

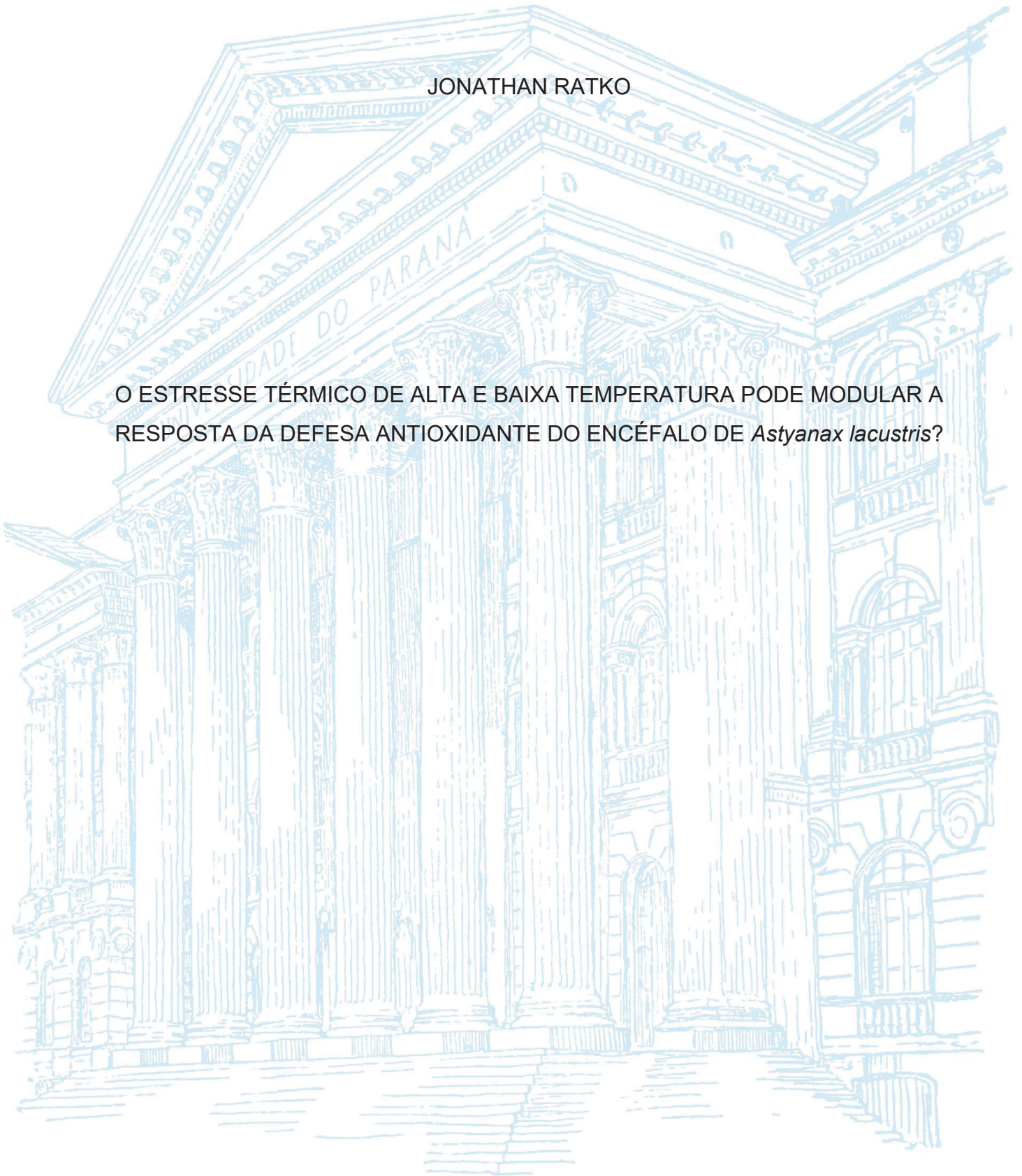
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JONATHAN RATKO

O ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA E BAIXA TEMPERATURA PODE MODULAR A
RESPOSTA DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris*?

CURITIBA

2022



JONATHAN RATKO

O ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA E BAIXA TEMPERATURA PODE MODULAR A
RESPOSTA DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris*?

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

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

CURITIBA

2022

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

Ratko, Jonathan

O estresse térmico de alta e baixa temperatura pode modular a resposta da defesa antioxidante do encéfalo de *Astyanax lacustris*? / Jonathan Ratko. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti.

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

1. Lambari (Peixe). 2. Temperatura. 3. Espécies reativas de oxigênio. 4. Biomarcadores. 5. Peixes – Criação. I. Donatti, Lucélia, 1964-. II. Pedreiro, Maria Rosa Dmengen, 1987-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR - 40001016007P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **JONATHAN RATKO** intitulada: **O ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA E BAIXA TEMPERATURA PODE MODULAR A RESPOSTA DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris*?**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Setembro de 2022.

Assinatura Eletrônica

05/10/2022 20:27:31.0

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

05/10/2022 16:25:48.0

KATYA NALIWAIKO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

05/10/2022 16:55:17.0

SILVIA ROMÃO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL)

Rua Cel Francisco H. dos Santos, 100. - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-990 - Tel: (41) 3361-1676 - E-mail: pgbiocel@ufpr.br

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

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 225836

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 225836

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai, Tadeu, e a minha mãe, Juraci, por todo o apoio, torcida e carinho durante toda esta jornada. Mesmo à distância, sempre me acompanharam em todas as etapas e me incentivaram a fazer meu melhor. Vocês são as pessoas que mais me inspiram e dão força para continuar lutando. Espero poder retribuir pelo menos um pouco toda essa dedicação. Amo muito vocês!

À minha madrinha Noêmia e ao meu padrinho Miguel (*in memoriam*), que desde minha infância me inspiraram a seguir o caminho acadêmico. Agradeço imensamente pelo apoio financeiro e principalmente por serem minhas referências. O mundo seria muito melhor se houvesse mais pessoas como vocês.

Aos meus familiares pela força, incentivo e carinho sempre presentes em todos nossos encontros, e que também acompanharam a trajetória do menino que foi para a “capital”.

À minha orientadora Lucélia Donatti e a minha coorientadora Maria Rosa Dmengeon Pedreiro de Souza, por terem acreditado em mim e me dado a oportunidade de estar aqui. Todos os ensinamentos foram fundamentais para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos que fiz no laboratório, que compartilharam comigo todos os momentos, sejam eles bons ou ruins. As longas jornadas no laboratório, percalços em algumas análises e dúvidas foram muito mais fáceis de superar com vocês ao meu lado. Agradeço também por todas as brincadeiras, risadas, rolês e companheirismo. Levarei todos estes momentos na memória e espero que nossa amizade perdure por muito tempo. Muito obrigado Niumaique, Diego, Ana e Ananda. Sou muito grato por ter trabalhado com as melhores pessoas.

Ao meu amigo Diego Mauro Carneiro Pereira, que me apoia desde a graduação e que me ajudou de todas as maneiras para que eu realizasse este mestrado. Sem você este agradecimento não seria escrito e essa dissertação não seria publicada. Esta conquista também é sua, e o meu crescimento pessoal e acadêmico é também fruto da sua ótima amizade.

Ao meu amigo Niumaique Gonçalves da Silva, que me aturou principalmente na reta final do mestrado. Muito obrigado por todas as pizzas, conversas, companhia e tantas outras coisas. Afinal, o que seria de nós se não tivéssemos amigos com quem podemos compartilhar e ser compreendidos, pois nos entendem quase melhor que

nós mesmos. Graças a você me tornei uma pessoa melhor, e serei eternamente grato por isso.

A todos do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, que foram indispensáveis para que as análises fossem realizadas. Obrigado por sempre nos recepcionarem e nos ajudarem da melhor forma.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro para que as análises laboratoriais fossem realizadas.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho.

"Porque eu sou do tamanho daquilo que sinto, que vejo e que faço, não do tamanho que as pessoas me enxergam."

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

A mudança da temperatura do ambiente aquático gera impactos sobre a fisiologia dos peixes. Os efeitos do choque térmico em organismos aquáticos ainda são pouco conhecidos, em especial no encéfalo, que é um órgão vital e propenso a danos oxidativos. *Astyanax lacustris* é uma espécie de peixe de água doce muito utilizada em programas de aquicultura, na alimentação e pesca esportiva, além do grande potencial na pesquisa. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar a defesa antioxidante e possíveis danos oxidativos no encéfalo do peixe subtropical *A. lacustris* submetido ao choque térmico de alta e baixa temperatura. Os espécimes (n= 280; comprimento $6,17 \pm 0,87$ cm e peso $9,15 \pm 3,4$ g) foram obtidos em lagos artificiais (União da Vitória – PR) e submetidos ao choque térmico em alta ($31 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$) e baixa temperatura ($15 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$), ambos com um grupo controle ($23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5$). Os indivíduos permaneceram nesta condição durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Foram analisadas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Também foram avaliadas a concentração de glutathione reduzida (GSH), lipoperoxidação (LPO), carbonilação de proteínas (PCO) e espécies reativas de oxigênio (EROs). Em alta temperatura, foram observadas diminuições na atividade da GPx em 12 e 72 h e aumento em 96 h. Também houve aumento da atividade da G6PDH e da concentração de GSH em 2 e 48 h, respectivamente. Em baixa temperatura, a atividade da CAT aumentou em 2 h e diminuiu em 96 h e a G6PDH reduziu em 6 h. No choque térmico de $31 \text{ }^\circ\text{C}$, os dados indicaram que a GSH atuou diretamente na detoxificação de EROs. Já no choque térmico de $15 \text{ }^\circ\text{C}$, o aumento da atividade da CAT está relacionado ao controle da concentração de peróxidos de hidrogênio. Em ambas as temperaturas testadas, não foram detectados danos oxidativos (LPO e PCO) e diferenças na concentração de EROs, indicando que o encéfalo de *A. lacustris* possui a capacidade de modular e mobilizar os antioxidantes com eficiência.

Palavras-chave: Lambari. Temperatura. Espécies reativas de oxigênio. Biomarcadores. Piscicultura.

ABSTRACT

Changing the temperature of the aquatic environment impacts the physiology of fish. The effects of thermal shock on aquatic organisms are still little known, especially in the brain, which is a vital organ prone to oxidative damage. *Astyanax lacustris* is a species of freshwater fish widely used in aquaculture programs, food and sport fishing, in addition to the great potential in research. Thus, this study aimed to evaluate antioxidant defense and possible oxidative damage in the brain of subtropical fish *A. lacustris* submitted to high and low temperature thermal shock. The specimens (n= 280; length 6.17 ± 0.87 cm and weight 9.15 ± 3.4 g) were obtained in artificial lakes (União da Vitória - PR) and submitted to thermal shock at high ($31 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$) and low temperature ($15^\circ\text{C} \pm 0.5$), both with a control group ($23 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5$). Specimens remained in this condition for 2, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours. The enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) were analyzed. Reduced glutathione (GSH), lipoperoxidation (LPO), protein carbonylation (PCO) and reactive oxygen species (ROS) levels were also evaluated. At high temperature, decreases in GPx activity were observed in 12 and 72 h and an increase in 96 h. G6PDH activity and GSH levels increased in 2 and 48 h, respectively. At low temperature, CAT activity increased in 2 h and decreased in 96 h and G6PDH decreased by 6 h. In the thermal shock of $31 \text{ }^\circ\text{C}$, the data indicated that GSH acted directly in the detoxification of EROs. In the thermal shock of $15 \text{ }^\circ\text{C}$, the increase in CAT activity is related to the control of hydrogen peroxide levels. At both temperatures tested, no oxidative damage (LPO and PCO) and differences in ROS levels were detected, indicating that the brain of *A. lacustris* has the ability to modulate and mobilize antioxidants efficiently.

Keywords: Lambari. Temperature. Reactive oxygen species. Biomarkers. Fish farming.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA PELA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	22
FIGURA 2 – REAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA PELA ENZIMA CATALASE (CAT)	22
FIGURA 3 – REAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA PELA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)	22
FIGURA 4 – REAÇÕES ENZIMÁTICAS CATALISADAS PELAS ENZIMAS GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) E GLUTATIONA REDUTASE (GR).....	23
FIGURA 5 – REAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA PELA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH)	23
FIGURA 6 – VIAS METABÓLICAS RELACIONADAS COM O ESTRESSE OXIDATIVO.....	25
FIGURA 7 – INDIVÍDUO DA ESPÉCIE <i>Astyanax lacustris</i>	26
FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DE <i>Astyanax lacustris</i> NO ESTADO DO PARANÁ.....	27
FIGURA 9 – CENTRO DE PESQUISA E EXTENSÃO EM AQUICULTURA ILDO ZAGO (CEPEA).....	28
FIGURA 10 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS RELACIONADAS COM A DEFESA ANTIOXIDANTE NO EXPERIMENTO DE ALTA TEMPERATURA.....	37
FIGURA 11 – MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS, GSH E EROs NO EXPERIMENTO DE ALTA TEMPERATURA	38
FIGURA 12 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS RELACIONADAS COM A DEFESA ANTIOXIDANTE NO EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA	39
FIGURA 13 – MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS, GSH E EROs NO EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA.....	40
FIGURA 14 – RESUMO DOS RESULTADOS PARA 31 °C E 15 °C.	41
FIGURA 15 – IBR DOS BIOMARCADORES NO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA	42
FIGURA 16 – IBR DOS BIOMARCADORES NO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA	43
FIGURA 17 – ESQUEMA DOS RESULTADOS DO IBR PARA O CHOQUE TÉRMICO DE 31 °C E 15 °C	44

FIGURA 18 – BIPLLOT DA PCA DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE <i>Astyanax lacustris</i>	45
FIGURA 19 – MATRIZ DE CORRELAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO DE <i>Astyanax lacustris</i> SUBMETIDO A ALTA TEMPERATURA	46
FIGURA 20 – MATRIZ DE CORRELAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO DE <i>Astyanax lacustris</i> SUBMETIDO A BAIXA TEMPERATURA	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO SIMPLIFICADA DA RAÇÃO UTILIZADA NO EXPERIMENTO	29
TABELA 2 – PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA ANÁLISES ENZIMÁTICAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE.....	32
TABELA 3 – PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA OS BIOMARCADORES NÃO ENZIMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO	33
TABELA 4 – RESULTADOS DA ANOVA DAS ENZIMAS RELACIONADAS A DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE <i>Astyanax lacustris</i>	35
TABELA 5 – RESULTADOS DA ANOVA DE DANOS OXIDATIVOS, GSH E EROs DO ENCÉFALO DE <i>Astyanax lacustris</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

ANOVA - Análise de variância

ATP - Adenosina trifosfato

BSA - Albumina de soro bovina

CAT – Catalase

CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DNPH - dinitrofenilhidrazina

DTNB - 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EROs - Espécies reativas de oxigênio

g - Aceleração da gravidade

g - Gramas (unidade de massa)

G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase

GPx - Glutaciona peroxidase

GR Glutaciona redutase

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG - Glutaciona dissulfeto

GST - Glutaciona-S-transferase

h – Horas

H₂O - Água

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

L - Litro

LPO - Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica

mg - Miligrama

mM - Milimolar

mRNA – RNA mensageiro

n - Número de espécimes por experimento

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NBT - Nitroblue tetrazolium (Azul de nitrotetrazólio)

nm - Nanômetro

O₂ - Oxigênio molecular

OH - Radical hidroxila

pH - Potencial Hidrogeniônico

SOD - Superóxido dismutase

U - Unidade internacional

UFPR - Universidade Federal do Paraná

µg - Microgramas

µL - Microlitro

µmol – Micromol

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 ESTRESSE TÉRMICO.....	20
2.2 BIOMARCADORES ANALISADOS.....	21
2.3 MODELO BIOLÓGICO.....	25
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 COMITÊ DE ÉTICA E AMOSTRAGEM.....	28
3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
3.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	31
3.3.1 Determinação da atividade das enzimas relacionadas à defesa antioxidante..	31
3.3.2 Determinação da concentração de GSH, EROs e dos marcadores de danos oxidativos	32
3.3.3 Análises estatísticas	33
4 RESULTADOS	35
4.1 BIOMARCADORES RELACIONADOS A DEFESA ANTIOXIDANTE NO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA E BAIXA TEMPERATURA NO ENCÉFALO DE <i>A. lacustris</i>	36
4.2 IBR DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA E BAIXA TEMPERATURA NO ENCÉFALO DE <i>A. lacustris</i>	41
4.3 RESPOSTAS DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO ENTRE TEMPERATURAS NO ENCÉFALO DE <i>A. lacustris</i>	44
5 DISCUSSÃO	48
5.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO ENCÉFALO DE <i>A. lacustris</i>	49

5.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA NO ENCÉFALO DE <i>A. lacustris</i>	51
5.3 RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES EM ALTA E BAIXA TEMPERATURA	52
5.4 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO ENTRE TEMPERATURAS NO ENCÉFALO DE <i>A. lacustris</i>	53
6 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS.....	56
APÊNDICE 1 – NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS NAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS	73

1 INTRODUÇÃO

A resposta ao estresse em peixes e demais vertebrados é considerado um mecanismo adaptativo que permite ao animal lidar com o agente estressor, buscando manter seu estado homeostático (BALASCH; TORT, 2019; SCHRECK; TORT, 2016). Após a percepção do estressor, ocorrem mudanças fisiológicas que são em sua maioria iniciadas pelo sistema nervoso central (TSENG et al., 2011; URBINATI; ZANUZZO; BILLER, 2020). A temperatura é um dos principais fatores abióticos que causam estresse (HARDEWIG; PÖRTNER; VAN DIJK, 2004; YANG et al., 2020), em especial nos animais ectotérmicos (característica da maioria das espécies de peixes), onde a temperatura corporal varia com a do meio (LOGAN; BUCKLEY, 2015). Desta forma, temperaturas da água abaixo ou acima dos limites adequados influenciam diretamente a fisiologia e o metabolismo dos indivíduos (FU et al., 2018; ISLAM et al., 2020; SUN et al., 2019).

Astyanax lacustris (Lütken, 1875) possui grande potencial na aquicultura brasileira (GONÇALVES et al., 2014; VALLADÃO; GALLANI; PILARSKI, 2018) devido às suas características de rápido crescimento, fácil manipulação, aceitação de ração processada e alta prolificidade (GONÇALVES et al., 2014). Esta espécie é citada pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) como uma das mais utilizadas no Brasil em estudos biológicos (MCTIC, 2017).

O encéfalo dos peixes é um dos órgãos mais ativos metabolicamente (PHROMpanya et al., 2021; SOENGAS; ALDEGUNDE, 2002). Apresenta alta concentração de ácidos graxos insaturados (facilmente peroxidáveis) e um consumo desproporcional de oxigênio por unidade de peso (AFIFI; SADDICK; ABU ZINADA, 2016; EZEYILI et al., 2019). Estas características tornam este órgão vulnerável à ação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e propenso à danos oxidativos, que podem causar doenças neurodegenerativas (GÜLLER et al., 2020). Além disso, o encéfalo dos vertebrados ectotérmicos é um dos órgãos mais vulneráveis às flutuações térmicas (TSENG et al., 2011), fazendo dele um importante modelo de estudo frente ao estresse térmico. Além disso, Topal e colaboradores (2021) ressaltam que as respostas fisiológicas do encéfalo de peixes expostos ao estresse térmico ainda não são totalmente conhecidas.

As mudanças climáticas alteram os ecossistemas aquáticos e provocam alterações nas populações e comunidades de peixes (WHITNEY et al., 2016). Desta

forma, a avaliação do estresse provocada pela mudança da temperatura com o uso de biomarcadores específicos é uma importante ferramenta para a compreensão do processo evolutivo de adaptação e distribuição geográfica de peixes (SOPINKA et al., 2016). Estudos como este também auxiliam no entendimento dos mecanismos fisiológicos e a capacidade de ajustes bioquímicos dos peixes frente às mudanças de temperatura (RESENDE et al., 2022).

Do ponto de vista econômico, estas pesquisas são fundamentais para garantir a produção futura, trazendo dados importantes para os processos de piscicultura (ISLAM et al., 2020), como os aspectos relacionados ao bem-estar e produtividade (ALFONSO; GESTO; SADOUL, 2021). Além disso, a verificação da mudança na atividade/concentração dos biomarcadores de estresse oxidativo contribui para a compreensão dos mecanismos de defesa antioxidante (WEN et al., 2017). Neste sentido, Petitjean e colaboradores (2019) ressaltam a necessidade de novos estudos para prever os impactos dos estressores atuais e futuros na vida selvagem aquática.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a defesa antioxidante e danos oxidativos no encéfalo do peixe subtropical *A. lacustris* submetido ao choque térmico de alta ($31\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$) e baixa temperatura ($15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$) comparados a um grupo controle ($23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$), durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.

1.1.2 Objetivos específicos

- Investigar a atividade das enzimas envolvidas na defesa antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx); glutathione redutase (GR) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH);
- Verificar a concentração de glutathione reduzida (GSH) e espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Analisar a concentração dos marcadores de danos oxidativos: lipoperoxidação (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO);

- Comparar as mudanças encontradas entre os experimentos de alta ($31\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$) e baixa temperatura ($15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5$).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ESTRESSE TÉRMICO

Existe uma faixa limitada de temperatura corporal na qual todos os organismos vivem e dependem para que processos moleculares, celulares e sistêmicos ocorram de maneira otimizada (PÖRTNER; FARRELL, 2008). A temperatura da água pode variar rapidamente devido às ocorrências naturais (como as tempestades) e antropogênicas (interferência humana) (DONALDSON et al., 2008). Quando estes animais precisam enfrentar uma mudança repentina de temperatura ocorrem na maioria das vezes alterações metabólicas e mobilização da defesa antioxidante para proteção ao estresse gerado (ALFONSO; GESTO; SADOUL, 2021).

A proteção ao estresse está associada principalmente com a neutralização das EROs, que são espécies derivadas do oxigênio e que apresentam característica instável e reativa. Todos os radicais de oxigênio são EROs e caracterizam-se pela presença de um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada. Contudo, nem todas as EROs são radicais livres. Além disso, algumas EROs, como o peróxido de hidrogênio, reagem com moléculas biológicas específicas, enquanto que a hidroxila reage com todas (MURPHY et al., 2022).

O estresse térmico de alta e baixa temperatura pode levar ao aumento da concentração de EROs (VINAGRE et al., 2012) e levar a um desbalanço entre a produção de EROs e a capacidade do sistema de defesa antioxidante, caracterizando o estresse oxidativo (VAN DER POL et al., 2019). Desta forma, podem ocorrer efeitos lesivos nos tecidos, como a lipoperoxidação na membrana celular (CHENG et al., 2018a), agressão às proteínas celulares e teciduais, às enzimas, carboidratos e ao DNA (ALVES et al., 2010; SOPINKA et al., 2016).

As respostas ao estresse envolvem todos os níveis de organização do animal (JOËLS; BARAM, 2009; KOAKOSKI et al., 2012) e podem ser divididas em três fases: o reconhecimento da ameaça à homeostase, a própria resposta ao estresse e por último as consequências desse estresse, caracterizando a Síndrome de Adaptação Geral (SAG) (SILVA; GOULART; GUIDO, 2018).

Inicialmente ocorrem respostas neuroendócrinas, desencadeadas pelos eixos Hipotálamo-Sistema Nervoso Simpático-Células Cromafins (HSC) e Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (HHI) (KOAKOSKI et al., 2012), que incluem a liberação de

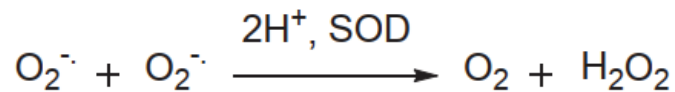
hormônios catecolaminas e corticosteroides na corrente sanguínea (SCHRECK; TORT, 2016). Após isso, ocorrem mudanças fisiológicas provocadas em sua maioria pela ação dos hormônios liberados na resposta primária, acarretando mudanças nas taxas respiratória e cardiovascular, na mobilização de substratos energéticos e alterações no balanço hidromineral. Estes fatores estão relacionados com potencial de geração de EROs, que ocorre principalmente na mitocôndria (RODNICK; PLANAS, 2016). Por fim, o animal pode apresentar alterações no crescimento, na resistência às doenças e no comportamento, impactando em sua sobrevivência (BARTON, 2002; IWAMA et al., 2004; SCHRECK; TORT, 2016).

2.2 BIOMARCADORES ANALISADOS

Os organismos aquáticos assim como todos os organismos aeróbios dependem de oxigênio molecular (O_2) para muitos processos metabólicos, deixando todos sujeitos ao risco de estresse oxidativo (HOSEINIFAR et al., 2021). Contudo, as células possuem um sistema de defesa principal que atua no controle do estresse oxidativo (CHENG et al., 2018b). A proteção celular ocorre através de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que têm o papel de converter os oxidantes em moléculas menos reativas (CANTIN; RICHTER, 2012; LUO et al., 2014).

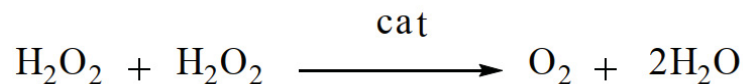
A superóxido dismutase (SOD) é uma enzima da primeira linha de defesa antioxidante (BOWLER; MONTAGU; INZE, 1992; PAITAL; NITYAN; A CHAINY, 2016). É responsável por catalisar a redução do radical superóxido em peróxido de hidrogênio (FIGURA 1) (MODESTO; MARTINEZ, 2010; CHENG et al., 2018a). Já a catalase (CAT) degrada o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular (FIGURA 2) (MODESTO; MARTINEZ, 2010; CHENG et al., 2018a) e, portanto, reflete na capacidade de resistência a oxidação (CHENG et al., 2018b). A glutathione S-transferase (GST) atua na eliminação de compostos reativos a partir da conjugação com a glutathione (FIGURA 3) (MODESTO; MARTINEZ, 2010).

FIGURA 1 – REAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA PELA ENZIMA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)



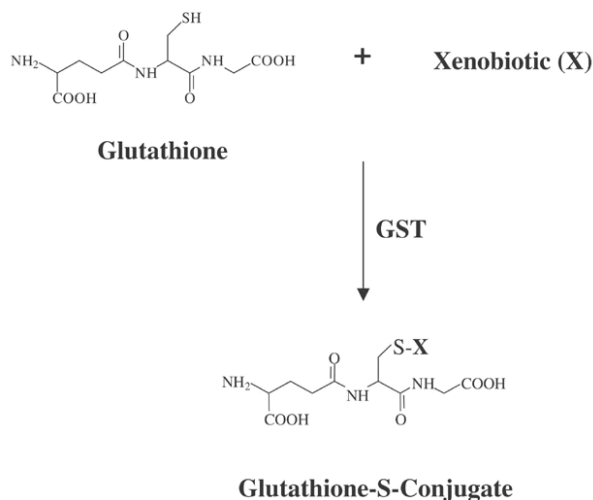
FONTE: ZAIKOV; OPALKO, 2019.

FIGURA 2 – REAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA PELA ENZIMA CATALASE (CAT)



FONTE: ZAIKOV; OPALKO, 2019.

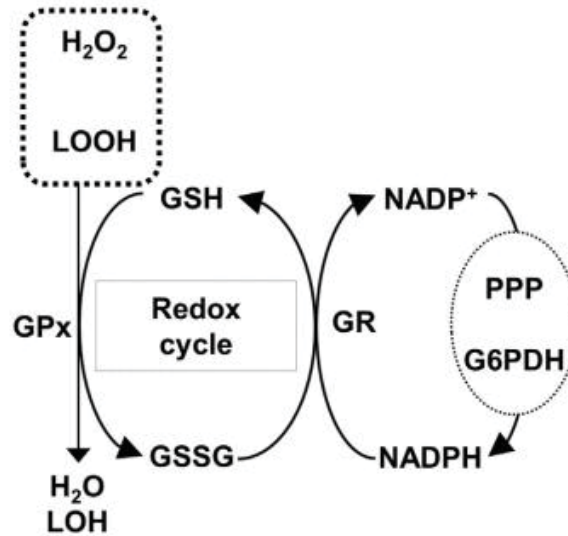
FIGURA 3 – REAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA PELA ENZIMA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST)



FONTE: TOWNSEND; TEW, 2003.

A glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução de peróxidos formados em condições aeróbicas, especialmente o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MASSARSKY; KOZAL; DI GIULIO, 2017; SATTIN et al., 2015), a partir da oxidação de glutathiona reduzida (GSH) à glutathiona oxidada (GSSG) (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; MASSARSKY; KOZAL; DI GIULIO, 2017). A enzima glutathiona redutase (GR) possui papel fundamental na redução da GSSG de volta para GSH, utilizando fosfato dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) como agente redutor para reduzir uma GSSG para duas GSH (FIGURA 4) (ESPINOSA-DIEZ et al., 2015).

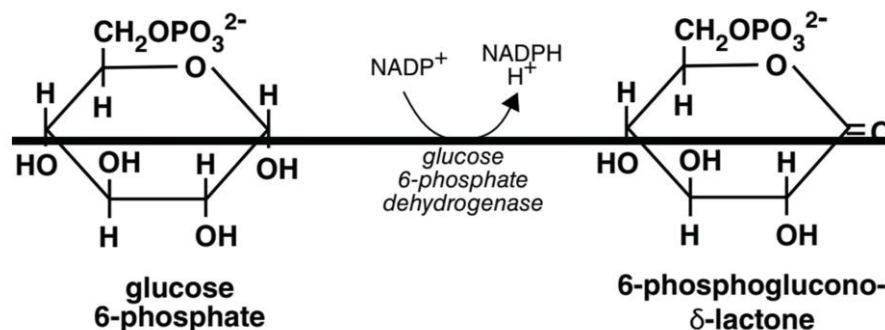
FIGURA 4 – REAÇÕES ENZIMÁTICAS CATALISADAS PELAS ENZIMAS GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX) E GLUTATIONA REDUTASE (GR)



FONTE: HIGUCHI, 2014.

Outra enzima que também está relacionada com a defesa antioxidante é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que catalisa o primeiro passo da via das pentoses-fosfato, em que a glicose-6-fosfato é convertida em 6-fosfoglicona- δ -lactona (FIGURA 5) (ABDEL-TAWWAB; WAFEEK, 2017; CIFTCI; TURKOGLU; COBAN, 2007). O resultado dessa via é a produção de NADPH (NELSON et al., 2014), que é cofator requerido para a redução de GSSG em GSH pela GR (GARAI-IBABE; SAA; PAVLOV, 2013).

FIGURA 5 – REAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA PELA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH)



FONTE: SALWAY, 2017.

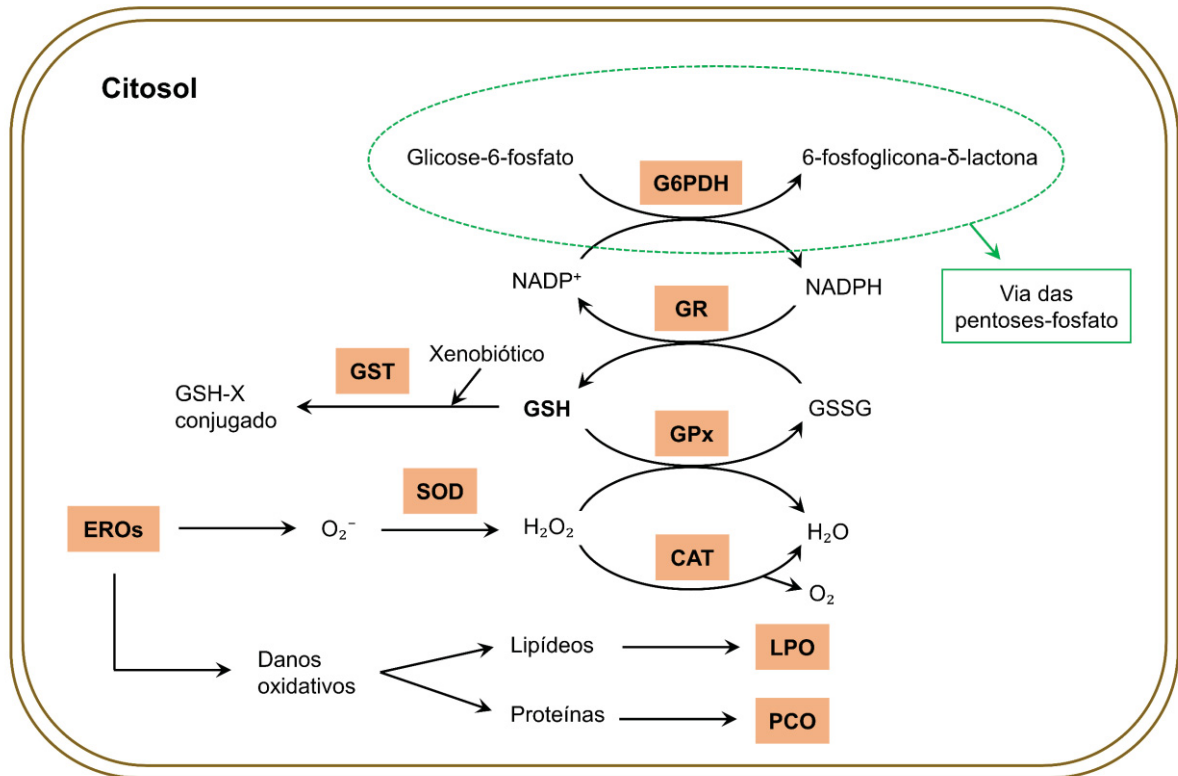
O sistema de defesa antioxidante é formado principalmente por enzimas que constituem a primeira (SOD, CAT e GPx) e segunda (GR e G6PDH) linhas de defesa

contra EROs (FIGURA 6). As enzimas da primeira linha de defesa utilizam EROs como substrato, enquanto que as enzimas da segunda linha fornecem GSH e NADPH para o funcionamento das enzimas da primeira linha. As moléculas necessárias para o funcionamento das enzimas da segunda linha de defesa são fornecidas por vias do metabolismo intermediário, como por exemplo a via das pentoses-fosfato (LUSHCHAK, 2016).

A GSH é considerada um antioxidante não enzimático (MODESTO; MARTINEZ, 2010) e uma das principais moléculas de defesa contra EROs (HUBER; ALMEIDA; FÁTIMA, 2008; MASSARSKY; KOZAL; DI GIULIO, 2017). Em sua forma oxidada (GSSG), apresenta duas moléculas de glutathiona ligadas através de uma ligação dissulfeto (NELSON et al., 2014). Além disso, a relação GSH/GSSG é um importante indicador da defesa antioxidante, visto que a concentração de GSH está relacionada com a capacidade de neutralização das EROs (ATAMANALP et al., 2021).

Além destas moléculas, a lipoperoxidação (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO) também podem ser avaliadas e usadas como indicadores de estresse oxidativo (GOBI et al., 2018; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006). A LPO ocorre através da ação das EROs sobre os lipídios, gerando a quebra dos fosfolipídios de membrana, que contém ácidos graxos poli-insaturados. A PCO ocorre a partir da oxidação das proteínas, resultando na formação de grupos carbonilas (aldeídos e cetonas) nas cadeias laterais (KLEIN et al., 2017).

FIGURA 6 – VIAS METABÓLICAS RELACIONADAS COM O ESTRESSE OXIDATIVO

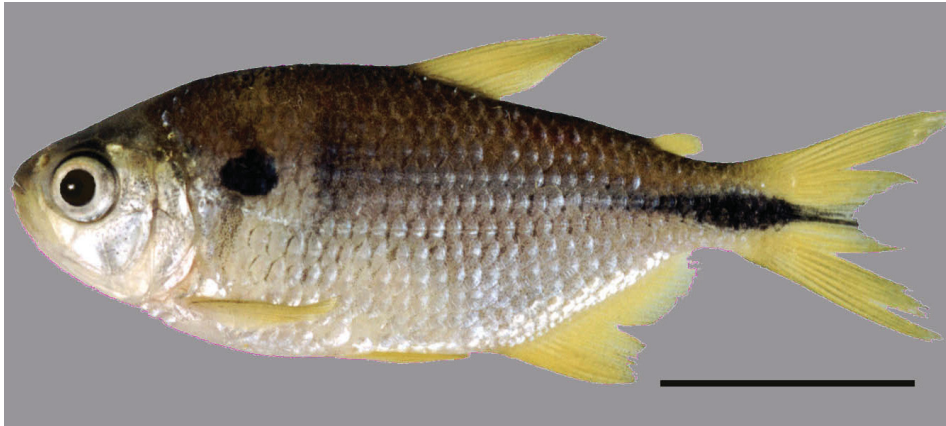


FONTE: O autor (2022).

NOTA: Esquema simplificado das vias metabólicas relacionadas com o estresse oxidativo. Embora alguns destes biomarcadores estejam também presentes em outros compartimentos celulares, foi dado ênfase na região citosólica da célula, visto que neste trabalho não houve o processo de sonicação das amostras. Os biomarcadores analisados estão destacados em laranja, com exceção da GSH (em negrito). SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutationa S-transferase, GPx- glutationa peroxidase, GR- glutationa redutase, GSH- glutationa reduzida, G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase, LPO- lipoperoxidação, PCO- carbonilação de proteínas e EROs- espécies reativas de oxigênio.

2.3 MODELO BIOLÓGICO

A. lacustris, conhecido popularmente como lambari-do-rabo-amarelo, é um peixe de água doce que habita pequenos riachos, lagos e rios e está comumente distribuído na região subtropical brasileira (FIGURA 7) (GNOCCHI et al., 2020; SCHLEGER et al., 2022). É considerado herbívoro, mas pode alimentar-se de insetos terrestres e fragmentos de peixes (BAUMGARTNER et al., 2012). As fêmeas crescem mais rápido (CAMPELO et al., 2018) e atingem maior tamanho corporal em relação aos machos, caracterizando o dimorfismo sexual da espécie (SATO et al., 2006). É um peixe de pequeno porte, possui corpo claro e nadadeiras amareladas, com comprimento padrão de 8,3 cm (BAUMGARTNER et al., 2012).

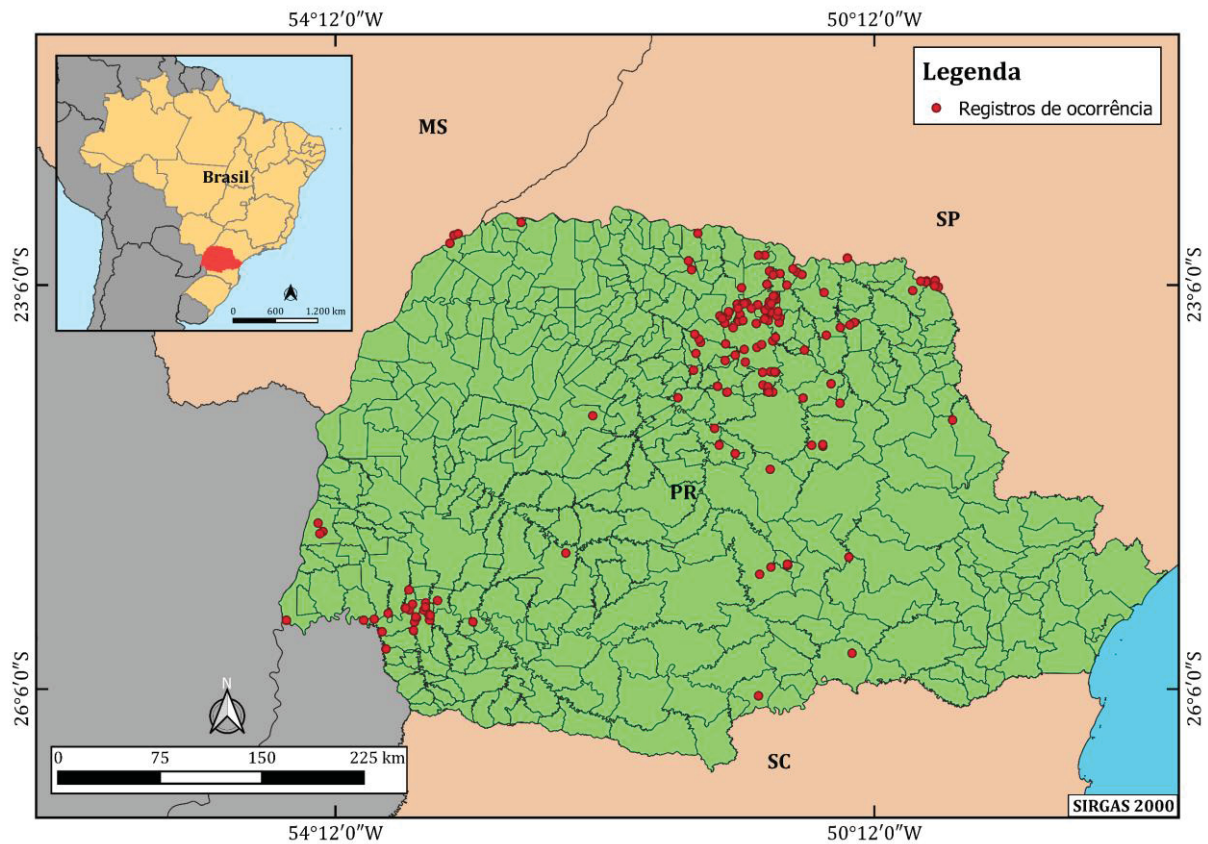
FIGURA 7 – INDIVÍDUO DA ESPÉCIE *Astyanax lacustris*

FONTE: RAMSDORF, 2007.

NOTA: Barra= 3 cm.

Apresenta rápido crescimento, chegando à maturidade sexual cedo (SALARO et al., 2015). Alvo de predação, faz parte da dieta de peixes carnívoros maiores. Esta espécie possui grande interesse econômico, sendo utilizada em programas de aquicultura (GARUTTI; BRITSKI, 2000). Pode também ser utilizado como iscas, além do seu uso na alimentação, principalmente fritas ou em conserva (DUTRA et al., 2012).

Recentemente, *A. lacustris* foi sinonimizado com *A. jacuhiensis*, *A. asuncionensis* e *A. altiparanae*, aumentando o que já se sabia a respeito de sua distribuição geográfica (LUCENA; SOARES, 2016). As ocorrências registradas no Estado do Paraná para *A. lacustris* estão representadas na FIGURA 8.

FIGURA 8 – DISTRIBUIÇÃO DE *Astyanax lacustris* NO ESTADO DO PARANÁ

FONTE: O autor (2022).

NOTA: Distribuição de *Astyanax lacustris* no Estado do Paraná, Brasil. Dados de ocorrência obtidos através do Sistema Global de Informação sobre Biodiversidade (gbif.org).

Astyanax é um dos gêneros mais ricos em espécies dentro da família Characidae (BURGER; CARVALHO; ZANATA, 2019; ZANATA et al., 2019), contendo 115 espécies validadas (FROESE; PAULY, 2022). Conhecidos popularmente como “lambaris” (LEITE et al., 2021), são abundantes na América do Sul (CASTRO et al., 2019) e se distribuem entre o sul dos Estados Unidos até o centro da Argentina (GAVAZZONI et al., 2018). No Brasil, são encontrados principalmente nas grandes bacias brasileiras, como por exemplo os rios Paraná e São Francisco (DA SILVA et al., 2021).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA E AMOSTRAGEM

A obtenção da licença ambiental para coleta de animais ocorreu via Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio: número 63551-1, emitida em 27/06/2018). A obtenção da licença de experimentação animal ocorreu através da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas (SCB) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) (CEUABIO/UFPR: número 1228, emitida em 30/10/2018).

Os espécimes de *A. lacustris* foram obtidos em lagos artificiais pertencentes ao Centro de Pesquisa e Extensão em Aquicultura Il do Zago (FIGURA 9), localizado no município de União da Vitória – PR ($26^{\circ}13'12.15''S$; $51^{\circ}7'51.07''O$), com o auxílio de redes de pesca (tecido de multifilamento, malha de 12 mm entre os nós).

FIGURA 9 – CENTRO DE PESQUISA E EXTENSÃO EM AQUICULTURA ILDO ZAGO (CEPEA)



FONTE: O autor (2022).

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na piscicultura, os peixes foram mantidos em lagos artificiais por aproximadamente 60 dias. Posteriormente, os espécimes de *A. lacustris* foram aclimatados durante 3 dias (PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2017, com modificações) em tanques de aproximadamente 830 L, com água aerada constantemente (água corrente proveniente de uma nascente) em fluxo contínuo (vazão de 4 L/min), com fotoperíodo natural (BAGNYUKOVA et al., 2007; CHUNG, 2000; LIRA et al., 2018; NAVARRO et al., 2014) de aproximadamente 13:30 horas luz/10:30 horas escuro e temperatura controlada de $23\text{ °C} \pm 0,5$ (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015; LERMEN et al., 2004).

Os peixes foram alimentados diariamente (média: 1% peso corporal) (CHUNG, 2000; LERMEN et al., 2004) com ração comercial (Supra® Aqua Line, com teor de proteína de 42%) (TABELA 1). Os parâmetros analisados na água durante aclimação foram: oxigênio dissolvido ($9,31 \pm 2,17$ mg/L), amônia tóxica (NH_3) ($0,009 \pm 0,004$ mg/L), pH ($7,4 \pm 0,31$), dureza (75 ± 9 mg/L de CaCO_3) e sem presença de nitrato, nitrito e cloro residual.

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO SIMPLIFICADA DA RAÇÃO UTILIZADA NO EXPERIMENTO

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

FONTE: O autor (2022).

Após aclimação, os peixes foram randomicamente e simultaneamente transferidos para as temperaturas de $15\text{ °C} \pm 0,5$ ou $31\text{ °C} \pm 0,5$ (LERMEN et al., 2004) e seu respectivo grupo controle à $23\text{ °C} \pm 0,5$ (CAMARGO et al., 2017; LERMEN et al., 2004). Na região subtropical do Brasil, a temperatura da água pode ficar acima de 29 °C no verão (HENNEMANN; PETRUCIO, 2011; TANIWAKI et al., 2013) e abaixo de 16 °C no inverno (HAYASHI et al., 2011). Desta forma, as temperaturas utilizadas nos bioensaios foram escolhidas baseadas na distribuição subtropical de *A. lacustris*.

Os tempos testados foram 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, visto que tem sido demonstrado na literatura que estes tempos geram alterações das atividades

metabólicas visando o reestabelecimento da homeostase (FORGATI et al., 2017; KANDALSKI et al., 2018; PRZEPIURA et al., 2019; SOUZA et al., 2018).

Para cada situação experimental o número total foi de 10 indivíduos coletados de dois aquários diferentes (5 peixes de cada aquário), caracterizando duplicata. Como são dois bioensaios separados (choque térmico de alta e baixa temperatura), sete períodos de exposição testados em ambos os bioensaios (2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 h) e há um grupo controle para cada tempo de cada bioensaio, trabalhou-se com um número total de 280 peixes. Foram utilizados indivíduos adultos, com comprimento padrão de $6,17 \pm 0,87$ cm e peso médio de $9,15 \pm 3,4$ g.

Os aquários experimentais caracterizavam sistemas estáticos, limpos por sucção a cada dois dias (experimentos acima de 24 horas de exposição), com renovação de aproximadamente 50% da água (LERMEN et al., 2004). A densidade máxima foi de 1,8 g de peixe/L de água (CHUNG, 2000; VIEIRA; CORREIA; MOREIRA, 2013). Para regulação e controle da temperatura dos aquários, foram previamente instalados termostatos eletrônicos submersos (Aqua One®, VigoAr® e Atman®, com potência de 100 W). Os peixes expostos à baixa temperatura (15 °C) foram mantidos em aquários no interior de um refrigerador horizontal (Consul/530 L), com controlador digital de temperatura (TC-900E POWER/07).

O tipo de ração e a periodicidade da sua oferta durante a aclimação foram os mesmos durante os experimentos, sendo realizada de forma simultânea nos grupos controle e tratamento. O primeiro dia de aclimação foi o primeiro dia do fornecimento de alimento, e a última oferta de alimento ocorreu em um período de 22-24 horas antes da eutanásia dos animais (MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016; VINAGRE et al., 2014). *A. lacustris* e outras espécies pertencentes do gênero esvaziam seu sistema gastrointestinal em um período de 24-48 h (RIDDLE et al., 2018; SIQUEIRA-SILVA et al., 2021), evitando interferências do estado nutricional nos resultados.

Após a realização dos experimentos os peixes foram anestesiados com 20 mg L⁻¹ de benzocaína (a partir de uma solução estoque de 0,1 % (p v⁻¹) em etanol a 95%), eutanasiados através de secção medular e imediatamente dissecados. As amostras do encéfalo foram fixadas e armazenadas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram transportadas para o Laboratório de Biologia Adaptativa – Departamento de Biologia Celular – SCB/UFPR, onde houve continuidade com o processamento laboratorial do material.

3.3 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

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

A concentração de proteínas totais foi determinada com Coomassie Brilliant Blue G-250 e albumina de soro bovina (BSA) como padrão, com leitura de absorbância a 595 nm (BRADFORD, 1976).

As análises bioquímicas foram realizadas em triplicata e duplicata, com condições ótimas de pH, concentração de substrato saturante e temperatura ambiente aproximada de 22 °C (ROBINSON, 2008). Os resultados da EROs foram expressos em unidades de fluorescência, de acordo com modificações propostas por Perussolo e colaboradores (2019), e medida em espectrofluorímetro (Tecan infinite 200). Os demais biomarcadores foram determinados por espectrofotometria na leitora de microplacas (EPOCH Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT, USA).

O número de amostras utilizadas nas análises bioquímicas pode ser consultado em maiores detalhes no APÊNDICE 1.

A atividade enzimática foi expressa em unidade internacional, onde 01 U equivale a 01 μ mol de substrato convertido em produto por minuto.

3.3.1 Determinação da atividade das enzimas relacionadas à defesa antioxidante

Os métodos utilizados para mensuração da atividade enzimática das enzimas relacionadas à defesa antioxidante encontram-se na TABELA 2.

TABELA 2 – PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA ANÁLISES ENZIMÁTICAS DA DEFESA ANTIOXIDANTE

Enzima	EC	Método de observação	Leitura (min)	Abs (nm)	Componentes do sistema de reação	Referência
SOD	1.15.1.1	Redução do NBT	60	560	Carbonato de sódio (pH 10,2) 91 mM, EDTA 17.5 µM, NBT 0,1 mM e cloreto de hidroxilamina 37 mM.	CROUCH et al., 1981
CAT	1.11.1.6	Degradação do H ₂ O ₂	5	240	Tris (pH 8,0) 50 mM e H ₂ O ₂ 30 mM	AEBI, 1984
GST	2.5.1.18	Formação do tíoéster GS-DNB	10	340	Fosfato de potássio (pH 6,5) 85,5 mM, GSH 1,36 mM e CDNB 2,7 Mm.	KEEN et al., 1976
GPx	1.11.1.9	Oxidação do NADPH	15	340	Tampão fosfato de sódio (pH 7,0) 100 mM, Azida sódica 2 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 2 mM e GR 1 U/mL.	WENDEL, 1981
GR	1.8.1.7	Oxidação do NADPH	15	340	Fosfato de potássio (pH 7,6) 100 mM em EDTA 5mM, NADPH 0,5 mM e GSSG mM.	SIES et al., 1979
G6PDH	1.1.1.49	Formação de NADPH	10	340	Tris (pH 7,4) 97 mM, NADP ⁺ 0,2 mM e G6P 1 mM.	ANTONIETTA CIARDIELLO et al., 1995

FONTE: O autor (2022).

NOTA: Tabela constando as siglas, esquema de classificação numérica (EC), método de observação, tempo de leitura (em minutos), absorbância (Abs), sistema de reação e referência das enzimas testadas. SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutathione S-transferase, GPx- glutathione peroxidase, GR- glutathione reductase e G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase.

3.3.2 Determinação da concentração de GSH, EROs e dos marcadores de danos oxidativos

Os métodos utilizados para mensurar a concentração dos biomarcadores não enzimáticos relacionados à defesa antioxidante encontram-se na TABELA 3.

TABELA 3 – PROTOCOLOS UTILIZADOS PARA OS BIOMARCADORES NÃO ENZIMÁTICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Biomarcador	Método de observação	Leitura (min)	Abs (nm)	Padrão	Referência
LPO	Formação de Fe ⁺³	-	560	-	JIANG et al., 1991
PCO	Dinitrofenil hidrazonas formadas partir da reação entre DNPH e proteínas carboniladas	-	360	-	LEVINE et al., 1994
GSH	Tióis não protéicos reativo ao DTNB	-	415	GSH	SEDLAK; LINDSAY, 1968
EROs	Formação de diclorofluoresceína (DCF)	60	485 e 528*	-	DRIVER et al., 2000

FONTE: O autor (2022).

NOTA: Tabela constando o nome dos biomarcadores, método de observação, tempo de leitura (em minutos), absorvância (Abs), padrão utilizado na curva e referência. LPO- lipoperoxidação, PCO- carbonilação de proteínas, GSH- glutationa reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio. *A formação de diclorofluoresceína (DCF) foi medida com um espectrofluorímetro à 485 e 528 nm para excitação e emissão, respectivamente.

3.3.3 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram primeiramente transformados pelo método de box-cox (BOX; COX, 1964) para atender aos pressupostos da análise de variância (ANOVA) (KIM; CRIBBIE, 2018). Para isso fez-se uso do pacote MASS (VENABLES; RIPLEY, 2002). A normalidade e homocedasticidade dos dados foram verificadas com os testes de Shapiro–Wilk e Levene, respectivamente (VINAGRE et al., 2014).

Para verificar as diferenças entre controle e tratamento de cada período de exposição e entre os tempos de exposição, cada biomarcador foi submetido à ANOVA bifatorial ($p < 0,05$). Para identificação das diferenças específicas realizou-se o teste *post hoc* de Tukey pelo pacote emmeans (LENTH, 2022). Os gráficos de barra foram construídos através do pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016) e os dados apresentados como média \pm erro padrão da média.

A abordagem do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) foi aplicada para entender as relações entre os biomarcadores analisados (DEVIN et al., 2014). Além de um valor geral de estresse biológico obtido a partir da integração das respostas dos biomarcadores, o IBR permite verificar a resposta de cada biomarcador (indução ou inibição sob condição de estresse) (BEVITÓRIO et al., 2022). Neste trabalho, o IBR foi empregado para verificar a capacidade de aclimação da espécie

a partir do desempenho fisiológico geral (CAMPOS et al., 2019). O cálculo foi realizado através da Interface CALculate IBR, desenvolvida pelo Laboratório Interdisciplinar para Ambientes Continentais da Universidade de Lorraine, na França (CALIBRI, 2022). A plataforma considera o cálculo proposto por Beliaeff e Burgeot (2002) e revisitado por Devin e colaboradores (2014). Os gráficos radar foram obtidos através do pacote ggradar (BION, 2022).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com os pacotes factoextra (KASSAMBARA; MUNDT, 2020) e FactoMineR (LÉ; JOSSE; HUSSON, 2008) para investigar quais biomarcadores do estresse oxidativo foram importantes descritores das temperaturas analisadas (15 °C e 31 °C). Para verificar se houve diferença nas respostas dos biomarcadores entre as temperaturas de 15 °C e 31 °C foi utilizada a análise multivariada da variância (MANOVA) com o teste de Pillai ($p < 0,05$). A diferença entre os grupos foi investigada a partir do teste *post hoc* de Tukey ($p < 0,05$).

Uma análise de correlação foi empregada para verificar se as diferenças na concentração de LPO, PCO e EROs foram acompanhadas pela atividade/concentração dos biomarcadores SOD, CAT, GST, GPx, GR, GSH e G6PDH. Como não houve normalidade bivariada dos dados, foi aplicada a análise de correlação de Spearman ($p < 0,05$) (MADEIRA et al., 2013).

As análises estatísticas e as representações gráficas foram produzidas no *software* R, versão 4.1.3 (R CORE TEAM, 2022). Os mapas foram produzidos no *software* QGIS, versão 3.24 (QGIS, 2022) a partir de *shapefiles* disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2021). Os esquemas ilustrativos foram produzidos no *software* Microsoft PowerPoint 2021, versão 2204.

4 RESULTADOS

Durante os ensaios ocorreram 11 mortes (3,9 %), sendo 8 peixes nos grupos controles e 3 peixes no grupo tratamento de baixa temperatura (15 °C). Desta forma, este bioensaio é considerado válido (mortalidade < 10 %) (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2015). Os resultados da ANOVA para as enzimas relacionadas a defesa antioxidante estão representados na TABELA 4, enquanto que os marcadores de danos oxidativos, GSH e EROs encontram-se na TABELA 5.

TABELA 4 – RESULTADOS DA ANOVA DAS ENZIMAS RELACIONADAS A DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris*

Estatísticas da ANOVA			SOD	CAT	GST	GPx	GR	G6PDH
Temperatura X Tempo	31 °C	F	1,599	1,796	1,963	3,819	2,146	2,228
		p	0,153	0,106	0,076	0,002*	0,053	0,045*
Tempo	15 °C	F	0,520	2,377	0,401	1,129	0,609	2,258
		p	0,792	0,034*	0,877	0,350	0,723	0,043*
Tempo	31 °C	F	10,131	3,213	3,149	3,263	7,694	3,819
		p	< 0,001*	0,006*	0,007*	0,005*	< 0,001*	0,002*
	15 °C	F	9,585	6,468	4,148	3,151	2,778	4,272
		p	< 0,001*	< 0,001*	< 0,001*	0,007*	0,015*	< 0,001*

FONTE: O autor (2022).

NOTA: SOD- superóxido dismutase, b- catalase (CAT), c- glutationa S-transferase (GST), d- glutationa peroxidase (GPx), e- glutationa redutase (GR) e f- glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

TABELA 5 – RESULTADOS DA ANOVA DE DANOS OXIDATIVOS, GSH E EROs DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris*

Estatísticas da ANOVA			LPO	PCO	GSH	EROs
Temperatura X Tempo	31 °C	F	0,795	1,204	2,724	1,349
		p	0,575	0,309	0,016*	0,242
Tempo	15 °C	F	1,649	1,018	0,853	0,796
		p	0,142	0,417	0,532	0,575
Tempo	31 °C	F	1,995	4,925	1,473	1,531
		p	0,072	< 0,001*	0,193	0,175
	15 °C	F	13,857	5,829	2,929	2,244
		p	< 0,001*	< 0,001*	0,011*	0,045*

FONTE: O autor (2022).

NOTA: LPO- lipoperoxidação, PCO- carbonilação de proteínas, GSH- glutationa reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio. Os asteriscos indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

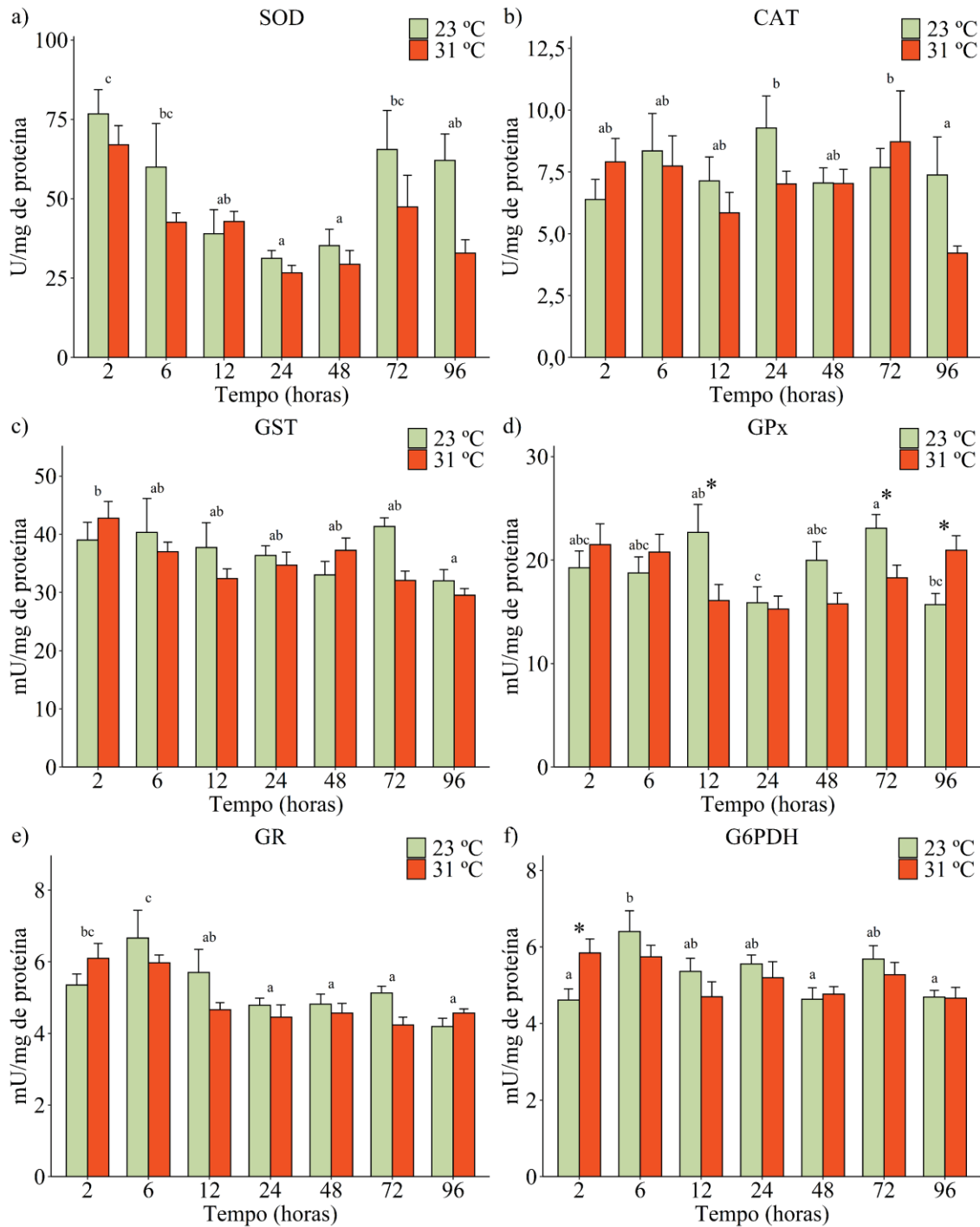
4.1 BIOMARCADORES RELACIONADOS A DEFESA ANTIOXIDANTE NO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA E BAIXA TEMPERATURA NO ENCÉFALO DE *A. lacustris*

No encéfalo de *A. lacustris*, em 31 °C, observou-se uma diminuição da atividade da GPx em 12 h ($p = 0,0048$) e 72 h ($p = 0,0391$), seguido por um aumento em 96 h ($p = 0,0133$) (FIGURA 10-d). Já na G6PDH houve aumento da atividade em 2 h ($p = 0,0059$) (FIGURA 10-f). Não houve mudança na atividade das enzimas SOD, CAT, GST e GR ($p > 0,05$) (FIGURA 10). Com relação aos biomarcadores não enzimáticos, se observou um aumento da concentração de GSH em 48 h ($p = 0,0006$) (FIGURA 11-c). LPO, PCO e EROs não apresentaram alterações ($p > 0,05$) (FIGURA 11).

Já no choque térmico de 15 °C observou-se um aumento da atividade da CAT em 2 h ($p = 0,0236$) com posterior redução em 96 h ($p = 0,0128$) (FIGURA 12-b), além de uma diminuição da atividade da G6PDH em 6 h ($p = 0,0015$) (FIGURA 12-f). Não houve mudança da atividade das enzimas SOD, GST, GPx e GR ($p > 0,05$) (FIGURA 12). Também se observou que LPO, PCO, GSH e EROs não apresentaram alterações em sua concentração ($p > 0,05$) (FIGURA 13).

Para resumir os resultados supracitados, foi construído um esquema que aborda os resultados de 31 °C e 15 °C (FIGURA 14).

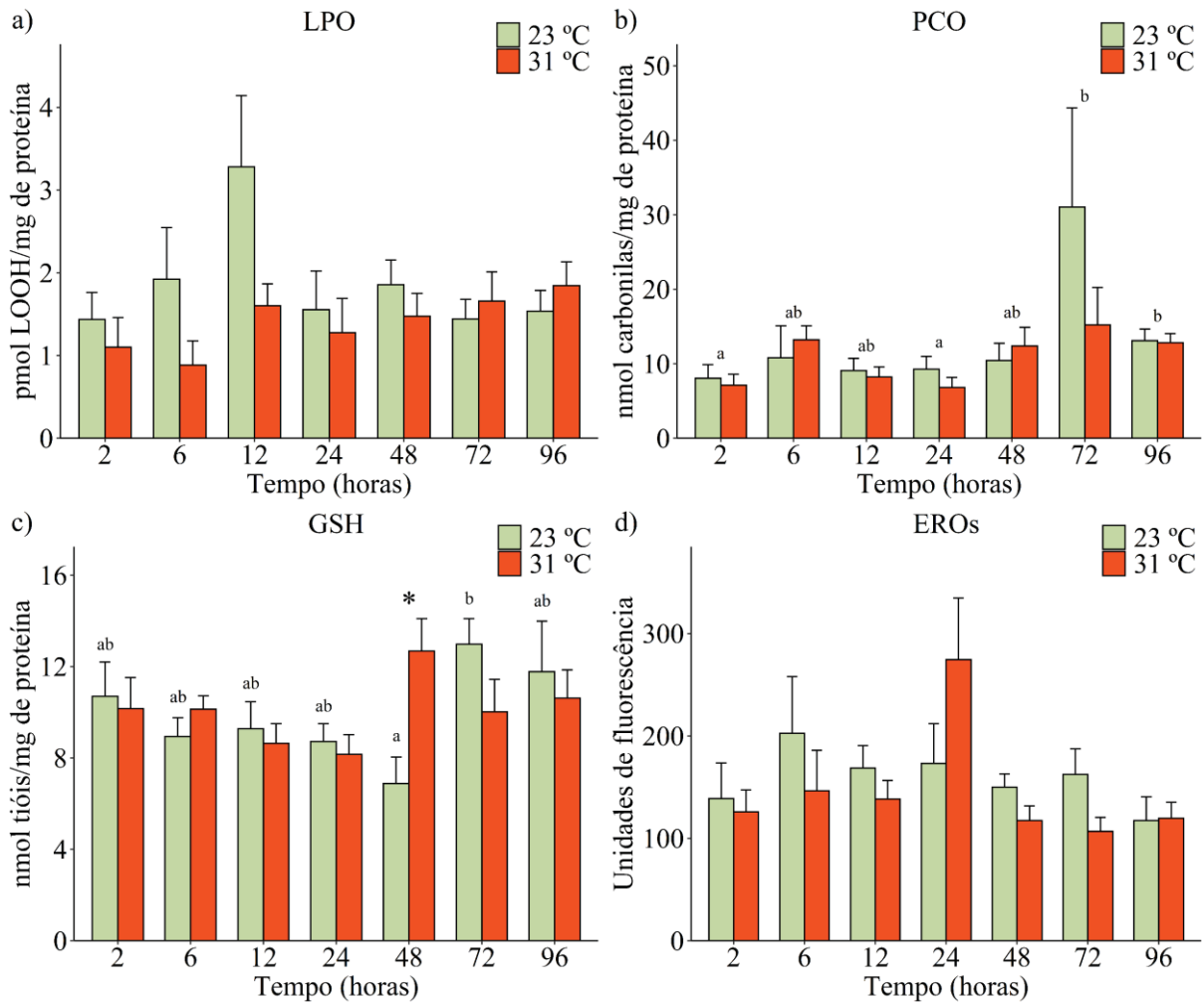
FIGURA 10 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS RELACIONADAS COM A DEFESA ANTIOXIDANTE NO EXPERIMENTO DE ALTA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Atividade das enzimas relacionadas com a defesa antioxidante no encéfalo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao choque térmico de alta temperatura (31 °C) e seu controle (23 °C). Para cada biomarcador foi construído um gráfico de barras, onde: a- superóxido dismutase (SOD), b- catalase (CAT), c- glutatona S-transferase (GST), d- glutatona peroxidase (GPx), e- glutatona redutase (GR) e f- glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Os dados estão apresentados com a média e erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferenças entre tratamentos, enquanto que diferentes letras minúsculas indicam diferenças entre os períodos de exposição ($p < 0,05$). Unidades de medida: U- unidade, mU- miliunidade e mg- miligrama.

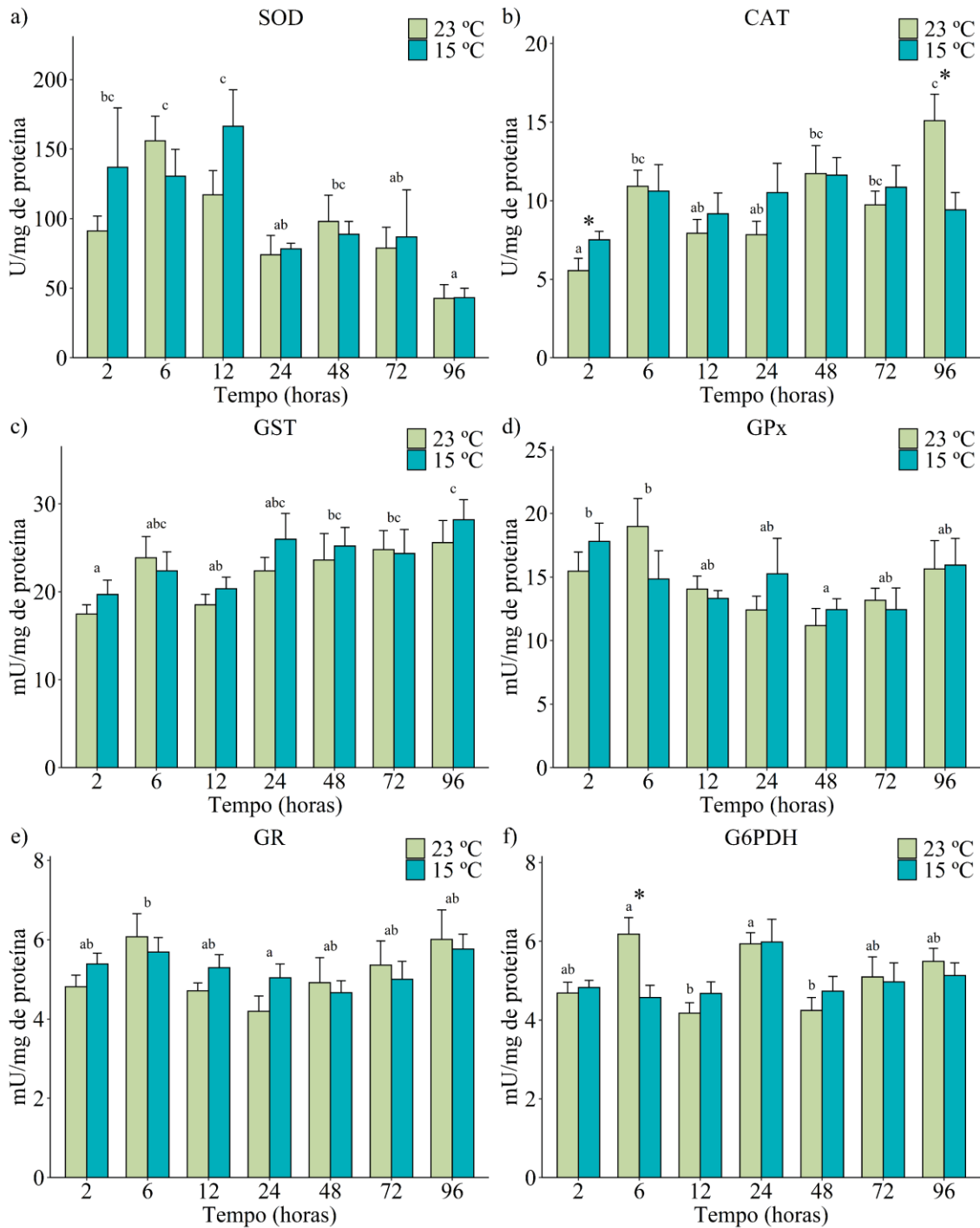
FIGURA 11 – MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS, GSH E EROs NO EXPERIMENTO DE ALTA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Concentração dos marcadores de danos oxidativos, GSH e EROs no encéfalo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao choque térmico de alta temperatura (31 °C) e seu controle (23 °C). Para cada biomarcador foi construído um gráfico de barras, onde: a- lipoperoxidação (LPO), b- carbonilação de proteínas (PCO), c- glutatona reduzida (GSH) e d- espécies reativas de oxigênio (EROs). Os dados estão apresentados com a média e erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferenças entre tratamentos, enquanto que diferentes letras minúsculas indicam diferenças entre os períodos de exposição ($p < 0,05$). Unidades de medida: pmol- picomole, nmol- nanomole e mg- miligrama.

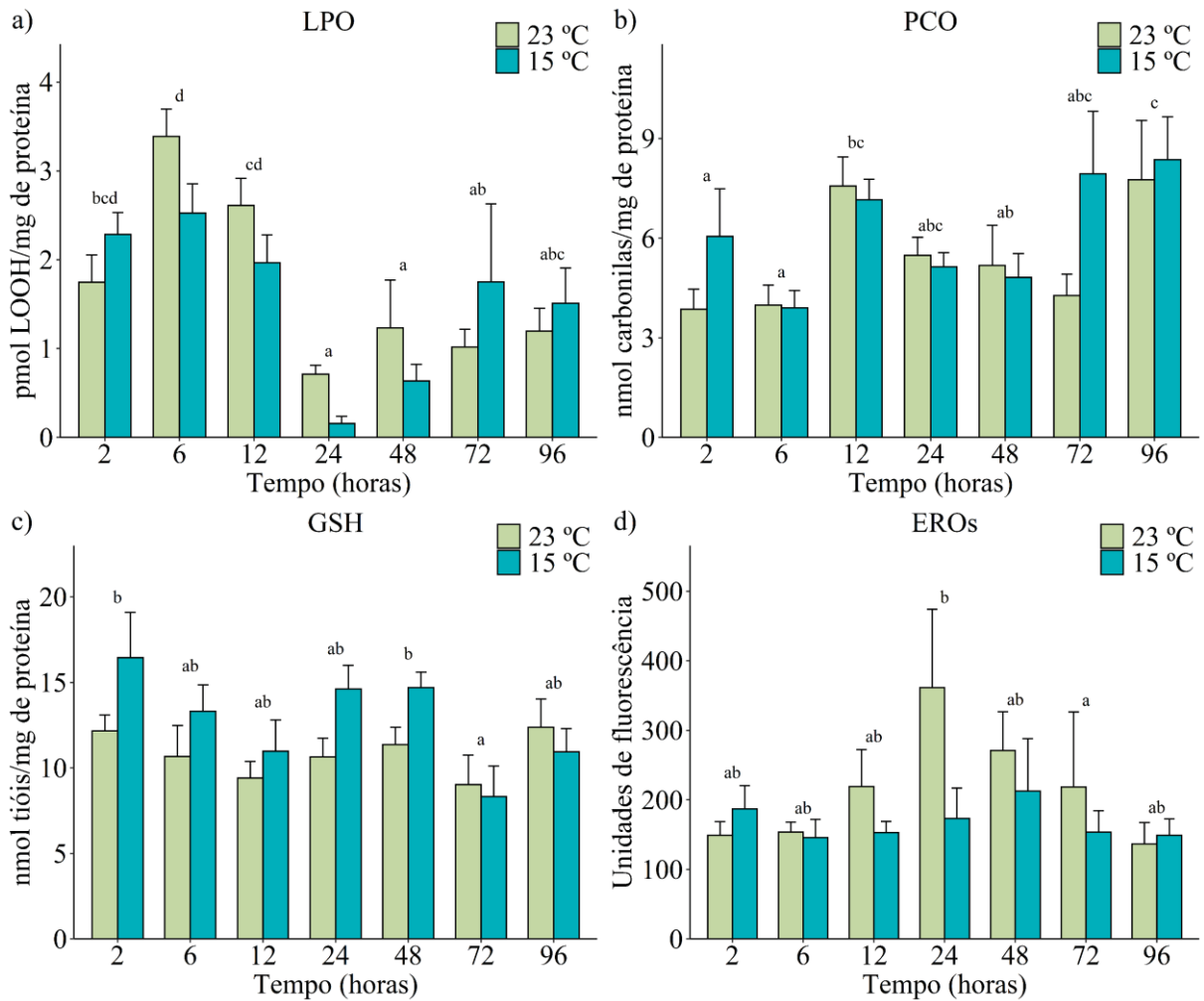
FIGURA 12 – ATIVIDADE DAS ENZIMAS RELACIONADAS COM A DEFESA ANTIOXIDANTE NO EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Atividade das enzimas relacionadas com a defesa antioxidante no encéfalo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao choque térmico de baixa temperatura (15 °C) e seu controle (23 °C). Para cada biomarcador foi construído um gráfico de barras, onde: a- superóxido dismutase (SOD), b- catalase (CAT), c- glutatona S-transferase (GST), d- glutatona peroxidase (GPx), e- glutatona redutase (GR) e f- glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Os dados estão apresentados com a média e erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferenças entre tratamentos, enquanto que diferentes letras minúsculas indicam diferenças entre os períodos de exposição ($p < 0,05$). Unidades de medida: U- unidade, mU- miliunidade e mg- miligrama.

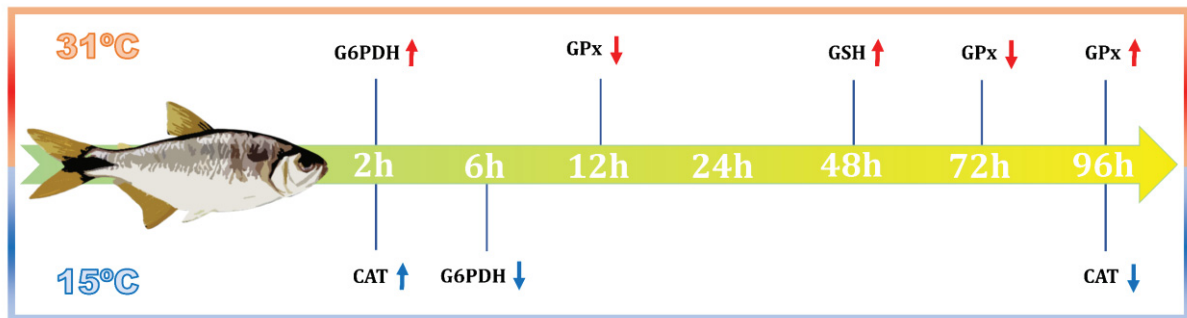
FIGURA 13 – MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS, GSH E EROs NO EXPERIMENTO DE BAIXA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Concentração dos marcadores de danos oxidativos, GSH e EROs no encéfalo de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao choque térmico de baixa temperatura (15 °C) e seu controle (23 °C). Para cada biomarcador foi construído um gráfico de barras, onde: a- lipoperoxidação (LPO), b- carbonilação de proteínas (PCO), c- glutatona reduzida (GSH) e d- espécies reativas de oxigênio (EROs). Os dados estão apresentados com a média e erro padrão da média. Os asteriscos indicam diferenças entre tratamentos, enquanto que diferentes letras minúsculas indicam diferenças entre os períodos de exposição ($p < 0,05$). Unidades de medida: pmol- picomole, nmol- nanomole e mg- miligrama.

FIGURA 14 – RESUMO DOS RESULTADOS PARA 31 °C E 15 °C.



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Esquema ilustrativo das mudanças na atividade/concentração dos biomarcadores relacionados à defesa antioxidante no encéfalo de *Astyanax lacustris* exposto ao choque térmico de alta e baixa temperatura. As setas apontadas para cima e para baixo indicam aumento e diminuição da atividade/concentração, respectivamente.

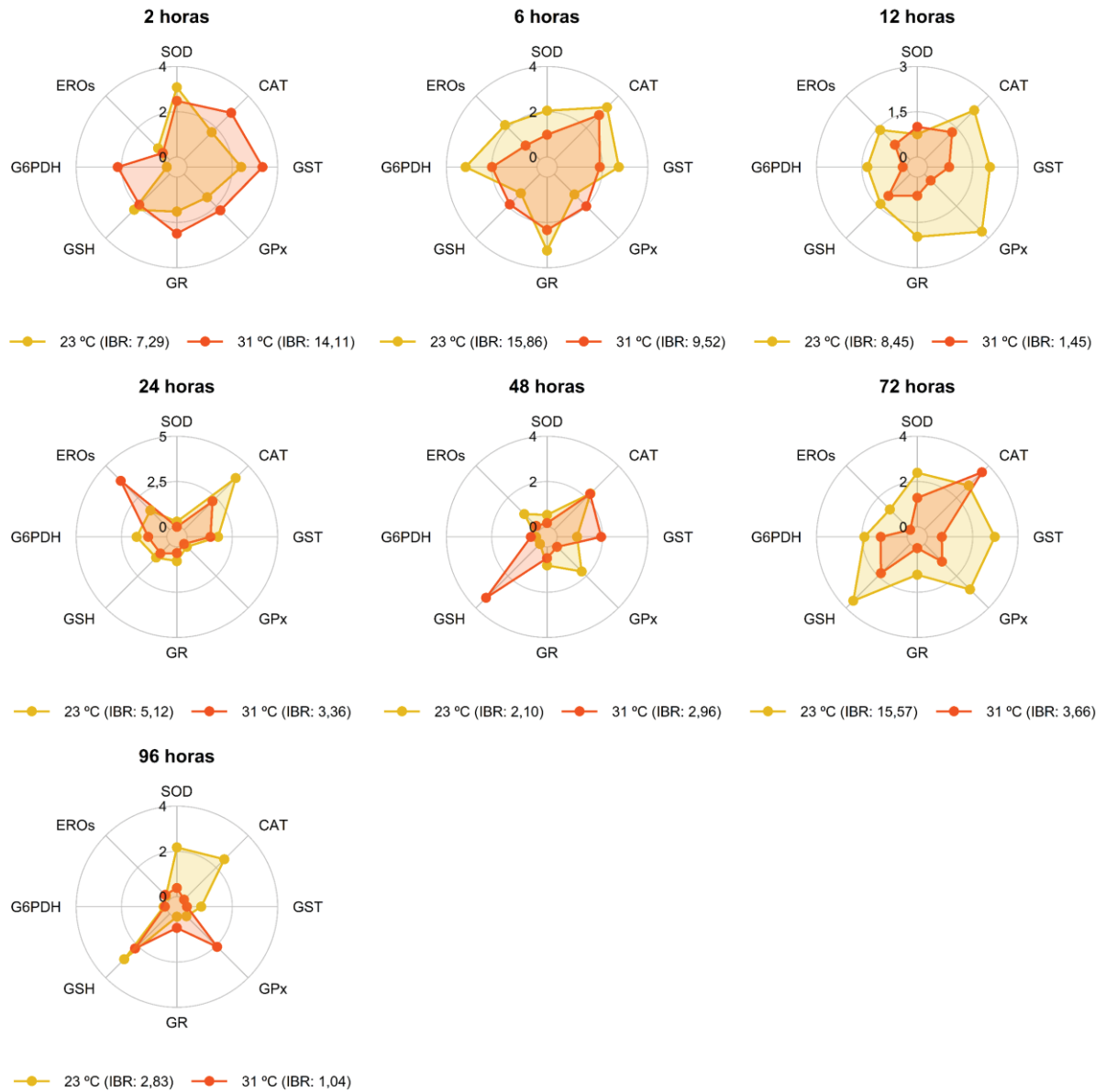
4.2 IBR DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA E BAIXA TEMPERATURA NO ENCÉFALO DE *A. lacustris*

O IBR sumarizou as respostas dos biomarcadores para alta temperatura (31 °C) (FIGURA 15). Como há um limite de oito biomarcadores no cálculo, optou-se pelo uso da SOD, CAT, GST, GPx, GR, GSH, G6PDH e EROs. Os marcadores bioquímicos mais responsivos em cada período de exposição em relação ao controle foram: CAT, GST, GPx, GR e G6PDH em 2 h; GPx e GSH em 6 h; SOD em 12 h; EROs em 24 h; GST, GSH e G6PDH em 48 h; CAT em 72 h e GPx, GR e EROs em 96 h.

A sumarização das respostas dos biomarcadores no choque térmico de baixa temperatura (15 °C) encontra-se na FIGURA 16. Os marcadores bioquímicos mais responsivos em cada período de exposição em relação ao controle foram: todos os biomarcadores em 2 h; GSH em 6 h; SOD, CAT, GST, GR, GSH e G6PDH em 12 h; SOD, CAT, GST, GPx, GR, GSH e G6PDH em 24 h; GST, GPx, GSH e G6PDH em 48 h; SOD e CAT em 72 h e SOD, GST, GPx e EROs em 96 h.

Para resumir os principais resultados obtidos a partir da integração dos biomarcadores do encéfalo de *A. lacustris* para o choque térmico de 31 °C e 15 °C, foi realizado um esquema que destaca os períodos de exposição que apresentaram maior mobilização do sistema de defesa antioxidante (FIGURA 17).

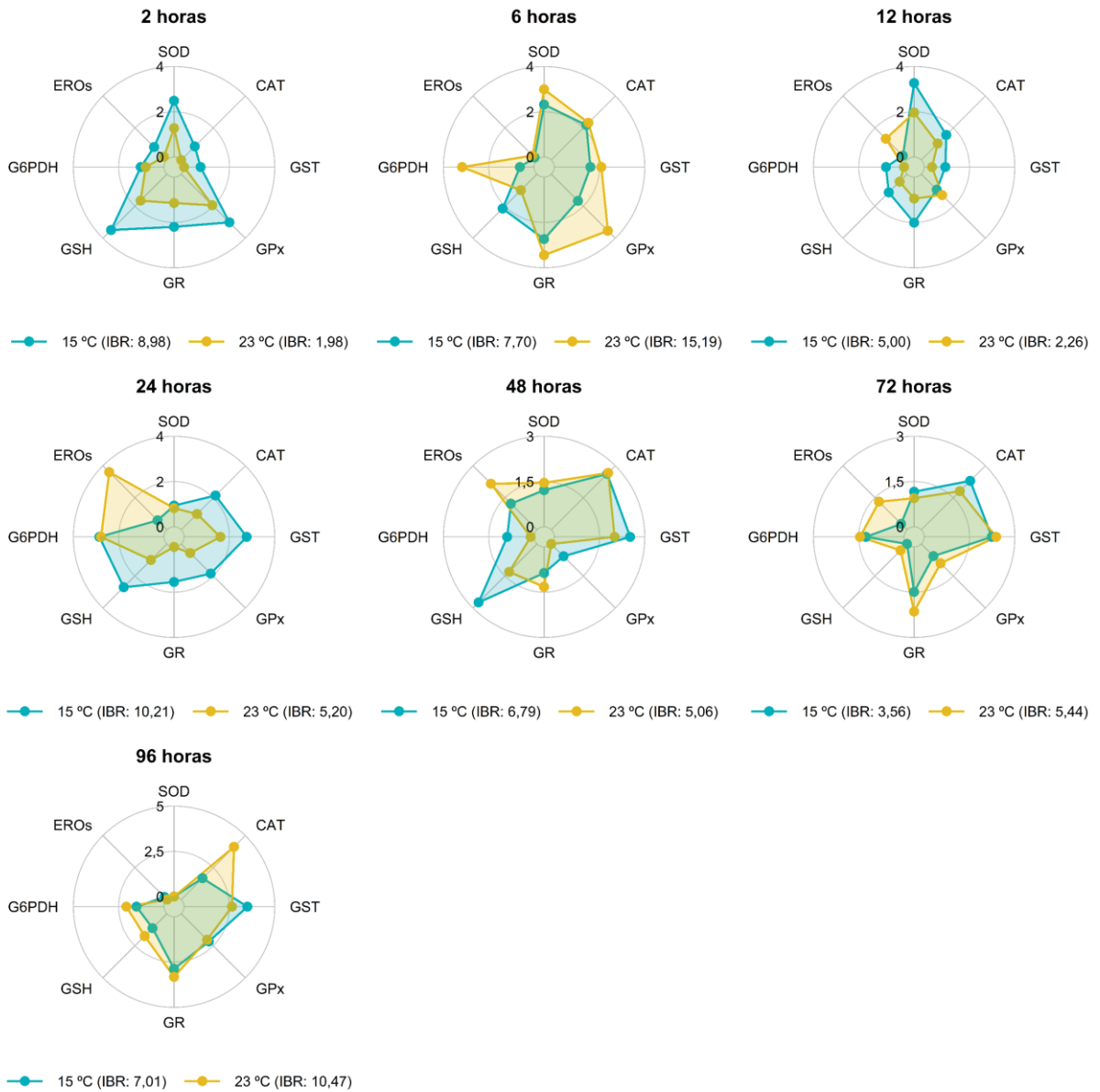
FIGURA 15 – IBR DOS BIOMARCADORES NO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivos gráficos de radar. SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutationa S-transferase, GPx- glutationa peroxidase, GR- glutationa redutase, G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase, GSH- glutationa reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio.






















FIGURA 16 – IBR DOS BIOMARCADORES NO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) e respectivos gráficos de radar. SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutationa S-transferase, GPx- glutationa peroxidase, GR- glutationa redutase, G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase, GSH- glutationa reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio.

FIGURA 17 – ESQUEMA DOS RESULTADOS DO IBR PARA O CHOQUE TÉRMICO DE 31 °C E 15 °C

Tempos de exposição	IBR da defesa antioxidante em 31°C	IBR da defesa antioxidante em 15°C
 2h  6h  12h  24h  48h  72h  96h	      	      

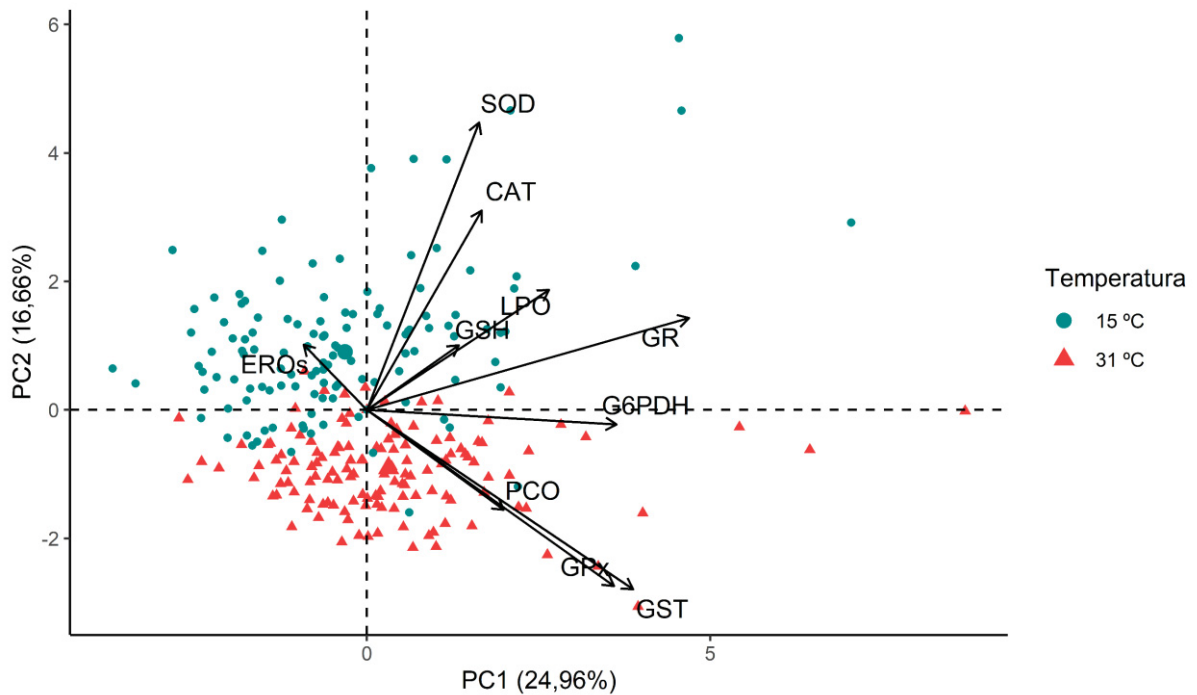
FONTE: O autor (2022).

NOTA: Esquema ilustrativo dos valores gerais de IBR do encéfalo de *Astyanax lacustris* para o choque térmico de 31 °C e 15 °C. Os peixes esquemáticos coloridos destacam os períodos de exposição que apresentaram maior mobilização do sistema antioxidante em relação ao grupo controle (cinza claro).

4.3 RESPOSTAS DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO ENTRE TEMPERATURAS NO ENCÉFALO DE *A. lacustris*

As diferenças nas respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo no encéfalo de *A. lacustris* entre temperaturas (15 °C e 31 °C) pode ser observada na FIGURA 18. O primeiro eixo da PCA explica 24,96 % e o segundo eixo explica 16,66 % da variação entre as temperaturas. Juntos, os dois eixos explicam 41,62 % da variação dos dados. Verificou-se que os biomarcadores SOD, CAT, GR, LPO, GSH e EROs estão relacionados com a baixa temperatura (15 °C). Já os biomarcadores GST, GPx, G6PDH e PCO estão relacionados com a alta temperatura (31 °C).

FIGURA 18 – BIPLLOT DA PCA DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris*



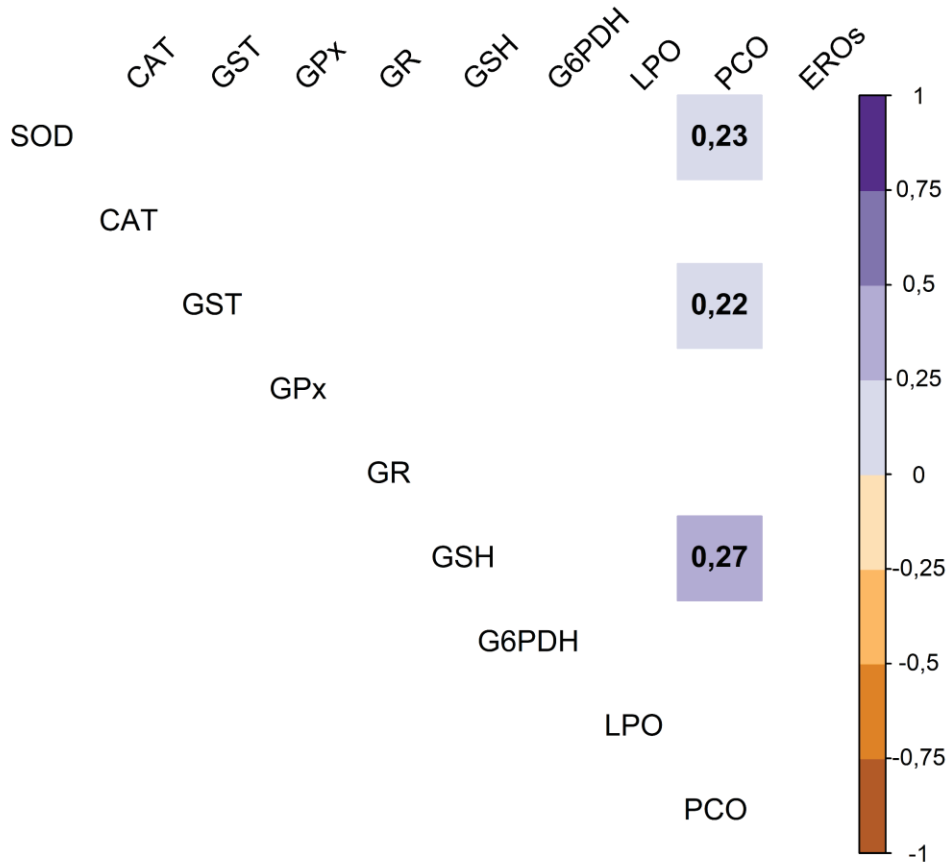
FONTE: O autor (2022).

NOTA: Biplot da análise de componentes principais (PCA) dos biomarcadores do encéfalo de *Astyanax lacustris* para as temperaturas de 31 °C e 15 °C. SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutathiona S-transferase, GPx- glutathiona peroxidase, GR- glutathiona redutase, G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase, LPO- lipoperoxidação, PCO- carbonilação de proteínas, GSH- glutathiona reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio.

Os resultados obtidos a partir da MANOVA corroboram com a PCA. Os marcadores bioquímicos SOD ($p < 0,0001$), CAT ($p < 0,0001$), GST ($p < 0,0001$), GPx ($p < 0,0001$), GSH ($p = 0,0023$), PCO ($p < 0,0001$) e EROs ($p = 0,0125$) apresentaram diferentes respostas entre as temperaturas de 15 °C e 31 °C. GR, G6PDH e LPO não apresentaram diferenças ($p > 0,05$).

Com relação aos resultados obtidos na análise de correlação de Spearman do choque térmico de alta temperatura (FIGURA 19), a PCO apresentou correlação positiva com a SOD ($p = 0,0085$), GST ($p = 0,0119$) e GSH ($p = 0,0021$).

FIGURA 19 – MATRIZ DE CORRELAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris* SUBMETIDO A ALTA TEMPERATURA

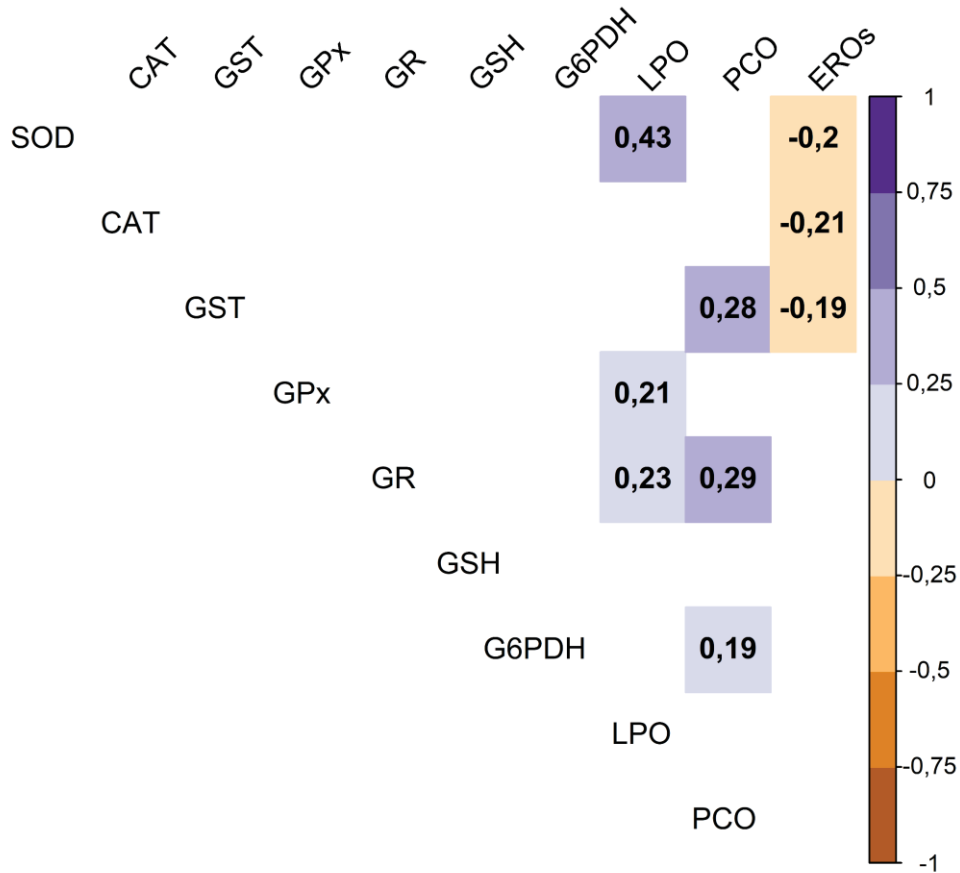


FONTE: O autor (2022).

NOTA: Matriz de correlação dos biomarcadores de defesa antioxidante com LPO, PCO e EROs. As cores indicam a intensidade da correlação. Os valores do coeficiente de correlação estão representados apenas para as correlações onde $p < 0,05$. SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutathione S-transferase, GPx- glutathione peroxidase, GR- glutathione reductase, G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase, LPO- lipoperoxidação, PCO- carbonilação de proteínas, GSH- glutathione reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio.

No choque térmico de baixa temperatura (FIGURA 20), a EROs apresentou correlação negativa com a SOD ($p = 0,0325$), CAT ($p = 0,0206$) e GST ($p = 0,0387$). A PCO apresentou correlação positiva com a GST ($p = 0,0023$), GR ($p = 0,0013$) e G6PDH ($p = 0,0367$). A LPO apresentou correlação positiva com a SOD ($p < 0,0001$), GPx ($p = 0,0288$) e GR ($p = 0,016$).

FIGURA 20 – MATRIZ DE CORRELAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris* SUBMETIDO A BAIXA TEMPERATURA



FONTE: O autor (2022).

NOTA: Matriz de correlação dos biomarcadores de defesa antioxidante com LPO, PCO e EROs. As cores indicam a intensidade da correlação. Os valores do coeficiente de correlação estão representados apenas para as correlações onde $p < 0,05$. SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutathiona S-transferase, GPx- glutathiona peroxidase, GR- glutathiona redutase, G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase, LPO- lipoperoxidação, PCO- carbonilação de proteínas, GSH- glutathiona reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, as mudanças encontradas entre os tempos de exposição para cada biomarcador podem estar relacionadas ao ritmo circadiano, visto que em determinados horários do dia há uma maior expressão dos genes enzimáticos da defesa antioxidante (VERA; MIGAUD, 2016). A variabilidade individual dos peixes em resposta ao choque térmico também pode estar associada a estes resultados, assim como o trabalho cooperativo dos biomarcadores do sistema de defesa antioxidante (CHADWICK; NISLOW; MCCORMICK, 2015). O aumento ou diminuição da atividade enzimática ou da concentração de alguns biomarcadores pode estar relacionado com o aumento ou diminuição de outros biomarcadores durante o controle do estresse oxidativo (FADHLAOU; COUTURE, 2016; MACHADO et al., 2014).

Os peixes utilizados neste trabalho foram mantidos em lagos artificiais de piscicultura por aproximadamente 60 dias. Posteriormente, foram aclimatados durante 3 dias (72 horas) em tanques com características físico-químicas da água semelhantes, pois a água dos lagos artificiais, tanques e aquários vieram da mesma nascente. Lopes e colaboradores (2021) aclimataram *A. lacustris* durante 10 dias em tanques e durante 24 horas nos aquários onde os experimentos foram conduzidos. Barbieri e colaboradores (2019) aclimataram *Astyanax ribeirae* durante 7 dias em tanques e durante 1 hora nos aquários experimentais para prevenir efeitos de manipulação. Estes períodos encontrados na literatura estão relacionados com a capacidade de aclimação que peixes do gênero *Astyanax* possuem quando realocados para ambientes diferentes (PINHEIRO et al., 2019). Desta forma, foram evitados efeitos de manipulação nos resultados.

Nas seções posteriores foram priorizadas as diferenças significativas entre controle e tratamento para cada período de tempo, visto que é o foco principal deste trabalho. O *design* metodológico apresenta um grupo controle para cada uma das situações experimentais, e o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do choque térmico em diferentes períodos de exposição.

5.1 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO ENCÉFALO DE *A. lacustris*

Na região subtropical do Brasil a temperatura da água, em condições naturais, pode ultrapassar 29 °C (HENNEMANN; PETRUCIO, 2011; TANIWAKI et al., 2013). A variação da temperatura é o principal fator abiótico relacionado com a fisiologia dos peixes em todos os estágios de criação na piscicultura (ISLAM; KUNZMANN; SLATER, 2021). O estresse oxidativo induzido pelo aumento da temperatura pode acarretar problemas de saúde, aumento de mortalidade e redução na expectativa de vida de peixes (MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016). Situações como esta levariam a perdas na produção com impacto econômico relevante (ISLAM et al., 2020).

O aumento da atividade da G6PDH indica a ativação da via das pentoses-fosfato, que tem como produto final NADPH (GUILLEN et al., 2019). A atividade desta enzima pode estar relacionada com a acumulação de energia a partir da síntese de ácidos graxos, esteroides de colesterol e esfingolipídios (GRASSET et al., 2016; KUMAR et al., 2016). Porém, o aumento da atividade da G6PDH em 2 h sugere que houve disponibilização de NADPH para a redução de GSSG em GSH pela GR, aumentando a concentração de GSH nas células (MATVIISHYN et al., 2014; MUTHAPPA et al., 2014).

A diminuição da atividade da GPx em 12 h e 72 h assemelha-se com os resultados encontrados por Przepiura e colaboradores (2019) no encéfalo do peixe antártico *Notothenia rossii*, onde houve diminuição da atividade nos períodos iniciais (6 e 12 h) e aumento nos períodos finais de exposição (72 e 144 h). Apesar das diferenças metabólicas entre peixes subtropicais e polares, uma resposta similar foi verificada entre as espécies. Estas respostas podem ser resultado de alterações na tradução do mRNA da GPx, que difere de acordo com a espécie e o órgão (SOUZA et al., 2018). Similarmente, Topal e colaboradores (2021) verificaram uma diminuição na expressão do mRNA da GPx no encéfalo da truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) sob estresse de alta temperatura. Na ocasião, os autores sugeriram que este resultado pode estar associado a uma mobilização inadequada da defesa antioxidante no combate às EROs. Contudo, em nosso trabalho, a diminuição da atividade da GPx pode representar um caráter responsivo da enzima a alta temperatura.

O aumento da concentração de GSH em 48 h pode indicar uma atuação direta na detoxificação de certas EROs, como o radical hidroxila (ZHANG et al., 2008). Klein

e colaboradores (2017) verificaram que a exposição à longo prazo (6 dias) do peixe antártico *Notothenia coriiceps* a alta temperatura (4 °C) ocasionou aumento na concentração de GSH do encéfalo. Estes autores também destacaram a importância da GSH nesta condição experimental, sugerindo que ela e outros antioxidantes não enzimáticos poderiam substituir as peroxidases e atuar na primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo.

O aumento da atividade da GPx em 96 h pode estar associado à eliminação do peróxido de hidrogênio formado na condição de estresse térmico (CUI et al., 2020), tendo em vista sua importância para o encéfalo na proteção dos neurônios contra danos (LUSHCHAK et al., 2005). No trabalho de Bagnyukova e colaboradores (2007) com *Carassius auratus*, o goldfish, houve aumento da atividade da GPx do encéfalo em 24 e 48 h após transferência da baixa (3 °C) para a alta (23 °C) temperatura. Na ocasião, os autores sugeriram que este resultado poderia estar relacionado com uma adaptação a longo prazo para a alta temperatura. Contudo, neste trabalho, a GPx do encéfalo de *A. lacustris* parece ser responsiva a alta temperatura.

Nossos resultados mostram que os marcadores bioquímicos G6PDH, GSH e GPx foram eficientes na neutralização de EROs no encéfalo de *A. lacustris* em 31 °C, visto que não houve aumento da concentração de LPO, PCO e EROs. Estes dados também explicam a ausência de alterações na concentração/atividade dos demais biomarcadores, sugerindo que não foi necessária a mobilização dos outros antioxidantes mensurados para a prevenção de danos oxidativos.

A temperatura da água varia diariamente e sazonalmente (ASHLEY STEEL; SOWDER; PETERSON, 2016), e organismos aquáticos conseguem tolerar uma variação de poucos graus celsius em relação à temperatura máxima que encontram no meio em que habitam (LOGAN; BUCKLEY, 2015). Portanto, é possível que *A. lacustris* enfrente uma temperatura de 31 °C no verão. Nesse sentido, o controle do estresse oxidativo durante um período curto de exposição à alta temperatura pode estar relacionado com a adaptação evolutiva da espécie (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; LUSHCHAK, 2011).

5.2 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA NO ENCÉFALO DE *A. lacustris*

A água da região subtropical do Brasil, em condições naturais, pode chegar a temperaturas menores que 16 °C (HAYASHI et al., 2011). O declínio da temperatura da água pode ocorrer devido às mudanças na incidência da radiação solar, renovação da água em lagoas e reservatórios e mudanças sazonais. No ambiente de piscicultura estas mudanças podem ocorrer devido às práticas do manejo de peixes (DONALDSON et al., 2008) e induzir estresse, o que compromete fisiologicamente os indivíduos e pode inclusive levar a mortalidade (PANASE; SAENPHET; SAENPHET, 2018). Desta forma, para garantir uma produção em grande quantidade e qualidade, a temperatura é uma característica da água que demanda atenção (REBOUÇAS et al., 2014).

A CAT desempenha importante papel na prevenção de danos oxidativos catalisando a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (LIU et al., 2019). Desta forma, o aumento da atividade da CAT em 2 h pode estar relacionado com maior produção de peróxido de hidrogênio induzido pelo choque térmico de baixa temperatura (GARCIA et al., 2015). No trabalho de Joy e colaboradores (2017) com encéfalo de *Etroplus suratensis*, um peixe tropical, houve aumento da atividade da CAT em 24, 48 e 72 h após choque térmico de baixa temperatura (16 °C). Esse resultado pode indicar que a CAT do encéfalo de *A. lacustris* é responsiva sob estresse de baixa temperatura.

Em relação à defesa antioxidante, a G6PDH catalisa a síntese de NADPH, cofator requerido para a redução de GSSG em GSH pela GR (GARAI-IBABE; SAA; PAVLOV, 2013). Contudo, a diminuição da atividade da G6PDH em 6 h e a ausência de outras alterações no encéfalo de *A. lacustris* neste mesmo período de exposição pode estar relacionado com um menor fornecimento de glicose-6-fosfato. Isso pode indicar uma diminuição nas taxas de atividade enzimática e consequente diminuição na demanda de ATP ocasionada pela baixa temperatura (QI et al., 2013). De modo parecido, no trabalho de Grasset e colaboradores (2016) com *Perca flavescens*, um peixe de água doce amplamente distribuído na América do Norte, verificou-se que a atividade da G6PDH do rim não respondeu à mudança da temperatura, provavelmente devido ao seu papel principal na biossíntese lipídica.

No encéfalo de *A. lacustris*, em 96 h, houve uma diminuição na atividade da CAT, e nenhuma outra alteração foi detectada neste período de exposição. Este resultado pode estar relacionado às diferentes taxas de geração de EROs e demanda da defesa antioxidante para cada período de exposição. Além disso, diferenças no controle da transcrição e tradução das enzimas de defesa antioxidante devem ser consideradas (ZHANG et al., 2021).

Após a exposição de *A. lacustris* em 15 °C, verificou-se que a neutralização das EROs no encéfalo ocorreu principalmente pela atividade da CAT. A ausência de alterações na concentração de LPO, PCO e EROs indicam que a CAT supriu a demanda antioxidante no combate às EROs e evitou danos macromoleculares nos períodos de exposição testados.

5.3 RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES EM ALTA E BAIXA TEMPERATURA

A aclimação é o processo de manutenção da homeostase fisiológica, que inclui respostas bioquímicas, entre elas a mobilização da defesa antioxidante no controle do estresse oxidativo (MADEIRA et al., 2016). A capacidade de aclimação está diretamente relacionada com a resistência que os peixes possuem frente às alterações climáticas. Desta forma, as respostas fisiológicas ocorridas em função das mudanças da temperatura condizem com a sobrevivência da espécie e podem indicar ameaças em cenários futuros (CAMPOS et al., 2019).

Os maiores valores de IBR para os grupos expostos em 31 °C e 15 °C presentes em 2 h indicam uma resposta inicial do sistema de defesa antioxidante do encéfalo para o controle do estresse oxidativo (JOY et al., 2017). Além do mais, as maiores respostas dos marcadores antioxidantes até 48 h podem refletir na capacidade do encéfalo de *A. lacustris* em mobilizar e modular eficientemente os antioxidantes. Para Campos e colaboradores (2019), o aumento do valor de IBR é resultado de estresse oxidativo, o que sugere baixa habilidade de aclimação. Por outro lado, os baixos valores de IBR em 72 e 96 h indicam que houve alta capacidade de aclimação de *A. lacustris* em 31 °C e 15 °C.

Estas características podem estar relacionadas às funções vitais que o encéfalo cumpre no organismo, como a percepção da mudança de temperatura e sua codificação em sinais nervosos e neuroendócrinos (MADEIRA; VINAGRE; DINIZ,

2016; SERVILI et al., 2020). A composição rica em lipídios e o alto metabolismo oxidativo mitocondrial do encéfalo implicam na necessidade de um sistema antioxidante robusto (LUSHCHAK et al., 2009).

5.4 EFEITOS DO CHOQUE TÉRMICO ENTRE TEMPERATURAS NO ENCÉFALO DE *A. lacustris*

Em baixa temperatura pode ocorrer acúmulo de elétrons em pontos específicos da cadeia respiratória em detrimento de uma menor fluidez da membrana mitocondrial, aumentando a produção de EROs (QI et al., 2013). Já em alta temperatura os peixes podem apresentar um aumento na atividade natatória (BEYAN et al., 2015; ROSSI; BACCHETTA; CAZENAVE, 2017) e um aumento do metabolismo celular, o que pode aumentar a produção de EROs (CARNEY ALMROTH et al., 2015). Estas características levam à diferentes respostas fisiológicas nos organismos aquáticos.

A SOD e a CAT fazem parte da primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo. A SOD catalisa as transformações de radicais superóxidos em H_2O_2 , enquanto que a CAT transforma o H_2O_2 em O_2 e H_2O (WOO; CHUNG, 2020). Os resultados da PCA e MANOVA indicam maior participação destas enzimas no encéfalo de *A. lacustris* sob choque térmico de baixa temperatura.

Já sob efeito do choque térmico de alta temperatura, as enzimas glutationa-dependentes e associadas GST, GPx e G6PDH parecem ser mais importantes no controle do estresse oxidativo. No trabalho de Bagnyukova e colaboradores (2007) com encéfalo de *Carassius auratus* (goldfish) as enzimas glutationa-dependentes apresentaram atividade mais elevada sob exposição ao choque térmico de alta temperatura. Os autores destacaram a importância destas enzimas para controlar a concentração de danos oxidativos.

A relação da GR e G6PDH na PCA indica uma contribuição similar destas enzimas para as temperaturas de 15 °C e 31 °C. Isso pode estar relacionado com a função de suprimento de substrato que estas enzimas desempenham, a partir da renovação da GSH dependente de NADPH pela GR e na reciclagem do NADP⁺ pela G6PDH (PEÑA-LLOPIS; FERRANDO; PEÑA, 2003).

As correlações negativas observadas representam uma associação direta entre o aumento/diminuição da concentração de EROs (responsáveis pela oxidação de

proteínas e lipídios) com a concentração/atividade dos antioxidantes. Já as correlações positivas indicam associações indiretas, pois entre a ação dos antioxidantes e a ocorrência de danos oxidativos existem os processos de produção e neutralização das EROs. A ausência de correlação para alguns biomarcadores pode estar relacionada com a expressão, regulação e maturação das proteínas (MADEIRA et al., 2013). Além disso, podem ocorrer respostas pontuais em função da temperatura (15 °C ou 31 °C) e intensidade do estresse, não refletindo na resposta de outros biomarcadores.

6 CONCLUSÕES

No choque térmico de alta temperatura (31 °C), a concentração de EROs até 96 h de exposição foi controlada principalmente pela GSH e GPx, que desempenham um importante papel antioxidante no encéfalo de *A. lacustris*. A GPx mostrou-se sensível ao aumento de temperatura em 12 e 72 h, destacando-se como um importante biomarcador de choque térmico.

No choque térmico de baixa temperatura (15 °C), os resultados indicam que houve o controle da produção de EROs no encéfalo de *A. lacustris* em 2 h de exposição, com aumento na atividade da CAT. As enzimas da primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo mostraram-se importantes na prevenção de danos oxidativos.

Não foram detectados danos oxidativos (LPO e PCO) e diferenças na concentração de EROs nas temperaturas testadas de 15 °C e 31 °C. Desta forma, os dados obtidos mostram que o encéfalo de *A. lacustris* mobiliza eficientemente o sistema de defesa antioxidante para evitar danos macromoleculares, o que indica capacidade de aclimação nos períodos de exposição estudados.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-TAWWAB, Mohsen; WAFEEK, Mohammed. Fluctuations in water temperature affected waterborne cadmium toxicity: Hematology, anaerobic glucose pathway, and oxidative stress status of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, [S. l.], v. 477, p. 106–111, 2017. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.05.007.
- AEBI, Hugo. Catalase *in vitro*. In: **Oxygen Radicals in Biological Systems**. [s.l.] : Academic Press, 1984. v. 105p. 121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- AFIFI, Mohamed; SADDICK, Salina; ABU ZINADA, Osama A. Toxicity of silver nanoparticles on the brain of *Oreochromis niloticus* and *Tilapia zillii*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, [S. l.], v. 23, n. 6, p. 754–760, 2016. DOI: 10.1016/j.sjbs.2016.06.008.
- ALFONSO, Sébastien; GESTO, Manuel; SADOUL, Bastien. Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. **Journal of Fish Biology**, [S. l.], v. 98, n. 6, p. 1496–1508, 2021. DOI: 10.1111/jfb.14599.
- ALMEIDA, Joana R.; GRAVATO, Carlos; GUILHERMINO, Lúcia. Effects of Temperature in Juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) Biomarker Responses and Behaviour: Implications for Environmental Monitoring. **Estuaries and Coasts**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 45–55, 2015. DOI: 10.1007/s12237-014-9792-7.
- ALVES, Clayton Q.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P.; BAHIA, Marcus V.; AGUIAR, Rosane M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, [S. l.], v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010. DOI: 10.1590/S0100-40422010001000033.
- ASHLEY STEEL, E.; SOWDER, Colin; PETERSON, Erin E. Spatial and Temporal Variation of Water Temperature Regimes on the Snoqualmie River Network. **JAWRA Journal of the American Water Resources Association**, [S. l.], v. 52, n. 3, p. 769–787, 2016. DOI: 10.1111/1752-1688.12423.
- ATAMANALP, Muhammed; PARLAK, Veysel; ÖZGERİŞ, Fatma Betül; ÇILINGIR YELTEKIN, Aslı; UCAR, Arzu; KELEŞ, Mevlüt Sait; ALAK, Gonca. Treatment of oxidative stress, apoptosis, and DNA injury with N-acetylcysteine at simulative pesticide toxicity in fish. **Toxicology Mechanisms and Methods**, England, v. 31, n. 3, p. 224–234, 2021. DOI: 10.1080/15376516.2021.1871794.
- BAGNYUKOVA, T. V.; LUSHCHAK, O. V.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. **Journal of Thermal Biology**, [S. l.], v. 32, n. 4, p. 227–234, 2007. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2007.01.004.
- BALASCH, Joan Carles; TORT, Lluís. Netting the Stress Responses in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 10, n. 62, p. 1–12, 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00062.
- BARBIERI, Edison; FERRARINI, Alessandra Maria Tegen; REZENDE, Karina

Fernandes Oliveira; MARTINEZ, Diego Stéfani Teodoro; ALVES, Oswaldo Luiz. Effects of multiwalled carbon nanotubes and carbofuran on metabolism in *Astyanax ribeirae*, a native species. **Fish Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v. 45, n. 1, p. 417–426, 2019. DOI: 10.1007/s10695-018-0573-2.

BARTON, Bruce A. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, England, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002. DOI: 10.1093/icb/42.3.517.

BAUMGARTNER, Gilmar; PAVANELLI, Carla Simone; BAUMGARTNER, Dirceu; BIFI, Alessandro Gasparetto; DEBONA, Tiago; FRANA, Vitor André. **Peixes do baixo rio Iguçu**. [s.l.] : EDUEM, 2012. DOI: 10.7476/9788576285861.

BELIAEFF, Benoit; BURGEOT, Thierry. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 1316–1322, 2002. DOI: 10.1002/etc.5620210629.

BEVITÓRIO, Lorena Ziviani et al. Impacts of tailings of Fundão dam (Brazil) rupture on marine fish: Metals bioaccumulation and physiological responses. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 177, p. 1–15, 2022. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2022.113511.

BEYAN, Cigdem; BOOM, Bastian J.; LIEFHEBBER, Jolanda M. P.; SHAO, Kwang-Tsao; FISHER, Robert B. Natural swimming speed of *Dascyllus reticulatus* increases with water temperature. **ICES Journal of Marine Science**, [S. l.], v. 72, n. 8, p. 2506–2511, 2015. DOI: 10.1093/icesjms/fsv104.

BION, Ricardo. **ggadar: Create radar charts using ggplot2**. , 2022.

BIRNIE-GAUVIN, Kim; COSTANTINI, David; COOKE, Steven J.; WILLMORE, William G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 928–942, 2017. DOI: 10.1111/faf.12215.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. V; INZE, D. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 83–116, 1992. DOI: 10.1146/annurev.pp.43.060192.000503.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An Analysis of Transformations. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 211–243, 1964. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1964.tb00553.x.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

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**, [S. l.], v. 135, p. 257–264, 2015. DOI:

10.1016/j.chemosphere.2015.04.064.

BURGER, Rafael; CARVALHO, Fernando R.; ZANATA, Angela M. A new species of *Astyanax* Baird amp; Girard (Characiformes: Characidae) from western Chapada Diamantina, Bahia, Brazil. **Zootaxa**, [S. l.], v. 4604, n. 2, p. 369, 2019. DOI: 10.11646/zootaxa.4604.2.9.

CALIBRI. **CALculate IBR Interface**. 2022. Disponível em: <https://shiny.otelo.univ-lorraine.fr/calibri/R/>. Acesso em: 29 mar. 2022.

CAMARGO, Marília de Paiva; CASSEL, Mônica; OLIVEIRA DE JESUS, Lázaro Wender; NÓBREGA, Rafael Henrique; BORELLA, Maria Inês. Characterization of undifferentiated spermatogonia and the spermatogonial niche in the lambari fish *Astyanax altiparanae*. **Theriogenology**, [S. l.], v. 96, p. 97–102, 2017. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.03.027.

CAMPELO, Daniel Abreu Vasconcelos; SALARO, Ana Lúcia; LADEIRA, André Luis Fialho; MOURA, Lorena Batista De; FURUYA, Wilson Massamitu. Dietary lysine requirement of adult lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti and Britski, 2000). **Revista Brasileira de Zootecnia**, [S. l.], v. 47, p. 1–9, 2018. DOI: 10.1590/rbz4720160325.

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**, [S. l.], v. 101, p. 533–540, 2019. DOI: 10.1016/j.ecolind.2019.01.051.

CANTIN, A. M.; RICHTER, M. V. Cigarette Smoke-Induced Proteostasis Imbalance in Obstructive Lung Diseases. **Current Molecular Medicine**, Netherlands, v. 12, n. 7, p. 836–849, 2012. DOI: 10.2174/156652412801318746.

CARNEY ALMROTH, Bethanie; ASKER, Noomi; WASSMUR, Britt; ROSENGREN, Malin; JUTFELT, Fredrik; GRÄNS, Albin; SUNDELL, Kristina; AXELSSON, Michael; STURVE, Joachim. Warmer water temperature results in oxidative damage in an Antarctic fish, the bald notothen. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 468, p. 130–137, 2015. DOI: 10.1016/j.jembe.2015.02.018.

CASTRO, Jonathan Pena; HATTORI, Ricardo Shohei; YOSHINAGA, Túlio Teruo; SILVA, Duílio Mazzoni Zerbinato de Agrade; FORESTI, Fausto; SANTOS, Mateus Henrique; ALMEIDA, Mara Cristina; ARTONI, Roberto Ferreira. Differential Expression of *dmt1* in *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) Is Correlated with B Chromosome Occurrence. **Zebrafish**, United States, v. 16, n. 2, p. 182–188, 2019. DOI: 10.1089/zeb.2018.1650.

CHADWICK, Joseph G.; NISLOW, Keith H.; MCCORMICK, Stephen D. Thermal onset of cellular and endocrine stress responses correspond to ecological limits in brook trout, an iconic cold-water fish. **Conservation Physiology**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 1–12, 2015. DOI: 10.1093/conphys/cov017.

CHENG, Chang-Hong; GUO, Zhi-Xun; LUO, Sheng-Wei; WANG, An-Li. Effects of high

temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 150, p. 190–198, 2018. a. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.045.

CHENG, Chang-Hong; GUO, Zhi-Xun; YE, Chao-Xia; WANG, An-Li. Effect of dietary astaxanthin on the growth performance, non-specific immunity, and antioxidant capacity of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under high temperature stress. **Fish Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v. 44, n. 1, p. 209–218, 2018. b. DOI: 10.1007/s10695-017-0425-5.

CHUNG, Kyung S. Heat Resistance and Thermal Acclimation Rate in Tropical Tetra *Astyanax bimaculatus* of Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, [S. l.], v. 57, n. 4, p. 459–463, 2000. DOI: 10.1023/A:1007696027169.

CIARDIELLO, M. Antonietta; CAMARDELLA, Laura; DI PRISCO, Guido. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from the blood cells of two Antarctic teleosts: Correlation with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, [S. l.], v. 1250, n. 1, p. 76–82, 1995. DOI: 10.1016/0167-4838(95)00046-W.

CIFTCI, Mehmet; TURKOGLU, Vedat; COBAN, T. Abdulkadir. Effects of some drugs on hepatic glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in Lake Van Fish (*Chalcalburnus Tarischi* Pallas, 1811). **Journal of Hazardous Materials**, [S. l.], v. 143, n. 1–2, p. 415–418, 2007. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2006.09.053.

CROUCH, Rosalie K.; GANDY, Samuel E.; KIMSEY, Gary; GALBRAITH, Richard A.; GALBRAITH, Gillian M. P.; BUSE, Maria G. The Inhibition of Islet Superoxide Dismutase by Diabetogenic Drugs. **Diabetes**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 235–241, 1981. DOI: 10.2337/diab.30.3.235.

CUI, Yanting; HOU, Zhumei; REN, Yichao; MEN, Xianhui; ZHENG, Bo; LIU, Peng; XIA, Bin. Effects of aerial exposure on oxidative stress, antioxidant and non-specific immune responses of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* under low temperature. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 101, p. 58–65, 2020. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.03.050.

DA SILVA, Marcos Aurélio; PERAZZO, Giselle Xavier; KAVALCO, Karine Frehner; PASA, Rubens. Shape diversity of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard, 1854 (Teleostei, Characidae) in adjacent basins. **Biologia**, [S. l.], v. 76, n. 1, p. 213–221, 2021. DOI: 10.2478/s11756-020-00544-5.

DEVIN, S.; BURGEOT, T.; GIAMBÉRINI, L.; MINGUEZ, L.; PAIN-DEVIN, S. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 2448–2454, 2014. DOI: 10.1007/s11356-013-2169-9.

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

DRIVER, Amy S.; KODAVANTI, Prasada Rao S.; MUNDY, William R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicology and Teratology**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 175–181, 2000. DOI: 10.1016/S0892-0362(99)00069-0.

DUTRA, F. M.; MACHADO, W. J.; CAETANO, M. S.; GOBBO, D. A. Avaliação Sensorial do Processamento em Conserva, Utilizando as Espécies: Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Lambari (*Astianax spp*) e Pacú (*Piaractus mesopotamicus*). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 239–244, 2012. DOI: 10.15871/1517-8595/rbpa.v14n3p239-244.

ESPINOSA-DIEZ, Cristina; MIGUEL, Verónica; MENNERICH, Daniela; KIETZMANN, Thomas; SÁNCHEZ-PÉREZ, Patricia; CADENAS, Susana; LAMAS, Santiago. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biology**, [S. l.], v. 6, p. 183–197, 2015. DOI: 10.1016/j.redox.2015.07.008.

EZEOYILI, Ifeanyi Christian; MGBENKA, Bernard O.; ATAMA, Chinedu Ifeanyi; NGWU, Godwin I.; MADU, Josephine Chinenye; NWANI, Christopher Didigwu. Changes in Brain Acetylcholinesterase and Oxidative Stress Biomarkers in African Catfish Exposed to Carbendazim. **Journal of Aquatic Animal Health**, United States, v. 31, n. 4, p. 371–379, 2019. DOI: 10.1002/aah.10089.

FADHLAOU, Mariem; COUTURE, Patrice. Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 180, p. 45–55, 2016. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.09.005.

FORGATI, Mariana; KANDALSKI, Priscila Krebsbach; HERRERIAS, Tatiana; ZALESKI, Tania; MACHADO, Cintia; SOUZA, Maria Rosa Dmengeon Pedreiro; DONATTI, Lucélia. Effects of heat stress on the renal and branchial carbohydrate metabolism and antioxidant system of Antarctic fish. **Journal of Comparative Physiology B**, Germany, v. 187, n. 8, p. 1137–1154, 2017. DOI: 10.1007/s00360-017-1088-3.

FROESE, R.; PAULY, D. **FishBase**. 2022. Disponível em: www.fishbase.org.

FU, Kang-Kang; FU, Cheng; QIN, Ying-Lian; BAI, Yang; FU, Shi-Jian. The thermal acclimation rate varied among physiological functions and temperature regimes in a common cyprinid fish. **Aquaculture**, [S. l.], v. 495, n. 4, p. 393–401, 2018. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2018.06.015.

GARAI-IBABE, Gaizka; SAA, Laura; PAVLOV, Valeri. Enzymatic Product-Mediated Stabilization of CdS Quantum Dots Produced In Situ: Application for Detection of Reduced Glutathione, NADPH, and Glutathione Reductase Activity. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 85, n. 11, p. 5542–5546, 2013. DOI: 10.1021/ac4007705.

GARCIA, Luciano de O.; OKAMOTO, Marcelo Hideo; RIFFEL, Ana Paula Konzen; SACCOL, Etiane M.; PAVANATO, Maria Amália; SAMPAIO, Luís André N. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat

shocks. **Neotropical Ichthyology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 607–612, 2015. DOI: 10.1590/1982-0224-20140148.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto Rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia**, [S. l.], v. 13, p. 65–88, 2000.

GAVAZZONI, Mariane; PAIZ, Leonardo M.; OLIVEIRA, Carlos A. M.; PAVANELLI, Carla S.; GRAÇA, Weferson J.; MARGARIDO, Vladimir P. Morphologically Cryptic Species of the *Astyanax bimaculatus* “Caudal Peduncle Spot” Subgroup Diagnosed Through Cytogenetic Characters. **Zebrafish**, United States, v. 15, n. 4, p. 382–388, 2018. DOI: 10.1089/zeb.2018.1574.

GNOCCHI, Karla Giavarini; BOLDRINI-FRANÇA, Johara; GOMES, Levy Carvalho; CHIPPARI-GOMES, Adriana Regina. De novo assembly and annotation of the transcriptome of *Astyanax lacustris* liver unveil candidate genes to monitor response to environmental stress. **Marine Genomics**, [S. l.], v. 54, p. 1–4, 2020. DOI: 10.1016/j.margen.2020.100784.

GOBI, Narayanan; VASEEHARAN, Baskaralingam; REKHA, Ravichandran; VIJAYAKUMAR, Sekar; FAGGIO, Caterina. Bioaccumulation, cytotoxicity and oxidative stress of the acute exposure selenium in *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 162, p. 147–159, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.070.

GONÇALVES, Ligia Uribe; PARISI, Giuliana; BONELLI, Antonio; SUSSEL, Fábio Rosa; VIEGAS, Elisabete Maria Macedo. The fatty acid compositions of total, neutral and polar lipids in wild and farmed lambari (*Astyanax altiparanae*) (Garutti & Britski, 2000) broodstock. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 195–203, 2014. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03215.x.

GRASSET, Julie; OLLIVIER, Élodie; BOUGAS, Bérénice; YANNIC, Glenn; CAMPBELL, Peter G. C.; BERNATCHEZ, Louis; COUTURE, Patrice. Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 177, p. 324–332, 2016. DOI: 10.1016/j.aquatox.2016.06.008.

GUILLEN, Angela Carolina; BORGES, Marcelo Eduardo; HERRERIAS, Tatiana; KANDALSKI, Priscila Krebsbach; DE ARRUDA MARINS, Elen; VIANA, Douglas; DE SOUZA, Maria Rosa Dmengeon Pedreiro; OLIVEIRA DO CARMO DALOSKI, Letícia; DONATTI, Lucélia. Effect of gradual temperature increase on the carbohydrate energy metabolism responses of the Antarctic fish *Notothernia rossii*. **Marine Environmental Research**, [S. l.], v. 150, p. 1–16, 2019. DOI: 10.1016/j.marenvres.2019.104779.

GÜLLER, Uğur; ÖNALAN, Şükrü; ARABACI, Muhammed; KARATAŞ, Boran; YAŞAR, Muhterem; KÜFREVIÖĞLU, Ömer İrfan. Effects of different LED light spectra on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): *in vivo* evaluation of the antioxidant status. **Fish Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 46, n. 6, p. 2169–2180, 2020. DOI: 10.1007/s10695-020-00865-x.

HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O.; VAN DIJK, P. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? **Journal of Comparative Physiology B**, Germany, v. 174, n. 2, p. 149–156, 2004. DOI: 10.1007/s00360-003-0399-8.

HAYASHI, Leila; SANTOS, Alex A.; FARIA, Gabriel S. M.; NUNES, Beatriz G.; SOUZA, Marina S.; FONSECA, Alessandra L. D.; BARRETO, Pedro L. M.; OLIVEIRA, Eurico C.; BOUZON, Zenilda L. *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Areschougiales) cultivated in subtropical waters in Southern Brazil. **Journal of Applied Phycology**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 337–343, 2011. DOI: 10.1007/s10811-010-9543-5.

HENNEMANN, Mariana Coutinho; PETRUCIO, Mauricio Mello. Spatial and temporal dynamic of trophic relevant parameters in a subtropical coastal lagoon in Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, [S. l.], v. 181, n. 1–4, p. 347–361, 2011. DOI: 10.1007/s10661-010-1833-5.

HIGUCHI, Masashi. Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress. In: WATSON, Ronald Ross; PREEDY, Victor R.; ZIBADI, Sherma B. T. Wheat and Rice in Disease Prevention and Health (org.). **Wheat and Rice in Disease Prevention and Health**. San Diego: Elsevier, 2014. p. 181–199. DOI: 10.1016/B978-0-12-401716-0.00015-5.

HOSEINIFAR, Seyed Hossein; YOUSEFI, Samira; VAN DOAN, Hien; ASHOURI, Ghasem; GIOACCHINI, Giorgia; MARADONNA, Francesca; CARNEVALI, Oliana. Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Fish: The Implications of Probiotic, Prebiotic, and Synbiotics. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, [S. l.], v. 29, n. 2, p. 198–217, 2021. DOI: 10.1080/23308249.2020.1795616.

HUBER, Paula C.; ALMEIDA, Wanda P.; FÁTIMA, Ângelo De. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000500046.

IBGE. **Bases cartográficas contínuas**. 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/downloads-geociencias.html>.

ISLAM, Md Jakiul; KUNZMANN, Andreas; BÖGNER, Mirko; MEYER, Achim; THIELE, Rajko; JAMES SLATER, Matthew. Metabolic and molecular stress responses of European seabass, *Dicentrarchus labrax* at low and high temperature extremes. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 112, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1016/j.ecolind.2020.106118.

ISLAM, Md Jakiul; KUNZMANN, Andreas; SLATER, Matthew James. Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S. l.], p. 1–53, 2021. DOI: 10.1111/jwas.12853.

IWAMA, George K.; AFONSO, Luis O. B.; TODGHAM, Anne; ACKERMAN, Paige; NAKANO, Kazumi. Are hsp90 suitable for indicating stressed states in fish? **Journal of**

Experimental Biology, England, v. 207, n. 1, p. 15–19, 2004. DOI: 10.1242/jeb.00707.

JIANG, Zhen-Yue; WOOLLARD, Alison C. S.; WOLFF, Simon P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, [S. l.], v. 26, n. 10, p. 853–856, 1991. DOI: 10.1007/BF02536169.

JOËLS, Marian; BARAM, Tallie Z. The neuro-symphony of stress. **Nature Reviews Neuroscience**, [S. l.], v. 10, n. 6, p. 459–466, 2009. DOI: 10.1038/nrn2632.

JOY, Susan; ALIKUNJU, Aneesa Painadath; JOSE, Jisha; SUDHA, Hari Sankar Haridasanpillai; PARAMBATH, Prabhakaran Meethal; PUTHIYEDATHU, Sajeewan Thavarool; PHILIP, Babu. Oxidative stress and antioxidant defense responses of *Etroplus suratensis* to acute temperature fluctuations. **Journal of Thermal Biology**, [S. l.], v. 70, p. 20–26, 2017. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2017.10.010.

KANDALSKI, Priscila Krebsbach et al. Effects of short-term thermal stress on the plasma biochemical profiles of two Antarctic nototheniid species. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, [S. l.], v. 28, p. 925–940, 2018. DOI: 10.1007/s11160-018-9535-0.

KASSAMBARA, Alboukadel; MUNDT, Fabian. **factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses**. , 2020. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=factoextra>.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 251, n. 20, p. 6183–6188, 1976. DOI: 10.1016/S0021-9258(20)81842-0.

KIM, Yoosun Jamie; CRIBBIE, Robert A. ANOVA and the variance homogeneity assumption: Exploring a better gatekeeper. **British Journal of Mathematical and Statistical Psychology**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1111/bmsp.12103.

KLEIN, Roberta Daniele; BORGES, Vinicius Dias; ROSA, Carlos Eduardo; COLARES, Elton Pinto; ROBALDO, Ricardo Berteaux; MARTINEZ, Pablo Elias; BIANCHINI, Adalto. Effects of increasing temperature on antioxidant defense system and oxidative stress parameters in the Antarctic fish *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Journal of Thermal Biology**, [S. l.], v. 68, p. 110–118, 2017. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2017.02.016.

KOAKOSKI, Gessi; OLIVEIRA, Thiago Acosta; DA ROSA, João Gabriel Santos; FAGUNDES, Michele; KREUTZ, Luiz Carlos; BARCELLOS, Leonardo José Gil. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of different ages. **Physiology & Behavior**, [S. l.], v. 106, n. 2, p. 129–132, 2012. DOI: 10.1016/j.physbeh.2012.01.013.

KUMAR, Neeraj; AMBASANKAR, Kondusamy; KRISHNANI, Kishore Kumar; GUPTA, Sanjay Kumar; MINHAS, Paramjit Singh. Dietary pyridoxine promotes growth and cellular metabolic plasticity of *Chanos chanos* fingerlings exposed to endosulfan

induced stress. **Aquaculture Research**, [S. l.], v. 48, n. 5, p. 1–14, 2016. DOI: 10.1111/are.13042.

LÊ, Sébastien; JOSSE, Julie; HUSSON, François. FactoMineR: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 1–18, 2008. DOI: 10.18637/jss.v025.i01.

LEITE, Erica Ferreira; GODOI, Divina Sueide De; JACYNTHO, Luiz Antonio; MACENO, Jhonathan Ferreira Santos; DUARTE, Cristiane Regina do Amaral. Feeding habits and reproductive biology of *Astyanax abramis*. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 2582–2597, 2021. DOI: 10.34117/bjdv7n1-176.

LENTH, Russell V. **emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means**. , 2022. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=emmeans>.

LERMEN, Carine Luísa; LAPPE, Rosiele; CRESTANI, Márcia; VIEIRA, Vânia Pimentel; GIODA, Carolina Rosa; SCHETINGER, Maria Rosa Chitolina; BALDISSEROTTO, Bernardo; MORAES, Gilberto; MORSCH, Vera Maria. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, [S. l.], v. 239, n. 1–4, p. 497–507, 2004. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2004.06.021.

LEVINE, Rodney L.; WILLIAMS, Joy A.; STADTMAN, Earl P.; SHACTER, Emily. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *In: Oxygen Radicals in Biological Systems Part C*. [s.l.] : Academic Press, 1994. v. 233p. 346–357. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33040-9.

LIRA, Lieschen Valeria Guerra; KURADOMI, Rafael Yutaka; GONÇALVES DE SOUZA, Thiago; HAINFELLNER, Patrick; BATLOUNI, Sergio Ricardo. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim do Instituto de Pesca**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 438–455, 2018. DOI: 10.20950/1678-2305.2018.44.4.207.

LIU, Fei; QU, Yun-Kun; WANG, Ai-Ming; YU, Ye-Bing; YANG, Wen-Ping; LV, Fu; NIE, Qing. Effects of carotenoids on the growth performance, biochemical parameters, immune responses and disease resistance of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) under high-temperature stress. **Aquaculture**, [S. l.], v. 503, p. 293–303, 2019. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.01.008.

LOGAN, Cheryl A.; BUCKLEY, Bradley A. Transcriptomic responses to environmental temperature in eurythermal and stenothermal fishes. **Journal of Experimental Biology**, England, v. 218, n. 12, p. 1915–1924, 2015. DOI: 10.1242/jeb.114397.

LOPES, Taise M.; GRANZOTTI, Rafaela V; OLIVEIRA, Anielly G.; BAUMGARTNER, Matheus T.; FIGUEIREDO, Bruno R. S.; GOMES, Luiz C. Phylogenetically and morphologically close ambush piscivores can elicit different antipredatory responses in characid prey. **Environmental Biology of Fishes**, [S. l.], v. 104, n. 10, p. 1279–1292, 2021. DOI: 10.1007/s10641-021-01154-z.

LUCENA, CARLOS ALBERTO S. DE; SOARES, HELENA GOUVEA. Review of

species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainag. **Zootaxa**, [S. l.], v. 4072, n. 1, p. 101–125, 2016. DOI: 10.11646/zootaxa.4072.1.5.

LUO, Sheng-Wei; CAI, Luo; LIU, Yuan; WANG, Wei-Na. Functional analysis of a dietary recombinant Fatty acid binding protein 10 (FABP10) on the *Epinephelus coioides* in response to acute low temperature challenge. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 36, n. 2, p. 475–484, 2014. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.12.028.

LUSHCHAK, Oleh V.; KUBRAK, Olha I.; TOROUS, Ihor M.; NAZARCHUK, Tetyana Yu.; STOREY, Kenneth B.; LUSHCHAK, Volodymyr I. Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain. **Chemosphere**, [S. l.], v. 75, n. 1, p. 56–62, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.11.052.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006.

LUSHCHAK, Volodymyr I. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. **Fish Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v. 42, n. 2, p. 711–747, 2016. DOI: 10.1007/s10695-015-0171-5.

LUSHCHAK, Volodymyr I.; BAGNYUKOVA, Tetyana V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S. l.], v. 143, n. 1, p. 30–35, 2006. DOI: 10.1016/j.cbpc.2005.11.017.

LUSHCHAK, Volodymyr I.; BAGNYUKOVA, Tetyana V.; LUSHCHAK, Oleh V.; STOREY, Janet M.; STOREY, Kenneth B. Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 1319–1330, 2005. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.01.006.

MACHADO, Cintia; ZALESKI, Tania; RODRIGUES, Edson; CARVALHO, Cleoni dos Santos; CADENA, Silvia Maria Suter Correia; GOZZI, Gustavo Jabor; KREBSBACH, Priscila; RIOS, Flávia Sant’Anna; DONATTI, Lucélia. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 172–173, p. 21–28, 2014. DOI: 10.1016/j.cbpb.2014.02.003.

MADEIRA, Carolina; MADEIRA, Diana; DINIZ, Mário S.; CABRAL, Henrique N.; VINAGRE, Catarina. Thermal acclimation in clownfish: An integrated biomarker response and multi-tissue experimental approach. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 71, p. 280–292, 2016. DOI: 10.1016/j.ecolind.2016.07.009.

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 Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [S. l.],

v. 166, n. 2, p. 237–243, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008.

MADEIRA, Diana; VINAGRE, Catarina; DINIZ, Mário S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 63, p. 324–331, 2016. DOI: 10.1016/j.ecolind.2015.12.008.

MASSARSKY, Andrey; KOZAL, Jordan S.; DI GIULIO, Richard T. Glutathione and zebrafish: Old assays to address a current issue. **Chemosphere**, [S. l.], v. 168, p. 707–715, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.11.004.

MATVIISHYN, Tetiana M.; KUBRAK, Olga I.; HUSAK, Viktor V; STOREY, Kenneth B.; LUSHCHAK, Volodymyr I. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Mild in brain and moderate in liver and kidney. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 861–869, 2014. DOI: 10.1016/j.etap.2014.02.007.

MCTIC. 2017. Disponível em: https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/Resolucao_CONCEA_n_34_de_27072017.html.

MODESTO, Kathya A.; MARTINEZ, Cláudia B. R. Roundup® causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, [S. l.], v. 78, n. 3, p. 294–299, 2010. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.047.

MURPHY, Michael P. et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and *in vivo*. **Nature Metabolism**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. 651–662, 2022. DOI: 10.1038/s42255-022-00591-z.

MUTHAPPA, N. A.; GUPTA, Subodh; YENGGOKPAM, Sona; DEBNATH, Dipesh; KUMAR, Neeraj; PAL, Asim Kumar; JADHAO, Sanjay B. Lipotropes promote immunobiochemical plasticity and protect fish against low-dose pesticide-induced oxidative stress. **Cell Stress and Chaperones**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 61–81, 2014. DOI: 10.1007/s12192-013-0434-y.

NAVARRO, Fernanda Keley Silva Pereira; NAVARRO, Rodrigo Diana; MURGAS, Luis David Solis; FELIZARDO, Viviane de Oliveira. Effect of photoperiod stress assessment and locomotor activity of female lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Ciência e Agrotecnologia**, [S. l.], v. 38, n. 2, p. 173–180, 2014. DOI: 10.1590/S1413-70542014000200008.

NELSON, David L.; COX, Michael M.; LEHNINGER, Albert L.; TERMIGNONI, Carlos. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l.] : Artmed, 2014.

PAITAL, Biswaranjan; NITYAN, Gagan Bihari; A CHAINY. Redox metabolism in fishes under thermal stress warrants more attention. **Journal of Fisheries Sciences**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 22–26, 2016.

PANASE, Paiboon; SAENPHET, Supap; SAENPHET, Kanokporn. Biochemical and

physiological responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Lin subjected to cold shock of water temperature. **Aquaculture Reports**, [S. l.], v. 11, p. 17–23, 2018. DOI: 10.1016/j.aqrep.2018.05.005.

PEÑA-LLOPIS, Samuel; FERRANDO, M. Dolore.; PEÑA, Juan B. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 65, n. 4, p. 337–360, 2003. DOI: 10.1016/S0166-445X(03)00148-6.

PEREIRA-DA-SILVA, Elyara Maria; OLIVEIRA, Ricardo Henrique Franco. 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**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 557–568, 2017. DOI: 10.20950/1678-2305.2017v43n4p557.

PERUSSOLO, Maiara C. et al. Integrated biomarker response index to assess toxic effects of environmentally relevant concentrations of paracetamol in a neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 182, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.109438.

PETITJEAN, Quentin; JEAN, Séverine; GANDAR, Allison; CÔTE, Jessica; LAFFAILLE, Pascal; JACQUIN, Lisa. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 684, p. 371–380, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.357.

PHROMPANYA, Phomphan; PANASE, Paiboon; SAENPHET, Supap; SAENPHET, Kanokporn. Histopathology and oxidative stress responses of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to temperature shocks. **Fisheries Science**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 491–502, 2021. DOI: 10.1007/s12562-021-01511-y.

PINHEIRO, João Paulo Silva; ASSIS, Cecília Bertacini De; MUÑOZ-PEÑUELA, Marcela; BARBOSA JÚNIOR, Fernando; CORREIA, Tiago Gabriel; MOREIRA, Renata Guimarães. Water temperature and acid pH influence the cytotoxic and genotoxic effects of aluminum in the freshwater teleost *Astyanax altiparanae* (Teleostei: Characidae). **Chemosphere**, [S. l.], v. 220, p. 266–274, 2019. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.143.

PÖRTNER, Hans O.; FARRELL, Anthony P. Physiology and Climate Change. **Science**, [S. l.], v. 322, n. 5902, p. 690–692, 2008. DOI: 10.1126/science.1163156.

PRZEPIURA, Thaylise de Cassia Santos; HERRERIAS, Tatiana; KANDALSKI, Priscila Krebsbach; ZALESKI, Tania; MACHADO, Cintia; FORGATI, Mariana; SOUZA, Maria Rosa Dmengeon Pedreiro De; DONATTI, Lucélia. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress. **Brain Research**, [S. l.], v. 1708, p. 126–137, 2019. DOI: 10.1016/j.brainres.2018.12.004.

QGIS, Equipe de Desenvolvimento. **Sistema de Informação Geográfica QGIS**. Associação QGIS, , 2022. Disponível em: <https://www.qgis.org>.

QI, Zeng-Hua; LIU, Yu-Feng; LUO, Sheng-Wei; CHEN, Chu-Xian; LIU, Yuan; WANG, Wei-Na. Molecular cloning, characterization and expression analysis of tumor

suppressor protein p53 from orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* in response to temperature stress. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 35, n. 5, p. 1466–1476, 2013. DOI: 10.1016/j.fsi.2013.08.011.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. ViennaR Foundation for Statistical Computing, , 2022. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

RAMSDORF, Wanessa. **Utilização de duas espécies de *Astyanax* (*Astyanax sp B* e *A. Altiparanae*) como bioindicadores de região contaminada por agrotóxico (Fazenda Canguiri - UFPR) I**. 2007. Universidade Federal do Paraná, [S. l.], 2007.

REBOUÇAS, P. M.; LIMA, L. R.; DIAS, Í. F.; BARBOSA FILHO, J. A. D. Influência da oscilação térmica na água da piscicultura. **Journal of Animal Behaviour and Biometeorology**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 35–42, 2014. DOI: 10.14269/2318-1265.v02n02a01.

RESENDE, Anna Carolina; MAURO CARNEIRO PEREIRA, Diego; CRISTINA SCHLEGER, Ieda; DMENGEON PEDREIRO DE SOUZA, Maria Rosa; ALVEZ NEUNDORF, Ananda Karla; ROMÃO, Silvia; HERRERIAS, Tatiana; DONATTI, Lucélia. Effects of heat shock on energy metabolism and antioxidant defence in a tropical fish species *Psalidodon bifasciatus*. **Journal of Fish Biology**, [S. l.], v. 100, n. 5, p. 1245–1263, 2022. DOI: 10.1111/jfb.15036.

RIDDLE, Misty R.; BOESMANS, Werend; CABALLERO, Olivya; KAZWINY, Youcef; TABIN, Clifford J. Morphogenesis and motility of the *Astyanax mexicanus* gastrointestinal tract. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 441, n. 2, p. 285–296, 2018. DOI: 10.1016/j.ydbio.2018.06.004.

ROBINSON, Esme. **Antarctic Fish: Thermal Specialists or Adaptable Generalists?** 2008. University of Canterbury, [S. l.], 2008.

RODNICK, Kenneth J.; PLANAS, Josep V. The Stress and Stress Mitigation Effects of Exercise: Cardiovascular, Metabolic, and Skeletal Muscle Adjustments. In: SCHRECK, Carl B.; TORT, Lluís; FARRELL, Anthony P.; BRAUNER, Colin J. B. T. Fish Physiology (org.). **Biology of Stress in Fish**. [s.l.] : Academic Press, 2016. v. 35p. 251–294. DOI: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00007-2.

ROSSI, Andrea; BACCHETTA, Carla; CAZENAVE, Jimena. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 79, p. 361–370, 2017. DOI: 10.1016/j.ecolind.2017.04.042.

SALARO, Ana Lúcia; CAMPELO, Daniel Abreu Vasconcelos; TAVARES, Mateus Moraes; BRAGA, Luiz Gustavo Tavares; PONTES, Marcelo Duarte; ZUANON, Jener Alexandre Sampaio. Transport of *Astyanax altiparanae* Garutti and Britski, 2000 in saline water. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 137–142, 2015. DOI: 10.4025/actascibiols.v37i2.26884.

SALWAY, J. G. **Metabolism at a glance**. Fourth ed. Chichester, West Sussex ;

Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Inc, 2017.

SATO, Yoshimi; SAMPAIO, Edson V.; FENERICH-VERANI, Nelsy; VERANI, José R. Biologia reprodutiva e reprodução induzida de duas espécies de Characidae (Osteichthyes, Characiformes) da bacia do São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 267–273, 2006. DOI: 10.1590/S0101-81752006000100021.

SATTIN, G.; BAKIU, Rigers; TOLOMEO, Anna Maria; CARRARO, Andrea; COPPOLA, D.; FERRO, Diana; PATARNELLO, Tomaso; SANTOVITO, Gianfranco. Characterization and expression of a new cytoplasmic glutathione peroxidase 1 gene in the Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Hydrobiologia**, [S. l.], v. 761, n. 1, p. 363–372, 2015. DOI: 10.1007/s10750-015-2488-6.

SCHLEGER, Ieda Cristina et al. Cold and warm waters: energy metabolism and antioxidant defenses of the freshwater fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) under thermal stress. **Journal of Comparative Physiology B**, [S. l.], v. 192, n. 1, p. 77–94, 2022. DOI: 10.1007/s00360-021-01409-2.

SCHRECK, Carl B.; TORT, Lluís. The Concept of Stress in Fish. In: SCHRECK, Carl B.; TORT, Lluís; FARRELL, Anthony P.; BRAUNER, Colin J. B. T. Fish Physiology (org.). **Biology of Stress in Fish**. [s.l.] : Academic Press, 2016. v. 35p. 1–34. DOI: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1.

SEDLAK, Jozef; LINDSAY, Raymond H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 25, p. 192–205, 1968. DOI: 10.1016/0003-2697(68)90092-4.

SERVILI, Arianna; CANARIO, Adelino V. M.; MOUCHEL, Olivier; MUÑOZ-CUETO, José Antonio. Climate change impacts on fish reproduction are mediated at multiple levels of the brain-pituitary-gonad axis. **General and Comparative Endocrinology**, [S. l.], v. 291, p. 1–15, 2020. DOI: 10.1016/j.ygcen.2020.113439.

SIES, Helmut; KOCH, Osvaldo R.; MARTINO, Elba; BOVERIS, Alberto. Increased biliary glutathione disulfide release in chronically ethanol-treated rats. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 103, n. 2, p. 287–290, 1979. DOI: 10.1016/0014-5793(79)81346-0.

SILVA, Rodrigo Marques Da; GOULART, Carolina Tonini; GUIDO, Laura de Azevedo. Evolução histórica do conceito de estresse. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 148–156, 2018.

SIQUEIRA-SILVA, Diógenes H.; BERTOLINI, Rafaela M.; LEVY-PEREIRA, Nycolas; NASCIMENTO, Nivaldo F.; SENHORINI, José A.; PIVA, Lucas Henrique; FERRAZ, José Bento S.; YASUI, George S. Factors affecting secondary sex characteristics in the yellowtail tetra, *Astyanax altiparanae*. **Fish Physiology and Biochemistry**, Netherlands, v. 47, n. 3, p. 737–746, 2021. DOI: 10.1007/s10695-020-00832-6.

SOENGAS, José L.; ALDEGUNDE, Manuel. Energy metabolism of fish brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 131, n. 3, p. 271–296, 2002. DOI: 10.1016/S1096-4959(02)00022-

2.

SOPINKA, Natalie M.; DONALDSON, Michael R.; O'CONNOR, Constance M.; SUSKI, Cory D.; COOKE, Steven J. Stress Indicators in Fish. *In*: SCHRECK, Carl B.; TORT, Lluís; FARRELL, Anthony P.; BRAUNER, Colin J. B. T. Fish Physiology (org.). **Biology of Stress in Fish**. [s.l.] : Academic Press, 2016. v. 35p. 405–462. DOI: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4.

SOUZA, Maria Rosa Dmengenon Pedreiro De et al. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, [S. l.], v. 146, p. 43–55, 2018. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.11.010.

SUN, Jun-long; ZHAO, Liu-lan; CUI, Can; DU, Zong-jun; HE, Zhi; WANG, Yan; LI, Xue-wei; YANG, Song. Influence of long-term temperature stress on respiration frequency, Na⁺/K⁺-ATPase activity, and lipid metabolism in common carp (*Cyprinus carpio*). **Journal of Thermal Biology**, [S. l.], v. 83, p. 165–171, 2019. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2019.05.009.

TANIWAKI, Ricardo Hideo; BORGHI, Tatiana Cintra; MAGRIN, Albano Geraldo Emílio; CALIJURI, Maria do Carmo; BOTTINO, Flávia; MOSCHINI-CARLOS, Viviane. Structure and dynamics of the community of periphytic algae in a subtropical reservoir (state of São Paulo, Brazil). **Acta Botanica Brasilica**, [S. l.], v. 27, n. 3, p. 551–559, 2013. DOI: 10.1590/S0102-33062013000300013.

TOPAL, Ahmet; ÖZDEMİR, Selçuk; ARSLAN, Harun; ÇOMAKLI, Selim. How does elevated water temperature affect fish brain? (A neurophysiological and experimental study: Assessment of brain derived neurotrophic factor, cFOS, apoptotic genes, heat shock genes, ER-stress genes and oxidative stress genes). **Fish & Shellfish Immunology**, [S. l.], v. 115, p. 198–204, 2021. DOI: 10.1016/j.fsi.2021.05.002.

TOWNSEND, Danyelle M.; TEW, Kenneth D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, [S. l.], v. 22, n. 47, p. 7369–7375, 2003. DOI: 10.1038/sj.onc.1206940.

TSENG, Yung-Che; CHEN, Ruo-Dong; LUCASSEN, Magnus; SCHMIDT, Maike M.; DRINGEN, Ralf; ABELE, Doris; HWANG, Pung-Pung. Exploring Uncoupling Proteins and Antioxidant Mechanisms under Acute Cold Exposure in Brains of Fish. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 1–15, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0018180.

URBINATI, Elisabeth Criscuolo; ZANUZZO, Fábio Sabbadin; BILLER, Jaqueline Dalbello. Stress and immune system in fish. *In*: BALDISSEROTTO, Bernardo; URBINATI, Elisabeth Criscuolo; CYRINO, J. E. P. B. T. Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish (org.). **Biology and Physiology of Freshwater Neotropical Fish**. [s.l.] : Elsevier, 2020. p. 93–114. DOI: 10.1016/B978-0-12-815872-2.00005-1.

VALLADÃO, Gustavo Moraes Ramos; GALLANI, Sílvia Umeda; PILARSKI, Fabiana. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 351–369, 2018. DOI: 10.1111/raq.12164.

VAN DER POL, Atze; VAN GILST, Wiek H.; VOORS, Adriaan A.; VAN DER MEER, Peter. Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. **European Journal of Heart Failure**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 425–435, 2019. DOI: 10.1002/ejhf.1320.

VENABLES, W. N.; RIPLEY, B. D. **Modern Applied Statistics with S**. Fourth ed. New York: Springer, 2002. Disponível em: <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.

VERA, L. M.; MIGAUD, H. Hydrogen peroxide treatment in Atlantic salmon induces stress and detoxification response in a daily manner. **Chronobiology International**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 530–542, 2016. DOI: 10.3109/07420528.2015.1131164.

VIEIRA, Vanessa A. R. O.; CORREIA, Tiago G.; MOREIRA, Renata G. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S. l.], v. 157, n. 1, p. 1–8, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpc.2012.08.003.

VINAGRE, Catarina; MADEIRA, Diana; MENDONÇA, Vanessa; DIAS, Marta; ROMA, Joana; DINIZ, Mário 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**, [S. l.], v. 97, p. 10–14, 2014. DOI: 10.1016/j.marenvres.2014.01.007.

VINAGRE, Catarina; MADEIRA, Diana; NARCISO, Luís; CABRAL, Henrique N.; DINIZ, Mário. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 23, p. 274–279, 2012. DOI: 10.1016/j.ecolind.2012.04.009.

WEN, Bin; JIN, Shi-Rong; CHEN, Zai-Zhong; GAO, Jian-Zhong; WANG, Lei; LIU, Ying; LIU, Han-Peng. Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. **Aquaculture**, [S. l.], v. 481, p. 169–176, 2017. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2017.09.002.

WENDEL, Albrecht. Glutathione peroxidase. In: **Detoxication and Drug Metabolism: Conjugation and Related Systems**. [s.l.] : Academic Press, 1981. v. 77p. 325–333. DOI: 10.1016/S0076-6879(81)77046-0.

WHITNEY, James E.; AL-CHOKHACHY, Robert; BUNNELL, David B.; CALDWELL, Colleen A.; COOKE, Steven J.; ELIASON, Erika J.; ROGERS, Mark; LYNCH, Abigail J.; PAUKERT, Craig P. Physiological Basis of Climate Change Impacts on North American Inland Fishes. **Fisheries**, [S. l.], v. 41, n. 7, p. 332–345, 2016. DOI: 10.1080/03632415.2016.1186656.

WICKHAM, Hadley. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. [s.l.] : Springer-Verlag New York, 2016. Disponível em: <https://ggplot2.tidyverse.org>.

WOO, Soo Ji; CHUNG, Joon Ki. Effects of trichlorfon on oxidative stress, neurotoxicity, and cortisol levels in common carp, *Cyprinus carpio* L., at different temperatures. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**,

[S. I.], v. 229, p. 1–9, 2020. DOI: 10.1016/j.cbpc.2019.108698.

YANG, Shuangshuang et al. Metabolic responses in *Scophthalmus maximus* kidney subjected to thermal stress. **Fish & Shellfish Immunology**, [S. I.], v. 103, p. 37–46, 2020. DOI: 10.1016/j.fsi.2020.04.003.

ZAIKOV, Gennady E.; OPALKO, Anatoly I. **Antioxidants in Systems of Varying Complexity**. Includes bibliographical references and index.: Apple Academic Press, 2019. DOI: 10.1201/9780429325168.

ZANATA, Angela Maria; BURGER, Rafael; VITA, George; CAMELIER, Priscila. A new species of *Astyanax* (Characiformes: Characidae) from the rio de Contas basin, Bahia, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, [S. I.], v. 17, n. 3, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1590/1982-0224-20190061.

ZHANG, Xian; YANG, Fangxing; ZHANG, Xiaoling; XU, Ying; LIAO, Tao; SONG, Shibo; WANG, Jianwei. Induction of hepatic enzymes and oxidative stress in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to waterborne hexabromocyclododecane (HBCDD). **Aquatic Toxicology**, [S. I.], v. 86, n. 1, p. 4–11, 2008. DOI: 10.1016/j.aquatox.2007.07.002.

ZHANG, Xuejing; NIU, Yonggang; ZHANG, Haiying; XU, Tisen; ZENG, Qiangcheng; STOREY, Kenneth B.; CHEN, Qiang. The effect of long-term cold acclimation on redox state and antioxidant defense in the high-altitude frog, *Nanorana pleskei*. **Journal of Thermal Biology**, [S. I.], v. 99, p. 1–10, 2021. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2021.103008.

APÊNDICE 1 – NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS NAS ANÁLISES BIOQUÍMICAS

TABELA 1 – NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES ENZIMÁTICAS DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris* EXPOSTO À 31 °C

Biomarcador	Tempo	Controle (23 °C)	Tratamento (31 °C)
SOD	2 h	10	10
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	10	10
	48 h	9	10
	72 h	10	10
	96 h	9	10
CAT	2 h	10	10
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	10	10
	48 h	9	10
	72 h	10	10
	96 h	9	10
GST	2 h	10	10
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	10	10
	48 h	9	10
	72 h	9	10
	96 h	8	10
GPx	2 h	10	10
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	10	10
	48 h	9	10
	72 h	10	10
	96 h	9	10
GR	2 h	10	10
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	10	10
	48 h	9	10
	72 h	10	10
	96 h	9	10
G6PDH	2 h	10	10
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	10	10
	48 h	9	10
	72 h	10	10
	96 h	9	10

FONTE: O autor (2022).

NOTA: SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutatona S-transferase, GPx- glutatona peroxidase, GR- glutatona redutase e G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase.

TABELA 2 – NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS PARA MENSURAR A CONCENTRAÇÃO DOS BIOMARCADORES RELACIONADOS A DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris* EXPOSTO À 31 °C

Biomarcador	Tempo	Controle (23 °C)	Tratamento (31 °C)
LPO	2 h	10	9
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	9	10
	48 h	9	10
	72 h	10	8
	96 h	9	10
PCO	2 h	10	10
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	10	10
	48 h	9	9
	72 h	10	10
	96 h	9	10
GSH	2 h	10	10
	6 h	7	9
	12 h	9	10
	24 h	10	10
	48 h	9	9
	72 h	9	10
	96 h	8	10
EROs	2 h	8	10
	6 h	7	9
	12 h	8	9
	24 h	8	8
	48 h	9	10
	72 h	10	10
	96 h	9	8

FONTE: O autor (2022).

NOTA: LPO- lipoperoxidação, PCO- carbonilação de proteínas, GSH- glutatona reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio.

TABELA 3 – NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS PARA AS ANÁLISES ENZIMÁTICAS DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris* EXPOSTO À 15 °C

Biomarcador	Tempo	Controle (23 °C)	Tratamento (15 °C)
SOD	2 h	9	8
	6 h	10	9
	12 h	9	9
	24 h	9	4
	48 h	10	10
	72 h	9	9
	96 h	5	9
CAT	2 h	9	9
	6 h	10	10
	12 h	9	9
	24 h	9	4
	48 h	10	10
	72 h	9	9
	96 h	5	9
GST	2 h	9	9
	6 h	10	10
	12 h	9	9
	24 h	9	4
	48 h	10	10
	72 h	9	9
	96 h	5	9
GPx	2 h	9	9
	6 h	10	9
	12 h	9	9
	24 h	9	4
	48 h	10	10
	72 h	9	9
	96 h	5	9
GR	2 h	9	9
	6 h	10	10
	12 h	9	9
	24 h	9	4
	48 h	10	10
	72 h	9	9
	96 h	5	9
G6PDH	2 h	9	9
	6 h	10	10
	12 h	9	9
	24 h	9	4
	48 h	10	10
	72 h	9	9
	96 h	5	9

FONTE: O autor (2022).

NOTA: SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutatona S-transferase, GPx- glutatona peroxidase, GR- glutatona redutase e G6PDH- glicose-6-fosfato desidrogenase.

TABELA 4 – NÚMERO DE AMOSTRAS UTILIZADAS PARA MENSURAR A CONCENTRAÇÃO DOS BIOMARCADORES RELACIONADOS A DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE *Astyanax lacustris* EXPOSTO À 15 °C

Biomarcador	Tempo	Controle (23 °C)	Tratamento (15 °C)
LPO	2 h	9	9
	6 h	10	10
	12 h	9	9
	24 h	8	3
	48 h	7	9
	72 h	8	7
	96 h	5	8
PCO	2 h	9	8
	6 h	10	10
	12 h	9	9
	24 h	9	3
	48 h	10	10
	72 h	9	9
	96 h	5	9
GSH	2 h	9	9
	6 h	9	9
	12 h	8	9
	24 h	9	4
	48 h	10	10
	72 h	9	9
	96 h	5	9
EROs	2 h	9	9
	6 h	10	10
	12 h	9	9
	24 h	9	4
	48 h	10	9
	72 h	9	9
	96 h	4	9

FONTE: O autor (2022).

NOTA: LPO- lipoperoxidação, PCO- carbonilação de proteínas, GSH- glutationa reduzida e EROs- espécies reativas de oxigênio.