UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

IEDA CRISTINA SCHLEGER

EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, DE PROTEÍNAS E NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DE Astyanax lacustris (CHARACIFORME, CHARACIDAE)

CURITIBA

2022

IEDA CRISTINA SCHLEGER

EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, DE PROTEÍNAS E NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DE Astyanax lacustris (CHARACIFORME, CHARACIDAE)

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Romão

CURITIBA 2022

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

Schleger, leda Cristina

Efeitos do estresse térmico no metabolismo de carboidratos de proteínas e no sistema de defesa antioxidante de *Astyanax lacustris* (Characiforme, Characidae) / leda Cristina Schleger. – Curitiba, 2022.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti. Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Romão

 Peixe – Efeito do stress. 2. Homeostase. 3. Metabolismo energético. 4. Estresse oxidativo. 5. Temperatura – Efeito fisiológico.
I. Donatti, Lucélia, 1964-. II. Romão, Silvia, 1969-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.



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 tese de Doutorado de **IEDA CRISTINA SCHLEGER** intitulada: **EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, DE PROTEÍNAS E NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE DE Astyanax lacustris (CHARACIFORME, CHARACIDAE).**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutora 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, 22 de Julho de 2022.

Assinatura Eletrônica 03/08/2022 13:53:04.0 LUCELIA DONATTI Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica 02/08/2022 22:04:24.0 MARISA FERNANDES DE CASTILHO Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ) Assinatura Eletrônica 02/08/2022 18:00:43.0 JULIANA BELLO BARON MAURER Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica 03/08/2022 11:41:33.0 SILVIA MARIA SUTER CORREIA CADENA Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR) Assinatura Eletrônica 02/08/2022 17:24:48.0 IZONETE CRISTINA GUILOSKI Avaliador Externo (INSTITUTO DE PESQUISA PELÉ PEQUENO PRÍNCIPE)

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: 211970 Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp

Para autenticar este documento/assinatura, acesse https://www.prppg.utpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp e insira o codigo 211970

Dedico este trabalho ao meu pai Agostinho Dias Schleger, à minha mãe Inês Zamboni Schleger e ao meu marido, Ernesto Vendramini Júnior.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela vida, proteção e por permitir o autoconhecimento e o crescimento pessoal.

Ao meu pai, Agostinho Dias Schleger e à minha mãe, Inês Zamboni Schleger, seu incentivo e apoio em todos os momentos foram imprescindíveis para que esta jornada se completasse. Vocês sempre me ensinaram que o conhecimento gera oportunidades, traz liberdade e transforma o caráter.

Ao meu companheiro de vida, Ernesto Vendramini Júnior, por ser meu porto seguro, agradeço por estar sempre presente, por compreender minha ausência e por poder contar contigo, seja para um conselho ou com auxílio nas atividades.

Aos meus irmãos, Iara Aparecida Schleger e Ícaro Augusto Schleger, pelo incentivo e auxílio sempre que precisei.

À três pessoas especiais em minha vida, minha sogra, Waltraud Vanderci Machado Vendramini, meu avô, Abel Zamboni e minha avó, Maria Cristina Schleger. Embora queiramos as pessoas que são nossas referências sempre próximas fisicamente, sabemos que isso não é possível; sua partida durante o doutorado reforça o legado que me deixaram, seus ensinamentos e seus exemplos sempre viverão em minha memória e em meu coração!

À minha orientadora, Lucélia Donatti, pela orientação, conselhos e toda contribuição para a minha formação pessoal e profissional.

À minha co-orientadora, Silvia Romão, por todos os ensinamentos, pela sua postura profissional e pela contribuição com seu grande conhecimento neste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Ananda Karla Alves Neundorf, Guilherme Prosperi Carster, Mylena da Costa Agustin, Diego Ortiz da Silva, Ana Paula Nascimento Corrêa, Jhonatan Ratko, em especial ao Diego Mauro Pereira Carneiro e à Anna Carolina Resende, pela grande ajuda com as análises bioquímicas e estatística.

Às professoras Maria Rosa Dmengeon Pedreiro de Souza, Silvia Romão e Tatiana Herrerias, que auxiliaram com as análises e com a interpretação dos resultados.

Ao Alessandro Mateus Sloty, por toda ajuda durante os experimentos, sem você eu não teria conseguido!

Ao Renan Gargiel de Oliveira e à Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), por viabilizar a infraestrutura da Piscicultura Ildo Zago, auxiliar com a logística, ceder espaço para a realização dos experimentos e alojamento, além da doação dos exemplares de *Astyanax lacustris* para esta pesquisa.

Aos senhores Silvino Tusset, conhecido como seu Tico, e ao senhor João Thiel, por ajudarem com as coletas dos peixes, sem seu grande conhecimento e experiência sobre o comportamento natural, manejo do material de pesca e do habitat destes animais, não seria possível realizar este trabalho. Muito obrigada!

Aos professores das bancas, que avaliaram o projeto, os relatórios anuais de acompanhamento, as qualificações e por fim, a tese, pelas valiosas contribuições.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa e apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Centro de Assessoria de Publicação Acadêmica (CAPA), pela tradução e contribuições com o artigo elaborado a partir do segundo capítulo desta tese.

Aos gestores, diretores e professores do Instituto Federal do Paraná (IFPR), campus de União da Vitória; Serviço Social do Comércio (SESC-PR) e Colégio Estadual Cívico Militar Bernardina Schleder, por auxiliarem com a logística e horários da docência, trocas de aulas e principalmente pela compreensão e apoio nos momentos em que precisei me ausentar para cumprimento das atividades do doutorado.

Ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR e a todos os professores que contribuíram para minha formação.

"Nada na Biologia faz sentido exceto à luz da evolução. Vista à luz da evolução, a Biologia é, talvez, intelectualmente a mais satisfatória e inspiradora ciência. Sem essa luz, torna-se uma pilha de fatos diversos – alguns deles interessantes ou curiosos, mas que não fazem uma descrição significativa do todo"

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

As variações térmicas do ambiente aquático afetam os animais ectotérmicos, sobretudo os peixes, os quais são evolutivamente adaptados para ajustar seu metabolismo e manter a homeostase diante das variações na temperatura da água. No entanto, situações de estresse térmico muito intensas ou duradouras podem comprometer a estabilidade metabólica, fisiológica e também a sobrevivência dos peixes. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar os efeitos do estresse térmico de baixa e alta temperatura no metabolismo de carboidratos e proteínas e na defesa antioxidante de Astvanax lacustris, uma espécie de peixe de água doce comum na região subtropical do Brasil, conhecida popularmente como lambari do rabo amarelo. Para isso, os exemplares de A. lacustris foram expostos a choque térmico de baixa temperatura (15 °C) e alta temperatura (31 °C), com controles a 23 °C e foram avaliados biomarcadores metabólicos de fígado, exposto ao choque térmico durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas; e de brânquias, expostas durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas. Os biomarcadores foram avaliados por métodos espectrofotométricos. No figado sob estresse térmico de baixa temperatura, houve aumento na demanda energética durante as primeiras 48 h, necessário para o ajuste metabólico à baixa temperatura, com aumento na glicólise, no ciclo do ácido cítrico e no catabolismo de aminoácidos. Adicionalmente, em 31 °C houve exportação de glicose nas primeiras 12 h de exposição e aumento no ciclo do ácido cítrico. O acetil-CoA, substrato da via, possivelmente foi originado da oxidação de lipídeos. As defesas antioxidantes não foram alteradas no fígado em 15 °C, ao contrário de 31 °C, em que houve alteração em vários marcadores da defesa antioxidante, indicando uma resposta à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Porém, o estresse oxidativo foi verificado em ambas as temperaturas de exposição, com ocorrência de danos oxidativos, detectados pela peroxidação lipídica a 15 °C e carbonilação de proteínas a 31 °C. Em brânquias, a baixa temperatura não provocou alterações na demanda energética e houve redução das defesas antioxidantes, com exceção de um aumento da glutationa peroxidase em 96 h. Por conta disso, o órgão esteve vulnerável à ação das EROs, ocorrendo aumento de carbonilação de proteínas em 12 h. Em alta temperatura, a resposta metabólica nas brânquias foi mais intensa, com aumento da glicólise e do ciclo do ácido cítrico, além da diminuição da via das pentoses fosfato. Ocorreu também elevação das defesas antioxidantes, verificado pela maior atividade da glutationa peroxidase, glutationa redutase e glutationa S-transferase. Mas, o sistema de defesa antioxidante não foi capaz de proteger os tecidos da ação das EROs, pois ocorreu aumento de carbonilação de proteínas em 6 e 24 h, indicando estresse oxidativo pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e sua capacidade de neutralização. Os resultados demostraram que as variações de temperatura provocam ajustes metabólicos em A. lacustris e, que as respostas adaptativas foram diferentes para temperaturas de inverno e verão e nos órgãos avaliados. No entanto, mesmo com a ocorrência de estresse oxidativo em lipídeos e proteínas no fígado; e em proteínas nas brânquias, A. lacustris conseguiu estabelecer a homeostase diante do estresse térmico, demonstrando que está adaptada às variações térmicas do ambiente.

Palavras-chave: Homeostase. Estresse térmico. Metabolismo Energético. Espécies Reativas de Oxigênio. Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

The thermal variations of the aquatic environment affect ectothermic animals, especially fish, which are evolutionarily adapted to adjust their metabolism and maintain homeostasis in the face of variations in water temperature. However, very intense or longlasting heat stress situations can compromise the metabolic and physiological stability and also the survival of fish. This research aimed to evaluate the effects of low and high temperature heat stress on carbohydrate and protein metabolism and on the antioxidant defense of Astyanax lacustris, a species of freshwater fish common in the subtropical region of Brazil, popularly known as yellow tail lambari. For this, specimens of A. lacustris were exposed to low temperature (15 ° C) and high temperature (31 °C) heat shock, with controls at 23 °C, and metabolic biomarkers of liver exposed to heat shock during 2, 6, 12, 24, 48, 72 and 96 hours; and gills, exposed for 2, 6, 12, 24, 48 and 96 hours. Biomarkers were evaluated by spectrophotometric methods. In the liver under low temperature heat stress, there was an increase in energy demand during the first 48 h, necessary for the metabolic adjustment at low temperature, with an increase in glycolysis, citric acid cycle and amino acid catabolism. Additionally, at 31 °C there was an export of glucose in the first 12 h of exposure and an increase in the citric acid cycle. Acetyl-CoA, the substrate of the pathway, possibly originated from the oxidation of lipids. Antioxidant defenses were not altered in the liver at 15 °C, as opposed to 31 °C, where there were changes in several markers of antioxidant defense, indicating a response to the production of reactive oxygen species (ROS). However, oxidative stress was verified at both exposure temperatures, with the occurrence of oxidative damage, detected by lipid peroxidation at 15 °C and protein carbonylation at 31 °C. In gills, the low temperature did not cause changes in energy demand. There was a reduction in antioxidant defenses, with the exception of an increase in glutathione peroxidase at 96 h. Because of this, the organ was vulnerable to the action of ROS, with an increase in protein carbonylation occurring within 12 h. At high temperature, the metabolic response in the gills was more intense, with an increase in glycolysis and the citric acid cycle, in addition to a decrease in the pentose phosphate pathway. There was also an increase in antioxidant defenses, verified by the higher activity of glutathione peroxidase, glutathione reductase and glutathione S-transferase. However, the antioxidant defense system was not able to protect the tissues from the action of ROS, as there was an increase in protein carbonylation at 6 and 24 h, indicating oxidative stress due to the imbalance between the production of ROS and its neutralization capacity. The results showed that temperature variations cause metabolic adjustments in A. lacustris and that the adaptive responses were different for winter and summer temperatures and in evaluated organs. However, even with the occurrence of oxidative stress on lipids and proteins in the liver; and in proteins in the gills, A. lacustris managed to establish homeostasis in the face of thermal stress, demonstrating that it is adapted to the thermal variations of the environment.

Keywords: Homeostasis. Thermal stress. Energy metabolism. Reactive Oxygen Species. Oxidative Stress.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

FIGURA 1 -	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS METABÓLICAS
	RESPONSÁVEIS PELA MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE DA
	GLICOSE
FIGURA 2 -	SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE
FIGURA 3 -	EXEMPLAR DE Astyanax lacustris
CAPÍTULO I	
FIGURA 1 -	MAPA DE LOCALIZAÇÃO41
FIGURA 2 -	DESIGN EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM43
FIGURA 3 -	BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO
	FÍGADO DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM
	O ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA50
FIGURA 4 -	ATIVIDADE DA G6PASE DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA51
FIGURA 5 -	ATIVIDADE DA PFK DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA51
FIGURA 6 -	ATIVIDADE DA CS DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA
FIGURA 7 -	ATIVIDADE DA GLDH DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA52
FIGURA 8 -	ATIVIDADE DA AST DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA53
FIGURA 9 -	ATIVIDADE DA ALT DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA53
FIGURA 10 -	BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO
	FÍGADO DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM
	O ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA55
FIGURA 11 -	ATIVIDADE DA G6PASE DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA56

FIGURA 12 -	ATIVIDADE	DA LDH	DO	FÍGADO	DE .	A.	lacustris	EXPOSTO) A
	CHOQUE TÉF	RMICO DI	EALT	TA TEMPE	RAT	UR	A		56

- FIGURA 16 BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM FÍGADO DE *A. lacustris* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA.....61
- FIGURA 17 BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE HEPÁTICA DE *A. lacustris* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA......63
- FIGURA 18 BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM FÍGADO DE *A. lacustris* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA......64

CAPÍTULO II

GURA 1 - ESTRUTURA BRANQUIAL EM PEIXES ACTINOPTERÍGEOS	93
GURA 2 - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	96
GURA 3 - BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS	S EM
BRÂNQUIAS DE A. lacustris SOB ESTRESSE TÉRMICO DE BA	AIXA
TEMPERATURA	103
GURA 4 - ATIVIDADE DA GLDH DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOS	ГО А
CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA	104
GURA 5 - ATIVIDADE DA AST DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOST	го а
CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA	104
GURA 6 - ATIVIDADE DA ALT DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOST	го а
CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA	105

FIGURA 7 -	BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE BRÂNQUIAS
	DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM CHOQUE
	TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA107
FIGURA 8 -	ATIVIDADE DA GPx DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOSTO À
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA108
FIGURA 9 -	ATIVIDADE DA GR DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA108
FIGURA 10 -	ATIVIDADE DA GST DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA109
FIGURA 11 -	BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM BRÂNQUIAS DE
	A. lacustris SOB CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA
	TEMPERATURA109
FIGURA 12 -	BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM
	BRÂNQUIAS DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES
	SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA111
FIGURA 13 -	ATIVIDADE DA PFK DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA112
FIGURA 14 -	ATIVIDADE DA PK DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA112
FIGURA 15 -	ATIVIDADE DA CS DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA113
FIGURA 16 -	ATIVIDADE DA G6PDH DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOSTO A
	CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA113
FIGURA 17 -	BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS DE
	BRÂNQUIAS DE A. lacustris SOB CHOQUE TÉRMICO DE ALTA
	TEMPERATURA114
FIGURA 18 -	BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE BRÂNQUIAS
	DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM CHOQUE
	TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA116
FIGURA 19 -	ATIVIDADE DA CAT DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris SOB CHOQUE
	TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA116

FIGURA 20 -	ATIVIDADE DA GPX DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris SOB CHOQUE
	TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA117
FIGURA 21 -	ATIVIDADE DA GR DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris SOB CHOQUE
	TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA117
FIGURA 22 -	ATIVIDADE DA GST DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris SOB CHOQUE
	TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA118
FIGURA 23 -	BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM BRÂNQUIAS DE
	A. lacustris SOB CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA118
FIGURA 24 -	ESQUEMA DAS VIAS METABÓLICAS BRANQUIAIS DE A. lacustris
	SOB ESTRESSE TÉRMICO

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

CAPÍTULO II

QUADRO I - RESUMO DOS RESULTADOS DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, DEFESA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO EM BRÂNQUIAS DE *A. lacustris......*125

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1 - RESULTADOS DA ANOVA PARA OS EFEITOS DA TEMPERATURA E
TEMPOS DE EXPOSIÇÃO NOS BIOMARCADORES DO
METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DO FÍGADO DE
Astyanax lacustris65
TABELA 2 - RESULTADOS DA ANOVA DOS EFEITOS DA TEMPERATURA E
TEMPOS DE EXPOSIÇÃO NOS BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO DO FÍGADO DE Astyanax lacustris65
TABELA 3 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS
E PROTEÍNAS DO FÍGADO DE Astyanax lacustris, EM TEMPERATURA
DE 15 °C66
TABELA 4 - ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS
E PROTEÍNAS DO FÍGADO DE Astyanax lacustris, EM TEMPERATURA
DE 31 °C67
TABELA 5 - MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE Astyanax
lacustris, EM TEMPERATURA DE 15 °C68
TABELA 6 - MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE Astyanax
lacustris, EM TEMPERATURA DE 31 °C69

CAPÍTULO II

TABELA 1 - RESU	LTADOS DA	ANOVA PA	RA OS EFEIT	OS DA TEM	IPERATUR	AE
TEMI	POS DE	EXPOSIÇÃ	O NOS	BIOMARCA	DORES	DE
META	ABOLISMO	DE CARE	BOIDRATOS,	PROTEÍN	AS, DEF	ESA
ANTI	IOXIDANTE	E DANOS	OXIDATIVO	DS DE BR	ÂNQUIAS	DE
Astya	nax lacustris	EXPOSTOS	A CHOQUE	TÉRMICO	DE BAIX	A E
ALTA	A TEMPERAT	URA				120
TABELA 2 - ATIVI	DADE DAS E	NZIMAS DO	METABOLI	SMO DE CA	RBOIDRA	ГOS
E P	ROTEÍNAS	DE BRÂN	QUIAS DE	Astyanax	lacustris,	EM
TEMI	PERATURA I	DE 15 °C	•••••			.121
TABELA 3 - MAR	RCADORES	DE ESTRES	SE OXIDAT	VO DE BR	ÂNQUIAS	DE
Astya	nax lacustris,	EM TEMPER	ATURA DE 1	l 5 °C		122

TABELA 4-	ATI	VIDADE DAS	ENZI	MAS DO ME	TABOLIS	SMO DE CA	ARBOIDRA	TOS
	Е	PROTEÍNAS	DE	BRÂNQUIA	AS DE	Astyanax	lacustris,	EM
TEMPERATURA DE 31 °C							123	
TABELA 5	- M	ARCADORES	DE E	ESTRESSE C	DXIDATI	VO DE BI	RÂNQUIAS	DE

Astyanax lacustris, EM TEMPERATURA DE 31 °C.....124

LISTA DE SIGLAS

- ADP Adenosina difosfato
- ALT Alanina aminotransferase
- AMP Adenosina monofosfato
- ANOVA Análise de variância
- AST Aspartato aminotransferase
- ATP Adenosina trifosfato
- CAT Catalase
- CDNB 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
- CEUA Comissão de ética no uso de animais
- CoA Coenzima A
- CP Comprimento padrão
- CS Citrato sintase
- CT Comprimento total
- DNTB 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)
- EDTA Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EROs Espécies reativas de oxigênio
- G6Pase Glicose-6-fosfatase
- G6PDH Glicose-6-fosfato desidrogenase
- GLDH Glutamato desidrogenase
- GP Glicogênio Fosforilase
- GPx Glutationa peoroxidase
- GR Glutationa redutase
- GSH Glutationa reduzida
- GSSG Gluationa dissulfeto
- GST Glutationa S-transferase
- HCl Ácido clorídrico
- HCO₃⁻ Ânion bicarbonato
- HK Hexoquinase
- H2O2 Peróxido de hidrogênio
- ICMBIO Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- KCl Ácido clorídrico

- LDH Lactato desidrogenase
- LOOH Hidroperóxido lipídico
- LPO Peroxidação lipídica
- m v⁻¹ proporção massa sobre volume
- MDA Malondialdeído
- MDH Malato desidrogenase
- NAD⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
- NADH Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
- NADP⁺ Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
- NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
- NaOH Hidróxido de sódio
- NBT Azul de nitrotetrazólio
- O2⁻ Radical ânion superóxido
- OH Radical hidroxila
- PCO Carbonilação de proteínas
- PEP Fosfoenolpiruvato
- PFK Fosfofrutoquinase
- pH Potencial hidrogeniônico
- PK Piruvato quinase
- PUFAs Ácidos graxos poli-insaturados
- SISBIO Sistema de autorização e informação em biodiversidade
- SOD Superóxido dismutase
- TCA Ácido tricloroacético
- TBA Ácido tiobarbitúrico
- TBARS Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
- U Unidade internacional
- UFPR Universidade Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL
1.1	TEMPERATURA COMO AGENTE ESTRESSOR AO METABOLISMO22
1.2	METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E BIOMARCADORES UTILIZADOS
	PARA AVALIAR O ESTRESSE
1.3	METABOLISMO DE PROTEÍNAS E BIOMARCADORES UTILIZADOS
	PARA AVALIAR O ESTRESSE
1.4	METABOLISMO ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO27
1.5	RIO IGUAÇU E Astyanax lacustris COMO MODELO DE ESTUDOS29
	REFERÊNCIAS32
	CAPÍTULO I - EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA
	TEMPERATURA NO METABOLISMO ENERGÉTICO E NO SISTEMA
	DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO FÍGADO DO PEIXE DE ÁGUA DOCE
	Astyanax lacustris (CHARACIDAE, CHARACIFORME)
1	INTRODUÇÃO
1.2	OBJETIVOS40
1.2.1	Objetivo geral40
1.2.2	Objetivos específicos40
2	MATERIAL E MÉTODOS41
2.1	COLETA E ACLIMATAÇÃO DE Astyanax lacustris41
2.2	EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO42
2.3	MÉTODOS ANALÍTICOS44
2.3.1	Determinação da atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos e
	proteínas44
2.3.2	Determinação da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante e
	glutationa reduzida (GSH)46
2.3.3	Determinação de marcadores de danos oxidativos47
2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS
3	RESULTADOS
3.1	EFEITOS DA BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO DE
	CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS
3.2	EFEITOS DA BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO SISTEMA DE DEFESA

	ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS
4	DISCUSSÃO71
4.1	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA
	NO METABOLISMO HEPÁTICO DE CARBOIDRATOS E
	PROTEÍNAS
4.2	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA
	NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE HEPÁTICO73
5	CONCLUSÃO79
	REFERÊNCIAS80
	CAPÍTULO II - ESTRATÉGIAS METABÓLICAS EM BRÂNQUIAS DE
	Astyanax lacustris SOB ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA
	TEMPERATURA90
1	INTRODUÇÃO91
1.2	OBJETIVOS
1.2.1	Objetivo geral
1.2.2	Objetivos específicos93
2	MATERIAL E MÉTODOS95
2.1	OBTENÇÃO DE A. lacustris E BIOÉTICA95
2.2	DESIGN EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM95
2.3	ANÁLISES BIOQUÍMICAS97
2.3.1	Determinação da atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos e
	proteínas97
2.3.2	Determinação da atividade dos marcadores do sistema de defesa
	antioxidante
2.3.3	Determinação de marcadores de danos oxidativos100
2.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS101
3	RESULTADOS102
3.1	EFEITOS DA BAIXA TEMPERATURA NO METABOLISMO
	BRANQUIAL102
3.2	EFEITOS DA ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO
	BRANQUIAL110
4	DISCUSSÃO126
4.1	EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA NO

Μ	ÍETABOI	LISMO	BRANQUI	AL		•••••		126
4.2 El	FEITOS	DO E	ESTRESSE	TÉRMICO	DE	ALTA	TEMPERATUR	A NO
Μ	IETABOI	LISMO	BRANQUI	AL		• • • • • • • • • • • • • • •		128
5 C	ONCLUS	SÃO	•••••	•••••	•••••		•••••	133
R	EFERÊN	ICIAS	•••••	•••••	•••••	• • • • • • • • • • • • • •	•••••	134
С	ONSIDE	RAÇÕ	ĎES FINAIS		•••••		•••••	142
R	EFERÊN	ICIAS	•••••	•••••	•••••	•••••	•••••	143
Α	PÊNDIC	E 1 -	• FÓRMUL	AS UTILI	ZADA	AS PAR	RA O CÁLCUL	O DA
A	TIVIDA	DE	ENZIMÁ	FICA O	U	CONC	ENTRAÇÃO	DOS
B	IOMAR	CADO	RES ANAL	ISADOS	•••••	•••••	•••••	157

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 TEMPERATURA COMO AGENTE ESTRESSOR AO METABOLISMO

Metabolismo é definido como o complexo de processos físicos e químicos envolvidos na manutenção da vida e pode ser compreendido como uma atividade altamente coordenada nas células, em que as vias metabólicas operam juntas para obter energia química, além de converter, sintetizar ou degradar moléculas necessárias para as funções celulares (POL; FLIK; GORISSEN, 2017).

Quando ocorrem mudanças nas condições fisiológicas das células e dos tecidos que ameaçam o estado de homeostase metabólico do organismo, ocorre o estresse (BALASCH; TORT, 2019; BARTON, 2002). A temperatura é um importante fator ambiental que afeta os processos bioquímicos e fisiológicos dos animais, uma vez que a temperatura do ambiente interfere na velocidade das reações bioquímicas e das rotas metabólicas; além de determinar a temperatura do corpo dos animais ectotérmicos (FICKE; MYRICK; HANSEN, 2007; HARDEWIG; PÖRTNER; DIJIK, 2004; POL; FLIK; GORISSEN, 2017).

Os peixes ectotérmicos, que estão sujeitos às mudanças sazonais na temperatura corporal por estarem diretamente expostos às variações térmicas da água, podem ajustar suas taxas fisiológicas para compensar alterações de temperatura, geralmente determinada por mudanças no metabolismo em um período de aclimatação (LERMEN, LAPPE; CRESTANI, 2004). Este ajuste metabólico é resultado de um processo de adaptação ao longo da evolução, permitindo que estes animais sobrevivam às perturbações que causam estresse, com a manutenção do estado homeostático (BARTON, 2002), o que os torna um importante modelo de estudo.

Segundo Pörtner (2002), os limites de tolerância térmica variam entre as espécies, sendo mais amplos em espécies de regiões tropicais e temperadas do que polares (PECK; CONWAY, 2000). Ambientes aquáticos marinhos, representados por grandes massas de água, geralmente são mais estáveis em relação a mudanças de temperatura do que tributários de água doce, nos quais a ictiofauna é mais afetada, pois experimenta variações de temperatura em maiores níveis do que os animais marinhos (HARDEWIG; PÖRTNER; DIJIK, 2004).

Situações de estresse desencadeiam alterações bioquímicas, selecionadas evolutivamente, que permitem ao organismo elaborar uma resposta metabólica e restaurar a

homeostase; mas, quando o estresse é muito intenso ou muito duradouro, pode comprometer os mecanismos de resposta e consequentemente prejudicar a saúde e bem estar do animal (BARTON, 2002).

O ajuste metabólico de peixes e sua habilidade em exibir atividades normais em temperaturas extremas sugerem que os processos celulares são mantidos em níveis apropriados após um período de aclimatação térmica (GERLACH, TURAY, MALIK, 1990). O limite da tolerância térmica de um animal é indicado pela sua capacidade aeróbica, com a queda de níveis de oxigênio nos fluidos corporais e diminuição da capacidade de ventilação e circulação; em altas temperaturas, a demanda excessiva de oxigênio causa níveis insuficientes nos fluidos, enquanto que em baixas temperaturas a capacidade aeróbica mitocondrial é insuficiente. Mudanças de temperatura além dos níveis de tolerância provocam a transição para o metabolismo anaeróbio, provocando insuficiência progressiva dos níveis de energia (PÖRTNER, 2002).

As respostas ao estresse são classificadas em três graus, sendo o primeiro deles caracterizado por alterações endócrinas, como aumento nos níveis de catecolaminas como a epinefrina e corticosteroides, principalmente o cortisol; o segundo envolve mudanças fisiológicas e bioquímicas e a terceira resposta compreende o comprometimento do desempenho do organismo, como crescimento, comportamento e susceptibilidade a doenças, podendo afetar a sua sobrevivência (BARTON, 2002; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009).

A resposta endócrina com o aumento dos níveis de catecolaminas e corticosteroides no plasma sanguíneo induz vários ajustes metabólicos, como a mobilização das reservas de energia, provocando hiperglicemia, diminuição de glicogênio nos tecidos, lipólise, inibição da síntese de proteínas e alterações nas enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2015; BARTON, 2002; CHENG et al., 2017; LIU; DONG; ZHOU, 2019; MARTÍNEZ-PORCHAS; MARTÍNEZ-CÓRDOVA; RAMOS-ENRIQUEZ, 2009; SILVEIRA; LOGATO; PONTES, 2009; SOPINKA et al., 2016).

1.2 METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E BIOMARCADORES UTILIZADOS PARA AVALIAR O ESTRESSE

O estresse é um componente inerente da vida de todos os peixes e o estudo de seus padrões pode mostrar a eficácia de sobrevivência destes animais, indicando seus ajustes homeostáticos (SCHRECK; TORT, 2016). A medição do estresse provocado pelas mudanças ambientais com a utilização de parâmetros metabólicos como indicadores é uma importante ferramenta para compreensão do processo evolutivo de adaptação e biogeografia de peixes, permitindo inferir sobre como estes animais estão adaptados (SOPINKA et al., 2016) e serão capazes de sobreviver a futuras mudanças ambientais, como o aquecimento global, além de subsidiar a seleção de espécies para a aquicultura e condições mais adequadas de manejo.

Dentre o metabolismo dos carboidratos, as vias energéticas são as principais vias metabólicas estudadas em relação à resposta ao estresse. Nestas vias, os eventos de oxidação da glicose até a produção de ATP nas células podem ser estudados e fornecer respostas importantes de como o organismo enfrenta a situação de estresse.

Os níveis de glicose no sangue são controlados pelo fígado sob a ação de hormônios, como insulina, glucagon e cortisol (CONDE-SIEIRA; SOENGAS, 2017; HAN et al., 2016; MARTÍNEZ-PORCHAS; MARTÍNEZ-CÓRDOVA; RAMOS-ENRIQUEZ, 2009; POL; FLIK; GORISSEN, 2017) e sua origem pode ser da alimentação, de vias gliconeogênicas ou de glicogenólise (ENES et al., 2009). O excesso de glicose pode ser estocado na forma de glicogênio no fígado e nos músculos pela glicogênese ou convertido em lipídeos no fígado (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002) (FIGURA 1).

Quando um organismo está em estado alimentado, os produtos da via glicolítica são utilizados para a síntese de ácidos graxos pela lipogênese nos hepatócitos; ao passo que, quando em jejum, o fígado secreta glicose através da quebra de glicogênio (glicogenólise) ou pela síntese da glicose a partir de outros substratos, tais como aminoácidos e piruvato (gliconeogênese) (RUI, 2014). A enzima glicogênio fosforilase (GP) atua na glicogenólise, ao catalisar a degradação de glicogênio, produzindo glicose 1-fosfato, enquanto que a enzima glicose 6-fosfatase (G6Pase) promove a catálise da última reação da gliconeogênese e glicogenólise, que é a hidrólise da glicose 6-fosfato em glicose e fosfato inorgânico (Pi) (HAN et al., 2016; MITHIEUX; RAJAS; GAUTIER-STEIN, 2004; RUI, 2014) sendo enzimas essenciais no controle da homeostase da glicose.

Em condições aeróbicas, a glicose segue pela via glicolítica no citoplasma, ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) e pela cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias (RUI, 2014). A glicólise é a única rota para catabolismo da glicose em todos os organismos, incluindo os peixes (FIGURA 1); este processo consiste na oxidação progressiva de uma

molécula de glicose (composta por 6 carbonos) em 2 moléculas de piruvato (compostas por 3 moléculas de carbono) (ENES et al., 2009; HAN et al., 2016).



FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS VIAS METABÓLICAS RESPONSÁVEIS PELA MANUTENÇÃO DA HOMEOSTASE DA GLICOSE

FONTE: Adaptado de Enes (2009).

A regulação da via glicolítica é dependente da atividade de três enzimas chave, cujo sentido das reações na glicólise é irreversível: hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK) e piruvato quinase (PK) (ENES et al., 2009). A HK realiza a primeira reação da glicólise, oxidando a glicose em glicose 6-fosfato; a PFK realiza a terceira etapa da glicólise, convertendo frutose 6-fostafo em frutose 1,6-bifosfato, sendo a enzima chave para inserção da glicose na via glicolítica; e a PK atua na décima e última etapa da glicólise, convertendo fosfoenolpiruvato (PEP) em piruvato (HAN et al., 2016).

A segunda etapa de oxidação da glicose ocorre após a formação do piruvato, com sua oxidação a acetil e introdução no ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs. Nesta etapa,

ocorre a oxidação dos grupos acetil em gás carbônico (CO₂₎, com a redução dos transportadores de elétrons dinucleotídeo de flavina e adenina (FADH₂) e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), os quais são oxidados na cadeia transportadora de elétrons. A enzima que atua incorporando os grupos acetil no ciclo do ácido cítrico é a citrato sintase (CS), outro biomarcador importante que indica metabolismo aeróbico nas células. A enzima malato desidrogenase (MDH), atua na última etapa do ciclo do ácido crítico, catalisando a reação reversível de malato em oxaloacetato (MUSRATI, et al., 1998).

Além da via aeróbica, as células podem realizar a fermentação, processo anaeróbico no qual atua a enzima lactato desidrogenase (LDH), situada no citosol, possui função glicolítica, que catalisa a etapa final da glicólise anaeróbica ao realizar redução de piruvato em lactato, em que os níveis de LDH refletem a capacidade de produção de energia anaeróbia e, portanto, o nível de resistência à deficiência de oxigênio durante o estresse térmico (HAN et al., 2016; ZAKHARTSEV et al., 2004); esta enzima também realiza a reação reversa, convertendo lactato em piruvato durante o ciclo de Cori, já descrito em peixes (GUILLEN et al., 2019).

Além das vias energéticas, a glicose também pode seguir a rota das pentosesfosfato, levando à produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) para biossíntese de lipídeos ou defesa antioxidante, com a síntese de ribose 5-fosfato para a produção de nucleotídeos (ENES et al., 2009; HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002). O desvio de moléculas para a via das pentoses fosfato é realizado pela enzima glicose 6fosfato desidrogenase (G6PDH) (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002), portanto, esta enzima pode ser utilizada como um marcador de anabolismo em peixes; além disso, o NADPH produzido pela G6PDH é um metabólito importante também para a proteção celular contra os danos oxidativos (PEDRÓN et al., 2017).

1.3 METABOLISMO DE PROTEÍNAS E BIOMARCADORES UTILIZADOS PARA AVALIAR O ESTRESSE

Os aminoácidos podem ser utilizados como substrato energético ou para a gliconeogênese, ao serem catabolizados em piruvato ou em intermediários do ciclo do ácido cítrico. Nesses processos, são realizadas reações de desaminação, catalisadas por enzimas, como glutamato desidrogenase e aminotransferases (LI; ZHENG; WU, 2020).

Após a retirada dos grupos amino dos aminoácidos glicogênicos nas mitocôndrias dos hepatócitos, os esqueletos de carbono remanescentes (na forma de piruvato e α -cetoglutarato), são prontamente catalisados para a gliconeogênese ou para o ciclo do ácido cítrico (LI; ZHENG; WU, 2020). Os α -cetoácidos podem ser convertidos em intermediários do ciclo do ácido cítrico, como, piruvato, oxaloacetato, fumarato, succinil-CoA ou α -cetoglutarato, o quais também são precursores da gliconeogênese (RUI, 2014).

Enzimas que atuam nesse processo podem ser utilizadas como bioindicadoras da utilização de aminoácidos como fonte energética, como a glutamato desidrogenase (GLDH), que é uma enzima mitocondrial que atua de forma reversível na reação de conversão de glutamato em α -cetoglutarato e amônia, enquanto reduz NAD(P)⁺ em NAD(P)H (PLAITAKIS, et al., 2017).

Outras enzimas utilizadas para identificar o metabolismo de aminoácidos são as transaminases: alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). A ALT catalisa a conversão reversível de alanina e α -cetoglutarato em piruvato e glutamato; ao passo que a enzima AST atua na conversão, também reversível, de oxaloacetato e glutamato em aspartato e α -cetoglutarato (LI; ZHENG; WU, 2020).

1.4 METABOLISMO ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO

Radicais livres são átomos, íons ou moléculas que contém elétrons desemparelhados, os quais são altamente reativos quimicamente (LUSHCHAK, 2011). Dentre os radicais livres, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas durante a redução parcial do oxigênio molecular na cadeia transportadora de elétrons (LUSHCHAK, 2011), tornando-se moléculas quimicamente reativas resultantes dos processos metabólicos de organismos aeróbios. Em torno de 2% do oxigênio utilizado como aceptor final de elétrons durante a respiração celular é convertido em ânion superóxido, um tipo de ERO (ABELE; PUNTARULO, 2004). Além disso, outros processos moleculares, em outras organelas, como reações enzimáticas, também podem produzir EROs.

A redução parcial do oxigênio durante a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial leva à produção de moléculas intermediárias (EROs) altamente reativas, sendo as principais: o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH•) (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; CADENAS, 1989). Inicialmente é formado o ânion $O_2^{\bullet-}$, podendo levar à formação de H_2O_2 e o OH•, que é o mais danoso das EROs

(CADENAS, 1989). Como o H_2O_2 tem alta difusão pelas membranas celulares e um período de vida longo, na presença de íons metálicos como o Fe²⁺, pode formar OH• pela reação de Fenton (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; CADENAS, 1989).

Situações de estresse ambiental causam aumento na produção de EROs, levando ao estresse oxidativo dentro das células (CADENAS, 1989; VINAGRE et al., 2012), o que pode ocasionar danos moleculares, como carbonilação de proteínas (PCO), peroxidação lipídica (LPO) e redução no comprimento de telômeros (SOPINKA et al., 2016). Nos organismos, as enzimas antioxidantes, incluindo a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa S-transferase (GST), glutationa redutase (GR) e glutationa peroxidase (GPx) induzem respostas antioxidantes e fornecem uma proteção importante contra o estresse oxidativo induzido por EROs, sendo que estas enzimas são importantes indicadoras de estresse ambiental (FIGURA 2) (DALZOCHIO, et al., 2016; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006).

A defesa antioxidante de um organismo envolve a proteção por enzimas que degradam as EROs, tais como a SOD, que converte o $O_2^{\bullet^-}$ em H_2O_2 ; a CAT, que converte o H_2O_2 em água e oxigênio e a GPx, que reduz H_2O_2 à água, à custa da conversão da glutationa reduzida (GSH) em oxidada (GSSG). A GR atua na recuperação da GSH, possibilitando a manutenção do ciclo redox da glutationa (FIGURA 2) (BARBOSA et al., 2010). A defesa antioxidante não enzimática compreende moléculas, como ácido ascórbico (vitamina C), glutationa (tiol não proteico), α -tocoferol (vitamina E) e carotenoides (CADENAS, 1989).



FIGURA 2 – SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE

FONTE: Barbosa et al. (2010). Legenda: O_2^- - radical superóxido; SOD - superóxido dismutase; H_2O_2 – peróxido de hidrogênio; OH⁻ – radical hidroxila; O_2 – gás oxigênio; H_2O - água; GPx – glutationa peroxidase; GSH – glutationa reduzida; GSSG = glutationa dissulfeto; Grd: glutationa reduzase; NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada; NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida.

A produção de EROs está relacionada positivamente com a concentração de oxigênio no organismo e com as taxas respiratórias; quando o aumento da produção de EROs excede a habilidade do organismo em extinguir estas espécies reativas com seu sistema antioxidante, ocorre o estresse oxidativo, danificando componentes celulares (BIRNIE-GAUIVIN et al., 2017). Ou seja, o termo estresse oxidativo é usado para um estado em que há desequilíbrio no balanço entre a geração e a eliminação das EROs. Este desequilíbrio ocorre quando há um aumento na produção de EROs ou quando as defesas antioxidantes são insuficientes para conter as EROs, provocando distúrbio na homeostase redox (BIRNIE-GAUVIN et 1., 2017; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA; 2006; PAITAL; CHAINY; 2015).

Quando não neutralizadas as EROs oxidam biomoléculas, como lipídeos, proteínas, açúcares e ácidos nucleicos, diminuindo ou anulando suas funções biológicas, e consequentemente, prejudicando a fisiologia celular (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; CADENAS, 1989; PAITAL; CHAINY; 2015). Os danos em lipídeos ocorrem nas cadeias de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), normalmente formando peróxidos, em um processo chamado de peroxidação lipídica (LUSHCHAK, 2011). Os produtos finais da peroxidação lipídica podem, inclusive, reagir com outras moléculas, como proteínas (LUSHCHAK, 2011). As EROs também podem reagir com o DNA e os danos podem levar ao envelhecimento e provocar doenças, como câncer (HALLIWELL, 2006).

1.5 RIO IGUAÇU E Astyanax lacustris COMO MODELO DE ESTUDOS

A região subtropical brasileira apresenta clima do tipo Cfb (Clima Temperado Oceânico - classificação Köppen), que se estende do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná até a região de Campos do Jordão em São Paulo e de Itatiaia no Rio de Janeiro. Este clima é caracterizado por ser temperado, com verões amenos, tendo média de temperatura nos meses mais quentes menor que 22 °C, com pelo menos 4 meses ao ano acima de 10 °C (ITCG, 2008); as chuvas são uniformemente distribuídas, sem estação seca e com a formação de geadas nos invernos (EMBRAPA, 2012).

O sul do estado do Paraná, situado na região sul do Brasil, apresenta estações do ano bem definidas e temperaturas que variam de -1 °C no inverno até 34 °C no verão (EMBRAPA, 2012). Lermen et al. (2004) destacam que a temperatura da água na região subtropical brasileira pode variar entre mínimas de 15 °C até máximas de 30 °C. As temperaturas da água do rio Iguaçu variam entre 15,5 °C a 28,8 °C entre inverno e verão

(NARDELLI et al., 2016), uma amplitude térmica que exerce pressão seletiva sobre a ictiofauna de água doce desta região.

O rio Iguaçu possui uma extensão de 1.320 km, formado pelo encontro dos rios Iraí e Atuba, em Curitiba, e deságua no rio Paraná em Foz do Iguaçu no oeste do estado do Paraná. A bacia do rio Iguaçu cobre uma superfície de 70.800 Km² e é dividida em três unidades hidrológicas: Baixo Iguaçu, Médio Iguaçu e Alto Iguaçu (PARANÁ, 2006, 2010). Maack (1968) considera este rio como geologicamente antigo, mas rejuvenescido pelos processos de soerguimento, que caracterizam seu curso com corredeiras e saltos, alternados por meandros e várzeas.

O rio Iguaçu apresenta alta compartimentalização em seu curso, devido à sua formação geológica e as barreiras artificiais (GARAVELLO; SAMPAIO, 2010). Além disso, este tributário do Rio Paraná apresenta um grande desnível em seu leito, em torno de 830 m que, somado ao surgimento das Cataratas do Iguaçu, há 22 milhões de anos, isolou as populações de peixes dos rios Iguaçu e Paraná (SEVERI; CORDEIRO, 1994). Estes fatores provocaram barreiras à sua ictiofauna, que em muitos casos se constitui de espécies endêmicas.

Os peixes de água doce do gênero *Astyanax* são abundantes em número de espécies, que estão amplamente distribuídas na região Neotropical, sendo encontradas desde os estados do Texas e Novo México nos Estados Unidos até a Patagônia, na Argentina (ORNELAS-GARCÍA; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ; DOADRIO, 2008). Sua grande distribuição geográfica se deve principalmente à sua alta plasticidade fenotípica e capacidade de se adequar e sobreviver em diversos habitats, sendo extremamente rápido seu ajuste fisiológico a ambientes novos (ORNELAS-GARCÍA; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ; DOADRIO, 2008).

As espécies de *Astyanax* são amplamente utilizadas para alimentação, aquarismo, piscicultura e como bioindicadoras de qualidade ambiental, uma vez que adversidades ambientais afetam as condições metabólicas destes peixes (WARREN et al., 2020). No estudo de Marandel et al. (2020), foi demonstrado que *Astyanax mexicanus* é eficiente em utilizar carboidratos como recurso energético, e isto deve-se ao fato de que estes animais têm hábito onívoro e respondem à sinalização pela insulina, tornando os representantes deste gênero importantes para estudos de ajustes no metabolismo energético devido a alterações nas condições ambientais.

A espécie *Astyanax lacustris* Garutti e Britski, 2000 (LUCENA; SOARES, 2016), popularmente conhecida como lambari do rabo amarelo, é registrada na região subtropical da América do Sul (LUCENA; SOARES, 2016). São peixes de pequeno porte (10 – 15 cm de comprimento), que habitam pequenos lagos, riachos e rios, com hábito alimentar onívoro (FIGURA 3) (BENNEMANN et al., 2005; VIANA; SUAREZ; LIMA-JUNIOR, 2013).

FIGURA 3 – EXEMPLAR DE Astyanax lacustris

FONTE: Baumgartner et al. (2012)

Esta espécie é considerada como um bom modelo em estudos ambientais (GNOCCHI et al., 2020; MACÊDO et al., 2020; STEVANATO; OSTRENSKY, 2018; ZAFRA-LEMOS et al., 2021), desde biogeográficos e evolutivos, até bioquímicos, utilizados como bioindicadores de alterações ambientais, como alterações climáticas e de contaminação. Os fatores que favorecem sua utilização em estudos ambientais são a sua ampla distribuição geográfica, abundância, facilidade de coleta na natureza e de manejo em condições laboratoriais (ORNELAS-GARCÍA; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, DOADRIO, 2008).

REFERÊNCIAS

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643304001722>.

ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of temperature in juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) biomarker responses and behaviour: implications for environmental monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, n. 1, p. 45–55, 2015. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s12237-014-9792-7.

BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the stress responses in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. FEB, p. 1–12, 2019.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002.

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

BENNEMANN, S. T.; GEALH, A. M.; ORSI, M. L.; SOUZA, L. M. Occurrence and trophic ecology of four species of *Astyanax* (Characidae) in different rivers of the Tibagi River Basin, Paraná, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 95, n. 3, p. 247–254, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0073-47212005000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

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

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen. Transition, p. 79–110, 1989.

CHENG, C. H.; YE, C. X.; GUO, Z. X.; WANG, A. L. Immune and physiological responses of pufferfish (*Takifugu obscurus*) under cold stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 64, p. 137–145, 2017. Elsevier Ltd. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2017.03.003>.

CONDE-SIEIRA, M.; SOENGAS, J. L. Nutrient sensing systems in fish: Impact on food intake regulation and energy homeostasis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. JAN, p. 1–21, 2017.

DALZOCHIO, T.; RODRIGUES, G. Z. P.; PETRY, I. E.; GEHLEN, G.; DA SILVA, L. B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, n. 4, p. 283–298, 2016.

EMBRAPA. Atlas climático da região sul do Brasil. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2012.

ENES, P.; PANSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 519–539, 2009.

FICKE, A. D.; MYRICK, C. A.; HANSEN, L. J. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. 2007.

GARAVELLO, J. C.; SAMPAIO, F. A. A. Five new species of genus <I>Astyanax</i>Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3 SUPPL., p. 847–865, 2010.

GERLACH, G. F.; TURAY, L.; MALIK, K. T. A.; et al. Mechanisms of temperature acclimation in the carp: A molecular biology approach. **American Journal of Physiology** - **Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 259, n. 2 28-2, p. 237–244, 1990.

GNOCCHI, K. G.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; GOMES, L. C.; CHIPPARI-GOMES, A. R. De novo assembly and annotation of the transcriptome of *Astyanax lacustris* liver unveil candidate genes to monitor response to environmental stress. **Marine Genomics**, v. 54, n. May, p. 100784, 2020. Elsevier. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100784>.

GUILLEN, A. C.; BORGES, M. E.; HERRERIAS, T.; et al. Effect of gradual temperature increase on the carbohydrate energy metabolism responses of the Antarctic fish *Notothenia rossii*. **Marine Environmental Research**, v. 150, n. June, p. 104779, 2019. Elsevier. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104779.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HAN, H. S.; KANG, G.; KIM, J. S.; CHOI, B. H.; KOO, S. H. Regulation of glucose metabolism from a liver-centric perspective. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. 1–10, 2016. Nature Publishing Group.

HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O.; DIJK, P. V. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 174, n. 2, p. 149–156, 2004.

HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes: Carbohydrates in fish nutrition. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175–194, 2002. Disponível em:

<http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2095.2002.00200.x>...

ITCG. Clima - estado do Paraná. Instituto de Terras, Cartografia e Geociências do Paraná, p. 54, 2008.

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

LI, X.; ZHENG, S.; WU, G. Nutrition and metabolism of glutamate and glutamine in fish. Amino Acids, 52(5):671-691, 2020. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-020-02851-2

LIU, C.; DONG, S.; ZHOU, Y.; et al. Temperature-Dependent Fatty Acid Composition Change of Phospholipid in Steelhead Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Tissues. Journal of Ocean University of China, v. 18, n. 2, p. 519–527, 2019.

LUCENA, C. A. S.; SOARES, H. G. 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 drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 4072, n. 1, p. 101, 2016. Disponível em: http://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4072.1.5.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 30–35, 2006. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045605002528>.

MAACK, R. Geografia física do Estado do Paraná. Curitiba: IBPT, 1968.

MACÊDO, A. K. S.; SANTOS, K. P. E.; BRIGHENTI, L. S.; et al. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 735, 2020.

MARANDEL, L.; PLAGNES-JUAN, E.; MARCHAND, M.; et al. Nutritional regulation of glucose metabolism-related genes in the emerging teleost model *Mexican tetra* surface fish: a first exploration. **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 2, 2020.

MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; RAMOS-ENRIQUEZ, R. Cortisol and glucose: Reliable indicators of fish stress? | ¿Cortisol y glucosa: Fiables indicadores de estrés de los peces? **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 2, 2009.

MITHIEUX, G.; RAJAS, F.; GAUTIER-STEIN, A. A novel role for glucose 6-

phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44231–44234, 2004.

MUSRATI, R. A.; KOLLÁROVÁ, M.; MERNIK, N.; MIKULÁŠOVÁ, D. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. **General Physiology and Biophysics**, v. 17, n. 3, p. 193–210, 1998.

NARDELLI, M. S.; BUENO, N. C.; LUDWIG, T. A. V.; GUIMARÃES, A. T. B. Estrutura e dinâmica da comunidade de Diatomáceas planctônicas do rio Iguaçu, estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 374–386, 2016.

ORNELAS-GARCÍA, C.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 340, 2008. Disponível em:

http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-8-340>.

PAITAL, B.; CHAINY, G. B. N. Redox metabolism in fishes under thermal stress warrants more attention. Asian Journal of Chemistry, v. 27, n. 11, p. 4120–4124, 2015.

PARANÁ. Resolução nº49, de 20 de dezembro de 2006. Dispõe sobre a instituição de Regiões Hidrográficas, Bacias Hidrográficas e Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado do Paraná. , 2006. SEMA: Secretaria do Estado do Meio Ambiente e de Recursos Hídricos, Conselho Estadual de Recursos Hídricos.

PARANÁ. Bacias Hidrográficas do Paraná. Série Histórica. Curitiba, 2010.

PECK, L. S.; CONWAY, L. Z. The myth of metabolic cold adaptation: Oxygen consumption in stenothermal Antarctic bivalves. **The Geological Society of London**, v. 177, p. 441–450, 2000.

PÉDRON, N.; LE DU, J.; CHARRIER, G.; et al. Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. **Marine Environmental Research**, v. 129, p. 258–267, 2017.

PLAITAKIS, A.; KALEF-EZRA, E.; KOTZAMANI, D.; ZAGANAS, I.; SPANAKI, C. The glutamate dehydrogenase pathway and its roles in cell and tissue biology in health and disease. **Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–26, 2017.

POL, I.; FLIK, G.; GORISSEN, M. Comparative physiology of energy metabolism: fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017. Disponível em:

http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00036/full>.

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 739–761, 2002.
RUI, L. Energy metabolism in the liver. In: R. Terjung (Org.); **Comprehensive Physiology**. p.177–197, 2014. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c130024>.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. First Edit ed. Elsevier Inc., 2016.

SEVERI, W.; CORDEIRO, A. A. M. **Catálogo de peixes da bacia do rio Iguaçu**. Curitiba, 1994.

SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nitritime**, v. 6, p. 1001–1017, 2009.

SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M. R.; O'CONNOR, C. M.; SUSKI, C. D.; COOKE, S. J. **Stress Indicators in Fish**. 2016.

STEVANATO, D. J.; OSTRENSKY, A. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, p. 1–10, 2018.

VIANA, L. F.; SUAREZ, Y. R.; LIMA-JUNIOR, S. E. Influence of environmental integrity on the feeding biology of *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) in the Ivinhema river basin. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 35, n. 4, p. 541–548, 2013. Disponível em:

http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/19497>.

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

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X12001719>.

WARREN, M. L. .; BURR, B. M. Freshwater fishes of north America. Volume 2 ed. 2020.

ZAFRA-LEMOS, L.; LOPES, V. L.; RAMPAZZO, A. P. S.; et al. Evidence of cytogenetic and histological damage in specimens of *Astyanax lacustris* (Pisces, characidae) exposed to the hydrogen cyanide-based herbicide Dormex[®]. Acta Scientiarum - Biological Sciences, v. 43, p. 1–10, 2021.

ZAKHARTSEV, M.; JOHANSEN, T.; PÖRTNER, H. O.; BLUST, R. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 1, p. 95–112, 2004.

CAPÍTULO I - EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO ENERGÉTICO E NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE NO FÍGADO DO PEIXE DE ÁGUA DOCE *Astyanax lacustris* (CHARACIDAE, CHARACIFORME)

RESUMO

Os peixes subtropicais estão expostos às variações sazonais de temperatura que impõem ao seu metabolismo um conjunto de adaptações necessárias para a manutenção da homeostase. Neste estudo, foram abordados os efeitos da variação de temperatura no metabolismo de Astyanax lacustris, uma espécie de peixe de água doce comum na região subtropical do Brasil. Para isso, foram utilizados biomarcadores do metabolismo de carboidratos e proteínas, da defesa antioxidante e de danos oxidativos, avaliados no fígado de exemplares de A. lacustris expostos a choque térmico de baixa temperatura (15 °C) e alta temperatura (31 °C), com controles a 23°C, durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Em baixa temperatura, houve aumento na glicólise, no ciclo do ácido cítrico e no catabolismo de aminoácidos, demonstrando alta demanda energética, necessária para o ajuste metabólico ao frio. Em alta temperatura, ocorreu exportação de glicose nas primeiras 12 horas de exposição e aumento no ciclo do ácido cítrico. Possivelmente o acetil-CoA, substrato do ciclo do ácido cítrico, foi originado da oxidação de lipídeos. As defesas antioxidantes não foram alteradas em baixa temperatura, ao contrário dos peixes expostos ao calor, que sofreram alterações em vários marcadores da defesa antioxidante, indicando uma resposta à produção de EROs. O estresse oxidativo foi verificado tanto em baixa quanto em alta temperatura, com ocorrência de danos oxidativos em lipídeos em 15 °C e em proteínas a 31 °C; porém, em baixa temperatura, a espécie consegue se recuperar dos danos oxidativos nos lipídeos.

Palavras-chave: Defesa antioxidante. Metabolismo energético. Peixe de água doce. Estresse

térmico. Biomarcadores metabólicos.

1 INTRODUÇÃO

A temperatura é o fator abiótico de maior importância para os ecossistemas aquáticos, sobretudo para organismos ectotérmicos, como a maioria dos peixes, afetando diretamente seus processos metabólicos e consequentemente influenciando o crescimento, nutrição, reprodução, comportamento e distribuição biogeográfica (GOLOVANOV, 2012; LERMEN et al., 2004).

A faixa de temperatura na qual uma espécie de peixe consegue manter suas funções fisiológicas depende dos mecanismos adaptativos e evolutivos que lhe permitiram sobreviver nas condições térmicas de seu ambiente (YAMASHITA; YABU; OJIMA, 2010) e quando as variações de temperatura ultrapassam os limites ótimos mínimos e máximos de tolerância, geram estresse térmico. As respostas metabólicas ao estresse devem ser consideradas como um mecanismo adaptativo que permitem ao organismo manter o estado homeostático diante do fator estressante até estar ajustado à nova condição ambiental (BALASCH; TORT, 2019; BARTON, 2002).

A biogeografía dos peixes é determinada, entre outros fatores, pela faixa de temperatura na qual conseguem sobreviver e manter suas taxas metabólicas ótimas. Desta forma, os limites de tolerância térmica variam entre as espécies de peixes, sendo mais amplos nas regiões com maiores oscilações térmicas na água, como nos rios e lagos, em comparação com os ambientes marinhos (PECK; CONWAY, 2000; PÖRTNER, 2002). Os grandes volumes de água dos ecossistemas marinhos fazem com que tenham maior estabilidade térmica em relação aos ambientes de água doce, nos quais os peixes são mais afetados pelas mudanças de temperatura e são expostos a pressões seletivas mais severas em relação à variação térmica da água (BALASCH; TORT, 2019; HARDEWIG; PÖRTNER; DIJK, 2004).

A plasticidade fenotípica determina a capacidade de resiliência de um organismo em relação às mudanças ambientais e é caracterizada pela manifestação de diferentes fenótipos a partir da regulação da expressão gênica, da atividade de proteínas e da epigenética. Em ambientes cujas condições oscilam periodicamente, como as mudanças sazonais, a plasticidade fenotípica reversível é favorecida pela seleção natural. Esta plasticidade permite a aclimatação do indivíduo a partir da remodelação de seus processos fisiológicos repetidamente, para compensar os efeitos da mudança ambiental (BEAMAN; WHITE; SEEBACHER, 2016). O figado participa diretamente na manutenção da homeostase, pois controla funções fisiológicas vitais, como metabolismo nutricional, excreção e detoxificação (POLAKOF et al., 2012; SUN; WU; YU, 2019). As funções do figado são controladas pela insulina e outros hormônios metabólicos (RUI, 2014) e, a investigação de biomarcadores metabólicos neste órgão pode indicar o estado nutricional, homeostático e patológico de um organismo.

Neste sentido, as respostas fisiológicas do figado são importantes durante o estresse térmico e estudos têm demonstrado que variações de temperatura podem provocar danos oxidativos e alterações metabólicas nas vias energéticas (BAGNYUKOVA et al., 2007; ROSSI; BACCHETTA; CAZENAVE, 2017; VARIS; HAVERINEN; VORNANEN, 2016; VINAGRE; MADEIRA; MENDONÇA, 2014; WANG; PAN, 2019).

Devido à sua abundância e ampla distribuição geográfica, as espécies de *Astyanax* são consideradas de relativa importância para estudos de padrões biogeográficos, evolutivos e de biomonitoramento de condições ambientais e contaminação (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015; CARRASCO-LETELIER et al., 2006; CHUNG, 2000; LORO et al., 2015; NIMET; GUIMARÃES; DELARIVA, 2017; ORNELAS-GARCÍA; DOMÍNGUES-DOMÍNGUEZ. DOADRIO, 2008; SIQUEIRA-SILVA et al., 2015).

O lambari do rabo amarelo *Astyanax lacustris* Garutti e Britski, 2000 (LUCENA; SOARES, 2016), é um pequeno peixe (até 14 cm de comprimento), com hábito alimentar onívoro (BENNEMANN et al., 2005; VIANA; SUAREZ; LIMA-JUNIOR, 2013) e de importância para a aquicultura neotropical, usado na alimentação humana e como isca viva na pesca esportiva (NASCIMENTO et al., 2017). Além disso, sua produção comercial tem ganhado destaque nos últimos anos nas regiões sul e sudeste brasileiras, como atividade sustentável econômica e ambientalmente em comunidades rurais, na produção de iscas vivas para criadouros de peixes carnívoros e com vistas para a substituição de *Sardinella* spp., reduzindo assim a pressão pesqueira sobre os estoques naturais de sardinha (FONSECA; COSTA-PERCE; VALENTI, 2017).

O entendimento dos mecanismos fisiológicos e da capacidade de ajuste metabólico de peixes submetidos ao estresse térmico é importante para compreender como as espécies estão adaptadas ao seu habitat, para estabelecer previsões de impactos em relação às alterações climáticas globais e para subsidiar o manejo comercial, com vistas à piscicultura.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos do estresse térmico no metabolismo de carboidratos e proteínas, na defesa antioxidante e em danos oxidativos, no figado de *A. lacustris*, sob a condição de choque térmico de baixa e alta temperatura.

1.2.2 Objetivos específicos

• Investigar as possíveis variações na atividade das enzimas do metabolismo energético: glicose 6-fosfatase (G6Pase), glicogênio fosforilase (GP), hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e malato desidrogenase (MDH), promovidas por estresse térmico de baixa e alta temperatura no figado de *A. lacustris*;

• Avaliar as possíveis alterações na atividade das enzimas do metabolismo de proteínas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e glutamato desidrogenase (GLDH), promovidas por estresse térmico de baixa e alta temperatura no figado de *A. lacustris*;

• Investigar as possíveis variações na atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa S-tranferase (GST), GPx (glutationa peroxidase), GR (glutationa redutase) e G6PDH (glicose 6 fosfato desidrogenase) e níveis de glutationa reduzida (GSH), promovidas pelo estresse térmico de baixa e alta temperatura no figado de *A. lacustris;*

• Avaliar a ocorrência de danos oxidativos em lipídeos e em proteínas, quantificando a peroxidação lipídica (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO), frente à estresse térmico de baixa e alta temperatura no figado de *A. lacustris*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA E ACLIMATAÇÃO DE Astyanax lacustris

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

Para os experimentos de estresse térmico de baixa e alta temperatura, os espécimes de *A. lacustris* (n = 280; CP: $6,17 \pm 0,87$ cm; peso médio: $9,15 \pm 3,4$ g) foram coletados com auxílio de redes de pesca (tecido de multifilamento, malha de 12 mm entre os nós) em lagos artificiais no Centro de Pesquisas e Extensão em Aquicultura Ildo Zago, situado no município de União da Vitória-PR, região sul do Brasil (26°13'12.15"S; 51° 7'51.07"O), pertencente à bacia hidrográfica do rio Iguaçu (FIGURA 1), onde foram realizados os experimentos.



FIGURA 1 - MAPA DE LOCALIZAÇÃO

Nota: A bacia hidrográfica do rio Iguaçu está destacada em cinza. Os municípios de Curitiba e Foz do Iguaçu indicam o início e o término da bacia do rio Iguaçu, respectivamente. O município de União da Vitória e a piscicultura Ildo Zago indicam onde os animais foram coletados e o experimento foi realizado.

Os peixes coletados foram transferidos para tanques com revestimento de azulejo com capacidade de 830 litros, com água de nascente própria, em fluxo contínuo (vazão de 4 L/min), em temperatura de 23 °C (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015; LERMEN et al., 2004), 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 aeração constante, durante 3 dias para aclimatação (SILVA; OLIVEIRA, 2017) nas seguintes condições físico-químicas da água: oxigênio dissolvido (9,31 \pm 2,17 mg/L), amônia tóxica (NH3) (0,009 \pm 0,004 mg/L), pH (7,4 \pm 0,31), nitrato (0,00 mg/L), nitrito (0,00 mg/L), dureza (75 \pm 9 mg/L de CaCO₃) e sem presença de cloro residual.

2.2 EXPERIMENTOS DE CHOQUE TÉRMICO

Após a aclimatação, os peixes foram separados randomicamente e transferidos diretamente para aquários com água nas temperaturas de 15 ± 1 °C ou 31 ± 1 °C (LERMEN et al., 2004), configurando o choque térmico de baixa e alta temperatura, respectivamente. Para cada situação experimental (temperatura e tempo), foi mantido um grupo controle a 23 ± 1 °C. Os peixes ficaram expostos às temperaturas estabelecidas durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas, totalizando 10 indivíduos por situação experimental, os quais foram retirados aleatoriamente de dois aquários diferentes, caracterizando duplicata (FIGURA 2). A densidade máxima em cada aquário foi de 1,8 g de peixe/L de água (CHUNG, 2000; VIEIRA; CORREIRA; MOREIRA, 2013).

Os aquários configuravam sistemas estáticos, limpos por sucção a cada 2 dias (nos experimentos acima de 24 horas), com aproximadamente 50 % da água renovada (LERMEN et al., 2004). Nos aquários foram instalados previamente termostatos eletrônicos submersos (Aqua One®, VigoAr® e Atman®, com potência de 100 W), para regulação e controle da temperatura. Os peixes condicionados à temperatura de 15 °C foram colocados em aquários no interior de um refrigerador horizontal (Consul/530 L), com controlador digital de temperatura (TC-900E POWER/07).

Os peixes foram alimentados diariamente com ração comercial para peixes (Supra® Aqua Line, com teor de proteína de 42 %), em uma proporção de 1 % do peso animal (CHUNG, 2000; LERMEN et al., 2004). A alimentação foi realizada de forma simultânea nos grupos controles e experimentais. O primeiro dia de aclimatação foi o primeiro dia do fornecimento de alimentos e a última alimentação foi fornecida entre 22 e 24 horas antes da

eutanásia (MADEIRA et al., 2016; VINAGRE et al., 2014), para evitar interferências do estado nutricional nos resultados (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002; SOUZA et al., 2018). Durante a alimentação, foram realizadas observações da mobilidade e ingestão de alimento pelos peixes. Ao fim de cada experimento, 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%) e eutanasiados com secção medular, sendo imediatamente dissecados e o figado coletado em gelo e armazenado em nitrogênio líquido.



FIGURA 2 - DESIGN EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM

Nota: para cada temperatura testada (15°C e controles à 23°C ou 31°C e controles à 23°C), foram realizados experimentos em duplicata (representadas pelas réplicas) e com dois tempos simultâneos (com exceção de 12 horas). Os tempos de exposição em cada temperatura testada foram de 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. As situações experimentais conduzidas simultaneamente foram nos tempos de 2 e 6 horas, 24 e 48 horas e 72 e 96 horas. A tabela representa o número de peixes que sobreviveram ao final dos experimentos.

2.3 MÉTODOS ANALÍTICOS

As análises foram realizadas em triplicata, com condições ótimas de pH, concentração de substrato saturante e em temperatura ambiente de 22 °C (ROBINSON, 2008) em espectrofotômetro de microplaca (Epoch Microplate Sprectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA). A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando Coomassie Brilliant Blue G-250 e albumina de soro bovina (BSA) como padrão, com absorbância medida em 595 nm. Os níveis de atividade enzimática foram expressos em unidades internacionais (U), sendo 01 U igual a 01 µmol de substrato convertido em produto por minuto. A atividade enzimática específica foi expressa em U por miligramas de proteína (U.mg⁻¹).

2.3.1 Determinação da atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos e proteínas

As amostras de figado foram pesadas e homogeneizadas em 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), numa proporção de 1:5 (p v⁻¹) em banho de gelo, sonicadas por 15 segundos (máximo de 18 J) para ruptura das estruturas subcelulares e centrifugadas a 14.000 G a 4 °C por 10 minutos. O sobrenadante foi obtido para determinação da atividade enzimática.

A atividade da glicogênio fosforilase (GP, EC 2.4.1.1) foi determinada segundo Milligan (2003), como modificações propostas por Chang et al. (2007). O sistema de reação foi preparado em 45 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0) contendo, 0,34 mM de NADP+, 4 μ M de glicose-1, 6- bifosfato, 0,1 mM de EDTA, 15 mM de MgCl2, 1,6 U/mL de fosfoglicomutase, 12 U/mL de glicose-6-fosfato desidrogenase, 1,6 mM de 5' AMP e 0,2 mg/mL de glicogênio. A redução de NADP+ a NADPH foi acompanhada em absorbância de 340 nm.

A atividade da glicose-6-fosfatase (G6Pase, EC 3.1.3.9) foi medida conforme a metodologia estabelecida por (FATHI et al., 2002). O meio de reação foi preparado com 50mM de tampão imidazol (pH 7,4), 0,9 mM de EDTA, 13,25 mM de glicose-6-fosfato e 17,5 mM de NaOH. A reação foi interrompida com adição de solução de verde de malaquita (contendo molibdato de amônia, verde de malaquita e Tween) e o fosfato inorgânico formado foi medido em absorbância de 600 nm.

A atividade da hexoquinase (HK, EC 2.7.1.1) foi mensurada conforme Baldwin et al. (2007), com acompanhamento da redução de NAPD+ na presença de glicose-6-fosfato

desidrogenase (G6PDH), em sistema de reação contendo 50 mM de tampão imidazol (pH 7,4) 2 mM de glicose, 2 mM de ATP, 10 μ M de MgCl2, 0,4 mM de NADP+, 1 mM de ditiotreitol, 2 mM de KCl e 0,3 U/mL de G6PDH, em comprimento de onda de 340 nm.

A atividade da fosfofrutoquinase (PFK, EC 2.7.1.11) foi avaliada seguindo a metodologia de Baldwin et al. (2007), em sistema de reação com tampão Tris-HCl a 50 mM (pH 8,2), 10 mM de MgCl2, 1 mM de ATP, 0,15 mM de NAPH, 0,15 mM de NADH, 2 mM de AMP, 250 mM de KCl, 1 U/mL de glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), 1,2 U/mL de aldolase (ALD), 10 U/mL de triose fosfato isomerase (TPI) e 5 mM de frutose-6-fosfato, em comprimento de onda de 340nm.

A atividade da piruvato quinase (PK, EC 2.7.1.40) foi determinada a partir da oxidação de NADH em NAD+ durante a formação de lactato a partir do piruvato gerado pela desfosforilação de fosfoenolpiruvato (LEVESQUE et al., 2002), em meio de reação com tampão imidazol a 50 mM (pH 7,4), 10 mM de MgCl2, 25 mM de KCl, 150 μM de NADH, 5 mM de ADP, 5 mM de fosfoenolpiruvato (PEP) e 9 U/mL de lactato desidrogenase (LDH). A absorbância foi medida em 340 nm.

A atividade da lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) foi medida a partir da oxidação de NADH, decorrente da conversão de piruvato a lactato (THUESEN; MCCULLOUGH; CHILDRESS, 2005), em sistema de reação contendo tampão Tris HCl a 50 mM (pH 7,4), 1 mM de piruvato de sódio, 100 mM de KCl e 0,25 mM de NADH, com absorbância medida em 340 nm.

A atividade da citrato sintase (CS, EC 4.1.3.7) foi determinada a partir do complexo de CoA-SH com 5,5' – ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (SABOROWSKI; BUCHHOLZ, 2002). O meio de reação foi formado com 50 mM de tampão Tris HCl (pH 7,4), 100 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 200 μ M de DTNB, 200 μ M de acetil-SCoA e 500 μ M de oxaloacetato, com absorbância em 412 nm.

A atividade da malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1) foi verificada com a conversão de malato em oxaloacetato, com medição da oxidação de NADH (CHILDRESS; SOMERO, 1979), em meio de reação com tampão Tris-HCl a 50 mM (pH 7,4), 0,4 mM de oxaloacetato, 20 mM de MgCl2 e 150 µM de NADH, com absorbância medida em 340nm.

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) foi medida conforme Ciardiello, Camardella e Di Prisco (1995), com a redução de NADP+ com a oxidação de glicose-6-fosfato. O sistema de reação consistiu em 100 mM de tampão Tris-

HCl (pH7,4), 0,2 mM de NADP+ e 1 mM de glicose-6-fosfato, com leitura em absorbância de 340 nm.

A atividade da glutamato desidrogenase (GLDH, EC 1.4.1.3) foi determinada pela formação de NADPH, a partir da oxidação de NADP+, conforme Ciardiello et al. (2000), em sistema de reação contendo tampão Tris HCl a 100 mM (pH 7,4), 2 mM de NADP+, 0,8 mM de ADP e 40 mM de L-glutamato. A absorbância foi medida em 340 nm.

A atividade da aspartato aminotransferase / transaminase glutâmico-oxalacética (AST/TGO, EC 2.6.1.1), foi determinada a partir de kit comercial (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, referência: 352, MS 80022230149), com formação de glutamato e oxaloacetato, com absorbância medida em 505 nm.

A atividade da alanina aminotransferase / transaminase glutâmico pirúvica (ALT/TGP, EC 2.6.1.2), foi realizada a partir de kit comercial (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, referência 353, MS 80022230150), com formação de glutamato e piruvato, com absorbância medida em 505 nm.

2.3.2 Determinação da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante e glutationa reduzida (GSH)

As amostras de figado foram pesadas e homogeneizadas em 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), numa proporção de 1:5 (p v⁻¹) em banho de gelo e centrifugadas a 12.000 G a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi obtido para determinação dos níveis de marcadores de estresse oxidativo.

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada pelo método de Crouch et al. (1981), pela capacidade de inibição da redução de cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT) para azul formazan pelo superóxido (O2⁻), que é gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. O sistema de reação foi preparado com 0,05 mM de EDTA, 100 µM de NBT e 36,85 mM de cloreto de hidroxilamina em 91 mM de tampão carbonato de sódio (pH 10,2), com absorbância medida em 560 nm.

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pela degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água, em meio de reação contendo 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0), 30 mM de H_2O_2 . A redução da absorbância do H_2O_2 foi acompanhada em 240 nm (AEBI, 1984).

A atividade da glutationa peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) foi medida através da oxidação de NADPH. A enzima utiliza glutationa reduzida (GSH) para reduzir peróxido orgânico originando glutationa dissulfídica (GSSG). Esta última é reduzida pela enzima glutationa redutase (GR) utilizando elétrons doados pelo NADPH (WENDEL, 1981). O meio de reação continha 0,1 M de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 2 mM de azida sódica, 0,2 mM de NADPH, 2 mM de GSH, 1 U/mL de GR e 0,5 mM de H₂O₂, com absorbância medida em 340 nm.

A atividade da glutationa redutase (GR, EC 1.8.1.7) foi mensurada de acordo com a metodologia de Sies et al. (1979), na conversão de GSSG em GSH, em 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,6) em EDTA 5 mM, 0,5 mM de NADPH e 5 mM de GSSG. A absorbância foi medida em 340 nm.

A atividade da glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) foi avaliada após a conjugação do grupo tiol da GSH ao substrato de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), onde forma-se como produto da reação, o conjugado GS-DNB, conforme Keen, Habig e Jakoby (1976). O meio de reação foi formado com 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 6,5), 1,5 mM de GSH e 2 mM de CDNB. A absorbância foi medida em 340 nm.

Os níveis de glutationa reduzida e outros tióis foram determinados através da metodologia de Sedlak e Lindsay (1968). O método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com 0,16 mM do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), gerando um produto que absorve luz em 415 nm. Os valores foram expressos em nmol de tióis por mg de proteína.

2.3.3 Determinação de marcadores de danos oxidativos

Para a determinação da peroxidação lipídica (LPO), foi utilizado o método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Federici, Shaw e Handy (2007), com modificações. O método consiste na medição de um dos produtos finais da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), cuja reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) pode ser lida em absorbância de 535 nm. Os valores foram expressos em µmols de MDA por mg de proteína.

O dano oxidativo em proteínas (PCO) foi determinado pelo método de Levine et al. (1994), que consiste na reação das proteínas carboniladas com 2,4-dinitrofenilhidrazina

(DNPH), formando dinitrofenil hidrazonas que podem ser medidas em absorbância de 360 nm. Os resultados foram expressos em nmols de carbonilas por mg de proteína.

2.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados dos biomarcadores avaliados foram padronizados (z-transformados) e centralizados, considerando a média como 0 e o desvio padrão como 1 (SCHIELZETH, 2010). Para comparação estatística do efeito da variável tempo de exposição ou as possíveis interações entre as variáveis tempo de exposição e temperatura, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA 2 fatores), a um nível de 5% de significância. Em caso de evidência de efeito significativo do fator tempo ou interação entre tempo e temperatura, foi aplicado como teste post hoc o teste de Tukey, para cada variável resposta, a um nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS

Foram observadas 11 mortes (3,9 %) nos peixes durante os ensaios, ocorridas nos grupos controles (8 peixes) e tratamento à 15 °C (3 peixes). Os resultados da ANOVA (Tabelas 1 e 2) indicam os marcadores que sofreram alterações significativas entre as variáveis temperatura e tempo (controle *versus* tratamento ao longo dos períodos de exposição) e somente ao longo do tempo (controle e tratamento variaram juntos). Os níveis de atividade enzimática de todos os marcadores avaliados são apresentados nas Tabelas 3, 4, 5 e 6.

Foi observado que os peixes mantidos a 15 °C apresentaram baixa atividade natatória e pouca ingestão de alimentos, enquanto que os peixes a 31 °C apresentaram maior atividade natatória e se alimentaram imediatamente após a oferta de alimento, consumindoo totalmente.

3.1 EFEITOS DA BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS

Os níveis de atividade enzimática dos marcadores do metabolismo de carboidratos e proteínas para as temperaturas de 15 °C e 23 °C estão apresentados na Tabela 3. A redução da temperatura para 15 °C não afetou a atividade das enzimas GP, HK, PK, LDH, MDH e G6PDH (FIGURA 6 – A, B, C, D, E, F, respectivamente) no fígado dos animais, quando comparadas com as atividades encontradas nos grupos controles.

FIGURA 3 – BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO FÍGADO DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM O ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Legenda: GP-glicogênio fosforilase; HK-hexoquinase; PK-piruvato quinase; LDH- lactato desidrogenase; MDH-malato desidrogenase; G6PDH-Glicose-6-fosfato desidrogenase. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

A redução da temperatura para 15 °C aumentou a atividade da G6Pase hepática em 72 horas (33 %) e diminuiu em 12 horas (46 %) e 24 horas (47 %) (FIGURA 4).

FIGURA 4 – ATIVIDADE DA G6PASE DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

A redução da temperatura para 15 °C aumentou a atividade da PFK hepática em 2 horas (103%) e 48 horas (110 %) (FIGURA 5).

FIGURA 5 – ATIVIDADE DA PFK DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

A redução da temperatura para 15 °C aumentou a atividade da CS hepática em 12 horas (60 %) e 24 horas (88 %) (FIGURA 6).

FIGURA 6 – ATIVIDADE DA CS DO FÍGADO DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

Em relação ao metabolismo de proteínas, a redução da temperatura para 15 °C aumentou em 115 % a atividade da GLDH hepática em 2 horas (FIGURA 7).

FIGURA 7 – ATIVIDADE DA GLDH DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

A redução da temperatura para 15 °C não influenciou a atividade da AST hepática (FIGURA 8).



FIGURA 8 – ATIVIDADE DA AST DO FÍGADO DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA

Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

A redução da temperatura para 15 °C aumentou a atividade da ALT hepática em 6 horas (89 %), 12 horas (117 %) e 24 horas (92 %) e diminuiu 39 % em 72 horas (FIGURA 9).

FIGURA 9 – ATIVIDADE DA ALT DO FÍGADO DE *A. lacustris* EXPOSTO À CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

Em relação às variações na atividade enzimática ao longo do tempo nos experimentos à baixa temperatura, a atividade da GP aumentou em 6 horas a 15 °C e 23 °C, quando comparada com os demais tempos de exposição (FIGURA 3 - A). A G6Pase aumentou a atividade em 72 e 96 horas nos grupos a 23 °C, quando comparados com 2 e 24 horas e 2, 12 e 48 horas, respectivamente; nos grupos a 15 °C, diminuiu a atividade em 12 horas, quando comparada com 2, 6, 72 e 96 horas e aumentou a atividade em 72 e 96 horas, quando comparada com 2, 12, 24 e 48 horas (FIGURA 4). A HK não teve alteração de atividade ao longo do tempo (FIGURA 3 – B). A PFK aumentou a atividade no grupo a 15 °C em 2 horas de exposição, quando comparada aos demais horários, e diminuiu a atividade em 12 horas a 15 °C, em relação a 96 horas (FIGURA 5). A PK diminuiu a atividade em 6 horas à 15 °C e à 23 °C, quando comparada com todos os demais horários (FIGURA 3 - C). A LDH aumentou a atividade em 2 e 6 horas a 15 °C e 23 °C, quando comparada com todos os demais horários (FIGURA 3 – D). A CS aumentou a atividade em 6 e 12 horas no grupo a 23 °C, quando comparada com 48 horas e 48 e 72 horas, respectivamente; enquanto no grupo a 15 °C, aumentou a atividade em 6, 12 e 24 horas, quando comparada com 48, 72 e 96 horas, 2, 48, 72 e 96 horas e 48 e 96 horas, respectivamente (FIGURA 6). A MDH aumentou a atividade em 2 e 6 horas a 15 °C e 23 °C, quando comparadas com 12, 24, 48, 72 e 96 horas (FIGURA 3 – E). A atividade da G6PDH aumentou em 12 e 72 horas a 15 °C e 23 °C, em relação a 2, 6, 24, 48 e 72 horas e 6, 48 e 96 horas, respectivamente (FIGURA 3 - F). A GLDH aumentou a atividade em 2 horas a 23 °C, quando comparada com 6 e 48 horas, e a 15 °C, quando comparada com 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas (FIGURA 7). A AST diminuiu a atividade a 15 °C e 23 °C em 2, 6, 12 e 96 horas, quando comparadas com 24, 48 e 72 horas, 24, 48 e 72 horas, 24 e 48 horas e 24 horas, respectivamente (FIGURA 8). A ALT diminuiu a atividade em 6, 12 e 24 horas a 23 °C, quando comparadas com 72 e 96 horas, 72 horas e 72 horas, respectivamente, e aumentou a atividade a 15 °C em 12 horas, quando comparada com 2 e 72 horas (FIGURA 9).

Os níveis de atividade enzimática dos marcadores do metabolismo de carboidratos e proteínas para as temperaturas de 31 °C e 23 °C estão apresentados na Tabela 4. Em relação ao metabolismo de carboidratos, o aumento de temperatura para 31 °C não alterou a atividade das enzimas GP, HK, PFK, PK, MDH e G6PDH (FIGURA 10 – A, B, C, D, E, F, respectivamente), quando foram comparados os grupos a 31 °C com seus respectivos controles.

FIGURA 10 – BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS DO FÍGADO DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM O ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Legenda: GP-glicogênio fosforilase; HK-hexoquinase; PFK-fosfofrutoquinase; PK-piruvato quinase; MDHmalato desidrogenase; G6PDH-Glicose-6-fosfato desidrogenase. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Foi observado aumento da atividade da G6Pase em 12 horas (46 %) e diminuição de 56% em 24 horas (FIGURA 11), com o aumento de temperatura para 31 °C.

FIGURA 11 – ATIVIDADE DA G6PASE DO FÍGADO DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

O aumento de temperatura para 31 ° C provocou diminuição em 55 % da atividade da LDH em 48 horas (FIGURA 12).

FIGURA 12 – ATIVIDADE DA LDH DO FÍGADO DE A. lacustris EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

O aumento de temperatura para 31 °C provocou aumento na atividade da CS em 2 horas (69 %) e 12 horas (75 %) (FIGURA 13).





Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Em relação ao metabolismo de proteínas, o aumento da temperatura para 31 °C não afetou a atividade da GLDH, AST e ALT hepáticas (FIGURA 14 – A, B e C, respectivamente).

FIGURA 14 – BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS DO FÍGADO DE *A. lacustris* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Legenda: GLDH-glutamato desidrogenase; AST-aspartato aminotransferase; ALT-alanina aminotransferase. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

Em relação às variações na atividade enzimática ao longo do tempo nos experimentos à alta temperatura, a atividade da GP aumentou em 6 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 48 e 72 horas (FIGURA 10 – A). A atividade da G6Pase diminuiu em 24 horas a 31 °C, quando comparada com 6, 12, 72 e 96 horas, e diminuiu em 48 horas no grupo a 23 °C, quando comparada com 72 e 96 horas (FIGURA 11). A atividade da HK diminuiu em 72 e 96 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 2 e 48 horas (FIGURA 10 - B). A atividade da PFK aumentou em 2, 72 e 96 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 2, 24 e 48 horas, 12 e 24 horas e 6, 12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente (FIGURA 10 - C). A atividade da PK diminuiu em 2 e 6 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparadas com 12, 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente, e aumentou em 12 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 24, 72 e 96 horas (FIGURA 10 - D). A atividade da

LDH aumentou em 6 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com os demais horários e aumentou à 23 °C em 2 e 48 horas, quando comparada com 12, 24 e 72 horas (FIGURA 12). A atividade da CS aumentou em 6 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 2, 12, 24, 48, 72 e 96 horas; diminuiu em 48 horas, quando comparada com 12 e 96 horas e aumentou em 2 e 12 horas a 31 °C, quando comparada com 12 e 48 horas e 24, 48, 72 e 96 horas, respectivamente (FIGURA 13). A atividade da MDH aumentou em 2, 6 e 96 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparadas com 6, 12, 24, 48 e 72 horas, 12, 24, 48, 72 e 96 horas e 12, 24, 48 e 72 horas, respectivamente (FIGURA 10 - E). A atividade da G6PDH aumentou em 12 horas à 31 °C e 23 °C, quando comparados com os demais horários (FIGURA 10 - F). A atividade da GLDH aumentou em 12, 24 e 72 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 2, 6, 48 e 96 horas (FIGURA 14 - A). A atividade de AST diminuiu em 2, 6 e 12 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 12, 24 e 72 horas, 24 e 72 horas e 24 horas e aumentou em 24 e 72 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 12, 24 e 6 horas, 24 e 72 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 12, 24 e 72 horas, 24 e 72 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 12, 24 e 72 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 12, 24 e 72 horas, 24 e 72 horas e 24 horas e aumentou em 24 e 72 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 26, 6, 48 e 96 horas (FIGURA 14 - A). A atividade de ALT aumentou em 24 e 72 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 48 e 96 horas e 96 horas, respectivamente (FIGURA 14 - B). A atividade de ALT aumentou em 24 e 72 horas a 31 °C e 23 °C, quando comparada com 26 e 6 horas e 6 horas, respectivamente (FIGURA 14 - C).

3.2 EFEITOS DA BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS

Os níveis dos marcadores de defesa antioxidante de atividade enzimática, concentração de GSH e de danos oxidativos dos grupos submetidos a 15 e 23 °C constam na Tabela 5. A redução da temperatura para 15 °C não afetou a atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, GR e GST (FIGURA 15 – A, B, C, D e E, respectivamente), nem os níveis de GSH (FIGURA 15 – F), quando comparamos os grupos experimentais com seus respectivos controles.

FIGURA 15 – BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE HEPÁTICA DE *A. lacustris* QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM O ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Legenda: SOD-superóxido dismutase; CAT-catalase; GPx-glutationa peroxidase; GR-glutationa redutase; GST-Glutationa-S-transferase; GSH-glutationa reduzida. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Considerando os danos moleculares do estresse oxidativo, foi observada diminuição de 56 % da LPO em 48 horas e aumento de 600 % em 72 horas de exposição a 15 °C (FIGURA 16 – A) e não houve variação na PCO (FIGURA 16 – B).

B A 5 PCO (nmols de carbonilas/mg de proteína) - - - - - - - - + -LPO (µmols de MDA/mg de proteína) ab 0 2 6 12 24 48 72 96 2 12 24 48 6 72 96 Tempo (horas) Tempo (horas)

FIGURA 16 – BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM FÍGADO DE *A. lacustris* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA

Legenda: LPO-peroxidação lipídica e PCO-carbonilação proteica. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Em relação às variações nos marcadores ao longo do tempo nos experimentos de baixa temperatura, a atividade da SOD diminuiu em 24 horas a 15 °C e 23 °C, quando comparada com 12 e 96 horas (FIGURA 15 – A). A atividade da CAT aumentou em 2, 6, 12 e 24 horas a 15 °C e 23 °C, quando comparadas com 48, 72 e 96 horas (FIGURA 15 – B). A atividade da GPx aumentou em 48 e 96 horas a 15 °C e 23 °C quando comparadas com todos os demais tempos (FIGURA 15 – C). A atividade da GR diminuiu em 12 horas a 15 °C e 23 °C, em relação a 24 e 48 horas e aumentou em 24 horas a 15 °C e 23 °C, quando comparada com 72 e 96 horas (FIGURA 15 – D). A atividade da GST aumentou em 6 e 72 horas a 15 °C e 23 °C, em comparação com 2, 12, 24 e 48 horas e com 12 e 48 horas, respectivamente (FIGURA 15 – E). Os níveis de GSH aumentaram em 2 e 6 horas a 15 °C e 23 °C, em comparados com 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas e 24 e 72 horas, respectivamente (FIGURA 15 – F). Os níveis de LPO aumentaram em 48 horas a 23 °C, em

comparação com 6, 24 e 72 horas (FIGURA 16 - A). A PCO não sofreu alterações ao longo do tempo de exposição (FIGURA 16 - B).

Os níveis dos marcadores de defesa antioxidante de atividade enzimática, concentração de GSH e de danos oxidativos dos grupos submetidos a 31 e 23 °C constam na Tabela 6.

O aumento de temperatura para 31 °C provocou aumento na atividade da SOD em 96 horas (69 %) (FIGURA 17 – A) e a atividade da CAT diminuiu 34 % em 12 horas e aumentou 63 % em 72 horas (FIGURA 17 – B). Não houve alteração na atividade da enzima GPx (FIGURA 17 – C). A atividade da GR diminuiu em 25 % em 24 horas (FIGURA 17 – D) e da GST aumentou em 48 horas (182 %) e 72 horas (69 %) (FIGURA 17 – E). Já os níveis de GSH aumentaram em 24 horas (116 %) e 72 horas (310 %) (FIGURA 17 – F).

FIGURA 17 – BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE HEPÁTICA DE A. lacustris SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Legenda: SOD-superóxido dismutase; CAT-catalase; GPx-glutationa peroxidase; GR-glutationa redutase; GST-Glutationa-S-transferase; GSH-glutationa reduzida. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Em relação aos danos oxidativos, a alta temperatura não alterou a LPO (FIGURA 18 – A), mas houve aumento de 91 % nos níveis de PCO em 96 horas (FIGURA 18 – B).



FIGURA 18 – BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM FÍGADO DE *A. lacustris* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA

Legenda: LPO-peroxidação lipídica e PCO-carbonilação proteica. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Em relação às alterações nos marcadores ao longo do tempo nos experimentos de alta temperatura, a atividade da SOD aumentou em 96 horas a 31 °C em relação aos demais tempos (FIGURA 17 – A) A atividade na CAT não foi alterada ao longo do tempo (FIGURA 17 – B), enquanto que a atividade da GPx aumentou em 96 horas a 31 °C e 23 °C, em comparação com os demais tempos (FIGURA 17 – C). Já os níveis de GR aumentaram em 12 horas a 31 °C, quando comparados com 96 horas e aumentaram em 24 horas a 23 °C, quando comparados com 2, 6, 48, 72 e 96 horas (FIGURA 17 – D). A atividade da GST diminuiu em 12 horas a 31°C, quando comparada com 6, 48, 72 e 96 horas, e aumentou em 72 horas a 31 °C, quando comparada a 2 e 24 horas (FIGURA 17 – E). Os níveis de GSH diminuíram em 24, 48 e 72 horas a 23 °C, quando comparados com 6 e 12 horas, 12 horas e 2, 6, 12 e 96 horas, respectivamente (FIGURA 17 – F). A LPO diminuiu em 72 horas a 31 °C e 23 °C em relação a 24 horas (FIGURA 18 – A) e a PCO aumentou em 96 horas a 31 °C, em relação a 2, 6, 24, 48 e 72 horas (FIGURA 181 – B).

O Quadro 1 apresenta um resumo de todos os resultados dos biomarcadores avaliados no figado de *A. lacustris*, para baixa e alta temperatura.

TABELA 1: RES CARBOIDRATO	ULTADC S E PRO'	OS DA	ANOVA AS DO FÍG	PARA OS E ADO DE As	FEITOS D _i tyanax lacu	A TEMPER. stris.	ATURA E	TEMPOS D	E EXPOSIÇ	CÃO NOS B	IOMARCA	DORES DC	METABO	LISMO DE
			GP	G6Pase	HK	PFK	PK	LDH	CS	MDH	G6PDH	GLDH	AST	ALT
E	1500	Ч	0,07	4,27	0,93	3,12	1,57	2,04	2,47	1,47	1,09	4,31	1,38	5,14
l emperatura v	C1	d	0,99	<0,001*	0,47	0,007*	0,16	0,07	0,02*	0, 19	0,37	<0,001*	0,22	<0,001*
Temno	2100	Ч	0,93	2,98	1,37	0,94	0,92	3,51	3,38	0,47	0,90	1,03	0,29	1,91
	<u>ک اد</u>	d	0,48	0,009*	0,23	0,46	0,47	0,003*	$0,004^{*}$	0,83	0,49	0,40	0,94	0,08
	0021	Ч	11,19	11,40	2,30	14,09	5,75	50,35	16,95	18,47	12,74	16,23	8,69	3,00
Tommo	C1	d	<0,001*	<0,001*	0,05	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,009*
nd ma t	2100	Ч	3,71	6,82	4,37	11,94	16,91	43,95	29,77	37,13	16,22	14,79	12,46	3,82
		d	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,001*
Legenda: GP-glic	ogênio fo	sforila	se; G6Pase	-glicose 6-fo	sfatase; HK	-hexoquinas	e; PFK-fosf	ofrutoquinas	e; PK-piruv	ato quinase;	LDH- lactat	o desidroge	nase; CS-cit	rato sintase;
MDH-malato desi	drogenas	se; G6ł	DH-Glico	se-6-fosfato d	lesidrogenas	ie; GLDH-gl	lutamato des	sidrogenase;	AST-aspart	ato aminotra	nsferase e A	LT-alanina	aminotransf	erase. Nota:
Asteriscos (*) ind	icam vari	iação e	statisticam	ente significa	tiva ($p \leq 0, 0$)5).								

FIGADO DE Astyanax I	acustris.									
			SOD	CAT	GPx	GR	GST	GSH	LPO	PCO
Ē	1500	F	1,53	1,07	1,46	1,13	0,92	1,65	2,80	0,97
l'emperatura	רו רו	d	0,17	0,38	0,20	0,35	0,48	1, 14	0,015*	0,45
Temno	2100	Н	2,82	2,50	1,70	2,19	3,02	3,83	1,40	2,31
	J_10	d	$0,014^{*}$	$0,026^{*}$	0,13	0,049*	0,009*	0,002*	0,22	0,039*
	1500	Н	3,39	4,15	30,07	6,66	6,34	15,90	2,47	2,04
Lound T	רו רו	d	0,004*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	<0,001*	0,029*	0,07
r empo	3100	Ы	7,84	0,65	7,12	7,97	3,95	3,50	2,77	3,87
	21 C	d	<0,001*	0,69	<0,001*	<0,001*	0,001*	0,003*	0,016*	0,001*
Legenda: SOD-superóxio	do dismuta	ase; C/	AT-catalase; GP	x-glutationa pero.	xidase; GR-glutati	iona redutase; GS	T-Glutationa-S-tra	ansferase; GSH-gl	utationa reduzida	: LPO-peroxidação

lipídica e PCO-carbonilação proteica. Nota: Asteriscos (*) indicam variação estatisticamente significativa ($p \le 0.05$).

$ \begin{array}{c c c c c c c c c c c c c c c c c c c $	TABELA 3:	: ATIVID	ADE DAS ENZIMAS	DO METABOLISMC	DE CARBOIDRATC	DS E PROTEÍNAS D (O FÍGADO DE <i>Astyar</i>	nax lacustris, EM TEM	PERATURA DE
GP 23 $0.62\pm 0.16^{\circ}$ $2.93\pm 0.85^{\circ}$ $0.33\pm 0.05^{\circ}$ $0.63\pm 0.73\pm 0.08^{\circ}$ $0.55\pm 0.06^{\circ}$ $0.77\pm 0.08^{\circ}$ $0.30\pm 0.65^{\circ}$ $0.66\pm 0.11^{\circ}$ $0.88\pm 0.16^{\circ}$ $0.65\pm 1.221.6^{\circ}$ $0.57\pm 0.72^{\circ}$ $0.33\pm 0.1232.2^{\circ}$ 4.85_{\circ} FS $3.93\pm 0.163^{\circ}$ $3.03\pm 0.55^{\circ}$ $3.03\pm 0.55^{\circ}$ $2.65, 9\pm 3.95^{\circ}$ $2.65, 9\pm 3.25^{\circ}$ $0.66\pm 0.14^{\circ}$ $0.88\pm 0.16^{\circ}$ $3.13\pm 0.20^{\circ}$ 4.85_{\circ} HK 23 $3.61\pm 0.8^{\circ}$ $3.10\pm 0.58^{\circ}$ $2.65\pm 0.24^{\circ}$ $3.33\pm 0.32^{\circ}$ 4.85_{\circ} 4.85_{\circ} FK 23 $3.56\pm 0.16^{\circ}$ $3.19\pm 0.58^{\circ}$ $2.95\pm 0.54^{\circ}$ $3.33\pm 0.33^{\circ}$ $3.33\pm 0.33^{\circ}$ $3.33\pm 0.33^{\circ}$ $3.33\pm 0.33^{\circ}$ $3.33\pm 0.25^{\circ}$		T(°C)	2h	6h	12h	24h	48h	72h	96
15 $0_47\pm0.08^{\circ}$ $3.03\pm0.65^{\circ}$ $0_6\pm0.1^{\circ}$ $0.88\pm0.16^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.69\pm0.16^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.69\pm0.12^{\circ}$ $0.69\pm0.12^{\circ}$ $0.69\pm0.12^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ $0.69\pm0.12^{\circ}$ $0.69\pm0.12^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ $0.7\pm0.2^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ $0.88\pm0.13^{\circ}$ $0.98\pm0.12^{\circ}$ $0.98\pm0.12^{\circ}$ $0.98\pm0.12^{\circ}$ $0.98\pm0.12^{\circ}$ $0.98\pm0.12^{\circ}$ $0.98\pm0.12^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ $0.88\pm0.12^{\circ}$ 0.88 ± 0.1	GP	23	$0,62{\pm}0,16~^{\rm a}$	$2,93{\pm}0,85$ ^b	$0,33{\pm}0,05~^{\rm a}$	$0,77{\pm}0,08~^{ m a}$	$1,06{\pm}0,43~^{\mathrm{a}}$	$0.55{\pm}0.06~^{\mathrm{a}}$	0,73±0
$ \begin{array}{cccccccccccccccccccccccccccccccccccc$		15	$0,47{\pm}0,08~^{ m a}$	$3,03{\pm}0,65$ ^b	$0,6{\pm}0,1~^{\rm a}$	$0,88{\pm}0,16~^{\mathrm{a}}$	$0,93{\pm}0,18~^{\rm a}$	$0,7{\pm}0,2$ ^a	$0,69\pm 0$
15 295,7±37,5 ab 330,0±32,9 ab 142,8±29,4 ds 177,4±41,8 ads 251,6±23,9 ad 463,3±31,4 cs 422,0±3 HK 23 3,61±0,8 3,19±0,58 2,35±0,14 2,54±0,2 3,39±0,49 3,13±0,29 3,13±0,29 3,21±1 FK 23 5,43±0,29 4,4±0,65 2,59±0,58 2,35±0,14 2,54±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,13±0,29 3,12±0,29 3,21±0 FK 23 13,7±4,86 4,4±0,815 1,75±0,24 2,54±0,23 0,3±4,45 1,1,12±1,76 8,89±0,58 ab 0,35±0,19 8,75±0,24 FK 23 28,03±4,35 a 6,05±0,54 b 11,88±1,45 a 11,12±1,76 a 8,89±0,55 ab 2,74±0,49 c 8,75±0,24 FK 23 24,64,53 ba 0,35±0,013 b 0,35±0,013 b 0,35±0,03 b 0,35±0,02 b	G6Pase	23	$197,3\pm37,8$ ^a	286,7±49,9 ^{ab}	$265,9\pm 35,2$ ^{ab}	$334,3\pm 35,2$ ^{abc}	$256,1\pm 21,6$ ^{ab}	348,6±32,2 ^{bc}	485,6±5
HK 23 3,61±0,8 3,19±0,58 2,33±0,13 3,99±0,49 3,13±0,29 3,21±0 FK 23 3,61±1,2 ^a 3,19±0,57 2,92±0,28 3,3±0,3 4,13±0,56 3,0±0,22 2,73±0 FK 23 5,61±1,2 ^a 2,84±0,49 ^{ab} 1,75±0,2 ^b 2,61±0,28 3,0±0,23 5,0±0,22 2,73±0 FK 23 5,11,12 ^{ab} 2,84±0,49 ^{ab} 1,75±0,2 ^b 2,61±0,28 3,0±0,23 5,0±0,22 2,73±0 FK 23 13,7±3,86 ^a 4,440,81 ^b 1,3,7±0,94 1,3,2±1,03 9,08±0,01 ^a 8,79±1,03 FK 25 23 4,41-0,81 ^b 1,1,2±1,16 ^a 8,49±0,65 ^{ab} 12,95±1,77 8,46±0,56 ^{bb} 3,25±0,49 ^c 8,47±0,49 ^c 8,77±0,49 ^c 8,77±0,49 ^c 8,77±0,49 ^c 8,77±0,49 ^c 3,25±0,40 ^c 3,54±0,49 ^c 3,25±0,40 ^c 3,54±0,49 ^c 3,25±0,40 ^c 3,54±0,49 ^c 3,54±0,49 ^c 8,74±0,49 ^c 8,77±0,49 ^c 8,77±0,49 ^c 8,75±0,40 ^c 8,75±0,40 ^c 8,75±0,40 ^c 8,75±0,40 ^c 8,75±0,40 ^c		15	295,7±37,5 ^{ab}	330,0±32,9 ^{abc}	$142,8\pm 29,4$ d*	$177,4\pm41,8$ ^{ad*}	251,6±23,9 ^{ad}	$463,3\pm31,4$ °*	$422,0\pm 3$
15 $3,43\pm0.29$ $4,49\pm0.57$ $2,92\pm0.28$ $3,3\pm0.3$ $4,13\pm0.56$ $3,0\pm0.32$ $2,73\pm0$ PFK 23 $5,61\pm1.2^{a}$ $2,84\pm0.49^{ab}$ $1,75\pm0.2^{b}$ $2,0\pm4.0,23^{ab}$ $3,87\pm0.2^{ab}$ $4,83\pm0.$ PK 23 $5,61\pm1.2^{a}$ $2,84\pm0.49^{ab}$ $1,75\pm0.2^{b}$ $2,0\pm4.0,23^{ab}$ $3,87\pm0.2^{ab}$ $4,83\pm0.6^{ab}$ PK 23 $13,7\pm0.6^{ab}$ $3,34\pm0.35^{bb}$ $2,34\pm0.35^{bb}$ $2,04\pm0.57^{bb}$ $6,05\pm0.7^{bb}$ $6,05\pm0.7^{bb}$ $6,05\pm0.7^{bb}$ $4,83\pm0.6^{bb}$ PK 23 $2,04\pm0.75^{ab}$ $3,34\pm0.55^{ab}$ $3,34\pm0.23^{ab}$ $3,84\pm0.40^{cb}$ $1,2,32\pm1.1,7^{ab}$ $8,47\pm0.49^{ab}$ $1,2,52\pm1,42^{ab}$ $1,2,52\pm1,42^{ab}$ $2,25\pm0.7^{ab}$ $2,26\pm0.29^{ab}$ $2,32\pm0.2^{ab}$ 2	HK	23	$3,61{\pm}0,8$	$3,19\pm 0,58$	$2,35{\pm}0,14$	$2,54{\pm}0,2$	$3,39{\pm}0,49$	$3,13{\pm}0,29$	$3,21\pm0$
PFK 23 5,61±1,2 a 2,84±0,49 ab 1,75±0,2 b 2,27±0,21 bb 3,87±0,2 ab 4,83±0,35 bc PK 15 11,41±2,02 a* 3,34±0,35 bc 2,08±0,35 bc 2,08±0,55 bc 5,49±1,1 bc* 4,46±0,57 bc 6,05±0,3 bc PK 23 13,7±3,86 a 4,440,81 b 13,37±0,94 a 13,22±1,03 a 9,08±0,57 bc 6,05±0,39 bc 5,09±1,35 ab 2,742±0,49 c 8,742±0,49 c 8,755±0,25 bc 8,60±0,06 c 9,35±0,03 c 9,35±0,03 c 9,35±0,03 c 9,35±0,03 c 9,35±0,03 c 9,35±0,03 c 9,35±0,02 bc 0,32±0,03 bc 0,32±0,02 bc 0,46±0,55 bc 8,60±0,06 c 9,35±0,03 bc 0,32±0,02 bc 0,46±0,55 bc 0,46±0,55 bc 0,46±0,55 bc 0,46±0,55 bc 0,55±0,22 bc 0,32±0,02 bc 0,32±0,03 bc 0,32±0,02 bc 0,45±0,33 cc 0,32±0,02 bc		15	$3,43\pm 0,29$	$4,49\pm 0,57$	$2,92{\pm}0,28$	$3, 3\pm 0, 3$	$4,13\pm 0,56$	$3,0{\pm}0,32$	$2,73\pm0,$
15 11,41±2,02 a* 3,34±0,35 b* 2,08±0,3 b* 2,04±0,25 b* 5,49±1,1 b** 4,46±0,57 b* 6,05±0; PK 23 13,7±3,86 a 4,4±0,81 b* 13,37±0,94 a* 13,32±1,03 a* 9,08±0,62 a* 10,8±0,91 a* 8,79±1; I5 9,04±0,55 a 6,25±0,54 b* 11,88±1,45 a* 11,12±1,76 a* 8,89±1,25 a* 12,52±1,42 a* 12,92±1, LDH 23 28,03±4,35 a* 6,05±0;49 b* 11,12±1,76 a* 8,89±1,25 a* 12,42±0,49 c* 8,47±0; I5 25,34±2,32 a* 40,64±2,47 b* 8,48±0,68 c* 6,48±0,49 c* 12,43±1,77 c* 8,60±0,66 c* 9,35±0;03 I5 2,53±1,14 a* 5,3±1,02 a* 5,9±40,33 a* 3,49±0,49 c* 1,77±0,33 c* 3,49±0,49 c* 3,35±0,02 MDH 23 0,98±0,11 a* 8,48±0,05 b* 0,35±0,03 b* 0,35±0,02 b* 0,35±0,03 b* 0,35±0,02 b* 0,32±0,02 b* 0,32±0,02 b* 0,32±0,02 b* 0,32±0,02 b* </th <th>PFK</th> <th>23</th> <th>$5,61{\pm}1,2~^{\rm a}$</th> <th>$2,84{\pm}0,49~^{ m ab}$</th> <th>$1,75{\pm}0,2^{-6}$</th> <th>$2,27{\pm}0,21$ ^{ab}</th> <th>$2,61{\pm}0,33$ ^{ab}</th> <th>$3,87{\pm}0,2$ ^{ab}</th> <th>4,83±0,</th>	PFK	23	$5,61{\pm}1,2~^{\rm a}$	$2,84{\pm}0,49~^{ m ab}$	$1,75{\pm}0,2^{-6}$	$2,27{\pm}0,21$ ^{ab}	$2,61{\pm}0,33$ ^{ab}	$3,87{\pm}0,2$ ^{ab}	4,83±0,
PK 23 $13,7\pm3,86^a$ $4,4\pm0,81^b$ $13,37\pm0,94^a$ $13,32\pm1,03^a$ $9,08\pm0,62^{ab}$ $10,8\pm0,91^a$ $8,79\pm1,13^a$ 15 $9,04\pm0,55^a$ $6,25\pm0,54^b$ $11,88\pm1,45^a$ $11,12\pm1,76^a$ $8,89\pm1,25^{ab}$ $12,52\pm1,42^a$ $12,92\pm1,13^a$ 15 $2,03\pm4,45^b$ $9,65\pm0,74^c$ $8,41\pm0,49^c$ $12,55\pm1,42^a$ $12,52\pm1,42^a$ $12,52\pm1,42^a$ $12,92\pm1,64^a$ 15 $2,53\pm2,3^a$ $3,03\pm4,45^b$ $9,65\pm0,93^a$ $3,44\pm0,49^c$ $12,75\pm0,39^c$ $3,26\pm0,35=0,640^a$ 15 $4,62\pm1,14^{abc}$ $5,3\pm1,02^{abb}$ $9,55\pm0,3^a$ $9,55\pm0,3^a$ $9,35\pm0,01^a$ $9,35\pm0,01^a$ $9,35\pm0,01^a$ $9,46\pm0,01^a$ $8,8\pm1,6^a$ MDH 23 $0,98\pm0,05^a$ $0,95\pm0,05^b$ $0,32\pm0,02^b$ $0,32\pm0,04^b$ $0,35\pm0,03^a$ MDH 23 $0,98\pm0,05^a$ $0,38\pm0,05^b$ $0,32\pm0,02^b$ $0,32\pm0,02^b$ $0,32\pm0,02^b$ $0,32\pm0,04^b$ $0,55\pm0,03^a$ MDH 23 $0,98\pm0,05^a$ $0,38\pm0,05^a$ $0,32\pm0,013^b$ $0,32\pm0,014^b$ $0,35\pm0,$		15	$11,41\pm 2,02$ ^a *	$3,34{\pm}0,35$ ^{bc}	$2,08{\pm}0,3$ ^b	$2,04{\pm}0,25~^{ m bc}$	$5,49\pm 1,1^{bc*}$	$4,46{\pm}0,57~^{ m bc}$	$6,05\pm 0,8$
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	PK	23	$13,7\pm 3,86$ ^a	$4,4{\pm}0,81$ ^b	$13,37\pm0,94$ ^a	13,22±1,03 ^a	$9,08{\pm}0,62~^{ m ab}$	$10,8{\pm}0,91$ ^a	$8,79{\pm}1,5$
LDH 23 $28,03\pm4,36^a$ $30,3\pm4,45^b$ $9,65\pm0,74^c$ $8,16\pm0,72^c$ $12,76\pm0,89^c$ $7,42\pm0,49^c$ $8,47\pm0,56^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32+0,76^{-10},32,40,76^{-10},32+0,76^{-1$		15	9,04±0,55 ^a	$6,25\pm0,54$ b	$11,88\pm1,45$ ^a	$11,12\pm 1,76^{a}$	$8,89{\pm}1,25~^{ m ab}$	12,52±1,42 ^a	$12,92\pm 1,$
15 25,34±2,32 40,64±2,47 ^b 8,48±0,68 ^c 6,48±0,49 ^c 12,45±1,77 ^c 8,60±0,66 ^c 9,35±0,3 CS 23 4,62±1,14 ^{abc} 5,3±1,02 ^{ab} 5,94±0,93 ^a 3,49±0,27 ^{abc} 2,17±0,22 ^c 2,56±0,29 ^{bc} 3,26±0,3 I5 4,63±0,56 ^{abc} 6,89±0,53 ^{ad} 9,55±0,8 ^{d*} 6,56±1,18 ^{abd*} 1,77±0,33 ^c 3,49±0,4 ^{bc} 3,26±0,29 ^{bc} 3,26±0,3 MDH 23 0,98±0,21 ^a 0,95±0,14 ^a 0,38±0,05 ^b 0,35±0,03 ^b 0,35±0,03 ^b 0,32±0,02 ^b 0,46±0,35±0,33 ^c MDH 23 0,98±0,21 ^a 0,95±0,14 ^a 0,38±0,05 ^b 0,35±0,03 ^b 0,33±0,04 ^b 0,35±0,02 ^b 0,46±0,33±0,33±0,32±0,04 ^b 0,55±0,03 ^b 0,55±0,03 ^b 0,46±0,25 ^b 0,45±0,25 ^b 0,46±0,25 ^b 0,55±0,03 ^b 0,33±0,04 ^b 0,55±0,03 ^b	LDH	23	$28,03\pm4,36$ ^a	$30,3\pm4,45^{\rm b}$	$9,65{\pm}0,74~^{ m c}$	$8,16{\pm}0,72~^{ m c}$	$12,76{\pm}0,89~^{ m c}$	$7,42{\pm}0,49~^{ m c}$	$8,47\pm0,5$
CS 23 $4,62\pm1,14^{abc}$ $5,3\pm1,02^{abc}$ $5,94\pm0,93^{a}$ $3,49\pm0,27^{abc}$ $2,17\pm0,22^{c}$ $2,56\pm0,29^{bc}$ $3,26\pm0,3$ 15 $4,63\pm0,56^{abc}$ $6,89\pm0,53^{ad}$ $9,55\pm0,8^{abc}$ $9,55\pm0,8^{abc}$ $3,24\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,02^{b}$ $0,46\pm0,32\pm0,04^{bc}$ $3,26\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,02^{b}$ $0,46\pm0,07^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,46\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,53\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,53\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,03^{b}$ $0,52\pm0,02^{b}$ $0,55\pm0,02^{b}$ $0,55\pm0,02^{b}$ $0,55\pm0,02^{b}$ $0,55\pm0,02^{b}$ $0,52\pm0,02^{b}$ $0,52\pm0,02^{b}$ $0,52\pm0,02^{b}$ $0,52\pm0,02^{b}$ $0,52\pm0,02^{b}$ $0,52\pm0,02^{b}$ $0,52\pm1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ $0,52+1,04^{b}$ </th <th></th> <td>15</td> <td>25,34±2,32^a</td> <td>$40,64\pm 2,47^{\rm b}$</td> <td>$8,48{\pm}0,68~^{ m c}$</td> <td>$6,48{\pm}0,49~{ m c}$</td> <td>$12,45\pm1,77$ °</td> <td>$8,60{\pm}0,66~^{\circ}$</td> <td>$9,35\pm 0,7$</td>		15	25,34±2,32 ^a	$40,64\pm 2,47^{\rm b}$	$8,48{\pm}0,68~^{ m c}$	$6,48{\pm}0,49~{ m c}$	$12,45\pm1,77$ °	$8,60{\pm}0,66~^{\circ}$	$9,35\pm 0,7$
15 $4,63\pm0,56$ $6,89\pm0,53$ $9,55\pm0,8$ $6,56\pm1,18$ abd $1,77\pm0,33$ $3,49\pm0,4^{bc}$ $3,26\pm0,3$ MDH 23 $0,98\pm0,21$ $0,95\pm0,14^{a}$ $0,38\pm0,05^{b}$ $0,33\pm0,02^{b}$ $0,32\pm0,02^{b}$ $0,46\pm0,$ 15 $0,67\pm0,03^{a}$ $1,06\pm0,07^{a}$ $0,4\pm0,07^{b}$ $0,32\pm0,02^{b}$ $0,33\pm0,04^{b}$ $0,32\pm0,02^{b}$ $0,46\pm0,$ G6PDH 23 $22,22,6\pm7,79^{ab}$ $11,34\pm1,93^{a}$ $50,87\pm11,33^{c}$ $28,95\pm9,16^{ab}$ $4,81\pm0,39^{a}$ $52,77\pm16,95^{bc}$ $6,02\pm1,$ G6PDH 23 $22,205\pm3,63^{ab}$ $1,34\pm1,93^{a}$ $82,02\pm7,78^{c}$ $24,0\pm8,94^{a}$ $45,43\pm17,25^{bc}$ $8,8\pm1,6$ GLDH 23 $3,74\pm0,89^{a}$ $1,05\pm0,23^{b}$ $2,75\pm0,27^{ab}$ $8,8\pm1,6$ $6,2\pm3,0,03^{b}$ $6,69\pm0,09^{c}$ $6,02\pm1,1,23^{b}$ AST 23 $34,96\pm2,22^{a}$ $1,8,55\pm2,33^{a}$ $82,02\pm7,78^{b}$ $2,23\pm0,14^{a}$ $6,73\pm1,65^{bc}$ $6,9\pm0,02^{b}$ $6,9\pm0,04^{b}$ $6,73\pm1,6,95^{bc}$ $6,9\pm0\pm0,02^{b}$ $6,74\pm1,67^{b}$ $6,74\pm1,67^{b}$ <	CS	23	$4,62\pm1,14$ ^{abc}	$5,3{\pm}1,02~^{ m ab}$	$5,94{\pm}0,93~^{ m a}$	$3,49{\pm}0,27$ ^{abc}	$2,17{\pm}0,22~^{ m c}$	2,56±0,29 ^{bc}	$3,26\pm0,3$
MDH 23 $0,98\pm0,21^{a}$ $0,95\pm0,14^{a}$ $0,38\pm0,07^{b}$ $0,35\pm0,03^{b}$ $0,32\pm0,02^{b}$ $0,43\pm0,04^{b}$ $0,32\pm0,04^{b}$ $0,46\pm0,03\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,04^{b}$ $0,52\pm1,12^{b}$ <		15	$4,63{\pm}0,56$ ^{abc}	6,89±0,53 ^{ad}	9,55±0,8 ^d *	$6,56\pm1,18$ abd*	$1,77{\pm}0,33~{ m c}$	3,49±0,4 ^{bc}	$3,26\pm 0,3$
15 $0,67\pm0,03^{a}$ $1,06\pm0,07^{a}$ $0,4\pm0,07^{b}$ $0,32\pm0,02^{b}$ $0,43\pm0,04^{b}$ $0,39\pm0,04^{b}$ $0,55\pm0,02\pm1,123^{a}$ G6PDH 23 $22,256\pm7,79^{ab}$ $11,34\pm1,93^{a}$ $50,87\pm11,33^{c}$ $28,95\pm9,16^{ab}$ $4,81\pm0,39^{a}$ $52,7\pm16,95^{bc}$ $6,02\pm1,135^{c}$ $8,8\pm1,65^{c}$ $6,02\pm1,135^{c}$ $8,8\pm1,65^{c}$ $6,02\pm1,135^{c}$ $24,04\pm8,94^{a}$ $45,43\pm17,25^{bc}$ $8,8\pm1,66^{c}$ $3,3\pm0,49^{c}$ $2,75\pm0,23^{b}$ $2,75\pm0,27^{ab}$ $2,8,3\pm1,6^{c}$ $2,0,0\pm0,09^{c}$ $1,83\pm0,48^{ab}$ $3,3\pm0,42^{c}$ $2,09\pm0,09^{c}$ $1,83\pm0,48^{ab}$ $3,3\pm0,42^{c}$ $2,09\pm0,09^{c}$ $1,8,3\pm0,48^{ab}$ $3,3\pm0,42^{c}$ $2,09\pm0,09^{c}$ $1,24\pm0,45^{bc}$ $2,09\pm0,02^{c}$ $3,2\pm0,42^{c}$ $3,2\pm0,42^{c}$ $3,2+1,42^{c}$ $3,2+1,42^{c}$ $3,2+1,42^{c}$ $3,2+1,42^{c}$ $3,2+1,42^{c}$ $3,2+1,42^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $4,2,5\pm2,25^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2+2,23^{c}$ $3,2,2,2+2,2,23^{c}$ $3,2,2+2,2,23^{c}$	MDH	23	$0,98{\pm}0,21~^{\rm a}$	$0,95{\pm}0,14~^{\mathrm{a}}$	$0,38{\pm}0,05$ ^b	$0,35{\pm}0,03$ ^b	$0,35\pm0,03$ ^b	$0,32\pm0,02^{-b}$	$0,46\pm 0,$
G6PDH 2322,26±7,79 ab11,34±1,93 ab50,87±11,33 cb28,95±9,16 ab4,81±0,39 ab52,7±16,95 bc6,02±1,35 bc1522,05±3,63 ab18,55±3,38 ab82,02±7,78 cb34,71±11,15 ab24,0±8,94 ab45,43±17,25 bc8,8±1,61523,74±0,89 ab1,05±0,23 bb2,75±0,27 ab2,23±0,14 ab0,59±0,08 bb1,83±0,48 ab3,3±0,42158,03±1,39 a*1,71±0,36 bc36,41±2,44 ab45,34±4,41 cb45,56±3,66 cd47,34±1,65 bcd43,01±1,95AST2334,96±2,22 ab34,9±1,83 ab38,75±3,04 ab54,04±3,03 cb47,94±2,97 cd42,62±2,79 bcd35,44±2,75AST2326,24±3,41 abc14,25±2,25 ab18,6±3,02 ab19,26±3,02 ab29,98±3,56 abc37,75±5,04 cb37,99±5,75ALT2326,24±3,41 abc14,25±2,25 ab18,6±3,02 ab19,26±3,02 ab29,98±3,56 abc37,75±5,04 cb37,99±5,75ALT2322,82±2,25 ab26,91±1,88 abs40,34±5,88 bs36,97±6,08 abs36,97±6,08 abs37,75±5,04 cb37,99±5,75		15	$0,67{\pm}0,03~^{\mathrm{a}}$	$1,06{\pm}0,07~^{\rm a}$	$0,4{\pm}0,07$ ^b	$0,32\pm0,02^{-b}$	$0,43{\pm}0,04~^{ m b}$	$0,39{\pm}0,04$ ^b	$0,55\pm 0,$
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	G6PDH	23	22,26±7,79 ^{ab}	$11,34\pm 1,93^{a}$	$50,87\pm11,33$ °	$28,95\pm9,16$ ^{ab}	$4,81{\pm}0,39~^{ m a}$	52,7±16,95 ^{bc}	$6,02\pm 1,$
GLDH 23 3,74±0,89 a 1,05±0,23 b 2,75±0,27 ab 2,23±0,14 ab 0,59±0,08 b 1,83±0,48 ab 3,3±0,4 15 8,03±1,39 a* 1,71±0,36 bc 3,38±0,29 b 4,15±0,58 b 0,69±0,09 c 1,24±0,45 bc 2,09±0,2 AST 23 34,96±2,22 a 34,05±2,92 a 36,41±2,44 ab 45,34±4,41 c 45,56±3,66 cd 47,34±1,65 bcd 43,01±1,9 AST 23 35,16±1,42 a 34,9±1,83 a 38,75±3,04 ab 54,04±3,03 c 47,94±2,97 cd 42,62±2,79 bcd 35,44±2,7 ALT 23 26,24±3,41 abc 14,25±2,25 a 18,6±3,02 ab 19,26±3,02 ab 29,98±3,56 abc 37,75±5,04 c 37,99±5,799±5,799±5,799±5,79±5,79±5,794±5,785 ab+ 37,75±5,04 c 37,99±5,799±5,79±5,79±5,79±5,704 c 37,75±5,04 c 37,99±5,79±5,79±5,70±5,730±5,755 a+ 35,39±5,756±5,70±5,755,70±5,755,70±6,755,70±6,755,70±6,755,70±6,755,70±6,755,70±6,755,70±6,755,70±5,755,70±6,755,70±6,755,70±5,750±5,70±5,756,70±5,756,70±5,756,70±5,756,70±5,756,756,756,756,756,756,756,756,756,75		15	22,05±3,63 ^{ab}	18,55±3,38 ^a	82,02±7,78 °	$34,71\pm11,15$ ^{ab}	$24,0{\pm}8,94~^{ m a}$	$45,43\pm17,25$ bc	$8,8{\pm}1,6$
$ \begin{array}{c ccccccccccccccccccccccccccccccccccc$	GLDH	23	$3,74{\pm}0,89~^{ m a}$	$1,05{\pm}0,23$ ^b	$2,75{\pm}0,27~^{ m ab}$	$2,23{\pm}0,14~^{ m ab}$	$0,59{\pm}0,08$ ^b	$1,83{\pm}0,48~^{ m ab}$	$3,3\pm 0,4$
AST 23 34,96±2,22 a 34,05±2,92 a 36,41±2,44 ab 45,34±4,41 c 45,56±3,66 cd 47,34±1,65 bcd 43,01±1,9 15 35,16±1,42 a 34,9±1,83 a 38,75±3,04 ab 54,04±3,03 c 47,94±2,97 cd 42,62±2,79 bcd 35,44±2,7 ALT 23 26,24±3,41 abc 14,25±2,25 a 18,6±3,02 ab 19,26±3,02 ab 29,98±3,56 abc 37,75±5,04 c 37,99±5,79 bcd 37,39±5,79 bcd		15	$8,03\pm1,39$ ^a *	$1,71{\pm}0,36$ ^{bc}	$3,38\pm0,29^{\rm b}$	$4,15{\pm}0,58$ b	$0,69{\pm}0,09~{ m c}$	$1,24{\pm}0,45~{ m bc}$	$2,09{\pm}0,2$
$\begin{array}{rrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrrr$	AST	23	34,96±2,22 ^a	34,05±2,92 ª	$36,41\pm 2,44$ ^{ab}	$45,34{\pm}4,41^{\circ}$	45,56±3,66 ^{cd}	47,34±1,65 ^{bcd}	$43,01{\pm}1,9$
ALT 23 26,24±3,41 abc 14,25±2,25 a 18,6±3,02 ab 19,26±3,02 ab 29,98±3,56 abc 37,75±5,04 c 37,99±5,37,99±5,37 15 22,82±2,25 a 26,91±1,88 ab* 40,34±5,88 b* 36,97±6,08 ab* 36,0±3,94 ab 23,02±4,53 a* 35,39±5,33		15	35,16±1,42 ^a	$34,9\pm1,83$ ^a	$38,75\pm3,04$ ^{ab}	$54,04{\pm}3,03~^{ m c}$	47,94±2,97 ^{cd}	42,62±2,79 ^{bcd}	35,44±2,7
$15 22,82\pm 2,25 \ ^a 26,91\pm 1,88 \ ^{ab*} 40,34\pm 5,88 \ ^{b*} 36,97\pm 6,08 \ ^{ab*} 36,0\pm 3,94 \ ^{ab} 23,02\pm 4,53 \ ^{a*} 35,39\pm 5,22\pm 3,22\pm $	ALT	23	$26,24\pm3,41$ ^{abc}	14,25±2,25 ^a	$18,6{\pm}3,02~^{ m ab}$	$19,26\pm 3,02$ ^{ab}	$29,98\pm 3,56$ ^{abc}	$37,75{\pm}5,04~^{ m c}$	37,99±5,
		15	22,82±2,25 ^a	$26,91{\pm}1,88$ ^{ab*}	$40,34\pm5,88^{b*}$	$36,97{\pm}6,08$ ^{ab*}	$36,0{\pm}3,94~^{\rm ab}$	$23,02\pm4,53$ a*	35,39±5,
	dados são an	-opentado	abor or a dio dio di ora a dio	se de médie Os velene	A A CD UV DEV DV	י חעמאט אט חעו ג	CIDU ACTAALT	11/m mo 2000 m m 11/m	ac do motoíno C

dados sao apresentados em media \pm erro padrao da media. Us valores de GP, HK, PFK, PK, LDH, CS, GoPDH, GLDH, AST e ALT estao expressos em mU/mg de proteina. Os valores de GoPase e MDH estão expressos em U/mg de proteína. Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre 23°C (controle) e 15°C (tratamento) (p \leq 0,05). As letras indicam diferenças nas médias entre os tempos de exposição. Os dados são apresentados em média e erro padrão da média.

31 °C						*		
	()°C)	2h	6h	12h	24h	48h	72h	96h
ac	23	$0,69{\pm}0,11~^{ m ab}$	$0,84{\pm}0,08~^{ m a}$	$0,75{\pm}0,09~^{ m ab}$	$0,82{\pm}0,1$ ^{ab}	$0,65{\pm}0,12$ ^b	$0,46{\pm}0,06$ ^b	$0,83{\pm}0,09~^{ m ab}$
JD.	31	$0,63{\pm}0,07~^{ m ab}$	$1,09{\pm}0,21$ ^a	$0,68{\pm}0,19~^{ m ab}$	$0,76{\pm}0,12~^{ m ab}$	$0,37{\pm}0,04$ ^b	$0,55{\pm}0,08$ b	$0,78{\pm}0,24~^{ m ab}$
	23	$239,9{\pm}47,5$ ^{ab}	252,6±34,0 ^{ab}	$230,6{\pm}41,0$ ^{ab}	$232,5\pm 30,1$ ^{ab}	$135,8\pm15,9$ ^a	$344,2\pm14,0$ ^b	$298,4\pm 39,0^{\text{b}}$
GOFASE	31	212,3±42,7 ^{ab}	274,9±21,6 ª	$336,1{\pm}50,2$ a*	$101, 7\pm 17, 0^{b*}$	$198,8{\pm}24,1$ ^{ab}	$304,4{\pm}27,0^{a}$	243,5±35,3 ^a
7111	23	2,94±0,22 ^a	$3,41{\pm}0,2$ ^{ab}	$3,11{\pm}0,39~^{ m ab}$	$2,32{\pm}0,12$ ^{ab}	$3,59\pm0,64$ ^a	$2,31\pm0,11^{\text{b}}$	$2,6{\pm}0,26$ ^b
NII	31	$3,9{\pm}0,49~^{\mathrm{a}}$	$3,01{\pm}0,24~^{ m ab}$	$3,31{\pm}0,42~^{ m ab}$	$2,83{\pm}0,22$ ^{ab}	$3,23{\pm}0,41$ ^a	$2,42{\pm}0,16^{ m b}$	$2,05{\pm}0,26$ ^b
DEV	23	$6,09{\pm}0,44~^{ m ab}$	$4,51{\pm}0,26~{ m acd}$	$3,08{\pm}0,46~^{\circ}$	$2,63{\pm}0,75~^{ m c}$	$4,6{\pm}1,16~{ m cd}$	5,27±0,21 ^{ad}	$6,62{\pm}1,09$ ^b
FFN	31	$7,21{\pm}0,77$ ^{ab}	4,95±0,49 ^{acd}	$2,64{\pm}0,32~^{ m c}$	$3,05{\pm}0,91~^{ m c}$	$3,2{\pm}0,38~{ m cd}$	4,89±0,61 ^{ad}	$8,03\pm1,22^{-b}$
DI7	23	$3,84{\pm}0,57$ ^a	$6,65{\pm}0,29~^{\rm a}$	$19,23{\pm}1,47$ ^b	$13,4{\pm}1,08~{ m c}$	$18,45\pm4,83$ ^{bc}	$14,65{\pm}1,31~^{ m c}$	$14,12\pm1,98^{\circ}$
LN	31	$3,1{\pm}0,51$ ^a	$4,84{\pm}0,3~^{\rm a}$	$19,41{\pm}1,75$ ^b	$12,89{\pm}1,44~^{ m c}$	11,52±0,91 ^{bc}	$10,63{\pm}1,0~^{ m c}$	$12,67\pm 2,33$ °
	23	21,48±2,2 ^a	$38,25\pm 2,34^{ m b}$	$10,8{\pm}1,01~^{ m c}$	$8,38{\pm}0,47~^{ m c}$	22,73±5,32 ^a	$8,78{\pm}0,47~^{ m c}$	13,86±1,28 ^{ac}
плл	31	$16,25\pm1,65$ ^a	$36,26\pm1,71$ ^b	$11,5{\pm}0,92$ ^a	$12,14{\pm}0,69~^{\mathrm{a}}$	$10,17\pm0,81$ ^{a*}	7,66±0,5 ª	15,89±3,23 ^a
U C	23	$3,24{\pm}0,4$ ^{ab}	$10,41{\pm}0,99~^{ m c}$	$5,43{\pm}0,48~^{ m a}$	$2,75{\pm}0,38$ ^{ab}	$2,03{\pm}0,63$ ^b	$4,91{\pm}0,81~^{ m ab}$	$5,77{\pm}0,76~^{ m a}$
20	31	$5,47{\pm}0,62$ a*	$9,38{\pm}1,11$ ^b	$9,52\pm0,61$ ^b *	$2,6{\pm}0,37~^{ m ac}$	$1,87{\pm}0,3~^{ m c}$	4,83±0,95 ª	$5,09{\pm}1,05~^{\mathrm{a}}$
	23	$0,65{\pm}0,07~^{ m a}$	$1,0{\pm}0,06$ ^b	$0,31{\pm}0,03$ °	$0,35{\pm}0,02~^{ m c}$	$0,19{\pm}0,02~^{ m c}$	$0,39{\pm}0,03~{ m c}$	$0,55{\pm}0,09~^{\rm a}$
	31	$0,7{\pm}0,05~^{\rm a}$	$0,93{\pm}0,05^{ m b}$	$0,3{\pm}0,03~{ m c}$	$0,4{\pm}0,03~^{ m c}$	$0,3{\pm}0,03~{ m c}$	$0,42{\pm}0,03~^{ m c}$	$0,62{\pm}0,15$ ^a
пцауу	23	13,65±2,3 ^a	$15,14{\pm}1,37$ ^a	$39,75\pm5,3^{\rm b}$	$19,81\pm 3,66$ ^a	$14,48\pm3,37$ ^a	$10,43{\pm}1,29~^{\mathrm{a}}$	$10,77{\pm}1,88~^{ m a}$
COLDI	31	$11,03{\pm}1,78$ ^a	$11,92\pm 1,64$ ^a	$53,07{\pm}7,2$ b	$23,77\pm9,6^{a}$	$21,15\pm 5,69$ ^a	17,09±3,23 ^a	13,49±4,59 ª
	23	$0,94{\pm}0,19~^{ m a}$	$1,38{\pm}0,28~^{\rm a}$	$3,07{\pm}0,24$ ^b	$2,53{\pm}0,18$ ^b	$1,2{\pm}0,33$ ^a	$3,38{\pm}0,97$ ^b	$1,44{\pm}0,26~^{\rm a}$
ИПЛИ	31	$0,87{\pm}0,14~^{ m a}$	$1,2{\pm}0,21$ ^a	$3,43{\pm}0,46~^{ m b}$	$4,03{\pm}0,35$ ^b	$1,81{\pm}0,22$ ^a	$3,63{\pm}0,76$ ^b	$1,91{\pm}0,54$ ^a
T A	23	29,9±2,5 ª	$31,57{\pm}0,75$ ^{ab}	$41,78\pm 2,29$ bc	$52,01{\pm}4,02~^{ m d}$	38,28±3,82 ^{abc}	$43,58\pm1,68$ ^{cd}	$30,49\pm1,51$ ^{ab}
ICH	31	28,14±3,57 ^a	33,25±0,82 ^{ab}	$35,38{\pm}4,96~^{ m bc}$	48,78±3,66 ^d	36,57±3,69 ^{abc}	$41,5{\pm}2,49~{ m cd}$	28,36±4,07 ^{ab}
T T A	23	25,45±4,61 ^{ab}	$17,38{\pm}2,34$ ^a	$31,22\pm4,6$ ^{abc}	33,92±5,23 °	$19,67\pm 3,94$ ^{abc}	$27,44{\pm}5,26$ ^{bc}	$22,3\pm 4,63$ ^{abc}
ALI	31	$16,57{\pm}4,14$ ^{ab}	$16,77{\pm}1,47$ a	17,38±2,77 ^{abc}	$37,13{\pm}6,63^{\circ}$	$30,54{\pm}4,63~^{ m abc}$	$35,61{\pm}4,45$ ^{bc}	21,62±6,52 ^{abc}
Legenda: (3P-glicogé	ènio fosforilase; G6Pa	ase-glicose 6-fosfatase	; HK-hexoquinase; PI	FK-fosfofrutoquinase;	PK-piruvato quinase;	LDH- lactato desidro	genase; CS-citrato
sintase; M aminotransf	DH-malat erase Not	o desidrogenase; G(a. os dados são anresei	6PDH-Glicose-6-fosfai ntados em média + err	to desidrogenase; G o nadrão da média Oc	LDH-glutamato desiv valores de GP HK PI	drogenase; AST-aspar FK PK LDH CS G6P	tato aminotransferas DH GI DH AST e A	te e ALT-alanina L'T estão expressos
em mU/mg	de proteín	a. Os valores de G6Pa	ase e MDH estão expre	essos em U/mg de prot	teína. Os asteriscos ($*$)) indicam diferencas sig	mificativas entre 23°	C (controle) e 31°C
(tratamento) (p≤ 0,05)	. As letras indicam dif	ferenças nas médias en	tre os tempos de expos	sição. Os dados são ap	resentados em média e	erro padrão da média.	

TABELA 4: ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DO FÍGADO DE Astyanax lacustris, EM TEMPERATURA DE

9	
-	

IABELA D: ML	ARCADURES	UL ENIKENNE UN	IDATIVU NU FIUA	ADU DE ASIYANAX IC	<i>ICUSITIS</i> , EM 1 EMPE	RATURA DE 12-C		
	T(°C)	2h	6h	12h	24h	48h	72h	96h
CON	23	$5,16{\pm}0,96~^{ m ab}$	$3,0{\pm}0,63$ ^{ab}	$5,68{\pm}1,3^{\ a}$	2,65±0,55 ^b	$5,34{\pm}0,96~^{ m ab}$	$4,36{\pm}0,91$ ^{ab}	$4,93{\pm}1,54$ ^a
	15	4,43±0,59 ^{ab}	$6,18{\pm}1,02~^{\mathrm{ab}}$	$6,14{\pm}1,12~^{\rm a}$	$1,64{\pm}0,34~^{ m b}$	3,75±0,75 ^{ab}	3,62±1,13 ^{ab}	$8,02{\pm}1,77$ ^a
	23	$13,96{\pm}1,64~^{\rm ab}$	$16,89{\pm}1,28~^{\rm ab}$	$15,25\pm1,16^{ab}$	$16,25{\pm}2,44~^{\rm ab}$	21,83±1,71 ^a	11,55±1,59 ^b	$20,68{\pm}1,3$ ^a
	15	$16,02{\pm}0,82$ ^{ab}	$16,57{\pm}1,57$ ^{ab}	$20,28{\pm}1,65~^{\mathrm{ab}}$	19,75±3,69 ^{ab}	18,83±3,11 ^a	$13,58{\pm}0,77$ b	19,28±2,21 ^a
^a∪	23	76,2±16,19 ^a	$48,8{\pm}6,05$ ^a	51,56±14,03 ^a	82,29±25,99 ª	$174,8\pm 21,66^{\rm b}$	57,78±15,0 ^a	283,5±94,95 ^b
V ID	15	68,0±15,92 ^a	$46,5{\pm}7,63$ ^a	$41,78{\pm}6,4$ ^a	82,4±21,61 ^a	286,0±56,62 ^b	84,13±18,49 ^a	$333,6\pm40,51$ ^b
CD	23	5,26±0,72 ^{abc}	$5,23{\pm}0,24~^{ m abc}$	3,59±0,26 ^а	$7,43{\pm}0,54$ ^b	$7,37\pm0,64$ ^{bc}	5,25±0,51 ^{ac}	$5,31{\pm}1,22~^{\rm ac}$
ND	15	5,9±1,38 ^{abc}	$6,68{\pm}0,59~^{\mathrm{abc}}$	$4,61{\pm}0,44$ ^a	$7,73{\pm}0,83$ ^b	$6,18{\pm}0,42$ ^{bc}	4,84±0,23 ^{ac}	4,0±0,28 ^{ac}
EUC	23	23,67±4,55 ^{ab}	55,25±6,31 °	21,89±1,81 ^a	28,56±4,09 ^{ab}	14,43±3,79 ^a	$37,22\pm4,06$ ^{bc}	35,75±7,36 ^{abc}
	15	35,63±11,33 ^{ab}	$53,56\pm7,14^{\circ}$	$30,6\pm3,72~^{\rm a}$	$26,17\pm4,93$ ^{ab}	$34,25{\pm}10,54$ ^a	$56,78{\pm}10,1$ ^{bc}	44,3±3,29 ^{abc}
HOU	23	20,78±5,07 ^a	$10,8{\pm}0,87~^{ m b}$	5,67±0,89 bc	$4,26{\pm}0,95~^{ m c}$	$3,35{\pm}0,57$ bc	$3,8\pm0,59~^{ m c}$	$4,72\pm1,04$ bc
	15	$14,3{\pm}1,74$ ^a	$10,29\pm 1,08^{ m b}$	$7,93{\pm}1,56$ ^{bc}	$1,68{\pm}0,21~^{\rm c}$	$6,85\pm1,53$ ^{bc}	$2,16{\pm}0,36~^{ m c}$	$5,79\pm1,04$ ^{bc}
Udi	23	$0,2{\pm}0,03~^{ m ab}$	$0,06\pm0,01$ ^a	$0,21{\pm}0,07~^{\rm ab}$	$0,13{\pm}0,06~^{a}$	$0,34{\pm}0,08~^{ m b}$	$0,03{\pm}0,01$ ^a	$0,19{\pm}0,06~^{\rm ab}$
	15	$0,11{\pm}0,04~^{\mathrm{a}}$	$0,11{\pm}0,02~^{\mathrm{a}}$	$0,14{\pm}0,04~^{\mathrm{a}}$	$0,13{\pm}0,03$ ^a	$0,15\pm0,03$ ^a *	$0,21{\pm}0,11$ ^a *	$0,1{\pm}0,02~^{\rm a}$
DCD	23	$2,25\pm0,42$	$2,82\pm 0,96$	$1,44{\pm}0,19$	$2,25\pm0,32$	$2,27\pm0,64$	$2,33{\pm}0,44$	$1,46{\pm}0,22$
	15	$2,21\pm0,35$	$1,73{\pm}0,48$	$0,88{\pm}0,2$	$2,02\pm 0,29$	$1,7{\pm}0,66$	$3,1{\pm}0,56$	$2,36{\pm}0,3$
Legenda: SOD	-superóxido di	ismutase; CAT-catal	lase; GPx-glutationa	peroxidase; GR-glı	utationa redutase; GS	ST-Glutationa-S-trans	ferase; GSH-glutatic	ona reduzida; LPO-
peroxidação lip.	ídica e PCO-ci	arbonilação proteica.	Nota: os dados são a	ıpresentados em méd	lia \pm erro padrão da m	nédia. Os valores de C	AT, GPx, GR e GST	estão expressos em
mU/mg de prot	eína. Os valor	es de SOD estão expr	ressos em U/mg de p	roteína. Os valores d	le GSH estão express	os em nmols de tióis/	mg de proteína. Os v	alores de LPO estão
th ma sossardxa	mols de MDA	/mg de proteína. Os v	'alores de PCO estão	expressos em nmols	de de carbonilas/mg	de proteína. Os asteri	scos (*) indicam dife	renças significativas
entre 23°C (con	itrole) e 15°C ((tratamento) (p≤ 0,05). As letras indicam	diferenças nas média	is entre os tempos de	exposição. Os dados	são apresentados em	média e erro padrão

da média.

THIS ENT TENDED A TUD A DE 15 °C 1~ TABEL A 5: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE 4640

68

	(°C)	2h	6h	12h	24h	48h	72h	96h
u U S	23	$6,19{\pm}1,44$ ^a	$5,0{\pm}0,86~^{\rm a}$	$5,03{\pm}0,84$ ^a	$3,74{\pm}0,63$ ^a	7,19±2,55 ^a	4,0±0,77 ^a	8,09±1,0 ª
	31	$4,09{\pm}0,65$ ^a	$6,23{\pm}1,1$ ^a	$2,95{\pm}0,6~^{\mathrm{a}}$	$2,7{\pm}1,23$ ^a	$5,02{\pm}1,16~^{\mathrm{a}}$	$6,08{\pm}1,0~^{a}$	$13,67\pm1,89$ ^{b*}
LVU	23	$15,14\pm3,37$ ^a	15,34±1,52 ^a	$17,85\pm 3,25^{a}$	$14,03\pm1,39$ ^a	13,8±2,32 ^a	$9,76{\pm}2,14$ ^a	$13,27\pm1,69^{a}$
	31	$10,74{\pm}0,7$ ^a	$14,07{\pm}1,07~^{\mathrm{a}}$	$11,82\pm1,96$ ^a *	$16,6{\pm}2,55$ ^a	16,78±1,7 ^a	$15,84{\pm}1,41$ ^{a*}	17,83±1,51 ^a
ν D	23	$70,2\pm 6,86$ ^a	$64,1{\pm}7,06~^{a}$	$111,11\pm 28,68$ ^a	94,0±24,99 ª	$81,4{\pm}15,4$ ^a	55,0±8,83 ^a	$164,89\pm47,07^{ m b}$
v ID	31	50,75±7,73 ^a	$62,13\pm11,95$ ^a	$78,0{\pm}15,98$ ^a	86,88±27,75 ^a	125,14±27,81 ^a	127,6±39,29 ^a	$250,78\pm33,66^{b}$
GD	23	$4,84{\pm}0,49~^{\rm a}$	$4,63{\pm}0,71$ ^a	$6,24{\pm}0,38~^{\rm ab}$	$8,52{\pm}0,65^{\rm b}$	3,71±0,71 ^a	3,65±1,17 ª	$4,66{\pm}0,8~^{\rm a}$
ND	31	$4,82{\pm}0,27~^{\rm ab}$	$6,03{\pm}0,61$ ^{ab}	7,2±0,35 ª	$6,38{\pm}0,48$ ^{ab*}	$4,96{\pm}0,44~^{ m ab}$	$5,05{\pm}0,86~^{ m ab}$	$4,54{\pm}0,23$ ^b
	23	$43,4\pm 5,63$ ^a	$45,1\pm 5,65^{a}$	34,67±9,72 ^a	$30,0{\pm}4,36$ ^a	$18,44\pm 2,83$ ^a	$40,3\pm 12,15$ ^a	$41,89\pm4,01$ ^a
	31	35,25±1,95 ^{ab}	58,89±7,48 ^{ac}	$20,5{\pm}2,81$ ^b	35,8±6,32 ^{ab}	$52,0{\pm}3,01$ ^{ac*}	68,3±11,69 °*	51,67±6,37 ^{abc}
HSU	23	7,55±0,95 ^{abc}	$8,74{\pm}1,2~^{ m ab}$	$9,86{\pm}0,49~^{\rm a}$	$3,92{\pm}0,84~^{ m cd}$	$4,72\pm 1,1$ bcd	$1,71{\pm}0,35~^{ m d}$	7,23±1,8 ^{abc}
TICD	31	$6,29{\pm}0,4~^{ m a}$	7,54±0,78 ª	$6,64{\pm}0,62~^{\rm a}$	8,47±1,22 ^a *	6,02±0,75 ^a	$7,01{\pm}2,55$ a*	$6,66{\pm}1,64~^{\rm a}$
Ud I	23	$0,12{\pm}0,04~^{\rm ab}$	$0,11{\pm}0,03~^{\rm ab}$	$0,19{\pm}0,05~^{\rm ab}$	$0,3{\pm}0,07~^{\rm a}$	0,25±0,11 ^{ab}	$0,04{\pm}0,01^{ m b}$	$0,13{\pm}0,06~^{\rm ab}$
	31	$0,04{\pm}0,01~^{ m ab}$	$0,23{\pm}0,11$ ^{ab}	$0,06{\pm}0,02~^{ m ab}$	$0,18{\pm}0,02~^{\rm a}$	$0,09{\pm}0,02~^{ m ab}$	$0,03{\pm}0,01$ ^b	$0,1{\pm}0,03~^{ m ab}$
DCD	23	2,32±0,24 ª	2,05±0,51 ^a	$2,48{\pm}0,33$ ^a	$1,86{\pm}0,36~^{\rm a}$	$0,99\pm0,11$ ^a	2,04±0,82 ª	1,95±0,31 ª
	31	$1,7{\pm}0,14~^{\rm a}$	$1,57{\pm}0,2~^{\rm a}$	$2,14{\pm}0,32~^{\rm ab}$	$1,48{\pm}0,23$ ^a	$1,06{\pm}0,14~^{\rm a}$	$1,45{\pm}0,28~^{\rm a}$	3,72±0,53 b*
Legenda:	SOD-supe	eróxido dismutase; C a e PCO-carbonilacã	CAT-catalase; GPx-gl o proteica Nota: os d	utationa peroxidase; C lados são anresentados	iR-glutationa redutas em média + erro nad	e; GST-Glutationa-S-tr rão da média Os valor	ansferase; GSH-gluta	ttiona reduzida; LPO- e GST são expressos
em mU/n	ng de prote	zína. Os valores de S	SOD estão expressos	em U/mg de proteína.	Os valores de GSH	estão expressos em nn	ols de tióis/mg de pr	oteína. Os valores de
LPO estão	o expresso:	s em µmols de MDA	/mg de proteína. Os v	alores de PCO estão ex	pressos em nmols de	de carbonilas/mg de pr	oteína. Os asteriscos (*) indicam diferenças
significat	ivas entre	23°C (controle) e 31	l°C (tratamento) (p≤ i	0,05). As letras indica	m diferenças nas méc	lias entre os tempos de	exposição. Os dados	são apresentados em
média e e	arro padrão	da média.						

TABELA 6: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NO FÍGADO DE Astyanax lacustris, EM TEMPERATURA DE 31 °C

QUADRO 1 - RESUMO DOS RESULTADOS DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, DEFESA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO EM FÍGADO DE A. lacustris

Comparação entr	e controle e	tratamento ao longo do tempo	
Via metabólica	Marcador	15°C	31°C
	GP	=	=
	C(Daga	↓ 12h (46 %), ↓ 24h (47 %)	↑ 12h (46 %)
	Gorase	↑ 72h (33 %)	↓ 24h (56 %)
	HK	=	=
Metabolismo de	PFK	↑ 2h (103 %), ↑ 48h (110 %)	=
carboidratos	РК	=	=
	LDH	=	↓ 48h (55 %)
	CS	↑ 12h (60 %), ↑ 24h (88 %)	↑ 2h (69 %), 12h (75 %)
	MDH	=	=
	G6PDH	=	=
	GLDH	↑ 2h (115 %)	=
Metabolismo de	AST	=	=
aminoácidos	AIT	↑ 6h (89 %), ↑ 12h (117 %),	_
	ALI	↑ 24h (92 %), ↓ 72h (39 %)	=
Defesa antioxidante	SOD	=	↑ 96h (69 %)
	CAT	=	\downarrow 12h (34 %); \uparrow 72h (63 %)
	GPx	=	=
	GSH	=	↑ 24h (116 %), ↑ 72h (63 %)
	GR	=	↓ 24h (25 %)
	GST	=	↑ 48h (182 %), ↑ 72h (69 %)
Danos	LPO	$\downarrow 48h (56 \%); \uparrow 72h (600 \%)$	=
oxidativos	РСО	=	↑ 96h (91 %)

Nota: Os sinais de igual (=) indicam os biomarcadores que não sofreram alterações para a interação tempo e temperatura. Setas para cima indicam aumento de atividade ou níveis e setas para baixo indicam diminuição na atividade ou níveis.

4 DISCUSSÃO

A mortalidade de 3,9 % dos peixes observada durante os ensaios pode ser considerada baixa e possivelmente foi provocada por condições fisiológicas individuais. Esta mortalidade não foi atribuída às condições experimentais, pois os parâmetros de qualidade da água (oxigênio dissolvido, amônia e pH) estavam adequados em todas as situações testadas. No estudo de Almeida, Gravato e Guilhermino (2015), foi considerado aceitável para validação dos bioensaios que a mortalidade esteja abaixo de 10 %.

Neste trabalho, as alterações nos marcadores fisiológicos que ocorreram apenas em relação à variável tempo de exposição foram consideradas como decorrentes do ciclo circadiano, amplamente identificado como fator de variação dos parâmetros fisiológicos dos organismos (BALASCH; TORT, 2019) e, portanto, não foram relacionadas com os efeitos das mudanças de temperatura.

O ritmo circadiano é responsável pela organização temporal de funções fisiológicas que envolvem ciclos de atividade hormonal, como melatonina e cortisol, principalmente a cada 24 horas (ISORNA et al., 2017), cuja sinalização de vias metabólicas antecedem os eventos naturais de mudança ambiental, como iluminação, temperatura e disponibilidade de alimentos (ZHDANOVA; REEBS, 2005). A melatonina, além de participar nos relógios circadianos, neutraliza radicais livres e aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, tais como GPx, SOD e CAT (ALBARRÁN et al., 2001; PROKKOLA; NIKINMMAA, 2018; SÁNCHEZ-VÁSQUEZ et al., 2019; TOMÁS-ZAPICO; COTO-MONTES, 2005), e diminui a secreção de cortisol (SANCHÉS-VÁSQUEZ et al., 2019) afetando também as vias do metabolismo energético ao longo do ciclo circadiano (ISORNA et al., 2017).

Durante os experimentos, os peixes submetidos a choque térmico de 15 °C apresentaram baixa atividade natatória e pouca ingestão de alimento, quando comparados aos submetidos a 31 °C. Esta diferença comportamental também foi verificada em outros estudos e tem sido atribuída a taxas metabólicas reduzidas em temperaturas baixas (BEYAN et al., 2015; COSTA; DRIEDZIC; GAMPERL, 2013; FERNANDES; MCMEANS, 2019; INOUE et al., 2008; ROSSI et al., 2017). Durante o estresse térmico, os peixes podem ajustar seu metabolismo para compensar as mudanças de temperatura até estarem aclimatados (LERMEN et al., 2004), e neste estudo as respostas metabólicas a 15 °C foram diferentes das respostas a 31 °C, indicando que diferentes mecanismos adaptativos atuam durante a exposição a baixa e alta temperatura nesta espécie.
4.1 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO HEPÁTICO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS

Os ajustes metabólicos para manutenção da homeostase diante de variações térmicas podem alterar a demanda energética (WEN et al., 2017). Neste estudo foi verificado aumento na demanda energética nas células hepáticas já em 2 horas de exposição ao frio, evidenciada pelo estímulo da via glicolítica e aumento na degradação de aminoácidos pela reação de desaminação oxidativa catalisada pela GLDH. Esta enzima é fundamental para as reações de interligação entre o metabolismo de carboidratos e proteínas. Um aumento na relação ADP/ATP é um importante modulador positivo da atividade da GLDH (PLAITAKIS et al., 2017). Este estímulo na atividade da GLDH gera um aumento na produção de α -cetoácidos, que são utilizados como substratos no ciclo do ácido cítrico, evidenciado pela alta atividade da CS em 12 e 24 horas, indicando aumento no metabolismo aeróbico (FIGURA 19).

O uso de aminoácidos como fontes de esqueletos carbônicos para a síntese de intermediários do ciclo do ácido cítrico também pode ser observado através do estímulo da atividade da ALT em 6, 12 e 24 horas (FIGURA 19). Esta alta demanda energética nos hepatócitos pode estar associada com o ajuste metabólico ao estresse em baixa temperatura (KAMMER; ORCZEWSKA; O'BRIEN, 2011; POL; FLIK; GORISSEN, 2017; WHITE; ALTON; FRAPPELL, 2012). No entanto, a utilização de aminoácidos glicogênicos como substratos energéticos durante o ajuste metabólico ao frio é uma resposta espécie-dependente, pois Lermen et al. (2004), ao exporem *Rhamdia quelen* a 15 °C e 31 °C por 12 horas e 21 dias, verificaram a diminuição de proteínas no figado somente em 31 °C e após 21 dias de exposição.

A alta demanda energética no figado em 15 °C parece ter sido suprida pelo estímulo da via glicolítica e das reações de desaminação de aminoácidos até 48 horas de exposição. Isso pode ser observado através da inibição da exportação de glicose, com redução da atividade da G6Pase em 12 e 24 horas pelos baixos níveis de ATP (FIGURA 19). No entanto, a alta atividade da G6Pase em 72 horas à 15°C indica que o figado está atuando para manter os níveis glicêmicos no final do período de ajuste, porém, não foi possível determinar pelos marcadores estudados se a origem da glicose exportada é da via gliconeogênica ou da glicogenólise. Estudos sugerem que as reservas de glicogênio hepáticas são mantidas durante o frio como uma estratégia de sobrevivência para situações de maior demanda energética,

como a fuga (HEMRE; MOMMSEN; KROGDAHL, 2002; ROSSI et al., 2017; SPEERS-ROESCH, NORIN, DRIEDZIC, 2018) e, devido ao catabolismo de aminoácidos, acreditamos que é mais provável a ocorrência de gliconeogênese em 72 horas.

O aumento de temperatura para 31 °C provocou alterações diversas no metabolismo hepático de carboidratos e proteínas quando comparado a 15 °C. Houve um estímulo do metabolismo aeróbico, representado pelo aumento na atividade da CS em 2 e 12 horas (FIGURA 19). Além disso, a necessidade de exportação de glicose para regulação da glicemia é evidenciada pelo aumento da atividade da G6Pase em 12 horas de exposição. Como não houve alteração na atividade das enzimas da glicólise e do catabolismo de aminoácidos e, houve inibição da via fermentativa de carboidratos em 48 horas, pode-se inferir que os ácidos graxos estão sendo utilizados como aporte energético para o ciclo do ácido cítrico em 2 e 12 horas. O catabolismo de triglicerídeos está sendo utilizado como fonte energética durante o estresse, com produção de ATP na via aeróbica a partir da introdução dos ácidos graxos no ciclo do ácido cítrico como acetil-CoA (RUI, 2014).

Estas diferenças metabólicas em relação ao metabolismo energético que foram observadas após a exposição ao estresse pelo frio ou pelo calor indicam que *A. lacustris* tem mais tolerância ao calor do que ao frio, uma vez que em 31 °C não foram observadas evidências de alterações na respiração anaeróbica, catabolismo de aminoácidos ou glicólise. Portanto, os níveis basais de atividade enzimática, com exceção da CS e G6Pase, foram suficientes para atender a demanda energética. A ausência de alterações nos marcadores estudados a partir de 72 horas nos peixes condicionados ao frio e a partir de 48 horas nos peixes expostos ao calor indica que estes animais se ajustaram à mudança de temperatura, e a resposta mais rápida de ajuste da homeostase foi ao calor.

4.2 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA NO SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTE HEPÁTICO

Em situações de estresse fisiológico, a indução das defesas antioxidantes é importante para conter o efeito das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) sobre as estruturas celulares (SOUZA et al., 2018). Porém, quando os limites ótimos de tolerância térmica de uma espécie são ultrapassados, podem ocorrer danos oxidativos (VINAGRE et al., 2014). Vários estudos têm demonstrado que as respostas do sistema de defesa antioxidante ao estresse térmico são específicas em relação ao órgão, espécie, temperatura e

tempo de duração (ABELE; PUNTARULO, 2004; BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; GRIM et al., 2013; HE et al., 2015; KAMMER; ORCZEWSKA; O'BRIEN, 2011; LUSHCHAK; BAGNYUKOVA, 2006; MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016; MADEIRA et al., 2013; SOUZA et al., 2018).

O estresse térmico em baixas temperaturas provoca respostas diferentes sobre as defesas antioxidantes do figado quando comparadas espécies de peixes tropicais e subtropicais. Em tilápia (*Oreochromis niloticus*) exposta a 13 °C por 120 horas, houve aumento na atividade da SOD, GPx, CAT e níveis de GSH do figado (HE et al., 2015). O linguado vermelho (*Paralichthys orbignyanus*) exposto a 17,1 °C por até 72 horas teve aumento nos níveis de GST e CAT hepáticas, também havendo aumento de LPO (GARCIA et al., 2015). No figado de *Gasterosteus aculeatus* expostos a 8 °C, houve aumento nos níveis de GSD (KAMMER; ORCZEWSKA; O'BRIEN, 2011). Por outro lado, no estudo de Rossi et al. (2017), o figado de *Hoplosternum littorale* exposto a 10 °C por 1 dia teve inibição na atividade das enzimas GST e GR, e em 21 dias houve diminuição da atividade da CAT, ocorrendo aumento de LPO.

Neste estudo, em 15 °C não houve alteração na atividade das enzimas antioxidantes avaliadas e nem nos níveis de GSH (FIGURA 19). Esta condição pode ser decorrente de taxas metabólicas baixas, característica de peixes em temperaturas frias (GRIM et al., 2013; RADOVANOVIC et al., 2010; ROSSI et al., 2017). Esta não alteração nas defesas antioxidantes indica que *A. lacustris* não foi capaz de conter os efeitos das EROs após 72 horas de exposição a 15°C, ocorrendo LPO. Um possível aumento na produção de EROs pode estar relacionado com o aumento da respiração celular aeróbica para atender a demanda energética durante o período de ajuste, evidenciada pelo aumento na atividade da CS em 12 e 24 horas.

Além disso, em baixas temperaturas, a manutenção na fluidez das membranas celulares de peixes ocorre pelo aumento de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) em sua composição (ABELE; PUNTARULO, 2004; BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; CROCKETT, 2008; FARKAS et al., 2001; VINAGRE et al., 2012).

Se por um lado esta condição, associada com o aumento na densidade mitocondrial (ABELE; PUNTARULO, 2004; O'BRIEN, 2011), permitiram a adaptação de peixes de água doce, marinhos e antárticos ao frio (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; FARKAS et al., 2001; LIU et al., 2019), aumentando sua capacidade aeróbica, por outro lado, tornam as membranas mais susceptíveis a sofrerem reações com EROs, levando à formação e

propagação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e aos danos oxidativos nas membranas (CROCKETT, 2008; IBARZ et al., 2010).

Em contraste ao observado na exposição ao frio, em 31 °C o sistema de defesa antioxidante apresentou diversas alterações. As primeiras alterações ocorreram em 12 horas de exposição, com a redução da atividade da CAT, indicando que as células hepáticas ficaram mais susceptíveis a ação deletéria de peróxidos, em especial do peróxido de hidrogênio. As alterações mais importantes sobre o sistema de defesa antioxidante foram verificadas em 72 horas de exposição ao calor. Houve aumento na atividade enzimática da CAT e GST e nos níveis de GSH hepáticos, indicando que o sistema de defesa antioxidante celular foi capaz de responder a um possível aumento na formação de EROs, causado pelo calor (FIGURA 19).

Tais resultados são semelhantes com os de Madeira et al. (2016), quando expuseram *Sparus aurata* à estresse térmico ao calor e houve aumento da atividade das enzimas CAT, SOD e GST no figado. O aumento da temperatura está relacionado com o aumento das taxas metabólicas celulares e consequentemente, aumenta a produção de EROs (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; LUSHCHAK, 2011; MADEIRA et al., 2013), o que pode ativar o sistema de defesa antioxidante para prevenir danos oxidativos celulares (ROSSI et al., 2017).

O estudo da participação do fator de transcrição Nrf2 na indução de respostas antioxidantes indica que a presença de EROs aumenta a translocação e acúmulo desse fator de transcrição no núcleo, induzindo a expressão dos genes de CAT, SOD, GR, GPx e GST, assim como de enzimas relacionadas com a síntese e renovação de GSH (COSTA-SILVA et al., 2015; DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV; KAZANTSEV, 2018; MUKAIGASA et al., 2012; WANG; ZHU, 2019).

Portanto, a indução da defesa antioxidante pode ocorrer mesmo na ausência de danos oxidativos. Estes resultados indicam que o choque térmico de alta temperatura induziu o aumento de produção de EROs e consequentemente a resposta da defesa antioxidante, mas, esta resposta não foi capaz de manter a proteção contra danos oxidativos em 96 horas, demonstrado pelo aumento de níveis de danos a proteínas (PCO) nas células hepáticas.

Em relação aos danos oxidativos em lipídios, não foi verificada LPO em 31 °C, sendo provavelmente decorrente do aumento da atividade da CAT em 72 horas e da SOD em 96 horas (FIGURA 19). Condição semelhante foi encontrada no estudo de Rossi et al. (2017), no figado de *Hoplosternum littorale* exposta a 33 °C por 1 e 21 dias, com a ativação de CAT e GR, sem ocorrer aumento de LPO. O aumento na atividade da GST em 48 e 72

horas nos peixes a 31 °C também pode ter sido responsável pela ausência de LPO à alta temperatura. As GSTs são uma família de enzimas diméricas que atuam na destoxificação de poluentes, drogas e compostos reativos endógenos do metabolismo celular (ROSSI et al., 2017). Regoli et al. (2011) associam a atividade de isoformas de GST na redução de LOOH a álcool, enquanto oxidam a GSH em GSSG.

Neste estudo, os danos em lipídios foram avaliados com a utilização de um marcador indireto de peroxidação lipídica, detectado pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que quantifica principalmente o MDA, um dos produtos finais da peroxidação lipídica. Portanto, pode ter havido formação de LOOH a 31 °C, com neutralização a partir da atividade da GST, não produzindo quantidades significativas de TBARS. No estudo de Bagnyukova et al. (2007), o rim e encéfalo de *Carassius auratus* apresentaram altos níveis de LOOH com o aumento de temperatura, porém os níveis de MDA não foram alterados significativamente.

Longos períodos de exposição a altas temperaturas requerem um aumento na atividade das enzimas dependentes de glutationa para manter estáveis os níveis de peroxidação lipídica e de carbonilação de proteínas (BAGNYUKOVA et al., 2007). O sistema de defesa antioxidante dependente de glutationa foi ativado em 31 °C, com alta atividade de GST em 48 e 72 horas e altos níveis de GSH em 24 e 72 horas.

A glutationa é fundamental na defesa celular contra o estresse oxidativo, sua forma reduzida (GSH) atua na conversão de compostos eletrofilicos sob condições fisiológicas, de forma espontânea ou catalisada pela GST e, em reação de degradação de peróxido de hidrogênio catalisado pela enzima GPx, com regeneração da glutationa oxidada (GSSG). Os níveis de glutationa reduzida na célula são dependentes de sua síntese ou regeneração a partir da GSSG pela enzima GR na presença de NADPH, mantendo os níveis de GSH sempre acima de GSSG (DEPONTE, 2013).

Em *A. lacustris* submetidos à alta temperatura, o aumento dos níveis de GSH encontrados em 24 e 72 horas parecem não estarem relacionados com a atividade da GR, mas possivelmente à indução de síntese pelo fator de transcrição Nrf2, que potencializa a expressão gênica das enzimas glutamato cisteína ligase e glutationa sintetase (MUKAIGASA et al., 2012).

Neste estudo, a condição de estresse oxidativo foi observada no figado dos animais submetidos à baixa e alta temperatura, com ocorrência de danos celulares. Em 15 °C não houve alteração das defesas antioxidantes, ocorrendo aumento de LPO; já em 31 °C, as

defesas antioxidantes foram aumentadas após 24 horas de exposição, com aumento de atividade das enzimas CAT, SOD e GST e nos níveis de GSH, porém, não foram capazes de manter o equilíbrio do sistema antioxidante em 96 horas de exposição, quando foi observado dano oxidativo em proteínas.

FIGURA 19 – ESQUEMA DAS VIAS METABÓLICAS HEPÁTICAS DE A. lacustris SOB ESTRESSE TÉRMICO





5 CONCLUSÃO

Em relação ao metabolismo de carboidratos e proteínas, a baixa temperatura provocou mais alterações no metabolismo de *A. lacustris* em relação à alta temperatura, uma vez que, mesmo com taxas metabólicas baixas, ocorreu alta demanda energética nas primeiras 48 horas de exposição e o fígado utilizou, além da glicólise, a catálise de aminoácidos para provimento de substratos energéticos para a via aeróbica. Enquanto que em 31 °C, as taxas normais de atividade das enzimas abordadas, com exceção da CS e G6Pase, foram suficientes para atender as necessidades energéticas de ajuste fisiológico frente à mudança de temperatura. No entanto, em relação às defesas antioxidantes, a temperatura de 31 °C afetou mais o metabolismo do figado nesta espécie, pois, apesar de haver aumento nas defesas antioxidantes, ocorre carbonilação de proteínas em 96 horas. E em 15 °C, apesar da não alteração nas defesas antioxidantes e da ocorrência de LPO, *A. lacustris* consegue recuperar os danos lipídicos em 96 horas.

REFERÊNCIAS

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643304001722>.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p.121–126, 1984. Elsevier. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163.

ALBARRÁN, M. T.; LÓPEZ-BURILLO, S.; PABLOS, M. I.; REITER, R. J.; AGAPITO, M. T. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light: Melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity rhytms. **Journal of Pineal Research**, v. 30, n. 4, p. 227–233, 2001. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-079X.2001.300406.x>.

ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of temperature in juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) biomarker responses and behaviour: implications for environmental monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, n. 1, p. 45–55, 2015. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s12237-014-9792-7.

BAGNYUKOVA, T. V; LUSHCHAK, O. V; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, n. 4, p. 227–234, 2007. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306456507000149>.

BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the stress responses in fish. Frontiers in Endocrinology, v. 10, n. FEB, p. 1–12, 2019.

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

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002.

BEAMAN, J. E.; WHITE, C. R.; SEEBACHER, F. Evolution of Plasticity: Mechanistic Link between Development and Reversible Acclimation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 3, p. 237–249, 2016. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534716000185.

BENNEMANN, S. T.; GEALH, A. M.; ORSI, M. L.; SOUZA, L. M. Occurrence and trophic ecology of four species of *Astyanax* (Characidae) in different rivers of the Tibagi River Basin, Paraná, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 95, n. 3, p. 247–254, 2005.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0073-47212005000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>..

BEYAN, C.; BOOM, B. J.; LIEFHEBBER, J. M. P.; SHAO, K.-T.; FISHER, R. B. Natural swimming speed of *Dascyllus reticulatus* increases with water temperature. **ICES Journal of Marine Science**, v. 72, n. 8, p. 2506–2511, 2015. Disponível em: https://academic.oup.com/icesjms/article/72/8/2506/2458916>.

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

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUENO-KRAWCZYK, A. C. D.; GUILOSKI, I. C.; PIANCINI, L. D. S.; et al. Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply. **Chemosphere**, v. 135, p. 257–264, 2015. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515004038>. .

CARRASCO-LETELIER, L.; EGUREN, G.; MELLO, F. T.; GROVES, P. A. Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution. **Chemosphere**, v. 62, n. 8, p. 1245–1252, 2006. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653505009094>.

CHANG, J. C. H.; WU, S. M.; TSENG, Y. C.; et al. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 19, p. 3494–3504, 2007.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273–283, 1979. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/BF00398141.

CHUNG, K. S. Heat resistance and thermal acclimation rate in tropical tetra *Astyanax bimaculatus* of Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, v. 57, n. 4, p. 459–463, 2000.

CIARDIELLO, A.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. 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**, v. 1250, n. 1, p. 76–82, 1995.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. L-Glutamate dehydrogenase from the Antartic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary srtucture, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 11–23, 2000. Naples, Italy: Elsevier. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483800001862?via%3Dihub>.

COSTA-SILVA, D. G.; NUNES, M. E. M.; WALLAU, G. L.; et al. Oxidative stress markers in fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15526–15535, 2015.

COSTA, I. A. S. F.; DRIEDZIC, W. R.; GAMPERL, A. K. Metabolic and cardiac responses of cunner *Tautogolabrus adspersus* to seasonal and acute changes in temperature. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 86, n. 2, p. 233–244, 2013. Disponível em: https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/669538>.

CROCKETT, E. L. The cold but not hard fats in ectotherms: Consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, v. 178, n. 7, p. 795–809, 2008.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; et al. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235–241, 1981. Disponível em: http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diab.30.3.235.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathionedependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3217–3266, 2013. Elsevier B.V. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>...

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; KOSTOV, R. V; KAZANTSEV, A. G. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 19, p. 3576–3590, 2018. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14379>.

FARKAS, T.; FODOR, E.; KITAJKA, K.; HALVER, J. E. Response of fish membranes to environmental temperature: Fish membranes and temperature. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 8, p. 645–655, 2001. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2109.2001.00600.x.

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

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269702003779>.

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

FERNANDES, T.; MCMEANS, B. C. Coping with the cold: energy storage strategies for surviving winter in freshwater fish. **Ecography**, v. 42, n. 12, p. 2037–2052, 2019. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ecog.04386>.

FONSECA, T.; COSTA-PIERCE, B. A.; VALENTI, W. C. Lambari aquaculture as a

means for the sustainable development of rural communities in Brazil. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 25, n. 4, p. 316–330, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1080/23308249.2017.1320647>.

GARCIA, L. O.; OKAMOTO, M. H.; RIFFEL, A. P. K.; et al. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 607–612, 2015. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252015000300607&lng=en&tlng=en>. .

GOLOVANOV, V. K. Influence of various factors on upper lethal temperature (review). **Inland Water Biology**, v. 5, n. 1, p. 105–112, 2012. Disponível em: http://link.springer.com/10.1134/S1995082911040079>.

GRIM, J. M.; SIMONIK, E. A.; SEMONES, M. C.; KUHN, D. E.; CROCKETT, E. L. The glutathione-dependent system of antioxidant defense is not modulated by temperature acclimation in muscle tissues from striped bass, *Morone saxatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 164, n. 2, p. 383–390, 2013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643312005235>.

HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O.; DIJK, P. V. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 174, n. 2, p. 149–156, 2004.

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

IBARZ, A.; MARTÍN-PÉREZ, M.; BLASCO, J.; et al. Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress. **PROTEOMICS**, v. 10, n. 5, p. 963–975, 2010. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200900528>.

INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G.; IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O. B. Physiological stress responses in the warm-water fish matrinxã (Brycon amazonicus) subjected to a sudden cold shock. Acta Amazonica, v. 38, n. 4, p. 603–609, 2008.

ISORNA, E.; PEDRO, N. DE; VALENCIANO, A. I.; ALONSO-GÓMEZ, Á. L.; DELGADO, M. J. Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 3, p. R141–R159, 2017. Disponível em: https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/232/3/R141.xml.

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

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

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

LEVESQUE, H. M.; MOON, T. W.; CAMPBELL, P. G. C.; HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 3–4, p. 257–267, 2002. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X02000127.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p.346–357, 1994. Elsevier. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687994330409>.

LIRA, L. V. G.; KURADOMI, R. Y.; DE SOUZA, T. G.; HAINFELLNER, P.; BATLOUNI, S. R. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 4, p. 438–455, 2018. Disponível em: https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/1318>.

LIU, C.; DONG, S.; ZHOU, Y.; et al. Temperature-Dependent Fatty Acid Composition Change of Phospholipid in Steelhead Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Tissues. Journal of Ocean University of China, v. 18, n. 2, p. 519–527, 2019.

LORO, V. L.; MURUSSI, C.; MENEZES, C.; et al. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 569–578, 2015. Disponível em: ..">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252015000300569&lng=en&tlng=en>..

LUCENA, C. A. S.; SOARES, H. G. 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 drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 4072, n. 1, p. 101, 2016. Disponível em: http://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4072.1.5.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 143, n. 1, p. 30–35, 2006. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045605002528>.

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**, v. 166, n. 2, p. 237–243, 2013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643313001645>.

MADEIRA, D.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 324–331, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.008>.

MILLIGAN, C. L. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 18, p. 3167–3173, 2003. Disponível em: http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.00538>.

MUKAIGASA, K.; NGUYEN, L. T. P.; LI, L.; et al. Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 21, p. 4455–4461, 2012. Disponível em: http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00481-12>.

NASCIMENTO, N. F. DO; PEREIRA-SANTOS, M.; PIVA, L. H.; et al. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra Astyanax altiparanae. **Aquaculture**, v. 471, p. 163–171, 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848616306184>.

NAVARRO, F. K. S. P.; NAVARRO, R. D.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. DE O. Effect of photoperiod stress assessment and locomotor activity of female lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 173–180, 2014.

NIMET, J.; GUIMARÃES, A. T. B.; DELARIVA, R. L. Use of muscular cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a biomarker in biomonitoring of rural streams. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 232–238, 2017. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00128-017-2111-9>.

O'BRIEN. Mitochondrial biogenesis in cold-bodied fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 275–285, 2011. Disponível em: <<u>http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.046854></u>.

ORNELAS-GARCÍA, C.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 340, 2008. Disponível em:

http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-8-340>.

PECK, L. S.; CONWAY, L. Z. The myth of metabolic cold adaptation: Oxygen consumption in stenothermal Antarctic bivalves. The Geological Society of London, v. 177, p. 441–450, 2000.

PLAITAKIS, A.; KALEF-EZRA, E.; KOTZAMANI, D.; ZAGANAS, I.; SPANAKI, C. The glutamate dehydrogenase pathway and its roles in cell and tissue biology in health and disease. Biology, v. 6, n. 1, p. 1–26, 2017.

POL, I.; FLIK, G.; GORISSEN, M. Comparative physiology of energy metabolism: fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool. Frontiers in Endocrinology, v. 8, 2017. Disponível em: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00036/full

POLAKOF, S.; PANSERAT, S.; SOENGAS, J. L.; MOON, T. W. Glucose metabolism in fish: a review. Journal of Comparative Physiology B, v. 182, n. 8, p. 1015–1045, 2012. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00360-012-0658-7>.

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology, v. 132, n. 4, p. 739–761, 2002.

PROKKOLA, J. M.; NIKINMAA, M. Circadian rhythms and environmental disturbances - underexplored interactions. The Journal of Experimental Biology, v. 221, n. 16, p. jeb179267, 2018. Disponível em:

http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.179267>.

RADOVANOVIC, T.; BORKOVIC-MITIC, S.; PERENDIJA, B.; et al. Superoxide dismutase and catalase activities in the liver and muscle of barbel (Barbus barbus) and its intestinal parasite (Pomphoryinchus laevis) from the Danube river, Serbia. Archives of Biological Sciences, v. 62, n. 1, p. 97–105, 2010. Disponível em: http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0354-46641001097R>.

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

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X11001834>

ROBINSON, E. Antarctic fish: thermal specialists or adaptable generalists? University of Canterbury, Christchurch, New Zealand, 12. fev. 2008. Disponível em: <https://www.semanticscholar.org/paper/Antarctic-Fish%3A-Thermal-Specialists-or-Adaptable-Robinson/df4fa3215a036388bda4819c858641dd99210a2a>...

ROSSI, A.; BACCHETTA, C.; CAZENAVE, J. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of Hoplosternum littorale (Teleostei, Callichthyidae). Ecological Indicators, v. 79, p. 361–370, 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X17302182>

RUI, L. Energy metabolism in the liver. In: R. Terjung (Org.); **Comprehensive Physiology**. p.177–197, 2014. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c130024>.

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

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; VERA, L. M.; et al. Environmental cycles, melatonin, and circadian control of stress response in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 279, 2019. Disponível em: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00279/full.

SCHIELZETH, H. Simple means to improve the interpretability of regression coefficients: *Interpretation of regression coefficients*. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, n. 2, p. 103–113, 2010. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1111/j.2041-210X.2010.00012.x>.

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

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

SILVA, E. M. P.; OLIVEIRA, R. H. F. Portable point-of-care device as alternative tool for monitoring blood glicose in lambari *Astyanax altiparanae*: stress and sex-specific effects. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 4, p. 557–568, 2017.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SILVA, A. P. DOS S.; SILVEIRA, A. N.; SILVEIRA, R. V. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033–1042, 2015. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X1500309X>.

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

SPEERS-ROESCH, B.; NORIN, T.; DRIEDZIC, W. R. The benefit of being still: Energy savings during winter dormancy in fish come from inactivity and the cold, not from metabolic rate depression. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1886, 2018.

SUN, S.; WU, Y.; YU, H.; et al. Serum biochemistry, liver histology and transcriptome

profiling of bighead carp *Aristichthys nobilis* following different dietary protein levels. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 832–839, 2019. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464818308350>.

THUESEN, E. V; MCCULLOUGH, K. D.; CHILDRESS, J. J. Metabolic enzyme activities in swimming muscle of medusae: is the scaling of glycolytic activity related to oxygen availability? **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 85, n. 3, p. 603–611, 2005. Disponível em: ">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S0025315405011537/type/journal_article>">https://www.cambridge.org/core/product/journal_article">https://www.cambridge.org/core/product/journal_article">https://www.cambridge.org/core/product/journal_article

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes: Mechanism against oxidative stress. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 99–104, 2005. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x>.

VARIS, J.; HAVERINEN, J.; VORNANEN, M. Lowering temperature is the trigger for glycogen build-up and winter fasting in Crucian carp (*Carassius carassius*). **Zoological Science**, v. 33, n. 1, p. 83–91, 2016. Disponível em: http://www.bioone.org/doi/10.2108/zs150072>.

VIANA, L. F.; SUAREZ, Y. R.; LIMA-JUNIOR, S. E. Influence of environmental integrity on the feeding biology of *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) in the Ivinhema river basin. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 35, n. 4, p. 541–548, 2013. Disponível em:

http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/19497>.

VIEIRA, V. A. R. O.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 1–8, 2013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045612000920>.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; MENDONÇA, V.; et al. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. **Marine Environmental Research**, v. 97, p. 10–14, 2014. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113614000233>.

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

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X12001719>.

WANG, M.; ZHU, Z. Nrf2 is involved in osmoregulation, antioxidation and immunopotentiation in *Coilia nasus* under salinity stress. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 1453–1463, 2019. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2019.1673671.

WANG, Y.; LI, C.; PAN, C.; et al. Alterations to transcriptomic profile, histopathology, and oxidative stress in liver of pikeperch (*Sander lucioperca*) under heat stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 95, n. October, p. 659–669, 2019. Elsevier. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.014>.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; et al. Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. **Aquaculture**, v. 481, n. June, p. 169–176, 2017. Elsevier. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.002>.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 77, p.325–333, 1981. Elsevier. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687981770460.

WHITE, C. R.; ALTON, L. A.; FRAPPELL, P. B. Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1734, p. 1740–1747, 2012.

YAMASHITA, M.; YABU, T.; OJIMA, N. Stress protein HSP70 in fish. Aqua-BioScience Monographs, v. 3, n. 4, p. 111–141, 2010.

ZHDANOVA, I. V.; REEBS, S. G. Circadian Rhythms in Fish. **Fish Physiology**, v. 24, n. C, p. 197–238, 2005.

CAPÍTULO II - ESTRATÉGIAS METABÓLICAS EM BRÂNQUIAS DE *Astyanax lacustris* SOB ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA

RESUMO

Animais ectotérmicos, como a maioria dos peixes, são afetados pelas alterações de temperatura do ambiente e estão evolutivamente adaptados para ajustar seu metabolismo e manter a homeostase diante das variações térmicas da água. A espécie de peixe de água doce Astyanax lacustris é um recurso amplamente utilizado para alimentação, aquicultura e pesquisa e está distribuída na região subtropical da América do Sul, se caracterizando como um bom modelo para estudos de impactos ambientais. O objetivo deste trabalho foi avaliar as respostas metabólicas em brânquias de A. lacustris sob estresse térmico, utilizando biomarcadores do metabolismo de carboidratos e proteínas, da defesa antioxidante e de danos oxidativos, submetidos à baixa (15 °C) e alta temperatura (31 °C), com controles a 23 °C, durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas de exposição, utilizando análise pelo método espectrofotométrico. Os resultados demonstraram que não houveram alterações no metabolismo de carboidratos em baixa temperatura (15 °C), pois os biomarcadores destas vias metabólicas não foram alterados. As defesas antioxidantes foram reduzidas, com exceção de um aumento pontual na atividade da glutationa peroxidase (GPx) em 96 h. Ocorreu estresse oxidativo em 12 h, verificado pelo aumento nos níveis de carbonilação de proteínas (PCO), demonstrando que as defesas antioxidantes não foram capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs). Já em alta temperatura, ocorreu aumento na glicólise, ciclo do ácido cítrico e inibição da via das pentoses fosfato, indicando maior demanda energética. A alta temperatura também alterou as defesas antioxidantes, com maior atividade da GPx, glutationa redutase (GR) e glutationa S-transferase (GST). Mas, o sistema de defesa antioxidante não foi capaz de proteger os tecidos branquiais da ação das EROs, pois ocorreu aumento de PCO em 6 e 24 h, indicando estresse oxidativo. Estes resultados demostram que as respostas metabólicas foram diferentes para temperaturas de inverno e verão, sendo que a alta temperatura afetou as brânquias de forma mais intensa. Apesar da ocorrência de estresse oxidativo, A. lacustris conseguiu recuperar a homeostase diante do estresse térmico, demonstrando que está adaptada às variações térmicas do ambiente.

Palavras-chave: Homeostase. Metabolismo aeróbico. Espécies Reativas de Oxigênio. Defesa

antioxidante. Estresse oxidativo.

1 INTRODUÇÃO

O estresse pode ser provocado por qualquer fator que ameace o estado homeostático de um organismo e que desencadeia um conjunto de respostas para manutenção do equilíbrio metabólico (BARTON, 2002; SCHRECKK; TORT, 2016). Entretanto, situações severas de estresse, por intensidade e/ou duração, podem comprometer a resposta fisiológica e prejudicar sua saúde e bem-estar (BARTON, 2002).

A temperatura do ambiente tem grande influência sobre os organismos biológicos, em especial aos peixes ectotérmicos (O'BRIEN, 2011; WEN et al., 2018). Baixas temperaturas impõem um desafio para a manutenção das taxas de ATP, uma vez que as reações químicas são reduzidas nessas condições (O'BRIEN, 2011); já o aumento de temperatura provoca hipóxia nos ambientes aquáticos naturais, além de aumentar a demanda energética nos tecidos e a produção de EROs, resultando em estresse oxidativo (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; LUSCHAK, 2011; POL; FLIK; GORISSEN, 2017; WEN et al., 2018). Estratégias adaptativas identificadas em espécies de peixes demonstram ajustes metabólicos selecionados evolutivamente e que garantem a sobrevivência em situação de estresse ambiental, com ajustes entre anabolismo e catabolismo e na produção e demanda de energia, a partir das fontes moleculares de carboidratos, proteínas e ácidos graxos (POL; FLIK; GORISSEN, 2017).

A manutenção da homeostase energética e antioxidante em situações de estresse térmico é bem documentada em peixes de água doce, tanto para baixas quanto para altas temperaturas (DALVI et al., 2017; GRIM; MILES; CROCKETT, 2010; KAMMER; ORCZEWSKA; O'BRIEN, 2011; LERMEN et al., 2004; ROSSI et al., 2017; WEN et al., 2017, 2018), no entanto, as respostas ao estresse térmico são diferentes entre as espécies, órgãos analisados e intensidade ou duração do estresse. Além disso, a grande diversidade e biogeografia dos peixes teleósteos impede uma descrição comum dos efeitos que o estresse térmico provocam nesses peixes (BALASCH; TORT, 2019).

Os peixes de água doce do gênero *Astyanax* são abundantes em número de espécies, distribuídas na região Neotropical (ORNELAS-GARCÍA; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ; DOADRIO, 2008). A espécie *Astyanax lacustris* Garutti e Britski, 2000 (LUCENA; SOARES, 2016), popularmente conhecida como lambari do rabo amarelo, é registrada na região subtropical da América do Sul (LUCENA; SOARES, 2016). São peixes de pequeno porte (10 – 15 cm de comprimento), que habitam pequenos lagos, riachos e rios,

apresentando hábito alimentar onívoro (BENNEMANN et al., 2005; VIANA; SUAREZ; LIMA-JUNIOR, 2013). Esta espécie é considerada como um bom modelo em estudos ambientais (GNOCCHI et al., 2020; MACÊDO et al., 2020; STEVANATO; OSTRENSKY, 2018; ZAFRA-LEMOS et al., 2021).

A principal função das brânquias é a respiração, promovida pela absorção de oxigênio (O₂) e excreção de gás carbônico (CO₂) da água (FIGURA 1). Mas, além da respiração, as brânquias possuem outras funções críticas, como o balanço ácido-base, regulação iônica e osmótica (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; FOYLE et al., 2020) e, pelo fato de serem diretamente expostas ao ambiente aquático, são sensíveis às alterações ambientais e desempenham um importante papel na resposta fisiológica ao estresse térmico, sendo de grande interesse para a investigação dos efeitos das mudanças de temperatura em peixes (WEN et al., 2018).

Nos peixes de água doce, hiper osmóticos em relação ao ambiente, as brânquias e os rins participam da osmorregulação; o equilíbrio hídrico é mantido com a produção e excreção de grandes volumes de urina diluída, enquanto que a homeostase iônica é alcançada com proteínas de translocação de íons nas brânquias e nos rins, absorvendo íons ativamente da água, bem como reabsorvendo da urina (PERRY et al., 2003). A absorção ativa de íons, como sódio (Na⁺), cloro (Cl⁻) e cálcio (Ca²⁺), ocorre em células especializadas, os ionócitos, que são ricas em mitocôndrias para a produção de ATP e representam grande consumo de energia nas brânquias (DYMOWSKA, HWANG; GOSS, 2012).

Já a amônia, originada a partir do catabolismo de aminoácidos e outros compostos nitrogenados, principalmente no fígado, é excretada sobretudo pelas brânquias, a partir da difusão de amônia do sangue para a água utilizando os íons H⁺ resultantes da conversão de CO₂ em íon bicarbonato (HCO₃⁻) e H⁺, podendo ser excretada também a partir do bombeamento ativo dos íons H⁺ pela enzima do epitélio branquial H⁺-ATPase (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; WILKIE, 1997).



FIGURA 1 – ESTRUTURA BRANQUIAL EM PEIXES ACTINOPTERÍGEOS

FONTE: Adaptado de Evans, Piermarini e Choe (2005)

Estudar os efeitos do estresse térmico de forma específica torna-se uma ferramenta para entender os mecanismos adaptativos de cada espécie e fornece dados para a fisiologia comparada. Da mesma forma, as funções específicas de cada órgão fazem com que as respostas sejam variadas nos diferentes órgãos de um mesmo organismo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos do estresse térmico no metabolismo de carboidratos e proteínas, na defesa antioxidante e em danos oxidativos em brânquias de *A. lacustris*, na condição de choque térmico em baixa e alta temperatura.

1.2.2 Objetivos específicos

• Investigar as possíveis variações na atividade das enzimas do metabolismo energético: hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS) e malato desidrogenase (MDH), influenciadas por estresse térmico de baixa e alta temperatura em brânquias de *A. lacustris*;

• Avaliar as possíveis alterações na atividade das enzimas do metabolismo de proteínas: aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e glutamato desidrogenase (GLDH), influenciadas por estresse térmico de baixa e alta temperatura em brânquias de *A. lacustris*;

• Investigar as possíveis variações na atividade das enzimas da defesa antioxidante: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa S-tranferase (GST), GPx (glutationa peroxidase), GR (glutationa redutase) e G6PDH (glicose 6 fosfato desidrogenase) e níveis de glutationa reduzida (GSH), influenciadas pelo estresse térmico de baixa e alta temperatura em brânquias de *A. lacustris;*

• Avaliar a ocorrência de danos oxidativos em lipídeos e em proteínas, quantificando a peroxidação lipídica (LPO) e a carbonilação de proteínas (PCO), frente à estresse térmico de baixa e alta temperatura em brânquias de *A. lacustris*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DE A. lacustris E BIOÉTICA

Foram utilizados 240 exemplares de *A. lacustris* (comprimento padrão: $6,08 \pm 0,84$ cm; peso médio: $8,84 \pm 3,2$ g), de ambos os sexos, os quais foram coletados com redes de pesca em lagos artificiais no Centro de Pesquisas e Extensão em Aquicultura Ildo Zago, situado no município de União da Vitória-PR, nas seguintes coordenadas geográficas: $26^{\circ}13'12.15''S$; 51° 7'51.07''O. Para a coleta, foi obtida licença ambiental junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio: número 63551-1) e licença para experimentação animal, junto à Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA-BIO/UFPR: número 1228).

2.2 DESIGN EXPERIMENTAL E AMOSTRAGEM

Após a coleta, os peixes foram levados para um tanque de 830 litros, no qual permaneceram durante 3 dias, em temperatura de 23 °C \pm 1 °C, para aclimatação e recuperação do estresse da captura (FORGATI et al., 2017; SCHLEGER et al., 2021; SOUZA et al., 2018; RESENDE et al., 2022). O período de 72 horas é suficiente para que *A. lacustris* consiga se recuperar do estresse do transporte e manipulação (SILVA; OLIVEIRA, 2017). A água utilizada para abastecimento do tanque era de nascente própria, com vazão contínua de 4 L/min (BUENO-KRAWCZYK et al., 2015; LERMEN et al., 2004).

Foi mantida aeração constante e fotoperíodo natural, de aproximadamente 13:30 horas luz/10:30 horas escuro (BAGNYUKOVA et al., 2007; CHUNG, 2000; LIRA et al., 2018; NAVARRO et al., 2014). Durante a aclimatação dos peixes, foram monitoradas as condições físico-químicas da água: oxigênio dissolvido (9,31 ± 2,17 mg/L), amônia tóxica (NH₃) (0,009 ± 0,004 mg/L), pH (7,4 ± 0,31), nitrato (0,00 mg/L), nitrito (0,00 mg/L), dureza (75 ± 9 mg/L de CaCO₃) e sem presença de cloro residual.

Após a aclimatação, os peixes foram submetidos aos experimentos de choque térmico de baixa e alta temperatura, sendo separados randomicamente e transferidos em grupos de 10 indivíduos para aquários experimentais (densidade máxima de 1,8 g de peixe/L de água (CHUNG, 2000; VIEIRA; CORREIA; MOREIRA, 2013), com temperaturas de 15

 ± 1 °C ou 31 ± 1 °C e aeração constante (LERMEN et al., 2004), nas quais permaneceram durante 2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas. Para cada situação experimental, foi mantido um grupo controle a 23 ± 1 °C. Cada aquário experimental era limpo por sucção a cada 2 dias, com renovação de metade da água (LERMEN et al., 2004).

O controle de temperatura da água dos aquários era mantido com termostatos eletrônicos submersos reguláveis (Aqua One[®], VigoAr[®] e Atman[®], com potência de 100 W) (FIGURA 2 – A). Para os experimentos de baixa temperatura (15 °C), os aquários foram mantidos no interior de um refrigerador horizontal (Consul/530 L), com controlador digital de temperatura (TC-900E POWER/07) (FIGURA 2 – B e C).



FIGURA 2 – PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Legenda: A = Aquário utilizado para os experimentos de alta temperatura e controle. B = Refrigerador horizontal com termostato, utilizado para os experimentos de baixa temperatura. C = Detalhe dos aquários no interior do refrigerador.

Os peixes foram alimentados a cada 24 horas, de forma simultânea nos grupos controles e experimentais, com ração comercial Supra[®] Aqua Line (teor de proteína de 42 %), em uma proporção de 1 % do peso animal (CHUNG, 2000; LERMEN et al., 2004). A

última alimentação foi fornecida entre 22 e 24 horas antes da eutanásia (MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016; VINAGRE et al., 2014), desta forma, os resultados não são afetados pelo estado nutricional dos peixes (HEMRE; KARZ, 1997; SOUZA et al., 2018). Durante a alimentação, foi observado se os peixes consumiam todo o alimento e se apresentavam mobilidade em busca do mesmo.

Após o fim de cada período de exposição ao choque térmico de baixa ou alta temperatura ou nos grupos controles, foram amostrados 10 indivíduos, os quais foram retirados de dois aquários diferentes, caracterizando duplicata. Cada aquário foi considerado como unidade experimental, e os 5 peixes retirados aleatoriamente de cada aquário foram considerados como unidades amostrais. 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%) e eutanasiados com secção medular, sendo imediatamente dissecados e as brânquias coletadas. Foram retirados os arcos branquiais e os filamentos branquiais foram armazenados imediatamente em gelo e armazenados em nitrogênio líquido.

2.3 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

As análises de espectrofotometria de massa foram realizadas em espectrofotômetro de microplaca (Epoch Microplate Sprectrophotometer, BioTek, Winooski, VT, USA), em triplicata, com concentração saturante de substrato e com condições ótimas de pH, em temperatura ambiente de 22 °C (ROBINSON, 2008). Para a determinação da concentração de proteínas totais, foi utilizado o método de Bradford (1976), utilizando Coomassie Brilliant Blue G-250 e albumina de soro bovina (BSA) como padrão (absorbância em 595 nm).

2.3.1 Determinação da atividade das enzimas do metabolismo de carboidratos e proteínas

As amostras de brânquias foram pesadas e homogeneizadas, numa proporção de 1:5 (p.v⁻¹), em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,4) e sonicadas por 15 segundos (máximo de 18 J), para ruptura de membranas e liberação das enzimas. Após, foram centrifugadas a 14.000 G por 10 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi obtido para determinação dos níveis de atividade enzimática.

A atividade da hexoquinase (HK, EC 2.7.1.1) foi mensurada conforme Baldwin et al. (2007), com acompanhamento da redução de NAPD+ na presença de glicose-6-fosfato

desidrogenase (G6PDH), em sistema de reação contendo 50 mM de tampão imidazol (pH 7,4) 2 mM de glicose, 2 mM de ATP, 10 μ M de MgCl2, 0,4 mM de NADP+, 1 mM de ditiotreitol, 2 mM de KCl e 0,3 U/mL de G6PDH, em comprimento de onda de 340 nm.

A atividade da fosfofrutoquinase (PFK, EC 2.7.1.11) foi avaliada seguindo a metodologia de Baldwin et al. (2007), em sistema de reação com tampão Tris-HCl a 50 mM (pH 8,2), 10 mM de MgCl2, 1 mM de ATP, 0,15 mM de NAPH, 0,15 mM de NADH, 2 mM de AMP, 250 mM de KCl, 1 U/mL de glicerol-3-fosfato desidrogenase (GPDH), 1,2 U/mL de aldolase (ALD), 10 U/mL de triose fosfato isomerase (TPI) e 5 mM de frutose-6-fosfato, em comprimento de onda de 340nm.

A atividade da piruvato quinase (PK, EC 2.7.1.40) foi determinada a partir da oxidação de NADH em NAD+ durante a formação de lactato a partir do piruvato gerado pela desfosforilação de fosfoenolpiruvato (LEVESQUE et al., 2002), em meio de reação com tampão imidazol a 50 mM (pH 7,4), 10 mM de MgCl2, 25 mM de KCl, 150 μM de NADH, 5 mM de ADP, 5 mM de fosfoenolpiruvato (PEP) e 9 U/mL de lactato desidrogenase (LDH). A absorbância foi medida em 340 nm.

A atividade da lactato desidrogenase (LDH, EC 1.1.1.27) foi medida a partir da oxidação de NADH, decorrente da conversão de piruvato a lactato (THUESEN; MCCULLOUGH; CHILDRESS, 2005), em sistema de reação contendo tampão Tris HCl a 50 mM (pH 7,4), 1 mM de piruvato de sódio, 100 mM de KCl e 0,25 mM de NADH, com absorbância medida em 340 nm.

A atividade da citrato sintase (CS, EC 4.1.3.7) foi determinada a partir do complexo de CoA-SH com 5,5' – ditio-bis-(ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) (SABOROWSKI; BUCHHOLZ, 2002). O meio de reação foi formado com 50 mM de tampão Tris HCl (pH 7,4), 100 mM de KCl, 1 mM de EDTA, 200 μ M de DTNB, 200 μ M de acetil-SCoA e 500 μ M de oxaloacetato, com absorbância em 412 nm.

A atividade da malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1) foi verificada com a conversão de malato em oxaloacetato, com medição da oxidação de NADH (CHILDRESS; SOMERO, 1979), em meio de reação com tampão Tris-HCl a 50 mM (pH 7,4), 0,4 mM de oxaloacetato, 20 mM de MgCl2 e 150 µM de NADH, com absorbância medida em 340nm.

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, EC 1.1.1.49) foi medida conforme Ciardiello, Camardellla e Di Prisco (1995), com a redução de NADP+ com a oxidação de glicose-6-fosfato. O sistema de reação consistiu em 100 mM de tampão Tris-

HCl (pH7,4), 0,2 mM de NADP+ e 1 mM de glicose-6-fosfato, com leitura em absorbância de 340 nm.

A atividade da glutamato desidrogenase (GLDH, EC 1.4.1.3) foi determinada pela formação de NADPH, a partir da oxidação de NADP+, conforme Ciardiello et al. (2000), em sistema de reação contendo tampão Tris HCl a 100 mM (pH 7,4), 2 mM de NADP+, 0,8 mM de ADP e 40 mM de L-glutamato. A absorbância foi medida em 340 nm.

A atividade da aspartato aminotransferase / transaminase glutâmico-oxalacética (AST/TGO, EC 2.6.1.1), foi determinada a partir de kit comercial (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, referência: 352, MS 80022230149), com formação de glutamato e oxaloacetato, com absorbância medida em 505 nm.

A atividade da alanina aminotransferase / transaminase glutâmico pirúvica (ALT/TGP, EC 2.6.1.2), foi realizada a partir de kit comercial (Gold Analisa Diagnóstica Ltda, referência 353, MS 80022230150), com formação de glutamato e piruvato, com absorbância medida em 505 nm.

2.3.2 Determinação da atividade dos marcadores do sistema de defesa antioxidante

As amostras de brânquias foram pesadas e homogeneizadas em 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4), numa proporção de 1:5 (p.v⁻¹) em banho de gelo e centrifugadas a 12.000 G a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi obtido para determinação dos níveis de marcadores de estresse oxidativo.

A atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada pelo método de Crouch et al. (1981), pela capacidade de inibição da redução de cloreto de azul de nitrotetrazólio (NBT) para azul formazan pelo superóxido (O2-), que é gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. O sistema de reação foi preparado com 0,05 mM de EDTA, 100 µM de NBT e 36,85 mM de cloreto de hidroxilamina em 91 mM de tampão carbonato de sódio (pH 10,2), com absorbância medida em 560 nm.

A atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pela degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água, em meio de reação contendo 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,0), 30 mM de H_2O_2 . A redução da absorbância do H_2O_2 foi acompanhada em 240 nm (AEBI, 1984).

A atividade da glutationa peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) foi medida através da oxidação de NADPH. A enzima utiliza glutationa reduzida (GSH) para reduzir peróxido

orgânico originando glutationa dissulfídica (GSSG). Esta última é reduzida pela enzima glutationa redutase (GR) utilizando elétrons doados pelo NADPH (WENDEL, 1981). O meio de reação continha 0,1 M de tampão fosfato de sódio (pH 7,0), 2 mM de azida sódica, 0,2 mM de NADPH, 2 mM de GSH, 1 U/mL de GR e 0,5 mM de H₂O₂, com absorbância medida em 340 nm.

A atividade da glutationa redutase (GR, EC 1.8.1.7) foi mensurada de acordo com a metodologia de Sies et al. (1979), na conversão de GSSG em GSH, em 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 7,6) em EDTA 5 mM, 0,5 mM de NADPH e 5 mM de GSSG. A absorbância foi medida em 340 nm.

A atividade da glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) foi avaliada após a conjugação do grupo tiol da GSH ao substrato de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), onde forma-se como produto da reação, o conjugado GS-DNB, conforme Keen, Habig e Jakoby (1976). O meio de reação foi formado com 0,1 M de tampão fosfato de potássio (pH 6,5), 1,5 mM de GSH e 2 mM de CDNB. A absorbância foi medida em 340 nm.

Os níveis de glutationa reduzida e outros tióis foram determinados através da metodologia de Sedlak e Lindsay (1968). O método baseia-se na precipitação de proteínas e posterior reação de tióis não proteicos com 0,16 mM do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), gerando um produto que absorve luz em 415 nm. Os valores foram expressos em nmol de tióis por mg de proteína.

2.3.3 Determinação de marcadores de danos oxidativos

Para a determinação da peroxidação lipídica (LPO), foi utilizado o método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Federici, Shaw e Handy (2007), com modificações. O método consiste na medição de um dos produtos finais da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA), cuja reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) pode ser lida em absorbância de 535 nm. Os valores foram expressos em µmols de MDA por mg de proteína.

O dano oxidativo em proteínas (PCO) foi determinado pelo método de Levine et al. (1994), que consiste na reação das proteínas carboniladas com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando dinitrofenil hidrazonas que podem ser medidas em absorbância de 360 nm. Os resultados foram expressos em nmols de carbonilas por mg de proteína.

Os valores de atividade enzimática e dos marcadores não enzimáticos (GSH, LPO e PCO) foram padronizados (z-transformados), considerando a média como 0 e o desvio padrão como 1 (SCHIELTZETH, 2010), para que as variáveis tenham a mesma ordem de grandeza. O efeito das duas variáveis independentes: temperatura (15 °C em comparação com 23 °C ou 31°C em comparação com 23 °C) e tempo (2, 6, 12, 24, 48 e 96 horas) e a possível interação entre elas foi avaliado pela análise de variância (ANOVA 2 fatores), a um nível de 5% de significância. Para os marcadores em que ocorreu efeito significativo do fator tempo ou interação entre tempo e temperatura, foi aplicado o teste de Tukey, como teste *post hoc*, para cada variável resposta, a um nível de 5% de significância.

3 RESULTADOS

Do total de peixes utilizados no experimento, 9 morreram durante os ensaios (7 peixes dos grupos controle e 2 peixes expostos a 15 °C). Os resultados da análise estatística (Anova 2 fatores) constam na Tabela 1. Os níveis de todos os biomarcadores avaliados constam nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, apresentados pela média da atividade enzimática ou níveis do marcador e erro padrão. O Quadro 1 apresenta um resumo geral dos resultados obtidos dos biomarcadores metabólicos de brânquias sob estresse térmico.

3.1 EFEITOS DA BAIXA TEMPERATURA NO METABOLISMO BRANQUIAL

Os peixes expostos a 15 °C apresentaram baixa atividade natatória e baixa ingestão de alimentos em comparação aos peixes expostos a 31 °C. A redução de temperatura para 15 °C não afetou a atividade das enzimas que atuam no metabolismo de carboidratos (HK, PFK, PK, LDH, CS, MDH e G6PDH) nas brânquias dos peixes, quando comparadas com os grupos controles (FIGURA 3 – A, B, C, D, E, F e G).

FIGURA 3 – BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM BRÂNQUIAS DE A. lacustris SOB ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA





Legenda: HK-hexoquinase; PFK-fosfofrutoquinase; PK-piruvato quinase; CS-citrato sintase; MDH-malato desidrogenase e G6PDH-Glicose-6-fosfato desidrogenase. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Em relação ao metabolismo de proteínas, a baixa temperatura reduziu a atividade da GLDH em 48 horas (30 %) e 96 horas (48 %) (FIGURA 4).

FIGURA 4 – ATIVIDADE DA GLDH DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: Os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

A baixa temperatura não afetou a atividade da AST (FIGURA 5).

FIGURA 5 – ATIVIDADE DA AST DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: Os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

A baixa temperatura aumentou em 36 % a atividade da ALT em 2 horas e reduziu em 41 % em 12 horas (FIGURA 6).

FIGURA 6 – ATIVIDADE DA ALT DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: Os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

Em relação às variações na atividade enzimática ao longo do tempo nos peixes expostos à baixa temperatura, não foi observada variação na atividade da enzima PK, porém, as demais apresentaram variações (Tabela 2), sendo que nas enzimas HK, PFK, LDH, CS, MDH, G6PDH e AST, foi observado comportamentos de variação ao longo do tempo bastante semelhantes entre o grupo controle (23 °C) e tratamento (15 °C). A HK apresentou maior atividade em 12 e 24 horas em relação aos demais tempos do ensaio (FIGURA 3 – A). A atividade da PFK foi maior em 2 horas, ocorrendo redução gradual da atividade em 6, 12 e 24 horas, com novo aumento de atividade em 48 e 96 horas (FIGURA 3 – B). A atividade da LDH apresentou oscilação ao longo das 96 horas, com maiores valores em 6 e 24 horas, valores intermediários em 2, 12 e 48 horas e menores valores em 96 horas (FIGURA 3 – D). A atividade da CS apresentou oscilações nas 96 horas de ensaio, com maiores valores em 2, 6 e 48 horas e menores valores em 12, 24 e 96 horas (FIGURA 3 – E). A atividade da MDH apresentou oscilações de atividade ao longo das 96 horas de ensaio, com valores intermediários em 2 e 12 horas, maiores valores em 6 e 24 horas e menores valores em 6 e 24 horas de ensaio, com valores intermediários em 2 e 12 horas, maiores valores em 6 e 24 horas de ensaio, com valores intermediários em 2 e 12 horas, maiores valores em 6 e 24 horas e menores valores em 6 e 24 horas e menores valores em 6 e 24 horas de ensaio, com valores intermediários em 2 e 12 horas, maiores valores em 6 e 24 horas e menores valores em 6 e

valores em 48 e 96 horas (FIGURA 3 – F). A G6PDH apresentou atividade baixa estável nas primeiras 24 horas, aumentando em 48 e 96 horas (FIGURA 3 – G). Nos animais do grupo controle (23 °C), a enzima GLDH manteve-se estável nas primeiras 12 horas de ensaio, ocorrendo aumento em 24 e 48 horas em comparação com 12 horas, com retorno aos níveis iniciais de atividade em 96 horas; enquanto que nos animais do grupo tratamento (15 °C), a atividade da GLDH manteve-se constante, ocorrendo uma redução pontual da atividade em 96 horas, em comparação a 24 horas (FIGURA 4). A atividade da AST oscilou ao longo do ensaio, com maiores valores em 2, 6 e 48 horas, valores intermediários em 12 horas e menores valores em 24 e 96 horas (FIGURA 5). A atividade da ALT dos animais do grupo controle (23 °C) apresentou-se estável ao longo do ensaio, com um único momento de redução, em 24 horas; já nos animais do grupo tratamento (15 °C), a atividade da ALT foi alta em 2, 6 e 48 horas, baixa em 12 e 24 horas e intermediária em 96 horas (FIGURA 6).

Em relação aos marcadores da defesa antioxidante e do estresse oxidativo, a redução da temperatura para 15 °C não afetou a atividade das enzimas SOD e CAT, bem como não alterou os níveis de GSH (FIGURA 7 - A, B e C, respectivamente).

FIGURA 7 – BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Legenda: SOD-superóxido dismutase; CAT-catalase; GSH-glutationa reduzida. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

A baixa temperatura alterou a atividade da GPx, com uma redução de 51 % em 12 horas e aumento de 97 % em 96 horas (FIGURA 8).

FIGURA 8 – ATIVIDADE DA GPX DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA


Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

A baixa temperatura alterou a atividade da GR, com diminuição em 24 horas (30 %) e 48 horas (29 %) (FIGURA 9).

FIGURA 9 – ATIVIDADE DA GR DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

A baixa temperatura afetou a atividade da GST, que reduziu 30 % em 2 horas (FIGURA 10).

FIGURA 10– ATIVIDADE DA GST DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

Em relação aos danos oxidativos, a baixa temperatura não alterou o marcador de danos lipídicos (LPO), mas aumentou em 115 % os danos proteicos (PCO) em 12 horas, com posterior redução de 62 % em 48 horas (FIGURA 11 - A e B, respectivamente).



FIGURA 11 – BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM BRÂNQUIAS DE A. lacustris SOB CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA

Legenda: LPO-peroxidação lipídica e PCO-carbonilação proteica. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (15 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Em relação às alterações ao longo do tempo nos marcadores da defesa antioxidante e de danos oxidativos nos peixes expostos à baixa temperatura, a atividade da enzima SOD e as concentrações dos marcadores de defesa, GSH e de dano, LPO, não apresentaram variação ao longo do ensaio. A enzima CAT apresentou aumento na atividade em 24 e 48 horas, ambas em relação a 2 horas, nos grupos controle (23 °C) e tratamento (15 °C) (FIGURA 7 – B). Em animais submetidos a 23 °C, a atividade da GPx, apresentou valores baixos nas primeiras 24 horas, com exceção de um aumento em 12 horas; além de apresentar valores intermediários em 48 e 96 horas; nos animais do grupo tratamento (15 °C), foi observado aumento gradual da GPx, nas primeiras 12 horas, com redução da atividade em 24 horas e novo aumento gradual, em 48 e 96 horas (FIGURA 8). A atividade da GR apresentou pequenas variações nas duas temperaturas de análise nas primeiras 12 horas, havendo, nos animais submetidos a 23 °C, um aumento gradual em 24 e 48 horas, com retorno aos níveis de atividade iniciais em 96 horas; nos animais submetidos a 15 °C, houve aumento da atividade em 48 horas, em relação a 2 horas (FIGURA 9). A GST apresentou comportamento bastante semelhante entre o grupo controle (23 °C) e tratamento (15 °C) ao longo do tempo de exposição, sendo que nos animais submetidos a 23 °C, apresentou atividade alta em 2 horas quando comparado aos demais períodos de ensaio, e em 6 horas, quando comparado a 48 e 96 horas; já o grupo a 15 °C apresentou atividade elevada da GST em 2, 6 e 12 horas, quando comparado a 24, 48 e 96 horas (FIGURA 10). No caso dos níveis de PCO, não houve variação ao longo do tempo nos animais submetidos a 23 °C e, no grupo a 15 °C, houve aumento em 6 e 12 horas, em comparação a 2 e 48 horas (FIGURA 11 – B).

3.2 EFEITOS DA ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO BRANQUIAL

Os peixes expostos a 31 °C apresentaram maior atividade natatória em comparação com os peixes expostos a 15 °C e se alimentaram imediatamente após a oferta de alimento, consumindo-o totalmente. O aumento de temperatura para 31 °C não afetou a atividade das enzimas HK, LDH e MDH, em relação ao grupo controle (FIGURA 12 – A, B e C, respectivamente).



FIGURA 12 – BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS EM BRÂNQUIAS DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES SOB ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA

Legenda: HK-hexoquinase; LDH-lactato desidrogenase; MDH-malato desidrogenase. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

O aumento de temperatura provocou alteração na atividade da PFK, com aumento em 2 horas (53 %) e 6 horas (147 %) (FIGURA 13).

FIGURA 13 – ATIVIDADE DA PFK DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

O aumento de temperatura alterou a atividade da PK, com aumento de 148 % em 2 horas (FIGURA 14).

FIGURA 14 – ATIVIDADE DA PK DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

O aumento de temperatura alterou a atividade da CS, com aumento de 48 % em 2 horas (FIGURA 15).

FIGURA 15 – ATIVIDADE DA CS DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

O aumento de temperatura alterou a atividade da G6PDH, com redução na atividade em 24 horas (66 %) e 96 horas (36 %) (FIGURA 16).



FIGURA 16 – ATIVIDADE DA G6PDH DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* EXPOSTO A CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA

Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

Em relação ao metabolismo de proteínas, o aumento de temperatura para 31 °C não afetou a atividade enzimática da GLDH, AST e ALT, em comparação aos grupos controle (FIGURA 17 – A, B e C, respectivamente).



FIGURA 17 – BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE PROTEÍNAS DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* SOB CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA

Legenda: GLDH-glutamato desidrogenase; AST-aspartato aminotransferase; ALT-alanina aminotransferase. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

Em relação às variações na atividade das enzimas ao longo do tempo nos peixes expostos à alta temperatura, a enzima GLDH não apresentou variação. As enzimas HK, LDH, MDH, AST e ALT apresentaram variações ao longo do tempo do ensaio, com comportamentos semelhantes nos grupos controle (23 °C) e tratamento (31 °C). As enzimas

PFK, PK, CS e G6PDH apresentaram variações ao longo do tempo com comportamentos diferentes para os grupos controle (23 °C) e tratamento (31 °C). A HK teve aumento na atividade em 12 e 24 horas em relação aos demais períodos do ensaio (FIGURA 12 – A). A PFK apresentou atividade estável durante as 96 horas de ensaio no grupo controle (23 °C), ocorrendo apenas uma redução em 24 horas, quando comparada com 2 e 48 horas. Nos animais do grupo tratamento (31 °C), as maiores atividades da PFK ocorreram em 2 e 6 horas e as menores atividades foram observadas em 12 e 24 horas, com valores intermediários em 48 e 96 horas do ensaio (FIGURA 13). A atividade da PK nos grupos controle (23 °C) esteve baixa em 2 horas, apresentando nível de atividade intermediário em 6 horas e mais elevado em 12 e 24 horas, voltando a níveis intermediários em 48 e 96 horas. Para os animais submetidos ao tratamento (31 °C), não houve variação na atividade da enzima PK (FIGURA 14). A LDH apresentou atividade reduzida em 2 horas de ensaio, com aumento de atividade em 6, 12 e 24 horas e retorno aos níveis iniciais de atividade em 48 e 96 horas (FIGURA 12 – B). A atividade da CS apresentou-se reduzida em 2 horas de ensaio nos grupos controle (23 °C), ocorrendo aumento de 6 a 24 horas e retorno aos níveis iniciais de atividade em 48 e 96 horas; nos grupos de tratamento (32 °C), a atividade da CS esteve com níveis altos em 2 e 24 horas, níveis intermediários em 6, 12 e 48 horas e níveis reduzidos de atividade em 96 horas (FIGURA 15). A MDH apresentou oscilação de atividade ao longo dos períodos de ensaio, ocorrendo atividade intermediária em 2 e 12 horas, atividade alta em 6 e 24 horas, com posterior aparente estabilização em baixa atividade em 48 e 96 horas de ensaio (FIGURA 12 - C). A G6PDH apresentou atividade reduzida estável nos grupos controle (23 °C) em 2, 6 e 12 horas, com posterior aumento em 24, 48 e 96 horas; nos animais dos grupos de tratamento (31 °C), a atividade da G6PDH esteve reduzida nas primeiras 24 horas de ensaio, ocorrendo aumento da atividade em 48 horas e redução posterior para nível intermediário, em 96 horas (FIGURA 16). A atividade da AST aumentou em 6 horas, em relação a 2, 24 e 96 horas (FIGURA 17 – B). A atividade da ALT apresentou aumento em 6 e 48 horas quando comparada a 2, 12 e 24 horas, e em 96 horas, em relação a 12 e 24 horas (FIGURA 17 - C).

Em relação à defesa antioxidante, a elevação de temperatura para 31 °C não alterou a atividade da SOD e os níveis GSH (FIGURA 18 – A e B).

FIGURA 18 – BIOMARCADORES DA DEFESA ANTIOXIDANTE DE BRÂNQUIAS DE A. lacustris QUE NÃO SOFRERAM ALTERAÇÕES COM CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Legenda: SOD-superóxido dismutase; GSH-glutationa reduzida. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

O aumento de temperatura para 31 °C provocou diminuição em 26 % na atividade da CAT em 24 horas (FIGURA 19).



FIGURA 19 – ATIVIDADE DA CAT DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* SOB CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA

Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

O aumento de temperatura provocou alteração na atividade da GPx, com aumento de 267 % em 96 horas (FIGURA 20).



FIGURA 20 – ATIVIDADE DA GPX DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* SOB CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA

Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

O aumento de temperatura provocou aumento de 72 % na atividade da GR em 6 horas e diminuição de 27 % em 24 horas (FIGURA 21).

FIGURA 21 – ATIVIDADE DA GR DE BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* SOB CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

O aumento de temperatura provocou aumento na atividade da GST, em 6 horas (96 %), 12 horas (55 %), 24 horas (83 %) e 96 horas (129 %) (FIGURA 22).





Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

Em relação aos danos oxidativos, o aumento de temperatura não provocou alteração nos níveis de LPO, mas gerou aumento nos níveis de PCO em 6 horas (103 %) e 24 horas (95 %) (FIGURA 23 – A e B, respectivamente).



FIGURA 23 – BIOMARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS EM BRÂNQUIAS DE *A. lacustris* SOB CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA

Legenda: LPO-peroxidação lipídica e PCO-carbonilação proteica. Nota: os grupos controles (23 °C) são mostrados com barras brancas e os grupos experimentais (31 °C) são mostrados com barras pretas. As letras sobre as barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição. Asteriscos (*) indicam diferenças estatisticamente significativas ($p \le 0.05$) entre os peixes do grupo controle e experimentais. Os dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Em relação às alterações ao longo do tempo nos marcadores de defesa antioxidante e de danos oxidativos nos peixes expostos ao ensaio de alta temperatura (31 °C), não foi observada variação na atividade da enzima SOD tanto nos grupos controle (23 °C) quanto nos grupos tratamento (31 °C). A atividade da CAT aumentou em 24 horas no grupo a 23 °C, em relação aos demais tempos de exposição; e aumentou em 6 horas no grupo a 31 °C, em relação a 2, 12, 48 e 96 horas (FIGURA 19). A atividade da GPx, no grupo a 23 °C, teve aumento em 12 horas em relação a 2, 6 e 96 horas, enquanto que no grupo a 31°C apresentou menor atividade em 2 horas, em relação a 6, 12, 24 e 96 horas; e aumentou a atividade em 96 horas, quando comparada a 2, 6, 24 e 48 horas (FIGURA 20). Os níveis de GSH estiveram baixos em 2 horas, em comparação com 48 horas, tanto no grupo a 23 °C quanto a 31 °C (FIGURA 18 – B). Já a atividade da GR, nos grupos controles (23 °C), apresentou diminuição em 6 horas e aumento em 24 horas, em relação aos demais tempos do ensaio, cuja atividade foi em níveis intermediários; enquanto que no grupo a 31 °C, houve diminuição em 2 horas, em relação a 12 horas (FIGURA 21). A atividade da GST, nos grupos de controle (23 °C), apresentou maior atividade em 2 horas, valores intermediários em 6, 12, 24 e 96 horas e menor atividade em 48 horas, quando comparada a 2, 12 e 24 horas; nos grupos de tratamento (31 °C), a GST apresentou atividade estável, com redução em 48 horas (FIGURA 22). Os níveis de LPO, tanto nos grupos controle quanto nos grupos tratamento, mantiveram-se estáveis ao longo do ensaio, havendo apenas um aumento em 24 horas (FIGURA 23 – A). Os níveis de PCO, nos grupos controle (23 °C), aumentaram em 12 horas, em comparação com 2 e 24 horas; e no grupo a 31 °C estavam baixos em 2 horas, em comparação a 6 e 24 horas; e aumentaram em 6 horas, em relação a 2, 12, 48 e 96 horas (FIGURA 23 - B).

	Tempe	ratura X Te	mpo de o	exposição	Tempo de exposição			
	1	5°C	3	1°C	15	5°C	31	°C
	F	р	F	р	F	р	F	р
HK	1,29	0,28	2,3	0,051	130,82	<0,001*	41,58	<0,001*
PFK	1,24	0,3	3,35	0,007*	27,05	<0,001*	8,71	<0,001*
РК	1,44	0,22	2,73	0,02*	1,71	0,14	6,09	<0,001*
LDH	1,3	0,27	0,68	0,64	24,2	<0,001*	22,06	<0,001*
CS	0,67	0,65	2,69	0,02*	9,13	<0,001*	8,79	<0,001*
MDH	0,65	0,66	1,3	0,27	46,56	<0,001*	31,7	<0,001*
G6PDH	0,48	0,79	2,33	0,048*	18,13	<0,001*	20,67	<0,001*
GLDH	2,68	0,02*	0,58	0,71	5,23	<0,001*	1,9	0,1
AST	0,53	0,75	0,9	0,48	16,37	<0,001*	4,36	0,001*
ALT	6,17	<0,001*	1,94	0,09	23,48	<0,001*	18,55	<0,001*
SOD	2,17	0,06	0,88	0,5	2,22	0,061	2,06	0,08
CAT	0,73	0,6	2,34	0,04*	3,58	0,005*	11,72	<0,001*
GPx	3,61	0,005*	5,22	<0,001*	18,41	<0,001*	11,12	<0,001*
GSH	1,66	0,15	0,9	0,48	1,87	0,1	2,93	0,02*
GR	2,59	0,03*	8,13	<0,001*	9,51	<0,001*	8,91	<0,001*
GST	2,69	0,02*	3,07	0,012*	23,34	<0,001*	17,56	<0,001*
LPO	0,88	0,5	1,47	0,2	1,25	0,29	2,45	0,03*
PCO	3,81	0,004*	5,33	<0,001*	5,53	<0,001*	6,31	<0,001*

TABELA 1: RESULTADOS DA ANOVA PARA OS EFEITOS DA TEMPERATURA E TEMPOS DE EXPOSIÇÃO NOS BIOMARCADORES DE METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, DEFESA ANTIOXIDANTE E DANOS OXIDATIVOS DE BRÂNQUIAS DE *Astyanax lacustris* EXPOSTOS A CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA E ALTA TEMPERATURA.

Legenda: HK, hexoquinase; PFK, fosfofrutoquinase; PK, piruvato quinase; LDH, lactato desidrogenase; CS, citrato sintase; MDH, malato desidrogenase; G6PDH, glicose-6-fosfato desidrogenase; GLDH, glutamato desidrogenase; AST, aspartato aminotransferase; ALT, alanina aminotransferase; SOD, superóxido dismutase; CAT, catalase; GPx, glutationa peroxidase; GSH, glutationa reduzida; GR, glutationa redutase; GST, glutationa-S-transferase; LPO, perozidação lipídica; PCO, carbonilação de proteínas. Nota: asteriscos (*) indicam diferenças significativas ($p \le 0.05$).

TEMPERAT	URA DE 15	°C					
	(C))T	2h	6h	12h	24h	48h	96h
ЛП	23	$0,61{\pm}0,09~^{\rm a}$	$0,70{\pm}0,1~^{\rm a}$	$3,18{\pm}0,19$ ^b	$3,54{\pm}0,32$ ^b	$1,14{\pm}0,08~^{ m a}$	$1,24{\pm}0,28~^{\rm a}$
	15	$0,74{\pm}0,1~^{\rm a}$	$0,75{\pm}0,12~^{\mathrm{a}}$	$2,99{\pm}0,14^{ m b}$	$3,08{\pm}0,13$ ^b	$1,01{\pm}0,1$ ^a	$0,74{\pm}0,1~^{ m a}$
	23	$2,49{\pm}0,14$ ^a	$1,86{\pm}0,15^{\text{ b}}$	$0,88{\pm}0,06~{ m cd}$	$0,78{\pm}0,14~^{ m c}$	$1,62{\pm}0,18$ ^b	$1,35\pm0,38$ ^{bd}
LLN	15	$3,42{\pm}0,43$ ^a	2,37±0,22 ^b	$0,99{\pm}0,08~{ m cd}$	$0,70{\pm}0,06~^{ m c}$	$2,11\pm0,22^{-b}$	$1,83{\pm}0,29$ ^{bd}
ΔIC	23	$44,37\pm7,09$	$54,93\pm 8,08$	$64,04{\pm}14,3$	73,59±5,81	$51,08{\pm}2,53$	51,417±7,77
LN	15	$66,10\pm12,1$	$48,30{\pm}7,62$	$43,36\pm10,28$	$72,64{\pm}6,98$	$52,01{\pm}4,54$	$57,61\pm 5,26$
	23	$30,53{\pm}4,48~^{ m ab}$	$57,11\pm6,29^{\circ}$	28,72±3,03 ^{ad}	$51,64{\pm}3,89$ ^{bc}	19,10±2,97 ^{de}	9,84±2,4 °
IIII	15	51,23±4,97 ^{ab}	59,37±9,47 °	29,84±2,64 ^{ad}	50,72±3,64 bc	21,22±3,92 ^{de}	15,99±3,12 °
	23	7,96±1,05 ª	$8,16{\pm}1,09~^{ m ab}$	$5,36{\pm}0,45~{ m cd}$	$6,00{\pm}0.66$ ^{bcd}	$6,18{\pm}0,41$ ^{abc}	$4,76\pm0,82^{-4}$
	15	$8,66{\pm}0,81$ ^a	$7,15{\pm}0,38$ ^{ab}	$5,36{\pm}0,65~{ m cd}$	$5,99{\pm}0{,}28$ ^{bcd}	$7,13{\pm}0,62$ ^{abc}	$3,74{\pm}0,46~^{ m d}$
	23	$85,38{\pm}7,24$ ^{ab}	$141,76\pm10,33$ °	$84,06\pm8,17~^{ m a}$	$115,71\pm 5,56^{b}$	52,94±6,97 ^d	36,64±5,68 ^d
	15	$105,81\pm 5,88$ ^{ab}	$142,97\pm10,46$ °	82,01±4,61 ^a	$114,07\pm4,07$ b	$57,86\pm 8,18^{ m d}$	44,93±5,68 ^d
	23	$1,3{\pm}0,39~^{\rm a}$	1,42±0,32 ^a	1,93±0,71 ª	$1,72{\pm}0,36~^{\rm a}$	$3,95{\pm}1,13^{\text{ b}}$	$5,9{\pm}0,61$ b
COLDI	15	$1,14{\pm}0,29$ ^a	1,59±0,29 ª	$0.94{\pm}0.23~^{ m a}$	1,32±0,27 ^a	$4,17{\pm}0,63$ ^b	$4,79{\pm}0,67^{ m b}$
	23	$0,44{\pm}0,04~^{ m ab}$	$0,51{\pm}0,05$ ^{abc}	$0,33{\pm}0,04~^{\mathrm{a}}$	$0,54{\pm}0,08~^{ m bc}$	$0,66\pm0,06~^{ m c}$	$0,54{\pm}0,05~^{ m abc}$
UTD	15	$0,45{\pm}0,05~^{ m ab}$	$0,45{\pm}0,06~^{ m ab}$	$0,38{\pm}0,03{}^{ m ab}$	$0,53{\pm}0,05~^{\rm a}$	$0,46{\pm}0,04~^{ m ab}{*}$	$0,28\pm 0,05$ ^b *
	23	$12,45\pm0,57$ a	$12,92\pm 1,70^{a}$	$8,12\pm0,9$ ^{bc}	$7,41{\pm}0,6$ ^b	$10,70{\pm}0,4$ ^{ac}	$7,34{\pm}0,09$ ^b
ICH	15	$13,84{\pm}1,23$ ^a	$13,63\pm1,09^{\ a}$	$10,16{\pm}1,14~^{ m bc}$	$7,25{\pm}0,24$ ^b	$10,59\pm0,36~^{\rm ac}$	$6,80{\pm}0,46$ ^b
	23	$4,63{\pm}0,31$ ^a	5,19±0,54 ª	$4,68{\pm}0,29~^{ m a}$	$2,34{\pm}0,24$ ^b	$4,95{\pm}0,31$ ^a	$4,44{\pm}0,2~^{ m a}$
ALL	15	$6,28\pm0,44$ ^a *	$5,57{\pm}0,35$ a	$2,76{\pm}0,14$ ^b *	$2,65\pm0,25^{\rm b}$	5,39±0,23 ^{ac}	$4,21{\pm}0,3~^{ m c}$
Legenda: HK-hr Osfato desidrog Dadrão da médiá J/mg de proteín empos de expos	xoquinase; F enase; GLDF I. Os valores a. Os asterisc ição. Os dad	PFK-fosfofrutoquinase 1-glutamato desidroge de HK, PFK, PK, LC :os (*) indicam diferen os são apresentados er	:; PK-piruvato quinase; nase; AST-aspartato an DH, CS, G6PDH, GLDJ nças significativas entre n média e erro padrão o	LDH- lactato desidrogé ninotransferase e ALT-a H, AST e ALT estão ex 2 23°C (controle) e 15°C la média.	mase; CS-citrato sintase; $\overline{\Lambda}$ llanina aminotransferase. $\widehat{\Lambda}$ cpressos em mU/mg de pro \mathbb{C} (tratamento) (p $\leq 0,05$). \mathbb{A}	(IDH-malato desidrogen, Jota: os dados são aprese oteína. Os valores de M As letras indicam diferen	ase; G6PDH-Glicose-6- entados em média ± erro IDH estão expressos em ıças nas médias entre os
badrao da media J/mg de proteín empos de expos	t. Us valores a. Os asterisc ição. Os dad	de HK, FFK, FK, LL 30s (*) indicam diferen os são apresentados er	ин, С.S. GOL/UH, ULU, ULU nças significativas entr n média e erro padrão (H, ASI e ALI estao ey e 23°C (controle) e 15°(la média.	cpressos em mu C (tratamento) (/mg ae pr (p≤ 0,05). A	∪mg de proteina. Us valores de M (p≤ 0,05). As letras indicam diferei

TABELA 2: ATIVIDADE DAS ENZIMAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS DE BRÂNOUIAS DE Astvanax lacustris. EM

121

	T(°C)	2h	6h	12h	24h	48h	96h
	23	$11,54{\pm}7,15$	$3,28{\pm}0,9$	$17,71\pm 8,62$	$2,35{\pm}0,3$	$6,46{\pm}1,16$	$0,94{\pm}0,12$
	15	$3,02\pm 1,46$	$1,08{\pm}0,22$	$3,1{\pm}1,69$	$3,02{\pm}0,98$	$3,62{\pm}0,52$	$4,14{\pm}1,87$
L م	23	$2,18{\pm}0,23$ ^a	$4,11{\pm}1,3~^{\rm ab}$	$2,81{\pm}0,32~^{\rm ab}$	$4,04{\pm}0,53$ ^b	$3,8{\pm}0,48^{ m \ b}$	$2,14{\pm}0,2$ ^{ab}
CAL	15	$2,08{\pm}0,43$ ^a	$2,58{\pm}0,3~^{ m ab}$	$2,97{\pm}0,36~^{ m ab}$	$3,73{\pm}0,35^{\rm b}$	$3,95{\pm}0,48~^{ m b}$	$2,26{\pm}0,12$ ^{ab}
ρ.	23	$4,1{\pm}0,6~^{\rm a}$	$11,13\pm 2,02$ ^{ab}	33,72±9,93 °	$3,51{\pm}0,99$ ^a	23,44±2,44 ^{bc}	15,75±3,66 ^{abc}
ALD.	15	$4,6{\pm}0,66~^{\rm a}$	$11,64{\pm}1,9~^{\rm ab}$	$16,61{\pm}1,6~^{\mathrm{ab}*}$	$1,55{\pm}0,65$ ^a	26,02±2,1 ^{bc}	$30,99\pm3,36$ c*
нэс	23	$4,76{\pm}0,72$	$1,54{\pm}0,3$	$3,96\pm 1,01$	$3,76{\pm}0,57$	$2,67{\pm}0,62$	$2,49{\pm}1,41$
	15	$2,28\pm 0,63$	$2,58{\pm}0,48$	$4,67{\pm}1,2$	$3,15\pm 1$	$3,2\pm 0,91$	$4,75\pm 1,31$
g	23	$5,23{\pm}0,19~^{\mathrm{a}}$	$5,28{\pm}0,39~^{\mathrm{a}}$	$5,14{\pm}0,9~^{a}$	8 ± 0.97 ^{bc}	$9,48{\pm}0,32$ ^b	5,73±0,75 ^{ac}
AD	15	$4,2{\pm}0,32$ ^a	$5,68{\pm}0,62~^{ m ab}$	5,35±0,71 ^{ab}	$5,6{\pm}0,56$ ^{ab*}	$6,69{\pm}0,52$ ^b *	$5,01{\pm}0,17$ ^{ab}
Loc	23	$16,39\pm 1,68^{\ a}$	$11,84{\pm}1,4~^{\rm ab}$	$8,35{\pm}0,83$ ^{bc}	7,37±1,21 ^{bc}	$3,94\pm0,66~^{ m c}$	$2,79\pm0,56$ $^{\circ}$
100	15	$11,4{\pm}1,27$ a*	$11,4{\pm}1,84~^{\rm a}$	9,72±0,77 ^а	$4,71{\pm}0,8^{\rm b}$	$5,19{\pm}0,73$ b	$4,38{\pm}0,57$ ^b
	23	$0,11\pm 0,03$	$0,18{\pm}0,03$	$0,15{\pm}0,04$	$0,35{\pm}0,16$	$0,17{\pm}0,06$	$0,34{\pm}0,17$
FLO	15	$0,08{\pm}0,06$	$0,14{\pm}0,06$	$0,11\pm 0,03$	$0,18{\pm}0,1$	$0,14{\pm}0,05$	$0,09{\pm}0,05$
	23	$1,98{\pm}0,29~^{\mathrm{a}}$	$3,71{\pm}0,58~^{ m a}$	$1,95{\pm}0,66~^{\rm a}$	$4,13{\pm}0,61$ ^a	$3,59{\pm}0,43~^{\mathrm{a}}$	$3,42{\pm}0,97~^{ m a}$
	15	$0,49{\pm}0,19~^{\mathrm{a}}$	$4,96{\pm}0,7^{\rm ~b}$	$4,19\pm0,98$ ^b *	$3,07{\pm}1,03~^{ m ab}$	$1,38{\pm}0{,}21$ ^a *	3 ± 0.54 ^{ab}
egenda: 5	SOD-superó	xido dismutase; CAT-c	atalase; GPx-glutationa p	eroxidase; GR-glutation:	a redutase; GST-Glutat	iona-S-transferase; GSH-	-glutationa reduzida; LPO

TABELA 3: MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DE BRÂNQUIAS DE Astyanax lacustris, EM TEMPERATURA DE 15 °C

peroxidação lipídica e PCO-carbonilação proteica. Nota: os dados são apresentados em média ± erro padrão da média. Os valores de CAT, GPx, GR e GST estão expressos em mU/mg de proteína. Os valores de SOD estão expressos em U/mg de proteína. Os valores de GSH estão expressos em nmols de tióis/mg de proteína. Os valores de LPO estão expressos em µmols de MDA/mg de proteína. Os valores de PCO estão expressos em nmols de tióis/mg de proteína. Os valores de LPO significativas entre 23°C (controle) e 15°C (tratamento) (p≤ 0,05). As letras indicam diferenças nas médias entre os tempos de exposição. Os dados são apresentados em média e erro padrão da média.

	T(°C)	2h	6h	12h	24h	48h	96h
7111	23	$0,42\pm0,06^{a}$	$0,91{\pm}0,22~^{\rm a}$	$3,33\pm0,15^{\rm b}$	$4,28{\pm}0,72^{ m b}$	$0,86\pm0,09~^{a}$	$0,88{\pm}0,13~^{a}$
ЧU	31	$1,04{\pm}0,51$ ^a	$0,9{\pm}0,28~^{\rm a}$	$3,5{\pm}0,16^{\rm b}$	$2,95{\pm}0,28$ ^b	$0,76{\pm}0,08~^{\rm a}$	$0,89{\pm}0,12~^{\rm a}$
DEIZ	23	$1,74\pm0,11$ ^a	$0,92{\pm}0,23$ ^{ab}	$1{\pm}0{,}07$ ^{ab}	$0,77{\pm}0,15$ b	1,83±0,17 ^a	$1,55{\pm}0,1$ ^{ab}
	31	$2,67{\pm}0,44$ ^{a*}	$2,27\pm0,19$ ^{ab*}	$1,11\pm0,07^{\circ}$	$1,08{\pm}0,17~^{ m c}$	$1,65{\pm}0,39~^{ m bc}$	$1,69{\pm}0{,}21$ ^{bc}
μV	23	16,79±3,57 ^а	37,73±5,44 ^{ab}	$70,94{\pm}12,27~^{ m c}$	75,02±11,01 °	57,07±4,35 bc	$61,65{\pm}3,27$ bc
	31	41,72±7,83 ^a *	$53,94\pm 8,61$ ^a	56,56±9,87 ^a	56,55±7,41 ª	$51,74{\pm}7,42$ ^a	$48,04{\pm}5,13$ ^a
I DII	23	24,48±2,83 ^a	42,52±4,87 ^b	$47,14{\pm}6,04$ ^b	$60,07{\pm}4,01$ ^b	17,83±2,72 ^a	$18,06\pm 2,02$ ^a
UUT	31	$30,71\pm3,53$ ^a	$47,1{\pm}10,82$ ^b	47,02±5,33 ^b	$50,47\pm5,97^{\text{b}}$	$14,8{\pm}2,43$ ^a	13,51±2,21 ^a
UC	23	$4,66{\pm}0,41$ ^a	$8,23\pm0,45^{\text{b}}$	$6,45\pm0,7$ ^{ab}	$8,42{\pm}1,16^{\text{b}}$	$5,62{\pm}0,41$ ^a	$4,55\pm0,34$ ^a
2	31	$6,91{\pm}0,4~^{\mathrm{a}*}$	$6,53{\pm}0,43$ ^{ab}	$5,36{\pm}0,3~^{ m ab}$	7,15±0,77 ^a	$5,02{\pm}0,9~^{ m ab}$	$4,22\pm0,42$ ^b
	23	71,7±4,95 ª	$146,12\pm 20,17^{\text{b}}$	$102,22\pm6,8^{\ a}$	$147,22\pm14,43$ ^b	$52,28\pm5,23$ °	$51,77{\pm}4,48~^{ m c}$
	31	96,09±5,73 ª	$121,24\pm12,34$ ^b	$100,91\pm 8,82$ ^a	135,75±11,72 ^b	$44,21{\pm}8,01~^{ m c}$	$45,45\pm5,93^{\circ}$
	23	$1,39{\pm}0,22~^{ m ab}$	$0,48{\pm}0,13~^{ m a}$	$0,96{\pm}0,23~^{\rm a}$	3 ± 0.95 ^{bc}	$4,46{\pm}0,68~^{ m c}$	$4,78{\pm}0,3~{ m c}$
GOLDH	31	$1,46{\pm}0,47~^{ m ab}$	$1{\pm}0{,}31$ ^a	$0,79{\pm}0,09$ ^a	$1,03{\pm}0,3~^{ m ab*}$	$4,96{\pm}0,71~^{ m c}$	$3,05{\pm}0,58$ ^{bc*}
	23	$0,28{\pm}0,04$	$0,44{\pm}0,04$	$0,4{\pm}0,05$	$0,6{\pm}0,16$	$0,48{\pm}0,05$	$0,44{\pm}0,05$
ИПЛИ	31	$0,39{\pm}0,03$	$0,48{\pm}0,04$	$0,31{\pm}0,03$	$0,49{\pm}0,09$	$0,43{\pm}0,06$	$0,47\pm0,1$
TOA	23	$9,43{\pm}0,81$ ^a	$14,29\pm 1,49$ ^b	$11,13\pm0,3$ ^{ab}	$8,74{\pm}1,3$ ^a	$11,88{\pm}0,84~^{ m ab}$	9,80±0,75 ª
ICN	31	$10,54{\pm}0,89~^{\rm a}$	$11,84\pm0,58$ ^b	$10,09{\pm}0,49~^{ m ab}$	$9,08{\pm}0,82$ ^a	$10,19{\pm}1,51$ ^{ab}	$9,53{\pm}1,03$ ^a
TIV	23	$3,95{\pm}0,31$ ^{ab}	$6,9\pm0,6$ °	$3,46{\pm}0,15~^{ m a}$	3,51±0,19 а	$5,83{\pm}0,26~^{ m c}$	$4,69{\pm}0,22$ ^{bc}
	31	$4,53{\pm}0,42$ ^{ab}	$5,7{\pm}0,32~^{ m c}$	$2,88\pm0,09$ ^a	$3,7{\pm}0,37$ a	$5,83{\pm}0,57~^{ m c}$	$5,74{\pm}0,75$ ^{bc}

	(⊃°)T	2h	6h	12h	24h	48h	96h
	23	$4,57\pm 1,13$	$2,15\pm 0,31$	$9, 6\pm 5, 51$	$5,24{\pm}0,81$	$4,2{\pm}0,36$	$4,45\pm 1,15$
	31	$6,39{\pm}0,69$	$3,56{\pm}0,88$	$5,35\pm 1,06$	$3,63{\pm}0,56$	$2,72\pm0.65$	$1,91{\pm}0,59$
E V	23	3,51±0,35 ^a	3,49±0,83 ª	$2,82{\pm}0,18~^{\mathrm{a}}$	$5,26{\pm}0,47^{ m b}$	$2,02{\pm}0,17$ ^a	2,1±0,22 ^a
	31	2,6±0,25 ª	$4,58{\pm}0,59$ ^b	$2,7{\pm}0,24$ ^a	$3,88{\pm}0,44~^{ m ab*}$	$2,32\pm0,19$ ^a	$2,15{\pm}0,28$ ^a
ñ	23	7,28±1,07 ^a	17,14±2,03 ^a	$38,91\pm3,22^{\text{b}}$	$22,01{\pm}2,88~^{ m ab}$	$21,51\pm 3,31$ ^{ab}	$13,43\pm1,99$ ^a
N IO	31	$4,82{\pm}0,54$ ^a	$26,97\pm2,25^{\text{b}}$	$38,35\pm 2,83$ ^{bc}	$26,34\pm 2,17^{b}$	$20,25\pm 2,54$ ^{ab}	$49,35\pm13,06$ °*
	23	$3,21{\pm}0,8~^{\rm a}$	$2,25{\pm}0,47$ ^{ab}	$4,94{\pm}0,75~^{ m ab}$	$4,30{\pm}1,04~^{\rm ab}$	$5,75{\pm}0,76$ b	$3,44{\pm}0,9~^{ m ab}$
HCD	31	2,58±0,71 ^a	$5,18{\pm}1,4~^{ m ab}$	7,68±2,15 ^{ab}	$4,19{\pm}0,76~^{ m ab}$	7,11±1,42 ^b	6,5±1,71 ^{ab}
g	23	$5,89{\pm}0,46~^{\mathrm{a}}$	$3,87\pm0,36^{\rm b}$	$5,94{\pm}0,4~^{ m a}$	$9,16{\pm}0,55^{\circ}$	$6,8{\pm}0,45~^{ m a}$	$5,88{\pm}0,51$ ^a
ND	31	$4,91{\pm}0,38~^{ m a}$	$6,65{\pm}0,54$ ^{ab*}	$6,82{\pm}0,55$ ^b	$6,64{\pm}0,37$ ^{ab} *	$6,32{\pm}0,25~^{ m ab}$	$6,48{\pm}0,33$ ^{ab}
Luc	23	12,9±1,05 ^a	$5,23{\pm}0,84$ bc	$6,64{\pm}0,62^{ m b}$	$6,62{\pm}0,64$ ^b	$1,84{\pm}0,4~^{ m c}$	$3,48{\pm}2,66$ ^{bc}
	31	$11,04{\pm}1,46$ ^a	$10,24{\pm}1,13$ a*	$10,27\pm0,77$ a*	$12,09\pm 1,05$ a*	$2,49\pm0,41$ ^b	$7,97\pm2,66$ a*
	23	$0,05{\pm}0,02$ ^a	$0,12{\pm}0,02~^{ m ab}$	$0,09{\pm}0,02~^{ m ab}$	$0,10{\pm}0,04^{ m \ b}$	$0,14{\pm}0,04~^{\rm ab}$	$0,08{\pm}0,02~^{ m ab}$
LFO	31	$0,01{\pm}0,001$ ^a	$0,12{\pm}0,03~^{ m ab}$	$0,09{\pm}0,04~^{ m ab}$	$0,21{\pm}0,11$ ^b	$0,06{\pm}0,01~^{ m ab}$	$0,04{\pm}0,01~^{ m ab}$
00a	23	$2,15{\pm}0,64$ ^a	$3,24{\pm}0,55~^{ m ab}$	$5,02{\pm}0,63$ b	2,22±0,54 ª	$2,84{\pm}0,41$ ^{ab}	$4,01{\pm}0.59~^{ m ab}$
rco	31	$1,77{\pm}0,37$ a	$6,58\pm0,68^{b*}$	$3,68{\pm}0,51~^{\rm ac}$	$4,33\pm0,72$ bc*	$3,8{\pm}0,47$ ^{ac}	$3,02{\pm}0,48~^{ m ac}$
Legenda.	: SOD-super	róxido dismutase; CA	T-catalase; GPx-glutation	a peroxidase; GR-glutatic	ona redutase; GST-Glutat	iona-S-transferase; GSH-	glutationa reduzida; LPO-
peroxida	ção lipídica	e PCO-carbonilação pi	roteica. Nota: os dados são	o apresentados em média	\pm erro padrão da média. C)s valores de CAT, GPx, (GR e GST estão expressos
em mU/r	ng de proteíı	na. Os valores de SOD) estão expressos em U/mg	ç de proteína. Os valores o	de GSH estão expressos ei	n nmols de tióis/mg de pr	oteína. Os valores de LPO
estão ext	pressos em l	umols de MDA/mg de	proteína. Os valores de l	CO estão expressos em 1	nmols de de carbonilas/m	g de proteína. Os asterisc	os (*) indicam diferenças
significa média e (uvas entre 2 erro padrão 6	da média.	(tratamento) (p≤ 0,00.14	As lettas indicam diferenç	ças nas medias entre os te	mpos de exposiçao. Us d	ados sao apresentados em
	•						

õ
31
DE
RA
TU
RA
IPE
ΕN
ΤW
E, E
stris
nor
ux la
anc
Asty
)E
SI
UIA
ğ
ß
B
Ð
NO
ATI
Ĩ
Ň
SE
SES
STE
Щ
D
RE
DO
CA.
AR
Ň
A 5.
EL.
AB
Ε

QUADRO 1 - RESUMO DOS RESULTADOS DOS BIOMARCADORES DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS, DEFESA ANTIOXIDANTE E ESTRESSE OXIDATIVO EM BRÂNQUIAS DE *A. lacustris*

Comparação entre controle e tratamento ao longo do tempo							
Via metabólica	Marcador	15°C	31°C				
	HK	=	=				
	PFK	=	↑ 2h (53 %), ↑ 6h (147 %)				
	PK	=	↑ 2h (148 %)				
Metabolismo de carboidratos	LDH	=	=				
	CS	=	↑ 2h (48 %)				
	MDH	=	=				
	G6PDH	=	↓ 24h (66 %), ↓ 96h (36 %)				
	GLDH	↓ 48h (30 %), ↓ 96h (48 %)	=				
Metabolismo de proteínas	AST	=	=				
proteinius	ALT	↑ 2h (36 %), \downarrow 12h (41 %)	=				
	SOD	=	=				
	CAT	=	↓ 24h (26 %)				
Dí	GPx	↓ 12h (51 %), ↑ 96h (97 %)	↑ 96h (267 %)				
antioxidantes	GSH	=	=				
	GR	\downarrow 24h (30 %), \downarrow 48h (29 %)	↑ 6h (96 %), ↓ 24h (27 %)				
	GST	↓ 2h (30 %)	 ↑ 6h (96 %), ↑ 12h (55 %), ↑ 24h (83 %), ↑ 96h (129 %) 				
	LPO	=	=				
Danos oxidativos	РСО	\uparrow 12h (115 %), \downarrow 48h (62 %)	↑ 6h (103 %), ↑ 24h (95 %)				

Nota: Os sinais de igual (=) indicam os biomarcadores que não sofreram alterações para a interação tempo e temperatura. Setas para cima indicam aumento de atividade ou níveis e setas para baixo indicam diminuição na atividade ou níveis.

4 DISCUSSÃO

A mortalidade durante os experimentos representou 3,75 % do total de peixes utilizados, sendo considerada baixa (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2015; SCHLEGER et al., 2022) e possivelmente foi decorrente de condições fisiológicas individuais, uma vez que as condições físico-químicas da água foram monitoradas e permaneceram adequadas durante o experimento.

As brânquias são órgãos com múltiplas funções, incluindo trocas gasosas, regulação iônica e ácido-básica, osmorregulação e excreção de nitrogênio (EVANS; PIERMARINI; CHOE, 2005; MOHAMAD et al., 2021). Pelo fato de estarem em contato direto com o ambiente, as brânquias são sensíveis às alterações nas condições abióticas, como a temperatura, e se tornam chave para investigação dos efeitos do estresse térmico sobre o metabolismo e fisiologia dos peixes.

Neste trabalho, as alterações nos marcadores fisiológicos que ocorreram apenas em relação à variável tempo de exposição, foram consideradas como decorrentes do ciclo circadiano, fator de variação dos parâmetros fisiológicos dos organismos (BALASCH; TORT, 2019; RESENDE et al., 2022). A observação da frequente semelhança de comportamento dos marcadores apenas nos períodos de exposição testados, corroboram com a indicação de que não foram relacionadas com os efeitos das mudanças de temperatura, assim como reafirmam a importância da comparação entre grupos experimentais e controles, sujeitos às mesmas condições de ensaio, temporal, físico-químico e espacial, portanto, a discussão desta pesquisa tem como foco as variações significativas para a interação das variáveis temperatura e tempo de exposição.

4.1 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA NO METABOLISMO BRANQUIAL

Os peixes de climas temperados sobrevivem aos períodos de frio adotando estratégias metabólicas, como o armazenamento de reservas energéticas na forma de triglicerídeos e/ou glicogênio durante as estações quentes para utilização nos períodos frios (FERNANDES; MCMEANS, 2019; SHUTER et al., 2012; VARIS; HAVERINEN; VORNANEN, 2016). Foi observado que os peixes expostos à baixa temperatura (15 °C) apresentaram redução na atividade natatória e na ingestão de alimentos, quando comparados

aos peixes expostos à alta temperatura (31 °C). Diversos autores associam as baixas temperaturas à redução nas taxas metabólicas (BEYAN et al., 2015; ROSSI et al., 2017; SPEERS-ROESCH; NORIN; DRIEDZIC, 2018; WEN et al., 2017).

Neste estudo, não houve alteração nos marcadores da glicólise, ciclo do ácido cítrico, via das pentoses fosfato e, ocorreu diminuição no catabolismo de aminoácidos, percebida pela redução na atividade das enzimas GLDH em 48 e 96 horas e da ALT em 12 horas, com exceção de um aumento isolado e pontual na atividade da ALT em 2 horas (FIGURA 24). Estes resultados indicam que não houve alteração na demanda energética nas brânquias para o ajuste homeostático em resposta ao estresse térmico ao frio. A redução no catabolismo de aminoácidos indica que o figado pode estar suprindo a demanda energética, possivelmente a partir de gliconeogênese, como verificado no estudo de Schleger et al. (2022).

A GLDH é uma enzima mitocondrial que atua de forma reversível no catabolismo de aminoácidos, fornecendo substrato para o ciclo do ácido cítrico em situações em que há maior demanda de ATP nas células, ao catalisar a conversão de glutamato em α -cetoglutarato e amônia, enquanto reduz NAD(P)⁺ em NAD(P)H⁺ (PLAITAKIS et al., 2017). Desta forma, a GLDH tem um papel fundamental na excreção de compostos nitrogenados e na homeostase redox. Neste estudo, devido à baixa atividade da GLDH em 48 e 96 horas (FIGURA 24), pode ter havido redução na produção de compostos nitrogenados pelas brânquias, mas, no entanto, não foram observados indícios de alteração do equilíbrio redox, pois não houve alteração nos níveis de LPO e ainda foi observada redução nos níveis de PCO em 48 horas.

Adicionalmente, em baixa temperatura, houve redução da atividade das enzimas da defesa antioxidante, compreendendo na redução da GPx em 12 horas, da GR em 24 e 48 horas e da GST em 2 horas (FIGURA 24). A redução da atividade da GPx em 12 horas, somada ao aumento nos níveis de PCO neste horário, indicam a vulnerabilidade do órgão aos danos que podem ser provocados pelas EROs. A GPx atua na conversão do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em água, enquanto oxida a glutationa reduzida (GSH) em GSSG (ABELE; PUNTARULO, 2004; DEPONTE, 2013) e, quando o H₂O₂ não é decomposto enzimaticamente, pode se converter no radical livre hidroxila pela reação de Fenton (ABELE; PUNTARULO, 2004; REGOLI et al., 2011).

Apesar de pontual, um indicador de ativação da defesa antioxidante foi o aumento na atividade da GPx em 96 horas, resposta que, somada à redução nos níveis de PCO em 48 horas, indicam que *A. lacustris* consegue se recuperar do estresse oxidativo e dos danos em proteínas, recuperando a homeostase a partir das 48 horas de exposição ao frio.

4.2 EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA NO METABOLISMO BRANQUIAL

Em peixes, as brânquias são o primeiro local de captação de oxigênio do ambiente, e consequentemente um órgão-chave onde são esperados ajustes para a manutenção dos níveis de oxigênio e da performance do metabolismo aeróbico com o aumento da temperatura (BOWDEN; GARDINER; COUTURIER, 2014). A elevação da temperatura ambiental provoca aumento nas taxas metabólicas dos peixes, os quais aceleram a taxa respiratória para suprir os tecidos com oxigênio; porém, isso aumenta o contato das brânquias com o ambiente desfavorável, devido ao bombeamento acelerado de água pelos opérculos (MOHAMAD et al., 2021). As brânquias apresentam elevadas taxas metabólicas, as quais aumentam como consequência direta do aquecimento da água ou de uma maior mobilização energética promovida pelo cortisol, para recuperar a homeostase após o choque térmico (SOKOLOVA et al., 2012).

O aumento na temperatura da água reduz os níveis de oxigênio dissolvido nos ambientes aquáticos naturais (HARASAWA et al., 2003). Alguns peixes, como *Carassius carassius* e *Carassius auratus* aumentam a área de superfície lamelar das brânquias em situações de hipóxia ou de altas temperaturas (BOWDEN; GARDINER; COUTURIER, 2014; NILSSON; DYMOWSKA; STECYK, 2012; POL; FLIK; GORISSEN, 2017; SOLLID; WEBER; NILSSON, 2005), um ajuste que aumenta a captação de oxigênio. Porém, este aumento na superfície lamelar também eleva os custos energéticos com a osmorregulação. Sollid, Weber e Nilsson (2005) e Nilsson, Dymowska e Stecyk (2012) verificaram um aumento no consumo de oxigênio e da superfície respiratória em brânquias de carpa expostas ao aumento de temperatura. Esta resposta pode ser um reflexo de traços adaptativos à hipóxia que ocorre nos ambientes naturais em alta temperatura.

As alterações nas brânquias em nível molecular para adaptação ao calor, compreendem em aumento no consumo de oxigênio (MOHAMAD et al., 2021; SOLLID; WEBER; NILSSON, 2005) e na demanda energética (BOWDEN; GARDINER; COUTURIER, 2014). Neste estudo, ocorreu aumento da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e respiração aeróbica, verificados pelo aumento na atividade das enzimas PFK em 2

e 6 horas e da PK em 2 horas, aumento da CS em 2 horas; bem como houve redução da via das pentoses fosfato, com diminuição da atividade da G6PDH em 24 e 96 horas (FIGURA 24).

O período de maior alteração nas enzimas do metabolismo energético foi em 2 horas de exposição a 31 °C, o que indica que este período foi crítico para a adaptação de *A. lacustris* à alta temperatura. Resende et al. (2022), ao estudarem os efeitos da alta temperatura em brânquias de *Psalidodon bifasciatus*, também verificaram um aumento na demanda por ATP, refletindo em aumento na atividade das enzimas HK em 2h e PFK em 48h, as quais, ao promoverem a glicólise, aumentam as quantidades de substratos para o ciclo de Krebs e para a respiração celular aeróbica. Schleger et al. (2022), verificaram que o figado de *A. lacustris* submetido à estresse térmico de 31 °C atuou exportando glicose nas primeiras 12 horas de estresse térmico para manutenção dos níveis energéticos dos tecidos, dado que indica aumento na demanda por energia com o calor e destaca a importância deste órgão para o suprimento de substratos energéticos.

A redução na atividade da G6PDH em 24 e 96 horas (FIGURA 24) demonstra uma diminuição na capacidade da via das pentoses fosfato. A G6PDH, além de atuar no desvio dos esqueletos de carbono para a manutenção de ATP nas células, também atua nas defesas antioxidantes, ao catalisar a primeira reação da via das pentoses fosfato, tornando-se importante para a produção de NADPH nas células, o qual é utilizado para a redução da glutationa (GSH) pela GR (DALVI et al., 2017). Portanto, a redução da G6PDH reflete uma possível alteração no anabolismo e uma redução na proteção contra os danos oxidativos (PEDRÓN et al., 2017). A diminuição da G6PDH em altas temperaturas é uma resposta encontrada em outras espécies de peixes, como em *Spaurus aurata* (LAIZ-CARRÍON et al., 2004) e *Horabagrus brachysoma* (DALVI et al., 2017).

Neste estudo, em alta temperatura, a baixa atividade da G6PDH em 24 horas, associada com baixa atividade da GR, sugerem baixos níveis de NADPH e/ou NADP⁺ e, somadas com a baixa atividade da CAT, indicam uma redução na neutralização de H₂O₂, e, com a ocorrência de PCO neste mesmo tempo de exposição (FIGURA 24), evidenciam que este foi um período crítico para a espécie; em que o sistema de defesa antioxidante esteve inibido e as células branquiais ficaram vulneráveis ao efeito deletério das EROs, ocorrendo estresse oxidativo em proteínas. Em brânquias, a ocorrência de danos em proteínas pode acarretar em desregulação nos gradientes iônicos e desequilibrar a osmorregulação, afetando a permeabilidade das membranas celulares (EVANS; PERMARINI; CHOE, 2005). O aumento de temperatura eleva também as taxas de respiração celular e a geração de EROs (BAGNYUKOVA et al., 2007), a partir do aumento das taxas metabólicas, que elevam o fluxo na cadeia transportadora de elétrons, gerando assim uma maior produção de EROs (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017). Desta forma, a elevação de temperatura pode provocar estresse metabólico via desequilíbrio entre uma maior produção de EROs e sua eliminação (BIRNIE-GAUVIN et al., 2017; JIN et al., 2019; LUSHCHAK, 2011), e as estruturas celulares podem ficar susceptíveis ao estresse oxidativo, sofrendo danos como a carbonilação de proteínas e a lipoperoxidação. O sistema de defesa antioxidante é importante para a proteção contra as EROs, protegendo os tecidos do estresse oxidativo com estratégias que podem envolver o aumento da atividade de enzimas da defesa antioxidante, como a SOD e a CAT, ou a elevação nos níveis de antioxidantes de baixa massa molecular, como a glutationa reduzida (GSH) (WEN et al., 2018).

Neste estudo, além do aumento da glicólise e ciclo do ácido cítrico em alta temperatura; também foi perceptível a ativação do sistema de defesa antioxidante, com aumento na atividade da GR em 6 horas, GPx em 96 horas e GST em 6, 12, 24 e 96 horas (FIGURA 24), o que demonstra que está havendo aumento das defesas antioxidantes, possivelmente via fator de transcrição Nrf2 (DINKOVA-KOSTOVA; KOSTOV; KAZANTSEV, 2018; MUKAIGASA et al., 2012; WANG; ZHU, 2019). No entanto, mesmo com a ativação da defesa antioxidante, *A. lacustris* não foi capaz de evitar o estresse oxidativo, percebido pela alta PCO em 6 horas e 24 horas, demonstrando que esta espécie é vulnerável ao calor, pois em 6 horas GR e GST estavam com alta atividade, mas não foram capazes de neutralizar as EROs e em 24 horas a defesa antioxidante colapsou, com baixa atividade da G6PDH, da GR e da CAT (FIGURA 24).

A GST desempenhou um importante papel na defesa antioxidante das brânquias de *A. lacustris* submetidos à alta temperatura, com alta atividade em 6, 12, 24 e 96 horas (FIGURA 24). As GSTs são uma família multifuncional de proteínas envolvidas na detoxificação celular de compostos como xenobióticos e poluentes ambientais, a partir da conjugação da glutationa reduzida (GSH) com compostos tóxicos que contenham grupos eletrofílicos, reduzindo sua toxicidade, aumentando a solubilidade em água ou tornando-os mais fáceis de serem degradados e excretados (CARLETTI et al., 2008).

As isoformas de GST, assim como a GPx, também atuam na conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) a álcool, enquanto oxidam a GSH em GSSG. Os LOOH são radicais livres formados a partir do radical hidroxila, que iniciam a peroxidação lipídica

nas membranas (REGOLI et al., 2011). Esta importante ação, principalmente da GST nas brânquias expostas à alta temperatura, podem indicar uma proteção aos danos lipídicos e explicar a não alteração nos níveis de LPO. No estudo de Garcia et al. (2015), em brânquias de *Paralichthys orbignyanus*, expostos à alta temperatura, foi percebido aumento na atividade da CAT e da GST e nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), indicando que, mesmo com a ativação das defesas antioxidantes, a espécie não conseguiu prevenir os danos oxidativos. Neste estudo, a ativação das defesas foi eficiente para evitar o aumento nos níveis de TBARS.

Percebe-se que em alta temperatura, a resposta metabólica das brânquias ocorre nos primeiros horários da exposição, tanto no metabolismo energético quanto na defesa antioxidante. Esta resposta ao estresse térmico nos dois primeiros horários de exposição ao calor sugere aumento na demanda energética e o aumento na atividade das enzimas da defesa antioxidante, indica uma resposta a um provável aumento na produção de EROs. A resposta da defesa antioxidante se estende para 24 e 96 horas. Já em baixa temperatura, o período mais crítico foi de 12 horas, ao haver redução nas defesas antioxidantes (GPx) e aumento nos níveis de PCO.

FIGURA 24 – ESQUEMA DAS VIAS METABÓLICAS BRANQUIAIS DE A. lacustris SOB ESTRESSE TÉRMICO



Nota: As setas indicam as alterações com diferenças significativas entre os grupos controle e tratamento, ao longo dos períodos de exposição. A cor azul indica os marcadores que tiveram alterações provocadas pela temperatura baixa (15 °C) e a cor vermelha indica as alterações provocadas pela temperatura alta (31 °C). Setas para cima indicam aumento e para baixo indicam redução na atividade ou níveis dos biomarcadores.

5 CONCLUSÃO

A baixa temperatura provocou pouco efeito no metabolismo energético. Com exceção da redução do catabolismo de aminoácidos, as demais vias investigadas: glicólise, ciclo do ácido cítrico e das pentoses fosfato, não foram alteradas. Também houve diminuição das defesas antioxidantes e ocorrência de carbonilação de proteínas, demonstrando que a não alteração das defesas antioxidantes deixou o órgão vulnerável à ação das EROs.

Ao contrário, em alta temperatura, possivelmente ocorreu aumento na demanda energética, com elevação na atividade das enzimas da glicólise, do ciclo do ácido cítrico e inibição da via das pentoses fosfato. O estresse térmico pelo calor também provocou um desequilíbrio entre a produção de EROs e sua neutralização pelas defesas antioxidantes, pois, mesmo com as defesas antioxidantes ativadas, houve estresse oxidativo, percebido pela ocorrência de carbonilação de proteínas.

Desta forma, conclui-se que tanto o estresse térmico de baixa temperatura quanto de alta temperatura afetam o metabolismo de brânquias de *A. lacustris*, sendo que a alta temperatura afeta de forma mais intensa; e ambas provocam estresse oxidativo. No entanto, *A. lacustris* consegue estabelecer o equilíbrio homeostático após 48 horas de exposição ao frio e após 24 horas de exposição ao calor, demonstrando que a espécie está adaptada às variações térmicas enfrentadas nesta intensidade e duração.

REFERÊNCIAS

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643304001722>.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p.121–126, 1984. Elsevier. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163.

ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of temperature in juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) biomarker responses and behaviour: implications for environmental monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, n. 1, p. 45–55, 2015. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s12237-014-9792-7.

BAGNYUKOVA, T. V; LUSHCHAK, O. V; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, n. 4, p. 227–234, 2007. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306456507000149>.

BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the stress responses in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, n. FEB, p. 1–12, 2019.

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

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002.

BENNEMANN, S. T.; GEALH, A. M.; ORSI, M. L.; SOUZA, L. M. Occurrence and trophic ecology of four species of *Astyanax* (Characidae) in different rivers of the Tibagi River Basin, Paraná, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 95, n. 3, p. 247–254, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0073-47212005000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

BEYAN, C.; BOOM, B. J.; LIEFHEBBER, J. M. P.; SHAO, K.-T.; FISHER, R. B. Natural swimming speed of *Dascyllus reticulatus* increases with water temperature. **ICES Journal of Marine Science**, v. 72, n. 8, p. 2506–2511, 2015. Disponível em: https://academic.oup.com/icesjms/article/72/8/2506/2458916>.

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

BOWDEN, A. J.; GARDINER, N. M.; COUTURIER, C. S.; et al. Alterations in gill structure

in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 175, p. 64–71, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUENO-KRAWCZYK, A. C. D.; GUILOSKI, I. C.; PIANCINI, L. D. S.; et al. Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply. **Chemosphere**, v. 135, p. 257–264, 2015. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515004038>.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BUCCIARELLI, T.; et al. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 48–57, 2008.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273–283, 1979. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/BF00398141.

CHUNG, K. S. Heat resistance and thermal acclimation rate in tropical tetra *Astyanax bimaculatus* of Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, v. 57, n. 4, p. 459–463, 2000.

CIARDIELLO, A.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. 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**, v. 1250, n. 1, p. 76–82, 1995.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. L-Glutamate dehydrogenase from the Antartic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary srtucture, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 11–23, 2000. Naples, Italy: Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483800001862?via%3Dihub>. .

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; et al. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235–241, 1981. Disponível em: <<u>http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diab.30.3.235></u>.

DALVI, R. S.; DAS, T.; DEBNATH, D.; et al. Metabolic and cellular stress responses of catfish, <i>Horabagrus brachysoma</I> (Günther) acclimated to increasing temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 65, n. December 2016, p. 32–40, 2017. Elsevier. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.003>.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3217–3266, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; KOSTOV, R. V; KAZANTSEV, A. G. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 19, p.

3576-3590, 2018. Disponível em: < http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14379>...

DYMOWSKA, A. K.; HWANG, P. P.; GOSS, G. G. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 282–292, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2012.08.025>.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 97–177, 2005.

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

FERNANDES, T.; MCMEANS, B. C. Coping with the cold: energy storage strategies for surviving winter in freshwater fish. **Ecography**, v. 42, n. 12, p. 2037–2052, 2019. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ecog.04386>.

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

FOYLE, K. L.; HESS, S.; POWELL, M. D.; HERBERT, N. A. What is gill health and what is its role in marine finfish aquaculture in the face of a changing climate? **Frontiers in Marine Science**, v. 7, n. June, p. 1–16, 2020.

GARCIA, L. O.; OKAMOTO, M. H.; RIFFEL, A. P. K.; et al. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder Paralichthys orbignyanus (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 607–612, 2015. Disponível em: ...">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252015000300607&lng=en&tlng=en>...

GNOCCHI, K. G.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; GOMES, L. C.; CHIPPARI-GOMES, A. R. De novo assembly and annotation of the transcriptome of *Astyanax lacustris* liver unveil candidate genes to monitor response to environmental stress. **Marine Genomics**, v. 54, n. May, p. 100784, 2020. Elsevier. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100784>. .

GRIM, J. M.; MILES, D. R. B.; CROCKETT, E. L. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 3, p. 445–452, 2010.

HARASAWA, H.; MATSUOKA, Y.; TAKAHASHI, K.; et al. Potential Impacts of Global Climate Change. **Climate Policy Assessment**, , n. August, p. 37–54, 2003.

HEMRE; KAHRS, F. 14 C-glucose injection in Atlantic cod, *Gadus morhua*, metabolic responses and excretion via the gill membrane. Aquaculture Nutrition, v. 3, n. 1, p. 3–8,

1997. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2095.1997.00052.x>.

ITCG. Clima - estado do Paraná. Instituto de Terras, Cartografia e Geociências do Paraná, p. 54, 2008.

JIN, S.-R.; WEN, B.; CHEN, Z.-Z.; et al. Sensitivity in the antioxidant system of discus fish (Symphysodon spp.) to cold temperature: evidence for species-specific cold resistance. **bioRxiv**, 2019.

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

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

LAIZ-CARRIÓN, R.; SANGIO-ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J. M.; et al. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. Fish Physiology and Biochemistry, p. 179–188, 2004.

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

LEVESQUE, H. M.; MOON, T. W.; CAMPBELL, P. G. C.; HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (Perca flavescens) chronically exposed to metals in the field. Aquatic Toxicology, v. 60, n. 3-4, p. 257-267, 2002. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X02000127>.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. Methods in Enzymology. v. 233, p.346-357, 1994. Elsevier. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687994330409>.

LIRA, L. V. G.; KURADOMI, R. Y.; DE SOUZA, T. G.; HAINFELLNER, P.; BATLOUNI, S. R. Astyanax altiparanae ovarian maturation after spawning in water recycling systems. Boletim do Instituto de Pesca, v. 44, n. 4, p. 438–455, 2018. Disponível em: https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/1318>.

LUCENA, C. A. S.; SOARES, H. G. Review of species of the Astvanax bimaculatus "caudal peduncle spot" subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. Zootaxa, v. 4072, n. 1, p. 101, 2016. Disponível em: http://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4072.1.5.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>

MACÊDO, A. K. S.; SANTOS, K. P. E.; BRIGHENTI, L. S.; et al. Histological and

molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 735, 2020.

MADEIRA, D.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 324–331, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.008>.

MOHAMAD, S.; LIEW, H. J.; ZAINUDDIN, R. A.; et al. High environmental temperature and low pH stress alter the gill phenotypic plasticity of Hoven's carp <i>Leptobarbus hoevenii<i/>i<i/. Journal of Fish Biology, v. 99, n. 1, p. 206–218, 2021.

MUKAIGASA, K.; NGUYEN, L. T. P.; LI, L.; et al. Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 21, p. 4455–4461, 2012. Disponível em: http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00481-12>.

NARDELLI, M. S.; BUENO, N. C.; LUDWIG, T. A. V.; GUIMARÃES, A. T. B. Estrutura e dinâmica da comunidade de Diatomáceas planctônicas do rio Iguaçu, estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 374–386, 2016.

NAVARRO, F. K. S. P.; NAVARRO, R. D.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. DE O. Effect of photoperiod stress assessment and locomotor activity of female lambari (*Astyanax bimaculatus*). Ciência e Agrotecnologia, v. 38, n. 2, p. 173–180, 2014.

NILSSON, G. E.; DYMOWSKA, A.; STECYK, J. A. W. New insights into the plasticity of gill structure. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 214–222, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2012.07.012>.

O'BRIEN. Mitochondrial biogenesis in cold-bodied fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 275–285, 2011. Disponível em: http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.046854>.

OLSEN, Y. A.; REITAN, L. J.; ROED, K. H. Gill Na+, K+-ATPase activity, plasma cortisol level, and non-especific immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. **Journal of Fish Biology**, v. 43, p. 559–573, 1993.

ORNELAS-GARCÍA, C.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 340, 2008. Disponível em:

http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-8-340>.

PÉDRON, N.; LE DU, J.; CHARRIER, G.; et al. Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. **Marine Environmental Research**, v. 129, p. 258–267, 2017.

PERRY, S. F.; SHAHSAVARANI, A.; GEORGALIS, T.; et al. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base

regulation. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, v. 300, n. 1, p. 53–62, 2003.

PLAITAKIS, A.; KALEF-EZRA, E.; KOTZAMANI, D.; ZAGANAS, I.; SPANAKI, C. The glutamate dehydrogenase pathway and its roles in cell and tissue biology in health and disease. **Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–26, 2017.

POL, I.; FLIK, G.; GORISSEN, M. Comparative physiology of energy metabolism: fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017. Disponível em: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00036/full.

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

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X11001834>.

RESENDE, A. C.; PEREIRA, D. M. C.; SCHLEGER, I. C.; et al. Effects of heat shock on energy metabolism and antioxidant defense in a tropical fish species Psalidodon bifasciatus. **Journal of Fish Biology**, 2022. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfb.15036>...

ROBINSON, E. Antarctic fish: thermal specialists or adaptable generalists? **University of Canterbury, Christchurch, New Zealand**, 12. fev. 2008. Disponível em: https://www.semanticscholar.org/paper/Antarctic-Fish%3A-Thermal-Specialists-or-Adaptable-Robinson/df4fa3215a036388bda4819c858641dd99210a2a>.

ROSSI, A.; BACCHETTA, C.; CAZENAVE, J. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). **Ecological Indicators**, v. 79, p. 361–370, 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X17302182.

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

SCHIELZETH, H. Simple means to improve the interpretability of regression coefficients: *Interpretation of regression coefficients*. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, n. 2, p. 103–113, 2010. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/j.2041-210X.2010.00012.x.

SCHLEGER, I. C.; PEREIRA, D. M. C.; RESENDE, A. C.; et al. Cold and warm waters: energy metabolism and antioxidant defenses of the freshwater fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) under thermal stress. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, n. 0123456789, 2021. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00360-021-01409-2>.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. First Edit ed. Elsevier Inc., 2016.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl

groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192–205, 1968. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003269768900924>.

SHUTER, B. J.; FINSTAD, A. G.; HELLAND, I. P.; ZWEIMÜLLER, I.; HÖLKER, F. The role of winter phenology in shaping the ecology of freshwater fish and their sensitivities to climate change. **Aquatic Sciences**, v. 74, n. 4, p. 637–657, 2012.

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

SILVA, E. M. P.; OLIVEIRA, R. H. F. Portable point-of-care device as alternative tool for monitoring blood glicose in lambari *Astyanax altiparanae*: stress and sex-specific effects. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 4, p. 557–568, 2017.

SOKOLOVA, I. M.; FREDERICH, M.; BAGWE, R.; LANNIG, G.; SUKHOTIN, A. A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 1–15, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>.

SOLLID, J.; WEBER, R. E.; NILSSON, G. E. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. Journal of Experimental Biology, v. 208, n. 6, p. 1109–1116, 2005.

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

SPEERS-ROESCH, B.; NORIN, T.; DRIEDZIC, W. R. The benefit of being still: Energy savings during winter dormancy in fish come from inactivity and the cold, not from metabolic rate depression. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1886, 2018.

STEVANATO, D. J.; OSTRENSKY, A. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, p. 1–10, 2018.

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

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

VARIS, J.; HAVERINEN, J.; VORNANEN, M. Lowering temperature is the trigger for glycogen build-up and winter fasting in Crucian carp (*Carassius carassius*). **Zoological Science**, v. 33, n. 1, p. 83–91, 2016. Disponível em: http://www.bioone.org/doi/10.2108/zs150072>.

VIANA, L. F.; SUAREZ, Y. R.; LIMA-JUNIOR, S. E. Influence of environmental integrity on the feeding biology of *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) in the Ivinhema river basin. Acta Scientiarum. Biological Sciences, v. 35, n. 4, p. 541–548, 2013. Disponível em: http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/19497.

VIEIRA, V. A. R. O.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 1–8, 2013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045612000920>.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; MENDONÇA, V.; et al. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. **Marine Environmental Research**, v. 97, p. 10–14, 2014. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113614000233>.

WANG, M.; ZHU, Z. Nrf2 is involved in osmoregulation, antioxidation and immunopotentiation in *Coilia nasus* under salinity stress. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 1453–1463, 2019. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2019.1673671>.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; et al. Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. **Aquaculture**, v. 481, n. June, p. 169–176, 2017. Elsevier. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.002>.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; GAO, J. Z. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 1372–1381, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.401>.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 77, p.325–333, 1981. Elsevier. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687981770460. WILKIE, M. P. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology**, v. 118, n. 1, p. 39–50, 1997.

ZAFRA-LEMOS, L.; LOPES, V. L.; RAMPAZZO, A. P. S.; et al. Evidence of cytogenetic and histological damage in specimens of *Astyanax lacustris* (Pisces, characidae) exposed to the hydrogen cyanide-based herbicide Dormex[®]. Acta Scientiarum - Biological Sciences, v. 43, p. 1–10, 2021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espécie de peixe de água doce *Astyanax lacustris* é abundante no rio Iguaçu, no estado do Paraná. Estudar suas respostas metabólicas frente às variações de temperatura entre inverno e verão nesta região permite conhecer como esta espécie está adaptada evolutivamente e fornece subsídios para ações de manejo e conservação deste importante recurso natural.

No capítulo I, foram estudados os efeitos do estresse térmico de baixa (15 °C) e alta (31 °C) temperatura no fígado. Os resultados demostraram que a baixa temperatura provocou alta demanda energética, com aumento da via glicolítica, no ciclo do ácido cítrico e no catabolismo de aminoácidos; e a baixa temperatura não afetou o metabolismo antioxidante. Em alta temperatura, o fígado atuou exportando glicose para atender à demanda energética, e teve aumento nas defesas antioxidantes. Foi verificado aumento nos níveis de peroxidação lipídica em baixa temperatura e aumento nos níveis de proteínas carboniladas em alta temperatura, indicando que em ambas as temperaturas houve estresse oxidativo, ou seja, houve um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade de neutralização destes radicais livres.

No capítulo II, constam os resultados do estudo de estresse térmico de baixa (15 °C) e alta (31 °C) temperatura no metabolismo de brânquias. Em baixa temperatura, ocorreu redução nas taxas metabólicas, não havendo alterações no metabolismo de carboidratos e de proteínas e houve redução nas defesas antioxidantes. Ocorreu dano oxidativo, com aumento nos níveis de carbonilação de proteínas. Já em alta temperatura, ocorreu aumento na glicólise, ciclo do ácido cítrico e inibição da via das pentoses fosfato, indicando aumento na demanda energética, além de aumento nas defesas antioxidantes. Porém, a resposta da defesa antioxidante não foi suficiente para conter o estresse oxidativo, ocorrendo danos em proteínas.

Estes resultados demostram que o estresse térmico desencadeou diferentes respostas metabólicas para as temperaturas de inverno e verão e que os órgãos, figado e brânquias, também apresentam respostas diferenciadas. Mesmo com a ocorrência de estresse oxidativo, *A. lacustris* reestabelece a homeostase após um período de ajustes, demonstrando que consegue suportar as variações térmicas com a intensidade e duração impostas neste estudo.

REFERÊNCIAS

ABELE, D.; PUNTARULO, S. Formation of reactive species and induction of antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 138, n. 4, p. 405–415, 2004. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643304001722>.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p.121–126, 1984. Elsevier. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050163.

ALBARRÁN, M. T.; LÓPEZ-BURILLO, S.; PABLOS, M. I.; REITER, R. J.; AGAPITO, M. T. Endogenous rhythms of melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity in several tissues of chick and their inhibition by light: Melatonin, total antioxidant status and superoxide dismutase activity rhytms. **Journal of Pineal Research**, v. 30, n. 4, p. 227–233, 2001. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1034/j.1600-079X.2001.300406.x>.

ALMEIDA, J. R.; GRAVATO, C.; GUILHERMINO, L. Effects of temperature in juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) biomarker responses and behaviour: implications for environmental monitoring. **Estuaries and Coasts**, v. 38, n. 1, p. 45–55, 2015. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s12237-014-9792-7>. .

BAGNYUKOVA, T. V; LUSHCHAK, O. V; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Oxidative stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature from 3 to 23°C. **Journal of Thermal Biology**, v. 32, n. 4, p. 227–234, 2007. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306456507000149>.

BALASCH, J. C.; TORT, L. Netting the stress responses in fish. Frontiers in Endocrinology, v. 10, n. FEB, p. 1–12, 2019.

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

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 517–525, 2002.

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

BEAMAN, J. E.; WHITE, C. R.; SEEBACHER, F. Evolution of Plasticity: Mechanistic Link between Development and Reversible Acclimation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 31, n. 3, p. 237–249, 2016. Disponível em:
https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534716000185

BENNEMANN, S. T.; GEALH, A. M.; ORSI, M. L.; SOUZA, L. M. Occurrence and trophic ecology of four species of *Astyanax* (Characidae) in different rivers of the Tibagi River Basin, Paraná, Brazil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 95, n. 3, p. 247–254, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0073-47212005000300004&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

BEYAN, C.; BOOM, B. J.; LIEFHEBBER, J. M. P.; SHAO, K.-T.; FISHER, R. B. Natural swimming speed of *Dascyllus reticulatus* increases with water temperature. **ICES Journal of Marine Science**, v. 72, n. 8, p. 2506–2511, 2015. Disponível em: https://academic.oup.com/icesjms/article/72/8/2506/2458916>.

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

BOWDEN, A. J.; GARDINER, N. M.; COUTURIER, C. S.; et al. Alterations in gill structure in tropical reef fishes as a result of elevated temperatures. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 175, p. 64–71, 2014.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BUENO-KRAWCZYK, A. C. D.; GUILOSKI, I. C.; PIANCINI, L. D. S.; et al. Multibiomarker in fish to evaluate a river used to water public supply. **Chemosphere**, v. 135, p. 257–264, 2015. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653515004038>.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen. Transition, p. 79-110, 1989.

CARLETTI, E.; SULPIZIO, M.; BUCCIARELLI, T.; et al. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 48–57, 2008.

CARRASCO-LETELIER, L.; EGUREN, G.; MELLO, F. T.; GROVES, P. A. Preliminary field study of hepatic porphyrin profiles of *Astyanax fasciatus* (Teleostei, Characiformes) to define anthropogenic pollution. **Chemosphere**, v. 62, n. 8, p. 1245–1252, 2006. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0045653505009094>.

CHANG, J. C. H.; WU, S. M.; TSENG, Y. C.; et al. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 19, p. 3494–3504, 2007.

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, v. 52, n. 3, p. 273–283, 1979. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/BF00398141.

CHUNG, K. S. Heat resistance and thermal acclimation rate in tropical tetra *Astyanax bimaculatus* of Venezuela. **Environmental Biology of Fishes**, v. 57, n. 4, p. 459–463, 2000.

CIARDIELLO, A.; CAMARDELLA, L.; DI PRISCO, G. 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**, v. 1250, n. 1, p. 76–82, 1995.

CIARDIELLO, M. A.; CAMARDELLA, L.; CARRATORE, V.; DI PRISCO, G. L-Glutamate dehydrogenase from the Antartic fish *Chaenocephalus aceratus*. Primary srtucture, function and thermodynamic characterisation: relationship with cold adaptation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1543, n. 1, p. 11–23, 2000. Naples, Italy: Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167483800001862?via%3Dihub>. .

CONDE-SIEIRA, M.; SOENGAS, J. L. Nutrient sensing systems in fish: Impact on food intake regulation and energy homeostasis. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, n. JAN, p. 1–21, 2017.

COSTA-SILVA, D. G.; NUNES, M. E. M.; WALLAU, G. L.; et al. Oxidative stress markers in fish (*Astyanax* sp. and *Danio rerio*) exposed to urban and agricultural effluents in the Brazilian Pampa biome. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 20, p. 15526–15535, 2015.

COSTA, I. A. S. F.; DRIEDZIC, W. R.; GAMPERL, A. K. Metabolic and cardiac responses of cunner *Tautogolabrus adspersus* to seasonal and acute changes in temperature. **Physiological and Biochemical Zoology**, v. 86, n. 2, p. 233–244, 2013. Disponível em: https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/669538>.

CROCKETT, E. L. The cold but not hard fats in ectotherms: Consequences of lipid restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review. Journal of **Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 178, n. 7, p. 795–809, 2008.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; et al. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v. 30, n. 3, p. 235–241, 1981. Disponível em: http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/diab.30.3.235.

DALVI, R. S.; DAS, T.; DEBNATH, D.; et al. Metabolic and cellular stress responses of catfish, <i>Horabagrus brachysoma</I> (Günther) acclimated to increasing temperatures. **Journal of Thermal Biology**, v. 65, n. December 2016, p. 32–40, 2017. Elsevier. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.02.003>.

DALZOCHIO, T.; RODRIGUES, G. Z. P.; PETRY, I. E.; GEHLEN, G.; DA SILVA, L. B. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. **International Aquatic Research**, v. 8, n. 4, p. 283–298, 2016.

DEPONTE, M. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1830, n. 5, p. 3217–3266, 2013. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>.

DINKOVA-KOSTOVA, A. T.; KOSTOV, R. V; KAZANTSEV, A. G. The role of Nrf2 signaling in counteracting neurodegenerative diseases. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 19, p. 3576–3590, 2018. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/febs.14379>.

DYMOWSKA, A. K.; HWANG, P. P.; GOSS, G. G. Structure and function of ionocytes in the freshwater fish gill. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 282–292, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2012.08.025>.

EMBRAPA. Atlas climático da região sul do Brasil. Journal of Chemical Information and Modeling, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2012.

ENES, P.; PANSERAT, S.; KAUSHIK, S.; OLIVA-TELES, A. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 3, p. 519–539, 2009.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, n. 1, p. 97–177, 2005.

FARKAS, T.; FODOR, E.; KITAJKA, K.; HALVER, J. E. Response of fish membranes to environmental temperature: Fish membranes and temperature. **Aquaculture Research**, v. 32, n. 8, p. 645–655, 2001. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2109.2001.00600.x>.

FATHI, A.-R.; KRAUTHEIM, A.; LUCKE, S.; BECKER, K.; JUERGEN STEINFELDER, H. Nonradioactive technique to measure protein phosphatase 2A-like activity and its inhibition by drugs in cell extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 310, n. 2, p. 208–214, 2002. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269702003779>.

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

FERNANDES, T.; MCMEANS, B. C. Coping with the cold: energy storage strategies for surviving winter in freshwater fish. **Ecography**, v. 42, n. 12, p. 2037–2052, 2019. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ecog.04386>.

FICKE, A. D.; MYRICK, C. A.; HANSEN, L. J. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. 2007.

FONSECA, T.; COSTA-PIERCE, B. A.; VALENTI, W. C. Lambari aquaculture as a means for the sustainable development of rural communities in Brazil. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 25, n. 4, p. 316–330, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1080/23308249.2017.1320647>.

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

FOYLE, K. L.; HESS, S.; POWELL, M. D.; HERBERT, N. A. What is gill health and what is its role in marine finfish aquaculture in the face of a changing climate? **Frontiers in Marine Science**, v. 7, n. June, p. 1–16, 2020.

GARAVELLO, J. C.; SAMPAIO, F. A. A. Five new species of genus <I>Astyanax</i> Baird & Girard, 1854 from Rio Iguaçu, Paraná, Brazil (Ostariophysi, Characiformes, Characidae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3 SUPPL., p. 847–865, 2010.

GARCIA, L. O.; OKAMOTO, M. H.; RIFFEL, A. P. K.; et al. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 607–612, 2015. Disponível em: ..">http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252015000300607&lng=en&tlng=en>..

GERLACH, G. F.; TURAY, L.; MALIK, K. T. A.; et al. Mechanisms of temperature acclimation in the carp: A molecular biology approach. **American Journal of Physiology -Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 259, n. 2 28-2, p. 237–244, 1990.

GNOCCHI, K. G.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; GOMES, L. C.; CHIPPARI-GOMES, A. R. De novo assembly and annotation of the transcriptome of *Astyanax lacustris* liver unveil candidate genes to monitor response to environmental stress. **Marine Genomics**, v. 54, n. May, p. 100784, 2020. Elsevier. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.margen.2020.100784>.

GOLOVANOV, V. K. Influence of various factors on upper lethal temperature (review). **Inland Water Biology**, v. 5, n. 1, p. 105–112, 2012. Disponível em: http://link.springer.com/10.1134/S1995082911040079>.

GRIM, J. M.; MILES, D. R. B.; CROCKETT, E. L. Temperature acclimation alters oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 3, p. 445–452, 2010.

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

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643312005235>.

GUILLEN, A. C.; BORGES, M. E.; HERRERIAS, T.; et al. Effect of gradual temperature increase on the carbohydrate energy metabolism responses of the Antarctic fish *Notothenia rossii*. **Marine Environmental Research**, v. 150, n. June, p. 104779, 2019. Elsevier. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.104779, .

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HAN, H. S.; KANG, G.; KIM, J. S.; CHOI, B. H.; KOO, S. H. Regulation of glucose

metabolism from a liver-centric perspective. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 48, n. 3, p. 1–10, 2016. Nature Publishing Group.

HARASAWA, H.; MATSUOKA, Y.; TAKAHASHI, K.; et al. Potential Impacts of Global Climate Change. **Climate Policy Assessment**, , n. August, p. 37–54, 2003.

HARDEWIG, I.; PÖRTNER, H. O.; DIJK, P. V. How does the cold stenothermal gadoid *Lota lota* survive high water temperatures during summer? **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 174, n. 2, p. 149–156, 2004.

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

HEMRE, G.-I.; MOMMSEN, T. P.; KROGDAHL, Å. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes: Carbohydrates in fish nutrition. **Aquaculture Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 175–194, 2002. Disponível em: ">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x>">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x>">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x>">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x>">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x>">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x>">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x<">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x<">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x<">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x<">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-200200.x<">http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-20020000000000

HEMRE; KAHRS, F. 14 C-glucose injection in Atlantic cod, *Gadus morhua*, metabolic responses and excretion via the gill membrane. **Aquaculture Nutrition**, v. 3, n. 1, p. 3–8, 1997. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2095.1997.00052.x.

IBARZ, A.; MARTÍN-PÉREZ, M.; BLASCO, J.; et al. Gilthead sea bream liver proteome altered at low temperatures by oxidative stress. **PROTEOMICS**, v. 10, n. 5, p. 963–975, 2010. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/pmic.200900528>.

INOUE, L. A. K. A.; MORAES, G.; IWAMA, G. K.; AFONSO, L. O. B. Physiological stress responses in the warm-water fish matrinxã (Brycon amazonicus) subjected to a sudden cold shock. **Acta Amazonica**, v. 38, n. 4, p. 603–609, 2008.

ISORNA, E.; PEDRO, N. DE; VALENCIANO, A. I.; ALONSO-GÓMEZ, Á. L.; DELGADO, M. J. Interplay between the endocrine and circadian systems in fishes. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 3, p. R141–R159, 2017. Disponível em: https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/232/3/R141.xml.

ITCG. Clima - estado do Paraná. **Instituto de Terras, Cartografia e Geociências do Paraná**, p. 54, 2008.

JIN, S.-R.; WEN, B.; CHEN, Z.-Z.; et al. Sensitivity in the antioxidant system of discus fish (*Symphysodon* spp.) to cold temperature: evidence for species-specific cold resistance. **bioRxiv**, 2019.

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

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

LAIZ-CARRIÓN, R.; SANGIO-ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J. M.; et al. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. **Fish Physiology and Biochemistry**, p. 179–188, 2004.

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

LEVESQUE, H. M.; MOON, T. W.; CAMPBELL, P. G. C.; HONTELA, A. Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. **Aquatic Toxicology**, v. 60, n. 3–4, p. 257–267, 2002. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X02000127.

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**. v. 233, p.346–357, 1994. Elsevier. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687994330409>.

LI, X.; ZHENG, S.; WU, G. Nutrition and metabolism of glutamate and glutamine in fish. Amino Acids, 52(5):671-691, 2020. Disponível em: https://link.springer.com/article/10.1007/s00726-020-02851-2

LIRA, L. V. G.; KURADOMI, R. Y.; DE SOUZA, T. G.; HAINFELLNER, P.; BATLOUNI, S. R. *Astyanax altiparanae* ovarian maturation after spawning in water recycling systems. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 44, n. 4, p. 438–455, 2018. Disponível em: https://www.pesca.sp.gov.br/boletim/index.php/bip/article/view/1318>.

LIU, C.; DONG, S.; ZHOU, Y.; et al. Temperature-Dependent Fatty Acid Composition Change of Phospholipid in Steelhead Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Tissues. Journal of Ocean University of China, v. 18, n. 2, p. 519–527, 2019.

LORO, V. L.; MURUSSI, C.; MENEZES, C.; et al. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 3, p. 569–578, 2015. Disponível em: ..

LUCENA, C. A. S.; SOARES, H. G. 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 drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, v. 4072, n. 1, p. 101, 2016. Disponível em: http://biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.4072.1.5.

LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology, v. 101, n. 1, p. 13–30, 2011. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. **Comparative Biochemistry and**

Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 143, n. 1, p. 30–35, 2006. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045605002528>.

MAACK, R. Geografia física do Estado do Paraná. Curitiba: IBPT, 1968.

MACÊDO, A. K. S.; SANTOS, K. P. E.; BRIGHENTI, L. S.; et al. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 735, 2020.

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**, v. 166, n. 2, p. 237–243, 2013. Disponível em:

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1095643313001645>.

MADEIRA, D.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. Are fish in hot water? Effects of warming on oxidative stress metabolism in the commercial species *Sparus aurata*. **Ecological Indicators**, v. 63, p. 324–331, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.008>.

MARANDEL, L.; PLAGNES-JUAN, E.; MARCHAND, M.; et al. Nutritional regulation of glucose metabolism-related genes in the emerging teleost model *Mexican tetra* surface fish: a first exploration. **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 2, 2020.

MARTÍNEZ-PORCHAS, M.; MARTÍNEZ-CÓRDOVA, L. R.; RAMOS-ENRIQUEZ, R. Cortisol and glucose: Reliable indicators of fish stress? | ¿Cortisol y glucosa: Fiables indicadores de estrés de los peces? **Pan-American Journal of Aquatic Sciences**, v. 4, n. 2, 2009.

MILLIGAN, C. L. A regulatory role for cortisol in muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum. **Journal of Experimental Biology**, v. 206, n. 18, p. 3167–3173, 2003. Disponível em: http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.00538>.

MITHIEUX, G.; RAJAS, F.; GAUTIER-STEIN, A. A novel role for glucose 6-phosphatase in the small intestine in the control of glucose homeostasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44231–44234, 2004.

MOHAMAD, S.; LIEW, H. J.; ZAINUDDIN, R. A.; et al. High environmental temperature and low pH stress alter the gill phenotypic plasticity of Hoven's carp <i>Leptobarbus hoevenii<i/>i<i/>. Journal of Fish Biology, v. 99, n. 1, p. 206–218, 2021.

MUKAIGASA, K.; NGUYEN, L. T. P.; LI, L.; et al. Genetic evidence of an evolutionarily conserved role for Nrf2 in the protection against oxidative stress. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 21, p. 4455–4461, 2012. Disponível em: http://mcb.asm.org/cgi/doi/10.1128/MCB.00481-12>.

MUSRATI, R. A.; KOLLÁROVÁ, M.; MERNIK, N.; MIKULÁŠOVÁ, D. Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. **General Physiology and Biophysics**, v. 17, n. 3, p. 193–210, 1998.

NARDELLI, M. S.; BUENO, N. C.; LUDWIG, T. A. V.; GUIMARÃES, A. T. B. Estrutura e dinâmica da comunidade de Diatomáceas planctônicas do rio Iguaçu, estado do Paraná, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 374–386, 2016.

NASCIMENTO, N. F. DO; PEREIRA-SANTOS, M.; PIVA, L. H.; et al. Growth, fatty acid composition, and reproductive parameters of diploid and triploid yellowtail tetra Astyanax altiparanae. **Aquaculture**, v. 471, p. 163–171, 2017. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848616306184>.

NAVARRO, F. K. S. P.; NAVARRO, R. D.; MURGAS, L. D. S.; FELIZARDO, V. DE O. Effect of photoperiod stress assessment and locomotor activity of female lambari (*Astyanax bimaculatus*). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 173–180, 2014.

NILSSON, G. E.; DYMOWSKA, A.; STECYK, J. A. W. New insights into the plasticity of gill structure. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 184, n. 3, p. 214–222, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.resp.2012.07.012>.

NIMET, J.; GUIMARÃES, A. T. B.; DELARIVA, R. L. Use of muscular cholinesterase of *Astyanax bifasciatus* (Teleostei, Characidae) as a biomarker in biomonitoring of rural streams. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 99, n. 2, p. 232–238, 2017. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00128-017-2111-9>.

O'BRIEN. Mitochondrial biogenesis in cold-bodied fishes. **Journal of Experimental Biology**, v. 214, n. 2, p. 275–285, 2011. Disponível em: http://jeb.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jeb.046854>.

OLSEN, Y. A.; REITAN, L. J.; ROED, K. H. Gill Na+, K+-ATPase activity, plasma cortisol level, and non-especific immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. **Journal of Fish Biology**, v. 43, p. 559–573, 1993.

ORNELAS-GARCÍA, C.; DOMÍNGUEZ-DOMÍNGUEZ, O.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the fish genus *Astyanax* Baird & Girard (1854) (Actinopterygii, Characidae) in Mesoamerica reveals multiple morphological homoplasies. **BMC Evolutionary Biology**, v. 8, n. 1, p. 340, 2008. Disponível em: http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-8-340>.

PAITAL, B.; CHAINY, G. B. N. Redox metabolism in fishes under thermal stress warrants more attention. Asian Journal of Chemistry, v. 27, n. 11, p. 4120–4124, 2015.

PARANÁ. Resolução nº49, de 20 de dezembro de 2006. Dispõe sobre a instituição de Regiões Hidrográficas, Bacias Hidrográficas e Gerenciamento de Recursos Hídricos do Estado do Paraná. , 2006. SEMA: Secretaria do Estado do Meio Ambiente e de Recursos Hídricos, Conselho Estadual de Recursos Hídricos.

PARANÁ. Bacias Hidrográficas do Paraná. Série Histórica. Curitiba, 2010.

PECK, L. S.; CONWAY, L. Z. The myth of metabolic cold adaptation: Oxygen consumption in stenothermal Antarctic bivalves. **The Geological Society of London**, v. 177, p. 441–450, 2000.

PÉDRON, N.; LE DU, J.; CHARRIER, G.; et al. Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. **Marine Environmental Research**, v. 129, p. 258–267, 2017.

PERRY, S. F.; SHAHSAVARANI, A.; GEORGALIS, T.; et al. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology, v. 300, n. 1, p. 53–62, 2003.

PLAITAKIS, A.; KALEF-EZRA, E.; KOTZAMANI, D.; ZAGANAS, I.; SPANAKI, C. The glutamate dehydrogenase pathway and its roles in cell and tissue biology in health and disease. **Biology**, v. 6, n. 1, p. 1–26, 2017.

POL, I.; FLIK, G.; GORISSEN, M. Comparative physiology of energy metabolism: fishing for endocrine signals in the early vertebrate pool. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, 2017. Disponível em: http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2017.00036/full.

POLAKOF, S.; PANSERAT, S.; SOENGAS, J. L.; MOON, T. W. Glucose metabolism in fish: a review. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 182, n. 8, p. 1015–1045, 2012. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/s00360-012-0658-7.

PÖRTNER, H. O. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: Systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 132, n. 4, p. 739–761, 2002.

PROKKOLA, J. M.; NIKINMAA, M. Circadian rhythms and environmental disturbances – underexplored interactions. **The Journal of Experimental Biology**, v. 221, n. 16, p. jeb179267, 2018. Disponível em: http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.179267.

RADOVANOVIC, T.; BORKOVIC-MITIC, S.; PERENDIJA, B.; et al. Superoxide dismutase and catalase activities in the liver and muscle of barbel (*Barbus barbus*) and its intestinal parasite (*Pomphoryinchus laevis*) from the Danube river, Serbia. Archives of Biological Sciences, v. 62, n. 1, p. 97–105, 2010. Disponível em: http://www.doiserbia.nb.rs/Article.aspx?ID=0354-46641001097R>.

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

https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166445X11001834>.

RESENDE, A. C.; PEREIRA, D. M. C.; SCHLEGER, I. C.; et al. Effects of heat shock on energy metabolism and antioxidant defense in a tropical fish species Psalidodon bifasciatus. **Journal of Fish Biology**, 2022. Disponível em: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfb.15036>.

ROBINSON, E. Antarctic fish: thermal specialists or adaptable generalists? University of Canterbury, Christchurch, New Zealand, 12. fev. 2008. Disponível em:

<https://www.semanticscholar.org/paper/Antarctic-Fish%3A-Thermal-Specialists-or-Adaptable-Robinson/df4fa3215a036388bda4819c858641dd99210a2a>. .

ROSSI, A.; BACCHETTA, C.; CAZENAVE, J. Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). **Ecological Indicators**, v. 79, p. 361–370, 2017. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X17302182.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. In: R. Terjung (Org.); **Comprehensive Physiology**. p.177–197, 2014. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1002/cphy.c130024>.

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

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, F. J.; LÓPEZ-OLMEDA, J. F.; VERA, L. M.; et al. Environmental cycles, melatonin, and circadian control of stress response in fish. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 279, 2019. Disponível em: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2019.00279/full.

SCHIELZETH, H. Simple means to improve the interpretability of regression coefficients: *Interpretation of regression coefficients*. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, n. 2, p. 103–113, 2010. Disponível em: http://doi.wiley.com/10.1111/j.2041-210X.2010.00012.x>.

SCHLEGER, I. C.; PEREIRA, D. M. C.; RESENDE, A. C.; et al. Cold and warm waters: energy metabolism and antioxidant defenses of the freshwater fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) under thermal stress. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, n. 0123456789, 2022. Springer Berlin Heidelberg. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s00360-021-01409-2>.

SCHRECK, C. B.; TORT, L. The Concept of Stress in Fish. First Edit ed. Elsevier Inc., 2016.

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

SEVERI, W.; CORDEIRO, A. A. M. Catálogo de peixes da bacia do rio Iguaçu. Curitiba, 1994.

SHUTER, B. J.; FINSTAD, A. G.; HELLAND, I. P.; ZWEIMÜLLER, I.; HÖLKER, F. The role of winter phenology in shaping the ecology of freshwater fish and their sensitivities to climate change. **Aquatic Sciences**, v. 74, n. 4, p. 637–657, 2012.

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

SILVA, E. M. P.; OLIVEIRA, R. H. F. Portable point-of-care device as alternative tool for

monitoring blood glicose in lambari *Astyanax altiparanae*: stress and sex-specific effects. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 43, n. 4, p. 557–568, 2017.

SILVEIRA, U. S.; LOGATO, P. V. R.; PONTES, E. C. Fatores estressantes em peixes. **Revista Eletrônica Nitritime**, v. 6, p. 1001–1017, 2009.

SIQUEIRA-SILVA, D. H.; SILVA, A. P. DOS S.; SILVEIRA, A. N.; SILVEIRA, R. V. The effects of temperature and busulfan (Myleran) on the yellowtail tetra *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) spermatogenesis. **Theriogenology**, v. 84, n. 6, p. 1033–1042, 2015. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X1500309X>.

SOKOLOVA, I. M.; FREDERICH, M.; BAGWE, R.; LANNIG, G.; SUKHOTIN, A. A. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. **Marine Environmental Research**, v. 79, p. 1–15, 2012. Elsevier Ltd. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>.

SOLLID, J.; WEBER, R. E.; NILSSON, G. E. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. Journal of Experimental Biology, v. 208, n. 6, p. 1109–1116, 2005.

SOPINKA, N. M.; DONALDSON, M. R.; O'CONNOR, C. M.; SUSKI, C. D.; COOKE, S. J. Stress Indicators in Fish. 2016.

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

SPEERS-ROESCH, B.; NORIN, T.; DRIEDZIC, W. R. The benefit of being still: Energy savings during winter dormancy in fish come from inactivity and the cold, not from metabolic rate depression. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 285, n. 1886, 2018.

STEVANATO, D. J.; OSTRENSKY, A. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 2, p. 1–10, 2018.

SUN, S.; WU, Y.; YU, H.; et al. Serum biochemistry, liver histology and transcriptome profiling of bighead carp *Aristichthys nobilis* following different dietary protein levels. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 86, p. 832–839, 2019. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1050464818308350>.

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

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

TOMÁS-ZAPICO, C.; COTO-MONTES, A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes: Mechanism against oxidative stress. **Journal of Pineal Research**, v. 39, n. 2, p. 99–104, 2005. Disponível em:

http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-079X.2005.00248.x>.

VARIS, J.; HAVERINEN, J.; VORNANEN, M. Lowering temperature is the trigger for glycogen build-up and winter fasting in Crucian carp (*Carassius carassius*). **Zoological Science**, v. 33, n. 1, p. 83–91, 2016. Disponível em: http://www.bioone.org/doi/10.2108/zs150072>.

VIANA, L. F.; SUAREZ, Y. R.; LIMA-JUNIOR, S. E. Influence of environmental integrity on the feeding biology of *Astyanax altiparanae* (Garutti & Britski, 2000) in the Ivinhema river basin. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 35, n. 4, p. 541–548, 2013. Disponível em: http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/ActaSciBiolSci/article/view/19497>.

VIEIRA, V. A. R. O.; CORREIA, T. G.; MOREIRA, R. G. Effects of aluminum on the energetic substrates in neotropical freshwater *Astyanax bimaculatus* (Teleostei: Characidae) females. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 157, n. 1, p. 1–8, 2013. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045612000920>.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; MENDONÇA, V.; et al. Effect of increasing temperature in the differential activity of oxidative stress biomarkers in various tissues of the Rock goby, *Gobius paganellus*. **Marine Environmental Research**, v. 97, p. 10–14, 2014. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141113614000233>.

VINAGRE, C.; MADEIRA, D.; NARCISO, L.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. **Ecological Indicators**, v. 23, p. 274–279, 2012. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470160X12001719>.

WANG, M.; ZHU, Z. Nrf2 is involved in osmoregulation, antioxidation and immunopotentiation in *Coilia nasus* under salinity stress. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 1453–1463, 2019. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13102818.2019.1673671>.

WANG, Y.; LI, C.; PAN, C.; et al. Alterations to transcriptomic profile, histopathology, and oxidative stress in liver of pikeperch (*Sander lucioperca*) under heat stress. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 95, n. October, p. 659–669, 2019. Elsevier. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.fsi.2019.11.014>.

WARREN, M. L. .; BURR, B. M. Freshwater fishes of north America. Volume 2 ed. 2020.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; et al. Plasticity of energy reserves and metabolic performance of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) exposed to low-temperature stress. **Aquaculture**, v. 481, n. June, p. 169–176, 2017. Elsevier. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.09.002>.

WEN, B.; JIN, S. R.; CHEN, Z. Z.; GAO, J. Z. Physiological responses to cold stress in the gills of discus fish (*Symphysodon aequifasciatus*) revealed by conventional biochemical assays and GC-TOF-MS metabolomics. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 1372–1381, 2018. Elsevier B.V. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.401>.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**. v. 77, p.325–333, 1981. Elsevier. Disponível em: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687981770460.

WHITE, C. R.; ALTON, L. A.; FRAPPELL, P. B. Metabolic cold adaptation in fishes occurs at the level of whole animal, mitochondria and enzyme. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 279, n. 1734, p. 1740–1747, 2012.

WILKIE, M. P. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology, v. 118, n. 1, p. 39–50, 1997.

YAMASHITA, M.; YABU, T.; OJIMA, N. Stress protein HSP70 in fish. Aqua-BioScience Monographs, v. 3, n. 4, p. 111–141, 2010.

ZAFRA-LEMOS, L.; LOPES, V. L.; RAMPAZZO, A. P. S.; et al. Evidence of cytogenetic and histological damage in specimens of *Astyanax lacustris* (Pisces, characidae) exposed to the hydrogen cyanide-based herbicide Dormex[®]. Acta Scientiarum - Biological Sciences, v. 43, p. 1–10, 2021.

ZAKHARTSEV, M.; JOHANSEN, T.; PÖRTNER, H. O.; BLUST, R. Effects of temperature acclimation on lactate dehydrogenase of cod (*Gadus morhua*): genetic, kinetic and thermodynamic aspects. **Journal of Experimental Biology**, v. 207, n. 1, p. 95–112, 2004. ZHDANOVA, I. V.; REEBS, S. G. Circadian Rhythms in Fish. **Fish Physiology**, v. 24, n. C, p. 197–238, 2005.

BIOMARCA	DORES ANALISADOS		
Biomarcador	Medição da atividade	Fórmula	Observações
G6Pase	Leitura de tempo fixo. Comparação dos valores obtidos das amostras com curva de calibração.	(((Média ABS Amostra – Média ABS Controle – Média ABS branco)*VT	ABS Controle = branco de cada amostra;
		incubado) / (coeficiente de regressão linear da curva * VA * Prot)) * Dil)*2	ABS branco = meio de reação *2 = correcão da concentracão de
			fosfato
GP	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot))	$E = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} (\text{NADP}^{+} \text{ cm} 340)$
	de 30 s, durante 15 min. Velocidade da reação	* (Dil)	(uu)
	medida pela variação da absorbância em		CO = 1,25 cm (100 ul)
	linearidade de leitura por minuto.		
HK	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot))	$E = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1} (\text{NADP}^{+} \text{ em } 340)$
	de 30 s, durante 15 min.	* (Dil)	nm)
	Velocidade da reação medida pela variação da		CO = 1 cm (80 ul)
	absorbância em linearidade de leitura por minuto.		
PFK	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot))	$E = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (NADH em 340
	de 30 s, durante 15 min.	* (Dil)	um)
	Velocidade da reação medida pela variação da		CO = 1 cm (80 ul)
	absorbância em linearidade de leitura por minuto.		
PK	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot))	$E = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (NADH em 340
	de 30 s, durante 15 min.	* (Dil)	um)
	Velocidade da reação medida pela variação da		CO = 1 cm (80 ul)
	absorbância em linearidade de leitura por minuto.		
LDH	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot))	$E = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (NADH em 340
	de 30 s, durante 15 min.	* (Dil)	nm)
	Velocidade da reação medida pela variação da		CO = 1 cm (80 ul)
	absorbância em linearidade de leitura por minuto.		

APÊNDICE 1 - FÓRMULAS UTILIZADAS PARA O CÁLCULO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA OU CONCENTRAÇÃO DOS

CS	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 30 s, durante 15 min. Velocidade da reação medida pela variação da	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot)) * (Dil)	E = 13,61 mM ⁻¹ .cm ⁻¹ (DTNB em 412 nm) CO = 1 cm (80 ul)
HDM	absorbancia em inicaridade de fetura por minuo. Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 30 s, durante 15 min. Velocidade da reação medida pela variação da absorbância em linearidade de leitura por minuto.	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot)) * (Dil)	E = 6,22 mM ⁻¹ .cm ⁻¹ (NADH em 340 nm) CO = 1 cm (80 ul)
G6PDH	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 30 s, durante 15 min. Velocidade da reação medida pela variação da absorbância em linearidade de leitura nor minuto.	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot)) * (Dil)	E = 6,22 mM ⁻¹ .cm ⁻¹ (NADH em 340 nm) CO = 1,25 cm (100 ul)
GLDH	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 30 s, durante 5 min. Velocidade da reação medida pela variação da absorbância em linearidade de leitura por minuto.	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot)) * (Dil)	$E = 6,22 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1} \text{ (NADP}^{+} \text{ em } 340 \text{ nm})$ nm) CO = 1,25 cm (100 ul)
AST	Leitura de tempo fixo. Comparação dos valores obtidos das amostras com curva de calibração.	A partir da curva de calibração (y = ax), onde y = absorbância; a = concentração; x = atividade de AST.	Conversão de Unidades (U RF/mL para SI): U/L = U RF/mL x 0,482
ALT	Leitura de tempo fixo. Comparação dos valores obtidos das amostras com curva de calibração.	A partir da curva de calibração (y = ax), onde y = absorbância; a = concentração; x = atividade de ALT.	Conversão de Unidades (U RF/mL para SI): U/L = U RF/mL x 0,482
SOD	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 30 min, durante 4 horas.	(((Média ABS Branco/ Média ABS Amostra) -1) * (VT/VA*Prot)) * (Dil)	Média ABS Branco = ABS final – ABS inicial/ tempo de análise (hora) Média ABS da amostra= ABS final – ABS inicial/ tempo de análise (hora)
CAT	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 7 s, durante 3 min. Velocidade da reação medida pela variação da absorbância em linearidade de leitura por minuto.	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot)) * (Dil)	$E = 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} (\text{H}_2\text{O}_2 \text{ em } 240 \text{ nm})$ CO = 1 cm (300 ul)

GP _X	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 30 s, durante 10 min. Velocidade da reação medida pela variação da	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot)) * (Dil)	E = 6,22 mM ⁻¹ .cm ⁻¹ (NADH em 340 nm) CO = 1,25 cm (100 ul)
GSH	Leitura de tempo fixo. Comparação dos valores obtidos das amostras com curva de calibração.	A partir da curva de calibração (y = ax), onde y = absorbância; a = concentração; x = níveis de tois não proteicos.	1,25 = diluição das amostras
GR	Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 30 s, durante 10 min. Velocidade da reacão medida nela variacão da	<pre>((Incura ADS = 0tatico) A 1,23) / (ax/[proteínas]) ((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot)) * (Dil)</pre>	$E = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ (NADH em 340 nm)}$ nm) CO = 1.25 cm (100 ul)
GST	absorbância em linearidade de leitura por minuto. Método contínuo (cinética). Leitura em intervalos de 30 s, durante 10 min. Velocidade da reação medida pela variação da absorbância em linearidade de leitura por minuto.	((Velocidade * VT) / (E * CO * VA * Prot)) * (Dil)	$E = 9,6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (tioéter em 340 mm) CO = 1,25 cm (100 ul)
LPO	Leitura de tempo fixo. Comparação dos valores de MDA obtidos das amostras com curva de calibração.	[TBARS]= (((ABS amostra – ABS branco) *Fator de diluição) / coeficiente de regressão linear da curva) / [Prot]	Fator de diluição = 2
PCO	Leitura de tempo fixo. Comparação dos valores de das amostras com seus respectivos brancos.	(ABS *2,5 * 45,45) /[Prot]	ABS= ABS das amostras – ABS dos respectivos brancos de cada amostra; 2,5 = diluição da amostra; 45,45 = cálculo feito a partir do ε = 22.000 M-1.cm-1 para expressão dos resultados em nMol/mg*prot
Legenda: VT = , amostra; Dil = d	volume total no poço da microplaca; E = coeficiente de extinção iluição da amostra; ABS = absorbância. Nota: leituras de espect	b): CO = caminho óptico; VA = volume da amostra utili; trofotometria realizadas em triplicata para cada amostra	zada; Prot = concentração de proteína da 1.