PR, pelo apoio logístico durante a realização dos bioensaios.

Ao programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e a Universidade Federal do Paraná pela infraestrutura e aos seus professores que contribuíram para a minha formação.

À agência de fomento CAPES pela concessão de bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, à banca examinadora por aceitarem o convite e por todas as significativas contribuições para esta dissertação.

Nós somos uma maneira de o cosmos se autoconhecer.

- Carl Sagan

RESUMO

A temperatura é um importante fator que condiciona as respostas fisiológicas dos peixes, gerando uma condição estressante quando em parâmetros não ideais. Neste contexto, peixes representam uma boa ferramenta de estudo tendo em vista as alterações naturais, perturbações antrópicas locais e as alterações climáticas estimadas que alteram a dinâmica da água, afetando diretamente estes animais. Assim, objetivou-se avaliar o metabolismo de carboidratos de proteínas e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo no músculo do peixe *Astyanax lacustris* proveniente de lagos artificiais da região da bacia do rio Iguaçu, submetido a choque térmico. Os espécimes ($n = 240$) foram submetidos aos regimes de tempo de 2, 6, 12, 24, 48, e 96 horas sob baixa ($15 \pm 1^\circ\text{C}$) e alta temperatura ($31 \pm 1^\circ\text{C}$), com seus respectivos controles ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e um $n = 10$ por grupo experimental. A baixa temperatura reduziu a atividade da glicogênio fosforilase (GP) e os níveis de piruvato em 2h e lactato em 6h. Isso pode indicar uma redução da glicólise nos períodos iniciais do estresse. A diminuição do piruvato também ocorre em 24h, podendo estar associado ao ciclo de Cori. Posteriormente houve um aumento da atividade da GP em 12h, aumento dos níveis de piruvato em 48h e da atividade da hexoquinase (HK) em 96h. Isso indica um aumento da demanda energética depois das horas iniciais do choque térmico. Não houve alterações do metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs para alta temperatura, essa ausência de alterações pode estar ligada a outro mecanismo para suprir as necessidades energéticas, como a utilização da fosfocreatina quinase. Em relação ao metabolismo de proteínas para 15°C , não houve alterações para glutamato desidrogenase (GLDH), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) ou transaminase glutâmico pirúvica (TGP). Essa ausência de alterações pode estar relacionada com uma compensação do metabolismo de carboidratos ou lipídico. Em 31°C houve redução da atividade da TGO em 2 e 96h e da TGP em 2h, que teve posterior aumento em 48h. Isso pode demonstrar, uma baixa necessidade o peixe por esta via metabólica. Em relação ao estresse oxidativo em 15°C , houve aumento da atividade da glutathiona redutase (GR) em 2 e 6h com posterior redução em 24 e 48h. Em relação a danos em proteínas através da observação de proteínas carboniladas (PCO), houve aumento de nível em 6h. Isso indica uma indução de estresse para músculo de *A. lacustris* expostos a 15°C . Em 31°C foi observado um aumento pontual dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em 24h. Desta maneira, é possível inferir que a temperatura baixa foi mais estressante em músculo de *A. lacustris*. A partir disso, é possível concluir que o choque térmico agudo pode afetar o metabolismo do músculo de *A. lacustris*, que em determinadas situações promove alterações nas vias metabólicas.

Palavras-chave: Biomarcadores. Metabolismo energético. Enzimas. Choque térmico.

ABSTRACT

Temperature is an important factor that conditions the physiological responses of fish, generating a stressful condition when in non-ideal parameters. In this context, fish represent a good study model in view of natural changes, local anthropogenic disturbances and estimated climate changes that alter the water dynamics, directly affecting these animals. Thus, the objective was to evaluate the carbohydrates metabolism from proteins and parameters related to oxidative stress in the muscle of the fish *Astyanax lacustris* from artificial lakes in the region of the Iguaçu river basin, submitted to thermal shock. The specimens ($n = 240$) were subjected to the time regimes of 2, 6, 12, 24, 48, and 96 hours under low ($15 \pm 1^\circ\text{C}$) and high temperature ($31 \pm 1^\circ\text{C}$), with their respective controls ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) and a $n = 10$ per experimental group. The low temperature reduced the activity of glycogen phosphorylase (GP) and the levels of pyruvate in 2h and lactate in 6h. This may indicate a reduction in glycolysis in the initial periods of stress. The decrease in pyruvate also occurs within 24 hours and may be associated with the Cori cycle. Subsequently, there was an increase in GP activity in 12h, increase in pyruvate levels in 48h and increase in hexokinase (HK) activity in 96h. This indicates an increase in energy demand after the initial hours of the thermal shock. There were no changes in carbohydrate metabolism and high temperature Krebs cycle, this absence of changes may be linked to another mechanism to meet energy needs, such as the use of phosphocreatine kinase. Regarding protein metabolism at 15°C , there were no changes for glutamate dehydrogenase (GLDH), glutamic oxaloacetic transaminase (TGO) or glutamic pyruvic transaminase (TGP). This absence of alterations may be related to a compensation of carbohydrate or lipid metabolism. At 31°C there was a reduction in the activity of TGO in 2 and 96h and of TGP in 2h, which had a subsequent increase in 48h. This may demonstrate a low necessity for this metabolic pathway in the fish. Regarding oxidative stress at 15°C , there was an increase in glutathione reductase (GR) activity at 2 and 6 hours with a subsequent reduction at 24 and 48 hours. Regarding protein damage through the observation of carbonyl proteins (PCO), there was only an increase in level in 6h. This indicates an induction of stress for *A. lacustris* muscle exposed to 15°C . At 31°C a punctual increase in reduced glutathione (GSH) levels was observed within 24 hours. Thus, it is possible to infer that low temperature was more stressful on *A. lacustris* muscle. From this, it is possible to conclude that the acute thermal shock can affect the metabolism of the *A. lacustris* muscle, which in certain situations promotes alterations in the metabolic pathways.

Keywords: Biomarkers. Energy metabolism enzymes. Thermal shock

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – FATORES QUE INFLUENCIAM O FENÓTIPO DO ESTRESSE	20
FIGURA 2 - VIAS METABÓLICAS.....	30
FIGURA 3 – MAPA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE <i>Astyanax lacustris</i>	32
FIGURA 4 – EXEMPLARES DE <i>Astyanax lacustris</i>	33
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO DESIGN EXPERIMENTAL E DO PROCESSAMENTO LABORATORIAL.....	36
FIGURA 6 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS EM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA.....	46
FIGURA 7 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS EM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA.....	48
FIGURA 8 – NÍVEIS DE METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS E GLICOGÊNIO EM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA	50
FIGURA 9 – NÍVEIS DE METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS E GLICOGÊNIO EM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA.....	51
FIGURA 10 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA	52
FIGURA 11 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA	53
FIGURA 12 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE, PCO E GSH EM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA	55
FIGURA 13– ATIVIDADES DAS ENZIMAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE, PCO E GSH EM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA.....	57
FIGURA 14 - IBR DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS PARA BAIXA TEMPERATURA.....	59
FIGURA 15 - IBR DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS PARA ALTA TEMPERATURA.....	60
FIGURA 16 - IBR DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS E CICLO DE KREBS PARA BAIXA TEMPERATURA.....	62
FIGURA 17 - IBR DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS E CICLO DE KREBS PARA ALTA TEMPERATURA.....	63

FIGURA 18 - IBR DA DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS CELULARES PARA BAIXA TEMPERATURA.....	64
FIGURA 19 - IBR DA DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS CELULARES PARA ALTA TEMPERATURA.....	66
FIGURA 20 - ALTERAÇÕES PARA INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E TEMPO	66

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS.....	38
TABELA 2 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS E GLICOGÊNIO.....	39
TABELA 3 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS	39
TABELA 4 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DEFESA ANTIOXIDANTE	40
TABELA 5 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE DANOS CELULARES E GSH.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA - Análise de variância
AMP - Adenosina monofosfato
ATP - Adenosina trifosfato
BSA - Albumina de soro bovina
CAT - Catalase
CoA - Coenzima A
CS - Citrato sintase
CT - Comprimento total
CTmax - Critical thermal maximum (temperatura crítica máxima)
DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DTNB - 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs - Espécies reativas de oxigênio
g - Aceleração da gravidade
g - Gramas (unidade de massa)
GAP - Gliceraldeído-3-fosfato
G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPDH - glicerolfosfato desidrogenase
GPx - Glutathione peroxidase
GR - Glutathione reductase
GSH - Glutathione reduzida
GSSG - Glutathione dissulfeto
GST - Glutathione-S-transferase
h - Horas
HCl - Ácido clorídrico
HK - Hexoquinase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
Hsp - Heat shock proteins (proteínas de choque térmico)
K⁺ - Íon potássio
KCl - Cloreto de potássio
L - Litro.
LDH - Lactato desidrogenase

LPO - Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
MDA - Malondialdeído
MDH - Malato desidrogenase
mg - Miligrama
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
Min – minuto (os)
mM - Milimolar
mRNA – Messenger Ribonucleic Acid (RNA mensageiro)
m v⁻¹ - Proporção massa sobre volume
n - Número de espécimes por experimento
Na⁺ - Íon sódio
NaCl - Cloreto de sódio
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT - Nitroblue tetrazolium (Azul de nitrotetrazólio)
nm - Nanômetro O - Oxigênio livre
O₂ - Oxigênio molecular
OH⁻ Radical hidroxila
PFK - Fosfofrutoquinase
pH - Potencial Hidrogeniônico
PK - Piruvato quinase
SEM - Standard error of mean (Erro padrão da média)
SOD - Superóxido dismutase
TCA - Ácido tricloroacético
TPI - Triose fosfato isomerase
U - Unidade internacional
UFPR - Universidade Federal do Paraná
µg - Microgramas
µL - Microlitro
µmol – Micromol

SUMÁRIO

1 TERMO DE APROVAÇÃO	2
2 INTRODUÇÃO	16
2.1 OBJETIVOS	17
2.1.1 Objetivo geral	17
2.1.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1 ESTRESSE TÉRMICO EM PEIXES	19
3.2 METABOLISMO E MÚSCULO ESQUELÉTICO	22
Metabolismo de carboidratos em peixes e estresse térmico	23
2.2.2 Metabolismo de proteínas em peixes	25
3.2.1 Defesa antioxidante e danos celulares.....	27
3.3 BACIA HIDROGRÁFICA E ESPÉCIE DO ESTUDO.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 AMOSTRAGEM E ACLIMATAÇÃO	34
4.2 EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO	34
4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	37
4.3.1 Metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs	37
4.3.2 Metabólitos intermediários e glicogênio	38
4.3.3 Metabolismo de proteínas	39
4.3.4 Defesa antioxidante	40
4.3.5 Danos celulares e GSH.....	40
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA.....	41
5 RESULTADOS	44
5.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO PARA INTERAÇÃO ENTRE AS TEMPERATURAS E TEMPOS.....	44
5.1.1 Efeitos do choque térmico de baixa e alta temperatura no metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs	45
5.1.1.1 Baixa temperatura (15 °C).....	45
5.1.1.2 Alta temperatura (31 °C).....	47
5.1.2 Efeitos do choque térmico de baixa e alta temperatura nos metabólitos intermediários e glicogênio.....	49
5.1.2.1 Baixa temperatura (15 °C).....	49

5.1.2.2 Alta temperatura (31 °C).....	50
5.1.3 Efeitos do choque térmico de baixa e alta temperatura no metabolismo de proteínas.....	51
5.1.3.1 Baixa temperatura (15 °C).....	51
5.1.3.2 Alta temperatura (31 °C).....	52
5.1.4 Efeitos do choque térmico de baixa e alta temperatura na defesa antioxidante e danos celulares	53
5.1.4.1 Baixa temperatura (15 °C).....	54
5.1.4.2 Alta temperatura (31 °C).....	56
5.2 ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTAS DE BIOMARCADORES.....	58
5.2.1 IBR para baixa e alta temperatura no metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs 58	
5.2.2 IBR para baixa e alta temperatura no metabolismo de proteínas e ciclo de Krebs 61	
5.2.3 IBR para baixa e alta temperatura na defesa antioxidante e danos celulares .	64
6 DISCUSSÃO	68
6.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, CICLO DE KREBS, METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS E GLICOGÊNIO.....	68
6.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS	70
6.3 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NA DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS CELULARES.....	72
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICE 1- INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DA RAÇÃO	90

2 INTRODUÇÃO

As características físicas da água como alto calor específico e condutividade térmica, determinam uma equivalência corporal dos organismos com seu habitat. Organismos de ambientes aquáticos toleram uma baixa variação na temperatura em relação a faixa máxima de variação que eles já experimentam no meio em que habitam (TOMANEK, 2010; LOGAN; BUCKLEY, 2015). Neste sentido, a temperatura condiciona a taxa em que as reações ocorrem podendo gerar uma condição ambiental estressante (FEDER; HOFMANN, 1999; SCHRECK; TORT, 2016).

O estresse é um evento ou condição externa que gera tensão em um organismo que leva a uma resposta que envolve gasto de energia para remover ou reduzir seus efeitos (COLLIER et al., 2017). O desenvolvimento dos peixes pode ser comprometido pelo estresse com alterações no metabolismo e fisiologia (CHOWDHURY; SAIKIA, 2020), gerando diversos efeitos negativos na saúde destes animais. As alterações incluem dificuldades no suprimento da demanda de oxigênio dos tecidos e alterações no metabolismo energético, de lipídios, de aminoácidos e de nucleotídeos (PORTNER; KNUST, 2007; LIU et al., 2019).

Espécies ecologicamente mais ativas possuem maior dificuldade para tolerar ou aclimatar-se em novas condições térmicas quando comparadas com espécies sedentárias que possuem características que aumentam sua resistência. Neste contexto, é proposto que espécies da família do peixe do presente estudo *Characidae* (mais ativas) são mais vulneráveis em uma perspectiva de mudanças climáticas (CAMPOS et al., 2018, 2019). O custo energético de uma alta atividade e a manutenção da homeostase deve diminuir a capacidade energética para controlar as variações térmicas que surjam (CAMPOS et al., 2019).

Para responder a variações de temperatura os peixes podem mudar seu comportamento, movendo-se para uma área com temperatura da água adequada para suas funções fisiológicas. Alguns peixes migram dependendo de sua necessidade em relação ao seu ciclo de vida. Entretanto, peixes que não possuem grandes habilidades natatórias para migração são forçados a se adaptar a sua temperatura ambiental, mesmo quando as flutuações são grandes (SOYANO; MUSHIROBIRA, 2018).

Alterações agudas na temperatura da água são observadas na aquicultura e causam grandes perdas econômicas (PANASE et al., 2018; SONG et al., 2019). Além

disso, o aumento de temperatura pode interferir de forma interespecífica em relação ao crescimento. Exemplos relatam aumento do crescimento para algumas espécies (O'GORMAN et al., 2016; HUSS et al., 2019), mas também é documentada uma ação estressora prejudicial. A produtividade de populações, incluindo uma perda no aumento da biomassa produzida pelos peixes é afetada (FICKE et al., 2007; DORST, VAN et al., 2019). Isso pode refletir em danos em relação a biodiversidade, além de impactar na pesca artesanal, recreativa e comercial, com possíveis efeitos no setor econômico (FICKE et al., 2007). Alternativamente, a exposição estressora a baixas temperaturas também provoca efeitos danosos, como uma redução nos níveis de ácidos graxos não esterificados, glicose e fluxo de oxigênio nos peixes (HAMAN et al., 1997), mesmo que não interfira diretamente em parâmetros externos.

Os peixes estão sujeitos a variações de temperatura constantemente e essa variação pode ter efeito estressante. Levando isto em consideração, este trabalho objetiva analisar quais os efeitos do estresse térmico agudo (2 a 96h) de alta e baixa temperatura no metabolismo e na defesa antioxidante de *Astyanax lacustris*.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

Avaliar parâmetros do metabolismo de carboidratos e proteínas e de estresse oxidativo no músculo do peixe subtropical *Astyanax lacustris* submetido a choque térmico de baixa (15°C) e alta (31°C) temperatura durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição.

2.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar variações nos níveis de enzimas do metabolismo de carboidratos: glicogênio fosforilase (GP), hexoquinase (HK); fosfofrutoquinase (PFK); piruvato quinase (PK); lactato desidrogenase (LDH); e do ciclo de Krebs: citrato sintase (CS) e malato desidrogenase (MDH) no músculo branco de *A. lacustris* submetidos a choque térmico de baixa (15°C) e alta (31°C) temperatura durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição.

- Analisar variações na atividade das enzimas do metabolismo de proteínas: AST transaminase, ALT (TGO) e glutamato desidrogenase (GLDH) no músculo branco de *A. lacustris* submetidos a choque térmico de baixa (15°C) e alta (31°C) temperatura durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição.
- Verificar os níveis dos marcadores metabólicos: glicogênio, lactato e piruvato no músculo branco de *A. lacustris* submetidos a choque térmico de baixa (15°C) e alta (31°C) temperatura durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição.
- Quantificar a atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa-s-transferase (GST), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no músculo de *A. lacustris* submetidos a choque térmico de baixa (15°C) e alta (31°C) temperatura durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição.
- Avaliar os níveis de marcadores de dano oxidativo: peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PCO), além de verificar o nível de glutationa reduzida (GSH) no músculo branco de *A. lacustris* submetidos a choque térmico de baixa (15°C) e alta (31°C) temperatura durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição.
- Analisar o Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) para o metabolismo de carboidratos, de proteínas, ciclo de Krebs e defesa antioxidante no músculo branco de *A. lacustris* submetidos a choque térmico de baixa (15°C) e alta (31°C) temperatura durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ESTRESSE TÉRMICO EM PEIXES

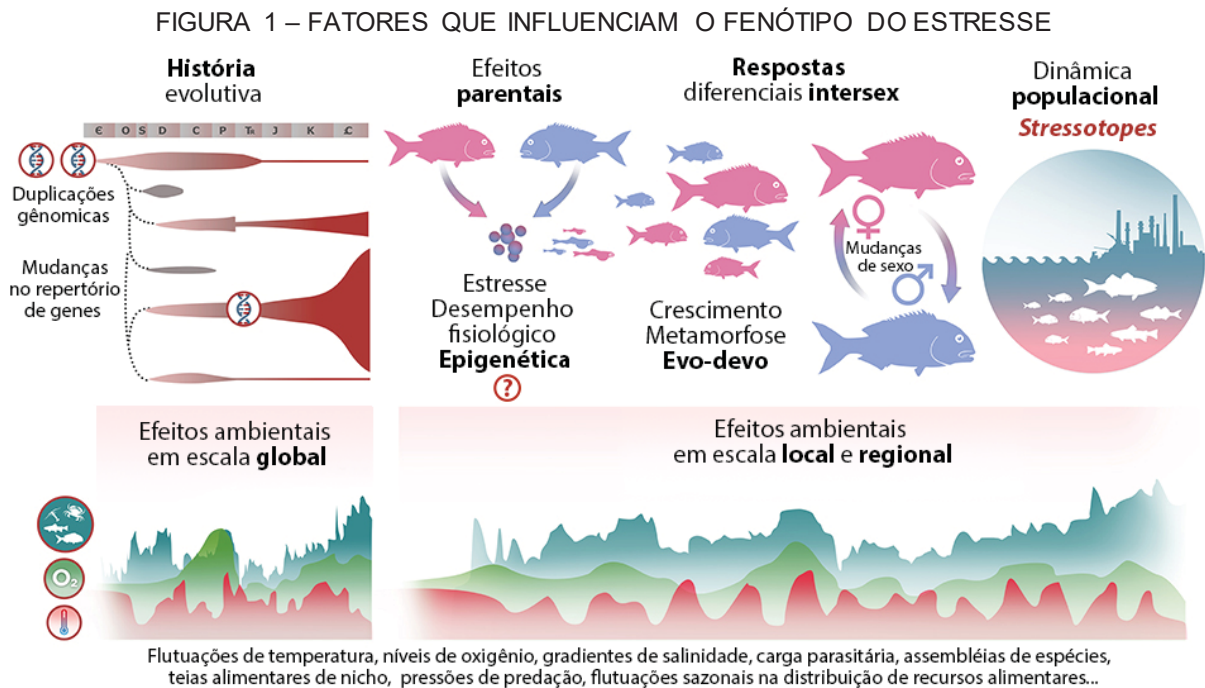
O ambiente físico ou abiótico possui variáveis naturais que podem ser estressores individuais ou em combinação, gerando problemas na performance dos organismos (AKBARZADEH et al., 2018). Existem diferentes sensibilidades e adaptações ao estresse entre populações, sugerindo que a adaptação local pode moldar a resposta ao estresse mesmo em organismos amplamente tolerantes e plásticos (SCHULTE, 2014). Assim novos conceitos foram propostos e um deles é a alostase, um processo que visa estabilidade através da mudança, no qual existe um comportamento dinâmico e mecanismos fisiológicos para antecipar ou lidar com mudanças ambientais e manter a função do organismo (SCHULTE, 2014).

A partir das discussões de alostase, surgiu o conceito de sobrecarga alostática, onde o animal tem consequências fisiológicas negativas quando a demanda energética supera o disponível ou quando existe uma prolongada ativação dos mecanismos alostáticos (SCHULTE, 2014). Várias abordagens surgiram para definir o estresse avaliando se a ideia da homeostase abordava suficientemente a resposta de um organismo a um estressor (SCHULTE, 2014). Desta maneira, a sobrecarga alostática está associada diretamente com consequências prejudiciais no organismo (HÖGLUND et al., 2020). De maneira geral, quando o estresse é sutil pode ter efeitos positivos (*eustress*) e quando árduo pode ter consequências negativas (*distress*) (SCHRECK; TORT, 2016).

A resposta ao estresse pode ser dividida em fase aguda e crônica com base em sua duração. A fase aguda dura de horas a poucos dias e a crônica alcança vários dias ou semanas. O direcionamento da fase aguda para a homeostase ocorre através do sistema nervoso e endócrino, e na fase crônica, existe uma regulação homeorrética, com o suporte do sistema endócrino (COLLIER et al., 2017). A resposta celular ao estresse (CSR – *Cell Stress Response*) está associada as vias do metabolismo energético, atuando em enzimas como glicerol-3-fosfato-desidrogenase (G3PDH), 6-fosfogluconato-desidrogenase (6PDGH), 2-fosfo-D-glicerato hidrolase (enolase), citrato cintase (CS) e isocitrato desidrogenase (IDH). A resposta envolve o controle de vias chave do metabolismo como glicólise, via das pentoses fosfato e ciclo de Krebs. Estas enzimas estão envolvidas com a geração de nicotinamida adenina

dinucleotídeo reduzido (NADH) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) necessários para a geração de ATP e também, na defesa celular antioxidante durante estresse (KÜLTZ, 2005).

Diversas variáveis podem influenciar o fenótipo do estresse nos peixes, sendo a resposta um resultado conjunto da história de vida evolutiva. Essa resposta inclui alterações genéticas em relação ao estresse e mudanças em variáveis estressoras ao longo de tempos geológicos, associadas a dinâmicas de extinção/espeiação através da história da terra. Isto tudo compõe a capacidade evolutiva do sistema biológico e está sujeito a influências ambientais de um biótopo específico (FIGURA 1) (BALASCH; TORT, 2019).



FONTE: Adaptado de BALASCH e TORT (2019)

LEGENDA: O fenótipo é descrito não somente pelo resultado fisiológico de redes de genes, mas também associado a história de vida de cada indivíduo.

Os peixes possuem um sistema de compensação fisiológica para suprir a demanda energética ao lidar com estresse (YANG et al., 2020). Existem mecanismos citoprotetivos, possibilitando que o peixe exerça manutenção celular durante o estresse térmico (TANG et al., 2014). A resposta a nível celular ao estresse inclui marcadores como (I) a proteção de macromoléculas através de chaperonas ou (II) a redistribuição de fontes metabólicas para a resposta ao estresse. Podem existir

também (III) a parada reversível do ciclo celular ou (IV) a morte celular programada (apoptose) (LOGAN; BUCKLEY, 2015), com possibilidade de danos severos.

As implicações do estresse são iniciadas pelo sistema hormonal, compreendendo a produção de corticosteroides (como o cortisol) e catecolaminas (como a adrenalina, noradrenalina e dopamina). Algumas vezes diretamente vinculados aos hormônios citados, são gerados fatores de resposta ao estresse que conduzem a distribuição de fontes de energia e oxigênio para áreas vitais do organismo. Isso também tem impacto no balanço hidromineral e sistema imune. Caso a intensidade do estresse seja baixa, o organismo pode se recompor, porém, exposições repetidas ou prolongadas ao estresse suscitam altos custos energéticos para sua manutenção (BARTON, 2002; SCHRECK; TORT, 2016). Neste caso, as respostas podem afetar de forma negativa o crescimento, desenvolvimento, resistência a doenças, reprodução e comportamento (BARTON, 2002; SCHRECK; TORT, 2016) ou mesmo interferir na sobrevivência (JOY et al., 2017).

Os peixes são em sua maioria ectotérmicos, entretanto existem algumas exceções e variações. Há uma gama de conceitos que podem ser aplicados em diferentes membros deste grupo como poiquilotérmicos, homeotérmicos, heterotérmicos e até endotérmicos (GUDERLEY, 2004; LOGAN; BUCKLEY, 2015; WEGNER et al., 2015; SOYANO; MUSHIROBIRA, 2018). Peixes podem possuir elevada atividade (<0,1% das espécies) com “endotermia em determinadas regiões do corpo” ou endotermia em todo o corpo, representada pelo peixe mesopelágico *Lampris guttatus* (WEGNER et al., 2015). Além disso, a faixa de temperatura que os peixes toleram é variada, sendo atribuído dois grupos principais, os que toleram grande variação de temperatura (euritérmicos) e os que toleram baixa variação de temperatura (estenotérmicos) (LOGAN; BUCKLEY, 2015).

Mudanças na temperatura induzem diversas alterações metabólicas e fisiológicas (JOY et al., 2017). Alterações rápidas na temperatura geram estresse, que pode afetar diretamente a sobrevivência quando em níveis letais ou indiretamente, afetando a imunidade e facilitando a incidência de patógenos sobre estes organismos (MARIANA et al., 2019). Uma mudança aguda na temperatura ocasiona grandes perdas econômicas na indústria da aquicultura (SONG et al., 2019). Os peixes e demais ectotérmicos têm uma boa habilidade em relação a mecanismos para suportar mudanças de temperaturas. Entretanto os mecanismos moleculares envolvidos na adaptação a variações de temperatura ainda são escassos e poucos conhecidos para

peixes. Adicionalmente, os mecanismos para lidar com as alterações de temperatura representam um assunto de crescente interesse no cenário atual e futuro com as emergentes alterações climáticas globais (LIU et al., 2013).

As enzimas possuem atividade ótima a uma determinada faixa de temperatura, que se ultrapassada compromete a função a nível fisiológico (EDDY; HANDY, 2012). Portanto, a temperatura da água está associada com alterações no metabolismo dos peixes (SUN et al., 2019), visto que pode gerar estresse e desencadear respostas que afetam o metabolismo (HARPER; WOLF, 2009; COLLIER et al., 2017). A alta temperatura pode gerar alterações promovendo aumento da demanda energética (DILLON et al., 2010; JOHANSEN et al., 2015) e várias mudanças fisiológicas nos peixes (NAKANO et al., 2014).

Como resposta ao frio, peixes podem reduzir ou cessar sua atividade fisiológica durante o inverno, condição próxima a hibernação, chamada para peixes de dormência para baixa temperatura ou dormência de inverno (SOYANO; MUSHIROBIRA, 2018). Pode ser ativada a expressão de genes envolvidos com o metabolismo de carboidratos (LONG et al., 2012), ou a supressão da taxa metabólica, relatada no peixe *Sebastes schlegelii*. Esta última, observada como uma estratégia para promover a sobrevivência durante o inverno (SONG et al., 2019). Os metabolismos da sucrose, dos glicerolipídeos, dos esfingolipídeos, da arginina e prolina, da glutatona e das pentoses fosfato, demonstram serem bons indicadores do estresse térmico de baixa temperatura (WEN et al., 2018). A baixa temperatura também pode gerar alterações nas capacidades oxidativas, aumento do conteúdo intracelular de lipídios e alterações lipídicas em membranas (GRIM et al., 2013).

3.2 METABOLISMO E MÚSCULO ESQUELÉTICO

O músculo esquelético de peixes apresenta características exclusivas como o crescimento indeterminado e um papel importante como reserva de substratos energéticos. Esse tecido demonstra plasticidade para lidar com alterações anabólicas e catabólicas em resposta a variáveis ambientais como temperatura, fotoperíodo e disponibilidade de alimento (NEMOVA et al., 2021). A adaptação muscular é muito relevante para estes ectodérmicos, levando em consideração que o músculo contribui com cerca de 34-48% da massa total em peixes (MOHANTY et al., 2015). Além disso, pesquisas têm sido executadas analisando o músculo e coração, tendo em vista que

esses sistemas têm maior efeito na performance dos peixes em diferentes temperaturas (EDDY; HANDY, 2012).

Os hormônios liberados em resposta ao estresse (SCHRECK; TORT, 2016), estão envolvidos, dentre outros, no metabolismo de carboidratos (MOMMSEN et al., 1999; SCHRECK; TORT, 2016). Neste metabolismo os hormônios catecolaminas e cortisol atuam redirecionando fontes de energia armazenadas nos órgãos para a circulação sanguínea. A energia pode ser utilizada pelos tecidos, como, por exemplo, na glicogenólise hepática, que libera glicose para o músculo esquelético (SCHRECK; TORT, 2016).

Metabolismo de carboidratos em peixes e estresse térmico

O consumo de carboidratos na dieta pode variar de acordo com a espécie, sendo que peixes onívoros podem consumir grandes quantidades de glicogênio (WU, 2017). O uso de glicogênio no músculo está relacionado com uma rápida disponibilidade de unidades de glicose para própria utilização (SALWAY, 2017). Uma redução no glicogênio indica uma rápida utilização para atingir a demanda energética durante o estresse térmico (CAPPON; NICHOLLS, 1975).

A temperatura foi o principal componente envolvido na assimilação de alimento e síntese de glicogênio em *C. carassius* em virtude da chegada do inverno (VARIS et al., 2016). Sob situações de estresse a via glicolítica pode ser estimulada mobilizando a reserva de carboidratos para suprir futuras necessidades energéticas (ROSSI et al., 2017). *Rhamdia quelen* é um peixe presente em água doce subtropical e temperada. Ao avaliar o glicogênio do músculo branco desta espécie não houve alteração a exposição aguda (12h) em baixa ou alta temperatura (15°C e 31°C), entretanto houve um aumento de glicogênio em exposição crônica (21 dias) (LERMEN et al., 2004). Isto demonstra que o glicogênio pode ser um indicador de alterações em curto ou longo prazo para músculo de peixes.

O glicogênio pode ser utilizado como fonte de energia, sendo a enzima glicogênio fosforilase (GP) um marcador deste fenômeno. A GP realiza a fosforilação do glicogênio levando a formação de glicose-1-fosfato, que então pode ser utilizada nos processos geradores de energia (NELSON et al., 2014). Desta maneira, a GP é considerada uma enzima chave envolvida no catabolismo do glicogênio, devido a sua atuação na primeira etapa da degradação do glicogênio (ZHAO et al., 2014). A inibição inicial da GP é reportada para peixes, indicando a ausência de necessidade elevada

pelo glicogênio, como observado por Yamato (1968), avaliando o músculo esquelético da truta *Salmo gairdneri*, que relatou que a glicose e a adenosina trifosfato (ATP) têm efeitos inibitórios sobre a GP.

A baixa temperatura pode induzir a dormência em peixes, onde temperaturas baixas promovem uma baixa intensidade de ingestão de alimentos. A atividade espontânea nesses peixes diminui quando a temperatura reduz a níveis baixos em relação a temperatura ideal para estes organismos. As respostas em relação ao metabolismo podem variar dependendo da espécie (CRAWSHAW, 1984). Ao examinar a resposta ao frio em relação a dormência no peixe *Carassius carassius*, a atividade da GP mostrou redução de sua atividade no músculo depois de 30 dias em água com temperatura baixa, seguido do aumento da atividade da GP depois de 60 dias em condição de encurtamento da duração do dia e diminuição da temperatura (VARIS et al., 2016).

No metabolismo anaeróbico da glicose, as enzimas hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK) e lactato desidrogenase (LDH) são consideradas marcadores chaves (CARVALHO; FERNANDES, 2008). As enzimas HK, PFK e PK catalisam reações irreversíveis *in vivo*, impedindo seu uso na gliconeogênese, pois realizam reações com grande variação de energia livre negativa (NELSON et al., 2017).

A via glicolítica é controlada para manter o fluxo de glicose e os níveis de ATP constantes. Além do ATP, outros intermediários também necessitam de controle, para executarem outros papéis biossintéticos. A relação entre consumo de ATP, regeneração de NADH, regulações alostéricas em enzimas como a HK, a PFK-1, a PK, e a concentração de outros metabólitos, garante o ajuste na taxa de glicólise (NELSON et al., 2017).

A LDH é uma enzima terminal da glicólise anaeróbia, e desta maneira é utilizada como indicador da capacidade anaeróbica (HOCHACHKA, 1969; CHILDRESS; SOMERO, 1979). A LDH é ativada quando o organismo não consegue suprir a demanda de oxigênio para a oxidação do piruvato, e ocorre a falta de nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD^+), que é então regenerado pelo NADH, através da redução do piruvato em lactato pela LDH (NELSON et al., 2014). A LDH está estritamente relacionada com os metabólitos intermediários lactato e piruvato, pois catalisa a interconversão entre eles. No músculo esquelético a LDH está principalmente associada com a conversão de piruvato em lactato, pois esse tecido

possui baixa pressão parcial de oxigênio e esta é uma maneira do tecido obter energia a partir do lactato produzido (ALMEIDA-VAL et al., 2011).

Para exemplificar, a atividade da CS e citocromo-c oxidase (COX) e o nível de transcritos relacionados com genes aeróbios (CS, citocromo-c oxidase III - COXIII e citocromo-c oxidase IV - COXIV) aumentaram em músculo do peixe *Gasterosteus aculeatus* (esgana-gato) expostos a aclimação ao frio (8°C em relação a alta temperatura de 20°C) (ORCZEWSKA et al., 2010). Em outros organismos aquáticos expostos a diferentes temperaturas, a HK e a PK demonstraram atividades mais baixas quando expostos a temperatura baixa (LESSER; KRUSE, 2004; GUO et al., 2010). Portanto, é relevante avaliar o comportamento destas enzimas em diferentes momentos do tempo. Essas alterações podem ocorrer em horários específicos e serem revertidas, provavelmente visando a melhor adaptação do organismo ao estresse.

2.2.2 Metabolismo de proteínas em peixes

O conhecimento do metabolismo proteico dos peixes tem grande relevância, visto que estes animais utilizam de forma preferencial proteínas e aminoácidos de maneira nutritiva, para obtenção de energia (WAARDE, VAN, 1983; BOMBARDELLI et al., 2004). O metabolismo de proteínas nos peixes tem diferenças em relação ao dos mamíferos, isto é, no músculo de teleósteos o glutamato originado da glutamina é oxidado pela glutamato desidrogenase (GLDH). O glutamato exógeno, por sua vez, é oxidado principalmente pela aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacética (AST/TGO), sendo completada através da enzima málica, formando piruvato (CHAMBERLIN et al., 1991).

O glutamato constitui grande parte dos aminoácidos nos peixes, sendo muito importante para otimizar a saúde destes animais, e representa um combustível metabólico essencial em tecidos como músculo esquelético, fígado, rim e intestino (LI et al., 2020). É reportado uma alta oxidação desse aminoácido no músculo de *Danio rerio* (zebrafish) e *Hybrid Striped Bas* (HSB) (JIA et al., 2017). O glutamato, a glutamina e a leucina, são responsáveis por cerca de 80% da produção de ATP no fígado, intestino proximal, rim e músculo esquelético de zebrafish (onívoro) e HSB (carnívoro) (JIA et al., 2017). O efeito da oxidação das proteínas é a produção de uma excreção nitrogenada na forma de amônia. A ureia em menor quantidade, é produzida

através da uricólise. A amônia pode ser produzida é o fígado, através da transaminação e hidrólise de aminas (executadas pela AST/TGO e alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica - ALT/TGP - por exemplo). Uma quantidade menor é produzida no músculo esquelético pelo ciclo nucleotídeo purina, quando este está ativado (WAARDE, VAN, 1983).

No músculo de animais em geral, é documentado que o ciclo de nucleotídeo purinas tem uma variação de energia livre negativa, determinando que ele ocorra no sentido da desaminação oxidativa do glutamato. Enquanto que para a GLDH, a variação da energia livre é positiva, ocorrendo no sentido de realizar a aminação redutiva do alfa-cetoglutarato (LOWENSTEIN, 1972). Em peixes, a GLDH tem sua função reportada como um marcador e regulador do catabolismo de proteínas e a geração de amônia, entretanto, a informação sobre a função biológica da GLDH em animais aquáticos é limitada (LIU et al., 2012).

Em goldfish (*Carassius auratus*), o glutamato mitocondrial do músculo vermelho é oxidado via transaminases glutamato-oxaloacetato, gerando aspartato (WAARDE et al., 1982). No fígado de peixes, a GLDH atua na produção de amônia somente em situação aeróbica, já no músculo essa produção ocorre em situação aeróbica e anaeróbica de forma predominante pelo ciclo de nucleotídeos purinas (LOWENSTEIN, 1972; WAARDE et al., 1982). Embora a expressão de GLDH seja menor, é documentada a sua expressão e atividade em músculo de peixes, associando-se ao metabolismo de proteínas (CHAMBERLIN et al., 1991; LIU et al., 2012). Portanto, esta característica pode ser variável dependendo da espécie. É reportado que a baixa temperatura pode induzir desnaturação em proteínas (FEIDANTSIS et al., 2015; MADEIRA et al., 2016) e isso pode afetar o metabolismo como um todo.

No músculo branco da truta *Salmo gairdner* houve alterações na atividade da ALT em relação a temperatura, entretanto a AST não foi afetada por esta condição (JÜRS, 1979). A longo prazo (24 dias) a resposta ao estresse térmico alterou a proteólise de zebrafish, sendo regulada positivamente em estresse de baixa temperatura (18°C) e negativamente em alta temperatura (34°C) comparadas com o controle (26°C) (VERGAUWEN et al., 2010).

No músculo branco de tilápia (*Oreochromis aureus*) submetida a aclimatização térmica, os níveis de AST e ALT citosólica aumentaram em alta temperatura, enquanto houve uma redução da AST e ALT mitocondrial em alta

temperatura comparada com baixa temperatura (YOUNIS, 2015). Informações sobre a GLDH em animais aquáticos é limitada (LIU et al., 2012). Esta enzima no músculo realiza aaminação redutiva do alfa-cetoglutarato (LOWENSTEIN, 1972). Sua expressão é documentada em músculo de peixes, associando-se ao metabolismo de proteínas (CHAMBERLIN et al., 1991; LIU et al., 2012).

3.2.1 Defesa antioxidante e danos celulares

O oxigênio é essencial para os processos metabólicos e vital para a vida aeróbica, entretanto, ele também é deletério e oferece riscos. O oxigênio molecular é formado por dois átomos de oxigênio e possui dois elétrons não pareados, propriedade que permite que o oxigênio participe de reações de oxidação e redução. A enzima citocromo oxidase da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria, realiza a redução tetravalente do oxigênio formando água. Entretanto, quando a redução ocorre de maneira monovalente outros intermediários reativos são formados como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH). Neste contexto, os peixes possuem defesas antioxidantes para lidar com o efeito da reatividade do oxigênio (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005).

Vários fatores bióticos e abióticos podem influenciar na defesa antioxidante de peixes como por exemplo a idade, comportamento alimentar, fatores ambientais, oxigênio, temperatura e presença de xenobióticos (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ et al., 2005). Um desbalanço entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a defesa antioxidante resulta no estresse oxidativo. O estresse oxidativo influencia as respostas dos peixes a mudanças ambientais e moldam sua história de vida (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). O estresse oxidativo está emergindo para a definição e monitoramento do estado metabólico de animais, para verificar em que medida o fenótipo e o ambiente fornecem condições para suprir o seu metabolismo (BLIER, 2014). Biomarcadores do estresse oxidativo são ferramentas interessantes para acessar o *status* do metabolismo e saúde destes animais, promovendo um gerenciamento das populações que estão sob cultura ou mesmo, as selvagens (MADEIRA; VINAGRE; et al., 2016).

A neutralização de danos por EROs pode ser feita através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, como moléculas como o ácido ascórbico (vitamina C),

alfa-tocoferol (vitamina E), glutathione, carotenoides, vitamina A, flavonoides, tióis, coenzima Q e ácido úrico (VALKO et al., 2007; CHOWDHURY; SAIKIA, 2020).

Algumas enzimas da defesa antioxidante são: a catalase (CAT), associada com altos níveis de peróxido de hidrogênio; a superóxido dismutase (SOD), relacionada com altos níveis de superóxido; a glutathione peroxidase (GPX), pode ser associada a altos níveis de EROs; a glutathione redutase (GR) reduz glutathione oxidada (GSSG) para glutathione reduzida (GSH), e sua ativação pode estar associada a níveis elevados de GSSG (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). Embora avaliadas principalmente em relação a poluentes, os níveis desses marcadores (CAT, SOD e GPX) dependem de outras variáveis ambientais além de poluentes na água. Isto torna relevante avaliar os efeitos de outras variáveis em biomarcadores de estresse oxidativo (JOY et al., 2017), como por exemplo neste caso a temperatura.

Geralmente é reportado uma associação entre as atividades da SOD, GST e CAT juntamente com a GR (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006; ALMESELMANI et al., 2006), entretanto, também é documentada a ocorrência de ativação de enzimas individuais, como a SOD em situações de estresse nos peixes (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). Para *G. aculeatus*, por exemplo, a resposta foi transiente em relação ao tempo e tecido específico, com maior impacto do estresse pela temperatura reportado para o fígado em vez de músculo, com maiores atividades da SOD e G6PDH (KAMMER et al., 2011).

Outra enzima importante é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), chave da via das pentoses fosfato (CARVALHO; FERNANDES, 2008). A G6PDH é a primeira enzima da via e atua catalisando a transformação oxidativa da glicose-6-fosfato em 6-fosfoglicona- δ -lactona, um éster intramolecular (NELSON et al., 2014). A atividade da G6PDH está ligada a formação de NADPH através da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada (NADP⁺) e em tecidos que se dividem rapidamente, a pentose ribose-5-fosfato gerada pode ser utilizada para produzir DNA, RNA e coenzimas como adenosina difosfato (ADP), NADH, dinucleotideo de flavina e adenina reduzido (FADH₂) e coenzima A. Em outros tecidos, o produto é o NADPH, necessário para conter o efeito danoso de radicais de oxigênio (NELSON et al., 2017).

O nível de estresse oxidativo em peixes pode ser mensurado através da formação de proteínas carboniladas (PCO) (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). A PCO é um marcador genérico de oxidação proteica que é gerado por múltiplos radicais, espécies reativas em estado excitado e oxigênio singlete (forma reativa do oxigênio)

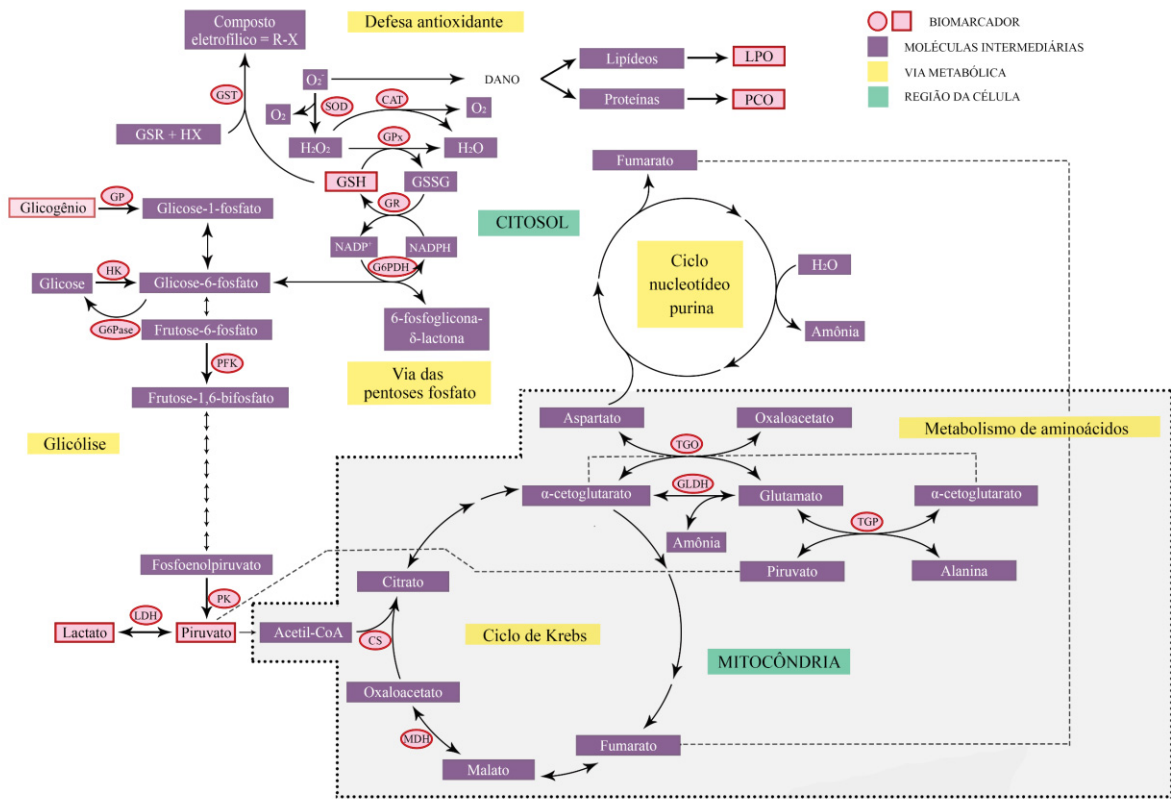
(HAWKINS et al., 2009). A temperatura também pode ocasionar respostas fisiológicas que aumentam o risco de peroxidação lipídica (LPO), visto que também aumenta a taxa de EROs (GRIM et al., 2013). O dano em lipídios pela LPO foi analisado indiretamente pelo método de detecção das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês: *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) (FEDERICI et al., 2007). Monitorar o dano em lipídeos também proporciona uma noção geral do nível de estresse oxidativo em peixes (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017).

Em músculo de zebrafish sob baixa temperatura foi encontrado um aumento da transcrição de genes envolvidos com o oxigênio e o metabolismo de EROs e a resposta ao estresse oxidativo (MALEK et al., 2004). Além disso, no músculo de *G. aculeatus* houve aumento da atividade da SOD em peixes aclimatados a baixa temperatura (8°C) em relação a temperatura alta (20°C) no período de 9 semanas (KAMMER et al., 2011).

Em *Etroplus suratensis*, submetido à choque térmico (16°C, 27 °C e 38°C) a atividade ou níveis dos biomarcadores SOD, CAT, GPx e LPO tiveram diferentes respostas indicando que o estresse pelo choque térmico pode ocasionar danos em diversos órgãos (brânquias, fígado, músculo e encéfalo) (JOY et al., 2017). Em *Oreochromis niloticus* submetido ao choque térmico em baixa temperatura (de 28°C para 13°C), foi observado para fígado um aumento da SOD, GPx, CAT e de GSH (HE et al., 2015). Estes estudos indicam que as respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo e dano celular dependem do órgão analisado, da espécie, da temperatura ou do modo de alteração de temperatura.

Uma associação entre os biomarcadores citados neste trabalho pode ser feita através do esquema que representa as vias metabólicas aqui analisadas (FIGURA 2).

FIGURA 2 - VIAS METABÓLICAS



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Esquema simplificado das vias metabólicas do músculo de peixes com destaque para os biomarcadores analisados neste trabalho e alguns elementos da via a qual eles pertencem. As setas representam a direção em que as reações podem ocorrer, indicando se estas são uni ou bidirecionais. As cores representam os agrupamentos que podem ser atribuídos para cada classe de palavras, sendo estas representando biomarcadores em vermelho (círculos para enzimas, quadrados para os demais), moléculas intermediárias em roxo, a via metabólica em amarelo e a região da célula em que as reações estão ocorrendo em verde. GP – glicogênio fosforilase, HK – hexoquinase, PFK – fosfofrutoquinase, PK – piruvato quinase, LDH – lactato desidrogenase, G6pase – Glicose-6-fosfatase, CS – citrato sintase, MDH – malato desidrogenase, GLDH – glutamato desidrogenase, AST/TGO – aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacética, ALT/TGP – alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica, SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GPx - glutatona peroxidase, GSH – Glutationa reduzida, GST – glutatona S-transferase, GR – glutatona redutase, G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase, LPO – peroxidação lipídica e PCO – proteínas carboniladas. A figura demonstra alguns locais em que os biomarcadores se encontram dentro da célula, entretanto os biomarcadores podem estar em outros compartimentos celulares também.

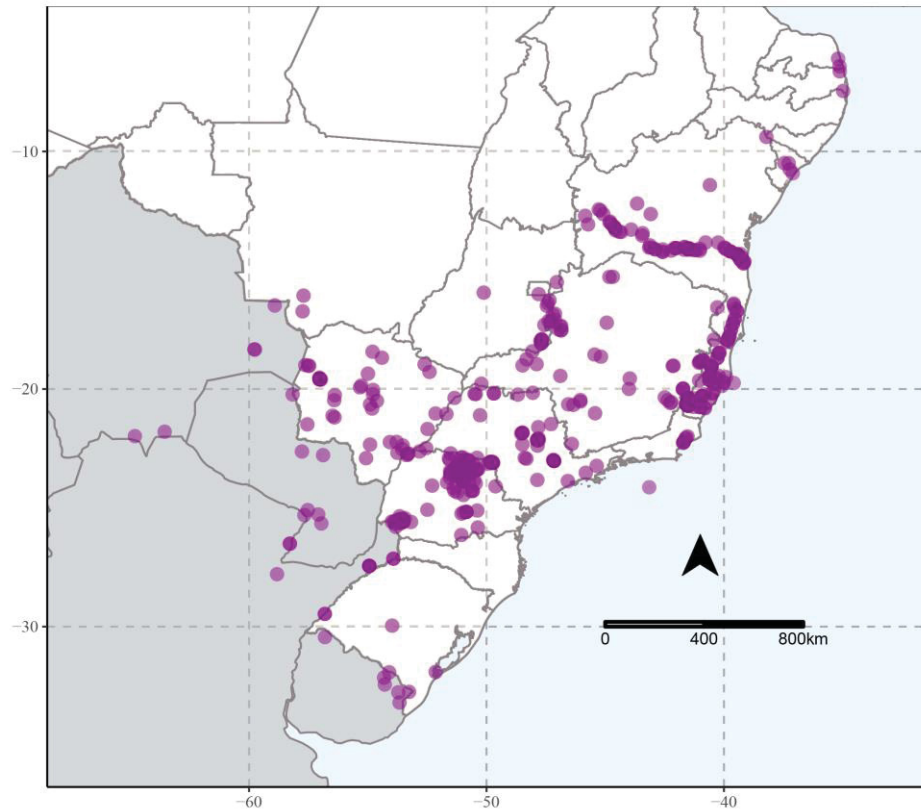
3.3 BACIA HIDROGRÁFICA E ESPÉCIE DO ESTUDO

A bacia hidrográfica do rio Iguaçu se estende por 70.800 km², compreendendo uma área total dentro do Estado do Paraná de 58.820,4 km² (SEMA, 2013). Ao longo de sua extensão recebe uma grande quantidade de afluentes, sendo 61 rios na

margem direita e 42 rios na margem esquerda (GONÇALVES, 2007). O rio Iguaçu pode ser considerado o maior rio totalmente paranaense, formado pelo encontro dos rios Irai e Atuba na parte leste do município de Curitiba em divisa com o município de Pinhais. Os rios citados são originados na borda Ocidental da Serra do Mar e seguem seu percurso de cerca de 1320 km cruzando os três planaltos paranaenses até desaguar em sua foz, no rio Paraná (SEMA, 2013).

Embora seja mais frequente temperaturas quentes extremas em relação as frias, juntamente com ondas de alta temperatura, invernos extremos vão continuar existindo (IPCC, 2014). Peixes tendem a procurar refúgios em diferentes áreas do seu hábitat que atendam as demandas de variações de temperatura (HOWELL et al., 2010). Entretanto, para peixes que habitam lagos rasos ou córregos esta não é uma alternativa eficiente (ROSSI et al., 2017).

O gênero *Astyanax* apresenta riqueza sob o ponto de vista sistemático, contendo 164 espécies válidas (FROESE; PAULY, 2021) e habitam cabeceiras de água, rios e córregos (GARCIA et al., 2003; MELLO et al., 2015). A espécie *A. lacustris* está presente em diferentes córregos (DELARIVA et al., 2018; FROTA et al., 2020). A distribuição de *A. lacustris* pode ser visualizada na FIGURA 3.

FIGURA 3 – MAPA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE *Astyanax lacustris*

LEGENDA: Distribuição geográfica de *Astyanax lacustris*, dados de ocorrência obtidos via GBIF.org (2021). Pontos em roxo = ocorrência, cinza = América do Sul, branco = Brasil e azul claro = oceano Atlântico. GBIF = Global Biodiversity Information Facility.

A. lacustris (Lütken, 1875) (FIGURA 4) conhecido como tambuí ou lambari-relógio é considerado herbívoro mas pode alimentar-se de insetos terrestres e fragmentos de peixes (BAUMGARTNER et al., 2012). É uma espécie de pequeno porte, que atinge de 10 a 15 cm de comprimento e até 40 g de peso. Apresenta rápido crescimento com maturidade sexual em cerca de 4 meses de idade e um tamanho aproximado de 7 a 9 cm para os machos e 9 a 12 cm para as fêmeas (PORTO-FORESTI et al., 2001). Possui dimorfismo sexual em relação ao tamanho do corpo que é maior para as fêmeas (SATO et al., 2006). Além disso, adaptam-se bem a alimentação com ração processada (HAYASHI et al., 2004). *A. lacustris* apresenta dados promissores em relação a sua utilização na piscicultura principalmente com a finalidade de ser utilizado como isca viva (SABBAG et al., 2011; SILVA; IGNÁCIO, 2017).

FIGURA 4 – EXEMPLARES DE *Astyanax lacustris*



FONTE: O autor (2021).

FONTE: O autor (2021).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAGEM E ACLIMATAÇÃO

A licença ambiental de coleta de animais foi obtida através do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio: número 63551-1) e a licença de experimentação animal, na Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA-BIO/UFPR: número 1228).

Espécimes de *A. lacustris* ($n = 240$; comprimento padrão: $6,17 \pm 0,87$ cm; peso médio: $9,15 \pm 3,4$ g) foram submetidos a experimentos de choque térmico de alta e baixa temperatura. Os exemplares foram coletados com auxílio de redes de pesca (tecido de multifilamento, malha de 12 mm entre os nós) em lagos artificiais no Centro de Pesquisas e Extensão em Aquicultura Ildo Zago, situado no município de União da Vitória-PR, Brasil ($26^{\circ}13'12.15''S$; $51^{\circ}7'51.07''O$), local de realização dos bioensaios.

Os espécimes de *A. lacustris* foram transferidos para tanques com capacidade de 830 litros, com água de nascente própria, em fluxo contínuo (vazão de 4L/min), em temperatura de $23^{\circ}C$ (LERMEN et al., 2004; BUENO-KRAWCZYK et al., 2015). Foi utilizado o fotoperíodo de aproximadamente 13:30 horas luz/10:30 horas escuro (CHUNG, KYUNG, 2000; BAGNYUKOVA; DANYLIV et al., 2007; NAVARRO et al., 2014; LIRA et al., 2018) e aeração constante, durante 3 dias para aclimatação (PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2017). As condições físico-químicas da água apresentavam oxigênio dissolvido: $9,31 \pm 2,17$ mg/L, amônia: $0,36 \pm 0,24$ mg/L, pH: $7,4 \pm 0,31$, nitrato: 0,00 mg/L, nitrito: 0,00 mg/L, dureza: 75 ± 9 mg/L de $CaCO_3$ e sem presença de cloro residual.

4.2 EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO

Depois de aclimatados os espécimes de *A. lacustris*, foram separados randomicamente e transferidos diretamente para aquários com água nas temperaturas de $15^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ ou $31^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ (LERMEN et al., 2004b). A densidade máxima foi de dez peixes por cinquenta litros de água ou 1,8 g de peixe/L de água (CHUNG; KYUNG, 2000; VIEIRA et al., 2013). Cada grupo experimental de estava dividido em dois aquários com cinco peixes, onde cada aquário é considerado uma

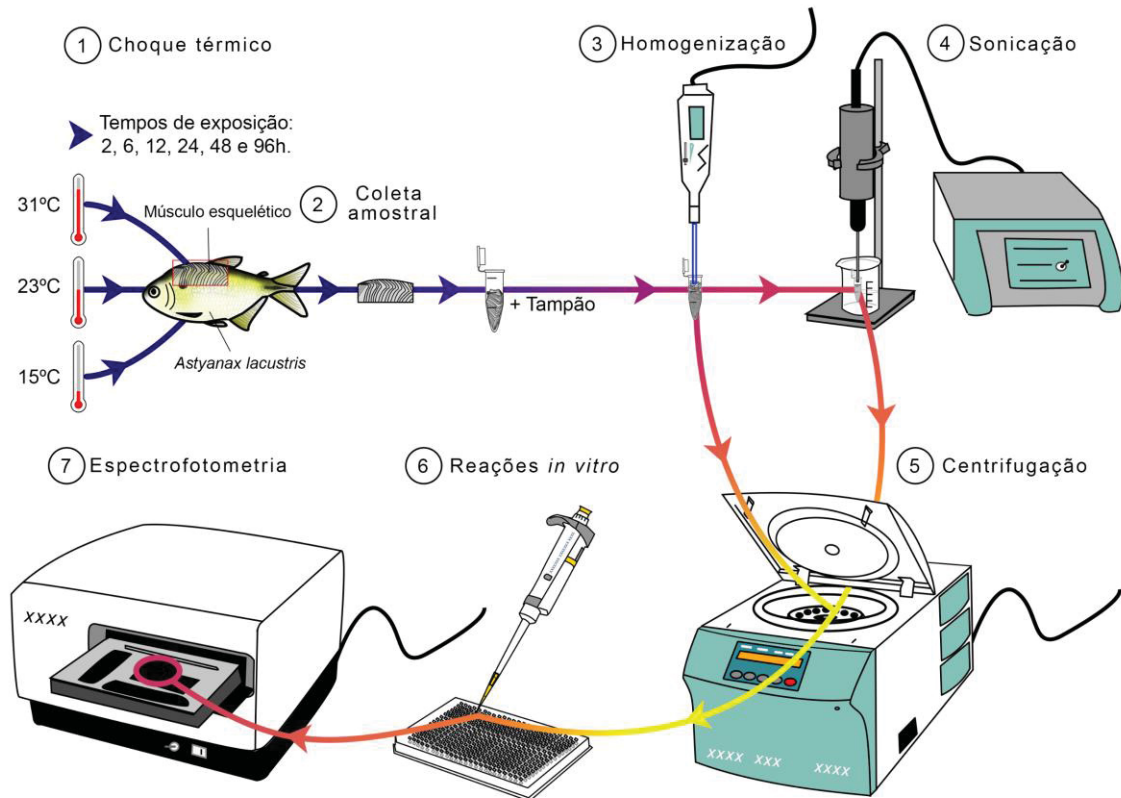
réplica, ou seja o meio experimental, cada peixe é considerado a unidade experimental e os biomarcadores são considerados as unidades observacionais (TINCANI et al., 2017). Foram atribuídos diferentes regimes de tempo em que os peixes continuaram sendo expostos a temperatura experimental (2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas). Em cada regime de tempo existia um grupo experimental de peixes para alta ou baixa temperatura com seu respectivo controle à $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Os aquários eram sistemas estáticos, limpos por sucção a cada 48h, com cerca de 50% da água renovada (LERMEN et al., 2004) com água originária de nascente própria. Foram instalados previamente nos aquários termostatos eletrônicos submersos (Aqua One, VigoAr e Atman, com potência de 100W), para regulação e controle da temperatura. Para a temperatura de 15°C , os espécimes foram alocados em aquários no interior de um refrigerador horizontal (Consul/530 L), com controlador digital de temperatura (TC-900E POWER/07).

Os espécimes foram alimentados diariamente com ração comercial para peixes (veja APÊNDICE 1- INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DA RAÇÃO), em uma proporção de 1% do peso animal (CHUNG, 2000; LERMEN et al., 2004). Para todos os grupos, o primeiro dia de aclimação foi o primeiro dia do fornecimento de alimentos e a última alimentação foi fornecida entre 22 e 24 horas antes da eutanásia (ROSSI et al., 2017). Ao fim de cada experimento, os peixes foram anestesiados com $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de benzocaína e eutanasiados com secção medular, sendo imediatamente dissecados e o músculo esquelético coletado e congelado em nitrogênio líquido.

As amostras foram direcionadas para processamento das análises dos biomarcadores do metabolismo energético e estresse oxidativo no Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia celular – Setor de Ciências Biológicas - UFPR. A representação gráfica do design experimental e do processamento laboratorial de *A. lacustris*, podem ser observados na FIGURA 5.

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO DESIGN EXPERIMENTAL E DO PROCESSAMENTO LABORATORIAL



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: 1. No experimento os peixes (*Astyanax lacustris*) foram submetidos a *choque térmico* de alta (31°C) e baixa (15°C) temperatura. Cada grupo/temperatura com seu respectivo controle (23°C) foram mantidos em diferentes regimes de tempo (2, 6, 12, 24, 48 e 96h). 2. Posteriormente, houve a *coleta amostral* (n = 10 indivíduos/por experimento) do músculo e encaminhamento para as análises laboratoriais. 3. O material biológico com tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4) passou pela *homogeneização* para romper as membranas celulares e expor as enzimas e moléculas alvo das análises. As amostras homogeneizadas foram divididas e seguiram para dois processamentos distintos. Um grupo foi direcionado para a *sonicação* (15 segundos, 18 J), responsável por romper as membranas de organelas intracelulares, expondo por exemplo, enzimas mitocondriais, para as análises que envolvem o metabolismo energético. 5. Posteriormente, este grupo de amostras seguiu para a *centrifugação* (10021 g por 10 min a 4°C). O outro grupo de amostras foi destinado as análises relacionadas ao estresse oxidativo e seguiram direto da etapa de homogeneização para a *centrifugação* (12.000 g a 4°C durante 20 min). 6. Após o preparo das amostras com os passos anteriores, os sobrenadantes foram direcionados para as *reações in vitro* específicas dos diferentes biomarcadores analisados. 7. Por fim, para obtenção dos dados das análises foi utilizada espectrofotometria (com o espectrofotômetro EPOCH Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA) ajustando diferentes comprimentos de onda dependendo da análise efetuada.

4.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

Durante a preparação até a realização das análises as amostras foram mantidas em banho de gelo moído. As amostras de músculo foram pesadas e, em seguida, homogeneizadas com a utilização do homogeneizador Potter-Elvehjem em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4). Para defesa antioxidante e danos oxidativos as amostras foram centrifugadas em 12000 g por 20 min a 4°C. Para metabolismo energético, após homogeneização as amostras foram sonicadas por cerca de 15s (até atingirem 18J) e centrifugadas a 10021 g por 10 min a 4°C.

As análises em laboratório foram realizadas em triplicata, com condições ótimas de pH e concentração de respectivos substratos, em temperatura ambiente de 22°C (ROBINSON, 2008). A absorbância foi medida em espectrofotômetro de microplaca (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando Coomassie Brilliant Blue G-250 e albumina de soro bovina (BSA) como padrão, medindo a absorbância em 595nm.

As atividades enzimáticas são expressas em nmol ou μmol de substrato convertido em produto por minuto ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}$, mU e $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$). A atividade enzimática está expressa em unidades internacionais (U) por miligramas de proteína ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ ou respectivas notações adequadas ex: $\text{mU}\cdot\text{mg}^{-1}$, $\mu\cdot\text{mg}^{-1}$).

4.3.1 Metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs

A TABELA 1 apresenta as metodologias usadas para avaliar as enzimas do metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs

TABELA 1 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS

Enzima	EC	Método de observação	Abs (nm)	Componentes do sistema de reação	Referência
GP	2.4.1.1	Formação de NADPH	340	K ₂ HPO ₄ (pH 7,0) 45 mM, AMP 1,6 mM, glicogênio 0,2 mg/mL, NADP ⁺ 0,34 mM, G-1,6-P ₂ 4 μm, EDTA 0,1 mM, MgCl ₂ 15 mM, fosfoglicomutase 1,6 U/ml e G6PDH 12 U/ml.	Chang et al., (2007)
HK	2.7.1.1	Formação de NADPH	340	Imidazol (pH 7,4) 50 mM, glicose 2 mM, ATP 2 mM, MgCl ₂ 10 mM, NADP ⁺ 0,4 mM, DTT 1,0 mM, KCl 2,0 mM e G6PDH 0,3 U/mL.	Baldwin et al. (2007)
PFK	2.7.1.11	Oxidação do NADH	340	Tris (pH 8,2) 50 mM, MgCl ₂ 10 mM, ATP 1 mM, NADH 0,15 mM, AMP 2 mM, KCl 250 mM, GPDH 1 U/mL, ALD 1 U/mL, TPI 10 U/mL e F6P 5,0 mM.	(Baldwin et al., 2007)
PK	2.7.1.40	Oxidação do NADH	340	Imidazol (pH 7,4) 50 mM, MgCl ₂ 10 mM, KCl 25 mM, NADH 150 μM, ADP 5 mM, PEP 5 mM e LDH 9 U/ml.	Levesque et al., (2002)
LDH	1.1.1.27	Oxidação do NADH	340	Tris (pH 7,4) 50mM, piruvato de sódio 1 mM, KCl 100mM e NADH 0,25 mM.	Thuesen et al., (2005)
CS	4.1.3.7	Formação do complexo DNTB + CoA-SH	410	Tris (pH 7,4) 50mM, KCl 100mM, EDTA 1 mM, DTNB 0,2 mM, acetil-CoA 0,2 mM e oxaloacetato 0,5 mM	Saborowski; Buchholz, (2002)
MDH	1.1.1.37	Oxidação do NADH	340	Tris (pH 7,4) 50 mM, oxaloacetato 0,4 mM, MgCl ₂ 20 mM e NADH 0,150 mM.	Childress; Somero (1979)

FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Para cada enzima é apresentado o EC (do inglês *Enzyme Commission Numbers*), o método de observação referente ao que é detectado durante espectrofotometria, realizada em um determinado comprimento de onda definido pela absorbância (abs). Também são apresentados os componentes do sistema de reação e a referência utilizada como base para a metodologia. GP – glicogênio fosforilase, HK – hexoquinase, PFK – fosfofrutoquinase, PK – piruvato quinase, LDH – lactato desidrogenase, CS – citrato sintase e MDH – malato desidrogenase.

4.3.2 Metabólitos intermediários e glicogênio

A TABELA 2 apresenta as metodologias usadas para avaliar os biomarcadores piruvato, lactato e glicogênio.

TABELA 2 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS E GLICOGÊNIO

Biomarcador	Método de observação	Abs (nm)	Padrão	Referência
Glicogênio	Glicose liberada após hidrólise ácida	480	Glicose	Dubois et al. (1956) e modificado por Bidinoto et al., (BIDINOTO et al., 1997)
Lactato	Formação de um complexo entre o lactato e o sulfato de cobre	570	Ácido láctico	Harrower & Brown (1972)
Piruvato	Reação entre hidróxido de sódio, carbonato de sódio e DNPH	440	Piruvato de sódio	Lu (1939)

FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Para cada biomarcador é apresentado o método de observação referente ao que é detectado durante espectrofotometria, realizada em um determinado comprimento de onda definido pela absorvância (abs), o padrão utilizado como referência, os componentes do sistema de reação e a referência utilizada como base para a metodologia do biomarcador.

4.3.3 Metabolismo de proteínas

A TABELA 3 apresenta as metodologias usadas para avaliar as enzimas do metabolismo de proteínas.

TABELA 3 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS

Enzima	EC	Método de observação	Abs (nm)	Componentes do sistema de reação	Referência
GLDH	1.4.1.3	Formação de NADPH	340	Tris (pH 7,4) 100 mM, NADP ⁺ 2 mM, ADP 0,8 mM e L-glutamato 40 mM.	Ciardiello et al. (2000)
AST	2.6.1.1	Formação de hidrazona	505	Kit da Gold Analisa Diagnóstica Ltda (ref. 353, MS 80022230150)	Reitman; Frankel (1957)
ALT	2.6.1.2	Formação de hidrazona	505	Kit da Gold Analisa Diagnóstica Ltda (ref. 352, MS 80022230149)	Reitman; Frankel (1957)

FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Para cada enzima é apresentado o EC (do inglês Enzyme Commission Numbers), o método de observação referente ao que é detectado durante espectrofotometria, realizada em um determinado comprimento de onda definido pela absorvância (abs). Também são apresentados os componentes do sistema de reação e a referência utilizada como base para a metodologia da enzima. GLDH – glutamato desidrogenase, TGO – transaminase glutâmico oxalacética, TGP – transaminase glutâmico pirúvica.

4.3.4 Defesa antioxidante

A TABELA 4 apresenta as metodologias usadas para avaliar as enzimas da defesa antioxidante.

TABELA 4 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DEFESA ANTIOXIDANTE

Enzima	EC	Método de observação	Abs	Componentes do sistema de reação	Referência
SOD	1.15.1.1	Redução do NBT	560	Carbonato de sódio (pH 10,2) 91 mM, EDTA 17.5 µM, NBT 0,1 mM e cloreto de hidroxilamina 37 mM.	Crouch et al., (1981)
CAT	1.11.1.6	Degradação do H ₂ O ₂	240	Tris (pH 8,0) 50 mM e H ₂ O ₂ 30 mM	Aebi (1984)
GST	2.5.1.18	Formação do tioéster GS-DNB	340	Fosfato de potássio (pH 6,5) 85,5 mM, GSH 1,36 mM e CDNB 2,7 mM.	Keen; Habig; Jakoby (1976)
GR	1.8.1.7	Oxidação do NADPH	340	Fosfato de potássio (pH 7,6) 100 mM em EDTA 5mM, NADPH 0,5 mM e GSSG mM.	Sies et al., (1979)
G6PDH	1.1.1.49	Formação de NADPH	340	Tris (pH 7,4) 97 mM, NADP ⁺ 0,2 mM e G6P 1 mM.	Ciardiello et al., (1995)

FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Para cada enzima é apresentado o EC (do inglês Enzyme Commission Numbers), o método de observação referente ao que é detectado durante espectrofotometria, realizada em um determinado comprimento de onda definido pela absorbância (abs). Também são apresentados os componentes do sistema de reação e a referência utilizada como base para a metodologia da enzima. SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GST – glutathione S-transferase, GPx, glutathione peroxidase, GR – glutathione reductase e G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase.

4.3.5 Danos celulares e GSH

A TABELA 5 apresenta as metodologias usadas para avaliar os danos celulares e os níveis de GSH.

TABELA 5 – MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE DANOS CELULARES E GSH

Biomarcador	Método de observação	Abs (nm)	Padrão	Referência
PCO	Dinitrofenil hidrazonas formadas partir da reação entre DNPH e proteínas carboniladas	360	-	Levine et al., (1994)
LPO	MDA reativo ao TBARS	535	MDA	Federici et al., (2007)
GSH	Tióis não protéicos reativo ao DTNB	415	GSH	Sedlak; Lindsay (1968)

FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Para cada biomarcador é apresentado o método de observação referente ao que é detectado durante espectrofotometria, realizada em um determinado comprimento de onda definido pela absorvância (abs), o padrão utilizado como referência (traço - indica ausente), os componentes do sistema de reação e a referência utilizada como base para a metodologia do biomarcador. PCO – proteínas carboniladas, LPO – lipoperoxidação e GSH – glutathiona reduzida.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA

Os dados dos biomarcadores avaliados foram previamente transformados utilizando o sistema box-cox (BOX; COX, 1964), para atender os pressupostos da análise de variância (ANOVA), com a utilização do pacote MASS (RIPLEY et al., 2021).

Para comparação estatística do efeito de duas variáveis independentes: *temperatura* (controle e tratamento) e *tempo* (2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas), ou a possível *interação* entre elas (controle *versus* tratamento dentro de determinado tempo), os dados foram submetidos à ANOVA bifatorial, para cada biomarcador. Desta maneira, as diferenças e comparações realizadas neste trabalho serão apresentadas com as denominações: temperatura, tempo e interação, respectivo as comparações citadas anteriormente. Para contraste a posteriori foi realizado o teste *post hoc* pelo pacote *emmeans* (LENTH et al., 2021) 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, 2021).

É comum utilizar uma bateria de biomarcadores para avaliar efeitos da exposição a alguma condição nociva na resposta ao estresse. Considerando a dificuldade de unir os dados em uma única análise, Beliaeff e Burgeot (2002) propuseram o Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR do inglês - Integrated Biomarker Response).

O IBR (Integrated Biomarker Response) é um método que sumariza as respostas dos biomarcadores e simplifica a sua interpretação em programas de biomonitoramento. Este método pode ser considerado um indicador de estresse ambiental, uma ferramenta importante ao avaliar riscos ecológicos (BELIAEFF; BURGEOT, 2002). O IBR utilizado neste trabalho foi a otimização realizada por Devin et. al (2014), baseado em uma fórmula mais simples e com um processo de permutação, evita um mal uso e melhora a performance do cálculo do IBR de Beliaeff e Burgeot (2002).

O cálculo do IBR proposto por Beliaeff e Burgeot (2002) modificado por Devin et. al (2014), apresenta as seguintes etapas:

1. A média para um local (X), que nosso caso corresponde a cada temperatura, é estandardizada usando o valor médio para todos os locais (m) e o desvio padrão para todos os locais (s), para obter o valor chamado Y : $Y = (X - m)/s$
2. Para cada biomarcador, foi calculado o valor de $Z = Y$ ou $Z = -Y$ de acordo como efeito biológico esperado (se inibe ou ativa respectivamente).
3. O valor de S foi calculado através de $S = Z + |Min|$, onde o Min é o valor mínimo observado em todos os locais para cada biomarcador.
4. Os valores de S_i são plotados em um diagrama de radar. O IBR é calculado como a área total mostrada pelo diagrama de radar. A área do triângulo é definida por dois sucessivos biomarcadores em um número de k biomarcadores do estudo, onde pelo menos quatro biomarcadores são considerados.

$$A_i = S_i \times S_{i+1} \times \frac{\sin\left(\frac{2\pi}{k}\right)}{2}$$

Desta maneira o IBR é calculado pela equação:

$$IBR = \sum_{i=1}^k A_i$$

Esta fórmula pode ser aplicada somente quando quatro ou mais biomarcadores são mensurados. Além disso, foi utilizado uma matriz de valores de $IBR (k - 1)!$, com todas as possíveis permutações circulares de k biomarcadores, com a média e o desvio padrão de cada local calculado para cada valor de IBR. O Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e os gráficos de radar foram obtidos através do pacote *IBRtools* (RESENDE; PEREIRA, 2020).

Todas as análises estatísticas, os gráficos de barra e os gráficos de radar (*star plots* ou *radar plots*) foram obtidos no *software* R (R TEAM, 2021). Os demais esquemas deste trabalho foram produzidos no *software* *Adobe Photoshop*® versão 21.0.2 (CC 2020).

5 RESULTADOS

Foram observadas 11 mortes (3,9 %) nos peixes durante os ensaios, ocorridas nos grupos controles (8 peixes) e tratamento à 15 °C (3 peixes). Foram encontradas variações significativas entre as temperaturas, entre os tempos e a interação entre tempo e temperatura.

5.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO PARA INTERAÇÃO ENTRE AS TEMPERATURAS E TEMPOS

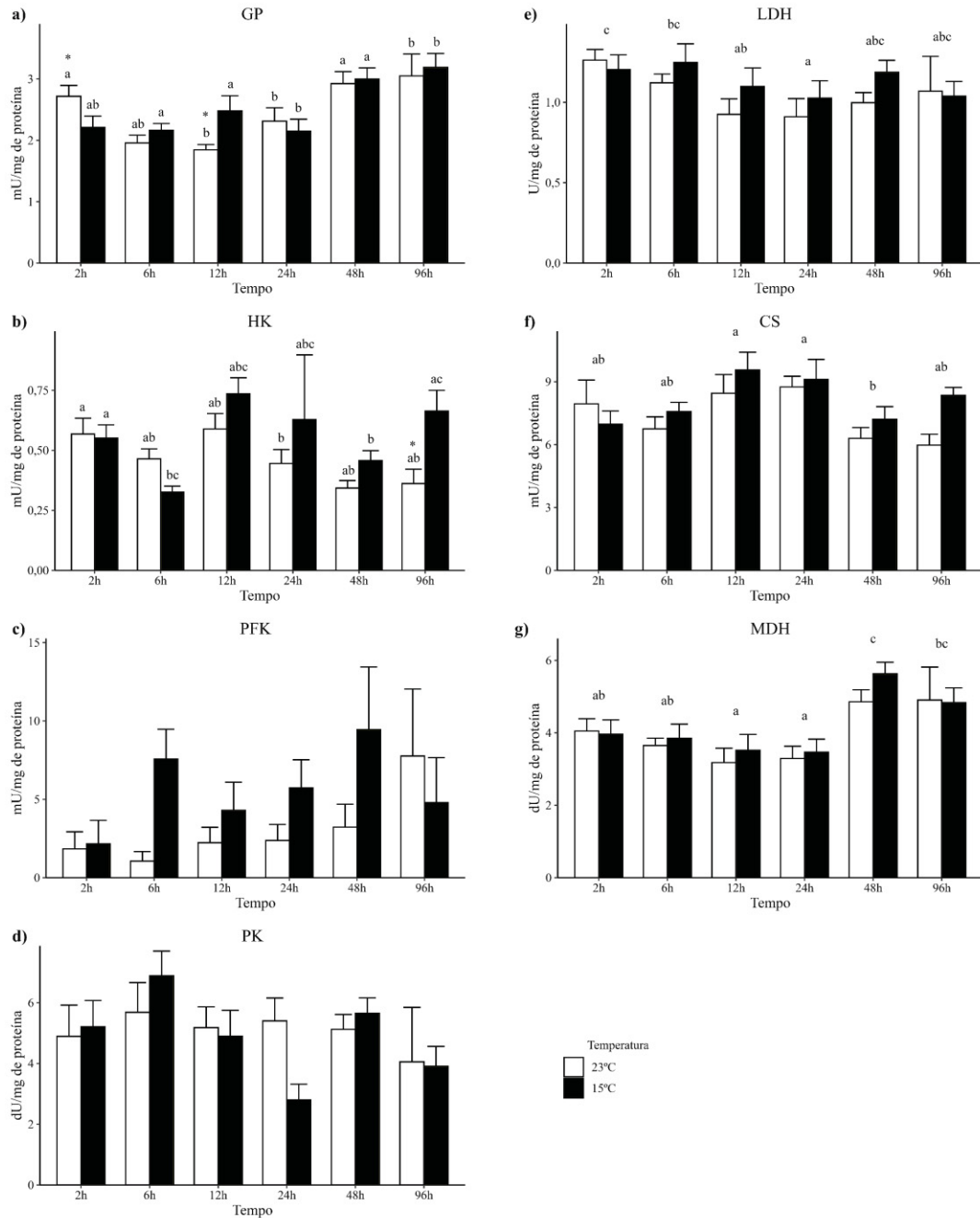
Embora analisadas as diferenças ao longo do tempo e temperaturas, as próximas seções avaliam a interação entre a temperatura controle e de choque térmico e cada tempo para músculo de *A. lacustris*. Isto é, foi comparado 15°C com seu respectivo controle (23°C) e 31°C com seu respectivo controle (23°C) para cada um dos seis tempos em que os peixes permaneceram (2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas). Este é o objetivo deste trabalho, para qual o design experimental foi planejado.

5.1.1 Efeitos do choque térmico de baixa e alta temperatura no metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs

5.1.1.1 Baixa temperatura (15 °C)

O choque térmico de baixa temperatura no músculo de *A. lacustris* (FIGURA 6), provocou alterações para os biomarcadores do metabolismo de carboidratos. Influenciou na redução da atividade da GP em 2h (FIGURA 6. a), com aumento na atividade em 12h, enquanto a HK teve aumento de atividade em 96h (FIGURA 6. b). Não houve alterações da atividade da PFK (FIGURA 6. c), PK (FIGURA 6. d), LDH (FIGURA 6. e). Não houve alterações nas atividades das enzimas envolvidas com o ciclo de Krebs (CS e MDH) (FIGURA 6. e-g).

FIGURA 6 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS EM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



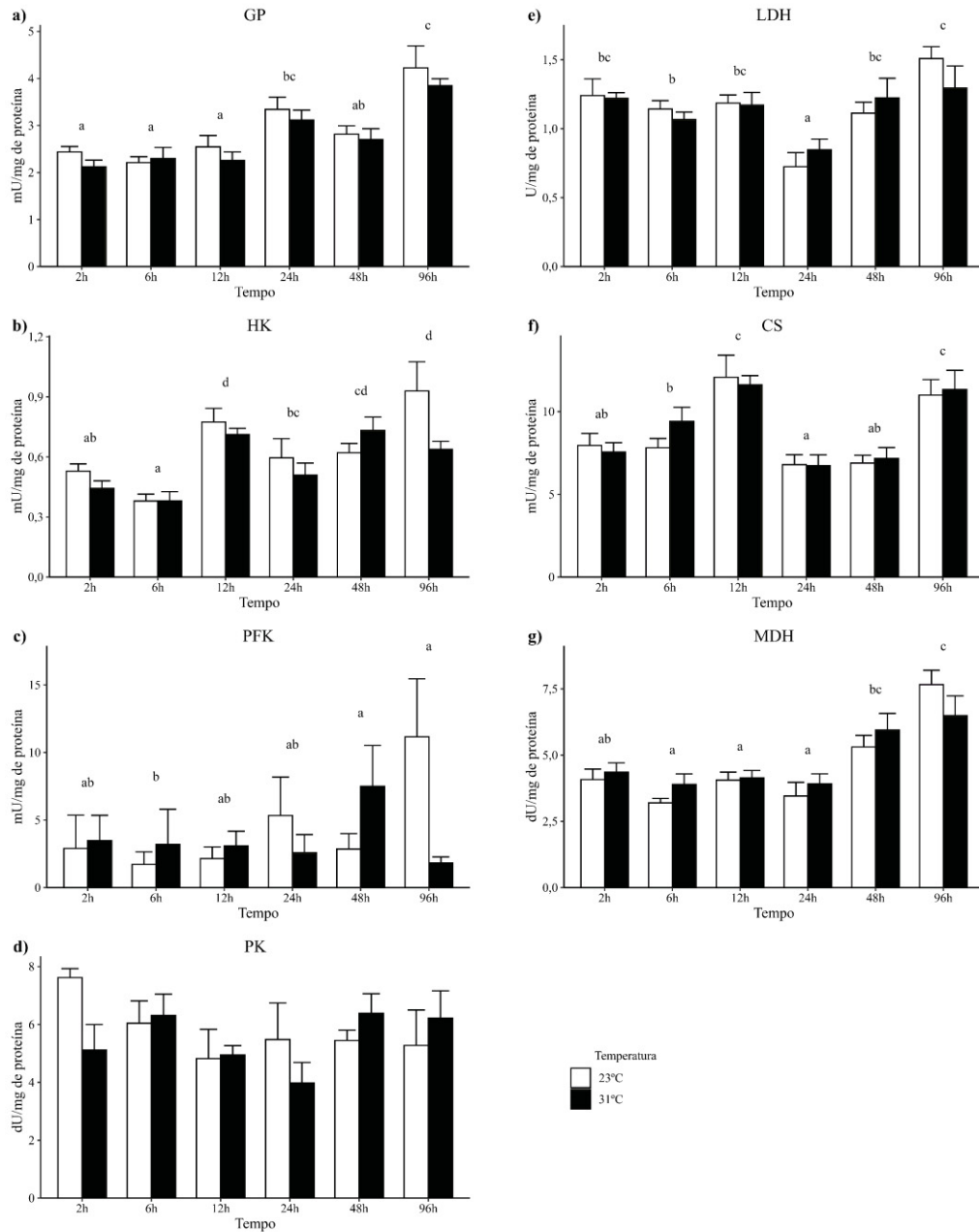
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs do músculo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição à temperatura de 15 °C e seu controle à 23°C. a. GP – glicogênio fosforilase, b. HK – hexoquinase; c. PFK – fosfofrutoquinase, d. PK – piruvato quinase, e. LDH – lactato desidrogenase, f. CS – citrato sintase e g. MDH – malato desidrogenase. Os dados estão apresentados com os valores da média e erro padrão da média. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças significativas para interação (experimental *versus* controle dentro do tempo), as letras acima das barras representam diferenças significativas ao longo do tempo, demonstradas para cada tratamento (temperatura) separadamente quando houve diferenças significativas para interação (significativo quando $p < 0,05$). Unidades de medida: U – unidade, dU – deciunidade e mU – miliunidade. Os valores estão representados em unidades por miligrama (mg) de proteína.

5.1.1.2 Alta temperatura (31 °C)

O choque térmico de alta temperatura no músculo de *A. lacustris*, não provocou alterações significativas para os biomarcadores do metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs (FIGURA 7).

FIGURA 7 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS EM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2021).

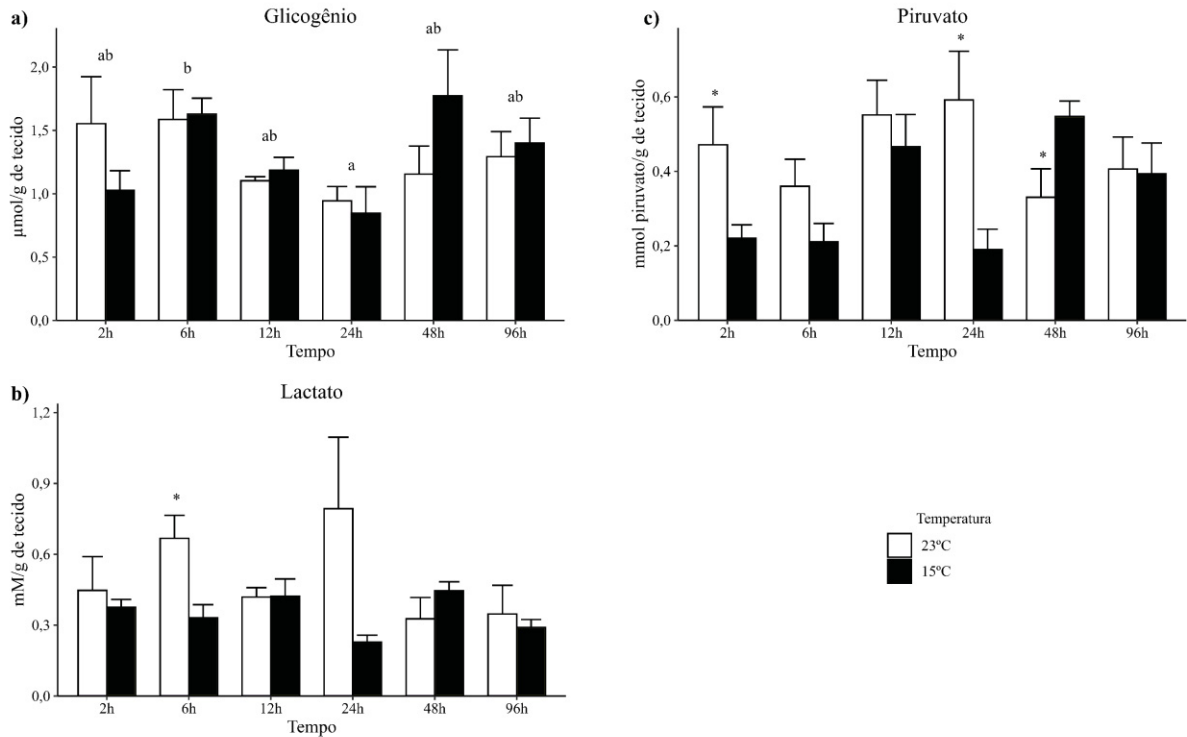
LEGENDA: Atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs do músculo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição à temperatura de 31 °C e seu controle à 23°C. a. GP – glicogênio fosforilase, b. HK – hexoquinase; c. PFK – fosfofrutoquinase, d. PK – piruvato quinase, e. LDH – lactato desidrogenase, f. CS – citrato sintase e g. MDH – malato desidrogenase. Os dados estão apresentados com os valores da média e erro padrão da média. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças significativas para interação (experimental versus controle dentro do tempo), as letras acima das barras representam diferenças significativas ao longo do tempo (significativo quando $p < 0,05$). Unidades de medida: U – unidade, dU – deciunidade e mU – miliunidade. Os valores estão representados em unidades por miligrama (mg) de proteína.

5.1.2 Efeitos do choque térmico de baixa e alta temperatura nos metabólitos intermediários e glicogênio

5.1.2.1 Baixa temperatura (15 °C)

O choque térmico de baixa temperatura no músculo de *A. lacustris* (FIGURA 8), provocou alterações para os biomarcadores dos metabólitos intermediários e glicogênio. Houve variação nos níveis de piruvato (FIGURA 8. c) que diminuem em 2h e aumentam em 48 horas. Houve uma redução da quantidade de lactato (FIGURA 8. b) em 6h. Não houve alterações significativas nos níveis do substrato energético glicogênio (FIGURA 8. c)

FIGURA 8 – NÍVEIS DE METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS E GLICOGÊNIO EM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



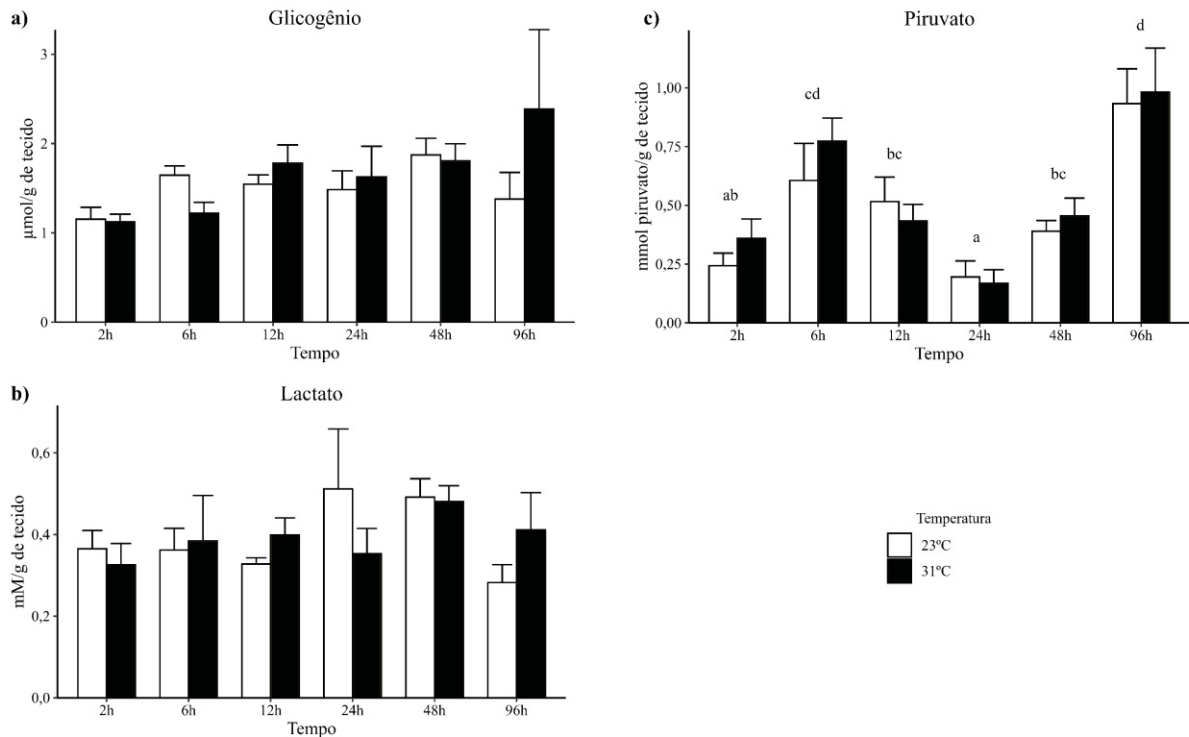
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Níveis de a. glicogênio e metabólitos intermediários b. lactato e c. piruvato do músculo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição à temperatura de 15 °C e seu controle à 23°C. Os dados estão apresentados com os valores da média e erro padrão da média. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças significativas para interação (experimental versus controle dentro do tempo), as letras acima das barras representam diferenças significativas ao longo do tempo (significativo quando $p < 0,05$). Unidades de medida: mM - milimolar, mmol – milimol e µmol - micromol. Os valores estão representados por grama (g) de tecido.

5.1.2.2 Alta temperatura (31 °C)

O choque térmico de alta temperatura no músculo de *A. lacustris* (FIGURA 9), não provocou alterações significativas para os biomarcadores dos metabólitos intermediários e glicogênio.

FIGURA 9 – NÍVEIS DE METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS E GLICOGÊNIO EM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2021).

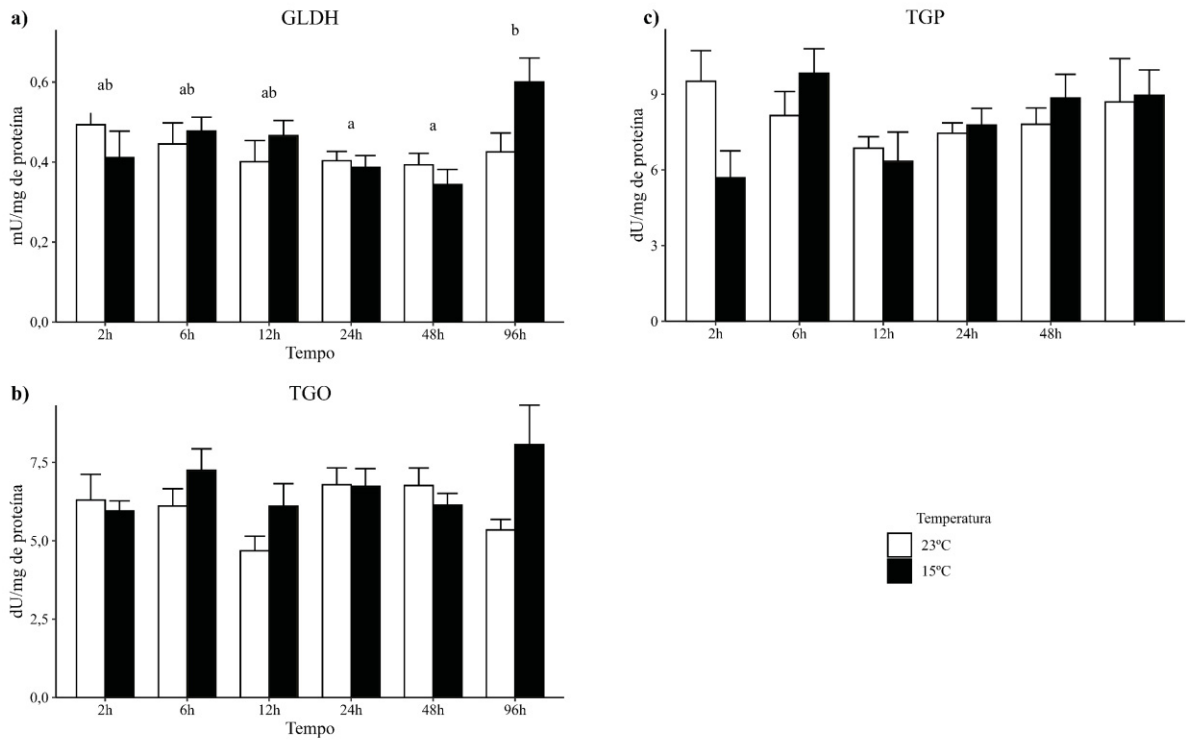
LEGENDA: Níveis de a. glicogênio e metabólitos intermediários b. lactato e c. piruvato do músculo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição à temperatura de 31 °C e seu controle à 23°C. Os dados estão apresentados com os valores da média e erro padrão da média. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças significativas para interação (experimental versus controle dentro do tempo), as letras acima das barras representam diferenças significativas ao longo do tempo (significativo quando $p < 0,05$). Unidades de medida: mM - milimolar, mmol – milimol e µmol - micromol. Os valores estão representados por grama (g) de tecido.

5.1.3 Efeitos do choque térmico de baixa e alta temperatura no metabolismo de proteínas

5.1.3.1 Baixa temperatura (15 °C)

O choque térmico de baixa temperatura no músculo de *A. lacustris* (FIGURA 10), não provocou alterações significativas para os biomarcadores do metabolismo de proteínas.

FIGURA 10 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



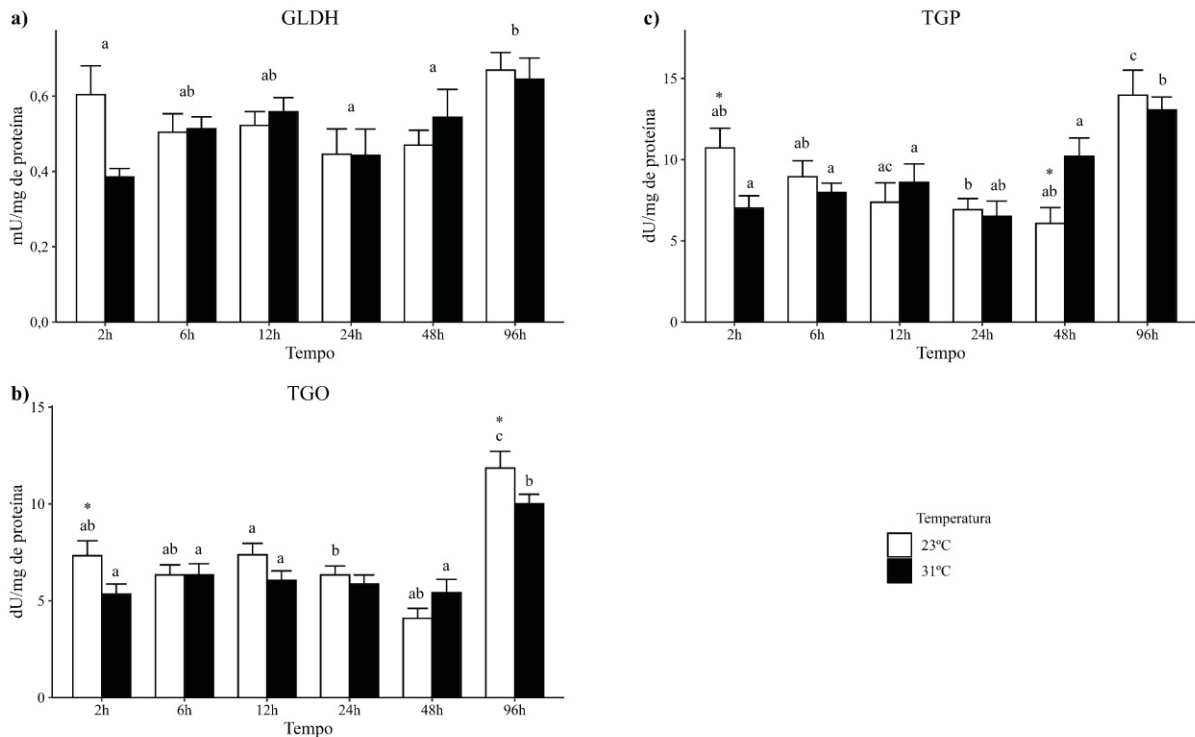
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo de proteínas do músculo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição à temperatura de 15 °C e seu controle à 23°C. a. GLDH – glutamato desidrogenase, b. AST/TGO – aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacética e c. ALT/TGP – alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica. Os dados estão apresentados com os valores da média e erro padrão da média. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças significativas para interação (experimental versus controle dentro do tempo), as letras acima das barras representam diferenças significativas ao longo do tempo (significativo quando $p < 0,05$). Unidades de medida: U – unidade, dU – deciunidade, mU – miliunidade. Os valores estão representados em unidades por miligrama (mg) de proteína.

5.1.3.2 Alta temperatura (31 °C)

O choque térmico de alta temperatura no músculo de *A. lacustris* (FIGURA 11), provocou alterações para os biomarcadores do metabolismo de proteínas. A GLDH (FIGURA 11. a) em músculo de *A. lacustris* permaneceu inalterada, entretanto houve redução da atividade da AST- (FIGURA 11. b) em 2h e em 96h. A atividade da ALT (FIGURA 11. c) também apresentou redução em 2h, com posterior aumento em 48h.

FIGURA 11 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS EM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo de proteínas do músculo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição à temperatura de 31 °C e seu controle à 23°C. a. GLDH – glutamato desidrogenase, b. AST/TGO – aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacética e c. ALT/TGP – alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica. Os dados estão apresentados com os valores da média e erro padrão da média. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças significativas para interação (experimental versus controle dentro do tempo), as letras acima das barras representam diferenças significativas ao longo do tempo, demonstradas para cada tratamento (temperatura) separadamente quando houve diferenças significativas para interação (significativo quando $p < 0,05$). Unidades de medida: U – unidade, dU – deciunidade, mU – miliunidade. Os valores estão representados em unidades por miligrama (mg) de proteína.

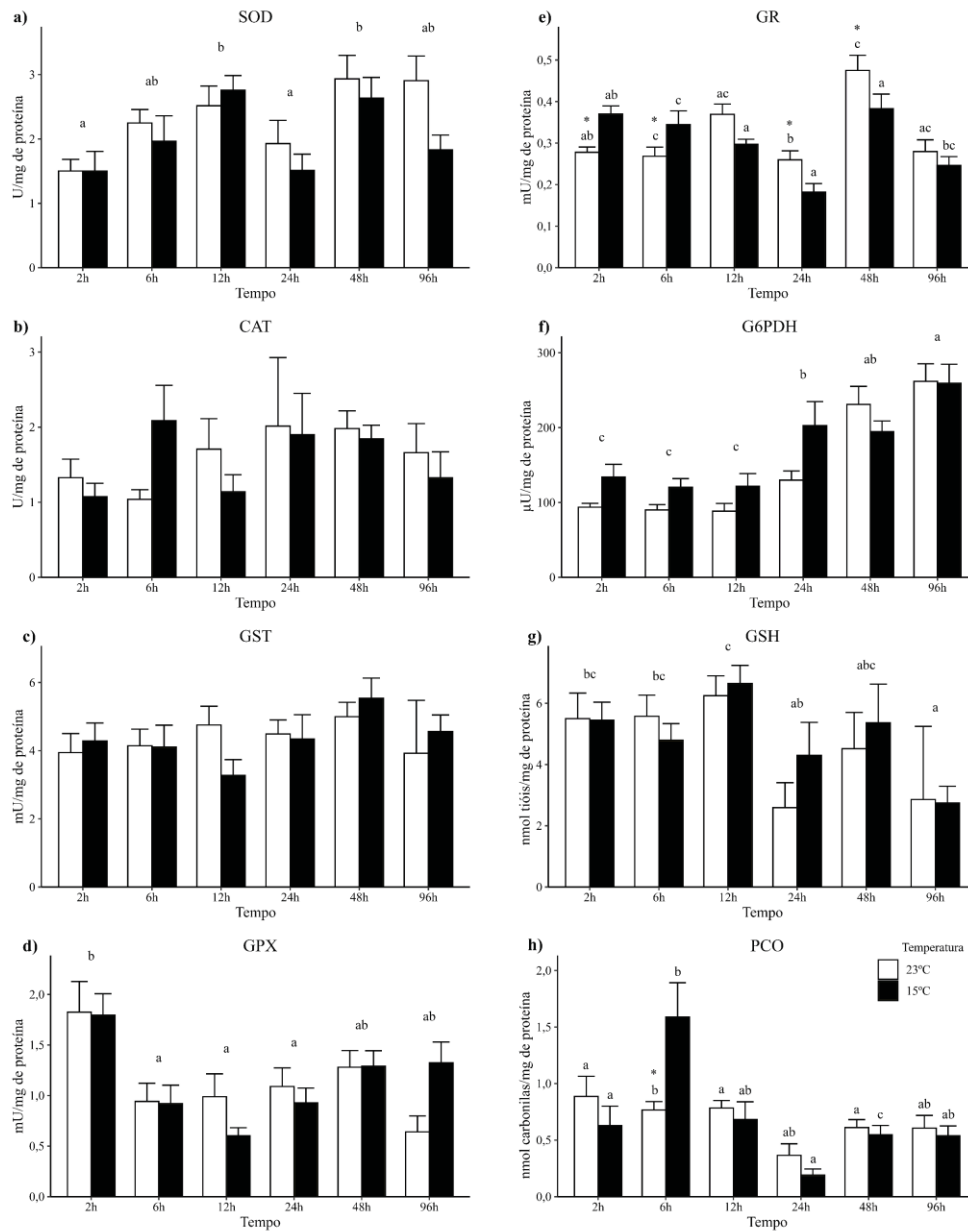
5.1.4 Efeitos do choque térmico de baixa e alta temperatura na defesa antioxidante e danos celulares

Em relação aos danos pela LPO (dados não mostrados), não foi possível realizar análise, provavelmente devido aos níveis de LPO estarem abaixo da sensibilidade da técnica utilizada.

5.1.4.1 Baixa temperatura (15 °C)

O choque térmico de baixa temperatura no músculo de *A. lacustris* (FIGURA 12), provocou alterações para os biomarcadores da defesa antioxidante e danos celulares. A enzima GR (FIGURA 12. e) teve um aumento na atividade em 2h e 6h, e posterior diminuição da atividade em 24h e 48h. Houve aumento dos níveis de PCO em 6h para baixa temperatura (FIGURA 12. h). Não houve alterações significativas para os demais biomarcadores SOD, CAT, GST, GPX, G6PDH e GSH (FIGURA 12. a-d, f-g).

FIGURA 12 – ATIVIDADES DAS ENZIMAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE, PCO E GSH EM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



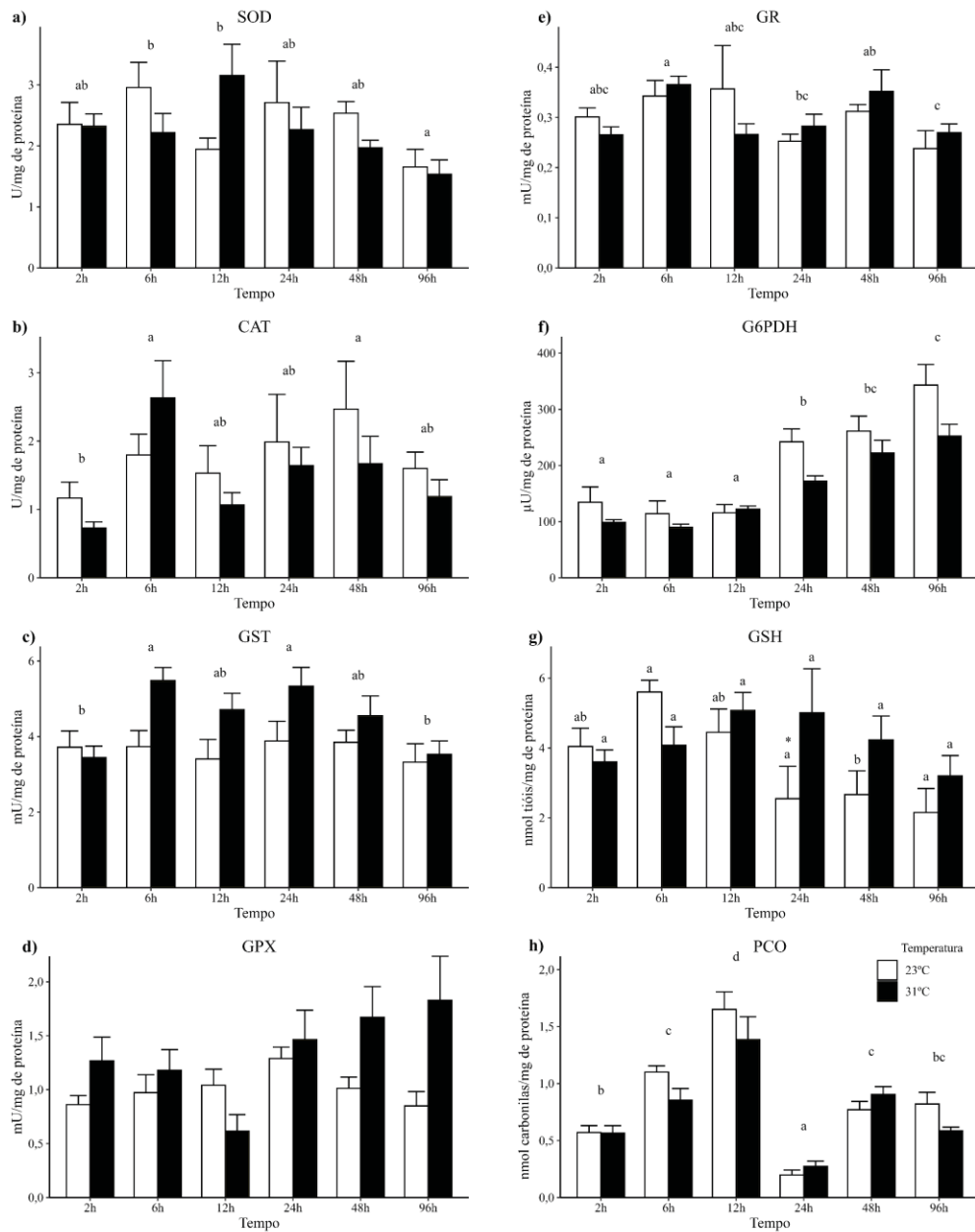
FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Atividades das enzimas relacionadas com a defesa antioxidante e níveis de glutatona reduzida e proteínas carboniladas do músculo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição à temperatura de 15 °C e seu controle à 23°C. Enzimas de defesa antioxidante: a. SOD – superóxido dismutase, b. CAT – catalase, c. GST – glutatona S-transferase, d. GPx, glutatona peroxidase, e. GR – glutatona redutase e f. G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase. Antioxidante não enzimático: g. GSH – glutatona reduzida. Marcador de dano em proteínas: h. PCO – proteínas carboniladas. Os dados estão apresentados com os valores da média e erro padrão da média. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças significativas para interação (experimental versus controle dentro do tempo), as letras acima das barras representam diferenças significativas ao longo do tempo, demonstradas para cada tratamento (temperatura) separadamente quando houve diferenças significativas para interação (significativo quando $p < 0,05$). Unidades de medida: U – unidade, mU – miliunidade, μU – microunidade e nmol - nanomol. Os valores estão representados em unidades, nmol de tióis ou nmol de carbonila por miligrama (mg) de proteína.

5.1.4.2 Alta temperatura (31 °C)

O choque térmico de alta temperatura no músculo de *A. lacustris* (FIGURA 13), não provocou alterações para as enzimas da defesa antioxidante e danos celulares. Houve aumento dos níveis de GSH (FIGURA 13. g). em 24h.

FIGURA 13– ATIVIDADES DAS ENZIMAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE, PCO E GSH EM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2021)

LEGENDA: Atividades das enzimas relacionadas com a defesa antioxidante e níveis de glutatona reduzida e proteínas carboniladas do músculo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição à temperatura de 31 °C e seu controle à 23°C. Enzimas de defesa antioxidante: a. SOD – superóxido dismutase, b. CAT – catalase, c. GST – glutatona S-transferase, d. GPx, glutatona peroxidase, e. GR – glutatona redutase e f. G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase. Antioxidante não enzimático: g. GSH – glutatona reduzida. Marcador de dano em proteínas: h. PCO – proteínas carboniladas. Os dados estão apresentados com os valores da média e erro padrão da média. Os asteriscos acima das barras indicam diferenças significativas para interação (experimental versus controle dentro do tempo), as letras acima das barras representam diferenças significativas ao longo do tempo, demonstradas para cada tratamento (temperatura) separadamente quando houve diferenças significativas para interação (significativo quando $p < 0,05$). Unidades de medida: U – unidade, mU – miliunidade, μU – microunidade e nmol – nanomol. Os valores estão representados em unidades, nmol de tióis ou nmol de carboníla por miligrama (mg) de proteína.

5.2 ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTAS DE BIOMARCADORES

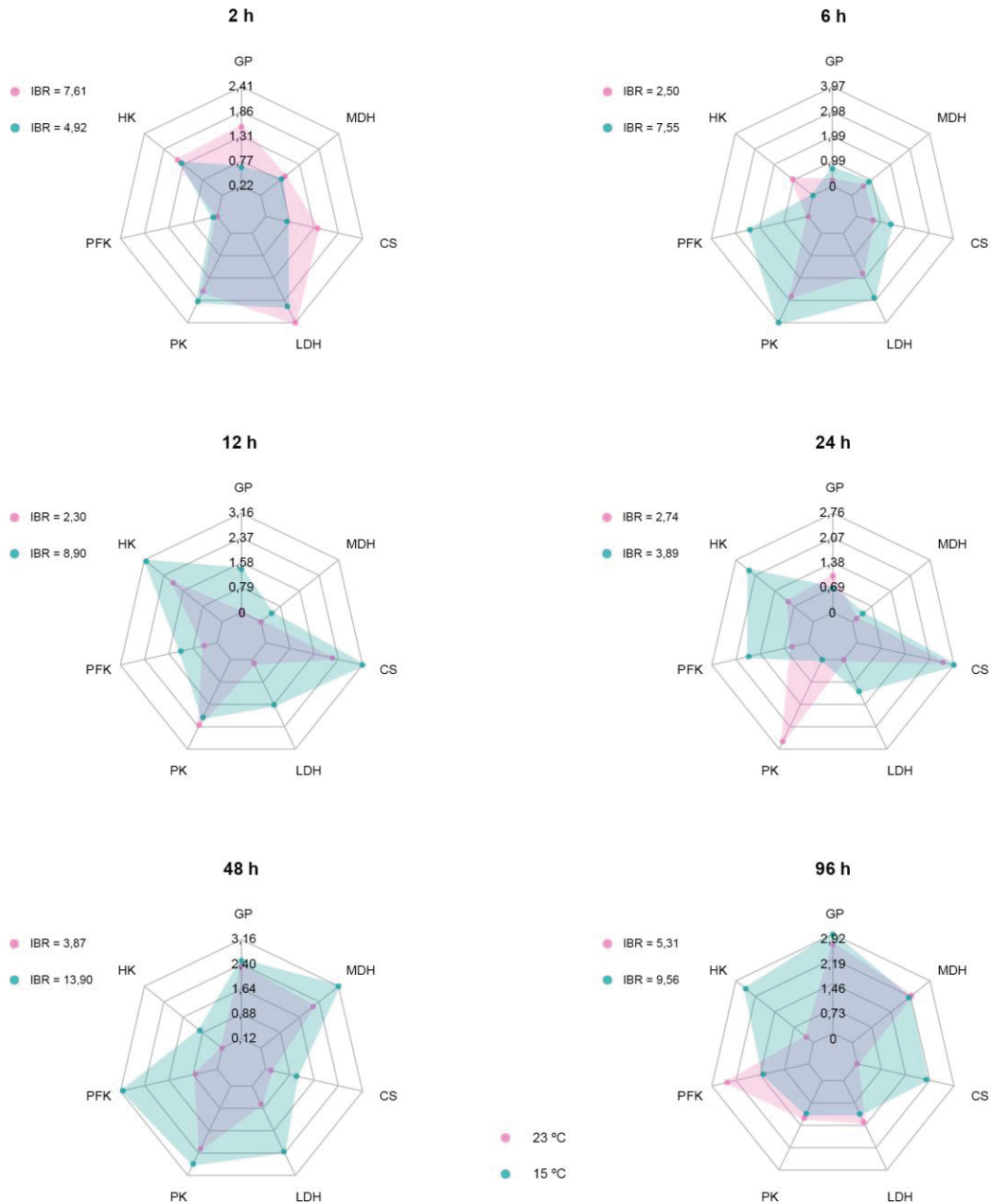
Neste trabalho também foi analisado o Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR do inglês - *Integrated Biomarker Response*) proposto por Beliaeff e Burgeot (2002), o método de cálculo utilizado foi a adaptação proposta por Devin et. al (2014). Complementarmente é demonstrado uma representação com gráficos de radar para o metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs para temperatura baixa e alta, metabolismo de proteínas e ciclo de Krebs para temperatura e alta e defesa antioxidante e danos celulares para temperatura baixa e alta.

A área do gráfico de radar corresponde ao valor de IBR. Gráficos de radar usando os valores do IBR em vez de dados dos biomarcadores tornam possível visualizar diferenças entre as temperaturas para vários biomarcadores simultaneamente, melhorando a comparação entre as situações experimentais. Devido ao limite mínimo de biomarcadores para a análise e o sentido fisiológico das vias, as enzimas relacionadas ao ciclo de Krebs foram alocadas juntamente com as enzimas do metabolismo de proteínas e metabolismo de carboidratos. A seguir serão demonstradas as análises de IBR, considerando que foram feitas as associações e inferências com base nas diferenças observadas na estatística. As demais variações não foram elencadas.

5.2.1 IBR para baixa e alta temperatura no metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs

O IBR para metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs de baixa temperatura (FIGURA 14), contemplou em um âmbito geral as diferenças observadas individualmente nas enzimas GP e HK. Houve redução da GP em 2h o índice acompanhou com um índice mais baixo neste horário para o grupo experimental (de 7,61 para 4,92). Posteriormente a GP teve um aumento em 12h, observado também no índice IBR (de 2,3 para 8,9). Por fim, o piruvato um aumento em 48h e HK demonstrou um aumento em 96h respectivamente, acompanhados também pelo índice como segue: em 48h variou de 3,87 para 13,9 e em 96h variou de 5,31 para 9,56. Para alta temperatura (FIGURA 15)

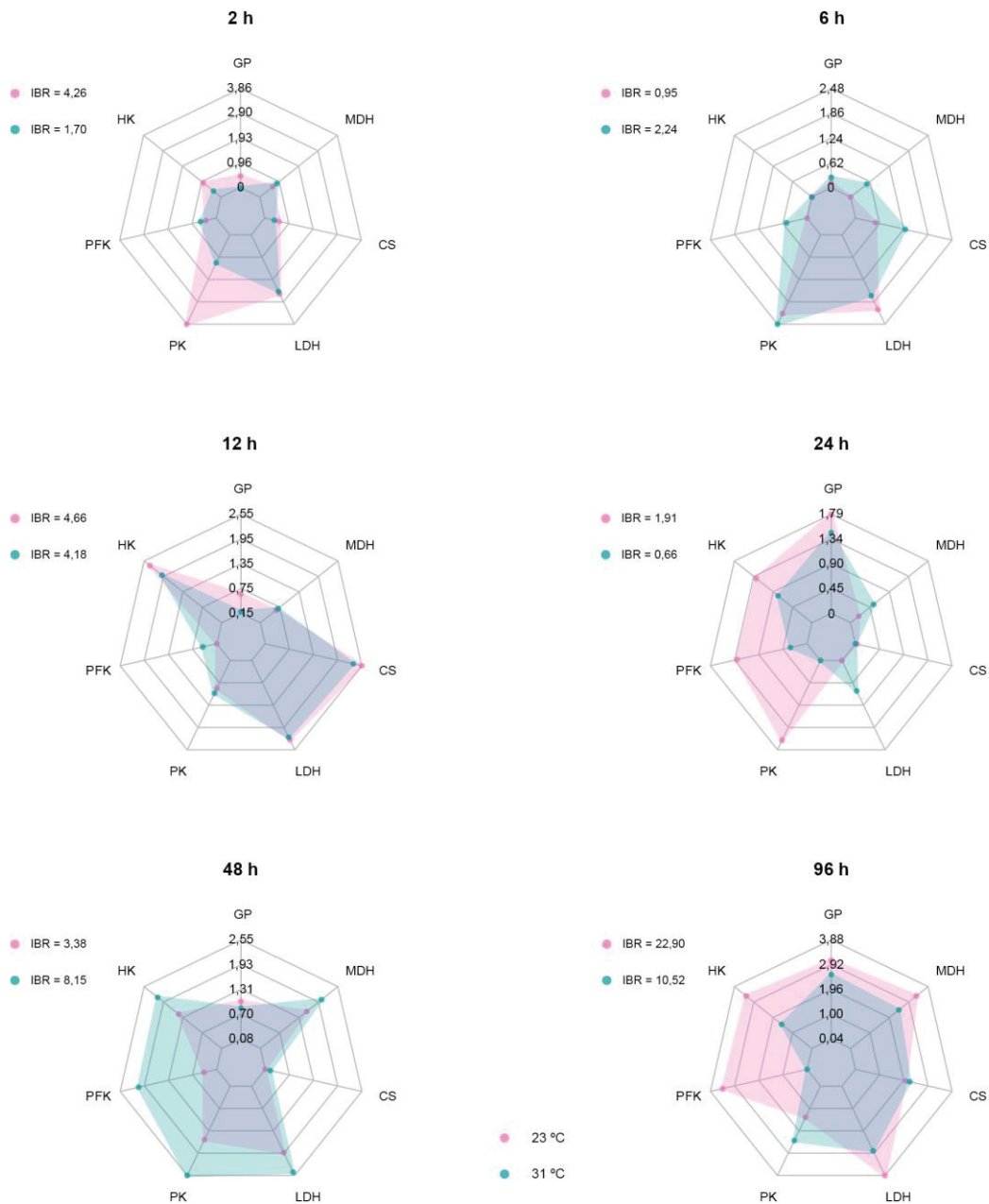
FIGURA 14 - IBR DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS PARA BAIXA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivo gráfico de radar em relação ao metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs para cada regime de tempo (2, 6, 12, 24, 48 e 96h) comparando baixa temperatura (15 °C) e seu respectivo controle (23 °C). GP – glicogênio fosforilase, HK – hexoquinase, PFK – fosfofrutoquinase, PK – piruvato quinase, LDH – lactato desidrogenase, CS – citrato sintase e MDH – malato desidrogenase.

FIGURA 15 - IBR DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E CICLO DE KREBS PARA ALTA TEMPERATURA



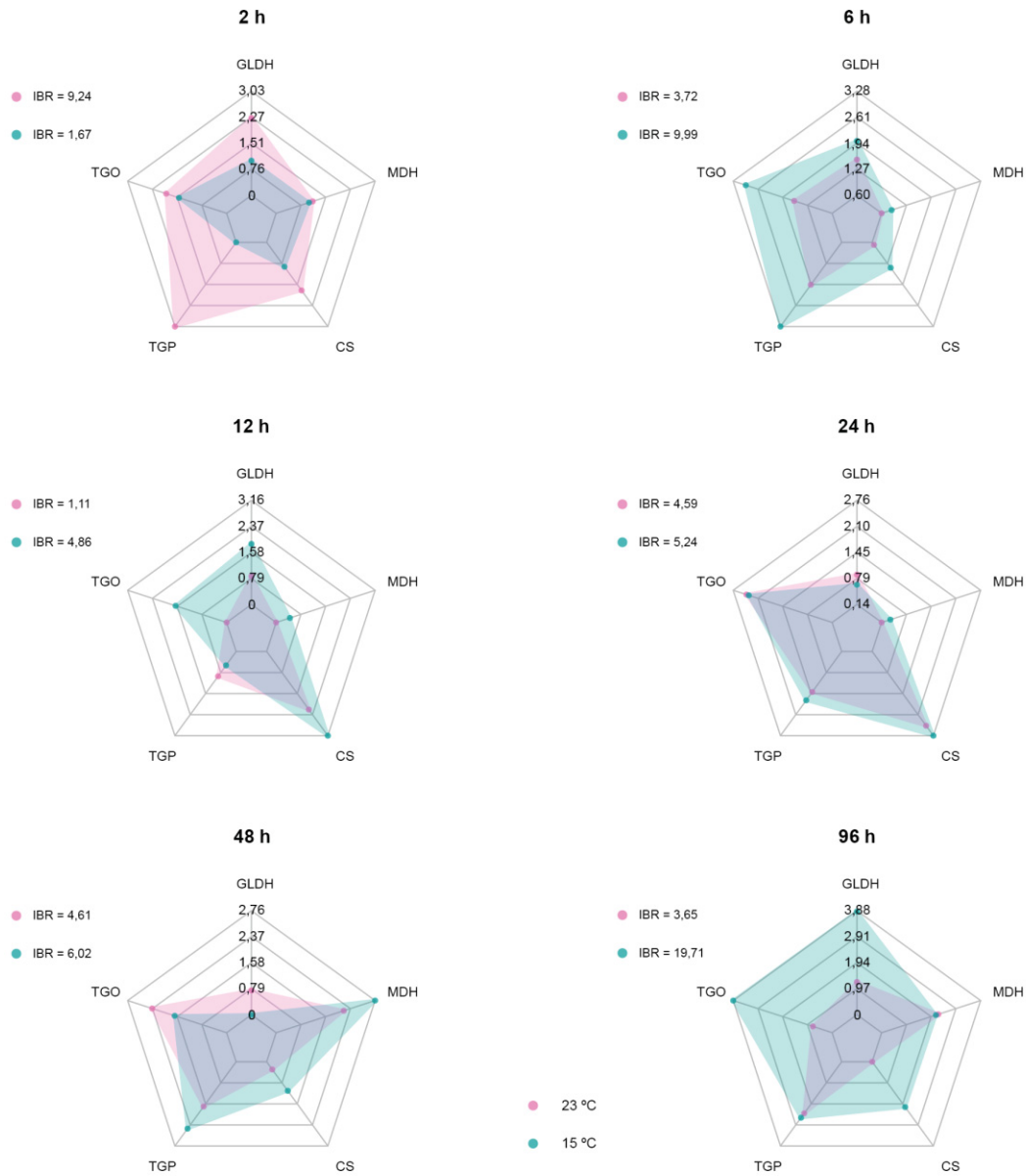
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivo gráfico de radar em relação ao metabolismo de carboidratos e ciclo de Krebs para cada regime de tempo (2, 6, 12, 24, 48 e 96h) comparando alta temperatura (31 °C) e seu respectivo controle (23 °C). GP – glicogênio fosforilase, HK – hexoquinase, PFK – fosfofrutoquinase, PK – piruvato quinase, LDH – lactato desidrogenase, CS – citrato sintase e MDH – malato desidrogenase.

5.2.2 IBR para baixa e alta temperatura no metabolismo de proteínas e ciclo de Krebs

Em baixa temperatura não houve alterações significativas para o metabolismo de proteínas e ciclo de Krebs. A FIGURA 16 demonstra os valores de IBR para esta via metabólica em baixa temperatura. Em alta temperatura (FIGURA 17), o IBR contemplou as diferenças observadas individualmente nas enzimas TGO e TGP que apresentaram em 2h, o índice acompanhou com um índice mais baixo neste horário para o grupo experimental (de 4,52 para 0,41). Posteriormente houve um aumento da TGP em 48h, observado também no índice IBR (de 0,42 para 3,52). Por fim, a TGO teve uma redução em 96h, que também refletiu no índice (de 22,40 para 16,52).

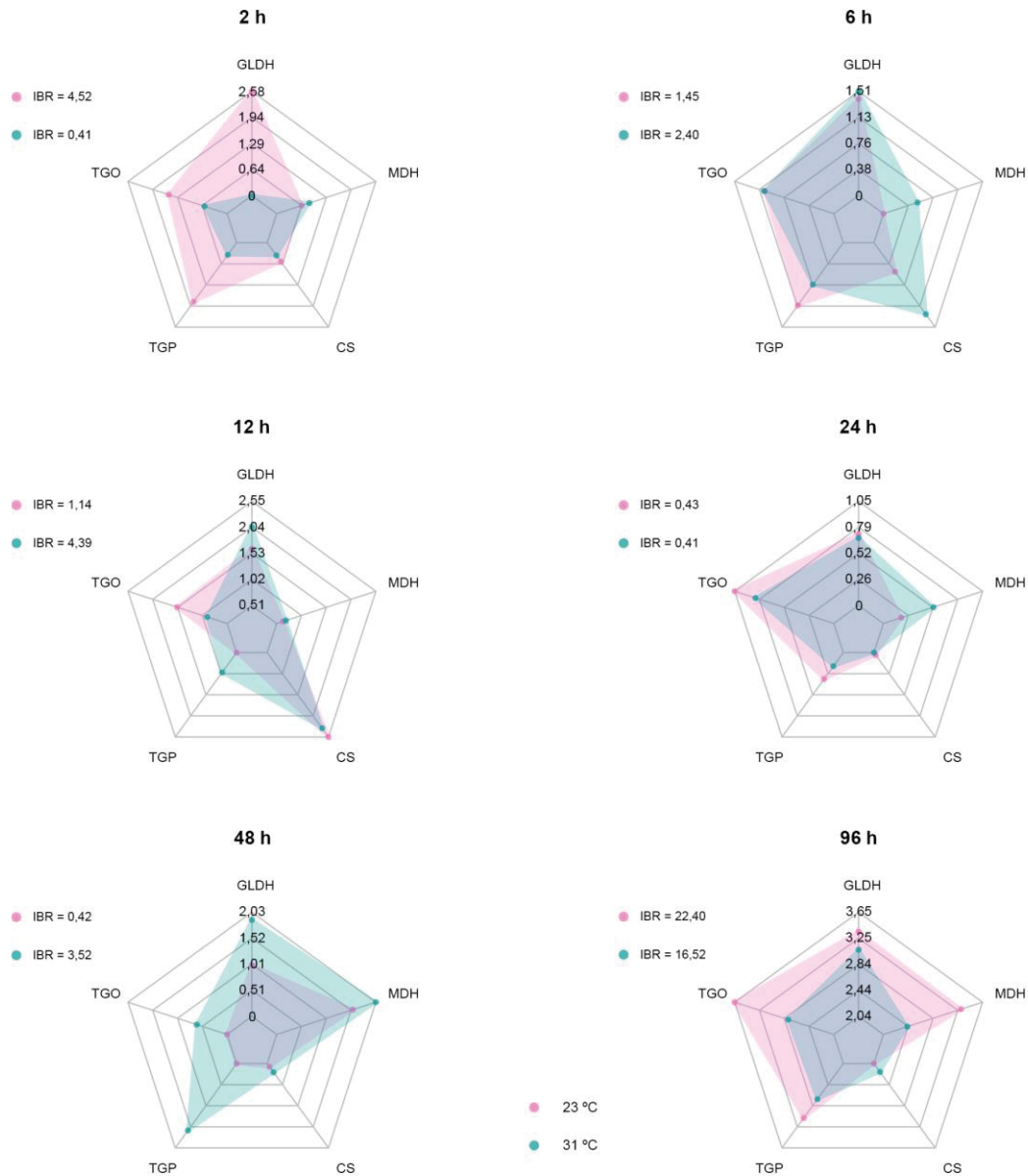
FIGURA 16 - IBR DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS E CICLO DE KREBS PARA BAIXA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivo gráfico de radar em relação ao metabolismo de proteínas e ciclo de Krebs para cada regime de tempo (2, 6, 12, 24, 48 e 96h) comparando baixa temperatura (15 °C) e seu respectivo controle (23 °C). GLDH – glutamato desidrogenase, TGO – transaminase glutâmico oxalacética, TGP – transaminase glutâmico pirúvica, CS – citrato sintase e MDH – malato desidrogenase.

FIGURA 17 - IBR DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS E CICLO DE KREBS PARA ALTA TEMPERATURA



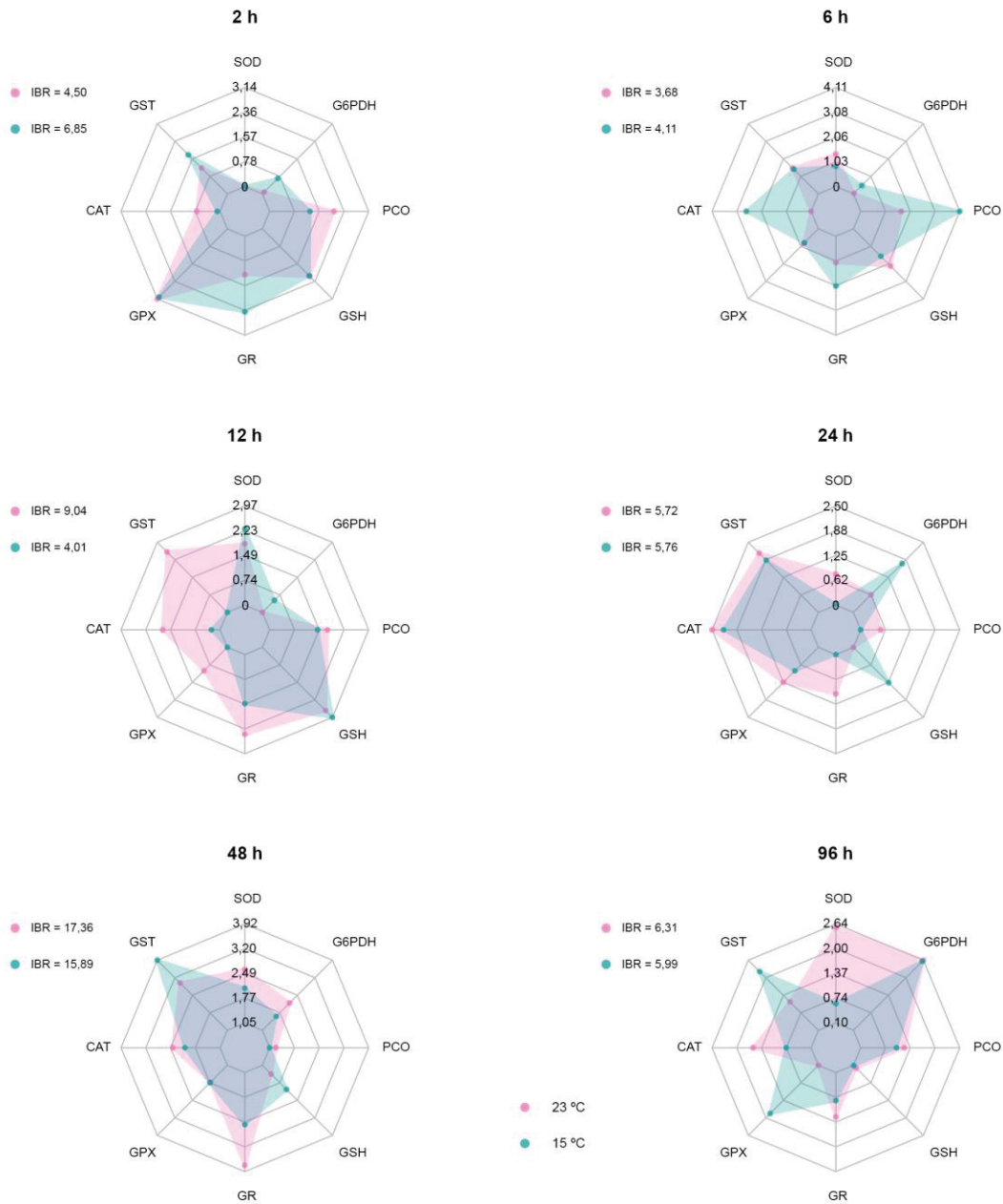
FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivo gráfico de radar em relação ao metabolismo de proteínas e ciclo de Krebs para cada regime de tempo (2, 6, 12, 24, 48 e 96h) comparando alta temperatura (31 °C) e seu respectivo controle (23 °C). GLDH – glutamato desidrogenase, TGO – transaminase glutâmico oxalacética, TGP – transaminase glutâmico pirúvica, CS – citrato sintase e MDH – malato desidrogenase.

5.2.3 IBR para baixa e alta temperatura na defesa antioxidante e danos celulares

Em baixa temperatura (FIGURA 18), o IBR contemplou as diferenças observadas individualmente na GR, que apresentou um aumento em 2h, o índice também teve um aumento (de 4,50 para 6,85). Os biomarcadores GR e PCO apresentaram um aumento em 6h, o índice acompanhou com um valor maior neste horário para o grupo experimental (de 3,68 para 4,11). Posteriormente houve uma redução da GR em 24 e 48h, entretanto valor do índice seguiu apresentou uma variação de 5,72 para 5,76 e de 17,36 para 15,89, respectivamente. Em alta temperatura não houve alterações significativas para o metabolismo de proteínas e ciclo de Krebs. A FIGURA 19 demonstra os valores de IBR para esta via metabólica em alta temperatura.

FIGURA 18 - IBR DA DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS CELULARES PARA BAIXA TEMPERATURA

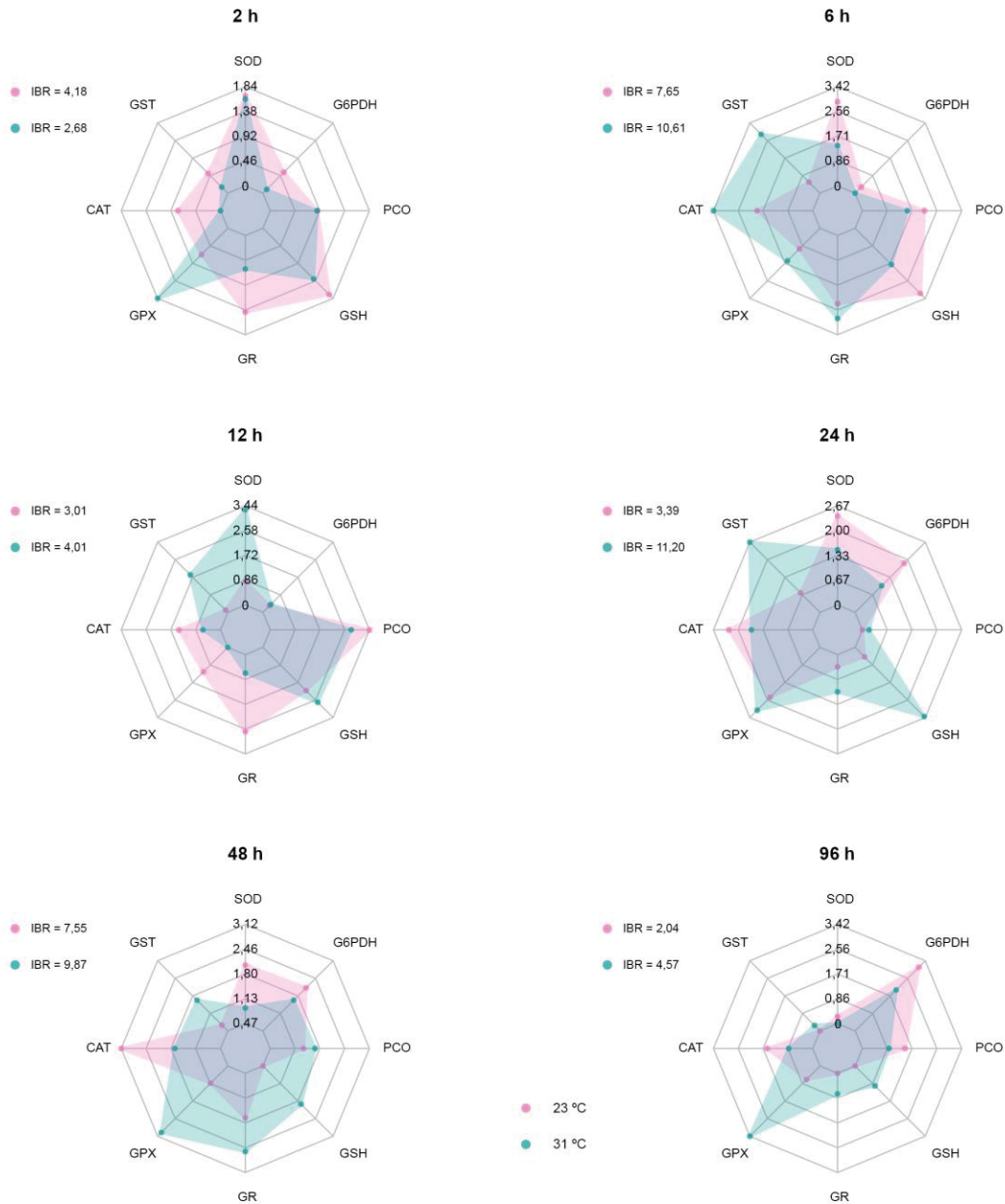


FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivo gráfico de radar em relação a defesa antioxidante e danos celulares para cada regime de tempo (2, 6, 12, 24, 48 e 96h) comparando baixa temperatura (15 °C) e seu respectivo controle (23 °C). SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GST – glutiona S-transferase, GPx, glutiona peroxidase, GR – glutiona redutase, G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase, PCO – proteínas carboniladas e GSH – glutiona reduzida.

FIGURA 19 - IBR DA DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS CELULARES PARA ALTA TEMPERATURA

as

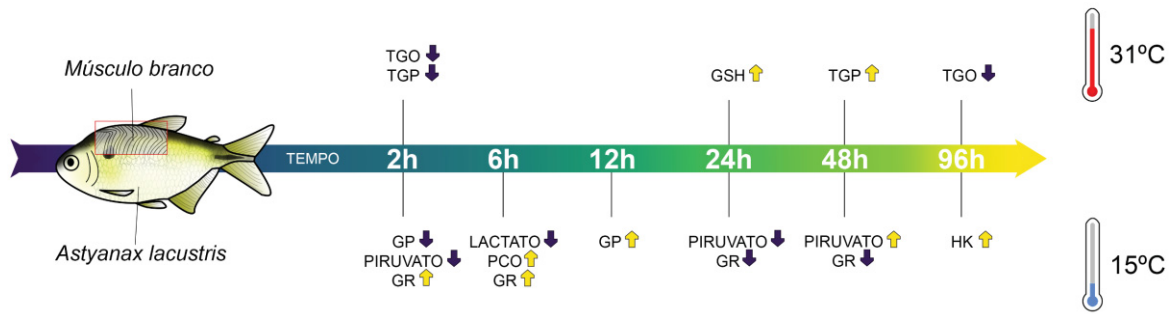


FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivo gráfico de radar em relação a defesa antioxidante e danos celulares para cada regime de tempo (2, 6, 12, 24, 48 e 96h) comparando alta temperatura (31 °C) e seu respectivo controle (23 °C). SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GST – glutiona S-transferase, GPx, glutiona peroxidase, GR – glutiona redutase, G6PDH – glicose-6-fosfato desidrogenase, PCO – proteínas carboniladas e GSH – glutiona reduzida.

Um resumo destas alterações significativas pode ser observado na FIGURA 20.

FIGURA 20 - ALTERAÇÕES PARA INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E TEMPO



FONTE: O autor (2021).

LEGENDA: Representação da espécie *Astyanax lacustris* com destaque para o órgão analisado (músculo), incluindo um resumo das alterações significativas para interação da temperatura e tempo (2, 6, 12, 24, 48 ou 96h) nos biomarcadores analisados. A parte superior representa as alterações da alta temperatura (31 °C) em relação ao seu controle (23°C), a seta central (degradê) indica os respectivos tempos em que houve as alterações. e a parte inferior representa as alterações da baixa temperatura (15 °C) em relação ao seu controle (23°C). A seta ao lado de cada enzima indica se a alteração foi no sentido de aumentar (seta amarela) ou diminuir (seta roxa) a atividade ou nível do biomarcador. AST/TGO – aspartato aminotransferase/transaminase glutâmico oxalacética, ALT/TGP – alanina aminotransferase/transaminase glutâmico pirúvica, GSH – glutationa reduzida, GP – glicogênio fosforilase, GR – glutationa redutase, PCO – proteínas carboniladas, HK – hexoquinase.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisado os efeitos do choque térmico agudo de alta e baixa temperatura no metabolismo de *A. lacustris*. Para esta avaliação foram utilizados biomarcadores do metabolismo energético de carboidratos, proteínas, da defesa antioxidante e alguns marcadores de dano frente ao estresse oxidativo.

A mortalidade de *A. lacustris* durante o bioensaio (3,9%) corresponde ao esperado em condições experimentais que são valores menores que 10% (ALMEIDA et al., 2015). As diferenças observadas ao longo do tempo estão demonstradas em baixa e alta temperatura. Estas variabilidades podem ser atribuídas ao ritmo circadiano e a própria alimentação dos peixes que pode variar ao longo dos dias/horas. Isso interfere diretamente no metabolismo, que é altamente regulado pela disponibilidade de substratos obtidos através da ingestão de alimentos (GUILLEN et al., 2019). Outro possível fator que pode ter influenciado é o próprio estresse resultado da remoção do peixe do tanque de aclimação e acomodação no aquário do ensaio. Essas diferenças são niveladas em relação ao foco do estudo (a interação entre temperatura e tempo) graças aos controles que acompanharam conjuntamente cada grupo experimental. As próximas seções discutem o alvo deste estudo, a diferença para interação entre temperatura em cada regime de tempo testado.

Nas seções abaixo são discutidos os principais resultados obtidos deste trabalho, que podem prover inferências sobre o *status* energético e respostas fisiológicos de *A. lacustris* frente ao choque térmico.

6.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, CICLO DE KREBS, METABÓLITOS INTERMEDIÁRIOS E GLICOGÊNIO

Inicialmente, a temperatura não gerou muitos efeitos no metabolismo de carboidratos (até 24h). Entretanto, após 48h, esta via demonstrou mais respostas ao choque térmico. A redução na atividade da GP em 2h em músculo de *A. lacustris* sob baixa temperatura (15°C), o que indica uma necessidade de inibição da glicogenólise. No choque térmico de baixa temperatura pode ser esperado uma inibição da GP (neste trabalho pode ser associado a redução do piruvato, também em 2h), visto que

a temperatura baixa pode induzir depressão metabólica nos peixes, (IBARZ et al., 2010), reduzindo as necessidades energéticas destes animais, o que pode explicar essa inibição inicial da GP. Essa redução inicial da glicogenólise é corroborada com o IBR (FIGURA 14), que possui um índice menor em 2h para baixa temperatura.

Lermen e colaboradores (2004) ao avaliarem o glicogênio do músculo branco de *R. quelem* não observaram alteração à exposição aguda (12h) em baixa ou alta temperatura (15°C e 31°C), entretanto houve um aumento de glicogênio em exposição crônica (21 dias). A sua justificativa, é a utilização do glicogênio a partir do fígado em vez do músculo como fonte de energia principal (LERMEN et al., 2004; CHATZIFOTIS et al., 2010; ROSSI et al., 2017).

O fígado do peixe *Chanos chanos*, de água salgada, submetido a baixa temperatura (18 °C em relação ao controle 28 °C) teve comportamento semelhante em relação ao encontrado no músculo do presente estudo, com uma redução inicial da GP nas primeiras horas (6 e 12h), com posterior aumento ao longo do tempo. Esta situação pode ser explicada por hormônios do estresse que devem induzir a degradação de glicogênio para atingir a demanda de glicose em choque térmico a baixa temperatura (CHANG et al., 2018), mas que é inibida no início e aumenta ao longo do tempo.

No músculo de *A. lacustris* em baixa temperatura, a possível redução da glicólise nos horários iniciais do choque térmico também é suportada por outros marcadores, como o piruvato, cujos níveis diminuíram em 2h e 24h. Em sequência também houve redução da quantidade de lactato em 6h. O piruvato pode ser convertido em lactato e exportado para o sangue para posteriormente ser metabolizado no fígado através da gliconeogênese, e este fenômeno é chamado de ciclo de Cori (SALWAY, 2017). Um indício da ativação deste ciclo no presente estudo é que houve um possível aumento da gliconeogênese na baixa temperatura (15°C) em 72h no fígado, em uma abordagem paralela nestes mesmos indivíduos (Schleger et al. não publicado).

O aumento da atividade da glicogenólise pode ser inferido a posteriori, com a indução da atividade da GP, que aumentou em 12h, com os aumentos dos níveis de piruvato em 48h e da atividade da HK em 96h. De maneira complementar, é possível ver índices mais altos do IBR em relação a demanda energética de carboidratos para 12, 48 e 96h (FIGURA 14).

A diminuição do metabolismo aeróbico para músculo em peixes é reportada para exposições a temperaturas baixas, mas temperaturas altas também tem esse efeito à medida que ultrapassam o limiar de temperatura ótima (PORTNER; FARRELL, 2008; KYPRIANOU et al., 2010). Em contrapartida, no rim a sua ativação pode ocorrer de modo inverso, como uma estratégia importante para combater o estresse térmico (YANG et al., 2020). No músculo de *A. lacustris* as variações de temperatura não influenciaram as atividades das enzimas relacionadas com o metabolismo aeróbico, a CS e a MDH. Também não houve alterações da LDH, sugerindo que o choque térmico não promoveu a ativação da via anaeróbica. Adicionalmente, para 31 °C não houve alterações nas enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos analisadas. Essa ausência do aumento do metabolismo anaeróbico ou aeróbico pode sugerir que os tratamentos testados não provocaram um aumento na demanda de ATP para a manutenção da temperatura (SONG et al., 2019). Outras hipóteses são de que o peixe pode estar utilizando outro mecanismo de fornecimento de ATP (BORCHEL et al. 2019), como por exemplo a via da fosfocreatina quinase, ou mesmo que a temperatura baixa não afetou a homeostase do animal.

6.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO DE PROTEÍNAS

Não existem muitos dados sobre o efeito da temperatura e a eficiência da utilização das proteínas por peixes e os dados disponíveis não são concisos (GUERREIRO et al., 2012). Peixes são capazes de hidrolisar proteínas musculares para prover energia presente nos aminoácidos, através do ciclo de Krebs e gliconeogênese (NEMOVA et al., 2021).

A expressão da GLDH é documentada em músculo de peixes, associando-se ao metabolismo de proteínas (CHAMBERLIN; GLEMET; BALLANTYNE, 1991; LIU et al., 2012). Entretanto no presente trabalho, a temperatura não gerou alterações na atividade da GLDH muscular em ambas as temperaturas testadas, indicando que ela não é afetada pelas temperaturas testadas. O aumento da atividade da GDH é documentado como uma forma de utilizar aminoácidos como fonte de energia em virtude de variações da temperatura (OYARZÚN et al., 2018). Entretanto, no presente trabalho esse não foi um recurso utilizado para o músculo de *A. lacustris*, podendo

indicar, que o nível basal de atividades das enzimas já é suficiente para suprir as necessidades metabólicas e não houve uma demanda maior deste metabolismo.

A TGO e TGP visam lidar com um aumento na demanda energia (PANASE et al., 2019). A baixa temperatura também não gerou alteração das demais enzimas relacionadas com o metabolismo de proteínas (TGO e TGP) em músculo de *A. lacustris*. Essa ausência de modificações em baixa temperatura pode estar relacionada com uma compensação realizada pelo metabolismo de carboidratos, que passou por modificações neste trabalho. Outra alternativa seriam modificações no metabolismo lipídico, que pode ser mobilizado em baixa temperatura (VERGAUWEN et al., 2010).

Song et al.(2019) obtiveram resultados semelhante aos nossos, com ausência de perturbação no metabolismo de aminoácidos, entretanto houve aumento da via de biossíntese de ácidos graxos e metabolismo do ácido araquidônico. Isso pode indicar que para o choque térmico de baixa temperatura outras vias são ativadas de acordo com a necessidade do organismo. Entretanto, é difícil concluir um padrão metabólico geral em resposta a baixa temperatura, visto que outros trabalhos demonstram várias respostas metabólicas dependendo da espécie em questão (WEN et al., 2017).

Em 31 °C, as atividades das enzimas TGO e TGP diminuíram em 2h. Posteriormente houve alterações pontuais com aumento da TGP em 48h e redução da TGO em 96h. O aumento da atividade destes biomarcadores é associado a um recrutamento de aminoácidos para produção de energia de forma a compensar o estresse provocado pela temperatura (DALVI et al., 2017; WEN et al., 2017; YANG et al., 2020). Portanto, as reduções de TGO e TGP indicam houve uma menor demanda de proteínas na alta temperatura para 2 e 96h. O IBR para o metabolismo de proteínas e ciclo de Krebs (FIGURA 17) corrobora com esses resultados, onde foi possível visualizar diminuição do índice em 2 e 96h e aumento do índice em 48h, em conjunto com o aumento pontual observado para TGP.

A atividade das enzimas TGO e TGP pode ser associada ao ciclo de nucleotídeo purinas no músculo esquelético de peixes, diretamente vinculada a excreção de amônia (WAARDE, VAN, 1983; ALAM et al., 2020). A excreção de amônia pode ser associada ao comportamento alimentar dos peixes em relação a temperatura (LYYTIKÄINEN; JOBLING, 1998; BUCKING, 2017). Os peixes apresentam correlação positiva entre consumo de alimento e aumento da temperatura da água, entretanto, ao ultrapassar um limite de tolerância, ocorre um progressivo

declínio na alimentação (ERIEGHA; EKOKOTU, 2017). Desta maneira, a alta temperatura desencadeou uma resposta inesperada do metabolismo de proteínas com a redução de TGO e TGP (GUERREIRO et al., 2012). Futuros estudos podem lançar a luz a esta questão, analisando por exemplo, se a alimentação varia devido a este tipo de choque térmico, para explicar esse tipo de resposta pelo metabolismo de proteínas.

6.3 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NA DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS CELULARES

A enzima GR está relacionada com a reciclagem de GSSG em GSH, com a tendência de manter o nível de GSH adequado para a necessidade da defesa antioxidante. Em baixa temperatura, o músculo de *A. lacustris* teve alterações significativas na atividade da GR, apresentando aumento de sua atividade em 2h e 6h, concomitante com aumento na PCO em 6h. Tais resultados demonstram um estresse inicial induzido pela temperatura e podem sugerir que estas variações foram determinantes nas alterações que ocorreram no metabolismo de carboidratos no músculo de *A. lacustris*.

A baixa temperatura pode gerar um aumento das EROs e consequente aumento dos níveis de danos e alterações compensatórias antioxidantes em diferentes tecidos para lidar com o estresse causado pela baixa temperatura (KAMMER et al., 2011; SAHOO; KARA, 2014), explicando as alterações em relação ao estresse oxidativo observadas em baixa temperatura. O IBR corrobora com tais proposições, demonstrando um índice mais alto em 2h e 6h, quando a GR e as PCOs aumentam (FIGURA 18), e demonstrando um índice mais baixo ou muito próximo do controle, em 24 e 48h, coincidindo com a redução da atividade da GR em 15 °C. Portanto é possível inferir um estresse oxidativo nas primeiras horas de choque térmico, entretanto o peixe parece lidar bem nos demais horários, sem muitas alterações na defesa antioxidante ou evidência de danos através dos biomarcadores analisados.

Em alta temperatura de 31 °C, o metabolismo de ectodérmicos tende a aumentar, mantendo alto os níveis de EROs e da atividade de enzimas envolvidas na defesa contra o estresse oxidativo gerado na respiração mitocondrial (BAGNYUKOVA

et al., 2007; MEHDI et al., 2019). No presente trabalho, uma indicação do estresse em alta temperatura foi indicado pela GSH.

A GSH é o maior regulador não proteico das propriedades intracelulares do estado redox (NAKANO et al., 2014). Para 31°C, a única alteração nos marcadores da defesa antioxidante foi com um aumento da GSH em 48h, indicando uma mobilização da defesa antioxidante (SAHOO; KARA, 2014), entretanto, essa alteração foi pontual. Nakano et al. (2014) também relataram um aumento de GSH muscular relacionado a choque térmico de alta temperatura, relacionando com a neutralização de EROS. O IBR demonstra um aumento em seu índice em 48h para alta temperatura, demonstrando essa mobilização na defesa antioxidante neste momento (FIGURA 19).

No presente trabalho, o choque térmico não ocasionou a ativação das demais enzimas da defesa antioxidante analisadas em 31°C. Entretanto, isto pode ser um fenômeno que pode ser restrito a este órgão para esta espécie, visto que diferentes órgãos se comportam ativando enzimas e a defesa antioxidante de diferentes formas frente ao estresse (NAKANO et al., 2014; JOY et al., 2017). Tecidos mais aeróbicos (como brânquias) parecem ser mais sensíveis a estresse térmico do que tecidos menos aeróbicos como músculo esquelético, que consegue energia anaerobicamente pela conversão de piruvato em lactato (MADEIRA et al., 2016; CAMPOS et al., 2018).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo demonstrou que a temperatura influenciou no metabolismo do músculo de *A. lacustris*. Os resultados indicam uma oscilação na demanda energética em 15 °C, onde houve uma redução inicial (em 2h) com posterior ativação (a partir de 12h) da glicogenólise como possível alternativa para lidar com o estresse. Nas primeiras horas (até 24h), não é possível ver modificações do metabolismo de carboidratos em relação a um aumento da demanda energética para combater um estresse, portanto a demanda de ATP pode estar sendo suprida por outra via metabólica, como por exemplo a fosfocreatina quinase, não analisada neste trabalho. Futuros estudos podem lançar luz a esta questão. Além disso, em 15 °C também houve indicação de estresse oxidativo, com indícios de danos em proteínas, revelando que esta temperatura foi mais impactante para o músculo de *A. lacustris*.

Em 31 °C, não houve variações para o metabolismo de carboidratos, o que pode indicar uma plasticidade do peixe para esse range de temperatura. Um indício de estresse nesse tratamento é indicado somente pelo aumento da GSH (em 24h). Em relação aos efeitos desse estresse nas vias analisadas, foi observado apenas uma variação relevante no metabolismo de proteínas, em geral suprimindo a atividade de enzimas. Isso pode indicar que esta via não foi a chave para o aporte energético nesta situação. Desta forma, é possível concluir que o choque térmico altera o metabolismo de *A. lacustris*, entretanto o animal não sofre grandes consequências nessa faixa de tempo e temperatura, visto que não apresenta muitos danos ou grandes alterações em relação a defesa antioxidante e consegue sobreviver aos regimes testados.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. . p.121–126, 1984. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163>>.
- AKBARZADEH, A.; GÜNTHER, O. P.; HOUDE, A. L.; et al. Developing specific molecular biomarkers for thermal stress in salmonids. **BMC Genomics**, v. 19, n. 749, p. 1–28, 2018. Disponível em: <<https://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-5108-9>>.
- ALAM, M. S.; LIANG, X.; LIU, L.; et al. Effect of dietary protein-to-energy ratios on growth performance, body composition, feed utilization and nitrogen metabolism enzyme of *Cirrhinus mrigala*. **Aquaculture Research**, v. 51, n. 12, p. 1–9, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/are.14844>>.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F.; OLIVEIRA, A. R.; SILVA, M. DE N. P. DA; et al. Anoxia- and hypoxia-induced expression of LDH-A* in the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinis*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 2, p. 315–322, 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572011000200025&lng=en&tlng=en>.
- ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of Temperature in Juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) Biomarker Responses and Behaviour: Implications for Environmental Monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, p. 45–55, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12237-014-9792-7>>.
- ALMESELMANI, M.; DESHMUKH, P. S.; SAIRAM, R. K.; KUSHWAHA, S. R.; SINGH, T. P. Protective role of antioxidant enzymes under high temperature stress. **Plant Science**, v. 171, n. 3, p. 382–388, 2006.
- BAGNYUKOVA, T. V.; DANYLIV, S. I.; ZIN'KO, O. S.; LUSHCHAK, V. I. Heat shock induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, n. 5, p. 255–260, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306456507000307>>.
- BAI, J.; LIU, L.; HAN, Y.; JIA, C.; LIANG, C. One-step detection of hexokinase activity using a personal glucose meter. **Analytical Methods**, v. 10, n. 18, p. 1–7, 2018. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/ay/c8ay00498f>>.
- BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the Stress Responses in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. 62, p. 1–12, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00062/full>>.
- 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. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022098106004989>>.

BARTON, B. A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002. Disponível em: <<https://academic.oup.com/icb/article-lookup/doi/10.1093/icb/42.3.517>>.

BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C. S.; BAUMGARTNER, D.; et al. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. EDUEM, 2012.

BEITNER, R. **Regulation of carbohydrate metabolism**. CRC Press, 1985.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316–1322, 2002.

BIDINOTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. , v. 10, p. 53–60, 1997.

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. 1–15, 2017. Blackwell Publishing Ltd.

BLIER, P. Fish Health: An Oxidative Stress Perspective. **Fisheries and Aquaculture Journal**, v. 5, n. 1, 2014. Disponível em: <<https://www.omicsonline.com/open-access/fish-health-an-oxidative-stress-perspective.php?aid=23576>>.

BOMBARDELLI, R. A.; MEURER, F.; SYPERRECK, M. A. Metabolism Protéico em Peixes. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 7, n. 1, p. 69–79, 2004. Disponível em: <<https://revistas.unipar.br/index.php/veterinaria/article/view/546>>.

BORCHEL, A.; VERLEIH, M.; KÜHN, C.; REBL, A.; GOLDAMMER, T. Evolutionary expression differences of creatine synthesis-related genes: Implications for skeletal muscle metabolism in fish. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 5429, 2019. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-019-41907-6>>. Acesso em: 20/11/2021.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An Analysis of Transformations. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 26, n. 2, p. 211–252, 1964. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2517-6161.1964.tb00553.x>>.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269776905273>>.

BUCKING, C. A broader look at ammonia production, excretion, and transport in fish: a review of impacts of feeding and the environment. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 187, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00360-016-1026-9>>.

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. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.064>>.

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, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.051>>.

CAMPOS, D. F.; VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. The influence of lifestyle and swimming behavior on metabolic rate and thermal tolerance of twelve Amazon forest stream fish species. **Journal of Thermal Biology**, v. 72, p. 148–154, 2018. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.02.002>>.

CAPPON, I. D.; NICHOLLS, D. M. Factors involved in increased protein synthesis in liver microsomes after administration of DDT. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 5, n. 2, p. 109–118, 1975. Academic Press.

CARVALHO, S.; FERNANDES, M. N. Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, v. 151, n. 3, p. 437–442, 2008.

CHAMBERLIN, M. E.; GLEMET, H. C.; BALLANTYNE, J. S. Glutamine metabolism in a holostean (*Amia calva*) and teleost fish (*Salvelinus namaycush*). **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 260, n. 1, p. 159–166, 1991.

CHANG, C.-H.; HUANG, J.-J.; YEH, C.-Y.; 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. 1–13, 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. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/jeb/article/210/19/3494/17096/Regulation-of-glycogen-metabolism-in-gills-and>>.

CHANGE, I. P. ON C. **Climate Change 2013: the Physical Science Basis**. Cambridge: Cambridge University Press, 2014.

CHATZIFOTIS, S.; PANAGIOTIDOU, M.; PAPAIOANNOU, N.; et al. Effect of dietary lipid levels on growth, feed utilization, body composition and serum metabolites of meagre (*Argyrosomus regius*) juveniles. **Aquaculture**, v. 307, n. 1–2, p. 65–70, 2010. Elsevier.

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.

CHOWDHURY, S.; SAIKIA, S. K. Oxidative Stress in Fish: A Review. **Journal of Scientific Research**, v. 12, n. 1, p. 145–160, 2020.

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, 2000.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; PRISCO, G. DI. L-Glutamate dehydrogenase from the Antarctic fish *Chaenocephalus aceratus*: Primary structure, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 11–23, 2000.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; PRISCO, G. DI. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: Correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1250, n. 1, p. 76–82, 1995. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/016748389500046W>>.

COLLIER, R. J.; RENQUIST, B. J.; XIAO, Y. A 100-Year Review: Stress physiology including heatstress. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10367–10380, 2017. American Dairy Science Association. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2017-13676>>.

CRAWSHAW, L. I. Low-temperature dormancy in fish. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 246, n. 4, p. R479–R486, 1984. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1984.246.4.R479>>.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; et al. The Inhibition of Islet Superoxide Dismutase by Diabetogenic Drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235–241, 1981. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diab.30.3.235>>.

CURITIBA, R. P. C. Estiagem faz Rio Iguaçu registrar nível mais baixo desde 1931, indica monitoramento. Disponível em: <<https://g1.globo.com/pr/parana/noticia/2020/05/11/estiagem-faz-rio-iguacu-registrar-nivel-mais-baixo-desde-1931-indica-monitoramento.ghtml>>.

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. Pergamon.

DELARIVA, R. L.; NEVES, M. P.; LARENTIS, C.; et al. Fish fauna in forested and rural streams from an ecoregion of high endemism, lower Iguaçu River basin, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 3, p. 1–12, 2018.

DEVIN, S.; BURGEOT, T.; GIAMBÉRINI, L.; MINGUEZ, L.; PAIN-DEVIN, S. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 4, p. 2448–2454, 2014.

DILLON, M. E.; WANG, G.; HUEY, R. B. Global metabolic impacts of recent climate warming. **Nature**, v. 467, n. 7316, p. 704–706, 2010. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature09407>>.

DORST, R. M. VAN; GÅRDMARK, A.; SVANBÄCK, R.; et al. Warmer and browner waters decrease fish biomass production. **Global Change Biology**, v. 25, n. 4, p. 1395–1408, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gcb.14551>>.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

EDDY, B.; HANDY, R. D. **Ecological and environmental physiology of fishes**. 1st ed ed. Oxford: Oxford University Press, 2012.

ERIEGHA, O. J.; EKOKOTU, P. A. Factors affecting feed intake in cultured fish species: A review. **Animal Research International**, v. 14, n. 2, p. 2697–2709, 2017.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. HEAT-SHOCK PROTEINS, MOLECULAR CHAPERONES, AND THE STRESS RESPONSE: Evolutionary and Ecological Physiology. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 243–282, 1999. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.physiol.61.1.243>>.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. 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. Elsevier.

FEIDANTSIS, K.; PÖRTNER, H.-O.; ANTONOPOULOU, E.; MICHAELIDIS, B. Synergistic effects of acute warming and low pH on cellular stress responses of the gilthead seabream *Sparus aurata*. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 185, n. 2, p. 185–205, 2015.

FICKE, A. D.; MYRICK, C. A.; HANSEN, L. J. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 17, n. 4, p. 581–613, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11160-007-9059-5>>.

FROESE, R.; PAULY, D. World Wide Web Electronic Publication. 2021.

FROTA, A.; OTA, R. R.; DEPRÁ, G. DE C.; GANASSIN, M. J. M.; GRAÇA, W. J. DA. A new inventory for fishes of headwater streams from the rio das Cinzas and rio Itararé basins, rio Paranapanema system, Paraná, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 20, n. 1, p. 1–12, 2020.

GARCIA, A. M.; RASEIRA, M. B.; VIEIRA, J. P.; WINEMILLER, K. O.; GRIMM, A. M. Spatiotemporal Variation in Shallow-Water Freshwater Fish Distribution and Abundance in a Large Subtropical Coastal Lagoon. **Environmental Biology of Fishes**, v. 68, n. 3, p. 215–228, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1027366101945>>.

GBIF.ORG, O. Occurrence Download. , 2021. The Global Biodiversity Information Facility.

GONÇALVES, G. L. **Análise ambiental das áreas ribeirinhas do Rio Iguaçu : municípios de São Mateus do Sul a União da Vitória - PR e Canoinhas a Porto União - SC** /oai:ufpr.br:235124, 8. Aug. 2007. Disponível em: <<https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/11196>>.

GRIM, J. M.; SIMONIK, E. A.; SEMONES, M. C.; KUHN, D. E.; CROCKETT, E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 2, p. 383–390, 2013. Pergamon.

GUDERLEY, H. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. **Biological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 409–427, 2004.

GUERREIRO, I.; PERES, H.; CASTRO-CUNHA, M.; OLIVA-TELES, A. Effect of temperature and dietary protein/lipid ratio on growth performance and nutrient utilization of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Temperature and diet P/E on Senegalese sole performance. **Aquaculture Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 98–106, 2012. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2095.2011.00884.x>>.

GUILLEN, A. C.; BORGES, M. E.; HERRERIAS, T.; et al. Effect of gradual temperature increase on the carbohydrate energy metabolism responses of the Antarctic fish *Notothenia rossii*. **Marine Environmental Research**, v. 150, n. 104779, p. 1–16, 2019. Elsevier.

GUO, B.; WANG, F.; DONG, S.; HOU, C. Effects of rapid temperature changes on HK, PK and HSP70 of *Litopenaeus vannamei* in different seasons. **Journal of Ocean University of China**, v. 9, n. 3, p. 303–308, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11802-010-1742-9>>.

HAMAN, F.; ZWINGELSTEIN, G.; WEBER, J. Effects of hypoxia and low temperature on substrate fluxes in fish: plasma metabolite concentrations are misleading. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 273, n. 6, p. R2046–R2054, 1997. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.1997.273.6.R2046>>.

HARPER, C.; WOLF, J. C. Morphologic effects of the stress response in fish. **ILAR Journal**, v. 50, n. 4, p. 387–396, 2009.

HARROWER, J. R.; BROWN, C. H. Lactic Acid -a of Microliter Micromethod Samples Adapted To Field Collection. **Journal of Applied Physiology**, v. 32, n. 5, p. 709–711, 1972.

HAWKINS, C. L.; MORGAN, P. E.; DAVIES, M. J. Quantification of protein modification by oxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 8, p. 965–988, 2009. Pergamon.

HAYASHI, C.; MEURER, F.; BOSCOLO, W. R.; LACERDA, C. H. F.; KAVATA, L. C. B. Freqüência de arraçoamento para alevinos de lambari do rabo-amarelo (*Astyanax bimaculatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 21–26, 2004.

HE, J.; QIANG, J.; YANG, H.; et al. Changes in the fatty acid composition and regulation of antioxidant enzymes and physiology of juvenile genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus* (L.), subjected to short-term low temperature stress. **Journal of Thermal Biology**, v. 53, p. 90–97, 2015.

HOCHACHKA, P. W. 6 Intermediary Metabolism in Fishes. **Fish Physiology**, v. 1, p. 351–389, 1969. Academic Press.

HÖGLUND, E.; KORZAN, W.; ÅTLAND, Å.; et al. Neuroendocrine indicators of allostatic load reveal the impact of environmental acidification in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 229, n. 108679, p. 1–7, 2020. Elsevier.

HOWELL, P. J.; DUNHAM, J. B.; SANKOVICH, P. M. Relationships between water temperatures and upstream migration, cold water refuge use, and spawning of adult bull trout from the Lostine River, Oregon, USA. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 19, n. 1, p. 96–106, 2010.

HUSS, M.; LINDMARK, M.; JACOBSON, P.; DORST, R. M. VAN; GÅRDMARK, A. Experimental evidence of gradual size-dependent shifts in body size and growth of fish in response to warming. **Global Change Biology**, v. 25, n. 7, p. 2285–2295, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/gcb.14637>>.

IBARZ, A.; PADRÓS, F.; GALLARDO, M. Á.; et al. Low-temperature challenges to gilthead sea bream culture: review of cold-induced alterations and ‘Winter Syndrome.’ **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 20, n. 4, p. 539–556, 2010.

JIA, S.; LI, X.; ZHENG, S.; WU, G. Amino acids are major energy substrates for tissues of hybrid striped bass and zebrafish. **Amino Acids**, v. 49, n. 12, p. 2053–2063, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00726-017-2481-7>>.

JOHANSEN, J. L.; PRATCHETT, M. S.; MESSMER, V.; et al. Large predatory coral trout species unlikely to meet increasing energetic demands in a warming ocean. **Scientific Reports**, v. 5, n. 13830, p. 1–8, 2015. Nature Publishing Group. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep13830>>.

JOY, S.; ALIKUNJU, A. P.; JOSE, J.; et al. Oxidative stress and antioxidant defense responses of *Etroplus suratensis* to acute temperature fluctuations. **Journal of Thermal Biology**, v. 70, p. 20–26, 2017. Pergamon.

JÜRS, K. EFFECTS OF TEMPERATURE, SALINITY, AND FEEDING ON AMINOTRANSFERASE ACTIVITY IN THE LIVER AND WHITE MUSCLE OF RAINBOW. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 64, n. 2, p. 213–218, 1979.

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. The Company of Biologists. Disponível em: <www.ensembl.org>.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976.

KÜLTZ, D. Molecular and Evolutionary Basis of the Cellular Stress Response. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 225–257, 2005.

KYPRIANOU, T.; PÖRTNER, H. O.; ANESTIS, A.; et al. Metabolic and molecular stress responses of gilthead sea bream *Sparus aurata* during exposure to low ambient temperature: an analysis of mechanisms underlying the winter syndrome. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 180, n. 7, p. 1005–1018, 2010.

LENTH, R. V.; BUERKNER, P.; HERVE, M.; et al. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. , Mar. 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=emmeans>>.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; et al. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v. 239, n. 1–4, p. 497–507, 2004. Elsevier.

LESSER, M. P.; KRUSE, V. A. Seasonal temperature compensation in the horse mussel, *Modiolus modiolus*: metabolic enzymes, oxidative stress and heat shock proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 137, n. 3, p. 495–504, 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643303003799>>.

LEVESQUE, H. M.; MOON, T. W.; CAMPBELL, P. G. C.; HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 60, n. 3–4, p. 257–267, 2002.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. B. T.-M. IN E. [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Oxygen Radicals in Biological Systems Part C**. v. 233, p.346–357, 1994. Academic Press. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687994330409>>.

LI, X.; ZHENG, S.; WU, G. Nutrition and metabolism of glutamate and glutamine in fish. **Amino Acids**, v. 52, n. 5, p. 671–691, 2020. Springer Vienna. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00726-020-02851-2>>.

LIRA, L. V. G.; KURADOMI, R. Y.; SOUZA, T. G. DE; HAINFELLNER, P.; BATLOUNI, S. R. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 4, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/1_Astyanax-altiparanae-OVARIAN-MATURATION-AFTER-SPAWNING.html>.

LIU, S.; WANG, X.; SUN, F.; et al. RNA-Seq reveals expression signatures of genes involved in oxygen transport, protein synthesis, folding, and degradation in response to heat stress in catfish. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 12, p. 462–476, 2013. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/physiolgenomics.00026.2013>>.

LIU, Y.; LIU, J.; YE, S.; et al. Global metabolic responses of the lenok (*Brachymystax lenok*) to thermal stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 29, p. 308–319, 2019. Elsevier. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbd.2019.01.006>>.

LIU, Z.; ZHOU, Y.; LIU, S.; et al. Characterization and dietary regulation of glutamate dehydrogenase in different ploidy fishes. **Amino Acids**, v. 43, n. 6, p. 2339–2348, 2012.

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.

LONG, Y.; LI, L.; LI, Q.; HE, X.; CUI, Z. Transcriptomic Characterization of Temperature Stress Responses in Larval Zebrafish. (L. Orban, Ed.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. 1–14, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666345>>.

LOWENSTEIN, J. M. Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle. **Physiological reviews**, v. 52, n. 2, p. 382–414, 1972.

LU, G. D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood piruvate. **Biochemical Journal**, v. 33, p. 249–254, 1939.

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, 2006.

LYYTIKÄINEN, T.; JOBLING, M. The effect of temperature fluctuations on oxygen consumption and ammonia excretion of underyearling Lake Inari Arctic charr. **Journal of Fish Biology**, v. 52, n. 6, p. 1186–1198, 1998. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8649.1998.tb00965.x>>.

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

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. 91, p. 1–14, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/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, 2016. Elsevier.

MALEK, R. L.; SAJADI, H.; ABRAHAM, J.; GRUNDY, M. A.; GERHARD, G. S. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 138, n. 3, p. 363–373, 2004.

MARIANA, S.; ALFONS; BADR, G. Impact of heat stress on the immune response of fishes. **Journal of Survey in Fisheries Sciences**, v. 5, n. 2, p. 149–159, 2019.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 15, n. 1, p. 75–88, 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11160-005-7846-4>>.

MEHDI, H.; BRAGG, L. M.; SERVOS, M. R.; CRAIG, P. M. Multiple Stressors in the Environment: The Effects of Exposure to an Antidepressant (Venlafaxine) and Increased Temperature on Zebrafish Metabolism. **Frontiers in Physiology**, v. 10, n. 1431, p. 1–10, 2019. Frontiers. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2019.01431/full>>.

MELLO, R.; MANIGLIA, T. C.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J. Genetic and biogeographical relationships among species of *Astyanax* (Teleostei, Characidae) in Brazilian river basins. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 15356–15364, 2015.

MOHANTY, B. P.; MITRA, T.; BANERJEE, S.; et al. Proteomic profiling of white muscle from freshwater catfish *Rita rita*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 789–802, 2015. Springer Netherlands. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10695-015-0046-9>>.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 9, n. 3, p. 211–268, 1999. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1008924418720>>.

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. Elsevier.

NAVARRO, F. K. S. P.; NAVARRO, R. D.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. DE O. Effect of photoperiod stress assessment and locomotor activity of female lambari (*Astyanax bimaculatu*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 173–180, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542014000200008&lng=en&tlng=en>.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L.; TERMIGNONI, C. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 2014.

NEMOVA, N. N.; KANTSEROVA, N. P.; LYSENKO, L. A. The Traits of Protein Metabolism in the Skeletal Muscle of Teleost Fish. **Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology**, v. 57, n. 3, p. 626–645, 2021. ©Pleiades Publishing. Disponível em: <<https://link.springer.com/10.1134/S0022093021030121>>.

O’GORMAN, E. J.; ÓLAFSSON, Ó. P.; DEMARS, B. O. L.; et al. Temperature effects on fish production across a natural thermal gradient. **Global Change Biology**, v. 22, n. 9, p. 3206–3220, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gcb.13233>>.

ORCZEWSKA, J. I.; HARTLEBEN, G.; O’BRIEN, K. M. The molecular basis of aerobic metabolic remodeling differs between oxidative muscle and liver of threespine sticklebacks in response to cold acclimation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 1, p. R352–R364, 2010. Disponível em: <<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00189.2010>>.

OYARZÚN, R.; MUÑOZ, J. L. P.; PONTIGO, J. P.; MORERA, F. J.; VARGAS-CHACOFF, L. Effects of acclimation to high environmental temperatures on intermediary metabolism and osmoregulation in the sub-Antarctic nototheniid *Eleginops maclovinus*. **Marine Biology**, v. 165, n. 1, p. 22, 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00227-017-3277-8>>.

PANASE, P.; SAENPHET, S.; SAENPHET, K. Biochemical and physiological responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Lin subjected to cold shock of water temperature. **Aquaculture Reports**, v. 11, p. 17–23, 2018. Elsevier.

PANASE, P.; SAENPHET, S.; SAENPHET, K.; PATHIKE, P.; THAINUM, R. Biochemical and physiological responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) subjected to rapid increases of water temperature. **Comparative Clinical Pathology**, v. 28, p. 493–499, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00580-018-2872-5>>.

PAVLOVIĆ, S. Z.; BORKOVIĆ MITIĆ, S. S.; RADOVANOVIĆ, T. B.; et al. Seasonal variations of the activity of antioxidant defense enzymes in the red mullet (*Mullus barbatus* L.) from the Adriatic sea. **Marine Drugs**, v. 8, n. 3, p. 413–428, 2010. MDPI AG. Disponível em: <www.mdpi.com/journal/marinedrugsArticle>.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; OLIVEIRA, R. H. F. Portable point-of-care device as alternative tool for monitoring blood glucose in lambari *Astyanax altiparanae*: stress and sex-specific effects. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 4, p. 557–568, 2017. Disponível em: <https://www.pesca.sp.gov.br/07_PORTABLE-POINT-OF-CARE-DEVICE-AS-ALTERNATIVE-TOOL-FOR-MONITORING-BLOOD-GLUCOSE-IN-LAMBARI-Astyanax-altiparanae-STRESS-AND-SEX-SPECIFIC-EFFECTS.html>.

PORTNER, H. O.; FARRELL, A. P. ECOLOGY: Physiology and Climate Change. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 690–692, 2008.

PORTNER, H. O.; KNUST, R. Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. **Science**, v. 315, n. 5808, p. 95–97, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1135471>>.

PORTO-FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; ALMEIDA, R. B. DE C. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Revista Panorama da Aqüicultura**, 2001. Disponível em: <<https://panoramadaaquicultura.com.br/cultivo-do-lambari/>>. Acesso em: 23/4/2021.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, n. 1, p. 56–63, 1957. Disponível em: <<https://academic.oup.com/ajcp/article-lookup/doi/10.1093/ajcp/28.1.56>>.

RESENDE, A. C.; PEREIRA, D. M. C. IBRtools. , 2020. Disponível em: <<https://github.com/ecologicaltools/IBRtools>>.

RIPLEY, B.; VENABLES, B.; BATES, D. M.; et al. MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS. , Mar. 2021. Disponível em: <<https://cran.r-project.org/package=MASS>>.

ROBINSON, E. E. **Antarctic Fish : Thermal Specialists or Adaptable Generalists ?**, 2008. University of Canterbury.

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. Elsevier.

SABBAG, O. J.; TAKAHASHI, L. S.; SILVEIRA, A. N.; ARANHA, A. S. Custos e viabilidade econômica da produção de lambari-do-rabo-amarelo em Monte Castelo/SP: Um estudo de caso. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 3, p. 307–315, 2011.

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. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00227-001-0734-0>>.

SAHOO, D. D.; KARA, T. C. Cold stress-induced lipid peroxidation and non-enzymatic antioxidant defense in tissues of the common Indian toad, *Bufo melanostictus*. **Archives of Biological Sciences**, v. 66, n. 4, p. 1303–1310, 2014. Institut za Bioloska Istrazivanja.

SALWAY, J. G. **Metabolism at a glance**. Fourth ed. Chichester, West Sussex; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 2017.

SATO, Y.; SAMPAIO, E. V.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J. R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes,

Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 1, p. 267–273, 2006.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. **Fish Physiology**, v. 35, p. 1–34, 2016. Academic Press.

SCHULTE, PATRICIA M. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. **Journal of Experimental Biology**, Jan. 2014. Company of Biologists Ltd. Disponível em: <<https://jeb.biologists.org/content/217/1/23>>.

SCHULTE, PATRICIA M. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. **Journal of Experimental Biology**, Jan. 2014. Company of Biologists Ltd.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269768900924>>.

SEMA. **Bacias Hidrográficas do Paraná**. 2nd ed. Governo do Estado do Paraná, 2013.

SIES, H.; KOCH, O. R.; MARTINO, E.; BOVERIS, A. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, v. 103, n. 2, p. 287–290, 1979. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2879%2981346-0>>.

SILVA, W. M.; IGNÁCIO, E. O. Piscicultura do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) uma alternativa de negócio para pequenas propriedades. **IX Sintagro – Simpósio Nacional de Tecnologia em Agronegócio**, 2017.

SONG, M.; ZHAO, J.; WEN, H.; et al. The impact of acute thermal stress on the metabolome of the black rockfish (*Sebastes schlegelii*). **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. 1–23, 2019.

SOYANO, K.; MUSHIROBIRA, Y. The Mechanism of Low-- Temperature Tolerance in Fish. **Survival Strategies in Extreme Cold and Desiccation**. p.149–164, 2018. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg.

SUN, J. L.; LIU, Q.; ZHAO, L. L.; et al. Potential regulation by miRNAs on glucose metabolism in liver of common carp (*Cyprinus carpio*) at different temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics**, v. 32, n. 100628, p. 1–12, 2019. Elsevier.

TANG, C. H.; LEU, M. Y.; SHAO, K.; HWANG, L. Y.; CHANG, W. B. Short-term effects of thermal stress on the responses of branchial protein quality control and osmoregulation in a reef-associated fish, *Chromis viridis*. **Zoological Studies**, v. 53, n. 21, p. 1–9, 2014.

TEAM, R. C. R: The R Project for Statistical Computing. , Mar. 2021. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>.

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. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>.

TINCANI, F. H.; GALVAN, G. L.; MARQUES, A. E. M. L.; et al. Pseudoreplication and the usage of biomarkers in ecotoxicological bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 36, n. 10, p. 2868–2874, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.3823>>.

TOMANEK, L. Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 971–979, 2010. Disponível em: <<https://journals.biologists.com/jeb/article/213/6/971/10173/Variation-in-the-heat-shock-response-and-its>>.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007. Pergamon.

VARIS, J.; HAVERINEN, J.; VORNANEN, M. Lowering Temperature is the Trigger for Glycogen Build-Up and Winter Fasting in Crucian Carp (*Carassius carassius*). **Zoological Science**, v. 33, n. 1, p. 83–91, 2016. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/10.2108/zs150072>>.

VERGAUWEN, L.; BENOOT, D.; BLUST, R.; KNAPEN, D. Long-term warm or cold acclimation elicits a specific transcriptional response and affects energy metabolism in zebrafish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 157, n. 2, p. 149–157, 2010. Pergamon.

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, 2013. Elsevier.

WAARDE, A. VAN. Aerobic and anaerobic ammonia production by fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 74, n. 4, p. 675–684, 1983. Pergamon.

WAARDE, A. VAN; WILDE-VAN BERGE HENEGOUWEN, M. DE. Nitrogen metabolism in goldfish, *Carassius auratus* (L.). Pathway of aerobic and anaerobic glutamate oxidation in goldfish liver and muscle mitochondria. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 133–136, 1982. Pergamon.

WEGNER, N. C.; SNODGRASS, O. E.; DEWAR, H.; HYDE, J. R. Whole-body endothermy in a mesopelagic fish, the opah, *Lampris guttatus*. **Science**, v. 348, n.

6236, p. 786–789, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aaa8902>>.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; et al. Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. **Aquaculture**, v. 481, p. 169–176, 2017. Elsevier.

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, 2018. Elsevier.

WICKHAM, H. Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. , Mar. 2021. Disponível em: <<https://ggplot2.tidyverse.org/>>.

WU, G. **Principles of Animal Nutrition**. Boca Raton : Taylor & Francis, 2018.: CRC Press, 2017.

YAMATO, M. Fish muscle glycogen phosphorylase. **Canadian Journal of Biochemistry**, v. 46, p. 423–432, 1968.

YANG, S.; ZHAO, T.; MA, A.; et al. Metabolic responses in *Scophthalmus maximus* kidney subjected to thermal stress. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 103, p. 37–46, 2020. Academic Press.

YOUNIS, E. M. Variation in metabolic enzymatic activity in white muscle and liver of blue tilapia, *Oreochromis aureus*, in response to long-term thermal acclimatization. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 33, n. 3, p. 696–704, 2015.

ZHAO, N.; HOU, M.; WANG, T.; et al. Cloning and expression patterns of the brine shrimp (*Artemia sinica*) glycogen phosphorylase (GPase) gene during development and in response to temperature stress. **Molecular Biology Reports**, v. 41, n. 1, p. 9–18, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11033-013-2764-3>>.

APÊNDICE 1- INFORMAÇÕES NUTRICIONAIS DA RAÇÃOTabela - Composição geral da ração utilizada durante o experimento com *Astyanax lacustris*.

Composto	Concentração (g/kg)	Teor (%)
Proteína	420	42
Extrato Etéreo	80	8
Matéria Fibrosa	30	3
Matéria Mineral	140	14

FONTE: O autor (2021).

