

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DIEGO ORTIZ DA SILVA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA EM *Rhamdia voulezi*
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE), UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DO RIO
IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL: DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXITIVO EM
FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS

CURITIBA

2022

DIEGO ORTIZ DA SILVA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA EM *Rhamdia voulezi*
(SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE), UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DO RIO
IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL: DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO
EM FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti
Coorientadora: Dr^a. Maria Rosa Dmengen Pedreiro de Souza

CURITIBA

2022

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Silva, Diego Ortiz da

Efeitos da exposição aguda a alta temperatura em *Rhamdia voulezi* (Siluriformes: Heptariidae), uma espécie endêmica do Rio Iguaçu, Paraná, Brasil : defesa antioxidante e dano oxidativo em fígado, brânquias e rins / Diego Ortiz da Silva. – Curitiba, 2022.
1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Profª. Drª. Lucélia Donatti.

Coorientadora: Drª. Maria Rosa Dmengen Pedreiro de Souza.

1. Peixes - Ecologia. 2. Estresse oxidativo. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Jundiá (Peixe). I. Donatti, Lucélia., 1964-. II. Pedreiro, Maria Rosa Dmengen, 1987-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1408



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

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de DIEGO ORTIZ DA SILVA intitulada: EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA EM *Rhamdia voulezi* (SILURIFORMES: HEPTAPTERIDAE), UMA ESPÉCIE ENDÊMICA DO RIO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL: DEFESA ANTIOXIDANTE E DANO OXIDATIVO EM FIGADO, BRÂNCUIAS E RINS, sob orientação da Profa. Dra. LUCÉLIA 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, 26 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica

29/08/2022 09:59:21.0

LUCÉLIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/08/2022 10:30:58.0

JULIANA BELLO BARON MAURER

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

31/08/2022 10:13:31.0

SÍLVIA ROMÃO

Avallador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro na compra de material para as análises laboratoriais.

Agradeço à minha mãe, Maria José Ortiz e minha falecida avó Claudete de Camargo Ortiz. Duas mulheres fortes que sempre foram meu alicerce e me ensinaram a ser homem mesmo não tendo um pai presente. Sempre acreditaram em mim, mesmo não compreendendo minha rotina e minhas atividades de pesquisa. Todas as minhas conquistas dedicarei a vocês!

Agradeço ao meu namorado, Afonso Luiz, pela paciência em momentos de estresse e pelo incentivo a nunca desistir. Não sei o que seria da minha vida sem o seu companheirismo e por topar qualquer desafio que tenhamos.

Agradeço a toda minha família de Curitiba, que me apoiaram nesta vinda de Maringá para Curitiba e me deram todo o suporte diminuindo o estresse que é a adaptação em uma nova cidade.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Biologia Adaptativa, Diego, Ieda, Jonathan, Ana Paula, Niumaique e Ananda, por toda ajuda durante as análises do material, além das risadas e discussões sobre os experimentos, quero acompanhar de perto o sucesso de vocês e jamais perder esse vínculo de amizade.

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

Agradeço à meu amigo Brendon Henrique, pelo longo período de amizade e por incentivar mesmo de longe a sempre acreditar em meu potencial.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dra. Lucélia Donatti e coorientadora Dra. Maria Rosa Dmengen Pedreiro de Souza pelos ensinamentos e conselhos durante todo o período de mestrado. Duas mulheres que com toda a certeza me inspiram a seguir como cientista.

Agradeço aos amigos da UEM, Juliana e Laryssa que me acompanharam por mais dois anos nesta jornada acadêmica. Assim como na graduação, fizeram meu mestrado ser mais feliz e caloroso. Agradeço também aos novos amigos que

fiz na minha turma do mestrado (PPGECO/UFPR), Mayara, Kaitlyn e Brayan. Jamais esquecerei os ótimos momentos que compartilhamos e dos filmes que assistimos para aliviar toda a tensão da rotina do mestrado

Agradeço, por último, aos meus gatos, Zeus e Hades, por serem meu suporte emocional em momentos que mais preciso de fofura. Vale muito a pena ter esses bichanos, mesmo eles tentarem derrubar meu notebook todos os dias.

“Todo grande sonho começa com um sonhador. Lembre-se sempre, você tem dentro de você a força, a paciência e a paixão para alcançar as estrelas para mudar o mundo.”

Harriet Tubman

RESUMO

Como ectotérmicos a temperatura da água influencia diretamente na ecologia, biologia e história de vida dos peixes. Quando a temperatura da água aumenta além dos níveis que os peixes são rotineiramente expostos, alterações na taxa respiratória pode ser perceptível e conseqüentemente aumento a formação de espécies reativas de oxigênio. Desta forma, respostas da defesa antioxidante enzimático podem ser alteradas a fim de evitar estresse a nível celular. *Rhamdia voulezi*, uma espécie endêmica do Rio Iguaçu, é uma espécie que é utilizada na piscicultura por seu rápido crescimento corpóreo e hábito alimentar. Por essas características podem ser utilizados como bioindicadores das implicações das variações ambientais de temperatura da água em tanques de cultivo em produção local. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade dos biomarcadores da defesa antioxidante enzimático (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione reductase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glutathione reduzida) e marcadores de danos oxidativo (lipoperoxidação lipídica e carbonilação proteica) em *R. voulezi* sob o efeito da exposição aguda a alta temperatura (31 °C) no fígado, brânquias e rins durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas de exposição. O número de peixes por experimento foi de 7 indivíduos com exceção de 8 em 96 horas e as coletas foram realizadas no rio Iguaçu (União da Vitória/PR). A exposição a alta temperatura aumentou a resposta da defesa antioxidante em todos os tecidos estudados. No fígado de *R. voulezi* foi perceptível o aumento da superóxido dismutase até 12 h de exposição a alta temperatura, bem como o aumento da glutathione S-transferase em 12 h e 96 h também no grupo experimental. Nas brânquias o aumento da superóxido dismutase foi evidenciado até 24 h de exposição a alta temperatura e os marcadores de danos como a lipoperoxidação lipídica foi identificado em 2, 6, 12 e 96 h de exposição neste mesmo grupo. Nos rins em 12 h também houve indução de resposta ao estresse térmico, com uma resposta da superóxido dismutase/catalase no grupo exposto à alta temperatura. Também foi evidenciado marcadores de danos como lipoperoxidação lipídica em 2 e 6 h de exposição a 31 °C. Os três tecidos avaliados responderam diferentemente ao estresse térmico, sendo que o fígado apresentou maior capacidade de aclimação. Os padrões de expressão de múltiplos biomarcadores relacionados à defesa antioxidante e danos oxidativo em resposta a exposição a alta temperatura sugere que *R. voulezi* apresentou estresse oxidativo, o que pode prejudicar o bem-estar do animal.

Palavras-chave: Espécie reativa de oxigênio, peixes subtropicais, estresse ambiental, jundiá.

ABSTRACT

As ectotherms, water temperature directly influences the ecology, biology, and life history of fish. When water temperature increases beyond the levels that fish are routinely exposed to, changes in respiration rate may be noticeable and consequently the formation of reactive oxygen species increases. Thus, enzymatic antioxidant defense responses can be altered to avoid stress at the cellular level. *Rhamdia voulezi*, an endemic species of the Iguaçu River, is a species that is used in fish farming for its fast body growth and feeding habit. For these characteristics they can be used as bioindicators of the implications of environmental water temperature variations in culture ponds in local production. The objective of this work was to evaluate the activity of enzymatic antioxidant defense biomarkers (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione S-transferase, glutathione reductase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, reduced glutathione) and oxidative damage markers (lipoperoxidation and protein carbonylation) in *R. voulezi* under the effect of acute exposure to high temperature (31 °C) in liver, gills and kidneys during 2, 6, 12, 24 and 96 hours of exposure. The number of fish per experiment was 7 individuals except for 8 at 96 hours and the collections were made in Iguaçu River (União da Vitória/PR). High temperature exposure increased the antioxidant defense response in all tissues studied. In the liver of *R. voulezi* an increase of superoxide dismutase was observed up to 12 h of high temperature exposure, as well as an increase of glutathione S-transferase at 12 h and 96 h also in the experimental group. In the gills the increase of superoxide dismutase was evidenced up to 24 h of high temperature exposure and damage markers such as lipid lipoperoxidation was identified at 2, 6, 12 and 96 h of exposure in this same group. In the kidneys at 12 h there was also an induction of a heat stress response, with a superoxide dismutase/catalase response in the group exposed to high temperature. It was also evidenced damage markers such as lipoperoxidation lipid at 2 and 6 h of exposure at 31 °C. The three tissues evaluated responded differently to heat stress, with the liver showing greater capacity to acclimatize. The expression patterns of multiple biomarkers related to antioxidant defense and oxidative damage in response to high temperature exposure suggests that *R. voulezi* exhibited oxidative stress, which may impair animal welfare.

Keywords: Reactive oxygen species, subtropical fish, environmental stress, silver catfish.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNDROME DA ADAPTAÇÃO GERAL (SAG).....	19
FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTANDO A REDUÇÃO DE O ₂ NA MITOCÔNDRIA.....	20
FIGURA 3 – ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).	21
FIGURA 4 – ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA CATALASE (CAT).....	21
FIGURA 5 - ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA PELAS ENZIMAS GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX), GLUTATIONA REDUTASE (GR) E MARCADOR GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	21
FIGURA 6 – ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH).	22
FIGURA 7 – ESQUEMA DO MECANISMO DE AÇÃO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).	22
FIGURA 8 – ESQUEMA DO MECANISMO DE AÇÃO ENZIMÁTICO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.	23
FIGURA 9 – EXEMPLAR DE <i>Rhamdia voulezi</i>	25
FIGURA 10 – CENTRO DE PESQUISAS E EXTENSÃO EM AQUICULTURA ILDO ZAGO, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ (UNESPAR).....	26
FIGURA 11 - MAPA DA ÁREA DE COLETA DE <i>Rhamdia voulezi</i>	27
FIGURA 12 – DESENHO ESQUEMÁTICO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS DE EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA EM <i>Rhamdia voulezi</i>	28
FIGURA 13- FOTO DOS PROCEDIMENTOS DE DISSECAÇÃO DE <i>Rhamdia voulezi</i>	29
FIGURA 14 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NO FÍGADO DE <i>Rhamdia voulezi</i>	36
FIGURA 15: CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO DE <i>R. voulezi</i>	37
FIGURA 16- ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NAS BRÂNQUIAS DE <i>Rhamdia voulezi</i>	40
FIGURA 17: CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS BIOMARCADORES DA DEFESA	

ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E DANOS OXIDATIVOS NAS BRÂNQUIAS DE <i>R. voulezi</i>	41
FIGURA 18 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NOS RINS DE <i>Rhamdia voulezi</i>	44
FIGURA 19: CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E DANOS OXIDATIVOS NOS RINS DE <i>R. voulezi</i>	45
FIGURA 20 - BIPLLOT DE PCA DE ENZIMAS E CONCENTRAÇÃO DE GSH DO SISTEMA ANTIOXIDANTE NOS TRÊS ÓRGÃOS AVALIADOS	46
FIGURA 21: IBR DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DANOS OXIDATIVOS EM FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS DE <i>R. voulezi</i> EXPOSTO A ALTA TEMPERATURA	47
Figura 22 – ESQUEMA DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVO NO FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS DE <i>R. voulezi</i> SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA.	53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: RESULTADOS ANOVA DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E DOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO FÍGADO DE <i>Rhamdia voulezi</i>	35
TABELA 2: RESULTADOS ANOVA DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E DOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS BRÂNQUIAS DE <i>Rhamdia voulezi</i>	39
TABELA 3: RESULTADOS ANOVA DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E DOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS RINS DE <i>Rhamdia voulezi</i>	43
TABELA 4: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE <i>Rhamdia voulezi</i> , A UMA TEMPERATURA DE 31 °C (CONTROLE A 21 °C), DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS.	71
Tabela 5: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS BRÂNQUIAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> , A UMA TEMPERATURA DE 31 °C (CONTROLE A 21 °C), DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS.	72
TABELA 6: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS RINS DE <i>Rhamdia voulezi</i> , A UMA TEMPERATURA DE 31 °C (CONTROLE A 21 °C), DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS.	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância
BSA - Albumina de soro bovino
CAT – Catalase
CEUA-BIO - Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas
CTmax - *Critical thermal maximum* (temperatura crítica máxima)
CTmin - *Critical thermal minimum* (temperatura crítica mínima)
DNPH - 2,4-dinitrofenilhidrazina
DTNB - 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs - Espécies reativas de oxigênio
g - Aceleração da gravidade
G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx - Glutaciona peroxidase
GR - Glutaciona redutase
GSH - Glutaciona reduzida
GSSG - Glutaciona dissulfeto
GST - Glutaciona-S-transferase
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HHI - Hipotálamo-Hipófise-Interrenal
HSC - Hipotálamo-Sistema Nervoso Simpático-Células Cromafins
IBR - Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores
ICMBio - Instituto Chico Mendes de Biodiversidade
LPO - Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
m v⁻¹ - Proporção massa sobre volume
MANOVA – Análise de Variância Multivariada
MDA - Malondialdeído
NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT - Nitroblue tetrazolium (Azul de nitrotetrazólio)
nm - Nanômetro
PCA - Análise dos Principais Componentes
Prx – Peroxirredoxinas

SAG - Síndrome da Adaptação Geral

SEM - Standard error of mean (Erro padrão da média)

SOD - Superóxido dismutase

TCA - Ácido tricloroacético

Trx - Tiorredoxina

UFPR - Universidade Federal do Paraná

UNESPAR - Universidade Estadual do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	MATERIAIS E MÉTODOS	26
2.2	<i>EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA ..</i>	<i>28</i>
2.3	<i>PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS</i>	<i>29</i>
2.3.1	<i>DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE, NÍVEIS DE GSH E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS</i>	<i>30</i>
2.4	<i>ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</i>	<i>32</i>
3	RESULTADOS.....	34
3.1	<i>RESPOSTA DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO DE <i>Rhamdia voulezi</i> EXPOSTO A ALTA TEMPERATURA.....</i>	<i>34</i>
3.2	<i>CORRELAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO DE <i>Rhamdia voulezi</i></i>	<i>37</i>
3.3	<i>SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NAS BRÂNQUIAS DE <i>Rhamdia voulezi</i> EXPOSTO A ALTA TEMPERATURA</i>	<i>38</i>
3.4	<i>CORRELAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NAS BRÂNQUIAS DE <i>Rhamdia voulezi</i></i>	<i>41</i>
3.5	<i>SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NOS RINS DE <i>Rhamdia voulezi</i> EXPOSTO A ALTA TEMPERATURA</i>	<i>41</i>
3.6	<i>CORRELAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NOS RINS DE <i>Rhamdia voulezi</i></i>	<i>45</i>
3.7	<i>EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA EM <i>Rhamdia voulezi</i>: VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS.....</i>	<i>46</i>
4	DISCUSSÃO	48
4.1	<i>BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS DE <i>Rhamdia voulezi</i> EXPOSTOS A ALTA TEMPERATURA.....</i>	<i>49</i>
4.2	<i>COMPARAÇÃO DOS BIOMARCADORES DO SISTEMA DE DEFESA</i>	

<i>ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS DE Rhamdia voulezi EXPOSTOS A ALTA TEMPERATURA.....</i>	<i>53</i>
5 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE 1 – TABELAS DE MÉDIAS E ERRO PADRÃO DAS MÉDIAS DOS TRÊS TECIDOS AVALIADOS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A temperatura é um fator abiótico que tem influência na biologia, ecologia e fisiologia dos peixes (BRETT, 1956). E como ectotérmicos a temperatura é um regulador das funções metabólicas dos peixes, sendo importante para a maioria das reações bioquímicas e processos fisiológicos (ISLAM et al., 2021). Rotineiramente os peixes são expostos a variações de temperatura que ocorrem no ambiente natural, desta forma existe uma faixa de temperatura que conseguem suportar e que varia conforme a espécie e localidade destes animais (WHITNEY et al., 2016). De modo geral, peixes que habitam locais que possuem maior sazonalidade de temperatura, suportam uma maior faixa de temperatura, mas são menos tolerantes ao calor se comparado com espécies tropicais (PÖRTNER; PECK, 2010; SPICER et al., 2019).

Para manter a homeostase em diferentes temperaturas os peixes ativam respostas internas envolvendo reações bioquímicas e fisiológicas (SOMERO 1995; WILLMER; STONE; JOHNSTON, 2005). Desta forma existe uma temperatura crítica máxima ou mínima (*Critical Thermal* – CTMáx ou CTMin) que animais ectotérmicos suportam, sendo letal quando as atividades locomotoras se tornam desorganizadas e o animal perde a habilidade de escapar de condições determinantes à sua sobrevivência (BEITINGER; BENNETT; MCCAULEY, 2000; CARVETH; WIDMER; BONAR, 2006; BEITINGER E LUTTERSCHMIDT, 2011). Os peixes quando expostos a alta temperatura com efeito prolongado, temperaturas acima do CTMáx (*Critical Thermal Maximum*), tem uma diminuição do oxigênio e um aumento do pH no sangue (BOECK et al. 2015; SHRIVASTAVA et al. 2017), e desta forma modifica o custo energético do equilíbrio fisiológico para se adequar a esta situação estressante (VAN DER VYVER et al., 2013; ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2015; SILVEIRA et al., 2018).

Diversos fatores estão envolvidos nas respostas fisiológicas a um estressor, como resposta específica do tecido, o tipo de estressor e a especificidade de cada organismo (BAERENDS; BRAUWER; WALTERBOLK, 1955; BATESON; GLUCKMAN, 2012; FLOHR et al., 2017). Todas as respostas ao estresse são chamadas de respostas integradas e atuam em níveis organizacionais no animal (JOËLS e BARAM, 2009; KOAKOSKI et al., 2012). Estas respostas são caracterizadas pela Síndrome da Adaptação Geral (SAG) (FIGURA 1) (SELYE, 1936).

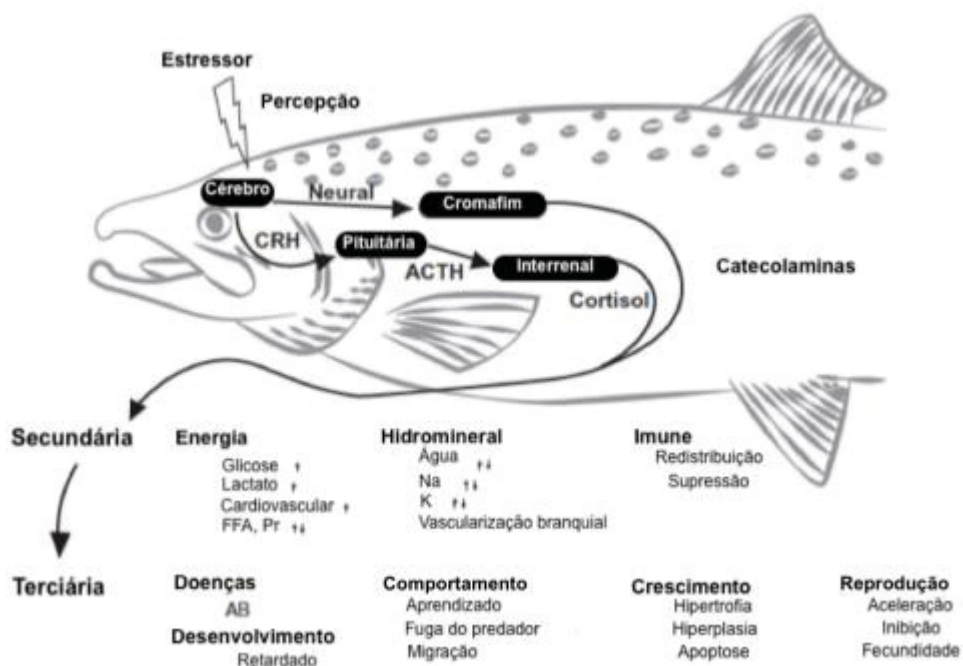
A SAG é composta por três fases, sendo elas primária (alarme), secundária

(estágio de resistência) e terciária (estágio de exaustão) (BARTON, 2002; SILVA; GOULART, 2018). A resposta primária, também chamada de alarme, consiste na percepção do animal ao estressor. Nesta fase ocorre a ativação de dois eixos neuroendócrinos: eixo Hipotálamo-Sistema Nervoso Simpático-Células Cromafins (HSC) e o eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (HHI) (CASTRO; FERNANDES, 2009; KOAKOSKI et al., 2012). Nesta fase ocorre a liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) e corticosteroides (cortisol e a cortisona) (SCHRECK; TORT, 2016).

Posteriormente o estresse estimula a fase secundária, também chamada de fase de resistência. Nesta fase é perceptível a mudança na frequência respiratória (RODNICK; PLANAS, 2016) ocorrendo o aumento da absorção de oxigênio (AFONSO et al., 2008). Neste estágio o animal tenta se adaptar ao estresse por meio de mecanismos de proteção fisiológicos (SCHRECK; OLLA; DAVIS, 1997). Se a adaptação ocorre com sucesso, novos níveis homeostáticos são estabelecidos, caso contrário, o animal acaba iniciando processos que ocasionam a morte (GONÇALVES et al., 2008).

A última fase da SAG é a terciária, também chamada de estágio de exaustão. Esta fase compreende as alterações patológicas que podem ocorrer no animal, o que acarreta perda de valor adaptativo e funcional (BALDISSEROTTO, 2002; KOEYPUJSA; JONGJAREANJAI, 2011). É perceptível nesta fase alterações no sistema imunológico (CONTE, 2004; YADA; TORTO, 2016), baixa no crescimento corpóreo (SADOUL; VIJAYAN, 2016), taxas de reprodução alterada (PANKHURST, 2016) e casos mais graves leva a morte do animal (BARTON; DWYER, 1997).

FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SÍNDROME DA ADAPTAÇÃO GERAL (SAG).



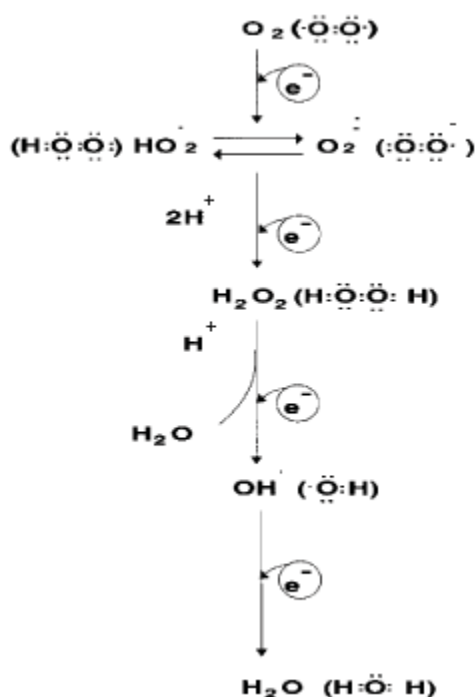
Nota: CRH, hormônio liberador de corticotropina; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; FFA, ácidos graxos livres; Pr, proteínas; AB, anticorpos. Fonte: Adaptado de Schreck; Tort (2016).

Em organismos aeróbicos as mitocôndrias têm um papel fundamental na formação de ATP, molécula esta utilizada pelas células como fonte energética (DOENST; NGUYEN; ABEL, 2013; ZHOU; RONG, 2018; PEOPLES; SARAF; GHAZAL, 2019). Para a formação de ATP ocorre a oxidação de moléculas como carboidratos, lipídios e proteínas. Comoceptor final de elétrons temos o oxigênio molecular, que são acoplados ao bombeamento de prótons através da membrana interna mitocondrial, gerando uma força motriz para a produção de ATP (NICHOLLS; FERGUSON, 2013; LIPPE et al., 2019). No entanto, quando a redução incompleta do oxigênio molecular ocorre devido ao vazamento de elétrons, tem início a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (BRAND, 2016; MAILLOUX et al., 2018; TREBERG et al., 2018). Todavia, EROs existem naturalmente na célula e participam de vias sinalizadoras como a sinalização redox (SIES, 2015; MAILLOUX, 2020), porém o excesso de EROs se torna prejudicial e processos de estresse oxidativo pode ser identificado, causando danos em macromoléculas principalmente. O equilíbrio de EROs nas mitocôndrias pode ocorrer devido a mecanismos de produção e consumo de EROs (ZOCCARATO; CAVALLINI; ALEXANDRE, 2004; ANDREYEV et al., 2015; MUNRO; TREBERG, 2017; KAMUNDE; SHARAF; MACDONALD, 2018; COLLIN,

2019; PEOPLES; SARAF; GHAZAL, 2019).

As EROs podem ser separadas em grupos de composto radicalares, e alguns exemplos são: OH^\bullet (íon hidroxila), HOH^\bullet (íon peroxil), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (ânion superóxido). Estes compostos tendem a ser mais reativos devido a sua instabilidade e possibilidade de reação com moléculas próximas. E os não radicalares, dentre eles, o O_2 (oxigênio molecular) e H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), que tendem a ser mais estáveis devido à ausência de elétrons livres (MAGDER, 2006) (FIGURA 2).

FIGURA 2 – ESQUEMA REPRESENTANDO A REDUÇÃO DE O_2 NA MITOCÔNDRIA.



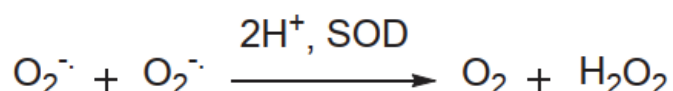
Nota: Redução do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria até a formação de água (H_2O). Neste processo são formadas espécies reativas de oxigênio. Fonte: Ferreira e Matsubara; 1997

Com o aumento da temperatura e a diminuição do oxigênio disponível na água os peixes aumentam seu consumo de oxigênio, e desta forma inicia o processo de estresse oxidativo (ROSSO; BOLNER; BALDISSEROTTO, 2006). O estresse oxidativo ocorre com o desbalanço entre a produção de EROs e a sua neutralização pelas defesas celulares antioxidantes, podendo ocorrer danos teciduais (LOWE, 2000; CHENG et al., 2015; LUO et al., 2015a; COSTA; STREIT, 2019).

Nos organismos, o mecanismo de defesa antioxidantes enzimáticos, incluindo superóxido dismutase (SOD) (FIGURA 3), catalase (CAT) (FIGURA 4), glutathiona peroxidase (GPx) (FIGURA 5), glutathiona redutase (GR) (FIGURA 5), glutathiona reduzida (GSH) (FIGURA 5) e glutathiona S-transferase (GST) (FIGURA 7) induzem

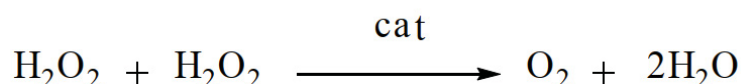
respostas antioxidantes e fornecem proteção contra o estresse oxidativo induzido por EROs. Já a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (FIGURA 6) fornece NADPH para o sistema das glutations. Estas enzimas são importantes biomarcadores de estresse ambiental (BAGNYUKOVA; CHAHRAK; LUSHCHAK, 2006; DALZOCHIO, 2016; LU et al. 2016).

FIGURA 3 – ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD).



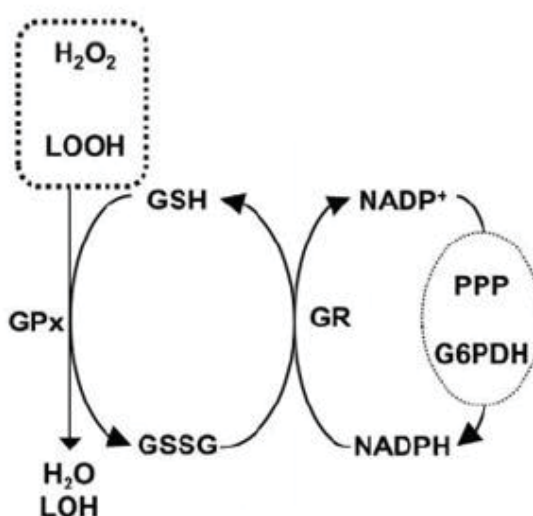
Nota: Reação enzimática de formação de peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD). Fonte: SHISHKINA; GOLOSHCHAPOV; WEISFELD, 2019.

FIGURA 4 – ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA CATALASE (CAT).



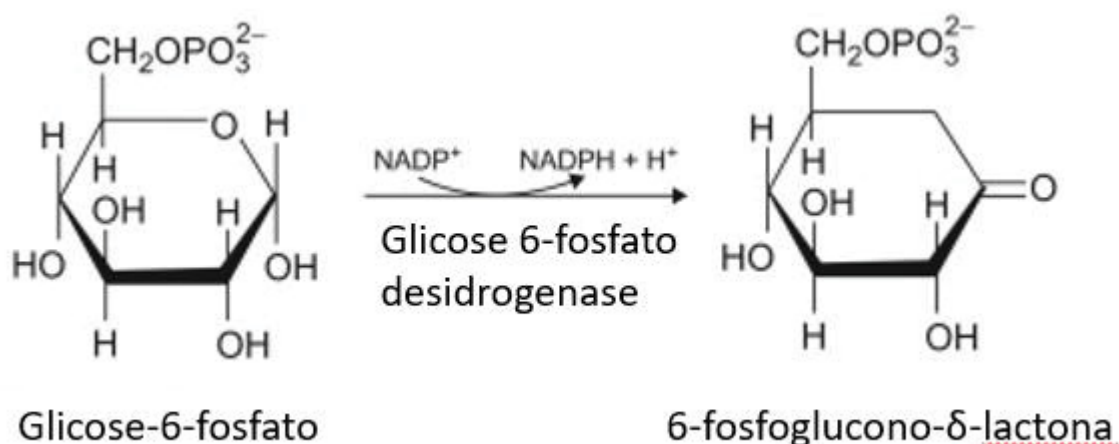
Nota: Reação enzimática de decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular e água catalisada pela enzima catalase (CAT). Fonte: SHISHKINA; GOLOSHCHAPOV; WEISFELD, 2019.

FIGURA 5 - ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA PELAS ENZIMAS GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX), GLUTATIONA REDUTASE (GR) E MARCADOR GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).



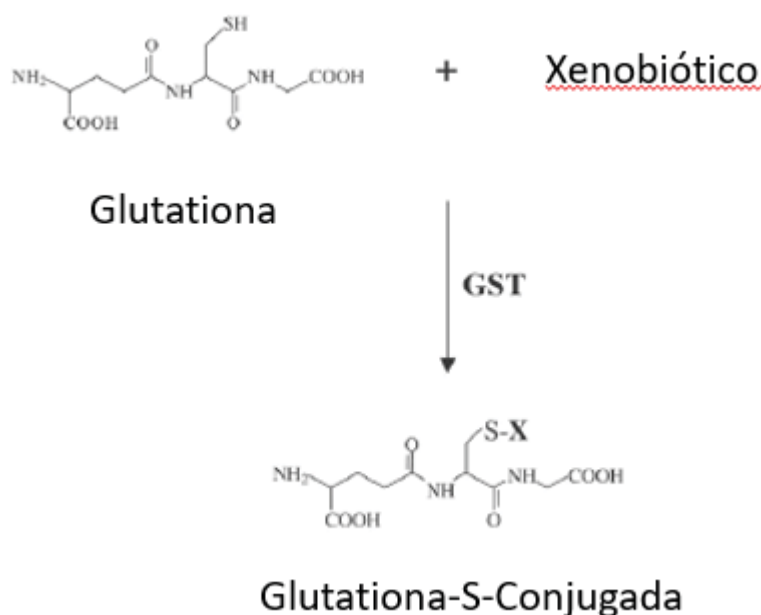
Nota: Reação enzimática de decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio molecular catalisada pela enzima Glutaciona Peroxidase (GPx). Conversão da Glutaciona Oxidada (GSSG) em Glutaciona Reduzida (GSH) pela ação catalítica da Glutaciona Redutase (GR). Fonte: SHISHKINA; GOLOSHCHAPOV; WEISFELD, 2019.

FIGURA 6 – ESQUEMA DA REAÇÃO CATALISADA PELA ENZIMA GLICOSE 6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH).



Nota: Reação enzimática de redução de NADP^+ em NADPH pela Glicose 6-fosfato desidrogenase. O NADPH é um aporte necessário para a atuação da GR e formação de GSH. Fonte: SHISHKINA; GOLOSHCHAPOV; WEISFELD, 2019.

FIGURA 7 – ESQUEMA DO MECANISMO DE AÇÃO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST).

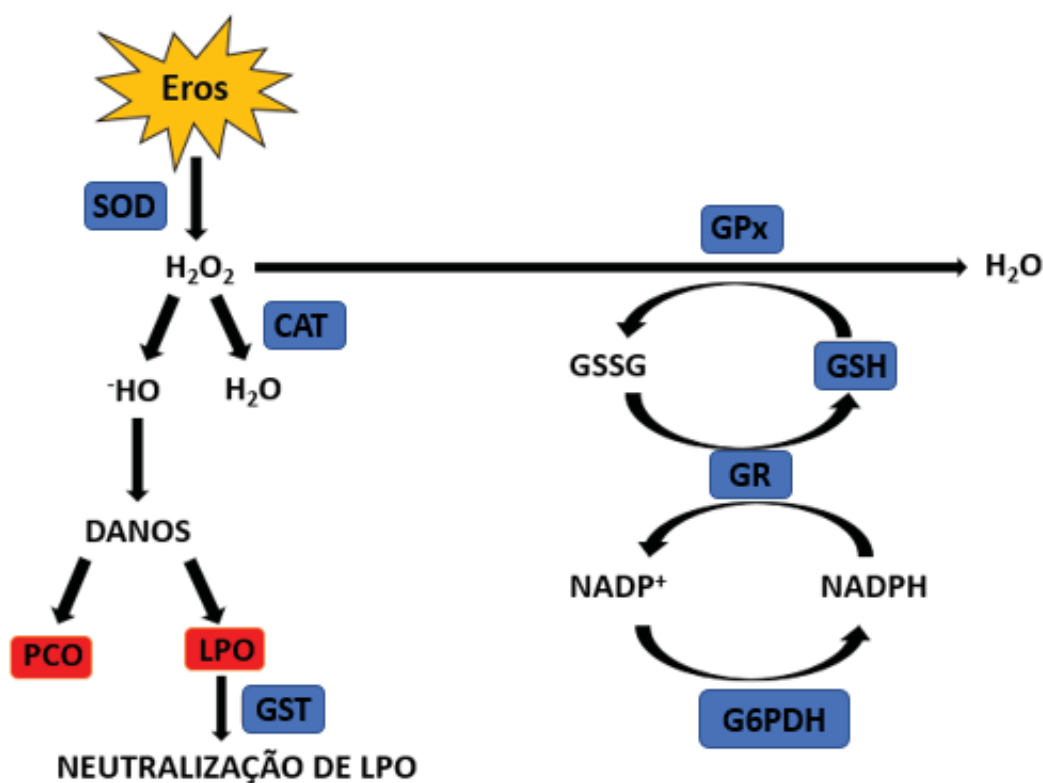


Nota: Reação enzimática da atuação de detoxificação de xenobióticos catalisado pela Glutathione S-Transferase. Neste processo ocorre a formação de compostos mais fáceis de serem excretados pela célula. Fonte: SHISHKINA; GOLOSHCHAPOV; WEISFELD, 2019.

O aumento de EROs pode levar ao estresse oxidativo e consequentes lesões celulares, causando danos como peroxidação lipídica (LPO), inativação de enzimas, carbonilação de proteínas (PCO), redução de telômeros, alterações teciduais e morte celular (FIGURA 8) (STADTMAN; LEVINE, 2000; STOLIAR; LUSHCHAK, 2012;

VINAGRE, et al., 2012; SOPINKA et al., 2016). LPO e PCO são bons indicadores de estresse oxidativo (AURICH, 2005; MARTÍNEZ-PÁRAMO et al., 2012; VERGAUWEN et al. 2013; BILYK; VARGAS-CHACOFF; CHENG, 2018).

FIGURA 8 – ESQUEMA DO MECANISMO DE AÇÃO ENZIMÁTICO DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.



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

Os efeitos da exposição aguda a altas temperaturas em peixes tropicais e subtropicais têm sido relatados (ALI; NICIEZA; WOOTTON, 2003; RODNICK et al., 2004; SCHAEFER; RYAN, 2006; MARTELL et al., 2005; RYAN, 2006; GASTON et al. 2009; COOKE et al. 2013; NEWTON; SANTIS; JERRY, 2012; MADEIRA et al. 2017; SCHLEGER et al. 2022; RESENDE et al. 2022) e uma compreensão maior sobre o tema elucida respostas de como populações de peixes responderam a este estressor, bem como auxilia em tanques de pisciculturas para uma melhor produção. Analisar as respostas fisiológicas sobre um distúrbio abiótico, principalmente em relação à temperatura, fornece uma importante compreensão sobre adaptações fisiológicas enfrentadas pelos peixes e a conquista pelo território natural, bem como auxilia na

compreensão das respostas futuras a mudanças ambientais, dentre elas as climáticas, e os impactos que o aumento da temperatura terá na adaptação e sobrevivência das espécies de peixes (BRETT, 1956; HUTCHISON, 1976; SOMERO 2005; CARVETH; WIDMER; BONAR, 2006; SCHULTE, 2011; REZENDE; CASTAÑEDA; SANTOS, 2014; HOFMANN; TODGHAM 2010; SCHULTE 2011).

Dentre as espécies de peixes tropicais podemos destacar peixes do gênero *Rhamdia* que foi originalmente descrito em 1858 por Bleeker (BALDISSEROTTO & RADÜNZ-NETO, 2005). São peixes muito apreciados pelo sabor da carne, desta forma muito importante para o comércio e para a piscicultura (GOMES et al., 2000). As espécies do gênero *Rhamdia* estão distribuídas na região neotropical, tendo como limite norte o México central e como limite sul a cidade de Buenos Aires, Argentina (SILFVERGRIP, 1996). Uma espécie destacada do gênero *Rhamdia* é a *Rhamdia voulezi* descrita por Haseman em 1911 (FIGURA 9).

Rhamdia voulezi, popularmente conhecido como jundiá, é uma espécie endêmica e nativa do rio Iguaçu pertencente à classe dos *Osteichthyes*, ordem dos Siluriformes e à família Heptapteridae (BOOCKMANN et al. 2003). O alto grau de endemismo do *R. voulezi* e de outras espécies de peixes ocorre pelo fato da bacia hidrográfica do rio Iguaçu ser caracterizada por um isolamento geográfico (CARVALHO, 2009; BAUMGARTNER et al. 2012). Por ser uma espécie endêmica *R. voulezi* pode ser utilizada como bioindicador das implicações de variações da temperatura no rio Iguaçu.

R. voulezi possui hábito alimentar onívoro sendo de grande eficiência alimentar, além de possuir um crescimento corpóreo muito alto (REIS, et al. 2012; DIEMER et al., 2012; DIEMER et al. 2013; PESSINI et al. 2014). Desta forma esta espécie possui grande potencial para aquicultura, além do fato da carne ter um sabor com grande aceitação no mercado de consumo local (DIEMER et al. 2013; PESSINI et al. 2014).

FIGURA 9 – EXEMPLAR DE *Rhamdia voulezi*

Fonte: Josiane Ribolli et al., 2017.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades da defesa antioxidante enzimáticas e marcadores de danos oxidativos em *Rhamdia voulezi* em relação a exposição aguda a alta temperatura (31 °C) no fígado, brânquias e rins durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas de exposição. A hipótese principal consiste em peixes submetidos a alta temperatura (31 °C) apresentarão aumento das enzimas da defesa antioxidante e conseqüentemente uma diminuição dos marcadores de danos oxidativo em relação aos peixes mantidos em temperatura controle (21 °C), bem como as brânquias apresentarão maiores alteração dos biomarcadores de defesa antioxidante em comparação a outros tecidos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento levou em consideração a literatura existente para a escolha da temperatura e o procedimento experimental. A habilidade de tolerar um estressor como o aquecimento depende não somente da intensidade do estressor, mas também da duração da exposição. Os tempos de coleta utilizados neste estudo (2 a 96 horas) simulam situações de estresse agudo e geram uma mudança transiente das atividades metabólicas, que ocorrem a fim de reestabelecer a homeostase (FORGATI et al., 2017; SOUZA et al., 2018; PRZEPIURA, 2019).

2.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO DE *Rhamdia voulezi*

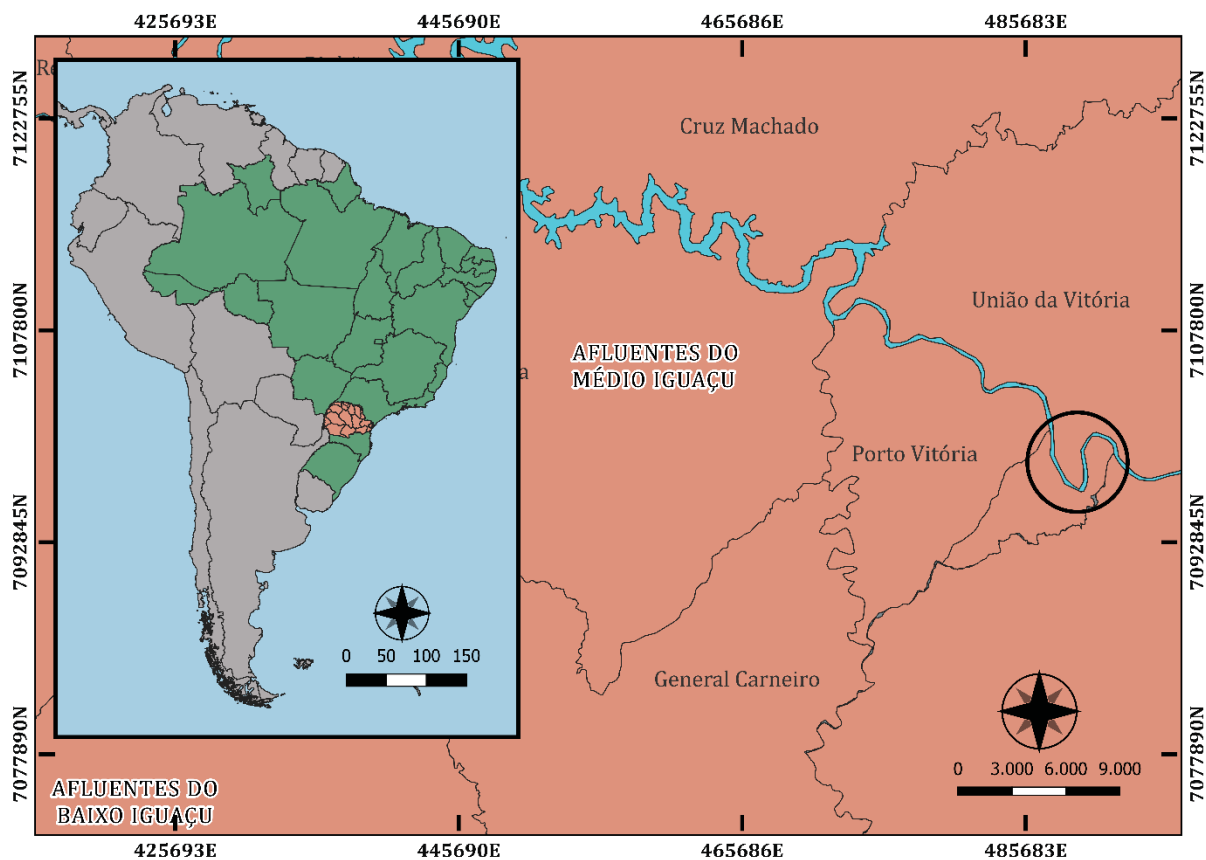
A licença ambiental de coleta de animais foi obtida via Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio: n° 63551-1, emitida em 27/06/2018) e as licenças de experimentação animal n° 1228 e 1228 C foram obtidas na Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA-BIO/UFPR).

Exemplares de *R. voulezi* foram coletados na região do médio Iguaçu (Sul 26°14'58.50" e Oeste 51°6'33.07"), no município de União da Vitória-PR (FIGURA 11), com o auxílio de linhas de pesca. Os indivíduos foram acondicionados em sacos plásticos com aeração constante até serem transportados ao local dos experimentos que foi o Centro de Pesquisas e Extensão em Aquicultura Ildo Zago, da Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), no município de União da Vitória – PR (FIGURA 10) (26°13'12.15"S; 51° 7'51.07"O).

FIGURA 10 – CENTRO DE PESQUISAS E EXTENSÃO EM AQUICULTURA ILDO ZAGO, DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PARANÁ (UNESPAR)



Nota: Imagem dos tanques de piscicultura. Fonte: Ieda Scheleger, 2019.

FIGURA 11 - MAPA DA ÁREA DE COLETA DE *Rhamdia voulezi*

Nota: Mapa da área de coleta dos indivíduos de *Rhamdia voulezi*. União da Vitória e Porto Vitória no estado do Paraná (em marrom), Brasil (verde). Círculo em preto indica o local da coleta no afluente do médio Iguçu. Fonte: IBGE.

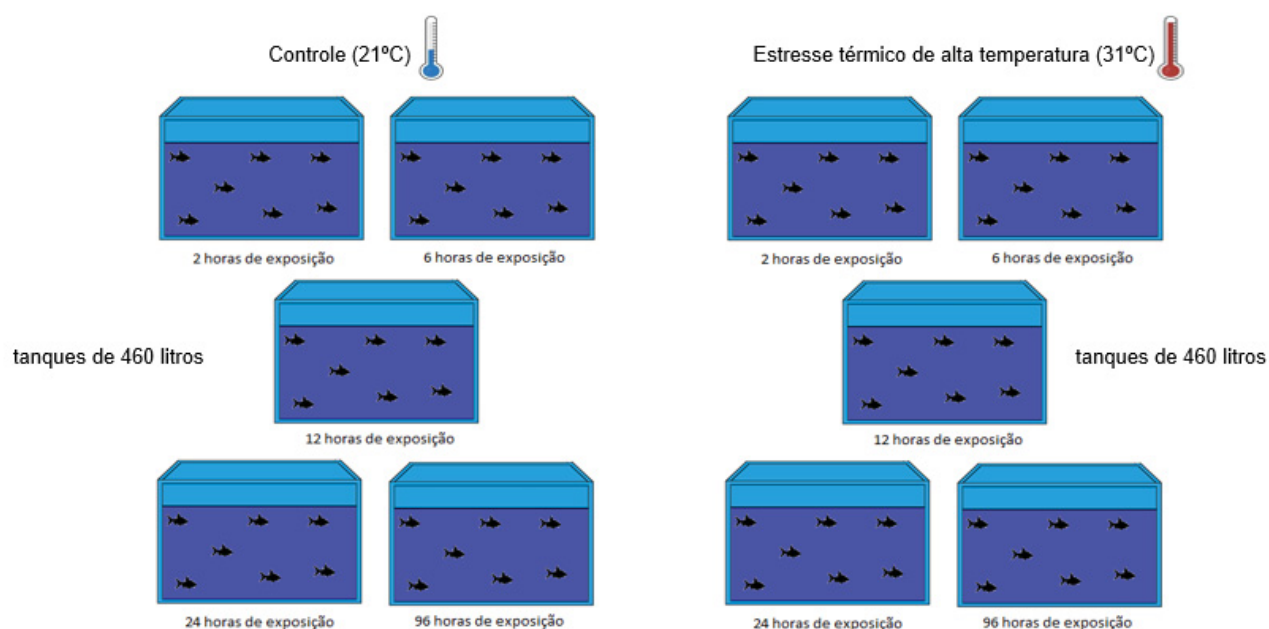
No local dos experimentos os peixes foram transferidos para tanques de 1000 litros, com o objetivo de aclimação às condições de laboratórios. Os tanques foram limpos por sucção diária, com cerca de 10% da água renovada diariamente (LERMEN et al., 2004), a água utilizada foi originária de nascente própria. Nestes tanques, o controle de temperatura foi regulado por termostatos (Aquaterm 08 Full Cage), que foram instalados previamente. Os tanques foram configurados como sistemas estáticos, a fim de diminuir variáveis experimentais.

Medidas abióticas foram realizadas durante os 8 dias de aclimação, sendo temperatura ($21 \pm 0,5$ °C), O₂ dissolvido ($7,5 \pm 1,0$ mg/L), amônia ($0,18 \pm 0,5$ mg/L) e pH ($7,0 \pm 0,5$). Os peixes foram alimentados diariamente (1% do peso do animal) com ração comercial para peixes (Supra® Aqua Line, com teor de proteína de 42%) (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 (VINAGRE et al., 2014; MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016).

2.2 EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA

Exemplares de *Rhamdia voulezi* ($n = 73$; comprimento total = $25,06 \pm 4,47$ cm; comprimento padrão = $20,71 \pm 3,94$ cm; peso = $142,94 \pm 85,77$ g) foram aleatoriamente selecionados e transferidos diretamente, simulando exposição aguda a alta temperatura, para tanques de 460 litros contendo água com temperatura a $31 \pm 1,0^\circ\text{C}$ (experimental) ou a $21 \pm 1,0^\circ\text{C}$ (controle) por 2, 6, 12, 24 ou 96 horas. O número de animais por experimento/controle (n amostral) foi de 7 peixes, com exceção de 96 horas, controle e experimental, com n amostral de 8 indivíduos (FIGURA 12).

FIGURA 12 – DESENHO ESQUEMÁTICO DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS DE EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA EM *Rhamdia voulezi*



Nota: Esquema gráfico representando o delineamento experimental. Os tanques utilizados foram de 460 litros e para cada situação experimental foi utilizado um controle. Fonte: O autor, 2022.

A escolha de temperatura utilizada no experimento foi baseada em respostas já descritas para uma espécie próxima a *R. voulezi* o *Rhamdia quelen*, espécie que é encontrada na América do Sul, em faixas de temperatura ambientais, bem como situações experimentais semelhantes ao utilizado no experimento (CHIPPARI-GOMES et al., 1999; TAVARES-DIAS et al, 2002; LERMEN et al., 2004). Espécimes de *R. quelen*, aclimatados a 21°C , apresentaram faixa de sobrevivência a rápidas mudanças de temperatura da água entre 11 e 31°C e em 100% dos animais (CHIPPARI-GOMES et al., 1999). Valores encontrados por Tavares-Dias et al. (2002) em *R. quelen* à 25°C , relatam que esta espécie possui boa tolerância para a variação

de temperatura testada.

A água foi mantida nas temperaturas estabelecidas por sistema de aquecimento elétrico e com termostatos (Aqua One®, VigoAr®e Atman®, com potência de 200 e 500 W), sendo rigorosamente controlada. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em tanques com água em vazão constante de 1 L/min, em uma densidade média de $4,3 \pm 1,4$ g/L. Foram mensurados durante os experimentos os parâmetros de amônia tóxica (NH₃) ($0,003 \pm 0$ mg/L), oxigênio dissolvido ($9 \pm 1,41$ mg/L) e pH ($7,15 \pm 0,21$). A oferta de alimento foi idêntica a aclimação e descrita no item .1 – coletas e aclimação de *Rhamdia voulezi*.

Ao fim de cada experimento os peixes foram anestesiados com benzocaína 1% (p.v-1), eutanasiados com secção medular e imediatamente dissecados (FIGURA 13). As amostras (fígado, brânquias e rins médio-posterior) foram congeladas e mantidas em nitrogênio líquido e foram processadas no Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – Setor de Ciências Biológicas, UFPR.

FIGURA 13- FOTO DOS PROCEDIMENTOS DE DISSECAÇÃO DE *Rhamdia voulezi*



Nota: Equipe do laboratório de Biologia Adaptativa realizando procedimentos de anestesia e dissecação dos animais após o período do experimento. FONTE: Ieda Scheleger, 2019.

2.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

As amostras foram pesadas e homogeneizadas com o auxílio do homogeneizador motorizado (Potter-Elvehjem) e posteriormente centrifugadas a 12.000 g à 4 °C por 20 min para se obter o sobrenadante. Posteriormente as amostras foram separadas em diferentes alíquotas (fazendo-se uso microtubos de 1,5 ml) e mantidas congeladas à -80 °C até o momento do uso para as análises laboratoriais.

A concentração de proteínas totais foi determinada com Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma) e albumina de soro bovina (BSA) como padrão, com leitura de absorvância a 595 nm (BRADFORD, 1976). As análises foram realizadas em triplicata, com condições ótimas de pH, concentração de substrato saturante e temperatura ambiente aproximada de 22 °C (ROBINSON, 2008), sendo mensuradas por espectrofotometria na leitora de microplacas (EPOCH Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT, EUA).

2.3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE, NÍVEIS DE GSH E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS

Os níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD, E.C. 1.15.1.1) foram avaliados segundo CROUCH; GANDY; KIMSEY (1981), utilizando sistema de reação com tampão carbonato de sódio pH 10,2 mM e cloreto de hidroxilamina e solução de NBT, a leitura de absorvância foi a 560 nm. As amostras foram previamente tratadas com etanol 25% e centrifugadas por 10 min a 12000 g (4 °C). O tempo de leitura utilizado foi de 4 h com intervalo de leitura de 20 min.

A atividade da catalase (CAT, E.C. 1.11.1.6) foram avaliados segundo BEUTLER (1975), com sistema de reação contendo tampão Tris-HCl 1,0 M, EDTA 5,0 mM, pH 8,0 e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a leitura de absorvância foi a 240 nm. A cinética enzimática foi lida por 5 min com intervalo de 8 segundos.

Os níveis de atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx, E.C. 1.11.1.9) foram medidos segundo o método descrito por WENDEL (1981), com sistema de reação contendo solução de tampão fosfato de sódio pH 7,0 100 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 2 µM, Azida sódica 2 mM, GR 1 U/mL e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), a leitura de absorvância foi a 340 nm. O tempo de leitura da atividade enzimática utilizado foi de 10 min com intervalo de 43 segundos.

Os níveis de atividade da glutatona redutase (GR, E.C. 1.6.4.2) foram avaliados segundo os autores CARLBERG; MANNERVIK (1985), com sistema de

reação contendo tampão fosfato de potássio pH 7,6 100 mM, NADPH 0,5 mM e GSSG 5 mM, a leitura de absorbância foi a 340 nm. A leitura da cinética enzimática utilizado foi de 15 min com intervalo de 43 segundos.

A atividade de glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PDH, E.C. 1.1.1.49) foi determinada pelo método descrito por GLOCK; MCCLEAN (1953), por meio de sistema de reação contendo tampão Tris-HCl pH 7,4 200 mM, NADP⁺ 0,2 mM e G6P 1 mM e leitura de absorbância a 340 nm. A leitura da cinética enzimática utilizado foi de 15 min com intervalo de 43 segundos.

Os níveis de atividade da glutationa-S-transferase (GST, E.C. 2.5.1.18) foram determinados de acordo com a metodologia de KEEN; HABIG; JAKOBY (1976), sistema de reação contendo solução de tampão fosfato de potássio pH 6,5 mM, GSH 1,5 mM, CDNB 2 mM, a leitura de absorbância foi a 340 nm. O tempo de leitura utilizado foi de 5 min com intervalo de 30 segundos.

Em relação aos marcadores de danos oxidativos e concentração de tióis não proteicos, foram utilizados os seguintes métodos: os níveis de glutationa (GSH) foram determinados por meio da metodologia de SEDILAK; LINDSAY, (1968), onde foi utilizado sistema de reação contendo DTNB dissolvido em metanol PA somado a tampão Tris-base a 0,4 M, pH 8,9 e leitura de absorbância a 415 nm. As amostras homogeneizadas foram tratadas previamente com solução de ácido tricloroacético a 50% (TCA 50%) e centrifugadas a 5000 g por 10 min a 4 °C.

Análises de marcadores de dano celular: lipoperoxidação lipídica (LPO) foram estimadas pelo método de TBARS (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007 com modificações), sistema de reação contendo BHT diluído em etanol, tampão PBS pH 7,4, ácido tricloroacético a 50% e TBA 1,3% (dissolvido em NaOH 0,3%), a leitura de absorbância utilizada foi de 535 nm. As amostras homogeneizadas foram tratadas previamente com solução de TCA 10% e centrifugadas a 14.000 rpm por 5 min a 4 °C. As placas foram encubadas em *Thermo shaker* por 1 h em temperatura de 60 °C com rotação de 250 rpm.

Em relação aos danos oxidativos em proteínas (carbonilação proteica - PCO) foram mensurados medindo grupos carbonil conforme previamente descrito por LEVINE et al. (1994), utilizando sistema de reação contendo 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), solução de etanol – acetato de etila e solução de hidrocloreto de guanidina. As amostras homogeneizadas foram tratadas previamente com solução de ácido tricloroacético a 28% e centrifugadas a 9000 g em 4 °C por 10 min, leitura de

absorbância foi realizada a 360 nm.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos foram primeiramente transformados pelo método de box-cox (BOX; COX, 1964) para atender aos pressupostos da análise de variância (ANOVA) em relação a homocedasticidade e normalidade dos resíduos (KIM; CRIBBIE, 2018). Para cumprir com esse objetivo fez-se uso do pacote MASS (RIPLEY et al., 2021). Cada biomarcador foi submetido à ANOVA bifatorial. Foram estatisticamente comparadas as variáveis independentes temperatura (controle e tratamento) e tempo (2, 6, 12, 24 e 96 horas), bem como a interação entre elas (controle e tratamento para cada período de exposição). Para identificação das diferenças específicas realizou-se o teste post hoc de Tukey pelo pacote emmeans (LENTH et al., 2021). Os valores estão apresentados como a média e o erro padrão da média nos gráficos montados através do pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016).

A análise MANOVA foi utilizada para testar a diferença de resposta enzimática entre os três órgãos avaliados. Uma análise multivariada, *principal components analysis* (PCA), foi realizada com os pacotes factoextra (KASSAMBARA; MUNDT, 2019) e FactoMineR (LE; JOSSE; HUSSON, 2008) para investigar quais biomarcadores do estresse oxidativo foram importantes descritores dos três órgãos analisados. Uma análise de correlação de Pearson foi utilizada com o pacote metan (OLIVOTO; LÚCIO, 2020), para testar a relação entre os biomarcadores da defesa antioxidante enzimático, bem como marcadores de danos oxidativos. Correlações com $p < 0,05$ foram consideradas significativas e demonstradas utilizando o pacote corrplot (WEI; SIMKO, 2021). Uma análise do índice de resposta do biomarcador integrado (IBR) foi realizado para verificar a capacidade de aclimação com base em seu desempenho fisiológico geral (CAMPOS et al., 2019). Neste estudo, os marcadores bioquímicos SOD, CAT, GPx, GR, GST, GSH, LPO e PCO foram integrados para analisar a resposta dos tecidos analisados. O cálculo foi realizado utilizando a Interface IBR CALCulate, desenvolvida pelo Laboratório Interdisciplinar para Ambientes Continentais da Universidade de Lorena, França (CALIBRI, 2022). A plataforma considera o cálculo proposto por Beliaeff e Burgeot (2002) e revisitado por Devin et al. (2014). Os gráficos do radar foram construídos com o pacote ggradar

(BION, 2022). As análises estatísticas e os gráficos foram produzidos integralmente no software R (R Core Team, 2021).

3 RESULTADOS

Os animais sobreviveram ao longo dos tempos experimentais (2, 6, 12, 24 e 96 horas) e nas temperaturas testadas (21°C e 31°C), com exceção de morte de 1 peixe em 2 h (31°C), 3 peixes em 2 h (21°C) e 1 peixe em 6 h (21°C), totalizando 6,8% de morte. Conseqüentemente, este bioensaio é considerado válido (mortalidade < 10 %) (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2015).

3.1 RESPOSTA DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO DE *Rhamdia voulezi* EXPOSTO A ALTA TEMPERATURA

No fígado de *R. voulezi*, a atividade da SOD aumentou em 2 h (F = 42,9, p = 0,0006), 6 h (F = 38,83, p = 0,0001), 12 h (F = 56,05, p = 2,09e-05) e 96 h (F = 28,41, p = 0,0001) (FIGURA 14a), sendo esses aumentos em 31 °C quando comparado ao controle de 21 °C. A atividade da GPx aumentou em 6 h (F = 6,716, p = 0,029) (FIGURA 14c) no grupo exposto a 31 °C. Em relação a GST houve um aumento da atividade em 12 h (F = 20,7, p = 0,001) e 96 h (F = 10,31, p = 0,006) em 31 °C (FIGURA 14f). Na GR não houve diferença significativa na interação entre as variáveis independentes (tempo e temperatura), e em relação a variável tempo houve uma diferença significativa (TABELA 1). Nos biomarcadores enzimáticos não houve diferença significativa na interação entre as variáveis independentes na atividade da CAT e G6PDH (TABELA 1).

Os níveis de GSH apresentaram diferenças na variável tempo e tratamento, mas não difereu na interação entre as variáveis (TABELA 1). Em relação aos biomarcadores de danos oxidativos, LPO apresentou diferença na variável tempo e PCO também na variável tempo (TABELA 1). Em relação a interação entre as variáveis independentes não houve diferença significativa entre os biomarcadores citados.

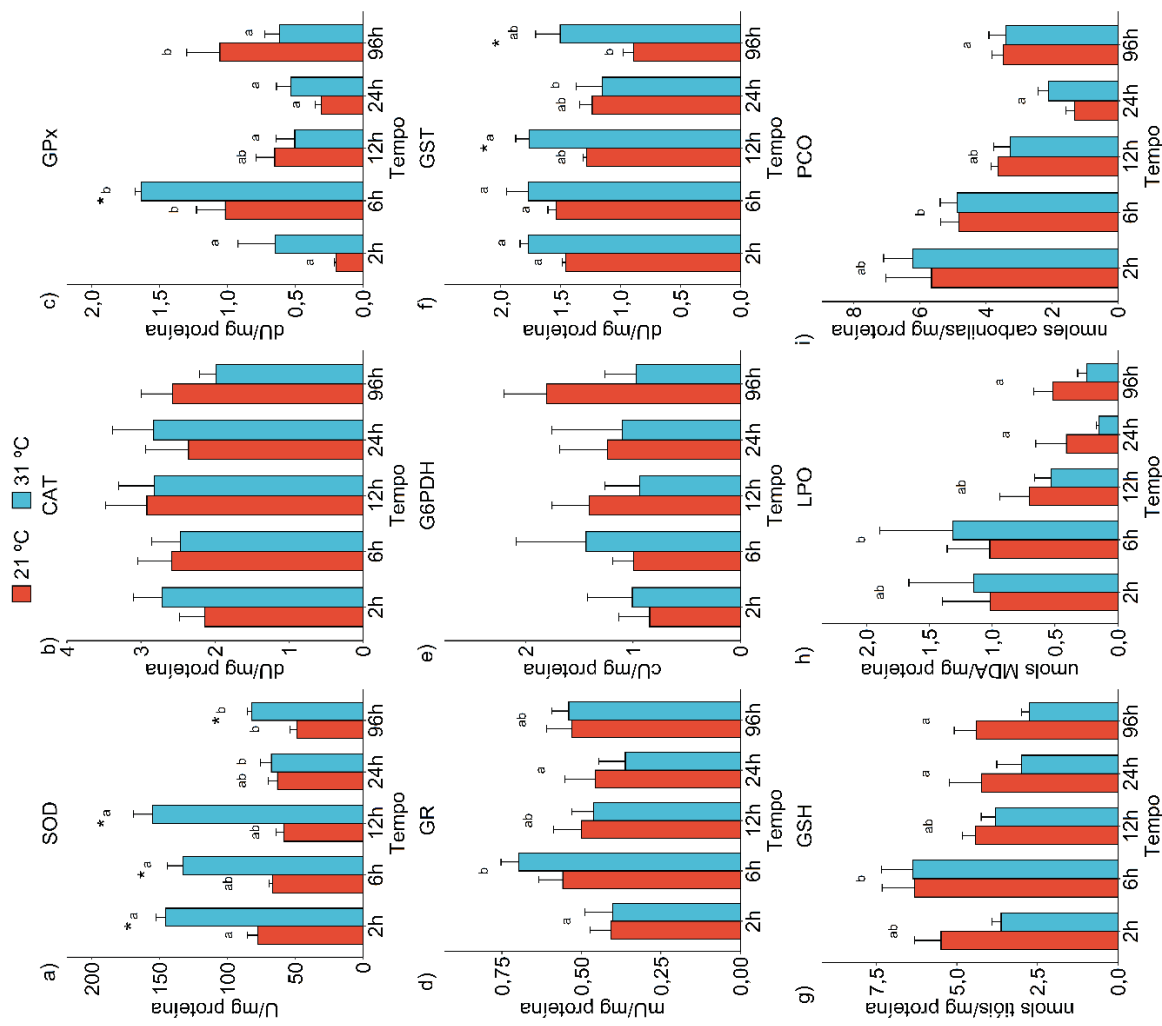
A diferença entre os tempos de exposição (2, 6, 12, 24 e 96 h) do grupo controle e do tratamento dos biomarcadores de defesa antioxidante e marcadores de danos oxidativos no fígado de *R. voulezi* podem ser melhor observados na figura 14.

TABELA 1: RESULTADOS ANOVA DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E DOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO FÍGADO DE *Rhamdia voulezi*

		SOD	CAT	GPx	GR	G6PDH	GST	GSH	LPO	PCO
Tempo	F	18.825	0.608	9.064	3.001	0.505	6.773	5.221	5.139	18.873
	p	2.69e-09*	0.659	1.64e-05*	0.0276 *	0.7320	0.0002*	0.001*	0.001*	2.59e-09*
Temperatura	F	113.698	0.007	0.625	0.002	3.820	12.922	6.118	1.218	0.252
	p	3.87e-14*	0.934	0.4330	0.9659	0.0566	0.0007*	0.017*	0.27528	0.618
Temperatura x Tempo	F	7.615	0.745	2.961	0.579	0.504	2.749	0.621	0.341	0.906
	p	8.15e-05*	0.566	0.0291 *	0.6794	0.7331	0.039 *	0.64957	0.84878	0.468

Nota: SOD superóxido dismutase, CAT catalase, GPx glutatona peroxidase, GR glutatona reductase, GST glutatona-S-transferase, GSH glutatona reduzida, peroxidação lipídica LPO, carbonilação de proteína PCO. *Diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Fonte: O autor.

FIGURA 14 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NO FÍGADO DE *Rhamdia voulezi*.



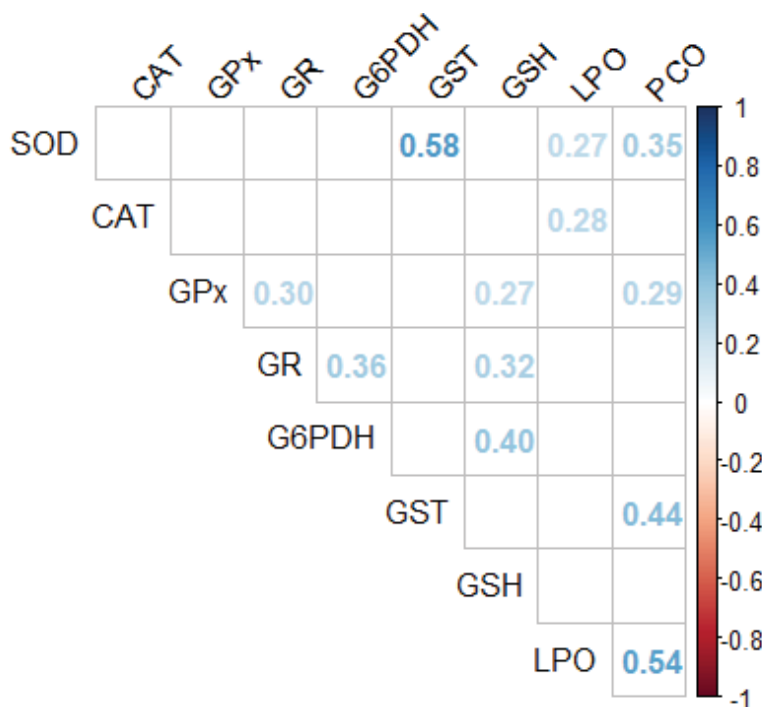
Nota: Os asteriscos (*) representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. As letras acima das barras indicam variações entre os diferentes tempos de exposição (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutathione peroxidase; GR - glutathione reductase; G6PDH - Glicose 6-fosfato desidrogenase; GST - glutathione-S-transferase. Tióis não-proteicos: GSH - glutathione reduzida. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação. FONTE: O autor, 2022.

3.2 CORRELAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO DE *Rhamdia voulezi*

No fígado de *R. voulezi* houve uma correlação positiva entre todos os biomarcadores testados. Os biomarcadores que apresentaram correlação significativa ($p < 0,05$) foram a SOD, com a GST ($p = 2.43e-06$), LPO ($p = 0,04$) e PCO ($p = 0,007$). A CAT apresentou uma correlação com LPO ($p = 0,03$). A GPx apresentou correlação com a GSH ($p = 0,04$), GR ($p = 0,02$) e PCO ($p = 0,02$). A GR apresentou correlação com a GSH ($0,01$) e G6PDH ($p = 0,006$). A GST apresentou uma relação com a PCO ($p = 0,0006$).

Em relação aos marcadores não enzimáticos e danos oxidativos uma correlação significativa foi encontrada na GSH em relação a G6PDH ($p = 0,002$). LPO teve correlação com a PCO ($p = 1.311e-05$). Todas as interações significativas e não significativas são observadas na figura 15.

FIGURA 15: CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO DE *R. voulezi*.



Nota: Espaços em branco representam correlação não significativa ($p > 0,05$) entre os biomarcadores testados. Coloração azul indica uma relação positiva e coloração vermelha indica uma relação negativa. Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutathione peroxidase; GR - glutathione reductase; G6PDH - Glicose 6-fosfato desidrogenase; GST - glutathione-S-transferase. Tióis não-proteicos: GSH - glutathione reduzida. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação. FONTE: O autor, 2022.

3.3 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NAS BRÂNQUIAS DE *Rhamdia voulezi* EXPOSTO A ALTA TEMPERATURA

Nas brânquias de *R. voulezi*, a atividade da SOD aumentou em 31°C quando comparado a 21 °C em 2 h ($F = 20,36$, $p = 0,01$), 6 h ($F = 17,61$, $p = 0,001$), 12 h ($F = 29,66$, $p = 0,0002$) e 24 h ($F = 95,92$, $p = 1,92e-06$) (FIGURA 16a). A atividade da GPx aumentou em 2 h ($F = 10,68$, $p = 0,030$) em 31 °C quando comparado a 21 °C (FIGURA 16c). Na GST não houve diferença significativa na interação entre as variáveis independentes, porém a variável tempo teve diferença significativa (TABELA 2). Em relação a GR, a variável tempo houve uma diferença significativa (TABELA 2), mas não foi observado diferença significativa entre a interação das variáveis independentes. Na G6PDH também não houve diferença significativa entre as variáveis independentes, somente a variável tempo apresentou diferença significativa (TABELA 2). Em relação a CAT a variável temperatura apresentou diferença significativa, porém não houve diferença significativa entre a interação das variáveis independentes (TABELA 2).

Os níveis de GSH aumentaram em 24 h ($F = 13,18$, $p = 0,004$) no grupo exposto a 31 °C em comparação a 21 °C, e em 96 h ($F = 10,5$, $p = 0,005$) foi observado uma diminuição no grupo exposto a 31 °C quando comparado a 21 °C (FIGURA 16g). Em relação aos danos oxidativos, a LPO aumentou em 2 h ($F = 93,59$, $p = 0,0006$), 6 h ($F = 41,13$, $p = 7,7e-05$), 12 h ($F = 15,25$, $p = 0,002$) e 96 h ($F = 15,85$, $p = 0,001$), todos em 31 °C (FIGURA 16h). Nos marcadores de PCO foi registrado um aumento em 12 h ($F = 58,45$, $p = 1e-05$) no grupo exposto a 31 °C quando comparado ao grupo exposto a 21 °C (FIGURA 16i).

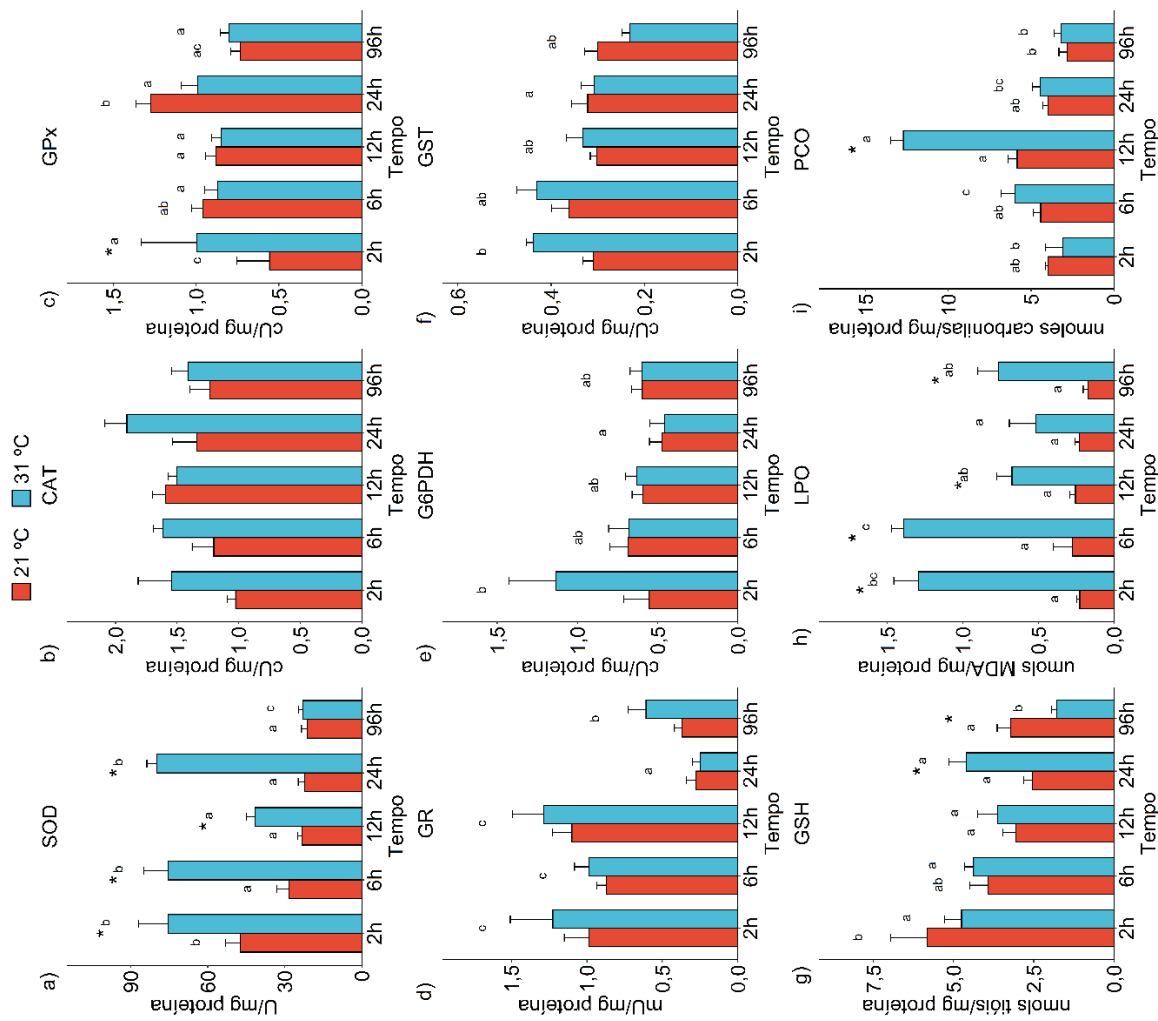
A diferença entre os tempos de exposição (2, 6, 12, 24 e 96 h) do grupo controle e do tratamento dos biomarcadores de defesa antioxidante e marcadores de danos oxidativos nas brânquias de *R. voulezi* podem ser melhor observados na figura 16.

TABELA 2: RESULTADOS ANOVA DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E DOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS BRÂNCIAS DE *Rhamdia voulezi*

		SOD	CAT	GPx	GR	G6PDH	GST	GSH	LPO	PCO
Tempo	F	21.19	1.335	6.311	28.41	2.669	5.896	8.821	4.117	32.00
	<i>p</i>	3.41e-10*	0.27037	0.0003*	3.1e-12*	0.043*	0.0005*	1.91e-05*	0.005*	4.05e-13*
Temperatura	F	88.94	8.380	0.000	3.03	0.571	0.249	0.069	83.688	19.60
	<i>P</i>	1.36e-12*	0.005*	0.98	0.088	0.453	0.619913	0.79	3.55e-12*	5.34e-05*
Temperatura x Tempo	F	9.94	1.515	3.092	0.51	1.381	2.540	5.528	3.450	8.61
	<i>p</i>	5.71e-06*	0.21246	0.02*	0.729	0.254	0.051500	0.0009*	0.01*	2.41e-05*

Nota: SOD superóxido dismutase, CAT catalase, GPx glutationa peroxidase, GR glutationa redutase, GST glutationa-S-transferase, GSH glutationa reduzida, peroxidação lipídica LPO, carbonilação de proteína PCO. *Diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Fonte: O autor.

FIGURA 16- ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NAS BRÂNKUIAS DE *Rhamdia voulezi*.

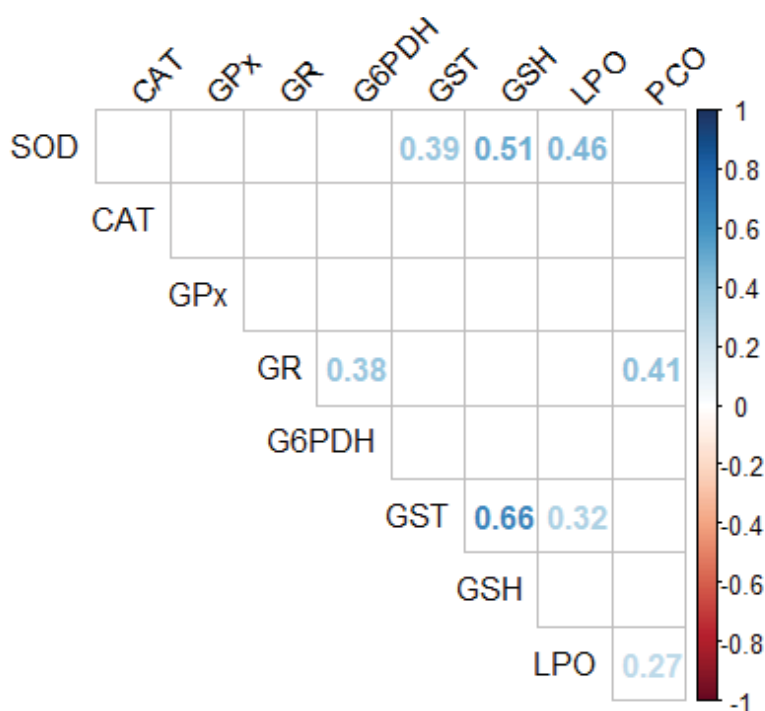


Nota: Os asteriscos (*) representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. As letras acima das barras indicam variações entre os diferentes tempos de exposição (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPX - glutatona peroxidase; GR - glutatona redutase; G6PDH - Glicose 6-fosfato desidrogenase; GST - glutatona-s-transferase. Tióis não-proteicos: GSH - glutatona reduzida. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação. FONTE: O autor, 2022.

3.4 CORRELAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NAS BRÂNQUIAS DE *Rhamdia voulezi*

Nas brânquias de *R. voulezi* todos os biomarcadores da defesa antioxidante enzimático apresentaram uma correlação positiva. Em relação aos biomarcadores que apresentaram correlação significativa ($p < 0,005$) temos a SOD, com a GSH ($p = 4.48e-05$), GST ($p = 0,002$) e LPO ($p = 0,0002$). A GR teve correlação com a PCO ($p = 0,001$) e G6PDH ($0,002$). A GST teve correlação com a GSH ($p = 1.561e-08$) e LPO ($p = 0,01$). Em relação aos biomarcadores de danos oxidativos a LPO e PCO apresentaram correlação significativa entre os próprios marcadores ($p = 0,04$). Todas as interações significativas e não significativas são observadas na figura 17.

FIGURA 17: CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E DANOS OXIDATIVOS NAS BRÂNQUIAS DE *R. voulezi*.



Nota: Espaços em branco representam correlação não significativa ($p > 0,05$) entre os biomarcadores testados. Coloração azul indica uma relação positiva e coloração vermelha indica uma relação negativa. Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutatona peroxidase; GR - glutatona redutase; G6PDH - Glicose 6-fosfato desidrogenase; GST - glutatona-s-transferase. Tióis não-proteicos: GSH - glutatona reduzida. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação. FONTE: O autor, 2022.

3.5 SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE

DANOS OXIDATIVOS NOS RINS DE *Rhamdia voulezi* EXPOSTO A ALTA TEMPERATURA

Nos rins de *R. voulezi* a SOD em 12 h ($F = 9,373$, $p = 0,0108$) e 96 h ($F = 80,84$, $p = 0,000106$) aumentou de atividade em 31°C quando comparado ao grupo de 21 °C (FIGURA 18a). Em relação a CAT em 2 h ($F = 71,47$, $p = 0,00107$) e 12 h ($F = 71,47$, $p = 0,00107$) um aumento da atividade foi observado no grupo exposto a 31 °C quando comparado ao grupo de 21 °C (FIGURA 18b). A GR aumentou de atividade em 6 h ($F = 12,36$, $p = 0,0079$) e 12 h ($F = 6,52$, $p = 0,0268$) no grupo exposto a 31 °C em comparação a 21 °C (FIGURA 18d). Na GPx não houve diferença significativa entre as variáveis independentes, mas foi registrado um valor significativo na variável tempo e tratamento (TABELA 5). A G6PDH não houve diferença significativa na interação entre as variáveis independentes, por outro lado, a variável tempo apresentou diferença significativa, bem como a variável tratamento (TABELA 5). Em relação a GST não foi registrado valor significativo entre as variáveis independentes (TABELA 5).

Os níveis de GSH não apresentaram diferença significativa na interação entre as variáveis independentes, por outro lado a variável tempo e tratamento apresentaram diferença significativa (TABELA 5). Nos marcadores de danos oxidativos, a LPO aumentou no grupo exposto a 31 °C em comparação a 21 °C em 2 h ($F = 654,4$, $p = 1,39e-05$) e 6 h ($F = 23,75$, $p = 0,00123$) (FIGURA 18h). Na PCO não teve diferença significativa entre as variáveis independentes, por outro lado uma diferença significativa foi observada na variável tempo (TABELA 5).

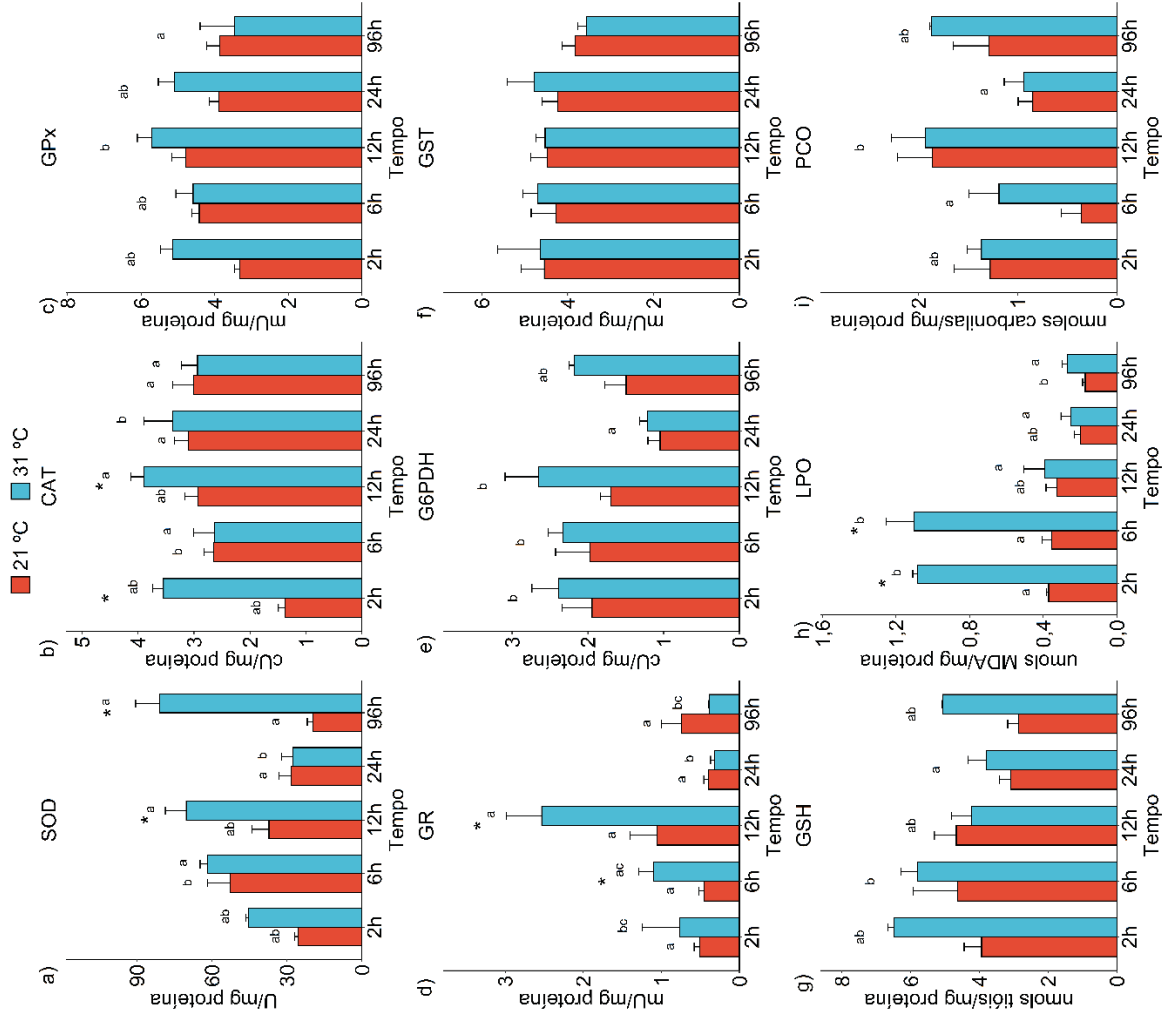
A diferença entre os tempos de exposição (2, 6, 12, 24 e 96 h) do grupo controle e do tratamento dos biomarcadores de defesa antioxidante e marcadores de danos oxidativos nos rins de *R. voulezi* podem ser melhor observados na figura 18.

TABELA 3: RESULTADOS ANOVA DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E DOS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO SOBRE OS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS RINS DE *Rhamdia voulezi*

		SOD	CAT	GPx	GR	G6PDH	GST	GSH	LPO	PCO
Tempo	F	10.020	5.391	3.713	7.594	6.925	0.892	4.335	21.173	4.960
	p	1.03e-05*	0.001*	0.01*	0.0001*	0.0002*	0.478	0.005*	1.94e-09*	0.002*
Temperatura	F	25.952	10.279	8.580	3.129	8.589	0.555	6.065	18.796	3.620
	p	8.76e-06*	0.002*	0.005*	0.08	0.005*	0.461	0.018*	9.55e-05*	0.06
Temperatura x Tempo	F	5.838	7.151	1.917	2.708	0.454	0.213	1.724	2.844	1.158
	p	0.0008*	0.0001*	0.12637	0.04*	0.769	0.930	0.16367	0.0364*	0.34

Nota: SOD superóxido dismutase, CAT catalase, GPx glutatona peroxidase, GR glutatona reductase, GST glutatona-S-transferase, GSH glutatona reduzida, peroxidação lipídica LPO, carbonilação de proteína PCO. *Diferenças significativas ($p \leq 0,05$). Fonte: O autor.

FIGURA 18 - ATIVIDADES DE ENZIMAS DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E CONCENTRAÇÃO DE GSH, LPO E PCO NOS RINS DE *Rhamdia voulezi*.

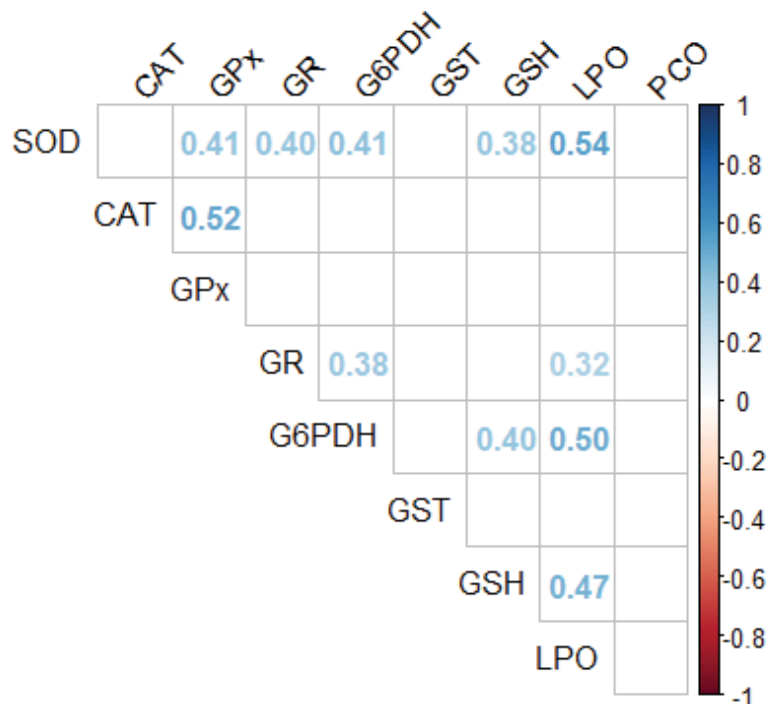


Nota: Os asteriscos (*) representam diferença significativa ($p < 0,05$) entre controle e tratamento. As letras acima das barras indicam variações entre os diferentes tempos de exposição (cada tempo de exposição representado pelo seu número de horas). Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutathione peroxidase; GR - glutathione reductase; G6PDH - Glicose 6-fosfato desidrogenase; GST - glutathione-S-transferase. Tióis não-proteicos: GSH - glutathione reduzida. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação. FONTE: O autor, 2022.

3.6 CORRELAÇÃO DAS ENZIMAS ENVOLVIDAS NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NOS RINS DE *Rhamdia voulezi*

Nos rins de *R. voulezi* todos os biomarcadores da defesa antioxidante enzimático apresentaram uma correlação positiva. Em relação aos biomarcadores enzimáticos com relação significativa ($p < 0,05$), temos a SOD com a GPx ($p = 0,003$), GR ($p = 0,004$), G6PDH ($p = 0,002$), GSH ($p = 0,006$) e LPO ($p = 5.088e-05$). A CAT teve correlação com a GPx ($p = 0,0001$). A GR teve correlação com a G6PDH ($p = 0,007$) e LPO ($p = 0,02$). A G6PDH apresentou correlação com a LPO ($p = 0,0002$). Em relação aos marcadores não enzimáticos a GSH apresentou correlação com a G6PDH ($p = 0,004$) e LPO ($p = 0,0005$). Todas as interações significativas e não significativas são observadas na figura 19.

FIGURA 19: CORRELAÇÃO DE PEARSON DOS BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E DANOS OXIDATIVOS NOS RINS DE *R. voulezi*.



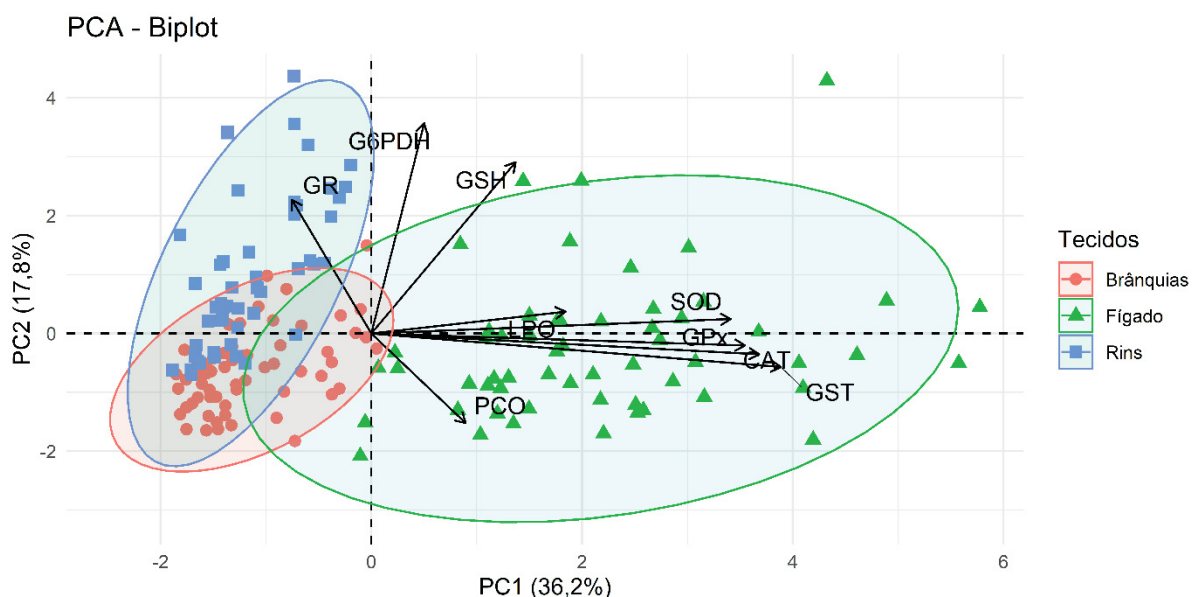
Nota: Espaços em branco representam correlação não significativa ($p > 0,05$) entre os biomarcadores testados. Coloração azul indica uma relação positiva e coloração vermelha indica uma relação negativa. Enzimas: SOD - superóxido dismutase; CAT - catalase; GPx - glutathiona peroxidase; GR - glutathiona redutase; G6PDH - Glicose 6-fosfato desidrogenase; GST - glutathiona-s-transferase. Tióis não-proteicos: GSH - glutathiona reduzida. Medidores de dano: LPO - lipoperoxidação. FONTE: O autor, 2022.

3.7 EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AGUDA A ALTA TEMPERATURA EM *Rhamdia voulezi*: VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS

Em relação às enzimas da defesa antioxidantes e marcadores de danos oxidativos foram observadas diferenças significativas em todos os biomarcadores avaliados entre os três órgãos (fígado, brânquias e rins) de *R. voulezi* estudados ($p < 0,05$) e são mostradas na Figura 20. O primeiro eixo da PCA explicou 36,2% da variação dos órgãos, e foi representado pela GST, CAT, GPx e SOD. O segundo eixo explicou 17,8% de variação de órgãos, e foi representado pela concentração de G6PDH, GSH e GR. O terceiro eixo explicou 15,6% da variação dos órgãos, e foi representado pela PCO. Em conjunto, os três primeiros eixos explicaram 69,6% das respostas diferenciais observadas para o sistema antioxidante entre os três órgãos.

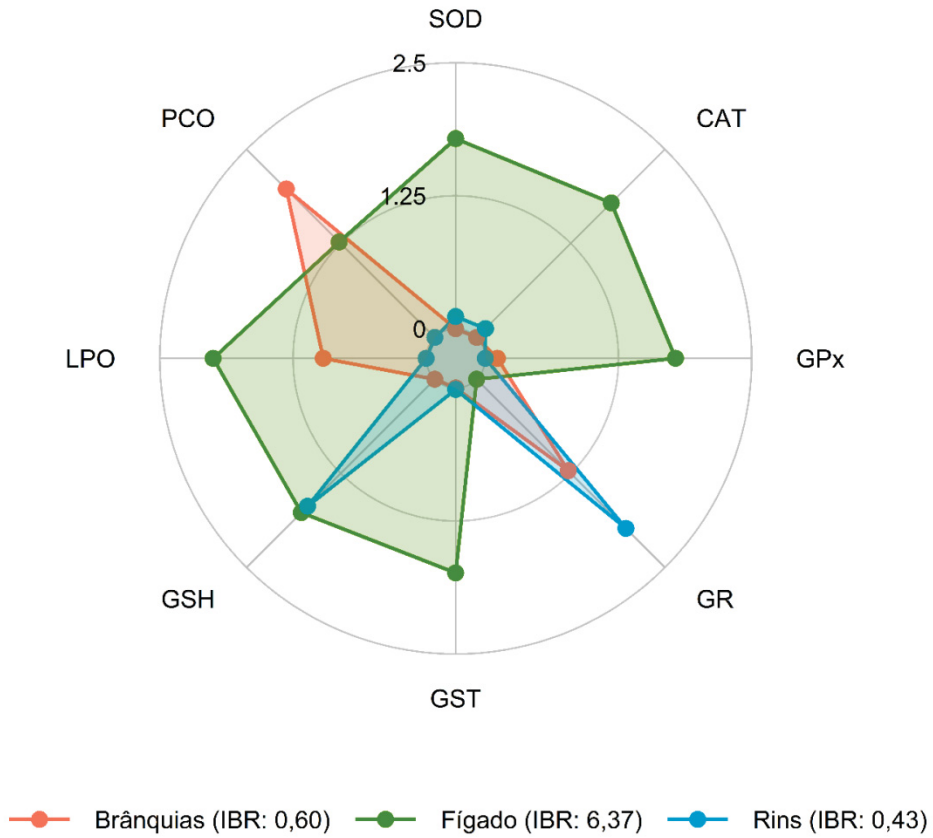
Na figura 21 é possível visualizar a variação da resposta da defesa antioxidante e marcadores de danos oxidativos entre os órgãos. O fígado de *R. voulezi* apresentou 6,37 de valor de IBR, os biomarcadores responsáveis por esse valor foram SOD, CAT, GPx, GST, GSH e LPO. Nas brânquias o valor de IBR foi de 0,60, com o biomarcador mais responsivo por esse valor sendo PCO. Nos rins o valor de IBR foi de 0,40 com GR sendo o biomarcador mais responsivos (FIGURA 21).

FIGURA 20 - BIPLLOT DE PCA DE ENZIMAS E CONCENTRAÇÃO DE GSH DO SISTEMA ANTIOXIDANTE NOS TRÊS ÓRGÃOS AVALIADOS



Nota: Os valores das enzimas foram normalizados para essa análise multivariada devido à sua alta variação. As elipses foram demarcadas no intervalo de confiança de 95%. FONTE: O Autor, 2022.

FIGURA 21: IBR DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E MARCADORES DANOS OXIDATIVOS EM FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS DE *R. voulezi* EXPOSTO A ALTA TEMPERATURA



Nota: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivo gráfico de radar em relação a defesa antioxidante e danos oxidativos dos tecidos avaliados (fígado, brânquias e rins). SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GPx, glutathione peroxidase, GR – glutathione reductase, GST – glutathione S-transferase, GSH – glutathione reduzida, LPO – lipoperoxidação lipídica e PCO – proteínas carboniladas.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo os biomarcadores testados foram as atividades de enzimas antioxidantes e biomarcadores de danos oxidativos nos órgãos fígado, brânquias e rins de *R. voulezi*. Foi testado o efeito da exposição aguda a alta temperatura (31°C) com os tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 96 h em comparação aos seus respectivos controles.

O fígado dos peixes tem função ativa no metabolismo básico e tem papel importante nas funções vitais sendo o maior órgão de excreção, biotransformação e acumulação (FIGUEIREDO-FERNANDES et al. 2006). Conseqüentemente o fígado é um órgão no qual pode ser observado os efeitos do estresse oxidativo (FAHEEM; LONE, 2017; RESENDE et al. 2022; SCHLEGER et al. 2022). As brânquias e os rins dos peixes atuam diretamente na osmorregulação e excreção, e sofrem diretamente com uma alteração drástica da mudança de temperatura na água (FORGATI et al., 2017; JAVED et al., 2017). Desta forma os padrões de respostas antioxidantes à produção de EROs podem ser observadas nestes tecidos, pois suas funções requerem a ação de diversas enzimas e transportadores, demandando grande quantidade de energia (TSENG et al. 2008).

Mudanças na temperatura da água afetam aspectos metabólicos e fisiológicos de peixes e os efeitos geralmente dependem de fatores como o tempo de exposição e a temperatura em que os peixes são expostos (BOWDEN 2008; LEE et al. 2014). Em sistemas biológicos as enzimas antioxidantes, são uma importante linha de defesa contra danos oxidativos, e podem ser usadas como biomarcadores para estresse oxidativo (PARIHAR; DUBEY, 1995). O comportamento destes biomarcadores elucidada como os órgãos respondem ao estresse oxidativo provocado pelo estresse térmico visto que as respostas dos biomarcadores são associadas para uma melhor defesa ao estresse (FADHLAOUI; COUTURE, 2016). Os órgãos tendem a ter uma resposta fisiológica diferente ao estresse térmico e isto está relacionado as atividades e funções que cada órgão desempenha no organismo (NAKANO et al., 2014).

Em *R. voulezi*, as variações em alguns biomarcadores ao longo do tempo sem o efeito da temperatura foram consideradas variações individuais, pois estudos indicam que diferentes tempos de confinamento podem afetar a regulação de genes relacionados a respostas fisiológicas do organismo (MADARO et al., 2015; KIILLERICH et al., 2018); outro fator que pode ocasionar variações nos tempos de exposição é o

estresse por manejo, quando um peixe é deslocado de um aquário para outro (KLEINHAPPEL; PIKE; BURMAN, 2019). Neste trabalho foi incluído um grupo controle para cada tempo de exposição, a fim de comparar impactos causados por essas variações.

4.1 BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS DE *Rhamdia voulezi* EXPOSTOS A ALTA TEMPERATURA

A SOD é descrita como uma enzima que participa da primeira etapa da eliminação de EROs, sendo bem conhecida sua atividade de converter os radicais livres de oxigênio em compostos menos reativos para evitar danos celulares (CHANDRA et al., 2000; RAMA; MANJABHAT, 2014; CHENG ET AL. 2018; IGHODARO & AKINLOYE, 2018; CHEN et al. 2021). Em *R. voulezi* o aumento da atividade da SOD no fígado até 12 h e posteriormente em 96 h, nos rins em 12 e 96 h e nas brânquias até 24 h aponta que a temperatura de 31 °C induziu uma resposta ao estresse oxidativo (FIGURA 22). O aumento da atividade da SOD nos tempos iniciais (12 h) como aconteceu nos três tecidos, pode indicar a importância da SOD na defesa inicial contra o estresse térmico de alta temperatura (JIA et al. 2020; CHEN et al. 2021). Já o aumento nos tempos finais (96 h) de exposição como ocorreu no fígado e rins indica a importância da SOD na aclimação de peixes a alta temperatura. Comportamento semelhante da SOD foi observado por CHENG et al. (2015) em baiacu (*Takifugu obscurus*) exposto a 34 graus durante 72 horas, sendo que neste indivíduo a SOD foi importante na redução de danos oxidativos.

Em conjunto com a atividade da SOD, a CAT tem como função quebrar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (CHENG et al. 2018). Estudos realizados com o peixe subtropical (*Onychostoma macrolepis*) demonstraram um aumento da SOD e CAT renal até 12 h de exposição, indicando a atuação em conjunto destas duas enzimas para eliminar EROs os tornando menos reativo (YU et al. 2017). Nos rins de *R. voulezi* foi perceptível indução da resposta de defesa antioxidante em 12 h de exposição a alta temperatura, tempo este que aumentou a atividade da SOD e CAT (FIGURA 22).

Por outro lado, a temperatura não foi capaz de alterar a atividade da CAT no fígado e brânquias de *R. voulezi*. Porém ocorreu um aumento da atividade da GPx em alguns horários nestes tecidos, enzima esta que possui função análoga a CAT (RAMA;

MANJABHAT, 2014; CUI et al. 2020). No fígado em 6 h e nas brânquias em 2 h houve uma ação conjunta da SOD e GPx sob exposição aguda a temperatura de 31 °C, o que indica uma ação de neutralizar danos causados por EROs (FIGURA 22) (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). A não alteração da CAT e GPx nos outros tempos de exposição no fígado e brânquias de *R. voulezi*, pode ser justificado também pelos níveis basais destas enzimas serem suficientes para neutralizar os peróxidos formados. Além disso em peixes é descrita a presença de peroxidases ligadas a tioredoxina (peroxirredoxinas – Prx) que possui atuação na decomposição de H₂O₂ para evitar danos oxidativos. Um estudo de expressão de tioredoxina redutase (Trx) em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) estressada por aumento da temperatura indicou um aumento da expressão de Trx, demonstrando a importância desta enzima na proteção contra estresse oxidativo (LI et al. 2022), desta forma a ausência de alteração da CAT e GPx em *R. voulezi* poderia ser explicada por uma atuação das Prx e Trx, porém não foi avaliado estes biomarcadores neste estudo.

Nas brânquias a ausência da ativação em conjunto da atividade da SOD/GPx ou ausência da atividade da CAT pode ser explicada por indícios de que peixes utilizam as brânquias para excretar peróxidos de hidrogênio diretamente na água (KLEIN et al. 2017). Outro ponto é a utilização do peróxido de hidrogênio pelos fagócitos do organismo na produção de ácidos hipoclorosos, que são oxidantes muito efetivos no combate a vírus, bactérias e outros corpos estranhos (BILLER; TAKAHASHI, 2018). Como as brânquias estão em contato direto com a água, uma resposta mais ativa do sistema imunológico é requerida (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; BILLER; TAKAHASHI, 2018).

Como linha de defesa contra danos oxidativos temos a atuação do ciclo das glutatonas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). A atividade da GR aumentou, somente nos rins, em 6 e 12 h a 31°C, enquanto a G6PDH não variou em nenhum dos tecidos analisados (FIGURA 22). No fígado e brânquias, a baixa variação da GPx pode explicar a não alteração da atividade da GR frente ao aumento de temperatura. Desta forma não houve alta demanda pelo substrato utilizado (GSH), e conseqüentemente não foi gerado GSH oxidado (GSSG), não sendo necessária a atuação da GR para conversão do substrato (KHARE et al., 2019). Em contrapartida, nos rins pode ser observado um aumento de GR em 6 e 12 h, principalmente por aumento de danos oxidativos em até 6 h, indicando uma maior necessidade de produção de GSH para proteção contra estresse térmico (KHARE; CHHAWANI;

KUMARI, 2019).

A GST é um dos principais componentes de defesa antioxidantes enzimáticos da célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Embora a GST seja normalmente descrita como uma excelente defesa contra espécies reativas provenientes de xenobiontes (MAHIM et al. 2021), alguns estudos têm relatado o aumento da enzima em peixes antárticos (KLEIN et al. 2017), tropicais (MADEIRA et al. 2016) e subtropicais (SCHLEGER et al. 2022; RESENDE et al., 2022) submetidos a alta temperatura. Esta relação pode ser explicada pela atuação de enzimas isoformas de GST na redução de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) a álcool enquanto oxidam GSH em GSSG (ROSSI et al. 2017; REGOLI et al. 2011). No fígado de *R. voulezi* o aumento da atividade da GST em 12 e 96 h sugere o aumento da defesa contra possíveis danos oxidativos neste tecido (FIGURA 22). Outra característica importante da GST é sua relação a aclimação do organismo quando exposto de forma prolongada a alta temperatura, pois a sobrevivência a longo prazo sob estresse térmico crônico está associada a uma maior atuação da GST (MAHANTY et al. 2016), o que entra em concordância com nossos dados, principalmente a ativação em 96 h de exposição.

Além das atividades enzimáticas do sistema de defesa antioxidante, existe um sistema não proteico de proteção, o sistema da GSH (NAKANO et al., 2014). Não houve variação nos níveis da GSH no fígado e rins, mesmo com o aumento da atividade da GPx em 6 h no fígado de *R. voulezi* no grupo exposto a 31 °C. Porém nas brânquias os níveis de GSH aumentaram em 24 h e diminuíram em 96 h de exposição a alta temperatura (FIGURA 22). Respostas do organismo a situações de estresse podem alterar os níveis da GSH. Por exemplo, nas brânquias de uma espécie de peixe tropical, *Mudskippers (Boleophthalmus boddarti)* em exposição a amônia, houve uma redução dos níveis de GSH (CHING et al. 2009). Em contrapartida, estudos realizados com exposição a alta temperatura em carpa (*Cyprinus carpio var koi*) apontaram para um aumento da concentração de GSH no músculo (ZUTSHI; SINGH; DASGUPTA, 2020). O tipo de estressor e o tempo de exposição ao estresse vão impactar na resposta da GSH, além da resposta específica do tecido que pode diferenciar os níveis deste biomarcador (MADARO et al., 2015; KIILLERICH et al., 2018).

Situações de estresse térmico de alta temperatura induzem danos oxidativos em espécies de peixes tropicais e subtropicais, e isto acontece pela falha de mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo (DORNELLES ZEBRAL et al. 2019; ROYCHOWDHURY; AFTABUDDIN; PATI, 2021; VINAGRE et al. 2021). Todavia, a

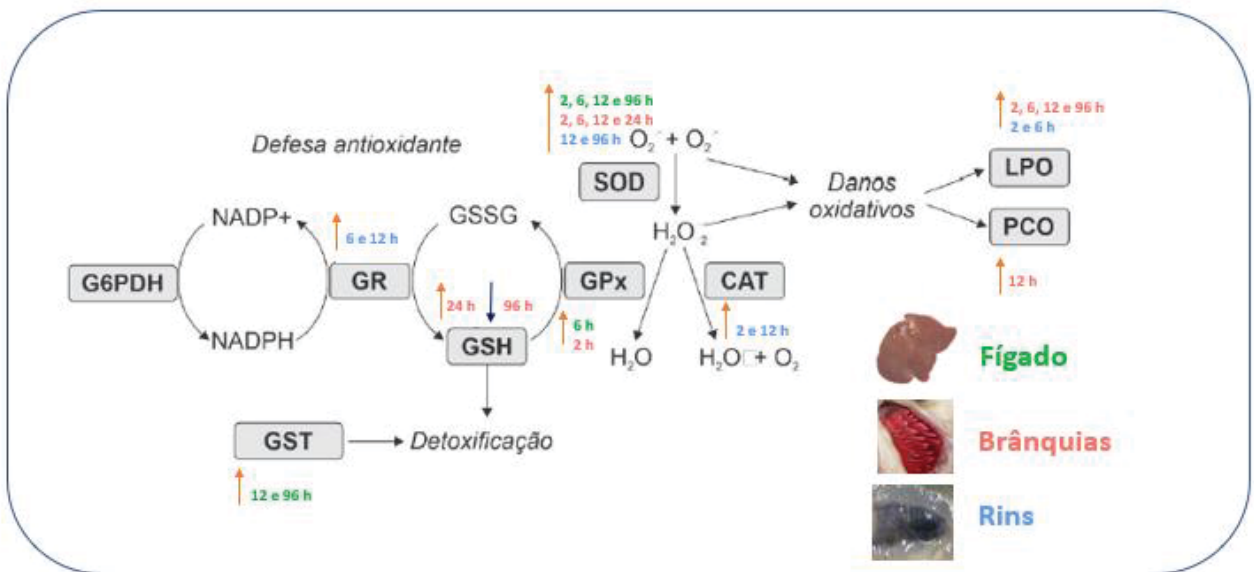
exposição a alta temperatura demonstrou eficácia da resposta da defesa antioxidante no fígado de *R. voulezi*, com ativação da SOD, GPx e GST e sem alterações de PCO e LPO em todos os tempos de exposição. A ausência de danos oxidativos no fígado pode ser relacionado também com a expressão de ubiquitina e ativação do sistema ubiquitina-proteassoma, que tem como função a degradação de moléculas oxidadas (BUCKLEY & SOMERO, 2009; TODGHAM et al., 2007; SHIN et al., 2012). Porém neste trabalho não foi avaliado a ativação deste sistema. Um conhecimento futuro sobre a expressão de ubiquitinas relacionando com o efeito da exposição a alta temperatura elucidaria respostas de ausência de danos oxidativos em peixes subtropicais.

Foi observado a presença de danos oxidativos nos rins de *R. voulezi* em 2 e 6 h de exposição e nas brânquias em todos os horários, com exceção de 24 h de exposição a alta temperatura (FIGURA 22). A presença de danos ocorreu em tempos que não foram ativados mecanismos de defesa antioxidante suficientes, ou quando ativos, no caso de SOD/CAT e SOD/GPx, não atuaram em conjunto. O aumento de LPO nos tempos iniciais são evidências de que a exposição aguda a alta temperatura pode afetar as células, até os mecanismos de defesa antioxidante serem ativos, e conseqüentemente após a ativação, uma recuperação dos produtos da LPO pode ser percebida, retornando aos níveis de controle (RESENDE et al. 2022). Este retorno a níveis de controle foi perceptível nos rins, porém nas brânquias não foi evidenciado.

Estudos realizados em peixes tropicais, por exemplo, Castanheta-das-rochas (*Abudefduf saxatilis*) e Molly Miller (*Scartella cristata*) (MADEIRA et al. 2017) e em Cromo Verde (*Etroplus suratensis*) (JOY et al. 2017) apontaram um aumento da concentração de LPO nas brânquias mesmo com uma resposta ativa da defesa antioxidante (MADEIRA et al. 2017). Outro marcador de danos, a PCO, em 12 h aumentou no grupo exposto a 31 °C. O aumento de EROs e o desequilíbrio das defesas antioxidantes levaram ao aumento da PCO nas brânquias de *S. haraldi* e *S. aequifasciatus* (duas espécies de peixes tropicais) expostos a baixa temperatura (14 °C) por 12 h de exposição (JIN et al., 2021), desta forma, tanto a baixa quanto a alta temperatura pode acarretar danos celulares em peixes. Os resultados aqui descritos apontaram uma redução dos níveis de PCO em 24 e 96 h para níveis normais o que pode indicar uma resposta de reparo de moléculas degradadas por estresse térmico, sendo essencial esse reparo para aclimação do peixe a uma exposição a alta temperatura.

Em relação a defesa antioxidante enzimática nos três tecidos estudados, houve uma relação positiva destes biomarcadores com os marcadores de danos oxidativos. Desta forma o aumento de LPO e PCO provocou um aumento da SOD, CAT, GPx, GR, GST e GSH no fígado, brânquias e rins. Uma relação positiva entre defesa antioxidante e danos oxidativos foi evidenciado por Johannsson et al. (2018) em uma espécie de peixe tropical de água doce (*Cyphocharax abramoides*) em três órgãos (cérebro, fígado e brânquias) em situações de hipóxia. Assim como foi relatado em *Cyphocharax abramoides* em *R. voulezi* o aumento de danos ocasionados pelo estresse oxidativo ativa a resposta da defesa antioxidante, a fim de diminuir danos em biomoléculas e consequentemente evitar maiores danos celular.

Figura 22 – ESQUEMA DA DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVO NO FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS DE *R. voulezi* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA.



Nota: Setas laranja indicam aumento dos biomarcadores em comparação com o controle (21 °C). Seta azul escura indica diminuição do biomarcador em comparação com o controle (21 °C). Letras verdes correspondem ao fígado, letras rosas correspondem as brânquias e letras azuis correspondem aos rins. SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GPx, glutatona peroxidase, GR – glutatona redutase, GST – glutatona S-transferase, GSH – glutatona reduzida, LPO – lipoperoxidação lipídica e PCO – proteínas carboniladas.

4.2 COMPARAÇÃO DOS BIOMARCADORES DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS NO FÍGADO, BRÂNQUIAS E RINS DE *Rhamdia voulezi* EXPOSTOS A ALTA TEMPERATURA

A resposta dos sistemas antioxidantes pode ser diferenciada dependendo do tecido, visto que existem diferenças de disponibilidade e entrega de oxigênio, bem como função metabólica, na localização corpórea e na maquinaria de expressão gênica que pode variar à medida que o estresse térmico progride (PAVLOVIĆ et al., 2010; FALFUSHYNSKA et al., 2014; NAKANO et al. 2014). Essa diferença foi evidenciada nos tecidos de *R. voulezi*, sendo que os biomarcadores avaliados apresentaram especificidade conforme o tecido, sendo o fígado o tecido com maiores atividades da defesa antioxidante enzimáticos conforme apresentado pela PCA (KAMMER et al., 2011; VINAGRE et al., 2014, MADEIRA et al., 2016b, ROSSI et al., 2017). Estudos de efeitos térmicos em peixes feito em diferentes tecidos nas espécies de peixes tropicais *Abudefduf saxatilis* e *Scartella cristata* realizado por Madeira et al. (2017) também demonstraram respostas enzimáticas tecido-específicas. Os autores sugerem que o estresse térmico e oxidativo observado para cada tecido está diretamente relacionado a taxa de difusão de oxigênio e consequente produção de EROs, gerando diferentes sensibilidades e respostas dos biomarcadores enzimáticos.

Em *R. voulezi* os efeitos do estresse térmico de alta temperatura apresentou maiores variações da resposta de defesa antioxidante enzimático no fígado, seguido de brânquias e rins segundo valores de IBR. A maior resposta no fígado da defesa antioxidante pode estar relacionada com a importância deste tecido nas atividades metabólicas, pois danos neste tecido pode afetar diretamente o fornecimento de suprimento energético para os outros tecidos (MADEIRA et al., 2016a). Apesar do fígado ser o órgão mais responsivo ao estresse térmico em *R. voulezi*, foi o tecido que não apresentou variação de danos oxidativos em comparação ao grupo controle. O que reforça ainda mais a hipótese da eficácia do sistema antioxidante neste tecido.

O segundo órgão que mais respondeu ao estresse térmico de alta temperatura em *R. voulezi* foi as brânquias. Por outro lado, foi o tecido que mais apresentou variação dos marcadores de danos oxidativos. Este aumento de danos nas brânquias pode estar diretamente relacionado com a posição corpórea no peixe, já que em contato direto com a água estes tecidos sofre diretamente com as variações de temperatura (MADEIRA et al., 2016a; RESENDE et al. 2022).

Em relação ao aumento de marcadores de danos, os rins de *R. voulezi* também apresentaram danos oxidativo, mas foi o tecido que menos respondeu ao estresse térmico de alta temperatura. Os rins dos peixes têm um papel fundamental na excreção e osmorregulação, além disso é um tecido importante para a resposta ao

estresse, visto que faz parte do eixo hipotálamo-pituitária-intrarrenal (HPI) que possui um papel importante na manutenção das respostas fisiológicas em situações estressantes (YANG et al., 2020). Conseqüentemente a integridade dos rins é importante para a manutenção de respostas contra estresse térmico, motivo este que justifica menores impactos da exposição a alta temperatura.

5 CONCLUSÕES

A exposição aguda a alta temperatura pode determinar a ativação das defesas antioxidantes no fígado, brânquias e rins de *R. voulezi*, bem como ocasionar danos oxidativos. Isto ocorre conforme o tecido apresentar maior contato com a água ou quando não há uma ativação em conjunto do sistema de defesa para evitar danos oxidativos.

A ativação do sistema antioxidante de *R. voulezi* frente a exposição aguda a alta temperatura foi fundamental para uma proteção inicial contra danos oxidativos no fígado, evidenciado pela atividade da SOD, GPx e GST. Os grupos controles e experimentais não diferiram em relação aos marcadores de danos como LPO e PCO, o que demonstra que as vias de proteção da defesa antioxidante foram eficazes no fígado.

A ativação da defesa antioxidante nas brânquias foi evidenciada pela atividade da SOD e GPx, bem como aumento dos níveis de GSH no grupo exposto a alta temperatura. Porém, danos oxidativos foi evidenciado pelos níveis de LPO e PCO, todos em grupos expostos ao estresse térmico de alta temperatura. Estes resultados indicam que, nas brânquias, houve ativação de defesa contra danos ocasionados por EROs, mas não foi eficaz para a proteção deste tecido.

Já nos rins também houve ativação da defesa antioxidante, principalmente do sistema SOD/CAT em exposição aguda a alta temperatura. Foi evidenciado também a presença de danos oxidativos nos tempos iniciais de exposição, por outro lado este tecido apresentou uma capacidade de ajuste fisiológico, pois nos tempos finais não foi observado a presença de danos oxidativos.

O fígado foi o órgão mais responsivo a alta temperatura quando comparado com brânquias e rins. Conseqüentemente, foi o único tecido com ausência de danos oxidativos. Esta ausência de danos pode ser relacionada com a capacidade de homeostase, além da importância fisiológica do fígado, sendo o principal órgão de

metabolismo.

Evidenciamos que a alta temperatura foi capaz de provocar estresse térmico em *R. voulezi*, o que pode prejudicar a longo prazo o desenvolvimento corpóreo, além de impactar o bem-estar do animal.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, P.; FONTES, J.; HOLLAND, K. N. e SANTOS, R. S. Social status determines behaviour and habitat usage in a temperate parrotfish: implications for marine reserve design. **Marine Ecology Progress Series**, v. 359, p. 215-227, 2008. <https://doi.org/10.3354/meps07272>
- ALI, M., A. NICIEZA, & R. J. WOOTTON. Compensatory growth in fishes: a response to growth depression. **Fish and Fisheries**, 4:147–190. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1467-2979.2003.00120.x>
- 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**, 38 (1): 45-55. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12237-014-9792-7>
- ANDREYEV, Y.; KUSHNAREVA, E.; MURPHY, N.; STARKOV, A. Mitochondrial ROS metabolism: 10 years later. **Biochemistry (Mosc)**, 80, pp. 517-531. 2015. <https://doi.org/10.1134/S0006297915050028>
- ANTONOPOULOU, E.; CHATZIGIANNIDOU, I.; FEIDANTISIS, K.; KOUNNA, C.; CHATZIFOTIS, S. Effect of water temperature on cellular stress responses in meagre (*Argyrosomus regius*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 1075–1091. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00773-0>
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, (89) 1: 65-75. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.025>
- BAERENDS, G. P.; BROUWER, R.; WATERBOLK, H. T. Ethological studies on *Lebistes reticulatus* (Peters) 1. An analysis of the male courtship pattern. **Behaviour**, 249-334, 1955. <https://www.jstor.org/stable/4532831>
- BAGNYUKOVA, T. V.; CHAHRAK, O. I.; LUSHCHAK, V. I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, v.78, p.325–331. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.005>
- BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23 °C. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, n. 4, p. 227–234. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.004>
- BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Induction of oxidative stress in *Rana ridibunda* during recovery from winter hibernation. **Journal of Thermal Biology**, v. 28, n. 1, p. 21–28. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0306-4565\(02\)00031-1](https://doi.org/10.1016/S0306-4565(02)00031-1)
- BALDISSEROTTO, B. Fisiologia de Peixes Aplicada à Piscicultura. **UFSM**, Santa Maria, 212p, 2002.

BARREIROS ALBS, DAVID JM and DAVID JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova** 29: 113-123. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>

BARTON, B. A. E DWYER, W. P. Physiological stress effects of continuous- and pulsed-DC electroshock on juvenile bull trout. **J. Fish Biol**, 1997. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb01538.x>

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, p. 517-525, 2002. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>

BATESON, P.; GLUCKMAN, P. Plasticity and robustness in development and evolution. **International Journal of Epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 219-223. 2012. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr240>

BAUMGARTNER G, PAVANELLI CS., BAUMGARTNER D, BIFI AG, DEBONA T, FRANA VA. Peixes do baixo rio Iguaçu. Maringá: **EDUEM**; 203 p. 2012.

BEITINGER, T. L., BENNETT, W. A., MCCAULEY, R. W. Temperature tolerances of North American freshwater fishes exposed to dynamic changes in temperature. **Environmental Biology of Fishes**, 58:237–275. 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1007676325825>

BEITINGER, T., LUTTERSCHMIDT, W. Measures of Thermal Tolerance. **Encyclopedia of Fish Physiology**. 1695-1702. 2011. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00200-8>

BELIAEFF, B., BURGEOT, T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environ. Toxicol. Chem.** 21, 1316–1322. 2002. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210629>

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods. New York. **Grune and Stratton**. 1975.

BILLER, JAQUELINE DALBELLO; TAKAHASHI, LEONARDO S. Oxidative stress and fish immune system: Phagocytosis and leukocyte respiratory burst activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 90, n. 4, p. 3403-3414, 2018. <http://hdl.handle.net/11449/190031>.

BILYK, K.T., VARGAS-CHACOFF, L. & CHENG, C. Evolution in chronic cold: varied loss of cellular response to heat in Antarctic notothenioid fish. **BMC Evol Biol**. 18, 143. 2018. <https://doi.org/10.1186/s12862-018-1254-6>

BION, R., 2022. gggradar: Create radar charts using ggplot2.

BIRNIE-GAUVIN, K., COSTANTINI, D., COOKE, S. J. AND WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. **Fish and Fisheries**, 18(5), pp. 928-942. 2017. <https://doi:10.1111/faf.12215>

- BOECK, G., VLAEMINCK, A., VAN DER LINDEN, A., BLUST, R. The energy metabolism of common carp (*Cyprinus carpio*) when exposed to salt stress: an increase in energy expenditure or effects of starvation? **Physiol. Biochem. Zool.** 73, 102–111. 2015. <https://doi.org/10.1086/316717>
- BOOCKMANN, F. A.; GUAZZELLI, G. M.; REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JUNIOR, C. J. Check list of the freshwater fishes of south and Central America. **EdiPucrs**, p. 331-331, Porto Alegre. 2003.
- BOWDEN, A. J.; GARDINER, N. M.; COUTURIER, C. S.; STECYK, J. A. W.; NILSSON, G. E.; MUNDAY, P. L.; RUMMER, J. L. Alterations in gill structure in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 175, p. 64–71. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.05.011>.
- 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. 211–243, 1964. <https://www.jstor.org/stable/2984418>
- BRAND, M.D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signalling. **Free Radic. Biol. Med.**, 100, pp. 14-31. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.001>
- BRETT J. R. Some Principles in the Thermal Requirements of Fishes. *Q. Rev. Biol.* 31, 75–87. 1956.
- BRETT, J. R. Some principles in the thermal requirements of fishes. **The Quarterly Review of Biology**, 31:75–88. 1956. <https://www.jstor.org/stable/2815121>
- BUCKLEY, B.A., SOMERO, G.N. cDNA microarray analysis reveals the capacity of the cold-adapted Antarctic fish *Trematomus bernacchii* to alter gene expression in response to heat stress. *Polar Biol* 32, 403–415. 2009. <https://doi.org/10.1007/s00300-008-0533-x>
- CALIBRI, 2022. CALculate IBR Interface [WWW Document]. URL <https://shiny.otelo.univ391lorraine.fr/calibri/R/>
- 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. **Ecol. Indic.** 101, 398 533–540. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.051>
- CARLBERG, I., MANNERVIK, B. Glutathione Reductase. **Methods in Enzymology**, 113, 484-490. 1985. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(85\)13062-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(85)13062-4)
- CARVALHO, C.J.B. Padrões de endemismo e a conservação da biodiversidade. **Megadiversidade** 5(1-2): 77-86. 2009.
- CARVETH, C. J., WIDMER, A. M., BONAR, S.A. Comparison of upper thermal tolerances for native and nonnative fish species in Arizona. **Transactions of the American Fisheries Society**, 135:1433–1440. 2006. <https://doi.org/10.1577/T05-025.1>

CASTRO, F. J.; FERNANDES, M. N. Efeitos da infestação por parasitos argulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixes cultivados. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Macapá: **Embrapa Amapá**, p. 361-388, 2009.

CHEN, Y.; LIU, E.; LI, C.; et al. Effects of heat stress on histopathology, antioxidant enzymes, and transcriptomic profiles in gills of pikeperch *Sander lucioperca*. **Aquaculture**, v. 534, p. 736277, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736277>

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

CHENG, C. H.; GUO, Z. X.; YE, C. X.; WANG, A. L. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, non-specific immunity, and antioxidant capacity of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under high temperature stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 209–218, 2018. <https://doi.org/10.1007/s10695-017-0425-5>

CHENG, C. H.; YANG, F. F.; LIAO, S. A.; et al. High temperature induces apoptosis and oxidative stress in pufferfish (*Takifugu obscurus*) blood cells. **Journal of Thermal Biology**, v. 53, p. 172–179. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2015.08.002>

CHING, B.; CHEW, S. F.; WONG, W. P.; IP, Y. K. Environmental ammonia exposure induces oxidative stress in gills and brain of *Boleophthalmus boddarti* (mudskipper). **Aquatic Toxicology**, v. 95, n. 3, p. 203–212. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.09.004>

CHUNG, K. S. Heat resistance and thermal acclimation rate in tropical tetra *Astyanax bimaculatus* of Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, 57(4), 459–463. 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1007696027169>

COLLIN, F. Chemical basis of reactive oxygen species reactivity and involvement in neurodegenerative diseases. **Int. J. Mol. Sci.**, 20, p. 2407. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20102407>

CONTE, F. S. Stress and the welfare of cultured fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 86, p. 205-223, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2004.02.003>

COOKE, S.J., SACK, L., FRANKLIN, C.E., FARRELL, A.P., BEARDALL, J., WIKELSKI, M., CHOWN, S.L. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. **Conservation Physiology** 1. 2013. <https://doi.org/10.1093/conphys/cot001>

COSTA, B. B., & STREIT JR, D. P. Estresse oxidativo e antioxidantes no de sêmen de peixes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

CROUCH RK, GANDY SE, KIMSEY G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**; 35:235-41. 1981. <https://doi.org/10.2337/diab.30.3.235>

CUI, W.; CAO, L.; LIU, J.; et al. Effects of seawater acidification and cadmium on the antioxidant defense of flounder *Paralichthys olivaceus* larvae. **Science of The Total Environment**, v. 718, p. 137234. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137234>

DALZOCHIO, T., RODRIGUES, G. Z. P., PETRY, I. E., GEHLEN, G., SILVA, L. B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **Int Aquat Res**, 8:283– 298. 2016. <https://doi.org/10.1007/s40071-016-0147-9>

DEVIN, S., BURGEOT, T., GIAMBÉRINI, L., MINGUEZ, L., PAIN-DEVIN, S. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. **Environ. Sci. Pollut. Res.** 21, 2448–2454. 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2169-9>

DOENST, T.; NGUYEN, T.D.; ABEL, E.D. Cardiac metabolism in heart failure. **Circ. Res.**, 113, pp. 709-724. 2013. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300376>

DORNELLES ZEBRAL, Y.; ROZA, M.; DA SILVA FONSECA, J.; et al. Waterborne copper is more toxic to the killifish *Poecilia vivipara* in elevated temperatures: Linking oxidative stress in the liver with reduced organismal thermal performance. **Aquatic Toxicology**, v. 209, n. February, p. 142–149. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.005>

FADHLAOU M., COUTURE P. Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). **Aquat. Toxicol.**, 180, pp. 45-55. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>

FAHEEM M., LONE K. P. Oxidative stress and histopathologic biomarkers of exposure to bisphenol-A in the freshwater fish, *Ctenopharyngodon idella*. **Braz. J. Pharm. Sci.** 2017;53(3): e17003. 2017. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902017000317003>

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**, 84: 415-430. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>

FIGUEIREDO-FERNANDES et al. Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 85:97– 103. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.11.001>

FLOHR, B. M.; HUNT, J. R.; KIRKEGAARD, J. A.; EVANS, J. R. Water and temperature stress define the optimal flowering period for wheat in south-eastern Australia. **Field Crops Research**, n. 209, p. 108-119. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.04.012>

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; et al. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 187, n. 8, p. 1137–1154. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1088-3>

GASTON, K.J., CHOWN, S.L., CALOSI, P., et al. Macrophysiology: a conceptual reunification. **American Naturalist** 174: 595–612. 2009. <https://doi.org/10.1086/605982>

GLOCK, G. E.; MCLEAN, P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver. **Biochem. J.**, v.55, p.400–408, 1953. <https://doi.org/10.1042/bj0550400>

GONÇALVES, A. F. N.; SANTOS, E. C. C.; FERNANDES, J. B. K.; e TAKAHASHI, L. S. Mentol e eugenol como substitutos da benzocaína na indução anestésica de juvenis de pacu. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**. v. 30, n. 3, p. 339-344. 2008 <https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v30i3.108110.4025/actascianimsci.v30i3>.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford: Oxford University Press.** 2007. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001>

HOFMANN, G. E., TODGHAM, A. E. Living in the now: Physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. **Annual Review of Physiology**, 72:127- 145. 2010. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021909-135900>

HUTCHISON, V. E. Factors influencing thermal tolerance of individual organisms. In: Esch, G. W and McFarlane R. W. (eds) **Thermal Ecology II**. U.S. National Technical Information Service, Springfield. pp. 10-26. 1976.

ISLAM, J., KUNZMANN, A., MATTHEW, |, SLATER, J. Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. 2021. <https://doi.org/10.1111/jwas.12853>

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

JIA, Y.; CHEN, X.; WANG, Z.; et al. Physiological response of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*. L) during hyperthermal stress. **Aquaculture**, v. 529, p. 735645. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735645>

JIN, S. R. et al. Integrating antioxidant responses and oxidative stress of ornamental discus (*Symphysodon spp.*) to decreased temperatures: Evidence for species-specific thermal resistance. **Aquaculture**, v. 535, p. 736375, 30 mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.736375>

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 6, p. 459–466, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrn2632>

JOHANNSSON, O. E.; GIACOMIN, M.; SADAUSKAS-HENRIQUE, H.; et al. Does hypoxia or different rates of re-oxygenation after hypoxia induce an oxidative stress response in *Cyphocharax abramoides* (Kner 1858), a Characid fish of the Rio Negro? **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 224, p. 53–67. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.019>

JOY, S.; ALIKUNJU, A. P.; JOSE, J.; et al. Oxidative stress and antioxidant defense responses of *Etrophus suratensis* to acute temperature fluctuations. **Journal of Thermal Biology**, v. 70, p. 20–26. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.10.010>

KAMUNDE, C.; SHARAF, M.S.; MACDONALD, N.L. H₂O₂ metabolism in liver and heart mitochondria: low emitting-high scavenging and high emitting-low scavenging systems. **Free Radic. Biol. Med.**, 124, pp. 135-148. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.064>

KASSAMBARA, A. MUNDT, F. Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. R package version 1.0.6. 2019 <https://CRAN.Rproject.org/package=factoextra>.

KEEN J. H., HABIG W. H. & JAKOBY W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. **Journal Biology Chemistry**, 20: 6183-6188. 1976. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)

KHARE A., CHHAWANI N., KUMARI K. Glutathione reductase and catalase as potential biomarkers for synergistic intoxication of pesticides in fish. **Biomarkers**, 24, 666-676.2019. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2019.1651902>

KIILERICH, P., SERVILI, A., PÉRON, S., VALOTAIRE, C., GOARDON, L., LEGUEN, I., & PRUNET, P. Regulation of the corticosteroid signalling system in rainbow trout HPI axis during confinement stress. **General and Comparative Endocrinology**, 258, 184–193. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.08.013>.

KLEIN, R. D.; BORGES, V. D.; ROSA, C. E.; et al. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, v. 68, p. 110–118. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.016>

KLEINHAPPEL T. K., PIKE T. W., & BURMAN O. H. P. Stress-induced changes in group behaviour. **Scientific Reports**, 9(1), 17200. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53661-w>.

KOAKOSKI, G.; OLIVEIRA, T. A.; DA ROSA, J. G. S.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L. C.; E BARCELLOS, L. J. G. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. **Physiology & behavior**, v. 106, n. 2, p. 129-132. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.01.013>

KOEYPUDSA, W., & JONGJAREANJAI, M. Impact of water temperature and sodium chloride (NaCl) on stress indicators of hybrid catfish (*Clarias gariepinus Burchell* x *C. macrocephalus Gunther*). **Songklanakarin Journal of Science & Technology**, v. 33, n. 4, 2011.

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

LENTH, R. V.; BUERKNER, P.; HERVE, M.; et al. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. 2021.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSEROTTO, B.; MORAES, G.; MORSCH, V. M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, 239, 497- 507, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.021>

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, 233: 346–357, 1994. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(94)33040-9)

LI, L., LIU, Z., QUAN, J. et al. Dietary nanoselenium supplementation for heat-stressed rainbow trout: effects on organizational structure, lipid changes, and biochemical parameters as well as heat-shock-protein- and selenoprotein-related gene expression. **Fish Physiol Biochem** 48, 707–722. 2022. <https://doi.org/10.1007/s10695-022-01084-2>

LIPPE G., COLUCCINO, G.; ZANCANI, M.; BARATTA, W.; CRUSIZ, P. Mitochondrial F-ATP synthase and its transition into an energy-dissipating molecular machine. **Oxid. Med. Cell Longev**. p. 8743257. 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8743257>

LOWE, D.T. Nitric oxide dysfunction in the pathophysiology of pré-eclâmpsia. **Nitric Oxide** 4: 441-458, 2000. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0296>

LU, Y., WU, Z., SONG, Z., XIAO, P., LIU, Y., ZHANG, P., YOU, F. Insight into the heat resistance of fish via blood: Effects of heat stress on metabolism, oxidative stress and antioxidant response of olive flounder *Paralichthys olivaceus* and turbot *Scophthalmus maximus*. **Fish & Shellfish Immunology**, 58: 125-135. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.008>

LUO S., HUANG Y., XIE F., HUANG X., LIU Y., WANG W., QIN Q. Molecular cloning, characterization and expression analysis of PPAR gamma in the orangespotted grouper (*Epinephelus coioides*) after the *Vibrio alginolyticus* challenge. **Fish. Shellfish Immunol.** 43 (2), 310–324. 2015a. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.003>

LUSHCHAK VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquat Toxicol**, 101:13–30. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

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**, 143(1), 36–41. 2006a <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.018>

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 30–35. 2006a. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.017>

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 36–41, 2006b. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.018>

MADARO, A., OLSEN, R. E., KRISTIANSEN, T. S., EBBESSON, L. O. E., NILSEN, T. O., FLIK, G., & GORISSEN, M. Stress in Atlantic salmon: Response to unpredictable chronic stress. **Journal of Experimental Biology**, jeb.120535. 2015. <https://doi.org/10.1242/jeb.120535>.

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

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**, 163(4), 91. 2016a. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2856-4>.

MADEIRA, D., NARCISO, L., CABRAL, H. N., VINAGRE, C., & DINIZ, M. S. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. **Comparative Biochemistry and Physiology—A Molecular and Integrative Physiology**, 166, 237–243. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.008>.

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**, 63, 324–331. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.008>

MAGDER, S. "Reactive oxygen species: toxic molecules or spark of life?" **Critical Care**, 10, 208. 2006. <https://doi.org/10.1186/cc3992>

MAHANTY, A.; PUROHIT, G. K.; BANERJEE, S.; et al. Proteomic changes in the liver of *Channa striatus* in response to high temperature stress. **Electrophoresis**, v. 37, n. 12, p. 1704–1717. 2016. <https://doi.org/10.1002/elps.201500393>

MAHIM SS; ANJALI VR; RESHMI S; DEVI CA. Oxidative stress responses of a freshwater fish, *Labeo rohita*, to a xenobiotic, bisphenol S. **J Biochem Mol Toxicol**. 2021;35: e22820. 2021. <https://doi.org/10.1002/jbt.22820>

MAILLOUX, R.J. An update on mitochondrial reactive oxygen species production. **Antioxidants**. 9, p. 472. 2020. <https://doi.org/10.3390/antiox9060472>

MAILLOUX, R.J. Mitochondrial antioxidants and the maintenance of cellular hydrogen peroxide levels. **Oxid. Med. Cell Longev**. p. 7857251. 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7857251>

MARTELL, D.J.; KIEFFER, J.D.; TRIPPEL, E. A. Effects of temperature during early life history on embryonic and larval development and growth in haddock. **J. Fish Biol.**, 66: 1558-1575. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00699.x>

MARTÍNEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T.; HERRÁEZ, M.P.; SARASQUETE, C.; CABRITA, E. Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. **Theriogenology**, (77), 6: 1129-1136. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.017>

MUNRO, D.; TREBERG, J.R. A radical shift in perspective: mitochondria as regulators

of reactive oxygen species. **J. Exp. Biol.**, 220, pp. 1170-1180. 2017. <https://doi.org/10.1242/jeb.132142>

NAKANO, T.; KAMEDA, M.; SHOJI, Y.; et al. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 772–776. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.05.007>

NEWTON, J. R.; SANTIS, C. D.; JERRY, D. R. The gene expression response of the catadromous perciform barramundi *Lates calcarifer* to an acute heat stress. **Journal of Fish Biology**, v. 81, n. 1, p. 81–93. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03310.x>

NICHOLLS, D.G., FERGUSON, S.J. Bioenergetics 4. **Respiratory Chains**. 4th edition. P 91–157. 2013.

OLIVOTO, T., & LÚCIO, A. D. METAN: An R package for multi-environment trial analysis. **Methods in Ecology and Evolution**, 11, 783–789. 2020. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13384>.

PANKHURST, N. W. Reproduction and development. In **FISH PHYSIOLOGY**, v. 35, p. 295-331, Academic Press, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00008-4>

PARIHAR MS, DUBEY AK. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. **Comp Biochem Physiol C** 112:309–313. 1995. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(95\)02025-X](https://doi.org/10.1016/0742-8413(95)02025-X)

PEOPLES, J.N.; SARAF, A.; GHAZAL, N. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. **Exp. Mol. Med.**, 51, pp. 1-13. 2019. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7>

PÖRTNER, H.O., PECK, M.A. Climate change effects on fishes and fisheries: Towards a cause-and-effect understanding. **J. Fish Biol.** 77, 1745–1779. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2010.02783.x>

PRZEPIURA, T. DE C. S.; HERRERIAS, T.; KANDALSKI, P. K.; et al. Metabolic responses in Antarctic *Nototheniidae* brains subjected to thermal stress. **Brain Research**, v. 1708, p. 126–137, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.004>

RAMA S., MANJABHAT S.N. Protective effect of shrimp carotenoids against ammonia stress in common carp, *Cyprinus carpio*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 107, pp. 207-213. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.06.016>

REGOLI F, GIULIANI ME, BENEDETTI M, ARUKWE A. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: a comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. **Aquat Toxicol** 105(3–4):56–66. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.06.014>

RESENDE, A. C.; MAURO, D.; PEREIRA, C.; et al. Effects of heat shock on energy metabolism and antioxidant defence in a tropical fish species *Psalidodon bifasciatus*. **J Fish Biol.**, 100(5):1245-1263. 2022. <https://doi.org/10.1111/jfb.15036>

REZENDE, E. L., CASTAÑEDA, L. E., SANTOS, M. Tolerance landscapes in thermal ecology. **Functional Ecology**, 28:799–809. 2014. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12268>

RIPLEY, B.; VENABLES, B.; BATES, D. M.; et al. MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS. 2021.

RODNICK, K. J., & PLANAS, J. V. The stress and stress mitigation effects of exercise: cardiovascular, metabolic, and skeletal muscle adjustments. **In FISH PHYSIOLOGY**, v. 35, p. 251-294. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00007-2>

RODNICK, K. J.; GAMPERL, A. K.; LIZARS, K. R.; et al. Thermal tolerance and metabolic physiology among redband trout populations in south-eastern Oregon. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 2, p. 310–335, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2004.00292.x>

ROSSI, A., BACCHETTA, C., & CAZENAVE, J. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). **Ecological Indicators**, 79, 361–370. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.042>.

ROSSO, F. L.; BOLNER, K. C. S.; BALDISSEROTTO, B. Ion fluxes in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 4, p. 435–440, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252006000400007>

ROYCHOWDHURY, P.; AFTABUDDIN, M.; PATI, M. K. Thermal stress–induced oxidative damages in the liver and associated death in fish, *Labeo rohita*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 21–32. 2021. <https://doi.org/10.1007/s10695-020-00880-y>

SADOUL, B.; VIJAYAN, M. M. Stress and growth. **In FISH PHYSIOLOGY**, v. 35, p. 167-205. Academic Press, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00005-9>

SCHAEFER, J.; RYAN, A. Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*. **Journal of Fish Biology**, v. 69, n. 3, p. 722–734. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01145.x>

SCHLEGER, I. C.; PEREIRA, D. M. C.; RESENDE, A. C.; et al. Cold and warm waters: energy metabolism and antioxidant defenses of the freshwater fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) under thermal stress. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 192, n. 1, p. 77–94. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01409-2>

SCHRECK, C. B.; OLLA, B. L.; DAVIS, M. W. Behavioral responses to stress. In: IWANA, G.K., PICKERING, A.D. SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B. (eds) FISH

STRESS AND HEALTH IN AQUACULTURE. **Society for Experimental Biology**, Seminar Series 62, Cambridge: Cambridge University Press. p.145-170, 1997.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. **Fish Physiology**. v. 35, p.1–34. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1>

SCHULTE, P.M. Effects of Temperature: An Introduction. In: Farrell, A. P. (ed.) **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. Academic Press, San Diego, CA. Pp. 1688-1694. 2011.

SELYE, H. Thymus and Adrenals in the response of the Organism to Injuries and Intoxications. **The British Journal of Experimental Pathology**. v. 17, n. 3, p.234– 248, 1936.

SHIN SC, KIM SJ, LEE JK, AHN DH, KIM MG, LEE H, LEE J, KIM BK, PARK H. Transcriptomics and comparative analysis of three Antarctic Notothenioid fishes. **PLoS One**, 7, 1-9. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043762>

SHRIVASTAVA, J., SINHA, A.K., CANNAERTS, S., BLUST, R., DE BOECK, G. Temporal assessment of metabolic rate, ammonia dynamics and ion-status in common carp during fasting: a promising approach for optimizing fasting episode prior to fish transportation. **Aquaculture**, 481, 218–228. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.008>

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biol.**, 4, pp. 180-183. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002>

SILVA R. M.; GOULART C. T.; GUIDO L. A. Evolução histórica do conceito de estresse. **Rev. Cient. Sena Aires**. v. 7, n. 2, p. 148-156, 2018.

SILVEIRA, T.L.R., MARTINS, G.B., DOMINGUES, W.B., REMIÃO, M.H., et al. Gene and blood analysis reveal that transfer from brackish water to freshwater is less stressful to the silverside *Odontesthes humensis*. **Front. Genet.** 9, 28. 2018. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00028>

SOMERO, G. N. Linking biogeography to physiology: evolutionary and acclimatory adjustments of thermal limits. **Frontiers in Zoology** 2:1-9. 2005. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-2-1>

SOMERO, G.N. Proteins and temperature. **Annual Review of Physiology**. 57:43-68. 1995. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.57.030195.000355>

SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M. R.; O'CONNOR, C. M.; CORY, D. S.; COOKE, S. J. Stress indicators in fish. Biology of Stress in Fish. **Fish Physiology**, 35: 405-462. 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4>

SPICER, J.I., MORLEY, S.A., BOZINOVIC, F. Physiological diversity, biodiversity patterns and global climate change: Testing key hypotheses involving temperature and oxygen. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.** 374, 8–11. 2019. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0032>

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899: 191–208. 2000. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>

STOLIAR O.B.; LUSHCHAK V.I. Environmental Pollution and Oxidative Stress in Fish, Oxidative Stress - Environmental Induction and Dietary Antioxidants, Volodymyr I. Lushchak, IntechOpen. 2012.

TODGHAM, AE, HOAGLUND, EA & HOFMANN, GE. Is cold the new hot? Elevated ubiquitin-conjugated protein levels in tissues of Antarctic fish as evidence for cold-denaturation of proteins in vivo. *J Comp Physiol B* **177**, 857–866 (2007). <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0183-2>

TREBERG, J.R.; BRAUN, K.; ZACHARIAS, P.; KROEKER, K. Multidimensional mitochondrial energetics: application to the study of electron leak and hydrogen peroxide metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, 224 (2018), pp. 121-128. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2017.12.013>

TSENG YC, LEE JR, CHANG JCH, KUO CH, LEE SJ, HWANG PP. Regulation of lactate dehydrogenase in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) gills during acclimation to salinity challenge. *Zool Stud* 47:473–480. 2008.

VAN DER VYVER, J.S.F., KAISER, H., POTTS, W.M., JAMES, N. Using blood plasma cortisol concentration and fish behaviour to determine temperature avoidance in the estuarine-dependent fish species *Rhabdosargus holubi* (steindachner,1881) (sparidae). *J. Appl. Ichthyol.* 29: 1275–1278. 2013. <https://doi.org/10.1111/jai.12268>

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

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; MENDONÇA, V.; MADEIRA, C.; DINIZ, M. S. Warming in shallow waters: Seasonal response of stress biomarkers in a tide pool fish. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, v. 251. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2021.107187>

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; NARCISO, L., CABRAL, H. N. DINIZ, M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23: 274–279. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.009>

WEI T, SIMKO V. R package 'corrplot': Visualization of a Correlation Matrix. (Version 0.92). 2021. <https://github.com/taiyun/corrplot>.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77:325-333. 1981. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0)

WHITNEY, J.E., AL-CHOKHACHY, R., BUNNELL, D.B., CALDWELL, C.A., COOKE, S.J., ELIASON, E.J., ROGERS, M., LYNCH, A.J., PAUKERT, C.P. Bases physiologiques des impacts des changements climatiques sur les poissons

continentaux d'Amérique du Nord. **Fisheries** 41, 332–345. 2016. <https://doi.org/10.1080/03632415.2016.1186656>

WICKHAM, H.; CHANG, W.; HENRY, L.; et al. ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. 2021.

WILLMER, P., STONE, G., JOHNSTON, I. Environmental physiology of animals. Second edition. **Blackwell Science**, Oxford, U.K. 754 p. 2005

YADA, T., & TORT, L. Stress and disease resistance: immune system and immunoendocrine interactions. In **FISH PHYSIOLOGY**, Academic Press, v. 35, p. 365-403, 2016. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00010-2>

YANG, S., ZHAO, T., MA, A., HUANG, Z., LIU, Z., CUI, W., ZHANG, J., ZHU, C., GUO, X., & YUAN, C. Metabolic responses in *Scophthalmus maximus* kidney subjected to thermal stress. **Fish & Shellfish Immunology**, 103, 37–46. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.04.003>

YU, H.; DENG, W.; ZHANG, D.; et al. Antioxidant defenses of *Onychostoma macrolepis* in response to thermal stress: Insight from mRNA expression and activity of superoxide dismutase and catalase. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 66, p. 50–61. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.04.027>

ZHOU, B.; RONG, J. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure. **Clin. Invest.**, 128, pp. 3716-3726. 2018. <https://doi.org/10.1172/JCI120849>

ZOCCARATO, F.; CAVALLINI, L.; ALEXANDRE, A. Respiration-dependent removal of exogenous H₂O₂ in brain mitochondria: inhibition by Ca²⁺. **J. Biol. Chem.**, 279, pp. 4166-4174. 2004. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308143200>

ZUTSHI, B., SINGH, A. & DASGUPTA, P. Impact of transient temperature disturbance on the oxidative stress indices and glucose levels of juvenile Koi carps (*Cyprinus carpio var koi*). **JoBAZ** 81, 4. 2020. <https://doi.org/10.1186/s41936-020-0142-y>

Apêndice 1 – Tabelas de médias e erro padrão das médias dos três tecidos avaliados.

TABELA 4: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE *Rhamdia voulezi*, A UMA TEMPERATURA DE 31 °C (CONTROLE A 21 °C), DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS.

	T(°C)	2h	6h	12h	24h	96h
SOD	21	77,52±7,9 ^a	66,74±2,7 ^{ab}	58,53±5,4 ^{ab}	63,03±7,0 ^{ab}	48,79±5,0 ^b
	31	145,57±7,2 ^{a*}	132,65±11,7 ^{a*}	155,10±14,4 ^{a*}	67,57±8,2 ^b	81,92±3,4 ^{b*}
CAT	21	2,1±0,3	2,6±0,5	2,9±0,6	2,4±0,6	2,6±0,4
	31	2,7±0,4	2,5±0,4	2,8±0,5	2,8±0,6	2,0±0,2
GPx	21	0,2±0,01 ^a	1,0±0,21 ^b	0,7±0,14 ^{ab}	0,3±0,05 ^a	1,1±0,24 ^b
	31	0,6±0,27 ^a	1,6±0,04 ^{b*}	0,5±0,14 ^a	0,5±0,11 ^a	0,6±0,11 ^a
GR	21	0,4±0,07 ^a	0,6±0,08 ^b	0,5±0,09 ^{ab}	0,5±0,1 ^a	0,5±0,08 ^{ab}
	31	0,4±0,09 ^a	0,7±0,06 ^b	0,5±0,07 ^{ab}	0,4±0,08 ^a	0,5±0,05 ^{ab}
G6PDH	21	0,8±0,29	1,0±0,2	1,4±0,34	1,2±0,44	1,8±0,4
	31	1,0±0,42	1,4±0,65	0,9±0,32	1,1±0,66	1,0±0,29
GST	21	1,5±0,02 ^a	1,5±0,07 ^a	1,3±0,03 ^{ab}	1,2±0,1 ^{ab}	0,9±0,09 ^b
	31	1,8±0,07 ^a	1,8±0,18 ^a	1,8±0,11 ^{a*}	1,2±0,22 ^b	1,5±0,2 ^{ab*}
GSH	21	5,49±0,81 ^{ab}	6,32±1,0 ^b	4,42±0,41 ^{ab}	4,24±0,98 ^a	4,39±0,69 ^a
	31	3,62±0,29 ^{ab}	6,37±0,97 ^b	3,8±0,44 ^{ab}	2,99±0,77 ^a	2,74±0,26 ^a
LPO	21	1,02±0,38 ^{bc}	1,02±0,34 ^c	0,7±0,24 ^{ac}	0,41±0,24 ^a	0,52±0,15 ^{ab}
	31	1,15±0,52 ^{bc}	1,31±0,58 ^c	0,53±0,13 ^{ac}	0,15±0,02 ^a	0,25±0,07 ^{ab}
PCO	21	5,64±1,38 ^d	4,82±0,55 ^{cd}	3,62±0,21 ^{bc}	1,31±0,25 ^a	3,46±0,35 ^b
	31	6,21±0,88 ^d	4,86±0,52 ^{cd}	3,25±0,5 ^{bc}	2,1±0,31 ^a	3,38±0,52 ^b

Nota: Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. Os valores de SOD são expressos em U/mg de proteína. Os valores de GPx e GST são expressos em dU/mg de proteína. Os valores de GR são expressos em mU/mg de proteína. Os valores de G6PDH são expressos em cU/mg de proteína. Os valores de GSH são expressos em nmols de tióis/mg de proteína. Os valores LPO são expressos em μmols de MDA/mg de proteína. Os valores de PCO são expressos em nmols de carbonílas/mg de proteína. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre 21 °C (controle) e 31 °C (tratamento) (p ≤ 0,05). As letras indicam diferenças nos valores médios entre os tempos de exposição. Fonte: O autor.

Tabela 5: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NAS BRÂNKUIAS DE *Rhamdia voulezi*, A UMA TEMPERATURA DE 31 °C (CONTROLE A 21 °C), DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS.

	T(°C)	2h	6h	12h	24h	96h
SOD	21	47,23±5,76 ^b	28,37±4,63 ^a	23,30±1,57 ^a	22,29±2,46 ^a	21,11±2,34 ^a
	31	75,28±11,67 ^{b*}	75,33±9,48 ^{b*}	41,50±3,38 ^{a*}	79,82±3,87 ^{b*}	22,97±1,58 ^c
CAT	21	1,02±0,07	1,2±0,18	1,59±0,11	1,34±0,2	1,23±0,16
	31	1,54±0,27	1,62±0,08	1,5±0,07	1,91±0,18	1,41±0,13
GPx	21	0,55±0,2 ^c	0,95±0,07 ^{ab}	0,87±0,07 ^a	1,27±0,09 ^b	0,73±0,06 ^{ac}
	31	0,99±0,34 ^{a*}	0,86±0,08 ^a	0,84±0,06 ^a	0,99±0,1 ^a	0,80±0,05 ^a
GR	21	0,1±0,02 ^c	0,09±0,01 ^c	0,11±0,01 ^c	0,03±0,01 ^a	0,04±0,01 ^b
	31	0,12±0,03 ^c	0,1±0,01 ^c	0,13±0,02 ^c	0,03±0,01 ^a	0,06±0,01 ^b
G6PDH	21	0,55±0,16 ^b	0,68±0,11 ^{ab}	0,59±0,07 ^{ab}	0,47±0,08 ^a	0,59±0,07 ^{ab}
	31	1,13±0,29 ^b	0,68±0,13 ^{ab}	0,62±0,07 ^{ab}	0,45±0,09 ^a	0,59±0,07 ^{ab}
GST	21	0,30±0,02 ^b	0,36±0,04 ^b	0,30±0,01 ^{ab}	0,32±0,03 ^{ab}	0,30±0,03 ^a
	31	0,43±0,02 ^b	0,43±0,04 ^b	0,33±0,04 ^{ab}	0,30±0,03 ^{ab}	0,23±0,02 ^a
GSH	21	5,82±1,15 ^b	3,93±0,55 ^{ab}	3,05±0,41 ^a	2,55±0,27 ^a	3,21±0,43 ^{a*}
	31	4,75±0,52 ^a	4,37±0,29 ^a	3,63±0,63 ^a	4,59±0,54 ^{a*}	1,77±0,17 ^b
LPO	21	0,23±0,02 ^a	0,27±0,13 ^a	0,26±0,04 ^a	0,23±0,03 ^a	0,17±0,03 ^a
	31	1,3±0,16 ^{bc*}	1,39±0,08 ^{c*}	0,68±0,10 ^{ab*}	0,52±0,18 ^a	0,77±0,14 ^{ab*}
PCO	21	3,98±0,15 ^{ab}	4,43±0,43 ^{ab}	5,85±0,53 ^a	3,98±0,32 ^{ab}	2,82±0,50 ^b
	31	3,10±1,03 ^b	5,96±0,84 ^c	12,72±0,76 ^{a*}	4,46±0,44 ^{bc}	3,2±0,40 ^b

Nota: Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. Os valores de SOD são expressos em U/mg de proteína. Os valores de CAT, GPx, G6PDH e GST são expressos em cU/mg de proteína. Os valores de GR são expressos em mU/mg de proteína. Os valores de GSH são expressos em nmols de tióis/mg de proteína. Os valores de LPO são expressos em μmols de MDA/mg de proteína. Os valores de PCO são expressos em nmols de carbonilas/mg de proteína. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre 21 °C (controle) e 31 °C (tratamento) (p ≤ 0,05). As letras indicam diferenças nos valores médios entre os tempos de exposição. Fonte: O autor.

TABELA 6: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NOS RINS DE *Rhamdia voulezi*, A UMA TEMPERATURA DE 31 °C (CONTROLE A 21 °C), DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS.

	T(°C)	2h	6h	12h	24h	96h
SOD	21	25,57±1,46 ^{ab}	52,61±9,13 ^b	37,17±6,82 ^{ab}	28,31±4,85 ^a	19,56±2,28 ^a
	31	45,45±1,06 ^{ab}	61,68±3,04 ^a	70,23±8,36 ^{a*}	27,66±4,46 ^b	81,04±9,46 ^{a*}
CAT	21	1,38±0,11 ^{ab}	2,65±0,17 ^b	2,92±0,23 ^{ab}	3,10±0,25 ^a	3,01±0,37 ^a
	31	3,55±0,18 ^{ab*}	2,63±0,37 ^a	3,89±0,23 ^{a*}	3,38±0,51 ^b	2,94±0,28 ^a
GPx	21	3,32±0,13 ^{ab}	4,42±0,19 ^{ab}	4,79±0,36 ^b	3,89±0,26 ^{ab}	3,86±0,34 ^a
	31	5,15±0,33 ^{ab}	4,59±0,46 ^{ab}	5,71±0,39 ^b	5,09±0,44 ^{ab}	3,45±0,94 ^a
GR	21	0,51±0,07 ^a	0,45±0,07 ^a	1,06±0,34 ^a	0,44±0,06 ^a	0,74±0,25 ^a
	31	0,76±0,48 ^{bc}	1,1±0,19 ^{ac*}	2,53±0,44 ^{a*}	0,32±0,04 ^b	0,38±0,01 ^{bc}
G6PDH	21	1,94±0,39 ^b	1,97±0,45 ^b	1,69±0,14 ^b	1,05±0,16 ^a	1,49±0,28 ^{ab}
	31	2,39±0,34 ^b	2,33±0,18 ^b	2,65±0,44 ^b	1,21±0,10 ^a	2,18±0,06 ^{ab}
GST	21	4,54±0,02	4,27±0,04	4,47±0,01	4,22±0,03	3,82±0,03
	31	4,63±0,02	4,70±0,04	4,52±0,04	4,78±0,03	3,55±0,02
GSH	21	3,94±0,50 ^{ab}	4,63±1,3 ^b	4,67±0,63 ^{ab}	3,08±0,33 ^a	2,87±0,30 ^{ab}
	31	6,49±0,17 ^{ab}	5,81±0,46 ^b	4,23±0,58 ^{ab}	3,80±0,52 ^a	5,07±0,02 ^{ab}
LPO	21	0,37±0,01 ^a	0,35±0,05 ^a	0,33±0,05 ^{ab}	0,20±0,03 ^{ab}	0,17±0,01 ^b
	31	1,08±0,02 ^{b*}	1,10±0,14 ^{b*}	0,39±0,11 ^a	0,25±0,05 ^a	0,27±0,02 ^a
PCO	21	1,28±0,36 ^{ab}	0,36±0,20 ^a	1,86±0,35 ^b	0,85±0,14 ^a	1,29±0,35 ^{ab}
	31	1,37±0,14 ^{ab}	1,19±0,30 ^a	1,93±0,34 ^b	0,94±0,19 ^a	1,87±0,01 ^{ab}

Nota: Os dados são apresentados como média ± erro padrão da média. Os valores de SOD são expressos em U/mg de proteína. Os valores CAT e G6PDH são expressos em $\mu\text{U/mg}$ de proteína. Os valores de GPx, GR e GST são expressos em mU/mg de proteína. Os valores de GSH são expressos em nmols de tióis/mg de proteína. Os valores LPO são expressos em $\mu\text{mols de MDA/mg}$ de proteína. Os valores de PCO são expressos em $\text{nmols de carbonílas/mg}$ de proteína. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre 21 °C (controle) e 31 °C (tratamento) ($p \leq 0,05$). As letras indicam diferenças nos valores médios entre os tempos de exposição. Fonte: O autor.