

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA PAULA NASCIMENTO CORRÊA

O CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA ALTERA AS DEFESAS
ANTIOXIDANTES NO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE PSALIDODON
BIFASCIATUS (GARAVELLO & SAMPAIO, 2010)?

CURITIBA

2022

ANA PAULA NASCIMENTO CORRÊA

O CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA ALTERA AS DEFESAS
ANTIOXIDANTES NO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE PSALIDODON
BIFASCIATUS (GARAVELLO & SAMPAIO, 2010)?

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

CURITIBA

2022



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

Corrêa, Ana Paula Nascimento

O choque térmico de alta temperatura altera as defesas antioxidantes no encéfalo, músculo e coração de *Psalidodon bifasciatus* (Garavello & Sampaio, 2010)?/ Ana Paula Nascimento Corrêa. – 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.

1. Peixes. 2. Estresse oxidativo. 3. Temperatura – Efeito fisiológico. 4. Biomarcadores. I. Donatti, Lucélia, 1964-. II. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. III. Título.

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 **ANA PAULA NASCIMENTO CORRÊA** intitulada: **O choque térmico de alta temperatura altera as defesas antioxidantes no encéfalo, músculo e coração de *Psilododon bifasciatus* (GARAVELLO & SAMPAIO, 2010)?**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 25 de Agosto de 2022.

Assinatura Eletrônica

29/08/2022 13:58:24.0

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

29/08/2022 11:16:28.0

TATIANA HERRERIAS

Avaliador Externo (CENTRO UNIVERSITÁRIO GUAIRACÁ)

Assinatura Eletrônica

29/08/2022 14:31:09.0

KATYA NALIWAIKO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço também ao CNPq pelo recurso financeiro utilizado para a compra de materiais, possibilitando as análises laboratoriais.

Agradeço imensamente a minha família pelo apoio que me deram durante toda a minha vida e principalmente nestes últimos anos. Aos meus amados pais Sebastião e Nadir por toda paciência, dedicação e por sempre me incentivar a estudar e me dedicar aos meus sonhos.

Agradeço a minha querida orientadora Lucélia Donatti, por sua paciência, dedicação e por todos os ensinamentos.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório, Niumaique, Jonathan, Diego Ortiz e Ananda. Sem vocês não seria possível realizar esse trabalho, vocês são especiais e alegraram demais meus dias.

Agradeço ao Niumaique, Jonathan e Diego por todo ensinamento que me passaram, obrigado por acreditarem em mim e por me ensinarem estatística e mapas com tanta paciência, amo vocês.

Agradeço a minha amiga Lucimara, que por diversas vezes escutou meus desabafos, e por ser a pessoa que sempre esteve disposta a me ajudar quando a desilusão e as dificuldades apareceram.

Agradeço a minha cachorrinha Pandora pela companhia diária e por me transmitir paz e esperança.

Agradeço a Ieda Cristina Schleger por realizar o experimento que forneceu o material para realização do meu trabalho e ao Diego Mauro Carneiro Pereira por todo os ensinamentos estatísticos que possibilitaram esse trabalho. A ambos agradeço por me ensinar as técnicas laboratoriais essenciais para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, pelo apoio ao nosso laboratório. E pelos momentos de descontração, conversando, tomando um café ou uma cerveja.

Agradeço a Maria Rosa Dememgeon Pedreiro, pela dedicação a este trabalho.

Agradeço aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação (PPGECO) por transmitirem tanto conhecimento mesmo com as adversidades oriundas da pandemia.

Agradeço aos meus antigos professores da graduação, principalmente Raul Rennó Braga e Rafael Baggio, que tanto me ensinaram, incentivaram e inspiraram.





“Aqueles que se sentem satisfeitos sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos são os únicos benfeitores do mundo.”

Walter S. Landor

RESUMO

Psalidodon bifasciatus é uma espécie de peixe que possui ampla distribuição geográfica apresentando boa adaptação a diferentes habitats. Por ser sensível as alterações físicas e químicas da água, torna-se um bom bioindicador das diferenças de temperatura do ambiente aquático, sendo utilizada em estudos ecotoxicológicos. Assim, este estudo propôs avaliar os biomarcadores relacionados a defesa antioxidante do coração, encéfalo e músculo de *P. bifasciatus* expostos a variação térmica de 10°C em relação ao controle. Exemplares de *P. bifasciatus* (n=120) foram coletados na região do médio Iguaçu no município de União da Vitória-PR e Porto Vitória-PR, e mantidos no Centro de Pesquisa e Extensão em Aquicultura Ildo Zago União da Vitória-PR. Após o período de aclimação, os peixes foram divididos em grupo (n= 12 indivíduos) controle (21°C) e submetidos ao choque térmico de 31°C por 2, 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Os biomarcadores relacionados a defesa antioxidante: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reduzida (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutathione reduzida (GSH), juntamente com os marcadores de dano celular: lipoperoxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO), foram quantificados e submetidos ao teste estatístico (ANOVA). Os resultados demonstraram que o aumento de 10°C na temperatura foi capaz de causar estresse oxidativo no coração, encéfalo e músculo de *P. bifasciatus*. Isso foi demonstrado pelos níveis alterados de LPO, PCO e GPx no coração, CAT e LPO no encéfalo e LPO no músculo. Além disso, as análises de PCA e IBR indicaram que o encéfalo apresentou maior ativação das respostas antioxidantes expostos ao choque térmico quando comparado com coração e músculo. O que conclui que *P. bifasciatus* possui estratégias para lidar com o choque térmico de 31°C por curtos períodos de tempo (até 48h), ajustando seu sistema de defesa antioxidante.

Palavras-chave: peixes subtropicais, estresse térmico, defesa antioxidante, lambari do-rabo-vermelho.

ABSTRACT

Psalidodon bifasciatus is a species of fish that has a wide geographic distribution showing good adaptation to different habitats. Because it is sensitive to physical and chemical water changes, it is a good bioindicator of temperature differences in the aquatic environment, being used in ecotoxicological studies. Thus, this study proposed to evaluate the biomarkers related to antioxidant defense in the heart, brain and muscle of *P. bifasciatus* exposed to 10°C thermal variation in relation to the control. *P. bifasciatus* specimens (n=120) were collected from the middle Iguaçu region in União da Vitória-PR and Porto Vitória-PR, and kept in the Ildo Zago Aquaculture Research and Extension Center in União da Vitória-PR. After the acclimation period, the fishes were divided into groups (n=12 individuals) control (21°C) and submitted to heat shock of 31°C for 2, 6, 12, 24 and 48 hours, respectively. The biomarkers related to antioxidant defense: catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), reduced glutathione (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and reduced glutathione (GSH), along with cell damage markers: lipoperoxidation (LPO) and protein carbonylation (PCO), were quantified and subjected to statistical test (ANOVA). The results showed that the 10°C increase in temperature was able to cause oxidative stress in heart, brain and muscle of *P. bifasciatus*. This was demonstrated by altered levels of LPO, PCO and GPx in heart, CAT and LPO in brain and LPO in muscle. Furthermore, PCA and IBR analyses indicated that the brain showed greater activation of antioxidant responses exposed to heat shock when compared to heart and muscle. Which concludes that *P. bifasciatus* has strategies to cope with the heat shock of 31°C for short periods of time (up to 48h), adjusting its antioxidant defense system.

Keywords: subtropical fish, heat stress, antioxidant defense, red-tailed lambari.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS	16
FIGURA 2. MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DE <i>PSALIDODON BIFASCIATUS</i> NO BRASIL.....	18
FIGURA 3. MAPA DO LOCAL DE COLETA DE <i>P. BIFASCIATUS</i>	20
FIGURA 4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO ENCÉFALO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i>	29
FIGURA 5. CONCENTRAÇÃO DE GSH E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO ENCÉFALO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i>	31
FIGURA 6. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO MÚSCULO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i>	33
FIGURA 7. CONCENTRAÇÃO DE GSH E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO MÚSCULO DE <i>PSALIDODON BIFASCIATUS</i>	35
FIGURA 8. ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO CORAÇÃO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i>	37
FIGURA 9. CONCENTRAÇÃO DE GSH E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO CORAÇÃO DE <i>Psalidodon bifasciatus</i>	39
FIGURA 10. BILOT DA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAIS (PCA) DOS BIOMARCADORES NO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE <i>P.</i> <i>bifasciatus</i>	41
FIGURA 11. VALORES DE CORRELAÇÃO NO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE <i>PSALIDODON BIFASCIATUS</i>	43
FIGURA 12. VALORES DE IBR DOS BIOMARCADORES DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE DE <i>P. BIFASCIATUS</i>	44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA PARA ALIMENTAÇÃO DE <i>P. BIFASCIATUS</i> DURANTE O BIOENSAIO	21
TABELA 2. VALORES DA ANOVA CONSIDERANDO A INTERAÇÃO ENTRE TEMPO DE EXPOSIÇÃO E TEMPERATURA NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE <i>PSALIDODON BIFASCIATUS</i>	26
TABELA 3. VALORES DA ANOVA DAS VARIAÇÕES ENTRE OS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE <i>PSALIDODON BIFASCIATUS</i>	27



LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA - Análise de variância
AMP - Adenosina monofosfato
ATP - Adenosina trifosfato
BSA - Albumina de soro bovina
CAT - Catalase
CT - Comprimento total
CTmax - Critical thermal maximum (temperatura crítica máxima)
DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DTNB - 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs - Espécies reativas de oxigênio
G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase
GPx - Glutaciona peroxidase
GR - Glutaciona redutase
GSH - Glutaciona reduzida
GSSG - Glutaciona dissulfeto
GST - Glutaciona-S-transferase
HCl - Ácido clorídrico
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
KCl - Cloreto de potássio
LPO - Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
MgCl₂ - Cloreto de magnésio
n - Número de espécimes por experimento
NaCl - Cloreto de sódio
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT - Nitroblue tetrazolium (Azul de nitrotetrazólio)
SOD - Superóxido dismutase
TCA - ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	19
1.1.2 Objetivos específicos.....	19
2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO DE <i>PSALIDODON BIFASCIATUS</i>	20
2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE CHOQUE TÉRMICO	21
2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	22
2.3.1 Enzimas do sistema de defesa antioxidante	22
2.3.2 Danos celulares e níveis de glutathiona reduzida	23
2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA.....	23
3 RESULTADOS	24
3.1.1 Enzimas do sistema de defesa antioxidante no encéfalo de <i>P. bifasciatus</i>	28
3.1.2 Marcadores de danos e concentração de GSH no encéfalo de <i>P. bifasciatus</i> . 30	
3.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA (31°C) NO MÚSCULO BRANCO DE <i>P. BIFASCIATUS</i>	32
3.2.1 Enzimas do sistema de defesa antioxidante no músculo de <i>P. bifasciatus</i>	32
4 DISCUSSÃO	45
4.1 ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANOS E CONCENTRAÇÃO DE GSH NO ENCÉFALO DE <i>P. BIFASCIATUS</i>	45
4.2 ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANOS E CONCENTRAÇÃO DE GSH NO CORAÇÃO DE <i>P. BIFASCIATUS</i>	47
4.3 ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANOS E CONCENTRAÇÃO DE GSH NO MÚSCULO DE <i>P. BIFASCIATUS</i>	49
4.4 CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM <i>P. BIFASCIATUS</i> : VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS	50
5. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas tem alterado a sua dinâmica conforme a frequência em que os gases de efeito estufa são lançados na atmosfera(SOUZA, 2014). Causadas pelo aquecimento global, as alterações climáticas impactam simultaneamente os fatores bióticos e abióticos do ambiente segundo a *World Wildlife Fund* (WWW BRASIL, 2005; NOYES *et al.*, 2009). Desta forma, as condições estressantes em que os organismos se encontram, tornam-se ameaça para a sobrevivência das espécies, principalmente para aquelas aquáticas (MERINO *et al.*, 2012; COX *et al.*, 2018; IPCC, 2019). Já que a taxa anual média da temperatura da água tem aumentado em diversas regiões (ALMEIDA *et al.*, 2014).

O grupo dos peixes possuem aproximadamente 30.000 espécies descritas das quais metade pertence ao ambiente de água doce (BATILANI-FILHO *et al.*, 2015). Por sua ampla diversidade e distribuição apresentam alto valor ecossistêmico e econômico (CARDOSO *et al.*, 2015). Desta forma, entender a fisiologia e como estes organismos lidam com estressores do meio possibilita avaliar riscos frente a mudança do meio. Deste modo, os peixes por serem organismos predominantemente ectotérmicos, regulando sua temperatura de acordo com o ambiente externo. Diferenças de temperatura no ambiente aquático os tornam suscetíveis ao ajuste das taxas metabólicas (IKEDA, 2009; PANG; CAO; FU, 2011) uma vez que, estima-se que a cada 10°C de aumento da temperatura do meio, os organismos aquáticos aumentam em até três vezes suas taxas metabólicas (WELTZIEN; PLANAS; FYHN, 1999).

Embora o grau de tolerância em relação as variações de temperatura seja relativo, variando de acordo com a espécie e sua distribuição longitudinal, peixes de habitats subtropicais e temperados tendem a suportar melhor as mudanças térmicas comparados com aqueles de regiões polares e tropicais por apresentarem uma ampla faixa térmica, ao apresentarem maior plasticidade frente as mudanças de temperatura da água (OOMEN; HUTCHINGS, 2017; PECK; CONWAY, 2000; PÖRTNER, 2002; PORTNER; FARRELL, 2008).

Além disso, as características individuais de cada espécie também afetam a capacidade de aclimação diante das mudanças do meio (CAMPOS *et al.*, 2019), visto que o processo de aclimação ocorre através dos ajustes metabólicos. Mas

quando a demanda energética é muito alta e não atinge a homeostase, pode acarretar em uma condição de estresse (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Ocasionado por uma resposta não específica do organismo a qualquer estímulo nocivo (KOOLHAAS *et al.*, 2011), o estresse, surge quando o estímulo excede a sua capacidade reguladora natural do organismo (BALASCH E TORT, 2019) em ajustar suas funções bioquímicas, fisiológicas e comportamentais para a manutenção da homeostase (BARTON, 2002).

No entanto, pequenas exposições aos estressores, onde a homeostase é mantida, provoca um estímulo ou uma resposta compensatória positiva (SCHRECK; TORT, 2016). À medida que a gravidade do estressor aumenta, o cortisol torna-se elevado, e essas altas concentrações podem desencadear mecanismos negativos de estresse que inibem, alteram ou diminuem os fatores imunológicos (SCHRECK; TORT, 2016; BALASCH; TORT, 2019).

A Síndrome de Adaptação Geral (SAG) (SELYE, 1946) é uma resposta do sistema nervoso autônomo simpático, que tem como objetivo proteger o organismo durante um estresse. Essa resposta é iniciada pelo sistema nervoso central e em órgãos periféricos (CHROUSOS, 2009) ao liberar hormônios que operam através de receptores específicos nas células (SCHRECK; TORT, 2016). Sendo caracterizada por alterações endócrinas, como o aumento dos níveis de hormônios corticosteroides e catecolaminas na corrente sanguínea (RIBEIRO *et al.*, 2007; SCHRECK; TORT, 2016).

A liberação desses hormônios faz com que organismos em condições de estresse aumente a atividade de natação e batimento opercular, na busca do aumento do fluxo sanguíneo e transporte de oxigênio pelo sangue. Isto eleva a captação de oxigênio para os processos vitais, bem como, aumenta a oxigenação e nutrição do encéfalo, coração e músculos esqueléticos. Órgãos importantes na coordenação da resposta ao estresse ou reação de fuga (CHROUSOS, 2009; PEREIRA, 2018).

As respostas ao estresse podem ter consequências negativas a longo prazo, dependendo do nível, duração e o número de estressores (BALASCH; TORT, 2019). Muitas vezes atribuído a condições externas ou internas do indivíduo, o estresse gera respostas fisiológicas que são expressas de diversas formas, como estresse oxidativo e metabólico que pode afetar os processos fisiológicos, biológicos e até causar impactos nas populações (CAMPOS *et al.*, 2019; KRANNER *et al.*, 2010).

Além disso, estressores ambientais podem desencadear respostas distintas de acordo com o tecido afetado (TREVISAN, 2008). O encéfalo, por exemplo, é o órgão que apresenta maior sensibilidade ao estresse ocasionado pelas variações de temperatura da água (TSENG *et al.*, 2011). Explicado pela ativação do sistema nervoso central durante o ajuste homeostático e de aclimação celular (BREER; RAHMANN, 1974; PRZEPIURA *et al.*, 2019a; TSENG *et al.*, 2011), bem como a necessidade da alta demanda de oxigênio, que chega a 20% de oxigênio respirado, produzindo altos níveis de EROs durante o metabolismo oxidativo (PRZEPIURA *et al.*, 2019a; RALF, 2000).

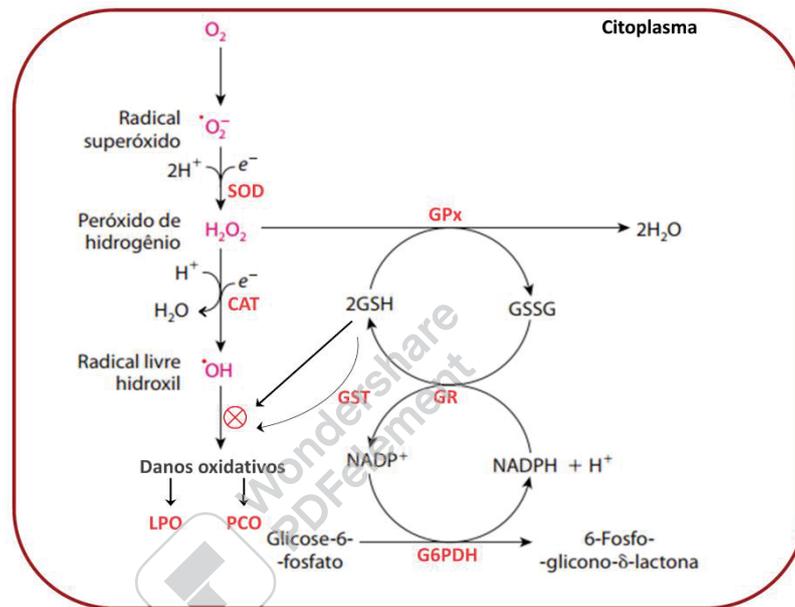
Outro aspecto é a diminuição do oxigênio dissolvido na água ocasionado pelo aumento da temperatura, que gera alterações no metabolismo oxidativo dos peixes, juntamente com a alta demanda energética necessária para a homeostase. As espécies reativas de oxigênio (EROs) que são geradas pelo metabolismo normalmente, tem sua produção aumentada com o estresse ambiental e gera estresse oxidativo celular (SIQUEIRA *et al.*, 2009; COPATTI *et al.*, 2019), através do acúmulo de danos causados por EROs nas células (FOGAÇA; SANT'ANA, 2009).

As EROs são moléculas oxidantes derivadas do oxigênio molecular (SIES *et al.*, 2022), sendo que, as que apresentam maior reatividade são as radicalares, ou seja, que apresentam número ímpar de elétrons, com um elétron desemparelhado na última camada eletrônica (DA COSTA; STREIT JR, 2019). Esta instabilidade faz com que essas moléculas se tornem altamente reativas, com capacidade de se ligar a outras moléculas, bem como provocar danos em proteínas, lipídeos e DNA (LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). Um exemplo, é a peroxidação lipídica (LPO) que ocorre nas membranas celulares (DA COSTA; STREIT JR, 2019) que são dependente da composição dos ácidos graxos e da concentração de agentes antioxidantes (FOGAÇA; SANT'ANA, 2009). Outro marcador de dano comumente utilizado em estudos ecotoxicológicos é a quantificação de proteínas carboniladas (PCO). A carbonilação proteica são modificações oxidativas que ocorrem através da inserção de carbonilas nas cadeias de aminoácidos (AKAGAWA, 2021), podendo ocasionar na perda de função proteica.

Dessa forma, o sistema de defesa antioxidante é dividido em não-enzimático e enzimático e tem a função de neutralizar a ação das EROs (BARBOSA *et al.*, 2010). Os antioxidantes não-enzimáticos são vitaminas, minerais e compostos fenólicos obtidos principalmente da dieta (BARBOSA *et al.*, 2010), além da

glutationa reduzida (GSH) presente em maior abundância no ambiente celular. Já o sistema antioxidante enzimático (figura 1) é composto por enzimas, tais como: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx), glutationa s-transferase (GST), glutationa redutase (GR) e glutationa redutase (GR) (BARBOSA *et al.*, 2010; BOX *et al.*, 2007; DA COSTA; STREIT JR, 2019; MARIANO; OBA; ASSIS, 2009; MONTEIRO, 2018).

FIGURA 1. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE ENZIMÁTICO E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS.



FONTE: Adaptado de Nelson & Cox (2014).

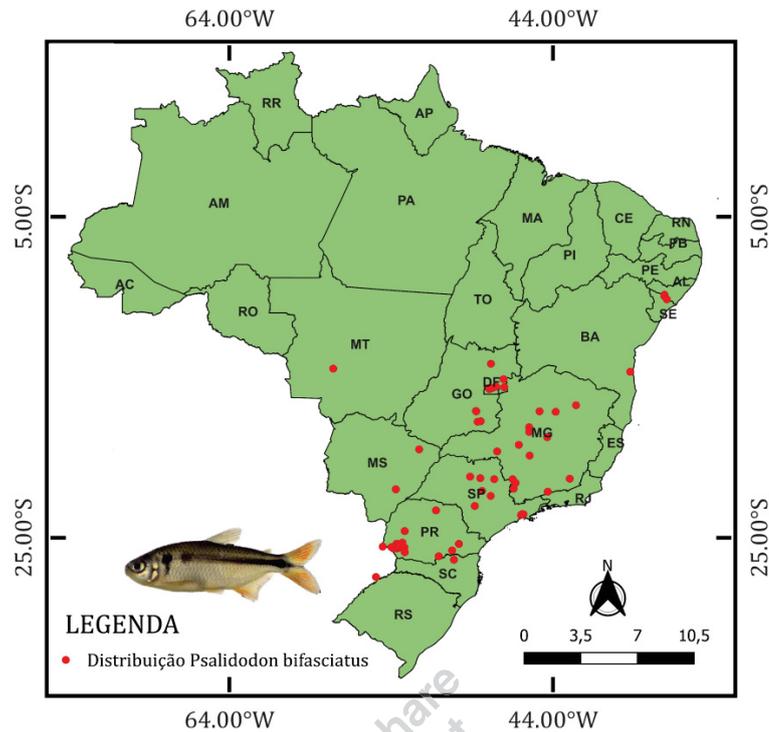
NOTA: Esquema resumido exemplificando o sistema enzimático de defesa antioxidante e marcadores de danos oxidativo. As setas indicam o caminho da reação. Os biomarcadores estão destacados em vermelho. SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GPx: glutationa peroxidase, GR: glutationa redutase, GST: glutationa S-transferase, G6PDH: glicose 6 fosfato desidrogenase, LPO: lipoperoxidação, PCO: proteínas carboniladas, GSH: glutationa reduzida.

A primeira enzima a neutralizar as EROs é a SOD, convertendo o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apresenta menor reatividade quando comparado com ânion superóxido, porém, ainda prejudicial as estruturas celulares (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Posteriormente, as enzimas CAT e GPx fazem a conversão do peróxido de hidrogênio produzido pela SOD, com liberação de água e oxigênio como produto final da reação (CHANDRA; SAMALI; ORRENIUS, 2000; IGHODARO; AKINLOYE, 2018). Além disso, a GPx também catalisa hidroperóxidos para proteger, por exemplo, as membranas celulares (BARLOW-WALDEN *et al.*, 1995; IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Diante disso, o uso de biomarcadores que avalie os parâmetros metabólicos e do sistema de defesa antioxidante dos peixes frente aos estressores aquáticos são importantes (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2016; CAMPOS *et al.*, 2019). Neste caso, a bacia do rio Iguaçu possui a maior extensão dentro do estado do Paraná. Sua nascente se encontra em Curitiba e ao percorrer cerca de 1.060 km, atravessa 113 municípios do estado do Paraná, com desagua no Rio Paraná (DELARIVA, 2002; SEMA, 2014).

O rio Iguaçu é considerado Ecorregião Mundial devido ao grande número de endemismo de peixes de água doce (DELARIVA *et al.*, 2018; MEZZAROBA, 2020). Ao longo do seu percurso, existem vários tipos de ocupações do solo que incluem atividades de importância econômica, rural, urbana, agropecuária, Unidade de Conservação Foz do Iguaçu, barragens hidrelétricas, bem como o uso do seu curso para o abastecimento de água pública (MEZZAROBA, 2020; NIMET *et al.*, 2020; NIMET; GUIMARÃES; DELARIVA, 2017).

Psalidodon bifasciatus (Teleostei: Characidae) é uma espécie de peixe neotropical, com ampla distribuição, desde os Estados Unidos até a Argentina (BUENO-KRAWCZYK *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2010; DELARIVA *et al.*, 2018), com ocorrência registrada em diversas bacias no Brasil (figura 2). Encontrada na bacia do rio Iguaçu, essa espécie possui ampla capacidade de colonização, devido a alimentação onívora, oportunismo trófico e grande potencial reprodutivo (BUENO-KRAWCZYK *et al.*, 2015; DELARIVA *et al.*, 2018; WACHTEL *et al.*, 2019).

FIGURA 2. MAPA DE DISTRIBUIÇÃO DE *PSALIDODON BIFASCIATUS* NO BRASIL

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Mapa de distribuição da espécie *Psalidodon bifasciatus* no Brasil. Pontos vermelhos indicam locais de ocorrência da espécie.

De acordo com DE OLIVEIRA *et al.*, (2019), espécimes de *P.bifasciatus* que vivem em trechos do rio Iguaçu impactados, possuem como estratégia a aceleração da maturidade sexual, o que o torna um bom indicador ambiental (NIMET; AMORIM; DELARIVA, 2018) para o monitoramento destas áreas impactadas (FREIRE *et al.*, 2015).

Assim, caracterizar o efeito do estresse térmico gerado em organismos aquáticos, principalmente aqueles que são oriundos de mudanças climáticas, ajuda a compreender os aspectos ecológicos, fisiológicos, comportamentais a até mesmo de extinção em massa que ocorre em cenários mais extremos (FREIRE *et al.*, 2015) (QUADRA *et al.*, 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do estresse térmico agudo durante 2, 6, 12, 24 e 48 horas de exposição no sistema de defesa antioxidantes do encéfalo, músculo e coração no peixe de água doce *Psalidodon bifasciatus*.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade de enzimas envolvidas na defesa antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-s-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e níveis de glutathione reduzida (GSH) no músculo, coração e encéfalo de *P. bifasciatus* submetidos a choque térmico de alta temperatura (31°C) expostos por 2, 6, 12, 24 e 48 horas.
- Avaliar os níveis dos marcadores de dano oxidativo: peroxidação lipídica (LPO) e proteínas carboniladas (PCO), no músculo, coração e encéfalo de *P. bifasciatus* submetidos a choque térmico de alta temperatura (31°C) expostos por 2, 6, 12, 24 e 48 horas.
- Avaliar as diferentes respostas ao estresse oxidativo quando comparado músculo, coração e encéfalo de *P. bifasciatus* submetidos ao estresse térmico agudo por 2, 6, 12, 24 e 48 horas de exposição.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As temperaturas utilizadas, 31°C e 21°C, levaram em consideração estudos já existentes com *Psalidodon bifasciatus* (BUENO-KRAWCZYK *et al.*, 2015). Os tempos de exposição 2, 6, 12, 24 e 48 horas, simulam situações de estresse térmico e geram uma mudança gradual das atividades metabólicas, que ocorrem a fim de reestabelecer a homeostase (FORGATI *et al.*, 2017; MORA; MAYA, 2006; PRZEPIURA *et al.*, 2019; SCHLEGER *et al.*, 2022; SOUZA, *et al.*, 2018).

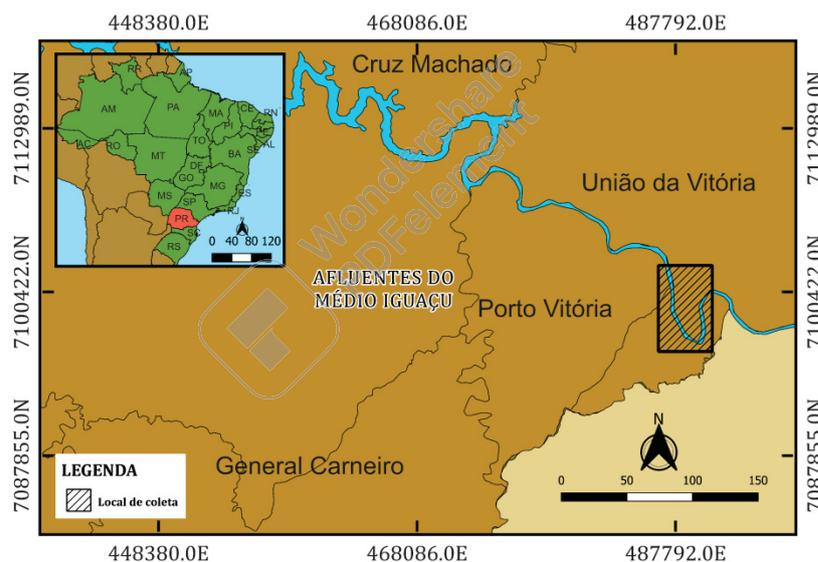
A licença ambiental para a coleta de animais foi obtida via Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio), sob número 63551-1. Já a licença de experimentação animal foi obtida através da Comissão de Ética no

Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA-BIO/UFPR), sob números 1228 e 1228 C.

2.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO DE *Psalidodon bifasciatus*

Os indivíduos de *P. bifasciatus* foram coletados na região do médio Iguaçu (figura 3), nos municípios de União da Vitória (26° 14' 58.50" S; 51° 6' 33.07" W) e Porto Vitória (26° 10' 46.66" S; 51° 10' 25.09" W), ambos localizados no estado do Paraná. Os mesmos foram coletados com o auxílio de redes de pesca (tecido de multifilamento, malha de 12 mm entre os nós) e transferidos para o Centro de Pesquisa e Extensão em Aquicultura Ildo Zago em União da Vitória-PR.

FIGURA 3. MAPA DO LOCAL DE COLETA DE *P. BIFASCIATUS*.



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Mapa mostrando o local de coleta de *P. bifasciatus*. O local destacado em preto representa o local do Rio Iguaçu onde os indivíduos de *P. bifasciatus* foram coletados.

A aclimação dos peixes ocorreu por um período de três dias em tanques de 830L, com temperatura controlada de $21 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, com aeração constante e fotoperíodo de 11 horas luz/13 horas escuro (BUENO-KRAWCZYK *et al.*, 2015; CHUNG, 2000; LERMEN *et al.*, 2004; PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2017). Medidas abióticas como O_2 dissolvido ($7,5+0,58\text{ppm/mg/L}$), amônia ($1,75+0,29\text{ppm/mg/L}$) e pH ($7,53+0,05$), nitrato ($0,00\text{mg/L}$), nitrito ($0,00\text{mg/L}$), dureza ($71,6 \text{ mg/L de CaCO}_3$) foram controladas rigorosamente.

Os tanques configuravam sistemas estáticos e foram limpos por sucção diária, com aproximadamente 50% da água renovada (LERMEN *et al.*, 2004) com água originária de nascente própria em fluxo contínuo de vazão de 4L/m. Os peixes foram alimentados (média: 1% peso corporal) diariamente com ração comercial para peixes, Supra® Aqua Line (tabela 1), 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. A alimentação foi realizada simultaneamente nos grupos controle e experimental.

TABELA 1. COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO UTILIZADA PARA A ALIMENTAÇÃO DE *P. BIFASCIATUS* DURANTE O BIOENSAIO

Matéria prima	Concentração (g/kg)	Proporção (%)
Proteína	420	42
Extrato etéreo	80	8
Extrato Fibroso	30	3
Extrato Mineral	140	14

FONTE: Ratko (2022, não publicado).

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL DE CHOQUE TÉRMICO

Exemplares de *P. bifasciatus* (n=120 indivíduos, com comprimento padrão de 8.75 ± 0.75 cm e peso de 15 ± 4.50 g) após aclimação, foram aleatoriamente selecionados e transferidos diretamente para os aquários contendo água a $31 \pm 0.5^\circ\text{C}$ com tempo de exposição de 2, 6, 12, 24 e 48 horas nessa condição, caracterizando choque térmico de alta temperatura. Para cada situação experimental houve um controle, em que os animais foram mantidos a $21 \pm 0.5^\circ\text{C}$. O número de animais por grupo experimento/controle (n amostral) foi de 12 peixes e a densidade máxima de peixes por aquário foi de 3,6g/L de água (CHUNG, 2000; VIEIRA; CORREIA; MOREIRA, 2013). Os bioensaios foram realizados em duplicata.

A temperatura da água dos aquários foi rigorosamente controlada por termostatos (Aqua One®, VigoAr® e Atman®, com potência de 100W). A troca de água nos experimentos acima de 24 horas foram idênticas as da aclimação.

Teores de amônia, oxigênio dissolvido e pH foram mensurados durante os experimentos e são semelhantes aos encontrados durante aclimação. A oferta de alimento foi idêntica à aclimação e a última alimentação foi fornecida entre 22 e 24 horas antes da eutanásia dos peixes (MADEIRA, *et al.*, 2016; VINAGRE *et al.*, 2014).

Ao fim de cada experimento os peixes foram anestesiados com benzocaína 1% (p v-1), eutanasiados com secção medular e imediatamente dissecados. As amostras (musculo, encéfalo e coração) foram conservadas em nitrogênio líquido e processadas no Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – Setor de Ciências Biológicas - UFPR.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

2.3.1 Enzimas do sistema de defesa antioxidante

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi avaliada através do meio de reação com tampão Tris-HCl e EDTA, H₂O destilada e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), onde a enzima é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio, e dessa forma a reação é mensurada através do decréscimo da absorbância em 240 nm em espectrofotômetro (AEBI, 1984).

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) teve sua atividade determinada pela reação com tampão carbonato de sódio mais cloreto de hidroxilamina e solução de cloreto de tetrazólio-nitroazul (NBT) foi mensurada através da inibição da redução de NBT para azul de *formazan*, e a leitura foi realizada através da absorbância a 560 nm (CROUCH *et al.*, 1981).

A atividade da glutathione S - transferase (GST, EC 2.5.1.18) foi mensurada com base em sistema de reação contendo tampão de fosfato de potássio, glutathione reduzida (GSH) e ácido 5',5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (CDNB), onde a GST catalisou a reação do CDNB com a GSH formando um tioéter, e o mesmo foi mensurado através do aumento da absorbância a 340 nm em espectrofotômetro (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976).

A glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) teve sua atividade avaliada através da redução de ácidos graxos em sistema de reação de fosfato de sódio acrescentado de ázida sódica, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH), glutathione reduzida (GSH) e glutathione redutase (GR), promovendo a redução da glutathione oxidada (GSSG) que é catalisada pela GR na presença de

NADPH e teve sua atividade mensurada através do decréscimo da absorbância a 340 nm em espectrofotômetro (WENDEL, 1981).

A atividade enzimática da glutathiona redutase (GR, EC 1.8.1.7) foi mensurada através da oxidação de NADPH para formação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP) onde a atividade é avaliada com o decréscimo da absorbância a 340 nm em espectrofotômetro (CALBERG; MANNERVIK, 1985).

A atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) foi mensurada através da redução de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada (NADP+) em NADPH enquanto oxida glicose-6-fosfato, dessa forma observamos o aumento da absorbância a 340 nm em espectrofotômetro (CIARDIELLO; CAMARDELLA; PRISCO, 1995).

2.3.2 Danos celulares e níveis de glutathiona reduzida

A lipoperoxidação (LPO) foi mensurada através da quantificação de malondialdeído (MDA) presente na amostra, onde o mesmo reage com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) gerando uma coloração avermelhada que foi lida em absorbância de 535 nm em espectrofotômetro (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007).

A carbonilação proteica (PCO) foi mensurada através da reação do 2,4-Dinitrofenil-hidrazina (DNPH) com as proteínas carboniladas presentes na amostra, formando dinitrofenil hidrazonas que foram detectadas através da leitura em 360 nm em espectrofotômetro (LEVINE *et al.*, 1994).

A concentração de glutathiona (GSH) foi mensurada através reação de DTNB com os tióis não proteicos presentes na amostra após a precipitação de proteínas, e o produto desta reação foi detectado através da leitura em 415 nm em espectrofotômetro (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS E REPRESENTAÇÃO GRÁFICA

Os dados obtidos foram transformados através da função box-cox (BOX, G E P; COX, 1964) utilizando o pacote MASS (RIPLEY *et al.*, 2021) no *software* R (R TEAM, 2022).

Buscando comparar a interação entre as variáveis independentes de tempo (2, 6, 12, 24 e 48 horas) e tratamento (21°C e 31°C) foi realizado uma análise de covariância (ANOVA) bi-fatorial para cada biomarcador. Para os biomarcadores que

mostraram interação significativa entre as variáveis independentes foi realizado teste a *posteriori* através do método Tukey disponível no pacote *emmeans* (LENTH *et al.*, 2021). Os gráficos foram gerados através do pacote *ggplot2* (WICKHAM, 2021) e os valores foram representados como a média e o erro padrão da média. Por fim, foi utilizado uma análise multivariada, *principal components analysis* (PCA) para avaliar quais biomarcadores foram melhores descritores dentre os três órgãos analisados. Para realizar a PCA utilizamos os pacotes *factoextra* (KASSAMBARA; MUNDT, 2020) e *FactoMineR* (LE; JOSSE; HUSSON, 2008).

Para avaliar a capacidade de aclimação de *P. bifasciatus* foi utilizado o índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR) (CAMPOS *et al.*, 2019). Para avaliar a capacidade de resposta de cada órgão analisado foram utilizados os biomarcadores SOD, CAT, GST, GPx, GR, GSH, G6PDH, LPO e PCO. Os cálculos foram realizados no *software* R através do pacote *ggradar* (BION, 2022).

Foi aplicada uma análise de correlação para averiguar se os níveis dos marcadores de danos (LPO e PCO) foi acompanhada pela atividade enzimática dos biomarcadores (SOD, CAT, GST, GPx, GR, GSH E G6PDH). Os dados não seguiram o pressuposto de normalidade bivariada dos dados, desse modo, a análise de correlação aplicada foi a de *Spearman* com nível de significância menor que 0,05 (MADEIRA *et al.*, 2013).

3 RESULTADOS

Cinco indivíduos morreram durante o experimento, todos quando submetidos ao choque térmico de 31°C. Sendo que, três mortes ocorreram em 2h, uma em 6h e uma em 12h de exposição. Isto pode estar associado a condição física dos animais, uma vez que, todas ocorreram dentro das primeiras 24 horas de exposição.

Os resultados obtidos estão apresentados por órgão para as enzimas do sistema de defesa antioxidante, concentração de GSH e marcadores de danos oxidativos. Os resultados discutidos neste trabalho são preferencialmente sobre a interação das duas variáveis independentes (tempo e temperatura) (tabela 1).

TABELA 2. VALORES DA ANOVA ENTRE A INTERAÇÃO TEMPO DE EXPOSIÇÃO E TEMPERATURA NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE *PSALIDODON BIFASCIATUS*.

ORGÃO	1	SOD	CAT	GPx	GR	GST	G6PDH	GSH	LPO	PCO
ENCÉFALO	F	0.10	5.20	0.78	1.83	0.62	1.02	0.70	3.68	1.95
	p	0.98	0.00079*	0.54	0.13	0.64	0.40	0.59	0.0081*	0.11
MÚSCULO	F	0.64	0.60	1.17	4.31	0.35	0.97	2.22	8.04	0.96
	p	0.64	0.66	0.33	0.0031*	0.84	0.42	0.073	0.000013*	0.43
CORAÇÃO	F	1.68	0.62	4.81	0.79	0.66	1.89	1.61	3.66	2.84
	p	0.16	0.64	0.0015*	0.53	0.62	0.12	0.18	0.0084*	0.029*

INTERAÇÃO TEMPO x
TEMPERATURA

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona reductase (GR), glutatona S-transferase (GST), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutatona reduzida (GSH), lipoperoxidação (LPO) e proteínas carboniladas (PCO). Asteriscos (*) representam variação significativa entre tempo e temperatura no mesmo horário de exposição. Os valores são apresentados como média e erro padrão da média.

Porém houve variação entre os tempos de exposição na atividade enzimática, marcadores de danos e níveis de GSH do encéfalo, coração e músculo de *P. bifasciatus*. Estas variações não estão descritas nos resultados, porém, podem ser observadas de acordo com as figuras 4 a 9 e tabela 2, apresentadas no texto.

TABELA 3. VALORES DA ANOVA DAS VARIAÇÕES ENTRE OS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE *PSALIDODON BIFASCIATUS*

	Orgão	T (°C)	2h	6h	12	24h	48h
SOD	Coração	21°C	3,5 ± 0,59	4,97 ± 0,59	4,13 ± 0,53	5,66 ± 0,59	5,07 ± 0,53
		31°C	4,63 ± 0,62 ^{ab}	3,44 ± 0,62 ^a	4,83 ± 0,53 ^{ab}	6,47 ± 0,56 ^b	5,98 ± 0,51 ^b
	Músculo	21°C	2,4 ± 0,33 ^a	3,73 ± 0,32 ^b	3,39 ± 0,32 ^{ab}	3,26 ± 0,37 ^{ab}	3,35 ± 0,33 ^{ab}
		31°C	2,45 ± 0,43	3,00 ± 0,40	3,70 ± 0,33	3,33 ± 0,32	3,15 ± 0,32
	Encéfalo	21°C	9,16 ± 1,32	8,53 ± 1,38	8,33 ± 1,45	9,41 ± 1,65	5,56 ± 1,38
		31°C	9,97 ± 1,95	10,67 ± 1,32	9,56 ± 1,38	10,13 ± 1,38	7,61 ± 1,45
CAT	Coração	21°C	1,65 ± 0,006 ^{ab}	1,62 ± 0,006 ^c	1,66 ± 0,005 ^a	1,63 ± 0,006 ^a	1,66 ± 0,006 ^a
		31°C	1,65 ± 0,006 ^{ab}	1,62 ± 0,006 ^a	1,65 ± 0,006 ^b	1,63 ± 0,006 ^{ab}	1,65 ± 0,005 ^b
	Músculo	21°C	3,53 ± 0,05 ^{ab}	3,42 ± 0,04 ^a	3,59 ± 0,04 ^{ab}	3,59 ± 0,04 ^{ab}	3,61 ± 0,04 ^b
		31°C	3,49 ± 0,05	3,45 ± 0,05	3,50 ± 0,04	3,61 ± 0,04	3,56 ± 0,04
	Encéfalo	21°C	6,04 ± 0,17	5,96 ± 0,16	6,26 ± 0,16	5,98 ± 0,18	5,94 ± 0,18
		31°C	5,63 ± 0,2 ^a	6,13 ± 0,17 ^{ab}	6,82 ± 0,18 ^{bc}	6,28 ± 0,18 ^{ab}	7,12 ± 0,18 ^c
GPx	Coração	21°C	3,11 ± 0,06 ^{ab}	2,95 ± 0,06 ^a	3,25 ± 0,05 ^b	2,94 ± 0,06 ^a	3,04 ± 0,05 ^{ab}
		31°C	3,35 ± 0,06 ^a	2,94 ± 0,06 ^b	3,14 ± 0,06 ^{abc}	3,26 ± 0,06 ^{ac}	3,07 ± 0,05 ^{bc}
	Músculo	21°C	1,67 ± 0,006	1,67 ± 0,005	1,67 ± 0,005	1,67 ± 0,006	1,66 ± 0,006
		31°C	1,66 ± 0,007 ^{ab}	1,65 ± 0,007 ^{ab}	1,67 ± 0,006 ^a	1,66 ± 0,005 ^{ab}	1,64 ± 0,006 ^b
	Encéfalo	21°C	1,39 ± 0,002 ^a	1,39 ± 0,002 ^a	1,39 ± 0,002 ^a	1,39 ± 0,002 ^a	1,40 ± 0,002 ^b
		31°C	1,39 ± 0,002 ^{ab}	1,39 ± 0,002 ^{ab}	1,39 ± 0,002 ^a	1,40 ± 0,002 ^{bc}	1,40 ± 0,002 ^c
GST	Coração	21°C	4,3 ± 0,12 ^a	3,55 ± 0,13 ^b	4,39 ± 0,10 ^a	4,07 ± 0,12 ^a	4,03 ± 0,11 ^a
		31°C	4,40 ± 0,13 ^a	3,35 ± 0,12 ^b	4,24 ± 0,11 ^a	4,03 ± 0,11 ^a	4,11 ± 0,10 ^a
	Músculo	21°C	4,51 ± 0,08 ^{ab}	4,46 ± 0,07 ^a	4,75 ± 0,07 ^b	4,58 ± 0,08 ^{ab}	4,44 ± 0,07 ^a
		31°C	4,47 ± 0,08	4,48 ± 0,08	4,68 ± 0,07	4,47 ± 0,07	4,48 ± 0,08
	Encéfalo	21°C	3,45 ± 0,03	3,50 ± 0,03	3,53 ± 0,03	3,45 ± 0,04	3,43 ± 0,03
		31°C	3,43 ± 0,04 ^{ab}	3,46 ± 0,03 ^a	3,45 ± 0,03 ^a	3,41 ± 0,03 ^{ab}	3,31 ± 0,03 ^b
G6PDH	Coração	21°C	1,72 ± 0,002 ^a	1,70 ± 0,003 ^{bc}	1,71 ± 0,002 ^{ab}	1,70 ± 0,002 ^c	1,70 ± 0,002 ^{bc}
		31°C	1,71 ± 0,002 ^a	1,70 ± 0,002 ^b	1,71 ± 0,002 ^{abc}	1,70 ± 0,002 ^{bc}	1,71 ± 0,002 ^{ac}
	Músculo	21°C	147 ± 10,03	164 ± 8,19	152 ± 8,55	141 ± 8,97	156 ± 9,46
		31°C	144 ± 10,03	134 ± 10,03	149 ± 8,55	122 ± 8,55	130 ± 8,97
	Encéfalo	21°C	0,58 ± 5,16-06 ^a	0,58 ± 4,94-06 ^{ab}	0,58 ± 4,94-06 ^{ab}	0,58 ± 5,41-06 ^b	0,58 ± 5,41-06 ^{ab}
		31°C	0,58 ± 6,05-06 ^a	0,58 ± 5,16-06 ^{ab}	0,58 ± 5,41-06 ^b	0,58 ± 5,41-06 ^{ab}	0,58 ± 5,41-06 ^{ab}
GR	Coração	21°C	22,1 ± 1,27 ^a	16 ± 1,27 ^b	27,7 ± 1,15 ^c	24,3 ± 1,27 ^{ac}	26,3 ± 1,15 ^{ac}
		31°C	23,6 ± 1,27 ^a	14,9 ± 1,21 ^b	29,6 ± 1,15 ^c	27,1 ± 1,27 ^{ac}	26,4 ± 1,15 ^{ac}

	Músculo	21°C	8,87 ± 0,12 ^a	8,98 ± 0,11 ^a	9,32 ± 0,12 ^{ab}	9,62 ± 0,13 ^b	9,65 ± 0,11 ^b
		31°C	8,91 ± 0,13 ^a	8,91 ± 0,13 ^a	9,91 ± 0,12 ^b	9,30 ± 0,11 ^{ac}	9,52 ± 0,12 ^{bc}
	Encéfalo	21°C	2,55 ± 0,01 ^a	2,56 ± 0,01 ^a	2,60 ± 0,01 ^b	2,58 ± 0,01 ^{ab}	2,61 ± 0,01 ^b
		31°C	2,59 ± 0,01 ^{ab}	2,57 ± 0,01 ^a	2,59 ± 0,01 ^{ab}	2,60 ± 0,01 ^{ab}	2,61 ± 0,01 ^b
GSH	Coração	21°C	1,7 ± 0,12 ^{ab}	2,13 ± 0,15 ^a	1,61 ± 0,10 ^b	1,88 ± 0,12 ^{ab}	1,43 ± 0,12 ^b
		31°C	1,48 ± 0,12 ^a	2,27 ± 0,15 ^b	1,54 ± 0,12 ^a	1,55 ± 0,12 ^a	1,59 ± 0,11 ^a
	Músculo	21°C	1,48 ± 0,41	1,35 ± 0,39	1,69 ± 0,41	2,08 ± 0,43	1,57 ± 0,39
		31°C	0,63 ± 0,49 ^a	1,89 ± 0,52 ^{ab}	1,51 ± 0,41 ^{ab}	1,73 ± 0,39 ^{ab}	2,94 ± 0,39 ^b
	Encéfalo	21°C	2,07 ± 0,22	2,0 ± 0,23	1,98 ± 0,22	2,38 ± 0,23	1,85 ± 0,24
		31°C	2,41 ± 0,27	1,61 ± 0,23	1,89 ± 0,23	2,16 ± 0,23	1,54 ± 0,24
LPO	Coração	21°C	1,12 ± 0,17 ^{ab}	1,37 ± 0,25 ^a	0,51 ± 0,16 ^b	1,22 ± 0,22 ^{ab}	0,63 ± 0,18 ^{ab}
		31°C	0,95 ± 0,19 ^{ab}	0,78 ± 0,25 ^{ab}	0,98 ± 0,15 ^{ab}	0,52 ± 0,19 ^a	1,32 ± 0,15 ^b
	Músculo	21°C	0,64 ± 0,11 ^a	0,88 ± 0,10 ^{ab}	1,05 ± 0,10 ^{bc}	0,97 ± 0,11 ^{abc}	1,31 ± 0,10 ^c
		31°C	0,97 ± 0,12 ^a	1,02 ± 0,12 ^{ab}	0,65 ± 0,10 ^a	1,46 ± 0,11 ^b	0,88 ± 0,11 ^a
	Encéfalo	21°C	1,07 ± 0,18 ^a	0,14 ± 0,17 ^b	0,21 ± 0,17 ^b	0,16 ± 0,18 ^b	0,97 ± 0,21 ^c
		31°C	0,67 ± 0,22	0,38 ± 0,17	0,13 ± 0,18	0,31 ± 0,21	0,16 ± 0,19
PCO	Coração	21°C	1,04 ± 0,14	1,14 ± 0,15	0,81 ± 0,14	0,93 ± 0,17	0,44 ± 0,27
		31°C	0,89 ± 0,14	0,88 ± 0,15	0,46 ± 0,14	0,80 ± 0,17	0,55 ± 0,13
	Músculo	21°C	1,73 ± 0,11 ^a	1,32 ± 0,10 ^{ab}	1,49 ± 0,10 ^a	1,33 ± 0,11 ^{ab}	1,02 ± 0,11 ^b
		31°C	1,62 ± 0,12	1,31 ± 0,12	1,31 ± 0,10	1,25 ± 0,10	1,24 ± 0,11
	Encéfalo	21°C	1,83 ± 0,21 ^a	1,20 ± 0,18 ^{ab}	0,91 ± 1,19 ^b	1,16 ± 0,20 ^{ab}	1,58 ± 0,20 ^{ab}
		31°C	1,58 ± 0,22	1,84 ± 0,21	1,49 ± 0,20	1,07 ± 0,20	1,77 ± 0,20

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST), glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), glutatona reduzida (GSH), lipoperoxidação (LPO) e proteínas carboniladas (PCO). Letras representam variações ao longo do tempo. Os valores são apresentados como média e erro padrão da média. As letras indicam a variação entre os tempos de exposição.

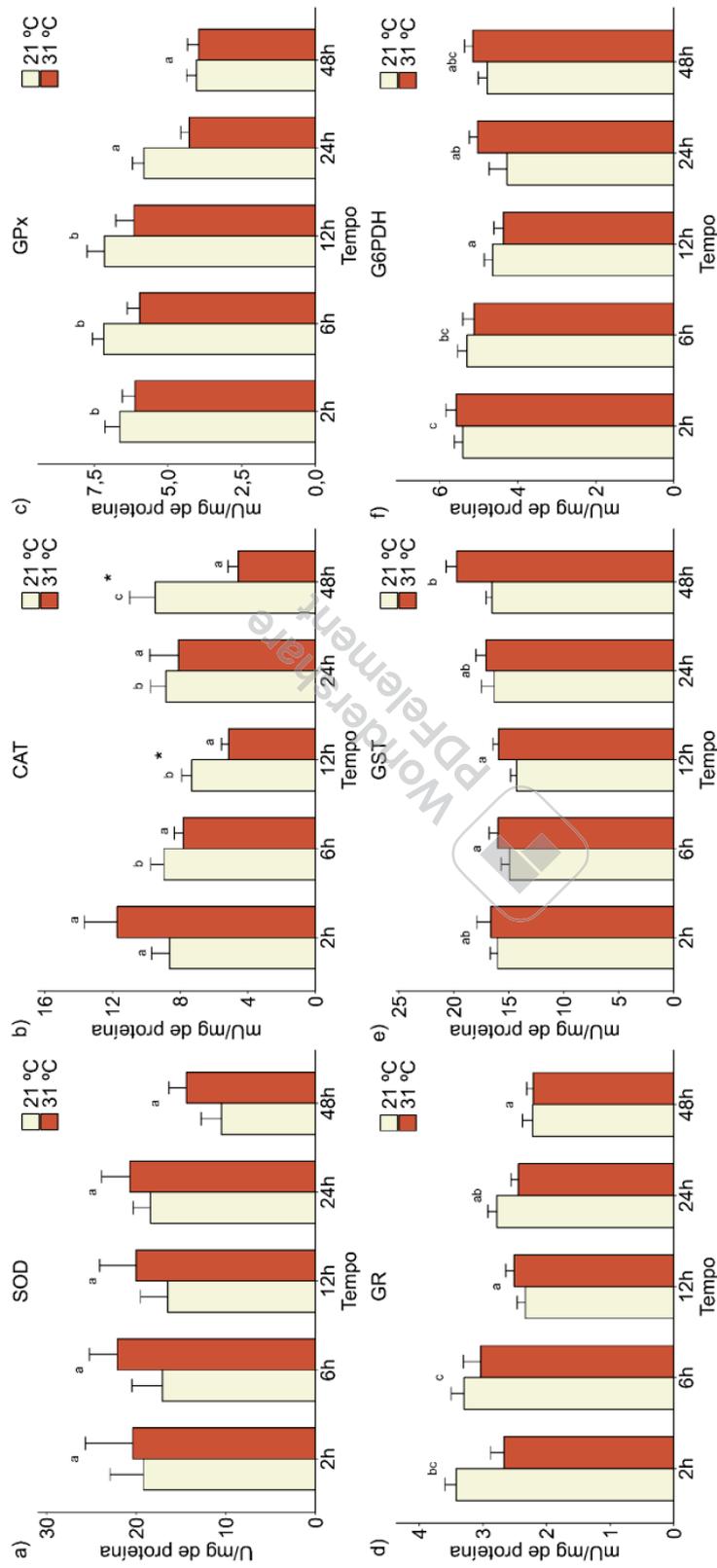
3.1. EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA (31°C) NO ENCÉFALO DE *P. BIFASCIATUS*

3.1.1 Enzimas do sistema de defesa antioxidante no encéfalo de *P. bifasciatus*

No encéfalo de *P. bifasciatus* a atividade da CAT (figura 4-B) variou em 12 e 48 horas entre os grupos controle (21°C) e experimental (31°C) ($p = 0,00079$). Ambos os tempos de exposição apresentaram maior atividade da CAT em 21°C.

As atividades das enzimas SOD (figura 4-A), GPx (figura 4-C), GR (figura 4-D), GST (figura 4-E) e G6PDH (figura 4-F) no encéfalo de *P. bifasciatus* não apresentaram diferença entre as variáveis tempo e tratamento.

FIGURA 4. ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO ENCÉFALO DE *Psalidodon bifasciatus*



ONTE: A autora (2022).

OTA: Níveis encefálicos das enzimas de defesa antioxidante em *Psalidodon bifasciatus* exposto a choque térmico de alta temperatura (31°C) e seus respectivos controles (21°C). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos controle e experimental de seus respectivos horários. As letras acima das barras representam a variação entre os diferentes tempos de exposição. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média. A – Superóxido dismutase (SOD); B – Catalase (CAT); C – Glutaciona peroxidase (GPX); D – Glutaciona redutase (GR); E- Glutaciona s-transferase (GST); F - Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

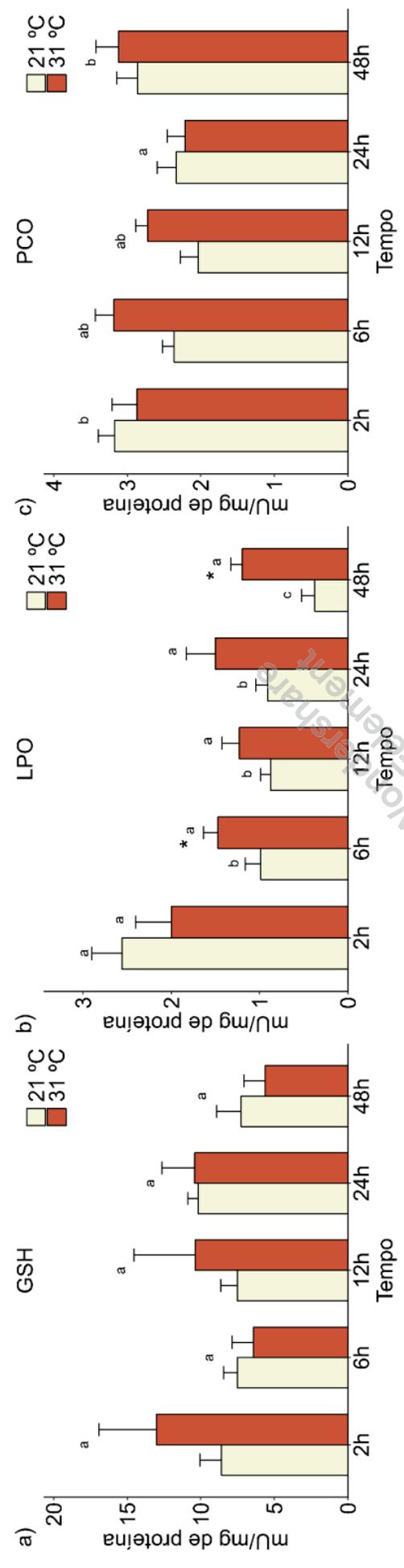
3.1.2 Marcadores de danos e concentração de GSH no encéfalo de *P. bifasciatus*

No encéfalo de *P. bifasciatus* os níveis de LPO (figura 5-B) apresentaram diferença na interação entre as variáveis tempo e temperatura ($p = 0.0081$) em 6 e 48 horas de exposição. Em ambos os tempos de exposição a concentração de LPO foi maior em 31°C.

Os níveis de GSH (figura 5-A) e de PCO (figura 5-C) não apresentaram variação significativa na interação entre as variáveis tempo e temperatura.



FIGURA 5. CONCENTRAÇÃO DE GSH E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO ENCÉFALO DE *Psalidodon bifasciatus*



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Níveis encefálicos dos marcadores de danos oxidativos e de GSH em *Psalidodon bifasciatus* exposto a choque térmico de alta temperatura (31°C) e seus respectivos controles (21°C). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre controle e tratamento de seus respectivos horários. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média. As letras acima das barras representam a variação entre os tempos de exposição. A – Glutaciona reduzida (GSH); B – Lipoperoxidação (LPO); C – Proteínas carboniladas (PCO).

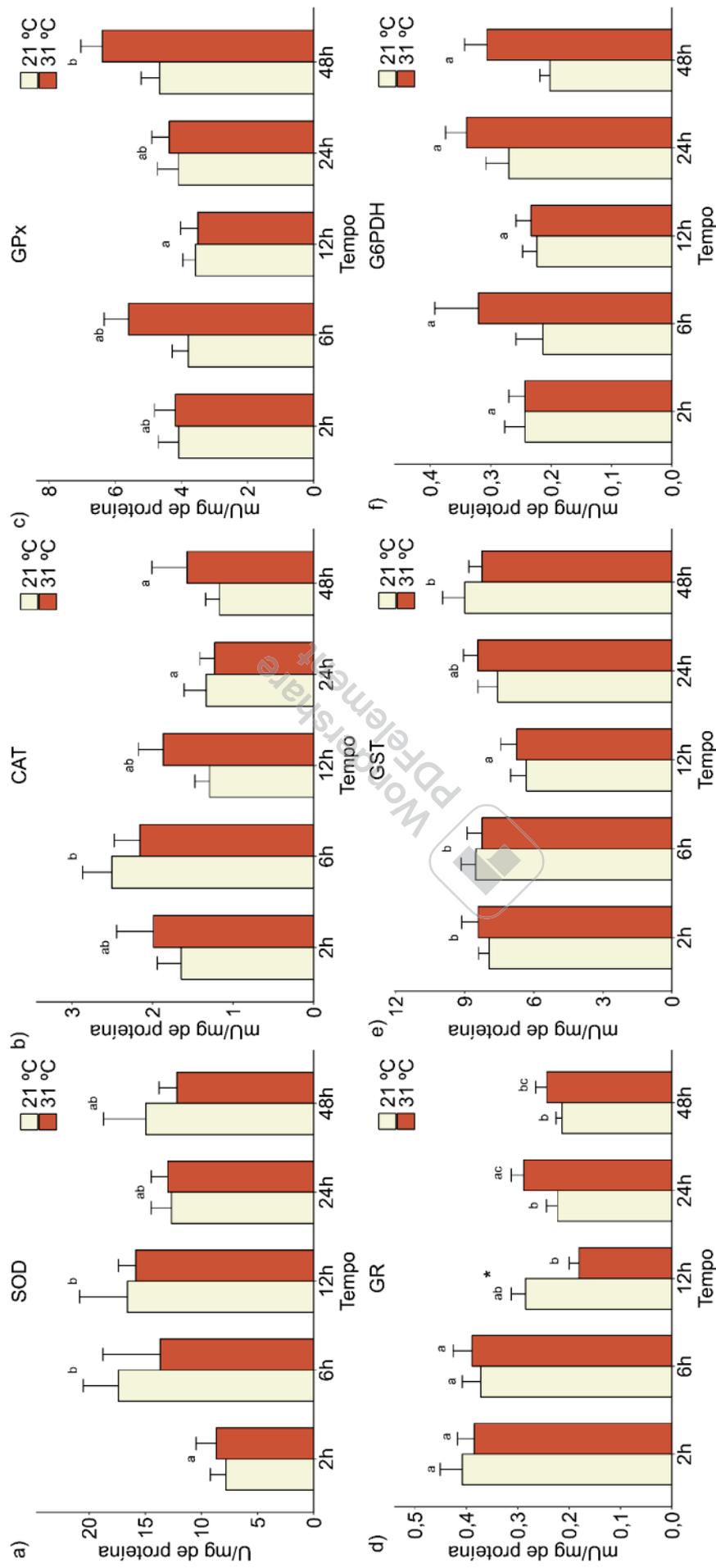
3.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA (31°C) NO MÚSCULO DE *P. bifasciatus*

3.2.1 Enzimas do sistema de defesa antioxidante no músculo de *P. bifasciatus*

No músculo de *P. bifasciatus* a atividade da GR (figura 6-D) variou ($p = 0.0031$) em 12 horas de exposição, sendo que, em 21°C a atividade foi maior do que em 31°C.

As atividades das enzimas SOD (figura 6-A), CAT (figura 6-B), GPx (figura 6-C), GST (figura 6-E), e a G6PDH (figura 6-F) não apresentaram variação significativa na interação entre tempo e temperatura, entre os grupos controles (21°C) e experimentais (31°C).



FIGURA 6. A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO MÚSCULO DE *Psalidodon bifasciatus*

FONTE: A autora (2022).

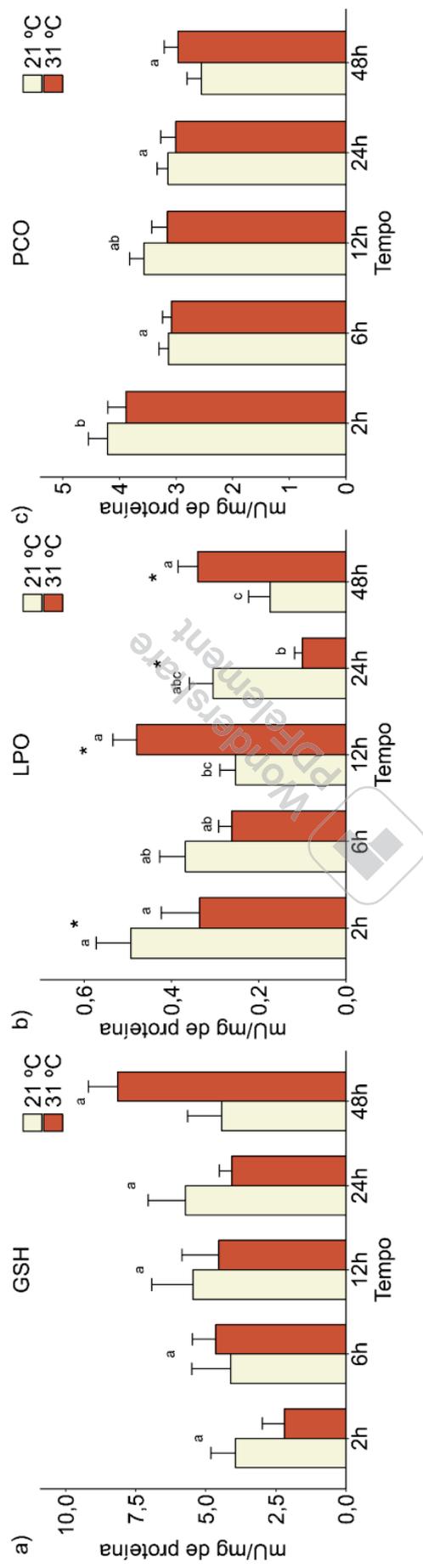
NOTA: Atividade das enzimas de defesa antioxidante no músculo de *Psalidodon bifasciatus* exposto a choque térmico de alta temperatura (31°C) e seus respectivos controles (21°C). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre grupo controle e experimental. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média. As letras acima das barras representam a variação entre os diferentes tempos de exposição. A – Superóxido dismutase (SOD); B - Catalase (CAT); C - Glutaciona peroxidase (GPx); D - Glutaciona redutase (GR); E - Glutaciona s-transferase (GST); F - Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

3.4.2 Marcadores de danos e concentração de GSH no músculo de *P. bifasciatus*

As concentrações da LPO (figura 7-B) variou na interação entre tempo e temperatura ($p = 0,000013$). Essa variação ocorreu em 2, 12, 24 e 48 horas de exposição. Em 12 e 48 horas os níveis de LPO foram maiores em 31°C e em 2 e 24 horas os níveis de LPO foram maiores em 21°C.

As concentrações de GSH (figura 7-A) e PCO (figura 7-D) não apresentaram variação na interação entre tempo e temperatura.



FIGURA 7. CONCENTRAÇÃO DE GSH E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO MÚSCULO DE *PSALIDODON BIFASCIATUS*

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Níveis dos marcadores de danos oxidativos e de GSH no músculo de *Psalidodon bifasciatus* exposto a choque térmico de alta temperatura (31°C) e seus respectivos controles (21°C). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos controle e experimental de seus respectivos horários. As letras acima das barras representam a variação entre os tempos de exposição. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média. A – Glutationa reduzida (GSH); B – Lipoperoxidação (LPO); C – Proteínas carboniladas (PCO).

3.3. EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA (31°C) NO CORAÇÃO DE *P. bifasciatus*

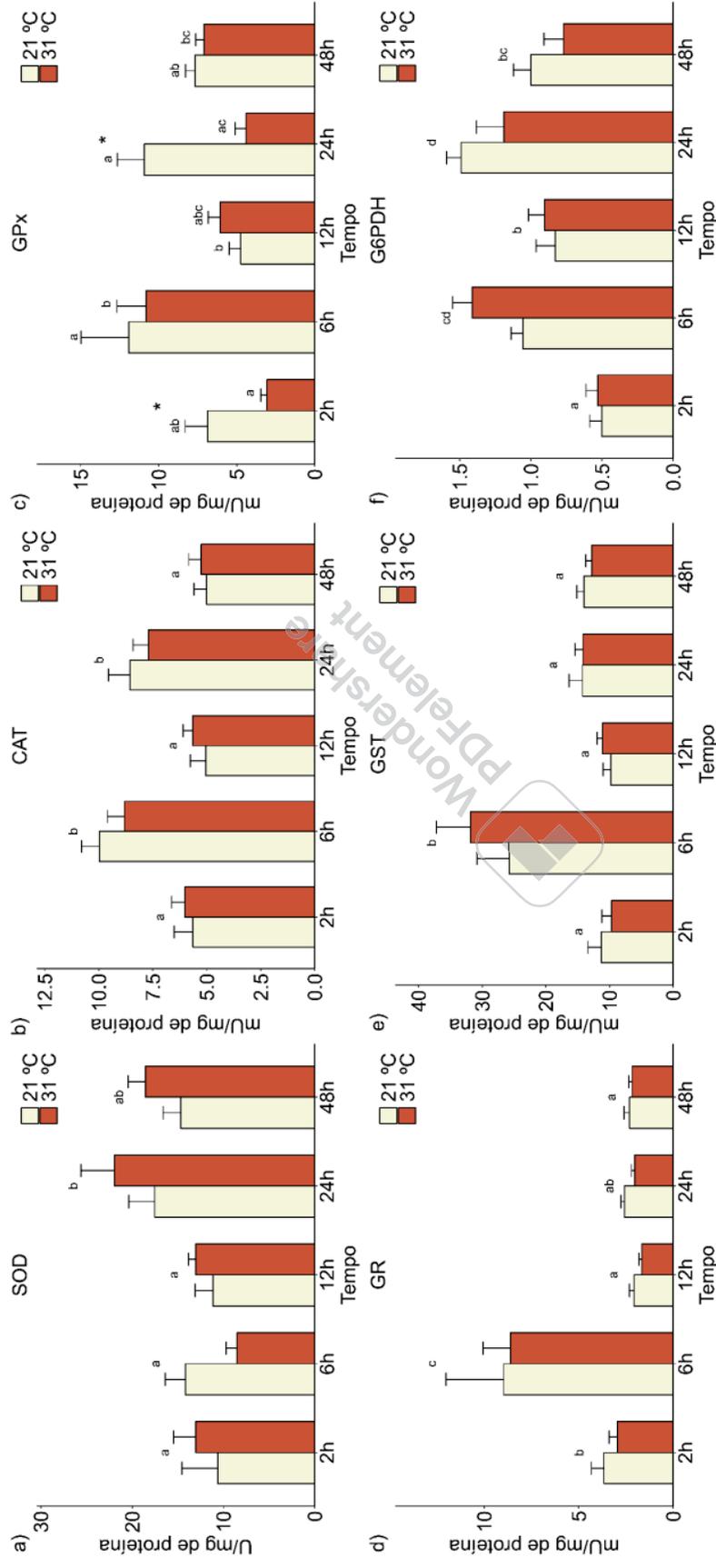
3.4.2 Enzimas do sistema de defesa antioxidante no coração de *P. bifasciatus*

No coração de *P. bifasciatus* a atividade da GPx (figura 8-C) variou na interação entre tempo e temperatura em 2 e 24 horas ($p = 0.0015$), e em ambos os tempos de exposição a atividade foi maior em 21°C quando comparado com 31°C.

As enzimas SOD (figura 8-A), CAT (figura 8-B), GR (figura 8-D), GST (figura 8-E) e G6PDH (figura 8-F) não apresentaram variação na interação tempo e temperatura sob nenhum período de exposição.



FIGURA 8.ATIVIDADE DAS ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO CORAÇÃO DE *Psalidodon bifasciatus*



FONTE: A autora (2022).

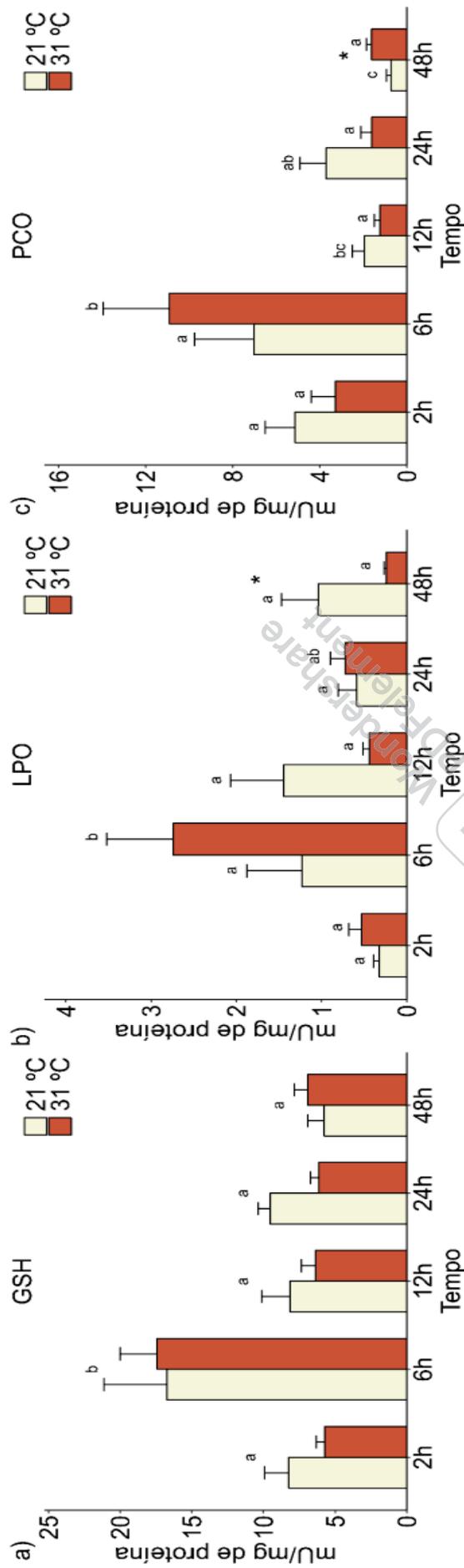
NOTA: Atividade das enzimas de defesa antioxidante no coração de *Psalidodon bifasciatus* exposto a choque térmico de alta temperatura (31°C) e seus respectivos controles (21°C). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre grupo controle e experimental. As letras acima das barras representam a variação entre os diferentes tempos de exposição. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média. A - Superóxido dismutase (SOD); B - Catalase (CAT); C - Glutaciona peroxidase (GPx); D - Glutaciona redutase (GR); E- Glutaciona s-transferase (GST); F - Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

3.4.3 Marcadores de dano celular e níveis de GSH no coração de *P. bifasciatus*

No coração de *P. bifasciatus* as concentrações de LPO (figura 9-B) apresentou variação na interação tempo e temperatura ($p = 0.0084$) em 48 horas. Em 21°C a concentração de LPO foi maior quando comparado a 31°C. A concentração de PCO (figura 9-C) variou na interação tempo e temperatura ($p = 0.029$) em 48 horas, e apresentou maiores níveis em 31°C quando comparado com 21°C.

As concentrações de GSH (figura 9-A) e PCO (figura 9-C) não apresentaram variação na interação entre tempo e temperatura.



FIGURA 9. CONCENTRAÇÃO DE GSH E MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS NO CORAÇÃO DE *Psalidodon bifasciatus*

FONTE: A autora (2022).

NOTA: Níveis dos marcadores de danos oxidativos e de GSH no coração de *Psalidodon bifasciatus* exposto a choque térmico de alta temperatura (31°C) e seus respectivos controles (21°C). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre controle e experimental de seus respectivos horários. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média. As letras acima das barras representam a variação entre os tempos de exposição. A – Glutathiona reduzida (GSH); B – Lipoperoxidação (LPO); C – Proteínas carboniladas (PCO).

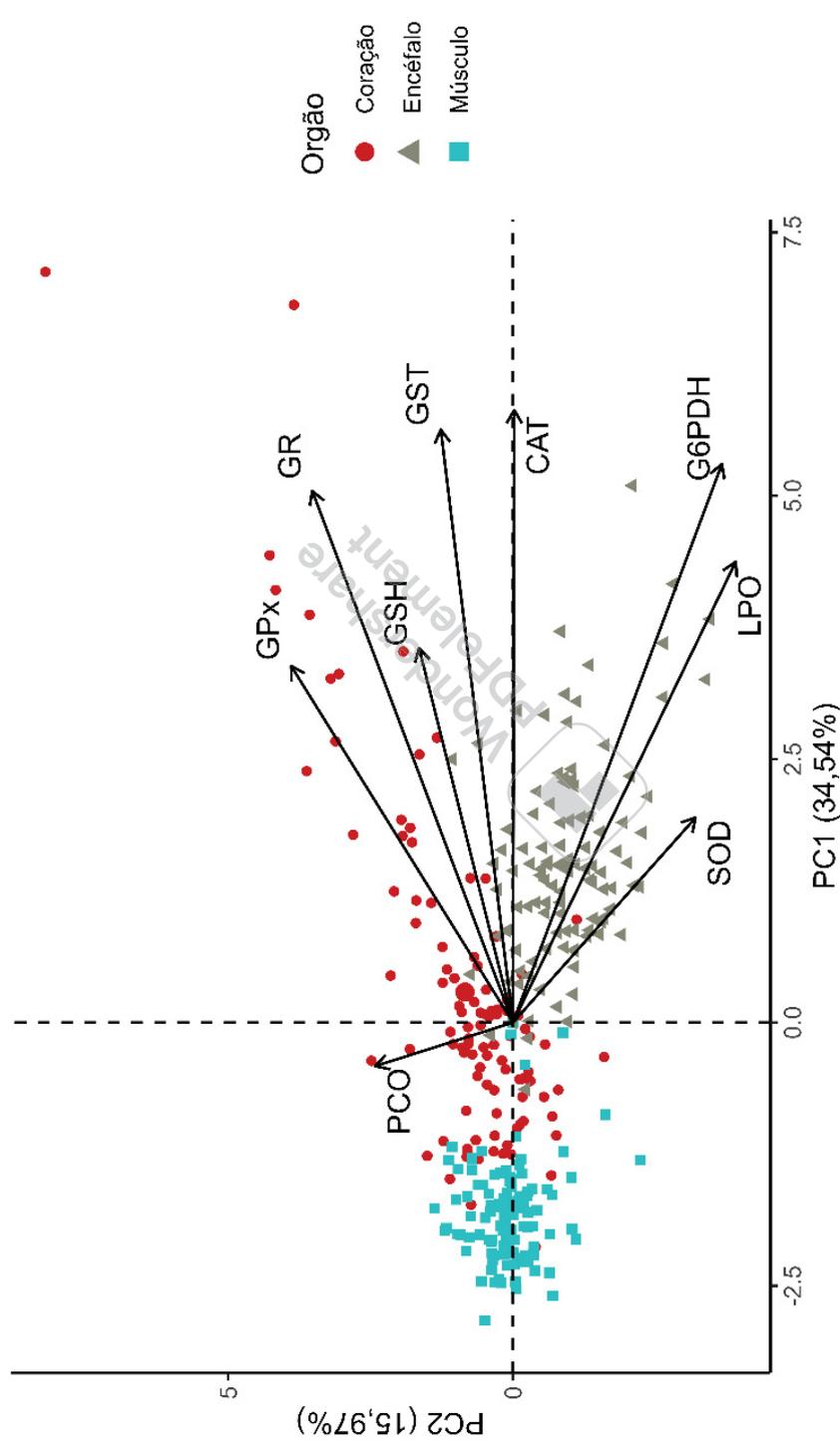
3.4. CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM *P. bifasciatus*: VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS

3.4.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

Os biomarcadores do encéfalo, músculo e coração de *P. bifasciatus* submetidos ao choque térmico de 31°C foi sumarizado em 50,51% na PCA. A variação dos dados foi explicada no primeiro eixo com 34,54% e no segundo eixo com 15,97%. A distribuição dos dados do encéfalo associou-se aos biomarcadores SOD, CAT, G6PDH, CAT e GST, enquanto a distribuição do coração foi associada a GSH, GPx, GR e PCO. Para o músculo, a distribuição dos dados não apresentou uma relação direta com os biomarcadores, com exceção da PCO.



FIGURA 10. BIPLLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTE PRINCIPAIS (PCA) DOS BIOMARCADORES NO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE *P. bifasciatus*.



FONTE: A autora (2022).

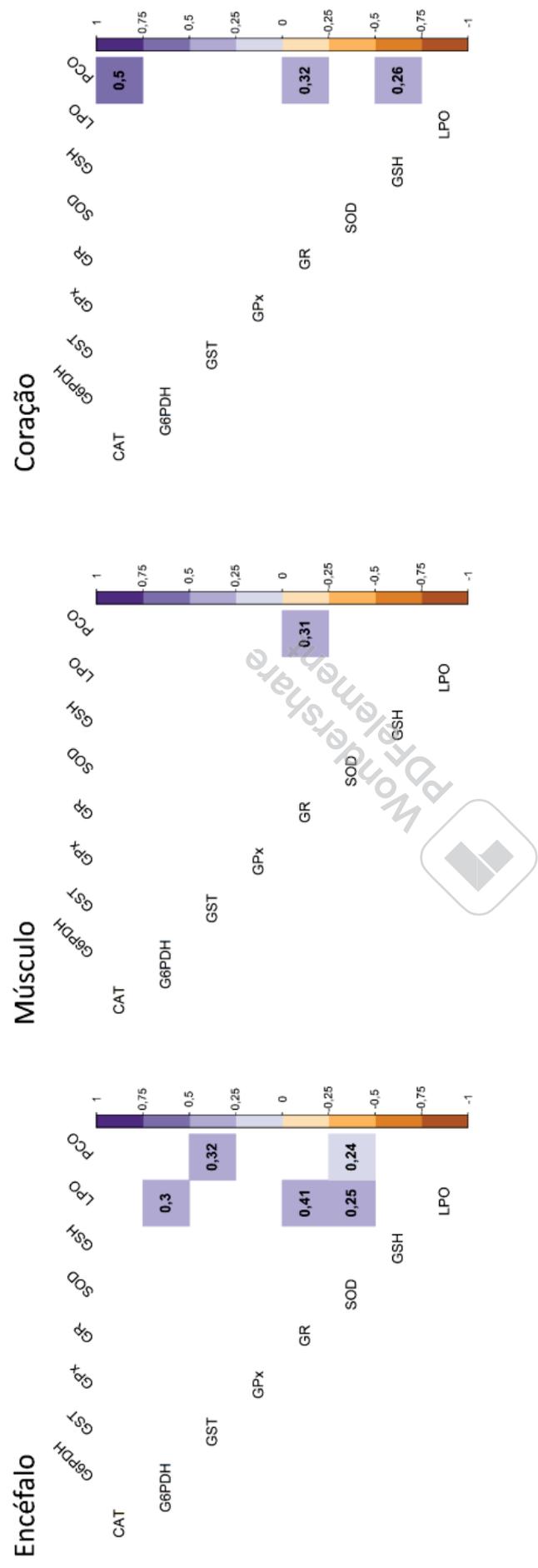
NOTA: Gráfico da análise de componentes principais (PCA) dos biomarcadores do encéfalo, coração e músculo de *P. bifasciatus* exposto ao choque térmico de 31 °C. Superóxido dismutase (SOD); Catalase (CAT); Glutathione peroxidase (GPx); Glutathione reductase (GR); Glutathione s-transferase (GST); Glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); Glutathione reduzida (GSH); Lipoperoxidação (LPO) e Proteínas carboniladas (PCO).

3.4.2 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE BIOMARCADORES DE DANOS E O SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE EM *P. bifasciatus*.

Na correlação de *spearman*, foi avaliado a correlação dos marcadores de danos oxidativos com os biomarcadores do sistema de defesa antioxidante. Dessa forma, foi observado que a PCO se correlacionou positivamente com a atividade da CAT e GR e os níveis de GSH no coração; GR no músculo e GST e SOD no encéfalo. Da mesma forma, a LPO correlacionou apenas com G6PDH, SOD e GR no encéfalo (figura 11).



FIGURA 11. VALORES DE CORRELAÇÃO NO ENCEFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE *PSALIDODON BIFASCIATUS*



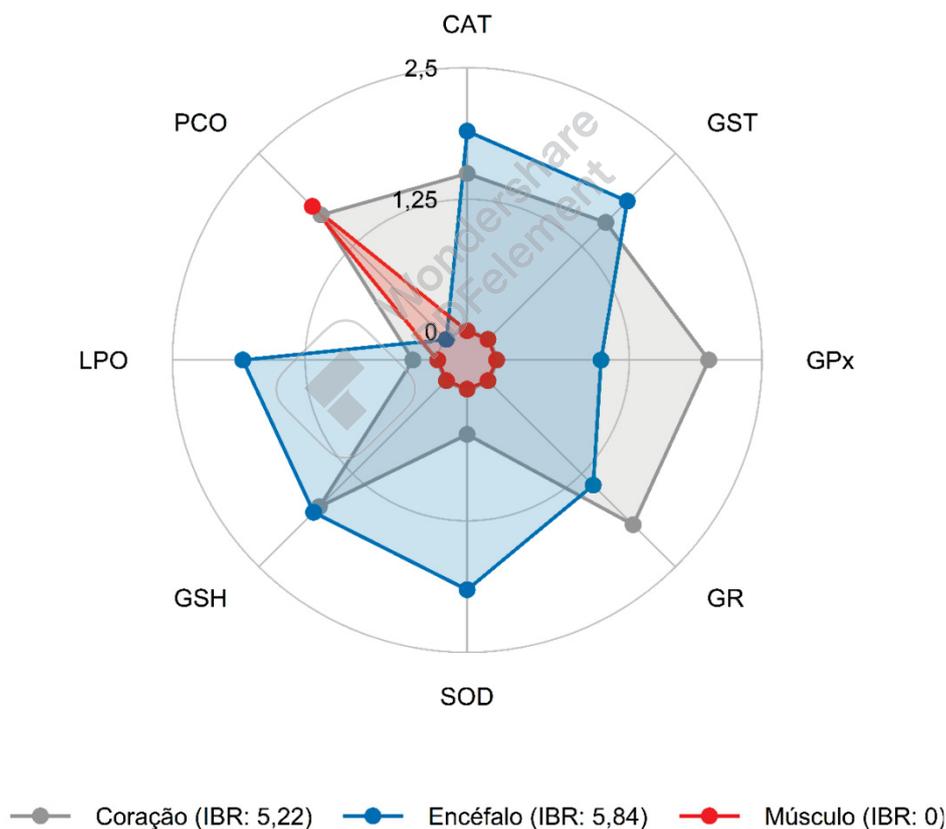
FONTE: A autora (2022).

NOTA: Valores de correlação no encefalo, músculo e coração de *P. bifasciatus* expostos ao choque térmico de alta temperatura (31°C). Superóxido dismutase (SOD); Catalase (CAT); Glutaciona peroxidase (GPx); Glutaciona redutase (GR); Glutaciona s-transferase (GST); Glutaciona reduzida (G6PDH); Glutaciona reduzida (GSH); Lipoperoxidação (LPO) e Proteinas carboniladas (PCO).

3.4.3 RESPOSTA DOS BIOMARCADORES INTEGRADOS (IBR) DO ENCÉFALO, CORAÇÃO E MÚSCULO DE *P. bifasciatus*

Ao combinar os diferentes marcadores relacionados ao sistema de defesa antioxidante dos três órgãos, verificou-se que o encéfalo apresentou uma maior resposta ao estresse térmico de 31°C, com valor médio de IBR em 5,84 seguido do coração com o valor de IBR em 5,22. Porém, o músculo de *P. bifasciatus* não apresentou uma resposta ao estresse térmico, obtendo o valor médio de IBR mínimo (figura 12).

FIGURA 12 VALORES DE IBR DOS BIOMARCADORES DO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO ENCÉFALO, MÚSCULO E CORAÇÃO DE DE *P. BIFASCIATUS*



FONTE: A autora (2022).

NOTA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) comparando o valor de resposta de cada órgão analisado (encéfalo, coração e músculo) após exposição ao choque térmico de alta temperatura (31°C). Superóxido dismutase (SOD); Catalase (CAT); Glutaciona peroxidase (GPx); Glutaciona redutase (GR); Glutaciona s-transferase (GST); Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH); Glutaciona reduzida (GSH); Lipoperoxidação (LPO) e Proteínas carboniladas (PCO).

4 DISCUSSÃO

Os efeitos do choque térmico de alta temperatura (31°C) no sistema de defesa antioxidante do encéfalo, músculo e coração de *P. bifasciatus* foram analisados durante 2, 6, 12, 24 e 48 horas de exposição. Para avaliar esses efeitos foi mensurado a atividade de enzimas biomarcadoras de estresse oxidativo (SOD, CAT, GPx, GR, GST e G6PDH), concentração de glutathiona reduzida (GSH) e danos celular (PCO e LPO).

Os resultados apresentaram diferenças na interação entre as variáveis, tempo e temperatura, isto é, grupo controle (21°C) e grupo experimental (31°C) nos três tecidos analisados. As variações que ocorreram entre os tempos de exposição, podem estar associadas a variabilidade dos indivíduos (RESENDE *et al.*, 2022; SCHLEGER *et al.*, 2022), devido a isto, cada tempo de exposição teve seu respectivo controle, buscando amenizar os ruídos nos experimentos.

A percentagem de mortalidade foi de 4,17% (5 indivíduos) no decorrer do experimento. Essa taxa de mortalidade está de acordo com o esperado para condições experimentais (<10%) (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2015) e podem estar associado a coleta e transporte dos indivíduos.

4.1 ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANOS E CONCENTRAÇÃO DE GSH NO ENCÉFALO DE *P. bifasciatus*

O encéfalo é o órgão responsável por iniciar a ativação dos mecanismos fisiológicos envolvidos na percepção dos estressores, uma vez que, estes são percebidos pelo sistema nervoso central (PRZEPIURA *et al.*, 2019a) e posteriormente ocorre a ativação dos mecanismos celulares de resposta ao estresse. Essa característica juntamente com o aumento da temperatura faz com que este tecido apresente alta demanda metabólica devido aos princípios termodinâmicos já conhecidos (BREER; RAHMANN, 1974; PRZEPIURA *et al.*, 2019a; TSENG *et al.*, 2011). Dessa forma, o consumo de oxigênio é aumentado ocasionando maior produção de EROs (LUSHCHAK, 2011; PRZEPIURA *et al.*, 2019a).

No encéfalo de *P. bifasciatus* a atividade da CAT reduziu em 12 e 48 horas de exposição a 31°C, e essa redução de atividade frente ao estresse térmico também

foi registrada por outros autores (KONO; FRIDOVICH, 1982; WILHELM, 1996; ATLI *et al.* 2006; MADEIRA *et al.* 2016). Apesar da CAT ser considerada uma enzima da primeira linha de defesa contra EROs, neutralizando O_2^* em H_2O_2 que é menos nocivo a célula, a CAT é considerada uma enzima sensível quando há superprodução de EROs, dessa forma alguns autores sugerem que a supressão da CAT pode estar associada ao aumento de EROs no ambiente celular (AHMAD *et al.*, 2009; MARIA *et al.*, 2009; MIEIRO *et al.*, 2011). Padrões de diminuição da atividade da CAT também foram encontrados por Bagnyukova *et al.*, (2005a) no encéfalo de *Carassius auratus* expostos a contaminantes ambientais. Os mesmos sugerem que a depleção da CAT leva ao estresse oxidativo, aumentando os níveis de MDA indicando lipoperoxidação no tecido encefálico, assim como encontrado neste experimento. Outro cenário possível para a diminuição da atividade da CAT é a inativação térmica. KAZMI *et al.*, (2022) defendem que a taxa de reação das enzimas é dependente da temperatura, sendo que, em temperaturas baixas a taxa de reação sobe conforme a temperatura aumenta, porém, após chegar ao estado “ótimo” o aumento da temperatura faz com que as taxas de reação decaiam rapidamente. Dessa forma, a sensibilidade térmica varia de acordo com as especificidades de cada organismo analisado. Nesse caso, 31°C poderia ser considerado acima da temperatura ótima para *P. bifasciatus* e causando a inativação da CAT.

Um nível basal de EROs é essencial para manutenção do funcionamento normal dos tecidos, uma vez que, EROs agem também como moléculas sinalizadoras importantes na sinalização redox (AA, 1995; BAGNYUKOVA *et al.*, 2005). O encéfalo possui alto teor de lipídios (JIANG *et al.*, 2014), dessa forma, a oxidação dos lipídios pode ser considerada uma excelente ferramenta para averiguar se o organismo está exposto a condição de estresse oxidativo (CALABRESE; BATES; GIUFFRIDA STELLA, 2000; KUBRAK *et al.*, 2011; MARTTILA; RIIYTT; LORENTZ, 1988). Aqui foram verificados indícios de estresse oxidativo causado pela alta temperatura, e esse estresse é indicado pela alteração nos níveis de LPO em 6 e 48 horas, onde o grupo experimental (31°C) apresentou maior concentração de lipídios peroxidados em ambos tempos de exposição. Dessa forma o que parece estar acontecendo é que a alta temperatura acarretou na inativação da CAT, diminuindo a eficácia de neutralização de EROs e ocasionando danos nas cadeias lipídicas.

Além disso, Madeira, *et al.*, (2016) em seu trabalho com *Amphiprion ocellaris* relatou a diminuição da atividade da CAT após 7 dias de exposição dos peixes a alta temperatura (32°C). Os autores relacionam esse resultado com a capacidade de aclimação dos peixes após um evento de estresse, aumentando a atividade antioxidante para ajustar seu metabolismo a homeostase e posteriormente diminuindo para atividades semelhantes ou menores que os níveis dos grupos controles. Outro cenário possível para a diminuição da atividade da CAT é a ação de outros antioxidantes do sistema de defesa. Essa ideia é abordada por Bagnyukova, *et al.*, (2005b) estudando *C. auratus*. Dessa forma, a primeira opção para compensar a diminuição na atividade da CAT seria o aumento da atividade da GPx, que também é responsável por neutralizar H₂O₂ (MIEIRO *et al.*, 2011). Porém, os resultados deste estudo não indicam essa compensação, uma vez que a atividade da GPx permaneceu constante durante todo o bioensaio.

Assim como a GPx, os biomarcadores dependentes de glutathione (GR, GST, G6PDH) bem como a SOD não apresentaram alteração no encéfalo de *P. bifasciatus*. WU *et al.*, (2015) sugeriram que o encéfalo possui menor suscetibilidade a apoptose celular e um sistema antioxidante capaz de lidar com alterações da temperatura por curtos períodos de tempo.

4.2 ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANOS E CONCENTRAÇÃO DE GSH NO CORAÇÃO DE *P. bifasciatus*

Estudos indicam que, em peixes, o coração é o órgão mais sensível ao aumento da temperatura do meio e isso estaria associado com a diminuição da disponibilidade de oxigênio na corrente sanguínea, levando a alteração no desempenho cardíaco e menor oxigenação de outros tecidos (IFTIKAR; HICKEY, 2013; PORTNER; KNUST, 2007; SOUZA, *et al.*, 2018).

Neste trabalho houve redução na atividade da GPx em 2 e 24 horas e dos níveis de LPO em 48 horas de exposição ao choque térmico. BAGNYUKOVA; CHAHRAK; LUSHCHAK, (2006) também encontraram diminuição nos níveis de peroxidação lipídica quando avaliaram o fígado de *Carassius auratus* onde os autores defendem que o aumento da atividade da catalase degradando LOOH diminuiu o substrato para a reação de Fenton, acarretando na redução dos níveis de

peroxidação lipídica. Porém, para esse processo estar ocorrendo as enzimas responsáveis pelo processo detox de H_2O_2 (CAT e GPx) deveriam apresentar atividade aumentada. No caso da GPx, a diminuição em sua atividade, pode estar possivelmente relacionada ao processo de síntese das diferentes isoformas. Em peixes, pelo menos 3 isoformas foram identificadas, sendo elas: GPx1 (clássica ou citosólica), GPx3 (pGPx ou plasmática) e GPx4 (phGPx ou hidroperóxido fosfolipídico), e a análise utilizada neste trabalho, é sensível à estas 3 isoformas. Todas essas isoformas são dependentes de um resíduo de seleniocisteína (SeCys) e sua incorporação na proteína é mediado pelo tRNA SeCys (HERBETTE; ROECKEL-DREVET; DREVET, 2007). Desse modo, qualquer alteração ou dano no sistema de transcrição do tRNA SeCys, ou na incorporação de SeCys às enzimas, acarretaria em uma diminuição das isoformas de GPx, o que poderia explicar nossos resultados que demonstram uma redução da atividade da GPx.

A redução dos níveis da LPO também pode estar relacionada as diferentes isoformas da GPx. Levando em consideração que a isoforma phGPx além de reduzir H_2O_2 também reage com ácidos graxos peroxidados e lipoproteínas (HERMES-LIMA, 2004), a phGPx poderia estar neutralizando os produtos da peroxidação lipídica, fazendo com que os níveis de produtos finais da peroxidação lipídica nas amostras experimentais ficassem menores quando comparados com os níveis das amostras controle. Assim como a GPx, as peroxirredoxinas (Prx) também fazem a neutralização de hidroperóxidos, e estão presentes em abundância no ambiente celular (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2021). Essas Prxs poderiam estar neutralizando os produtos da peroxidação lipídica, fazendo com os níveis de LPO ficassem menores quando comparados com o grupo controle. Isso explicaria também o porque a GPx não aumentou sua atividade com o estresse térmico, uma vez que, as Prxs podem ser mais sensíveis na neutralização de EROs no tecido cardíaco, porém, não podemos afirmar tal cenário uma vez que não foi analisado a atividade da Prx neste estudo.

Outro ponto, é que os níveis de PCO aumentaram em 48 horas a $31^\circ C$. Isso indica que está ocorrendo a carbonilação de proteínas e, dessa forma, pode ocorrer a alteração na transcrição de tRNA ou a inativação das enzimas protetoras, causando a condição de estresse oxidativo. LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, (2006) também relacionam o aumento dos níveis de proteínas carboniladas com a inativação de enzimas do sistema antioxidante em *C. auratus*. Os autores defendem

que as EROs têm a capacidade de interagir diretamente com as proteínas e acarretar na perda de função das mesmas. Dessa forma, isso explicaria a não ativação das enzimas antioxidantes no coração de *P. bifasciatus*. Os níveis de PCO aumentaram apenas no coração, e esses dados vão de acordo com que o coração dos ectotérmicos tende a apresentar maior suscetibilidade frente ao aumento da temperatura (IFTIKAR; HICKEY, 2013), mesmo poucos graus acima da temperatura máxima do ambiente. Outra explicação para essa sensibilidade do tecido cardíaco é que alta temperatura afeta a sinalização celular e pode comprometer o marcapasso cardíaco (HARPER; NEWTON; WATT, 1995; IFTIKAR; HICKEY, 2013), podendo afetar a oxigenação dos tecidos.

4.3 ENZIMAS DE DEFESA ANTIOXIDANTES E MARCADORES DE DANOS E CONCENTRAÇÃO DE GSH NO MÚSCULO DE *P. bifasciatus*

Nos peixes o músculo esquelético apresenta diversas funções, dentre elas, locomoção e reserva de energia. Além disso, estudos indicam que o músculo exerce forte efeito na performance natatória e como reserva de energia dos peixes (EDDY; HANDY, 2012). A LPO é um dos marcadores mais utilizados em peixes para verificar a existência de danos oxidativos frente a estressores, e isso está relacionado, entre outros fatores, as quantidades de ácidos graxos poli-insaturados existentes nos peixes (KUBRAK *et al.*, 2011).

Os níveis de LPO em 2, 12, 24 e 48 horas de exposição foram alterados, sendo que, em 12 e 48 horas houve aumento e em 2 e 24 horas diminuição nos níveis de LPO quando comparado com seus respectivos controles. Isso indica que houve aumento na produção de EROs nas células musculares. Mesmo com o possível aumento de EROs em 31°C, a atividade de enzimas importantes para a defesa antioxidante da célula não aumentou a atividade. Mesmo a GR, enzima essencial no ciclo da glutathiona, o principal antioxidante não enzimático, que reduz GSSG a GSH utilizando como substrato o NADPH⁺ (SRIKANTH *et al.*, 2013), somente apresentou diminuição em 12 horas de exposição.

A redução da atividade da GR em 12 horas ocorreu concomitantemente com os maiores níveis de LPO em 31°C no mesmo tempo de exposição. Dessa forma, o que pode estar ocorrendo é a inativação do sistema de defesa antioxidante. Essa inativação é bem documentada para a enzima CAT (ATLI *et al.*, 2006;

BAGNYUKOVA *et al.*, 2007; KONO; FRIDOVICH, 1982; MADEIRA, *et al.*, 2016), porém alguns estudos, relatam que as moléculas oxidantes também têm potencial de inativar as enzimas responsáveis por sua degradação (BAGNYUKOVA; CHAHRAK; LUSHCHAK, 2006; MODESTO; MARTINEZ, 2010). Dessa forma esse processo também pode estar ocorrendo com a GR no músculo de *P. bifasciatus* acarretando em maior disponibilidade de peróxido de hidrogênio no interior celular e maior quantidade de substrato para a peroxidação lipídica.

Mesmo na ausência de alterações nos níveis de enzimas antioxidantes importante para a célula, o que parece estar acontecendo é que *P. bifasciatus* conseguiu neutralizar as EROS durante as primeiras horas de exposição ao choque térmico de 31°C, o que é corroborado pela não ativação do sistema de defesa antioxidante e pela manutenção dos níveis basais de marcadores de danos e GSH. Já em 12 horas de exposição, o sistema de defesa antioxidante mostra indícios de que o aumento de EROs está inativando enzimas e causando danos, o que é demonstrado com a redução da GR. Isso pode acarretar em uma falha na manutenção do estado redox celular (MONTEIRO; RANTIN; KALININ, 2010) e consequentemente dano oxidativos, corroborado pelo aumento nos níveis de LPO no mesmo tempo de exposição. Seguido de reestabelecimento do sistema de defesa antioxidante e redução nos níveis de LPO em 24 horas, voltando novamente a condição de estresse em 48 horas de exposição, como é indicado pelos níveis de LPO aumentados.

No músculo de *P. bifasciatus* também foi verificado que não houve alteração nas demais enzimas antioxidantes analisadas em 31°C. Isso é demonstrado pela não modulação dos biomarcadores SOD, CAT, GPx, G6PDH, GSH e PCO frente ao choque térmico. Esses resultados podem ser explicados pela plasticidade que o músculo esquelético apresenta, uma vez que, é a principal reserva de energia nos peixes, além disso, estima-se que cerca de 75% do tecido muscular é composto de fibras anaeróbicas (LERMEN *et al.*, 2004), apresentando maior plasticidade por apresentar menor respiração aeróbica (MADEIRA *et al.*, 2016; CAMPOS *et al.*, 2018).

4.4 CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA EM *P. bifasciatus*: VARIAÇÃO ENTRE ÓRGÃOS

Os diferentes padrões de respostas apresentada pelos organismos frente a um estressor indicam que a ativação dos biomarcadores de defesa antioxidante é específica para cada espécie, bem como, tecido analisado e magnitude do estressor (KUBRAK, *et al.*, 2011; MADEIRA, D. *et al.*, 2013; MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016).

A maior ativação do sistema de defesa antioxidante frente ao choque térmico em *P. bifasciatus* foi no encéfalo, seguido por coração e músculo. Esses resultados podem ser verificados através da Resposta dos Biomarcadores Integrados (IBR), onde o encéfalo foi o que apresentou maior mobilização no sistema de defesa antioxidante com valor de IBR de 5.84. Essa resposta pode estar relacionada às características específicas do órgão. Um estudo realizado em *C. auratus* comparando cérebro, fígado e rim expostos ao cobalto (KUBRAK. *et al.*, 2011), também evidenciou maior alteração nos biomarcadores do encéfalo, considerando o órgão mais impactado frente a condição de estresse oxidativo, quando comparado com fígado e rim. Levando em consideração que o encéfalo possui altos teores de lipídios e alto consumo de oxigênio (CALABRESE; BATES; GIUFFRIDA STELLA, 2000; KUBRAK, *et al.*, 2011; MARTTILA; RIIYTT; LORENTZ, 1988) é de se esperar que este órgão esteja mais propenso a sofrer impactos frente ao aumento da concentração de EROs.

Diante disso, podemos considerar que o encéfalo de *P. bifasciatus* é mais sensível ao aumento da temperatura ambiental e necessita de uma ativação dos sistemas antioxidantes mais responsivos quando comparado com músculo e coração. WU *et al.*, (2015) ao comparar o encéfalo de *Danio rerio* com brânquias e rins expostos ao choque térmico de baixa e alta temperatura também verificou que o encéfalo apresenta maior mobilização do sistema antioxidante. Padrões semelhantes foram averiguados nos notothenideos antárticos e foi associado a ativação do encéfalo, entre outros fatores, a alta demanda de oxigênio (PRZEPIURA *et al.*, 2019).

Porém, esse padrão não deve ser extrapolado, uma vez que outros estudos evidenciaram padrões diferentes para outras espécies. Um exemplo disso é o estudo realizado por MADEIRA; VINAGRE; DINIZ (2016) onde os autores relatam que para juvenis de *S. aurata* as maiores alterações no sistema de defesa antioxidante ocorreram no músculo e fígado quando comparado com encéfalo, brânquias e intestino. Esses diferentes padrões corroboram com a ideia de que as

respostas frente ao estressor são distintas entre as espécies (KUBRAK *et al.*, 2011; MADEIRA, D. *et al.*, 2013; MADEIRA, *et al.*, 2016).

Na Análise de Componentes Principais (PCA) o encéfalo foi mais associado aos biomarcadores SOD, CAT, G6PDH e GST. Esse resultado é corroborado parcialmente por PRZEPIURA e colaboradores (2019), onde é proposto que os biomarcadores dependentes de glutathione tendem a ser mais responsivos nas respostas ao estresse térmico para o encéfalo. Aqui foi encontrado que o coração apresentou ativação dos biomarcadores dependentes de glutathione prioritariamente, uma vez que a PCA associou a GSH, GPx, GR e PCO ao coração. Isso pode estar relacionado ao ciclo da glutathione e a importância desse antioxidante de baixo peso molecular na manutenção do estado redox celular (MONTEIRO; RANTIN; KALININ, 2010; SRIKANTH *et al.*, 2013).

O músculo de *P. bifasciatus* foi o órgão que menos sofreu alteração frente ao estresse térmico de alta temperatura. O valor de IBR para o músculo foi de 0, o choque térmico de 31°C não mobilizou o sistema de defesa antioxidante, e além disso, os dados da PCA indicaram que o único biomarcador que apresentou relação direta com o músculo foi a PCO. Essa resposta pode estar associada com a plasticidade da musculatura esquelética para responder a estressores, já que a musculatura esquelética compõe cerca de 40 a 60% de toda massa corporal dos peixes (LERMEN *et al.*, 2004) e tem maior contato com o ambiente, dessa forma, a adaptação e alta plasticidade podem ser uma opção para lidar com as mudanças ambientais. Outro fator é que tecido que apresentam alta taxa de oxigenação tendem a apresentar maior capacidade de neutralizar EROs, uma vez que, precisam lidar com esse estressor com maior frequência, já que são liberados na cadeia transportadora de elétrons (NEUROHR; PAULSON; KINSEY, 2021). Dessa forma, possuem uma taxa basal de defesa maior que outros tecidos

O encéfalo, coração e músculo de *P. bifasciatus* responderam de forma distinta frente ao estresse de alta temperatura. Apesar de suas respectivas diferenças frente ao estressor os três órgãos apresentaram indícios de estresse oxidativo. A peroxidação de lipídios tende a ser comumente utilizada como fator de estresse em organismos aquáticos, uma vez que, estes apresentam grande quantidade de lipídios com resíduos de ácidos graxos poliinsaturados (LUSHCHAK, 2011).

As análises de correlação foram realizadas considerando os marcadores de danos e biomarcadores de defesa antioxidante. Todos os três tecidos analisados apresentaram correlações positivas, dessa forma a ativação/inativação do biomarcador de defesa ocorre concomitantemente com o marcador de dano associado. Nota-se que a única enzima que não apresentou correlação com nenhum marcador de dano em nenhum dos órgãos foi a GPx. A PCO se correlacionou com biomarcadores dos três órgãos analisados enquanto a LPO se correlacionou apenas com a G6PDH, SOD e GR do encéfalo.

5. CONCLUSÃO

O choque térmico de alta temperatura (31°C) foi capaz de causar estresse oxidativo em *P. bifasciatus*. Isso é evidenciado principalmente pelo aumento nos níveis de LPO no encéfalo e músculo indicando danos às membranas lipídicas e aumento de PCO no coração indicando dano às proteínas. Dessa forma, os três órgãos apresentaram sinais de estresse oxidativo, com alteração da CAT e LPO no encéfalo, GPx, LPO e PCO no coração e GR e LPO no músculo.

Assim como esperado, encontramos que o encéfalo foi o órgão que apresentou maior alteração nos marcadores de estresse oxidativo quando comparado com coração e músculo. Da mesma forma, esperávamos que o músculo fosse apresentar menores alterações devido a sua alta plasticidade, o que foi corroborado aqui. Dessa forma, concluímos que *P. bifasciatus* possui estratégias fisiológicas e mecanismos antioxidantes que o permite se aclimatar quando exposto por curtos períodos de tempo (até 48 horas) ao choque térmico (31°C).

REFERÊNCIAS

AA, B. Paradoxes of cerebral oxidative metabolism. **Biochemistry**, vol. 60, p. 1536–1542, 1995. Available at: [https://www.semanticscholar.org/paper/Paradoxes-of-cerebral-oxidative-metabolism-](https://www.semanticscholar.org/paper/Paradoxes-of-cerebral-oxidative-metabolism-Aa/b904472f540489365f600a0808d3138eb1b58e74)

[Aa/b904472f540489365f600a0808d3138eb1b58e74](https://www.semanticscholar.org/paper/Paradoxes-of-cerebral-oxidative-metabolism-Aa/b904472f540489365f600a0808d3138eb1b58e74).

AEBI, H. Catalase in Vitro. **Methods in Enzymology**, vol. 105, no. C, p. 121–126, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

AHMAD, I.; MARIA, V. L.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) enzymatic and non-enzymatic antioxidant responses following 17 β -estradiol exposure. **Ecotoxicology**, vol. 18, no. 8, p. 974–982, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0369-3>.

AKAGAWA, M. Protein carbonylation: molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches. **Free Radical Research**, vol. 55, no. 4, p. 307–320, 2021. DOI 10.1080/10715762.2020.1851027. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/10715762.2020.1851027>.

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**, vol. 38, p. 45–55, Aug. 2015. <https://doi.org/10.1007/s12237-014-9792-7>.

ATLI, G.; ALPTEKIN, Ö.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺ in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, vol. 143, no. 2, p. 218–224, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2006.02.003>.

BAGNYUKOVA, T. V.; CHAHRAK, O. I.; LUSHCHAK, V. I. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. **Aquatic Toxicology**, vol. 78, no. 4, p. 325–331, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.04.005>.

BAGNYUKOVA, T. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Adaptive response of antioxidant enzymes to catalase inhibition by aminotriazole in goldfish liver and kidney. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 142, no. 3, p. 335–341, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.08.003>.

BAGNYUKOVA, T. V.; VASYLKIV, O. Y.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. **Brain Research**, vol. 1052, no. 2, p. 180–186, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.06.002>.

BAGNYUKOVA, T. V.; DANYLIV, S. I.; ZIN'KO, O. S.; LUSHCHAK, V. I. Heat shock induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. **Journal of Thermal Biology**, vol. 32, no. 5, p. 255–260, Aug. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.014>.

BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the stress responses in fish. **Frontiers in Endocrinology**, vol. 10, no. FEB, p. 1–12, 2019. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00062>.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, vol. 23, no. 4, p. 629–643, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732010000400013>.

BARLOW-WALDEN, L. R.; REITER, R. J.; ABE, M.; PABLOS, M.; MENENDEZ-PELAEZ, A.; CHEN, L. D.; POEGGELER, B. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. **Neurochemistry International**, vol. 26, no. 5, p. 497–502, 1995. [https://doi.org/10.1016/0197-0186\(94\)00154-M](https://doi.org/10.1016/0197-0186(94)00154-M).

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, vol. 29, no. 1, p. 113–123, 2006. <https://doi.org/10.1590/s0100-40422006000100021>.

BARTON, B. A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, vol. 42, no. 3, p. 517–525, 2002. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.

BATILANI-FILHO, M.; ROMEO, B.; BATISTA, M.; BECKER, E. C.; NUNES, L.; SEGAL, B. Composição da ictiofauna em um gradiente de perturbação ao longo de um riacho costeiro. **Ecologia de campo: abordagens no mar, na terra e em águas continentais PPG Ecologia UFSC 2013**. [S. l.: s. n.], 2015. p. 194–2011.

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

BOX, A.; SUREDA, A.; GALGANI, F.; PONS, A.; DEUDERO, S. Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, vol. 146, no. 4, p. 531–539, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.06.006>.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An Analysis of Transformations. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, vol. 26, no. 2, p. 211–252, Jul. 1964. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1964.tb00553.x>.

BREER, H.; RAHMANN, H. Temperature effect on brain glycogen of fish. **Brain Research**, vol. 74, no. 2, p. 360–365, 1974. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90592-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90592-7).

BUENO-KRAWCZYK, A. C. D.; GUILOSKI, I. C.; PIANCINI, L. D. S.; AZEVEDO, J. C.; RAMSDORF, W. A.; IDE, A. H.; GUIMARÃES, A. T. B.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply. **Chemosphere**, vol. 135, p. 257–264, 2015. DOI 10.1016/j.chemosphere.2015.04.064. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.04.064>.

CALABRESE, V.; BATES, T. E.; GIUFFRIDA STELLA, A. M. NO Synthase and NO-Dependent Signal Pathways in Brain Aging and Neurodegenerative Disorders: The Role of Oxidant/Antioxidant Balance. **Neurochemical Research**, vol. 25, no. 9–10, p. 1315–1341, 2000. <https://doi.org/10.1023/a:1007604414773>.

CALBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione Reductase. **Methods in Enzymology**, vol. 13, no. 1955, p. 807–807, 1985. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6754-9_6982.

CAMPOS, D. F.; BRAZ-MOTA, S.; VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. **Ecological Indicators**, vol. 101, no. September 2018, p. 533–540, 2019. DOI 10.1016/j.ecolind.2019.01.051. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.051>.

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

CARDOSO, C. M.; SARTORIO, P. V.; MACHADO, A. S. D.; VIGNARDI, C. P.; ROJAS, D. C. G. C.; PASSOS, M. J. A. C. R.; ROCHA, A. J. S.; VAN NGAN, P.; GOMES, V. Hsp70 and p53 expressions and behavior of juvenile pompano, *Trachinotus carolinus* (Perciformes, Carangidae), at controlled temperature increase. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, vol. 470, p. 34–42, 2015. DOI 10.1016/j.jembe.2015.04.024. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jembe.2015.04.024>.

CHANDRA, J.; SAMALI, A.; ORRENIUS, S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 29, no. 3–4, p. 323–333, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00302-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00302-6).

CHROUSOS, G. P. Stress and disorders of the stress system. **Nature Reviews Endocrinology**, vol. 5, no. 7, p. 374–381, 2009. DOI

10.1038/nrendo.2009.106. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2009.106>.

CHUNG, K. S. Heat resistance and thermal acclimation rate in tropical tetra *Astyanax bimaculatus* of Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, vol. 57, no. 4, p. 459–463, 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1007696027169>.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; PRISCO, G. di. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: Correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, vol. 1250, no. 1, p. 76–82, 1995. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00046-W](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00046-W).

COPATTI, C. E.; BOLNER, K. C. S.; LONDERO, É. P.; DE ROSSO, F. L.; PAVANATO, M. A.; BALDISSEROTTO, B. Low dissolved oxygen levels increase stress in piava (*Megaleporinus obtusidens*): Iono-regulatory, metabolic oxidative responses. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, vol. 91, no. 3, p. 1–9, 2019. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180395>.

COX, K.; BRENNAN, L. P.; GERWING, T. G.; DUDAS, S. E.; JUANES, F. Sound the alarm: A meta-analysis on the effect of aquatic noise on fish behavior and physiology. **Global Change Biology**, vol. 24, no. 7, p. 3105–3116, 2018. <https://doi.org/10.1111/gcb.14106>.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; GALBRAITH, G. M.; BUSE, M. G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, vol. 30, no. 3, p. 235–241, 1981. <https://doi.org/10.2337/diab.30.3.235>.

DA COSTA, B. B.; STREIT JR, D. P. Estresse oxidativo e antioxidantes no de sêmen de peixes. **Ciência Animal**, vol. 29, no. 2, p. 93–109, 2019. Available at: <http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/9>. REVISÃO DE LITERATURA - 03.pdf.

DA SILVA, J. P. A.; MUELBERT, A. E.; DE OLIVEIRA, E. C.; FÁVARO, L. F. Reproductive tactics used by the Lambari *Astyanax aff. fasciatus* in three water supply reservoirs in the same geographic region of the upper Iguaçú River. **Neotropical Ichthyology**, vol. 8, no. 4, p. 885–892, 2010. <https://doi.org/10.1590/s1679-62252010000400019>.

DE OLIVEIRA, E. C.; AUACHE-FILHO, A. A.; DAMASIO, D.; GHISI, N. D. C.; MICHELS-SOUZA, M. A. Reproductive indicators of the endemic species *Astyanax bifasciatus* (Teleostei: Characidae) in a tributary of the lower Iguaçú river basin,

Brazil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, vol. 41, no. 1, p. 1–12, 2019. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v41i1.47720>.

DE OLIVEIRA, M. A.; TAIRUM, C. A.; NETTO, L. E. S.; DE OLIVEIRA, A. L. P.; ALEIXO-SILVA, R. L.; CABRERA, V. I. M.; BREYER, C. A.; DOS SANTOS, M. C. Relevance of peroxiredoxins in pathogenic microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 105, no. 14–15, p. 5701–5717, 2021. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11360-5>.

DELARIVA, R. L. **Ecologia trófica da ictiofauna do rio Iguçu Pr. Sob efeitos do represamento de Salto Caxias**. 2002. 72 f. Universidade Estadual de Maringá, 2002.

DELARIVA, R. L.; NEVES, M. P.; LARENTIS, C.; KLIEMANN, B. C. K.; BALDASSO, M. C.; WOLFF, L. L. Fish fauna in forested and rural streams from an ecoregion of high endemism, lower Iguçu River basin, Brazil. **Biota Neotropica**, vol. 18, no. 3, p. 1–12, 2018. <https://doi.org/10.1590/1676-0611-bn-2017-0459>.

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

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**, vol. 84, no. 4, p. 415–430, Oct. 2007. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2007.07.009>.

FOGAÇA, F. H. dos S.; SANTANA, L. S. OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM PEIXES: MECANISMO DE AÇÃO E PREVENÇÃO. **Archives of Veterinary Science**, vol. 14, no. 2, p. 117–127, 2009. .

FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; SOUZA, M. R. D. P.; DONATTI, L. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, vol. 187, no. 8, p. 1137–1154, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1088-3>.

FREIRE, C. A.; SOUZA-BASTOS, L. R.; CHIESSE, J.; TINCANI, F. H.; PIANCINI, L. D. S.; RANDI, M. A. F.; PRODOCIMO, V.; CESTARI, M. M.; SILVA-DE-ASSIS, H. C.; ABILHOA, V.; VITULE, J. R. S.; BASTOS, L. P.; DE OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. A multibiomarker evaluation of urban, industrial, and agricultural

exposure of small characins in a large freshwater basin in southern Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 22, no. 17, p. 13263–13277, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4585-5>.

HARPER, A. A.; NEWTON, I. P.; WATT, P. W. The effect of temperature on spontaneous action potential discharge of the isolated sinus venosus from winter and summer plaice (*Pleuronectes platessa*). **Journal of Experimental Biology**, vol. 198, no. 1, p. 137–140, 1995. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.1.137>.

HERBETTE, S.; ROECKEL-DREVET, P.; DREVET, J. R. Seleno-independent glutathione peroxidases: More than simple antioxidant scavengers. **FEBS Journal**, vol. 274, no. 9, p. 2163–2180, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05774.x>.

HERMES-LIMA, M. **Oxygen in Biology and Biochemistry: Role of Free Radicals. Functional Metabolism**, [S. l.: s. n.], 2004.

IFTIKAR, F. I.; HICKEY, A. J. R. Do Mitochondria Limit Hot Fish Hearts? Understanding the Role of Mitochondrial Function with Heat Stress in *Notolabrus celidotus*. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 5, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064120>.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, vol. 54, no. 4, p. 287–293, 2018. DOI 10.1016/j.ajme.2017.09.001. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.

IKEDA, A. K. **Desempenho produtivo e tolerância térmica de juvenis de Acará-Bandeira (*Pterophyllum scalare*) alimentados com diferentes fontes de lipídeos**. 2009. 50 f. Universidade Federal de Viçosa, 2009.

IPCC. IPCC — Intergovernmental Panel on Climate Change. 2022. Available at: <https://www.ipcc.ch/>.

JIANG, W. D.; LIU, Y.; HU, K.; JIANG, J.; LI, S. H.; FENG, L.; ZHOU, X. Q. Copper exposure induces oxidative injury, disturbs the antioxidant system and changes the Nrf2/ARE (CuZnSOD) signaling in the fish brain: Protective effects of myo-inositol. **Aquatic Toxicology**, vol. 155, no. 46, p. 301–313, 2014. DOI 10.1016/j.aquatox.2014.07.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.003>.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. factoextra: Extract and Visualize the Results

of Multivariate Data Analyses. 2020. Available at: <https://cran.r-project.org/package=factoextra>.

KAZMI, S. S. U. H.; WANG, Y. Y. L.; CAI, Y. E.; WANG, Z. Temperature effects in single or combined with chemicals to the aquatic organisms: An overview of thermo-chemical stress. **Ecological Indicators**, vol. 143, no. August, p. 109354, 2022. DOI 10.1016/j.ecolind.2022.109354. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109354>.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S transferases. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 251, no. 20, p. 6183–6188, 1976. .

KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 257, no. 10, p. 5751–5754, 1982. DOI 10.1016/s0021-9258(19)83842-5. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83842-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83842-5).

KOOLHAAS, J. M.; BARTOLOMUCCI, A.; BUWALDA, B.; DE BOER, S. F.; FLÜGGE, G.; KORTE, S. M.; MEERLO, P.; MURISON, R.; OLIVIER, B.; PALANZA, P.; RICHTER-LEVIN, G.; SGOIFO, A.; STEIMER, T.; STIEDL, O.; VAN DIJK, G.; WÖHR, M.; FUCHS, E. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, vol. 35, no. 5, p. 1291–1301, 2011. DOI 10.1016/j.neubiorev.2011.02.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neubiorev.2011.02.003>.

KRANNER, I.; MINIBAYEVA, F. V.; BECKETT, R. P.; SEAL, C. E. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. **New Phytologist**, vol. 188, no. 3, p. 655–673, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03461.x>.

KUBRAK, O. I.; HUSAK, V. V.; ROVENKO, B. M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Cobalt-induced oxidative stress in brain, liver and kidney of goldfish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, vol. 85, no. 6, p. 983–989, 2011. DOI 10.1016/j.chemosphere.2011.06.078. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.06.078>.

LE, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. FactoMineR: A Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, vol. 25, p. 1–18, 2008. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>.

LENTH, R. V.; BUERKNER, P.; HERVE, M.; LOVE, J.; RIEBL, H.; SINGMANN, H. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. ed. 1.5.4, Mar. 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**, vol. 239, no. 1–4, p. 497–507, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.021>.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. B. T.-M. in E. [37] Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Oxygen Radicals in Biological Systems Part C**. [S. I.]: Academic Press, 1994. vol. 233, p. 346–357. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, vol. 101, no. 1, p. 13–30, 2011. DOI 10.1016/j.aquatox.2010.10.006. Available at: <http://dx.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**, vol. 143, no. 1, p. 36–41, May 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.018>.

MADEIRA, C.; MADEIRA, D.; DINIZ, M. S.; CABRAL, H. N.; VINAGRE, C. Thermal acclimation in clownfish: An integrated biomarker response and multi-tissue experimental approach. **Ecological Indicators**, vol. 71, p. 280–292, Dec. 2016. DOI 10.1016/j.ecolind.2016.07.009. Available at: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X16304010>.

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**, vol. 166, no. 2, p. 237–243, 2013. DOI 10.1016/j.cbpa.2013.06.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.008>.

MADEIRA, Diana; 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**, vol. 163, no. 91, p. 1–14, Apr. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2856-4>.

MADEIRA, Diana; 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, vol. 63, p. 324–331, 2016. DOI 10.1016/j.ecolind.2015.12.008. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.008>.

MARIA, V. L.; AHMAD, I.; OLIVEIRA, M.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M. J.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 72, no. 7, p. 1861–1870, 2009. DOI 10.1016/j.ecoenv.2009.06.001. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.06.001>.

MARIANO, W. dos S.; OBA, E. T.; ASSIS, H. C. da S. de. Biomarcadores de Estresse Oxidativo em peixes. *In*: EDITORES, C. C. da P. & J. (ed.). **Tópicos Especiais em Criação Animal**. São Carlos - SP: [s. n.], 2009. p. 16.

MARTTILA, R. J.; RIIYTT, M.; LORENTZ, H. ___ Journal O f - - Neural Transmission Oxygen toxicity protecting enzymes in the human brain Cell damage induced by superoxide radical and related oxygen species , such as. , p. 87–95, 1988. .

MERINO, G.; BARANGE, M.; BLANCHARD, J. L.; HARLE, J.; HOLMES, R.; ALLEN, I.; ALLISON, E. H.; BADJECK, M. C.; DULVY, N. K.; HOLT, J.; JENNINGS, S.; MULLON, C.; RODWELL, L. D. Can marine fisheries and aquaculture meet fish demand from a growing human population in a changing climate? **Global Environmental Change**, vol. 22, no. 4, p. 795–806, 2012. DOI 10.1016/j.gloenvcha.2012.03.003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2012.03.003>.

MEZZAROBA, L. **Das cabeceiras às Cataratas do Iguaçu : inventário da ictiofauna da bacia do rio Iguaçu mostra aumento na porcentagem de espécies não-nativas**. 2020. 33 f. UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ, 2020.

MIEIRO, C. L.; PEREIRA, M. E.; DUARTE, A. C.; PACHECO, M. Brain as a critical target of mercury in environmentally exposed fish (*Dicentrarchus labrax*)- Bioaccumulation and oxidative stress profiles. **Aquatic Toxicology**, vol. 103, no. 3–4, p. 233–240, 2011. DOI 10.1016/j.aquatox.2011.03.006. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.03.006>.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus*

lineatus. **Chemosphere**, vol. 78, no. 3, p. 294–299, 2010. DOI 10.1016/j.chemosphere.2009.10.047. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.047>.

MONTEIRO, D. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Inorganic mercury exposure: Toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). **Ecotoxicology**, vol. 19, no. 1, p. 105–123, 2010. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0395-1>.

MONTEIRO, R. C. A. Efeitos do estresse térmico no comportamento e morfofisiologia muscular do *Astyanax brevirostris* (Characidae). **Journal of Materials Processing Technology**, vol. 1, no. 1, p. 1–8, 2018. DOI 10.1109/robot.1994.350900. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cirp.2016.06.001><http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2016.12.055><https://doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2019.02.006><https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.04.024><https://doi.org/10.1016/j.matlet.2019.127252><http://dx.doi.org>.

MORA, C.; MAYA, M. F. Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. **Journal of Thermal Biology**, vol. 31, no. 4, p. 337–341, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2006.01.005>.

NEUROHR, J. M.; PAULSON, E. T.; KINSEY, S. T. A higher mitochondrial content is associated with greater oxidative damage, oxidative defenses, protein synthesis and ATP turnover in resting skeletal muscle. **Journal of Experimental Biology**, vol. 224, no. 19, 2021. <https://doi.org/10.1242/jeb.242462>.

NIMET, J.; AMORIM, J. P. de A.; DELARIVA, R. L. Histopathological alterations in *Astyanax bifasciatus* (Teleostei: Characidae) correlated with land uses of surroundings of streams. **Neotropical Ichthyology**, vol. 16, no. 1, p. 1–14, 2018. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20170129>.

NIMET, J.; GUIMARÃES, A. T. B.; DELARIVA, R. L. Use of Muscular Cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a Biomarker in Biomonitoring of Rural Streams. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 99, no. 2, p. 232–238, 2017. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2111-9>.

NIMET, J.; NEVES, M. P.; VIANA, N. P.; DE ARRUDA AMORIM, J. P.; DELARIVA, R. L. Histopathological alterations in gills of a fish (*Astyanax bifasciatus*)

in neotropical streams: negative effects of riparian forest reduction and presence of pesticides. **Environmental Monitoring and Assessment**, vol. 192, no. 1, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10661-019-8030-y>.

NOYES, P. D.; MCELWEE, M. K.; MILLER, H. D.; CLARK, B. W.; VAN TIEM, L. A.; WALCOTT, K. C.; ERWIN, K. N.; LEVIN, E. D. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. **Environment International**, vol. 35, no. 6, p. 971–986, 2009. DOI 10.1016/j.envint.2009.02.006. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>.

OOMEN, R. A.; HUTCHINGS, J. A. Transcriptomic responses to environmental change in fishes: Insights from RNA sequencing. **Facets**, vol. 2, no. 2, p. 610–641, 2017. <https://doi.org/10.1139/facets-2017-0015>.

PANG, X.; CAO, Z. D.; FU, S. J. The effects of temperature on metabolic interaction between digestion and locomotion in juveniles of three cyprinid fish (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Spinibarbus sinensis*). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, vol. 159, no. 3, p. 253–260, 2011. DOI 10.1016/j.cbpa.2011.03.013. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.03.013>.

PECK, L. S.; CONWAY, L. Z. The myth of metabolic cold adaptation: Oxygen consumption in stenothermal Antarctic bivalves. **Geological Society Special Publication**, vol. 177, p. 441–450, 2000. <https://doi.org/10.1144/GSL.SP.2000.177.01.29>.

PEREIRA-DA-SILVA, E. M.; OLIVEIRA, R. H. F. Portable point-of-care device as alternative tool for monitoring blood glucose in lambari *Astyanax altiparanae*: stress and sex-specific effects. **Boletim do Instituto de Pesca**, vol. 43, no. 4, p. 557–568, 2017. <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2017v43n4p557>.

PEREIRA, C. R. **Aquecimento X Respostas fisiológicas: Mecanismos de estabilidade térmica em *Astyanax brevirostris* (Teleostei, Characidae)**. 2018. 87 f. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, 2018. Available at: <file:///C:/Users/User/Downloads/fvm939e.pdf>.

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, vol. 132, no. 4, p. 739–761, 2002. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00045-4](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00045-4).

PORTNER, H. O.; FARRELL, A. P. ECOLOGY: Physiology and Climate Change. **Science**, vol. 322, no. 5902, p. 690–692, Oct. 2008. <https://doi.org/10.1126/science.1163156>.

PORTNER, H. O.; KNUST, R. Climate Change Affects Marine Fishes Through the Oxygen Limitation of Thermal Tolerance. **Science**, vol. 315, no. 5808, p. 95–97, Jan. 2007. <https://doi.org/10.1126/science.1135471>.

PRZEPIURA, T. de C. S.; HERRERIAS, T.; KANDALSKI, P. K.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; FORGATI, M.; SOUZA, M. R. D. P. de; DONATTI, L. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress. **Brain Research**, vol. 1708, p. 126–137, 2019a. DOI 10.1016/j.brainres.2018.12.004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.004>.

PRZEPIURA, T. de C. S.; HERRERIAS, T.; KANDALSKI, P. K.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; FORGATI, M.; SOUZA, M. R. D. P. de; DONATTI, L. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress. **Brain Research**, vol. 1708, no. December 2018, p. 126–137, 2019b. DOI 10.1016/j.brainres.2018.12.004. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.12.004>.

QUADRA, G. R.; TEIXEIRA, J. R. P. V. A.; BARROS, N.; ROLAND, F.; AMADO, A. M. Water pollution: one of the main Limnology challenges in the Anthropocene. **Acta Limnologica Brasiliensia**, vol. 31, p. 12, 2019. DOI 10.1590/s2179-975x5118. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2179-975X2019000100802&tlng=en. Accessed on: 16 Nov. 2019.

R TEAM, C. R: A Language and Environment for Statistical Computing. 2022. Available at: <https://www.r-project.org/>.

RALF, D. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, vol. 62, no. 6, p. 649–671, 2000. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030100829900060X>.

RESENDE, A. C.; MAURO CARNEIRO PEREIRA, D.; CRISTINA SCHLEGER, I.; DMENGEON PEDREIRO DE SOUZA, M. R.; ALVEZ NEUNDORF, A. K.; ROMÃO, S.; HERRERIAS, T.; DONATTI, L. Effects of heat shock on energy metabolism and antioxidant defence in a tropical fish species *Psalidodon bifasciatus*. **Journal of Fish Biology**, vol. 100, no. 5, p. 1245–1263, 2022. <https://doi.org/10.1111/jfb.15036>.

RIBEIRO, P. A. P.; BRESSAN, M. C.; LOGATO, P. V. R.; GONÇALVES, A. C. S. Nutrição Lípidica para Peixes. **Revista Eletrônica Nutritime**, vol. 4, p. 436–455, 2007. .

RIPLEY, B.; VENABLES, B.; BATES, D. M.; HORNIK, K.; GEBHARDT, A.; FIRTH, D. MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS. ed. 7.3-53.1, Mar. 2021. .

SCHLEGER, I. C.; PEREIRA, D. M. C.; RESENDE, A. C.; ROMÃO, S.; HERRERIAS, T.; NEUNDORF, A. K. A.; SLOTY, A. M.; GUIMARÃES, I. M.; DE SOUZA, M. R. D. P.; CARSTER, G. P.; DONATTI, L. 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**, vol. 192, no. 1, p. 77–94, 2022. DOI 10.1007/s00360-021-01409-2. Available at: <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01409-2>.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. **The Concept of Stress in Fish**. First Edit. [S. /]: Elsevier Inc., 2016. vol. 35, . DOI 10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1>.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, vol. 25, p. 192–205, 1968. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, vol. 4, p. 32, 1946. .

SEMA, S. de E. do M. A. e R. H.-. Bacia do Rio Iguaçu - Bacias Hidrográficas do Paraná. , p. 2, 2014. .

SIES, H.; BELOUSOV, V. V.; CHANDEL, N. S.; DAVIES, M. J.; JONES, D. P.; MANN, G. E.; MURPHY, M. P.; YAMAMOTO, M.; WINTERBOURN, C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 23, no. 7, p. 499–515, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00456-z>.

SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; SILVA, A. G.; MELO, D.; VISTA, B.; VELHA, V. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais Using oxidative stress enzymes as biomarkers in environmental impacts. **Natureza on line**, vol. 7, p. 37–42, 2009. .

SOUZA, M. R. D. P. de; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, vol. 146, p. 43–55, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.010>.

SOUZA, R. S. **Emissão de gases de carbono em ecossistemas aquáticos subtropicais continentais: de padrões locais a mudanças climáticas**. 2014. 193 f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

SRIKANTH, K.; PEREIRA, E.; DUARTE, A. C.; AHMAD, I. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish-a review. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 20, no. 4, p. 2133–2149, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1459-y>.

TREVISAN, R. **Marcadores de estresse oxidativo e outros parâmetros biológicos em peixes e bivalves como ferramentas de monitoramento ambiental: análise de dois ecossistemas catarinenses**. 2008. 1–52 f. 2008.

TSENG, Y. C.; CHEN, R. D.; LUCASSEN, M.; SCHMIDT, M. M.; DRINGEN, R.; ABELE, D.; HWANG, P. P. Exploring uncoupling proteins and antioxidant mechanisms under acute cold exposure in brains of fish. **PLoS ONE**, vol. 6, no. 3, 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018180>.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Soil Quality Field Kit: Part II. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, vol. 13, no. February, p. 57–149, 2016. .

VIEIRA, V. A. R. O.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, vol. 157, no. 1, p. 1–8, Jan. 2013. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2012.08.003>.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; MENDONÇA, V.; DIAS, M.; ROMA, J.; DINIZ, M. S. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. **Marine Environmental Research**, vol. 97, p. 10–14, 2014. DOI 10.1016/j.marenvres.2014.01.007. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.01.007>.

WACHTEL, C. C.; DE OLIVEIRA, E. C.; MANIGLIA, T. C.; SMITH-

JOHANNSEN, A.; ROQUE, A. de A.; GHISI, N. de C. Waterborn Genotoxicity in Southern Brazil Using *Astyanax bifasciatus* (Pisces: Teleostei). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, vol. 102, no. 1, p. 59–65, 2019. DOI 10.1007/s00128-018-2477-3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00128-018-2477-3>.

WELTZIEN, F. A.; PLANAS, M.; FYHN, H. J. Temperature dependency of early growth of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) and its implications for developmental progress. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, vol. 242, no. 2, p. 201–210, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00099-4).

WENDEL, A. Glutathione Peroxidase. **Methods in Enzymology**, vol. 77, no. C, p. 325–333, 1981. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0).

WICKHAM, H. Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. Mar. 2021. .

WU, S. M.; LIU, J. H.; SHU, L. H.; CHEN, C. H. Anti-oxidative responses of zebrafish (*Danio rerio*) gill, liver and brain tissues upon acute cold shock. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A: Molecular and Integrative Physiology**, vol. 187, p. 202–213, 2015. DOI 10.1016/j.cbpa.2015.05.016. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.016>.