

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NIUMAIQUE GONÇALVES DA SILVA

EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO EM *Rhamdia voulezi*
COLETADOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO IGUAÇU, PARANÁ,
BRASIL: MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO
E DEFESA ANTIOXIDANTE

CURITIBA

2023

NIUMAIQUE GONÇALVES DA SILVA

EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO EM *Rhamdia voulezi*
COLETADOS NA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO IGUAÇU, PARANÁ,
BRASIL: MARCADORES BIOQUÍMICOS DO METABOLISMO ENERGÉTICO
E DEFESA ANTIOXIDANTE

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Lucélia Donatti

Coorientadora: Dr^a. Maria Rosa Dmengeon
Pedreiro de Souza

CURITIBA

2023

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

Silva, Niumaique Gonçalves da

Efeitos do estresse térmico agudo em *Rhamdia voulezi* coletados na Bacia Hidrográfica do Rio Guaçu, Paraná, Brasil : marcadores bioquímicos do metabolismo energético e defesa antioxidante / Niumaique Gonçalves da Silva. – Curitiba, 2023.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Prof^a Dr^a. Lucélia Donatti.

Coorientadora: Dr^a. Maria Rosa Dmengeon Pedreiro de Souza.

1. Jundiá (Peixe). 2. Biomarcadores. 3. Ecotoxicologia. 4. Temperatura - Efeito fisiológico. I. Donatti, Lucélia., 1964-. II. Pedreiro, Maria Rosa Dmengeon, 1987-. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular. IV. Título.

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406



TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **NIUMAIQUE GONÇALVES DA SILVA** intitulada: **Efeitos do estresse térmico agudo em *Rhamdia voulezi* coletados na Bacia Hidrográfica do Rio Iguaçu, Paraná, Brasil: marcadores bioquímicos do metabolismo energético e defesa antioxidante.**, sob orientação da Profa. Dra. LUCELIA DONATTI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

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

CURITIBA, 20 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica

24/03/2023 12:27:20.0

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

26/03/2023 09:52:41.0

KATYA NALIWAIKO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

10/04/2023 15:23:00.0

YURI DORNELLES ZEBRAL

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE)

*Dedico aos meus pais Aldeir
e Domingas que são
exemplos de garra, amor,
sabedoria e humildade.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar oportunidades únicas.

Aos meus pais Aldeir e Domingas por todo apoio, incentivo e amor. Sempre com palavras motivadoras. Amo vocês!!

Aos meus irmãos Niumar, Robson e Alan pelo carinho, companheirismo e suporte. Sempre mantendo contato para ter notícias. Amo vocês!!

Ao Niumar pela surpresa do bolo de aniversário. Não esperava. Mesmo longe de casa, me surpreenderam. Fiquei tão feliz!! Me fez sentir como se estivesse em casa com todos vocês. Te amo!!

Aos meus sobrinhos Arthur e Adriel. São os xodós do tio. Titio é babão mesmo!! Amo muito!!

Aos meus familiares (avós, tios, tias e primos). Não irei citar nomes porque são muitos (kkk). Obrigado por me acompanhar de perto, com palavras de apoio e conforto. Fiquei com muita saudade de todos. Principalmente das bagunças quando sabia que todos estavam reunidos. Amo todos vocês!!

Aos companheiros do Laboratório de Biologia Adaptativa, Jonathan, Ana Paula, Diego Mauro, Diego Ortiz e Ananda. Agradeço vocês pela receptividade que tiveram comigo quando cheguei em Curitiba e por todo carinho, paciência e troca de conhecimento. Vocês foram mais que essenciais na construção desse trabalho!! Os cafés não serão mais os mesmos!! Nem as festas!! Espero poder manter contato e encontrar vocês ao longo desta vida. Também aproveito para agradecer ao Afonso pelo carinho. Mesmo não sendo integrante do lab., mas estava sempre envolvido com a gente nos rolês. Sou muito grato!!

Ao Jonathan Ratko que aturou as minhas paranoias diárias. Os cafés da tarde e as pizzas não tem mais o mesmo significado. Eram muitas risadas, conversas, conselhos, ensinamentos, companheirismo, fofocas, passeios e muitas outras coisas. Agradeço por ter sido essa pessoa maravilhosa!!! Você deixou o mestrado e a saudade da distância de casa mais leve!

A minha prima Thamires Marques Ferreira pelo carinho, risadas e recepção de volta a São Mateus-ES. Minha bióloga preferida!!

Aos meus amigos Lucas e Nayara. A cada vídeo chamada que fazíamos, eram tantas risadas e comédias. Amo vocês!!!

Ao Fernando e Altina pelo companheirismo durante os trabalhos da disciplina de BIOCEL.

As professoras Maysa Oliveira do Vale da UFES campus São Mateus e Tatiana Herrerias do UNICENTRO do Paraná que não mediram esforços para reunir comigo e sanar as minhas dúvidas quando surgiam.

A todos os integrantes do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos, que nos recepcionou e ajudou com o fornecimento de gelo.

Ao técnico Fábio do Departamento de Fisiologia e a Roberta Pozzan do Laboratório de Toxicologia Celular que forneceram suporte de equipamento para algumas análises.

Ao professor Luís Fernando Fávaro pelo ensinamento do método de fator de condição.

Aos vários amigos, professores e profissionais de diversas áreas do conhecimento que de forma direta ou indireta contribuíram com o seu ensinamento, o qual pude aplicar neste estudo.

A minha ex-orientadora Juliana Castro Monteiro Pirovani que foi o meu primeiro exemplo científico durante a graduação. Agradeço pelas oportunidades e pelos incentivos.

Aos professores da banca pelo aceite e contribuições sugeridas.

A minha orientadora Dr^a Prof^a Lucélia Donatti pela confiança, oportunidade, dedicação, carinho e preocupação com a minha chegada em Curitiba. Sou feliz por ter feito parte da história do Laboratório de Biologia Adaptativa.

A minha coorientadora Maria Rosa Dmengen Pedreiro de Souza pelas correções e melhoria da dissertação.

À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq pelo apoio financeiro para desenvolver a pesquisa.

“Não tenho nenhum talento especial, sou apenas apaixonadamente curioso.”
Albert Einstein

RESUMO

A integridade ecológica dos rios, lagos e oceanos é representada pelo estado natural dos corpos d'água. Por sua vez, as práticas humanas ao alterar a dinâmica natural de temperatura dos ambientes aquáticos, seja com águas quentes ou frias, dão origem a poluição térmica. Deste modo, as populações de peixes quando em contato direto com as alterações de temperatura da água, produzem espécies reativas de oxigênio que afetam a ativação, detoxificação, citoproteção e homeostase de todos órgãos, bem como de suas taxas metabólicas e de sobrevivência, devido a predominância ectotérmica. Por isso, conhecer a biologia do estresse térmico agudo em *Rhamdia voulezi*, espécie de peixe nativa e endêmica da bacia hidrográfica do Rio Iguaçu, pode dar suporte para a biodiversidade e conservação da ictiofauna local, brasileira e mundial. O estudo propôs avaliar os marcadores bioquímicos do metabolismo energético e defesa antioxidante do encéfalo, coração e músculo de *Rhamdia voulezi* (n=73) submetido ao estresse térmico agudo de 31°C após a aclimação de 21°C por 2, 6, 12, 24 e 96 horas, respectivamente. Os resultados indicaram aumento da atividade de SOD, GPx e MDH, bem como a redução de SOD, HK e CK no encéfalo. No coração apenas a PCO reduziu e no músculo houve aumento de CAT e glicogênio e diminuição de G6PDH e ALT. A variação dos marcadores de estresse oxidativo dos três órgãos foi explicada pela PCA em 66,91%. A dos marcadores metabólicos do encéfalo e músculo em 61,16%. Os agrupamentos dos marcadores bioquímicos, assim como a separação dos órgãos foram corroborados com os resultados da PERMANOVA. Além disso, a categorização dos marcadores bioquímicos no IBR demonstrou que *R. voulezi* possui ajustes metabólicos e fisiológicos de aclimação, bem como sensibilidade térmica a temperatura de 31°C, mesmo com a higidez fragilizada em todos os tempos de exposição. O qual fez concluir que a temperatura de 31°C tem influência sobre o estado metabólico e oxidativo de *R. voulezi* e que diferentes estratégias metabólicas foram estabelecidas durante as abordagens biológicas observadas. O encéfalo sugeriu obter uma elevada demanda energética com eficiente sistema de defesa antioxidante. O coração apresentou maior fornecimento de oxigênio aos tecidos e regulação dos mecanismos redox e de sinalização celular. O músculo preservou as fibras musculares e manteve o fornecimento de energia sob condições metabólicas extenuantes. Juntamente a isso, os dados de IBR, sensibilidade térmica e higidez forneceram conhecimento sobre o efeito do estresse térmico agudo em *R. voulezi* coletados na bacia hidrográfica do rio Iguaçu e expostos a temperatura de 31°C.

Palavra-chave: Jundiá, biomarcadores, ecotoxicologia aquática, encéfalo, coração, músculo, temperatura, peixe.

ABSTRACT

The ecological integrity of rivers, lakes and oceans is represented by the natural state of water bodies. In turn, human practices by altering the natural temperature dynamics of aquatic environments, whether with hot or cold waters, give rise to thermal pollution. Thus, fish populations, when in direct contact with changes in water temperature, produce reactive oxygen species that affect the activation, detoxification, cytoprotection and homeostasis of all organs, as well as their metabolic and survival rates, due to the ectothermic predominance. Therefore, knowing the biology of acute heat stress in *Rhamdia voulezi*, a species of fish native and endemic to the Iguaçu River watershed, can support the biodiversity and conservation of the local, Brazilian and global ichthyofauna. The study proposed to evaluate the biochemical markers of energy metabolism and antioxidant defense of the brain, heart and muscle of *Rhamdia voulezi* (n=73) submitted to acute heat stress of 31°C after acclimation of 21°C for 2, 6, 12, 24 and 96 hours, respectively. The results indicated increased activity of SOD, GPx and MDH, as well as the reduction of SOD, HK and CK in the brain. In the heart only the PCO reduced and in the muscle, there was an increase in CAT and glycogen and a decrease in G6PDH and ALT. The variation of oxidative stress markers of the three organs was explained by PCA in 66.91%. That of the metabolic markers of the brain and muscle in 61.16%. The groupings of biochemical markers, as well as the separation of organs were corroborated with the results of PERMANOVA. In addition, the categorization of biochemical markers in the IBR showed that *R. voulezi* has metabolic and physiological acclimation adjustments, as well as thermal sensitivity at a temperature of 31°C, even with poor hygiene at all exposure times. This led to the conclusion that the temperature of 31°C has an influence on the metabolic and oxidative state of *R. voulezi* and that different metabolic strategies were established during the observed biological approaches. The brain suggested obtaining a high energy demand with an efficient antioxidant defense system. The heart showed greater oxygen supply to tissues and regulation of redox and cell signaling mechanisms. The muscle preserved muscle fibers and maintained the energy supply under strenuous metabolic conditions. Along with this, IBR, thermal sensitivity and hygiene data provided knowledge about the effect of acute heat stress on *R. voulezi* collected in the Iguaçu River watershed and exposed to a temperature of 31°C.

Keyword: Jundiá, biomarkers, aquatic ecotoxicology, brain, heart, muscle, temperature, fish.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: PANORAMA GERAL DAS VIAS METABÓLICAS	21
FIGURA 2: BACIA HIDROGRÁFICA DA REGIÃO MÉDIO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.	32
FIGURA 3: ESPÉCIME DE <i>Rhamdia voulezi</i>	33
FIGURA 4: ATIVIDADE DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	41
FIGURA 5: CONCENTRAÇÃO DE GSH, EROs, AChE E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.....	42
FIGURA 6: ATIVIDADE DOS MARCADORES METABÓLICOS DE CARBOIDRATOS DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.....	44
FIGURA 7: ATIVIDADE DOS MARCADORES METABÓLICOS DE CREATINA QUINASE, PROTEÍNA E CICLO DE KREBS DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	45
FIGURA 8: CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES METABÓLICOS LACTATO, PIRUVATO E GLICOGÊNIO DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	46
FIGURA 9: ATIVIDADE DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO CORAÇÃO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	47
FIGURA 10: CONCENTRAÇÃO DE GSH, EROs E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO DO CORAÇÃO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.....	48
FIGURA 11: ATIVIDADE DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	49
FIGURA 12: CONCENTRAÇÃO DE GSH, EROs, AChE E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.....	50

FIGURA 13: ATIVIDADE DOS MARCADORES METABÓLICOS DE CARBOIDRATOS DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.....	52
FIGURA 14: ATIVIDADE DOS MARCADORES METABÓLICOS DE CREATINA QUINASE, PROTEÍNA E CICLO DE KREBS DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	53
FIGURA 15: CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES METABÓLICOS LACTATO, PIRUVATO E GLICOGÊNIO DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	54
FIGURA 16: ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	55
FIGURA 17: DIFERENÇAS NO AGRUPAMENTO ENTRE CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO PARA OS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	56
FIGURA 18: ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS MARCADORES METABÓLICOS DO ENCÉFALO E MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	57
FIGURA 19: DIFERENÇAS NO AGRUPAMENTO ENTRE ENCÉFALO E MÚSCULO PARA OS MARCADORES METABÓLICOS DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	58
FIGURA 20: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	59
FIGURA 21: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO CORAÇÃO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	60
FIGURA 22: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	61

FIGURA 23: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DE EROs E DANO OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	62
FIGURA 24: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DE EROs E DANO OXIDATIVO DO CORAÇÃO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	63
FIGURA 25: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DE EROs E DANO OXIDATIVO DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	64
FIGURA 26: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	65
FIGURA 27: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO OXIDATIVO DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	66
FIGURA 28: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	67
FIGURA 29: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	68
FIGURA 30: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO SISTEMA ATP DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.....	69
FIGURA 31: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO SISTEMA ATP DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.....	70
FIGURA 32: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DO ENCÉFALO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	71
FIGURA 33: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DO MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	72

FIGURA 34: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DA DEFESA ANTIOXIDANTE, EROs E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO, METABOLISMO OXIDATIVO, METABOLISMO DO GLICOGÊNIO, SISTEMA ATP E METABOLISMO DE AMINOÁCIDO DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.....	73
FIGURA 35: RESUMO DOS VALORES GERAIS DAS CATEGORIAS DE IBR DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS.	74
FIGURA 36: RESUMO DOS VALORES GERAIS DAS CATEGORIAS DE IBR DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: MÉTODOS UTILIZADOS PARA MENSURAR OS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
TABELA 2: MÉTODOS UTILIZADOS NA MENSURAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS METABÓLICOS.	36
TABELA 3: SENSIBILIDADE DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO.	77
TABELA 4: DADOS BIOLÓGICOS DE <i>Rhamdia voulezi</i> APÓS SER SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.	78

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AChE - Acetilcolinesterase
ALT - Alanina aminotransferase
ANOVA - Análise de variância
AST - Aspartato aminotransferase
ATP - Adenosina trifosfato
BSA - Albumina de soro bovina
CAT - Catalase
CDNB - 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CK - Creatina quinase
CS - Citrato sintase
DNA - Ácido desoxirribonucleico
DNPH - dinitrofenilhidrazina
DTNB - 5'5-Ditiobis (2-nitrobenzoico ácido)
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs - Espécie reativa de oxigênio
g - Aceleração da gravidade
g - Gramas (unidade de massa)
G6Pase - Glicose-6-fosfatase
G6PDH - Glicose-6-fosfato desidrogenase
GLDH - Glutamato desidrogenase
GP - Glicogênio fosforilase
GPx - Glutaciona peroxidase
GR - Glutaciona redutase
GSH - Glutaciona reduzida
GSSG - Glutaciona dissulfeto
GST - Glutaciona S-transferase
H – Horas
H₂O - Água
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
HK - Hexoquinase
L - Litro
LDH - Lactato desidrogenase

LPO - Lipoperoxidação ou peroxidação lipídica
MDA - Malondialdeído
MDH - Malato desidrogenase
mg - Miligrama mM - Milimolar
mRNA – RNA mensageiro
n - Número de espécimes por experimento
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NADP - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADP+ - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT - Nitroblue tetrazolium (Azul de nitrotetrazólio)
nm - Nanômetro
O₂ - Oxigênio molecular
OH - Radical hidroxila
PCO - Carbonilação de proteínas
PFK - Fosfofrutoquinase
pH - Potencial Hidrogeniônico
PK - Piruvato quinase
SOD - Superóxido dismutase
TCA - Ácido tricloroacético
U - Unidade internacional
UFPR - Universidade Federal do Paraná
µg - Microgramas
µL - Microlitro
µmol – Micromol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3. REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) <i>versus</i> Estresse oxidativo.....	23
3.2 Metabolismo de carboidratos	26
3.3 Ciclo de Krebs	28
3.4 Metabolismo da creatina	29
3.5 Metabolismo de proteínas	30
3.6 Acetilcolinesterase	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Coleta e aclimatação de <i>R. voulezi</i>	31
4.2 Exposição de <i>R. voulezi</i> ao estresse térmico de 31°C	32
4.3 Procedimentos analíticos	34
4.3.1 Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo.....	34
4.3.2 Marcadores bioquímicos metabólicos	36
4.3.3 Marcador bioquímico de neurotoxicidade.....	38
4.4 Análises estatísticas	38
5. RESULTADOS	40
5.1 Marcadores bioquímicos: Encéfalo de <i>R. voulezi</i>	40
5.2 Marcadores bioquímicos: Coração de <i>R. voulezi</i>	46
5.3 Marcadores bioquímicos: Músculo de <i>R. voulezi</i>	48
5.4 Marcadores bioquímicos: Comparação entre os órgãos de <i>R. voulezi</i>	54
5.5 Resposta integrada dos biomarcadores (IBR) e condição corporal em <i>R. voulezi</i>	58
6. DISCUSSÃO	79
6.1 Influência do estresse térmico agudo de 31°C sob a fisiologia dos órgãos	79
6.2 Caracterização dos marcadores antioxidantes e metabólicos de <i>Rhamdia voulezi</i> a 31°C	84
6.3 Resposta integrada dos biomarcadores (IBR), sensibilidade térmica e condição corporal em <i>R. voulezi</i> para a habilidade de aclimatação a 31°C	85
7. CONCLUSÕES	87
8. REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos são caracterizados pelas interações ecológicas entre a biota existente e os componentes físico-químicos da água (COSTA *et al.*, 2008; MARTINS; ANTUNES, 2019). Entretanto, os parâmetros que determinam a qualidade da água como: temperatura, turbidez, pressão, pH, concentração de oxigênio dissolvido, salinidade, íons e depósito de sedimento têm sido modificados de forma rápida ou extrema sob a influência de atividades antrópicas de origem biológica, física e/ou química. Essas mudanças podem ocasionar perda da biodiversidade aquática e alterar a dinâmica natural das comunidades biológicas habitantes (CURRIE; TUFTS, 1997; MARIANO *et al.*, 2009; SANTANA; FREITAS, 2012; SCHILLER *et al.*, 2017).

Assim, as características geomorfológicas e morfodinâmicas da bacia hidrográfica do rio Iguaçu, fizeram com que o rio fosse dividido em três regiões: alto, baixo e médio Iguaçu, com diferentes regimes térmicos. A qualidade de suas águas ao ser enquadrada na classe II, conforme a resolução do CONAMA N° 357 de 2005, tornou-se fonte principal de abastecimento urbano no Estado do Paraná. Essas características juntamente com o caráter endêmico da fauna de peixes que corresponde a 75% fez com que a bacia tenha grande importância ecológica para a ictiofauna, sendo denominada ecorregião de biodiversidade global (BAUMGARTNER *et al.*, 2012; BRASIL, 2022; DAGA *et al.*, 2016).

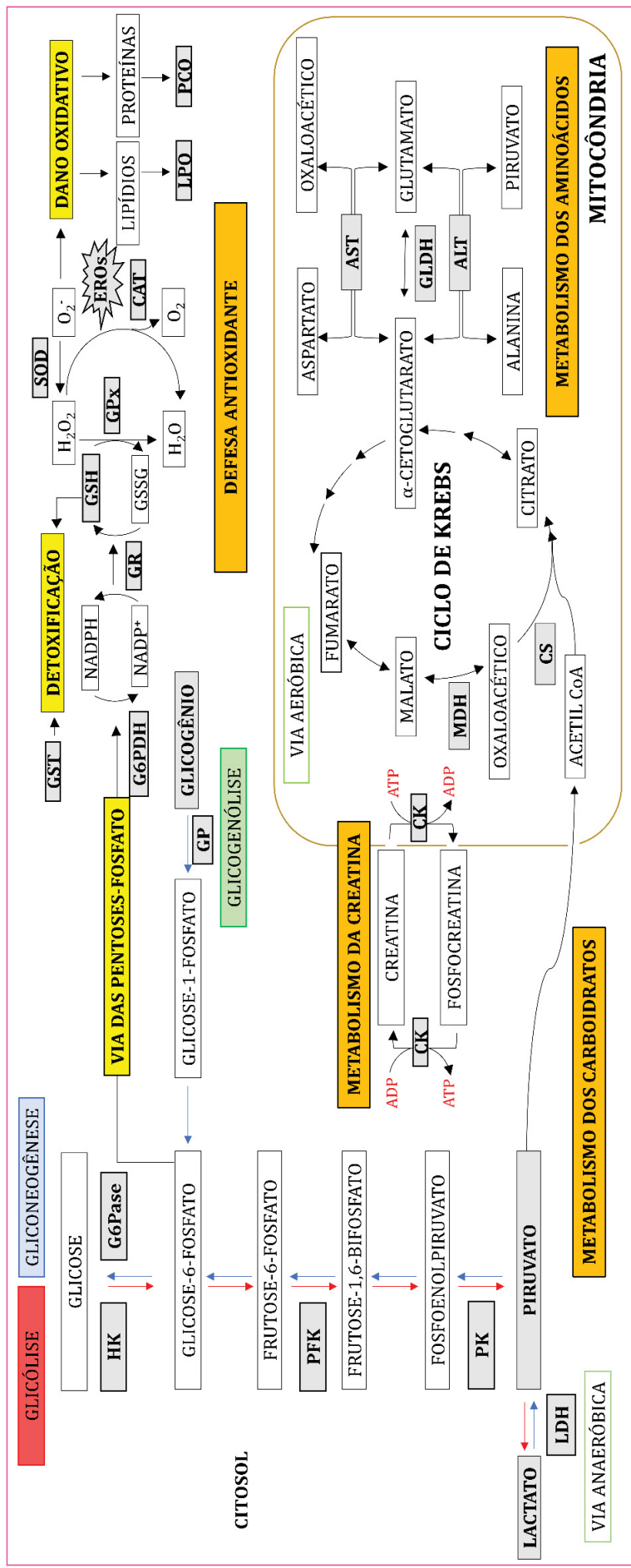
Por ser o principal recurso hídrico da região, o Iguaçu tem sofrido modificações na temperatura de suas águas devido a poluição térmica gerada pela remoção de vegetação e/ou sombras das margens, represamento, influência da agropecuária, da gestão de canais e das reações cinéticas produzidas pelas seis usinas hidrelétricas instaladas ao longo do seu percurso (ABDI; ENDRENY, 2019; BAUMGARTNER *et al.*, 2012; DAGA *et al.*, 2016; FICKE; MYRICK; HANSEN, 2007; LANGAN *et al.*, 2001). Dado que a integridade ecológica dos rios, lagos e oceanos é representada pelo estado natural dos corpos d'água. As práticas humanas ao alterar a dinâmica natural de temperatura dos ambientes aquáticos, seja com águas quentes ou frias, dão origem a poluição térmica (BOBAT, 2015; FEVILOVA; RASOVA, VELEGZHANINOV, 2021).

Tal fato representa um desafio substancial para a manutenção fisiológica e metabólica dos peixes, visto que o aumento de temperatura da água pode ocasionar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (JESUS; INÁCIO; COELHO, 2013). Isso pode implicar na sensibilidade destes organismos à adaptabilidade e a incapacidade de neutralizar as EROs e reparar as lesões (MADEIRA *et al.*, 2016; NATI *et al.*, 2021). Muitas vezes caracterizadas pelos efeitos persistentes que incluem alterações no desempenho natatório, anatomia cardíaca, resposta cerebral e ativação das respostas metabólicas com consequente aumento de consumo de oxigênio, que impacta na sua sobrevivência e distribuição geográfica (GARCIA *et al.*, 2015; PRZEPIURA *et al.*, 2019).

Desta forma, conhecer e entender os mecanismos biológicos do estresse térmico em *Rhamdia voulezi*, conhecido como jundiá, espécie de peixe nativa e endêmica do rio Iguaçu, descrita em 1911 por Haseman, pode dar suporte para a biodiversidade e conservação da ictiofauna local, brasileira e mundial (DECARLI *et al.*, 2016; DIEMER *et al.*, 2012; FEIDEN *et al.*, 2010; GARAVELLO; SHIBATTA, 2016; PIMENTA SIVIDANES *et al.*, 2012). Visto que o uso de marcadores bioquímicos, como parâmetros de dano oxidativos, atividade de enzimas antioxidante e enzimas-chaves do metabolismo energético e de outras vias metabólicas são suporte para a compreensão do estado fisiológico, celular, molecular e do ajuste homeostático desses animais frente ao estresse térmico (FIGURA 1) (MARIANO *et al.*, 2009; PRZEPIURA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2018).

FIGURA 1: PANORAMA GERAL DAS VIAS METABÓLICAS

CÉLULA



FONTE: próprio autor (2022)

NOTA: Esquema resumido das principais reações que ocorrem nas vias metabólicas de carboidratos, ciclo de Krebs, pentoses-fosfato, defesa antioxidante, metabólitos intermediários, glicogênio, aminoácidos e creatina. As setas indicam a direção em que as reações podem ocorrer. Os marcadores bioquímicos mensurados estão destacados em cinza. G6Pase: glicose-6-fosfatase, HK: hexoquinase, PFK: fosfofrutoquinase, PK: piruvato quinase, lactato, LDH: lactato desidrogenase, GP: glicogênio fosforilase, glicogênio, CK: creatina quinase, CS: citrato sintase, MDH: malato desidrogenase, GST: glutatona S-transferase, ALT: alanina aminotransferase, GP: glicogênio glutamato desidrogenase, G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase, GR: glutatona S-transferase, GR: glutatona S-transferase, GSH: glutatona reduzida, GPx: glutatona peroxidase, SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, EROs: espécie reativa de oxigênio, PCO: carbonilação de proteínas e LPO: lipoperoxidação. Os marcadores bioquímicos podem ser encontrados em outros compartimentos celulares, sendo esta representação, apenas um exemplo simplificado.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar marcadores bioquímicos do metabolismo de carboidratos, proteínas e de estresse oxidativo no músculo, coração e encéfalo de *Rhamdia voulezi* submetido ao estresse térmico agudo de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas de exposição.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade dos marcadores bioquímicos relacionados com a defesa antioxidante: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR), glutaciona S-transferase (GST) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) no coração, músculo e encéfalo de *Rhamdia voulezi* submetidos ao estresse térmico agudo de 31°C.
- Avaliar os níveis de glutaciona reduzida (GSH), carbonilação de proteínas (PCO), lipoperoxidação (LPO) e espécies reativas de oxigênio total (EROs) no coração, músculo e encéfalo de *Rhamdia voulezi* submetidos ao estresse térmico agudo de 31°C.
- Avaliar a atividade dos marcadores bioquímicos do metabolismo de carboidrato e ciclo de Krebs: hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase (PFK), piruvato quinase (PK), lactato desidrogenase (LDH), citrato sintase (CS), malato desidrogenase (MDH), glicogênio fosforilase (GP) e glicose-6-fosfatase (G6Pase) no músculo e encéfalo de *Rhamdia voulezi* submetidos ao estresse térmico agudo de 31°C.
- Avaliar a atividade da creatina quinase total (CK) no músculo e encéfalo de *Rhamdia voulezi* submetidos ao estresse térmico agudo de 31°C.
- Avaliar a atividade dos marcadores bioquímicos do metabolismo de proteínas: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e glutamato desidrogenase (GLDH) no músculo e encéfalo de *Rhamdia voulezi* submetidos ao estresse térmico agudo de 31°C.
- Avaliar a concentração de lactato, piruvato e glicogênio no músculo e encéfalo de *Rhamdia voulezi* submetidos ao estresse térmico agudo de 31°C.

- Avaliar a atividade de acetilcolinesterase (AChE) no encéfalo e músculo de *Rhamdia voulezi* submetido ao estresse térmico agudo de 31°C.
- Comparar os marcadores bioquímicos mensurados no encéfalo, coração e músculo de *Rhamdia voulezi* submetidos ao estresse térmico agudo de 31°C.
- Avaliar a sensibilidade térmica e o fator de condição de *Rhamdia voulezi* submetidos ao estresse térmico agudo de 31°C.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Espécies reativas de oxigênio (EROs) versus Estresse oxidativo

A via de degradação do oxigênio, que gera radicais livres, ocorre nas mitocôndrias, citoplasma e membranas celulares e pode ser favorecida pelos íons de ferro e cobre (BARBOSA *et al.*, 2010; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

A enzima citocromo c oxidase ou complexo IV ao catalisar a reação em que o oxigênio sofre redução tetravalente, com a incorporação de quatro elétrons ao final da cadeia transportadora de elétrons, resulta na formação de água. Essa ação da citocromo c oxidase controla a geração de radicais livres e impede que haja produção excessiva na mitocôndria (BARBOSA *et al.*, 2010; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A redução univalente do oxigênio ao longo da cadeia respiratória, determina a produção de EROs, como os radicais superóxidos (O_2^\bullet), hidroxila (OH^\bullet) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SILVA; GONÇALVES, 2010). Os íons de ferro e cobre são catalisadores potentes das reações de geração de radicais livres por participarem das reações óxido-redução de Fenton (gera radical OH^\bullet por meio da reação H_2O_2) e Haber-Weiss (catalisa a reação entre H_2O_2 e radical O_2^\bullet para gerar o mesmo radical OH^\bullet). Além disso, O_2^\bullet pode participar de reações de geração de OH^\bullet ao reagir com o radical livre óxido nítrico (NO^\bullet) e produzir espécies reativas de nitrogênio, o peroxinitrito ($ONOO$), com potencial reativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; KOURY; DONANGELO, 2003; SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

Por ser um agente oxidante fraco, o O_2^\bullet pode reduzir o ferro iônico e seus complexos, tornando-o capaz de causar danos aos aminoácidos e perda de função proteica. Ao passo que o H_2O_2 é uma espécie reativa de oxigênio extremamente deletéria e com capacidade de atravessar camadas lipídicas e

reagir com metais de transição e algumas hemoproteínas. Tal ação pode induzir alterações cromossômicas, quebra de DNA e oxidação dos compostos sulfidrílica na ausência de catalisadores (BARBOSA *et al.*, 2014; SILVA; GONÇALVES, 2010).

Já o $\text{OH}\cdot$ é o agente reativo mais conhecido dos sistemas biológicos. Quando produzido *in vivo*, pode causar danos próximo ao local em que foi sintetizado, reagindo amplamente com aminoácidos, RNA e DNA. Assim como a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares através da conversão de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais livres alcóxila ($\text{LO}\cdot$) e peróxila ($\text{LO}_2\cdot$) (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SILVA; GONÇALVES, 2010; VALKO *et al.*, 2007).

Por outro lado, as enzimas NADPH oxidases também são fontes geradoras de radicais livres. Como possuem a função de transferir elétrons através das membranas celulares, normalmente o aceptor de elétrons é o oxigênio, que em decorrência, gera o radical $\text{O}_2\cdot$ (BARBOSA *et al.*, 2010; WELCH *et al.*, 2002).

A produção desequilibrada das EROs e seus efeitos negativos no organismo são controlados pelo sistema antioxidante e caracteriza o estresse oxidativo (VASCONCELOS *et al.*, 2014). Diante disso, o sistema de defesa antioxidante pode reduzir e/ou inibir o efeito deletério das EROs por meio de diferentes mecanismos de ação (BARBOSA *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2010; KOURY; DONANGELO, 2003).

Caracterizados como antioxidantes enzimáticos, aqueles produzidos pelo próprio organismo, ou não-enzimático. Os antioxidantes podem ser classificados em prevenção (impede formação de EROs), varredura (impede ataques de EROs) e reparo (reconstituição e reparo de estruturas biológicas danificadas) (BARBOSA *et al.*, 2010; BARBOSA *et al.*, 2014; COTINGUIBA *et al.*, 2013).

A defesa antioxidante enzimática é composta por enzimas que protegem, controlam, reparam e previnem os danos causados pela formação de EROS. Sendo elas: superóxido dismutase (SOD) que catalisa a destruição do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em oxigênio e peróxido de hidrogênio; catalase (CAT) que converte peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2 ; glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) que participam do ciclo redutor da glutathiona (GSH) removendo o hidroperóxido, lipoperóxidos e o peróxido de hidrogênio e; glutathiona S-transferase (GST) que catalisa o ataque nucleofílico da forma

reduzida da GSH (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; KINNULA, 2005; RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006; SILVA; GONÇALVES, 2010).

No que refere a defesa antioxidante não-enzimática, os principais compostos incluídos são os carotenoides, flavonoides, pigmentos biliares, urato e vitaminas C e E que captam os radicais e atuam em sinergia para proteger os danos oxidativos às células e tecidos. Assim como a GSH, que combate de forma direta algumas EROs e possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos, peróxidos e radicais livres em conjunto com as enzimas GPx e GST (COTINGUIBA *et al.*, 2013; KINNULA, 2005).

Em contrapartida, a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) presente na via das pentoses catalisa a conversão de NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) em NADPH. O NADPH formado é essencial nas vias biossintéticas, pois protege as células de danos provocados por substâncias oxidativas como o H₂O₂ e radicais livres superóxidos (ZHANG; TSAO, 2016). Além do mais, o principal fornecimento de NADPH para a biossíntese de ácidos graxos e esteroides é da via das pentoses, que atua na redução das ligações duplas e dos grupos carbonilas formados no processo (NELSON *et al.*, 2022).

Sendo assim, quando a ação dos antioxidantes não supera os níveis de EROs, são formados metabólitos específicos que podem ser identificados, quantificados e utilizados como marcadores de dano celulares, tais como peroxidação lipídica (LPO) e carbonilação de proteínas (PCO) (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007; LEVINE *et al.*, 1994).

A LPO inicia-se com o sequestro do hidrogênio da membrana celular e formação do radical lipídico, que conseqüentemente, reage com oxigênio para formar o radical peroxila. Esse radical peroxila, por sua vez, sequestra novo hidrogênio do ácido graxo poliinsaturado e forma novamente o radical lipídico. Finalizando apenas quando os radicais produzidos se propagam até destruírem a si mesmos (BOKOV; CHAUDHURI; RICHARDSON, 2004; ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011; FRISARD *et al.*, 2007).

Tais reações alteram as propriedades físico-químicas das membranas celulares e ocasiona perda de permeabilidade, seletividade das trocas iônicas, expansão do líquido extracelular, risco de liberação das organelas com conseqüente morte celular e formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído, detectado a partir do método de substâncias reativas ao ácido

tiobarbitúrico (TBARS) (ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011; FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007).

Outro importante processo ocasionado é a PCO decorrente da ação das EROs sobre os grupos tióis. A oxidação das proteínas gera agregações e fragmentações de aminoácidos que levam a perda de função e aumento da taxa de degradação como consequência biológica, detectado pela presença dos grupos carbonil (BUDANOV; LEE; KARIN, 2010; LEVINE *et al.*, 1994; RONSEIN *et al.*, 2006).

Assim, o DNA juntamente com as proteínas nucleares e as histonas, ao ser oxidado pelos peróxidos, promove danos subsequentes que incluem ligações cruzadas de DNA-proteínas e mutações (ENGERS; BEHLING; FRIZZO, 2011; RONSEIN *et al.*, 2006).

3.2 Metabolismo de carboidratos

A glicose é um monômero centralizador dos carboidratos e pode ser estocada na forma de glicogênio nos animais. No momento em que o organismo necessita de energia, a via glicolítica é acionada, e a glicose é convertida em piruvato (NELSON *et al.*, 2022).

A fosforilação da glicose inicia-se com a enzima hexoquinase (HK), onde a molécula de ATP converte a glicose em glicose-6-fosfato. Após sua conversão, a enzima fosfo-hexose-isomerase converte a glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato pela reação sucessiva de catálise enzimática básica e ácida geral (MARZZOCO; TORRES, 2015).

Nesta etapa, a enzima fosfofrutoquinase (PFK) catalisa a transferência de um fosfato do ATP para a hidroxila do carbono 1 da frutose-6-fosfato para formar a frutose-1,6-bifosfato. Por ação da enzima frutose-1,6-bifosfato aldolase também chamada de aldolase, a frutose-1,6-bifosfato é quebrada e duas trioses de fosfatos diferentes são liberadas, o gliceraldeído-3-fosfato e a diidroxiacetona-fosfato (NELSON *et al.*, 2022; VOET; VOET, 2013).

Destas trioses de fosfato liberadas, apenas a gliceraldeído-3-fosfato pode ser diretamente degradada nas etapas subsequentes da via glicolítica. Sendo, a diidroxiacetona-fosfato convertida em gliceraldeído-3-fosfato pela enzima triose fosfato isomerase (VOET; VOET, 2013)

Em seguida, a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase utiliza o NAD^+ para oxidar o gliceraldeído-3-fosfato a partir do fosfato, constituindo-se o 1,3-bisfosfoglicerato. O grupo fosforil do 1,3-bisfosfoglicerato é transferido para uma molécula de ADP pela enzima fosfoglicerato-quinase para formar ATP e 3-fosfoglicerato. Assim, a enzima fosfoglicerato-mutase catalisa a isomerização do 3-fosfoglicerato em 2-fosfoglicerato, que pela ação da enzima enolase desidrata, converte o 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. O grupo fosforil do fosfoenolpiruvato é então transferido para o ADP pela piruvatoquinase (PK), no qual é formado o enol do piruvato que tautomeriza para piruvato e uma molécula de ATP (MARZZOCO; TORRES, 2015; NELSON *et al.*, 2022; VOET; VOET, 2013).

Uma vez formado o piruvato, este na condição aeróbica, pode formar lactato pela enzima lactato desidrogenase (LDH) ou etanol pela enzima piruvato-descarboxilase. Já na condição anaeróbica, o piruvato é convertido em acetil-coenzima-A pela enzima piruvato-desidrogenase para entrar no ciclo do ácido cítrico e formar dióxido de carbono e água (MARZZOCO; TORRES, 2015; NELSON *et al.*, 2022).

Mas, se a síntese de glicose for oriunda da rota do anabolismo, também chamada de gliconeogênese, o piruvato é convertido em glicose numa reversão das reações de glicólise através de hidrólises e liberação de fosfato inorgânico com perda de energia. As conversões realizadas se dão com a 1,3-bisfosfoglicerato para gliceraldeído-3-fosfato com gasto de energia e conversão de NADH em NAD^+ ; frutose-1,6-bisfosfato a frutose-6-fosfato pela frutose 1,6-bisfosfatase e; glicose-6-fosfato para glicose a partir da enzima glicose-6-fosfatase (BERG *et al.*, 2014; MARZZOCO; TORRES, 2015).

Outra característica da rota do anabolismo está na reação da enzima piruvato-carboxilase ao utilizar a biotina e ATP para adicionar bicarbonato ao piruvato, formando oxaloacetato, para em seguida ser transformado em fosfoenolpiruvato a partir da hidrólise do GTP em GDP. Não sendo possível converter o piruvato diretamente em fosfoenolpiruvato (BERG *et al.*, 2014; NELSON *et al.*, 2022).

Mas se a glicose estiver estocada na forma de glicogênio, ocorre a biossíntese do glicogênio. O glicogênio é quebrado pela enzima glicogênio-fosforilase (GP) para liberar moléculas de glicose 1-fosfato. As moléculas de

glicose 1-fosfato liberadas são convertidas em glicose-6-fosfato pela enzima fosfoglicomutase, para assim, formar glicose (BERG *et al.*, 2014).

Embora o destino principal da glicose é servir de fonte energética e gerar ATP, a glicose-6-fosfato formada durante o metabolismo de carboidratos pode ser direcionada para a via das pentoses para a produção de pentose-fosfato que são necessárias na síntese de ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH), dinucleotídeo de flavina e adenina reduzido (FADH₂), adenosina trifosfato (ATP) e coenzima A (BERG *et al.*, 2014; MARZZOCO; TORRES, 2015; NELSON *et al.*, 2022; VOET; VOET, 2013).

3.3 Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs é responsável pelo metabolismo degradativo de carboidratos, ácidos graxos, aminoácidos e etanol para a produção de inúmeros precursores biossintéticos (MARZZOCO; TORRES, 2015).

O ponto convergente do catabolismo, a acetil-co-enzima A (acetil-CoA), na mitocôndria, é totalmente oxidada a dióxido de carbono (CO₂) pelo ciclo de Krebs, com a produção de coenzimas reduzidas que são oxidadas pela cadeia transportadora de elétrons para a formação de ATP (VOET; VOET, 2013).

Esse processo pode ser observado no momento em que o piruvato oriundo da via glicolítica, origina o grupo acetila e forma acetil-CoA mitocondrial. Neste momento, a enzima citrato-sintase (CS) condensa a acetil-CoA e o oxaloacetato para formar citrato. O citrato formado é então catalisado pela enzima aconitase (aconitato-hidratase) a isocitrato por uma reação reversível a partir da adição de água (H₂O) à ligação dupla do *cis*-aconitato. O qual liga a enzima de duas maneiras diferentes, a citrato e a isocitrato (BERG *et al.*, 2014; MARZZOCO; TORRES, 2015; NELSON *et al.*, 2022).

Subsequente a isso, a enzima isocitrato-desidrogenase catalisa a descarboxilação oxidativa do citrato para formar α -cetogluturato e CO₂. A mesma reação de descarboxilação oxidativa ocorre com α -cetogluturato na presença do complexo da α -cetogluturato-desidrogenase, na qual é convertida em succinil-CoA e CO₂ (NELSON *et al.*, 2022; VOET; VOET, 2013).

Após a sua conversão em succinil-CoA, a enzima succinil-CoA-sintase, por reação reversível, converte a succinil-CoA em succinato, para posteriormente

ser oxidada em fumarato pela flavoproteína succinato-desidrogenase (NELSON *et al.*, 2022).

Nesta etapa em que a succinato-desidrogenase catalisa a oxidação do succinato, ocorre a produção da ligação dupla *trans*, dando origem ao fumarato, a partir da redução concomitante da coenzima redox FAD em FADH₂. Neste momento, ocorre a hidratação reversível do fumarato a L-malato pela enzima fumarase para produzir o malato. Assim, a malato desidrogenase (MDH) oxida o malato a oxaloacetato novamente, reduzindo NAD⁺ a NADPH para fechar o ciclo (MARZZOCO; TORRES, 2015; NELSON *et al.*, 2022; VOET; VOET, 2013).

Com isso, os produtos NADH e FADH formados no ciclo de Krebs são reoxidados pelo oxigênio na cadeia transportadora de elétrons e na fosforilação oxidativa para completar a quebra de combustível metabólico e impulsionar a síntese de ATP (MARZZOCO; TORRES, 2015; NELSON *et al.*, 2022; VOET; VOET, 2013).

3.4 Metabolismo da creatina

Adquirida por fontes endógenas, a creatina pode ser sintetizada a partir de unidades de aminoácidos L-arginina, glicina e metionina ou pode ser obtida através da dieta. Sua biossíntese é catalisada pela enzima L-arginina: glicina amidinotransferase (AGAT) a partir do sistema de retroalimentação realizado pelo produto final da creatina, seja de origem endógena ou exógena (SILVA; BRACHT, 2001).

Quando presente no interior celular, a creatina é fosforilada a fosfocreatina pela enzima creatina quinase (CK). Por ser uma enzima que participa na homeostase de células com necessidades energéticas variáveis e intermitentes, como, por exemplo, tecidos neurais, músculo esquelético e cardíaco (SCHNEIDER; PÉRICO; POZZOBON, 2015; VOGEL; ROMAN; SIQUEIRA, 2019).

A função da CK é criar um reservatório energético prontamente disponível; prevenir aumento de ADP livre; fornecer um sistema de transporte de energia em que a fosfocreatina seja o carreador de energia; criar um reservatório de prótons; suprir os sítios subcelulares com taxas apropriadas de ATP/ADP e permitir a sinalização para o início da glicogenólise (SILVA; BRACHT, 2001).

Além do mais, a CK apresenta três isoformas citoplasmáticas: a muscular (CK-MM), a cerebral (CK-BB) e a cardíaca (CK-MB). Enquanto as isoformas ubíqua (CK-Miu) e a sarcomérica (CK-Mis) são mitocondriais e expressas no cérebro e músculo estriado, respectivamente. Essas isoenzimas são consideradas importantes marcadores de danos celulares ao aumento dos níveis séricos de CK nas células (SCHNEIDER; PÉRICO; POZZOBON, 2015; SILVA; BRACHT, 2001).

3.5 Metabolismo de proteínas

Os aminoácidos glutamato, aspartato, glutamina e alanina possuem papel central no metabolismo de nitrogênio. Sendo facilmente convertidos em intermediários do ácido cítrico, o glutamato e a glutamina são convertidos em α -cetoglutarato, enquanto a alanina é convertida em piruvato e o aspartato em oxaloacetato (NELSON *et al.*, 2022)

As enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) catalisam a transferência reversível dos grupos amino dos aminoácidos para α -cetoglutarato para originar o ácido glutâmico e o cetoácido na presença da coenzima piridoxal-fosfato (Vitamina B₆) (MOTTA, 2009)

A enzima glutamato-desidrogenase (GLDH) atua como importante interseção do metabolismo do nitrogênio e do carbono. As reações de transaminação ocorrem no citosol das mitocôndrias e são catalisadas por enzimas aminotransferases ou transaminases. Do mesmo modo que a ação combinada das aminotransferases e da GLDH caracterizam a transdesaminação (MOTTA, 2009; NELSON *et al.*, 2022)

Por serem amplamente distribuídas pelo organismo, a AST é uma enzima encontrada especificamente nas mitocôndrias, com atividade elevada no músculo esquelético, miocárdio, fígado e atividade menor no cérebro, pulmões, baço, eritrócitos e pâncreas. Já a ALT é predominantemente encontrada no citoplasma e está presente no rim, com níveis maiores no fígado, podendo ser considerada um marcador de dano hepático (MOTTA, 2009; NELSON *et al.*, 2022).

3.6 Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima reguladora que hidrolisa a acetilcolina (ACh) nas sinapses colinérgicas do cérebro, bem como das junções neuromusculares (PERES *et al.*, 2016).

Por ser uma enzima com características únicas devido a sua organização do sítio ativo e de seu mecanismo catalítico, a AChE apresenta grande importância na regulação das funções cerebrais, desenvolvimento, crescimento de neurites, nível de cálcio e sobrevivência neural (PERES *et al.*, 2016; PORTO *et al.*, 2021; TÕUGU; KESVATERA, 1996).

As diversas condições toxicológicas que geram estresse oxidativo podem alterar a atividade da AChE, principalmente na sua forma ligada à membrana. Visto que mudanças em sua atividade acompanham comumente sinais de alteração de comportamento. A AChE é frequentemente estudada como biomarcador de efeitos agudos de toxicidade devido a sua ação direta sobre as sinapses no sistema nervoso. Além disso, o aumento da sua atividade possui relação positiva com a produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) devido à LPO (PERES *et al.*, 2016; PORTO *et al.*, 2021).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta e aclimatação de *R. voulezi*

A coleta e a realização dos experimentos seguiram legislação brasileira vigente, sendo a licença nº 63551-1 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (SISBIO/ICMBio) e as nº1228 e 1228C da Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA – BIO/UFPR).

Espécimes de *R. voulezi* (n=73) foram coletados com vara de pesca (linha e anzol), na região do médio Iguaçu (Sul 26°14'58.50" e Oeste 51°6'33.07"), município de União da Vitória-PR (FIGURA 2). Após a coleta, os espécimes foram transportados para o Centro de Pesquisa e Extensão em Aquicultura Ildo Zago, da Universidade Estadual do Paraná (UNESPAR), União da Vitória-PR, local em que ocorreram os experimentos.

FIGURA 2: BACIA HIDROGRÁFICA DA REGIÃO MÉDIO IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL.



FONTE: próprio autor (2022)

NOTA: Região em que os espécimes de *Rhamdia voulezi* foram coletados (polígono em vermelho) no afluente do médio Iguaçu, no município de União da Vitória (PR).

Durante 8 dias, os peixes foram aclimatados numa temperatura constante de $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$ em tanques de 1000 litros com água constantemente aerada e monitorada, sendo a temperatura de $21 \pm 0,5^\circ\text{C}$ controlada por termostato (Aquaterm 08 Full Cage), O_2 dissolvido de $7,5 \pm 1,0\text{mg/L}$, amônia de $0,18 \pm 0,5\text{mg/L}$ e pH de $7,0 \pm 0,5$. Os tanques foram configurados com sistemas estáticos e a limpeza ocorreu por sucção diária, com aproximadamente 50% da água renovada diariamente com água originária do próprio curso d'água. Os peixes foram alimentados (média: 1% peso corporal) diariamente com ração comercial (Supra® Aqua Line, com teor de proteína de 42%) (LERMEN *et al.*, 2004; RESENDE *et al.*, 2022; SCHLEGER *et al.*, 2022).

4.2 Exposição de *R. voulezi* ao estresse térmico agudo de 31°C

Após aclimação, os exemplares de *R. voulezi* (FIGURA 3) foram randomicamente transferidos para tanques de 460 L com água constantemente aerada e separados em grupo controle ($21 \pm 0,5^\circ\text{C}$) e exposto ao estresse térmico de alta temperatura ($31 \pm 0,5^\circ\text{C}$) do qual ficaram mantidos por 2, 6, 12,

24 e 96 horas. O número de peixes por grupo (controle e experimental) para cada tempo foi de $n=7$, com exceção de 96 horas com $n=8$. A temperatura da água ficou mantida e controlada rigorosamente por sistema de aquecimento elétrico com termostatos (Aqua One®, VigoAr® e Atman®, com potência de 200 e 500 W).

FIGURA 3: ESPÉCIME DE *Rhamdia voulezi*



FONTE: GRAVELLO E SHIBATTA (2016)

Os tempos de exposição simularam situações de estresse agudo que são geradas pela mudança de temperatura durante a determinação das taxas metabólicas e fisiológicas que ocorrem, a fim de restabelecer a homeostase (FORGATI *et al.*, 2017; MORA; MAYA, 2006; PRZEPIURA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2018). A temperatura testada foi baseada na temperatura ambiental onde *Rhamdia quelen*, espécie de peixe do mesmo gênero de *R. voulezi*, é encontrada na América do Sul (CHIPPARI-GOMES; GOMES; BALDISSEROTTO, 1999; LERMEN *et al.*, 2004).

Durante o experimento, a água dos tanques permaneceu em vazão constante de 1 L/min numa densidade média de $4,3 \pm 1,4\text{g/L}$ e os parâmetros abióticos foram monitorados: amônia (NH_3) ($0,003 \pm 0\text{mg/L}$), oxigênio dissolvido ($9 \pm 1,41\text{ mg/L}$) e pH ($7,15 \pm 0,21$). Para todos os grupos, o fornecimento de alimento foi o mesmo da aclimatação, sendo a última alimentação fornecida entre 22 e 24 horas antes da eutanásia dos peixes (JIANG *et al.*, 2022; MADEIRA *et al.*, 2016; RESENDE *et al.*, 2022; SCHLEGER *et al.*, 2022).

Ao final de cada experimento os peixes foram anestesiados com benzocaína 1% (p v-1), eutanasiados por secção medular e dissecados. As

amostras de coração, músculo e encéfalo foram removidas, fixadas e armazenadas em nitrogênio líquido e processadas no Laboratório de Biologia Adaptativa do Departamento de Biologia Celular do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

4.3 Procedimentos analíticos

Para os ensaios bioquímicos, o coração, encéfalo e músculo foram pesados e homogeneizados em tampão Tris-HCL (50mM, pH 7,4; proporção de 1:5 (p v-1)), mantidos em gelo e centrifugados a 12.000 g em 4°C por 20 minutos para as análises do estresse oxidativo e de neurotoxicidade do encéfalo e músculo. Para as análises metabólicas, o encéfalo e músculo foram centrifugados a 14.000 g em 4°C por 10 minutos, com a realização da ruptura de membranas dos tecidos através da sonicação em 18 joules. O coração por não obter material biológico suficiente, optou-se por fazer as análises do sistema antioxidante.

Os sobrenadantes foram armazenados a -80°C e utilizados na determinação dos marcadores bioquímicos. A concentração de proteínas totais das amostras foi determinada pelo método de Bradford (1976) com o uso da albumina de soro bovina (BSA) como padrão, mensurada a 595nm. As metodologias foram padronizadas em leitora de microplacas com espectrofotometria (EPOCH Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT, USA) e espectrofluorímetro (Tecan i-control, 2.0.10.0) e a EROs totais expressa em unidades de fluorescência, conforme proposto por Perussolo *et al.* (2019).

4.3.1 Marcadores bioquímicos de estresse oxidativo

A Tabela 1 apresenta as metodologias utilizadas para mensurar as atividades enzimáticas e concentrações dos marcadores bioquímicos de estresse oxidativo do encéfalo, coração e músculo de *Rhamdia voulezi*.

TABELA 1: MÉTODOS UTILIZADOS PARA MENSURAR OS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO.

Biomarcador (Sigla, E.C.)	Abs (nm)	Método de Observação	Componentes do Sistema de Reação	Referência
Catalase (CAT, 1.11.1.6)	240	Degradação de H ₂ O ₂ .	Tampão TRIS-HCl (1M, EDTA 5nM; pH8,0) e peróxido de hidrogênio 30mM.	AEBI (1984).
Superóxido dismutase (SOD, 1.15.1.1)	560	Redução do nitrotetrazólio (NBT) pelo O ₂ .	Tampão carbonato de sódio (182 mM; pH 10,2), cloreto de hidrolamina (37mM), EDTA (1mM) e NBT (0,1mM).	CROUCH <i>et al.</i> (1981).
Glutationa S-transferase (GST, 2.5.1.18)	340	Formação de tioéter a partir da reação do substrato CDNB-GSH.	Tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 6,5), GSH (1,36 mM) e CDNB em etanol (2,7mM).	KEEN; HABIG; JAKOBY (1976).
Glutationa peroxidase (GPx, 1.11.1.9)	340	Oxidação do NADPH.	Tampão fosfato de sódio (50mM; pH 7,0), azida sódica (2mM), NADPH (0,2mM), GSH (2μM), GR (1U/mL) e peróxido de hidrogênio.	WENDEL (1981).
Glutationa reduzida (GR, 1.6.4.2)	340	Oxidação de NADPH.	Tampão fosfato de potássio (0,1 M; EDTA 5,0 Mm; pH 7,6), NADPH (0,5 mM) e GSSG (5mM).	KEEN; HABIG; JAKOBY (1976).
Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH, 1.1.1.49)	340	Formação de NADH.	Tampão Tris-HCl (97mM; pH 7,4), NADP ⁺ (0,2Mm) e Glicose-6-fosfato (1mM).	ANTONIETTA CIARDIELLO; CAMARDELLA; DI PRISCO (1995).
Glutationa (GSH)	415	Tióis não protéicos reativo ao ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB).	Tampão tris-base (0,4M; pH 8,9) etanol, DTNB e curva padrão de GSH.	SEDLAK; LINDSAY (1968).
Lipoperoxidação (LPO)	535	Malonaldeído reativo (MDA) ao TBARS.	Tampão Tris-HCl (50nM; pH 7,0), BHT, etanol 95%, NaOH 0,3%, TBA 1,3%, TCA 10% e 50%, PBS (pH 7,4) e solução padrão de MDA.	FEDERICI; SHAW; HANDY (2007) adaptado.
Carbonilação de proteínas (PCO)	360	Dinitrofenil hidrazonas formadas a partir da reação entre 2,4-Dinitrofenil-hidrazina (DNPH) e proteínas carboniladas.	Solução de HCl 2M, DNPH, TCA 28%, Solução de etanol + acetato de etila 1:1 e solução padrão de hidrocloreto de guanidina.	LEVINE <i>et al.</i> (1994).
Espécies reativas de oxigênio total (EROs)	485/528	Formação de diclorofluoresceína.	Diclorofluoresceína, etanol PA, dimetilsulfóxido (DMSO PA).	DRIVER; KODAVANTI; MUNDY (2000) adaptado por PERUSSOLO <i>et al.</i> (2019).

Fonte: próprio autor (2022)

NOTA: O E.C. (do inglês Enzyme Commission Numbers) refere ao método de observação que é detectado na espectrofotometria, determinado por um comprimento de onda em nanômetros (nm) definido pela absorvância (abs). Cada análise possui a referência da metodologia utilizada como base.

4.3.2 Marcadores bioquímicos metabólicos

A Tabela 2 apresenta as metodologias utilizadas para mensurar as atividades enzimáticas e concentrações dos marcadores bioquímicos metabólicos do encéfalo e músculo de *Rhamdia voulezi*.

TABELA 2: MÉTODOS UTILIZADOS NA MENSURAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS METABÓLICOS.

Biomarcador (Sigla, E.C.)	Abs (nm)	Método de Observação	Componentes do Sistema de Reação	Referência
Hexoquinase (HK, 2.7.1.1)	340	Formação de NADPH	Tampão Imidazol (50 mM, pH 7,4), Glicose (2mM), ATP (2mM), MgCl ₂ (10mM), NADP ⁺ (0,4Mm), Ditiotreitól (1mM), KCL (2mM) e Glicose-6-fosfato desidrogenase (0,3U/mL).	BALDWIN <i>et al.</i> (2007).
Fosfofrutoquinase (PFK, 2.7.1.11)	340	Oxidação do NADH	Tampão Tris-HCL (50 mM, pH 8,2), MgCl ₂ (10mM), ATP (1mM), NADH (0,15mM), AMP (2mM), KCL (250Mm), Glicerofosfato desidrogenase (1U/ml), Aldolase (1U/ml), Triose fosfato isomerase (10 U/ml) e Frutose-6-fosfato (5mM).	BALDWIN <i>et al.</i> (2007).
Piruvato quinase (PK, 2.7.1.40)	340	Oxidação do NADH	Tampão Imidazol (50mM, pH 7,4), MgCl ₂ (10mM), KCL (25mM), NADH (150µM), ADP (5mM), Fosfoenolpiruvato (5mM) e Lactato desidrogenase (9U/mL)	LEVESQUE <i>et al.</i> (2002).
Citrato sintase (CS, 4.2.3.7)	412	Formação do complexo COA-SH e 5,5'ditio-bis (ácido-2-nitrobenzólico) (DTNB).	Tampão Tris-HCL (50mM, pH 7,4), KCL (100mM), EDTA (1mM), DTNB (0,2mM) e Acetil-SCoA e oxaloacetato (0,5mM).	SABOROWSKI; BUCHHOLZ (2002).
Malato desidrogenase (MDH, 1.1.1)	340	Oxidação do NADH	Tampão Tris-HCL (50mM, pH 7,4), Oxaloacetato (0,4mM), MgCl ₂ (20mM) e NADH (0,150mM).	CHILDRESS; SOMERO (1979).
Lactato desidrogenase (LDH, 1.1.1.27)	340	Oxidação do NADH	Tampão Tris-HCL (50mM, pH 7,4), Piruvato de sódio (1mM), KCL (100mM) e NADH (0,25mM).	THUESEN; MCCULLOUGH; CHILDRESS (2005).

Glicose-6-Fosfatase (G6Pase, 3.1.3.9)	600	Formação de fosfato.	de Tampão Imidazol (50mM, pH 7, 4), EDTA (0,9mM), Glicose-6-fosfato (13,25mM), NaOH (17,5mM), Mobilato de amônia 4,2%, Verde de Malachita 0,045% e Tween 20.	FATHI <i>et al.</i> (2002).
Glicogênio fosforilase (GP, 2.4.1.1)	340	Formação de NADPH.	de Tampão K ₂ HPO ₄ (45mM, pH 7,0), NADP ⁺ (0,34mM), Glicose 1,6 bifosfato (4μM), EDTA (0,1mM), MgCl ₂ (15mM), Fosfoglicomutase (1,6U/mL), Glicose-6-fosfato desidrogenase (12U/mL), AMP (1,6mM) e Glicogênio (0,2mg/ML).	CHANG <i>et al.</i> (2007).
Creatina quinase total (CK, 2.7.3.2)	340	Formação de NADPH.	de KIT ANALISA (REF.116)	HØRDER <i>et al.</i> (1990).
Alanina aminotransferase (ALT, 2.6.1.2)	505	Formação de hidrazona.	de KIT ANALISA (REF.352)	REITMAN; FRANKEL (1957).
Aspartato aminotransferase (AST, 2.6.1.1)	505	Formação de hidrazona.	de KIT ANALISA (REF. 353)	REITMAN; FRANKEL (1957).
Glutamato desidrogenase (GLDH, 1.4.1.3)	340	Formação de NADH.	de Tampão Tris-HCL (100mM, pH 7,4), NADP (2mM), ADP (0,8mM) e L-Glutamato (40mM).	ANTONIETTA CIARDIELLO; CAMARDELLA; DI PRISCO (1995).
Glicogênio	480	Glicose liberada após hidrólise ácida.	KOH 6M, etanol, K ₂ SO ₄ 10%, H ₂ O destilada, fenol 4,1%, H ₂ SO ₄ concentrado e solução padrão de glicose 100nmols.	DUBOIS <i>et al.</i> (1956) e adaptado por BIDINOTTO; MORAES; SOUZA (1997).
Lactato	570	Formação de um complexo entre o lactato e o sulfato de cobre.	de CuSO ₄ 4%, H ₂ SO ₄ , p-fenilfenol, TCA 20% e solução padrão de lactato (0,1mM).	HARROWER; BROWN (1972).
Piruvato	440	Reação entre hidróxido de sódio, carbonato de sódio e Dinitrofenilhidrazina (DNPH).	de DNPH 0,1% em HCl 2M, NaOH 1,3M, TCA 20% e solução padrão de piruvato (7,2mM).	LU (1939).

Fonte: próprio autor (2022).

NOTA: O E.C. (do inglês Enzyme Commission Numbers) refere ao método de observação que é detectado na espectrofotometria, determinado por comprimento de onda em nanômetros (nm) definido pela absorbância (abs). Cada análise possui a referência da metodologia utilizada como base.

4.3.3 Marcador bioquímico de neurotoxicidade

A acetilcolinesterase (AChE) foi mensurada no encéfalo e músculo de *R. voulezi* a partir da reação entre a tiocolina e o DTNB em 405 nm (ELLMAN *et al.*, 1961).

4.4 Análises estatísticas

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão e o nível de significância considerado no estudo foi de 5% ($p < 0,05$). Os pacotes ggplot2 (WICKHAM, 2016) e ggradar (BION, 2022) foram utilizados na confecção dos gráficos de barra e starplots. Todas as análises estatísticas e representações gráficas foram realizadas no *software* R, versão 4.1.3 (R CORE TEAM, 2022)

Os dados obtidos foram transformados pelo método do quantil ordenado (PETERSON; CAVANAUGH, 2020) com o uso do pacote bestNormalize (PETERSON, 2021). A verificação da normalidade foi realizada no teste Shapiro-Wilk e a homocedasticidade no teste de Levene. As diferenças entre grupo controle, tratado e tempos de exposição para cada marcador bioquímico foram analisadas por ANOVA bifatorial e aplicado o teste de *post hoc* de Tukey pelo pacote emmeans (LENTH, 2022).

Para investigar a potencial variação existente foi aplicada a análise multivariada de componentes principais (PCA). Avaliados em dois conjuntos de dados, conforme a resposta ao estresse oxidativo e metabólico. As matrizes foram compostas por 10 variáveis para os marcadores de estresse oxidativo dos três órgãos e 15 variáveis para os marcadores metabólicos do encéfalo e músculo. As PCAs foram realizadas com dados 'standardize' e plotadas com o uso dos pacotes FactoMineR (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008) e factoextra (KASSAMBARA; MUNDT, 2020).

As diferenças entre os órgãos e marcadores de estresse oxidativo e metabólicos foram avaliadas pela análise de variância multivariada permutacional não paramétrica (PERMANOVA) e as comparações par a par foram verificadas com a função 'pairwise.adonis' pelo método 'euclidian' e 999 permutações. Os dados foram visualizados com a escala multidimensional não métrica (NMDS) no pacote vegan (MARTINEZ ARBIZU, 2020; OKSANEN *et al.*, 2022).

A resposta global do estresse térmico de 31° C para os três órgãos e tempos de exposição foi calculada através da Resposta Integrada de Biomarcadores (IBR) realizado na interface CALculate IBR, desenvolvido pelo Laboratory for Continental Environments (LIEC) by Lorraine University (CALIBRI, 2022). Os múltiplos marcadores avaliados foram integrados em seis categorias de níveis biológicos, conforme as respostas geradas para a manutenção fisiológica e metabólica ocasionada pelo estresse térmico: i) defesa antioxidante - composto por antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (SOD, CAT, GR, GPx, GST, GSH e G6PDH) que são importantes defensores celulares contra o estresse oxidativo ao desencadear respostas primárias e secundárias, com o auxílio da G6PDH na regeneração de NADP⁺ em NADH (CHENG *et al.*, 2018; MADEIRA *et al.*, 2018; PRZEPIURA *et al.*, 2019; SCHLEGER *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2018; ZHANG; TSAO, 2016) ii) EROs e marcadores de dano oxidativo – composto por EROs, LPO e PCO que respondem o efeito macromolecular gerado (reversível ou irreversível) nas células e tecidos a partir do fluxo de espécies reativas de oxigênio produzidas durante o estresse oxidativo (MADEIRA *et al.*, 2016; NATI *et al.*, 2021); iii) metabolismo oxidativo – composto por HK, PFK, PK, PIRUVATO, CS e MDH que são relacionados com a manutenção e produção de energia no organismo (NATI *et al.*, 2021; SCHLEGER *et al.*, 2022); iv) metabolismo do glicogênio – composto por glicogênio, GP e G6Pase que são associados com as necessidades metabólicas através da regulação das vias glicolítica e gliconeogênese (DAI *et al.*, 2022; MALHEIROS, 2006); v) sistema de ATP – composto por lactato, LDH e CK que são mobilizados pelas células quando não recebem oxigenação suficientes (DAI *et al.*, 2022) e; vi) metabolismo de aminoácidos – composto por GLDH, AST e ALT que são essenciais para o funcionamento do organismo (ZHAO *et al.*, 2022). O efeito da temperatura nos grupos expostos ao estresse térmico de 31°C em relação ao controle, bem como a mobilização das funções biológicas para o processo de aclimatação da espécie foram observados através dos valores médios aumentado de IBR (BEVITÓRIO *et al.*, 2022; CAMPOS *et al.*, 2019; DEVIN *et al.*, 2014; VIEIRA *et al.*, 2022). Já a informação biológica de sensibilidade (Sb) sugerido por Dias *et al.* (2020), foi estimado com base no valor de IBR das condições de temperatura testada (IBR_{231°C}) e controle (IBR_{123°C}) para cada horário e categoria, aplicado na fórmula $Sb = ((IBR_{231°C} - IBR_{123°C}) /$

$IBR_{123^{\circ}C}) \times 100$ e expresso em porcentagem (%) para os três órgãos. As porcentagens negativas e positivas expressam a diminuição e o aumento da sensibilidade dos órgãos a temperatura de 31°C durante os tempos de exposição (2, 6, 12, 24 e 96 horas). A condição de saúde foi estimada pelo fator de condição (K) com base na curva de regressão a partir do comprimento total (cm) e massa corporal (g) dos peixes, aplicado na fórmula $K = M/SL^b$, onde b indica a inclinação da curva. Os peixes machos e fêmeas foram considerados como uma única categoria e os controles foram unidos numa média geral (BUENO-KRAWCZYK *et al.*, 2015; KANDALSKI *et al.*, 2019; LE-CREN, 1951).

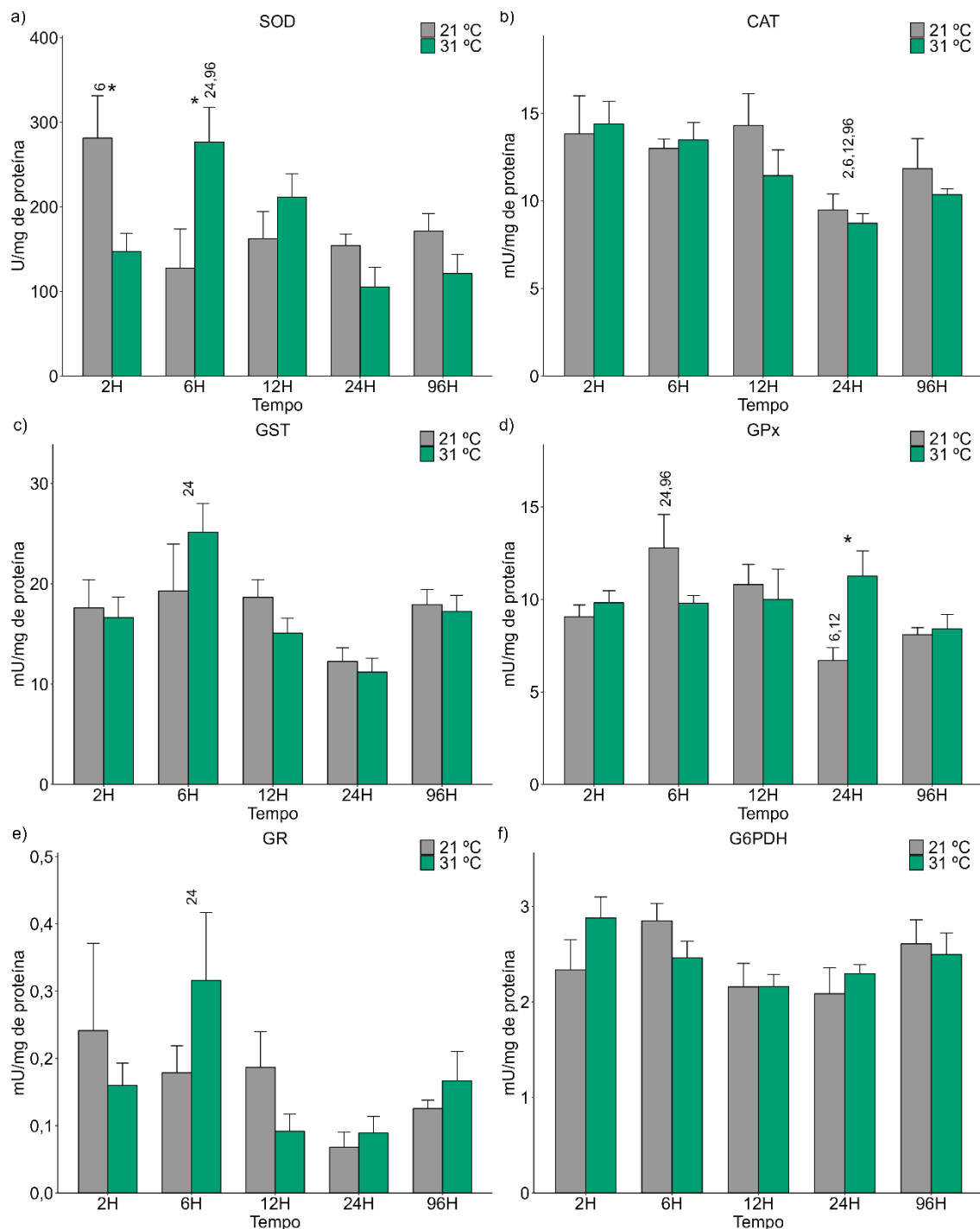
5. RESULTADOS

Os peixes sobreviveram ao longo dos tempos experimentais (2, 6, 12, 24 e 96 horas) e nas temperaturas testadas (21°C e 31°C), com exceção de morte de 1 peixe em 2h (31°C), 3 peixes em 2h (21°C) e 1 peixe em 6h (21°C).

5.1 Marcadores bioquímicos: Encéfalo de *R. voulezi*

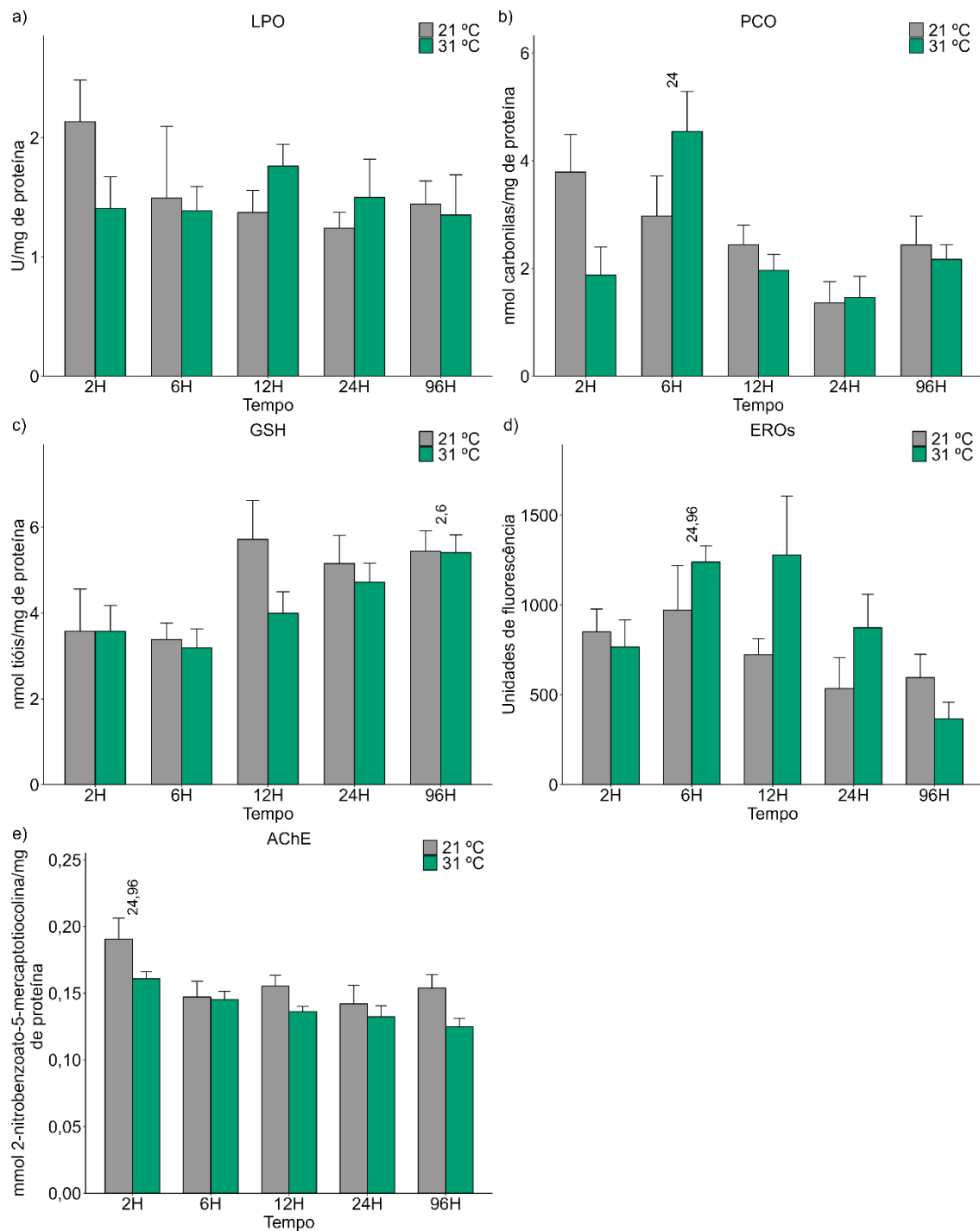
No encéfalo de *R. voulezi* os marcadores de estresse oxidativo CAT, GR, GSH, GST, G6PDH, LPO, PCO e EROs não apresentaram alterações significativas em relação aos seus controles, assim como para o marcador colinérgico AChE. A atividade da SOD ($p = 0,0241$; $p = 0.0008$) diminuiu em 2 horas e aumentou em 6 horas, enquanto que a GPx ($p = 0.0013$) aumentou 24 horas de exposição nos grupos experimentais quando comparados com seus respectivos controles. As atividades de SOD, CAT, GST, GPx e GR e as concentrações de GSH, PCO, EROs e AChE apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 96 horas (Figuras 4 e 5).

FIGURA 4: ATIVIDADE DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Atividade dos marcadores de estresse oxidativo do encéfalo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento, enquanto que os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição (p < 0,05). a) superóxido dismutase (SOD), b) catalase (CAT), c) glutatona S-transferase (GST), d) glutatona peroxidase (GPx), e) glutatona redutase (GR) e f) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

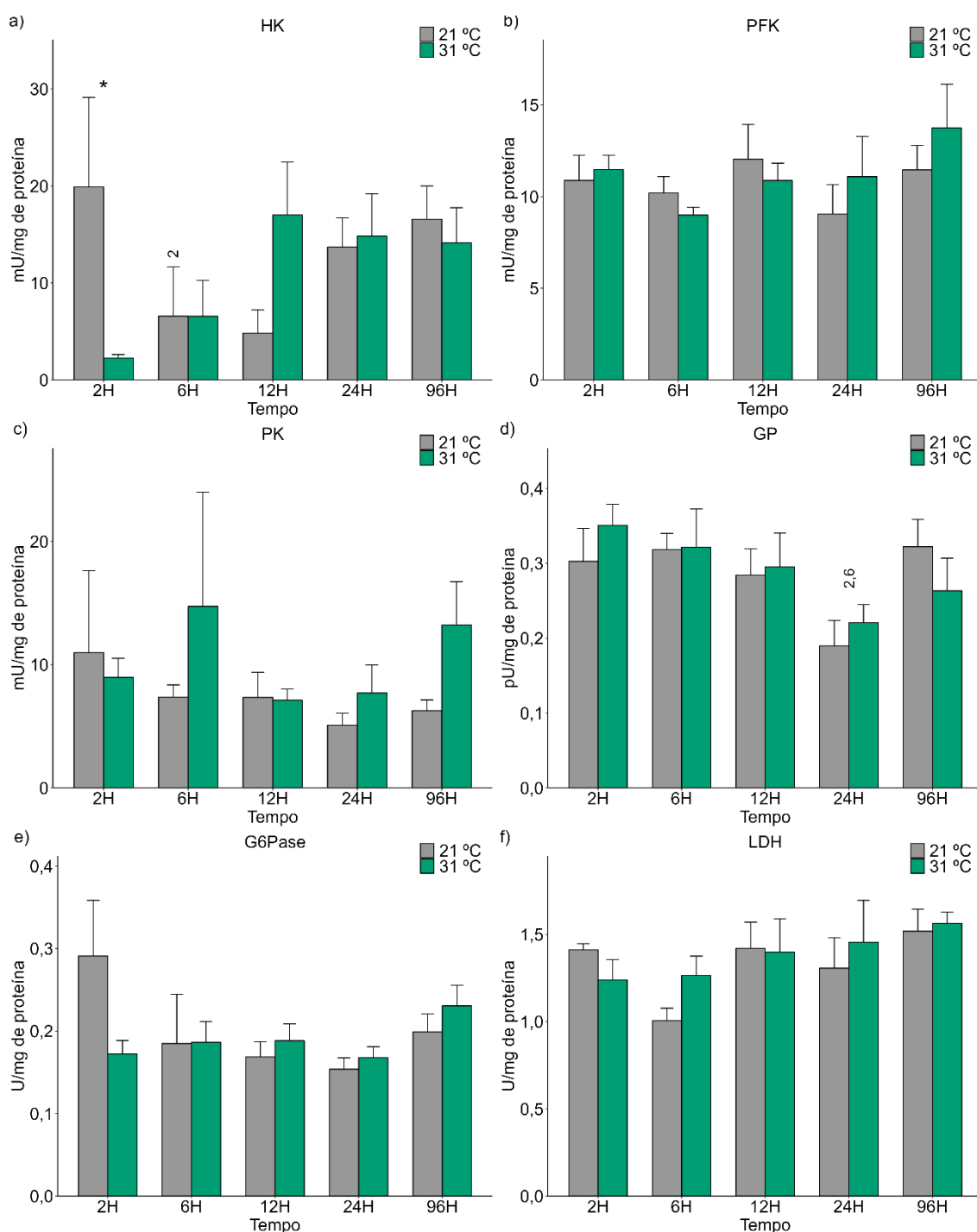
FIGURA 5: CONCENTRAÇÃO DE GSH, EROs, AChE E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Concentração de GSH, EROS, AChE e marcadores de dano oxidativo do encéfalo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31° C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) lipoperoxidação (LPO), b) carbonilação de proteínas (PCO), c) glutatona reduzida (GSH), d) espécies reativas de oxigênio total (EROs) e e) acetilcolinesterase (AChE).

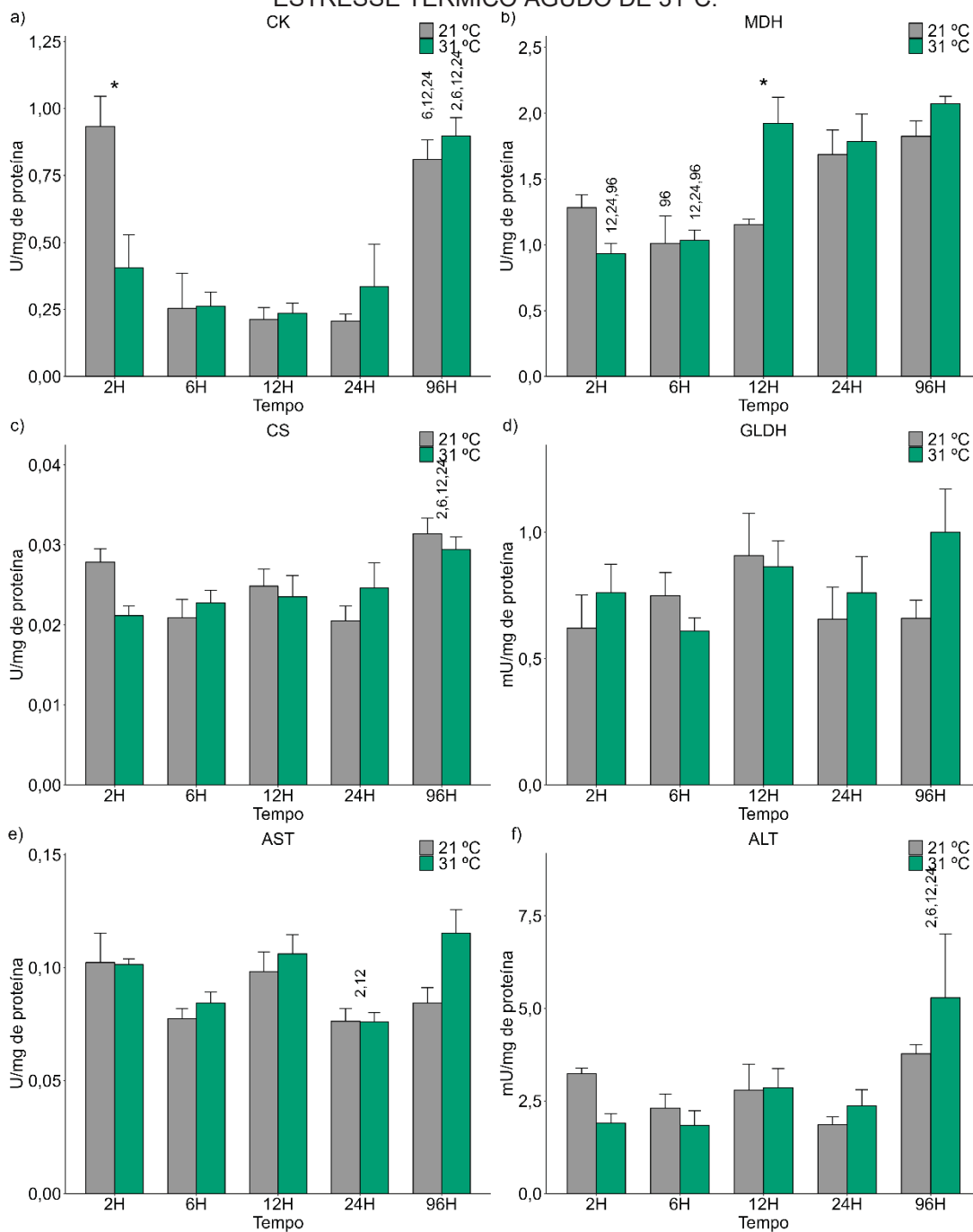
No encéfalo de *R. voulezi* a atividade dos marcadores metabólicos CS, G6Pase, GLDH, GP, LDH, PFK, PK, AST, ALT, piruvato, lactato e glicogênio não apresentaram alterações significativas em relação aos seus controles. As atividades da HK ($p = 0.0109$) e CK ($p = 0.0017$) diminuíram em 2 horas e a atividade da MDH ($p = 0.0027$) aumentou em 12 horas de exposição quando comparado com seus respectivos controles. As atividades de CK, CS, GP, HK, MDH, AST e ALT apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 96 horas (Figuras 6, 7 e 8).

FIGURA 6: ATIVIDADE DOS MARCADORES METABÓLICOS DE CARBOIDRATOS DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



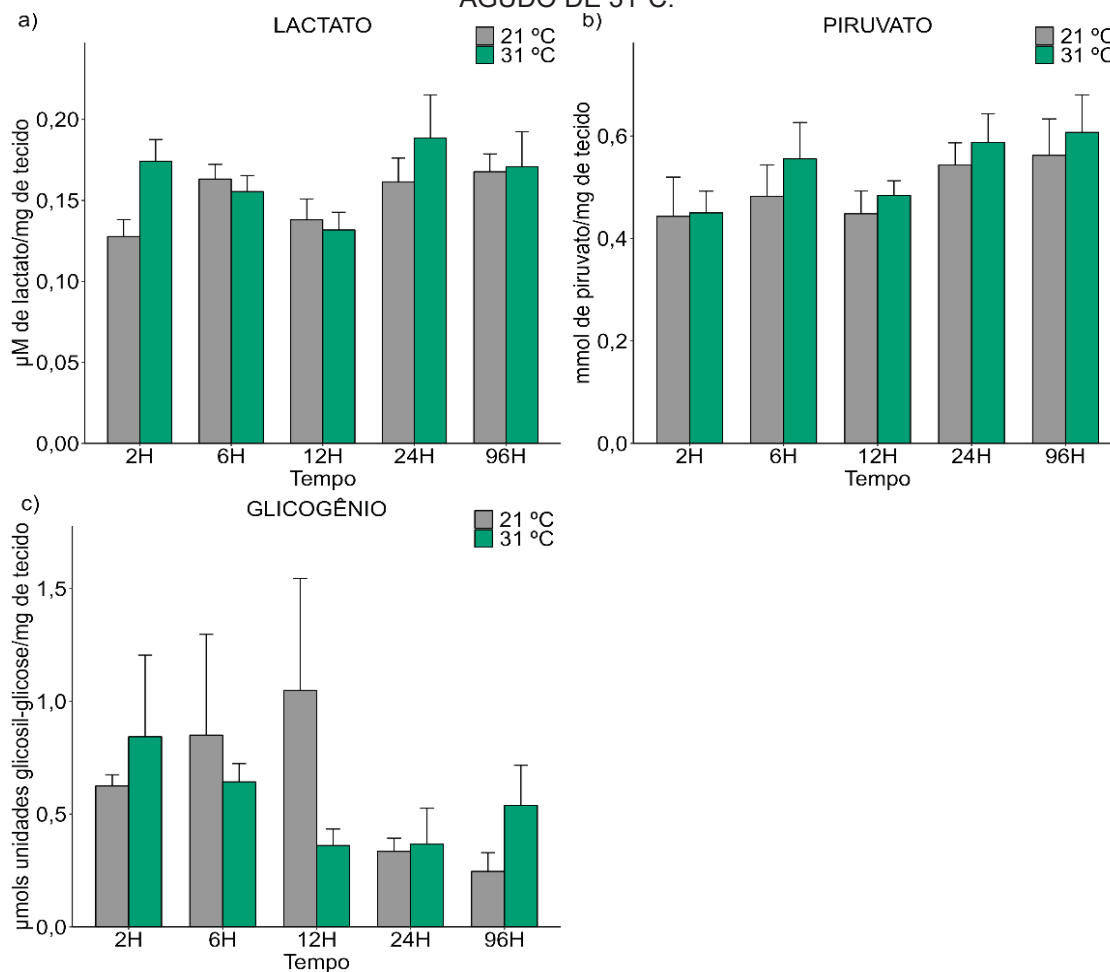
NOTA: Atividade dos marcadores metabólicos de carboidratos do encéfalo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento, enquanto que os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) hexoquinase (HK), b) fosfofrutoquinase (PFK), c) piruvato quinase (PK), d) glicogênio fosforilase (GP), e) glicose-6-fosfatase (G6Pase) e f) lactato desidrogenase (LDH).

FIGURA 7: ATIVIDADE DOS MARCADORES METABÓLICOS DE CREATINA QUINASE, PROTEÍNA E CICLO DE KREBS DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Atividade dos marcadores metabólicos de creatina quinase, proteína, e ciclo de Krebs do encéfalo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento, enquanto que os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) creatina quinase (CK), b) malato desidrogenase (MDH), c) citrato sintase (CS), d) glutamato desidrogenase (GLDH), e) aspartato aminotransferase (AST) e f) alanina aminotransferase (ALT).

FIGURA 8: CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES METABÓLICOS LACTATO, PIRUVATO E GLICOGÊNIO DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.

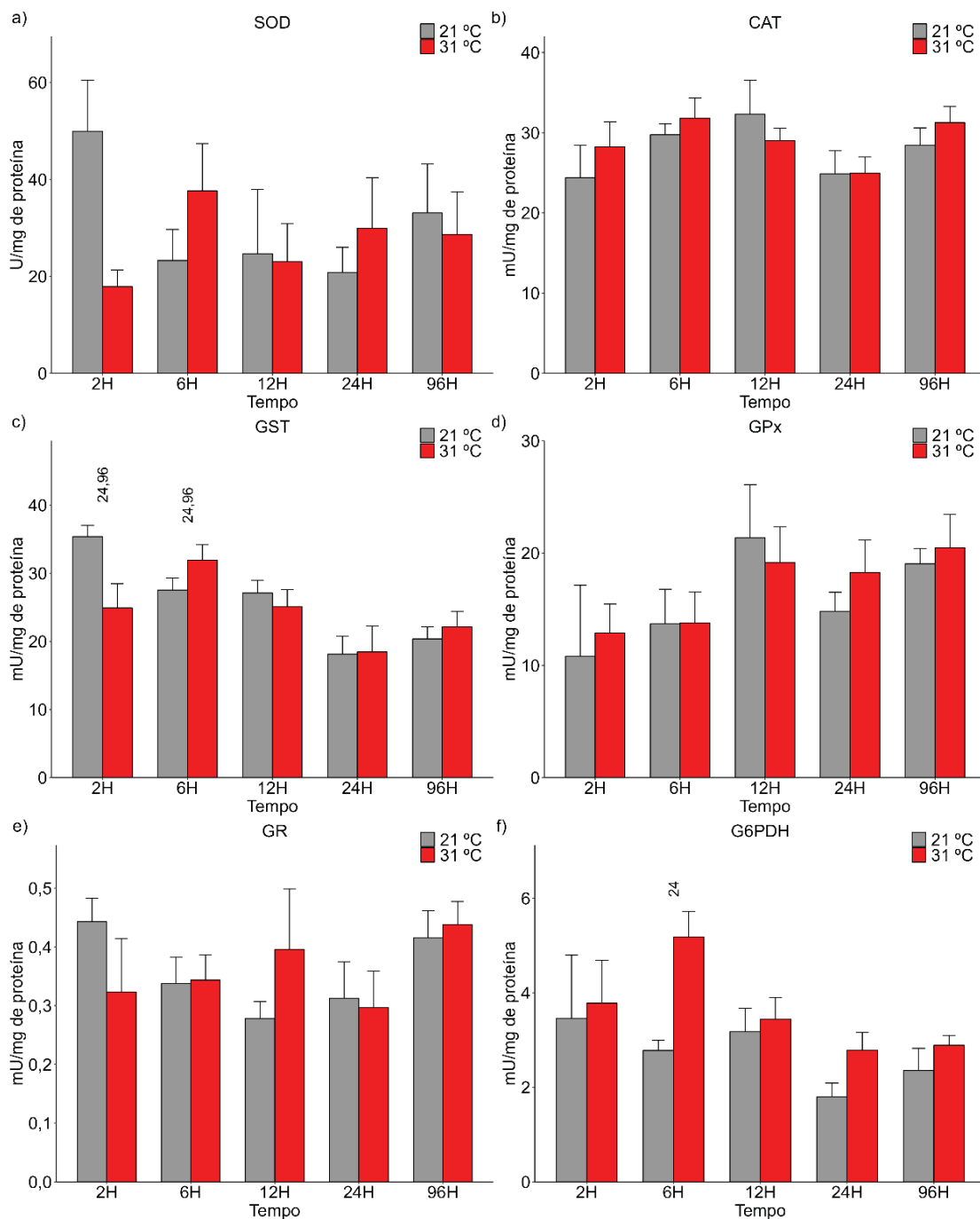


NOTA: Concentração dos marcadores metabólicos lactato, piruvato e glicogênio do encéfalo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) lactato, b) piruvato e c) glicogênio.

5.2 Marcadores bioquímicos: Coração de *R. voulezi*

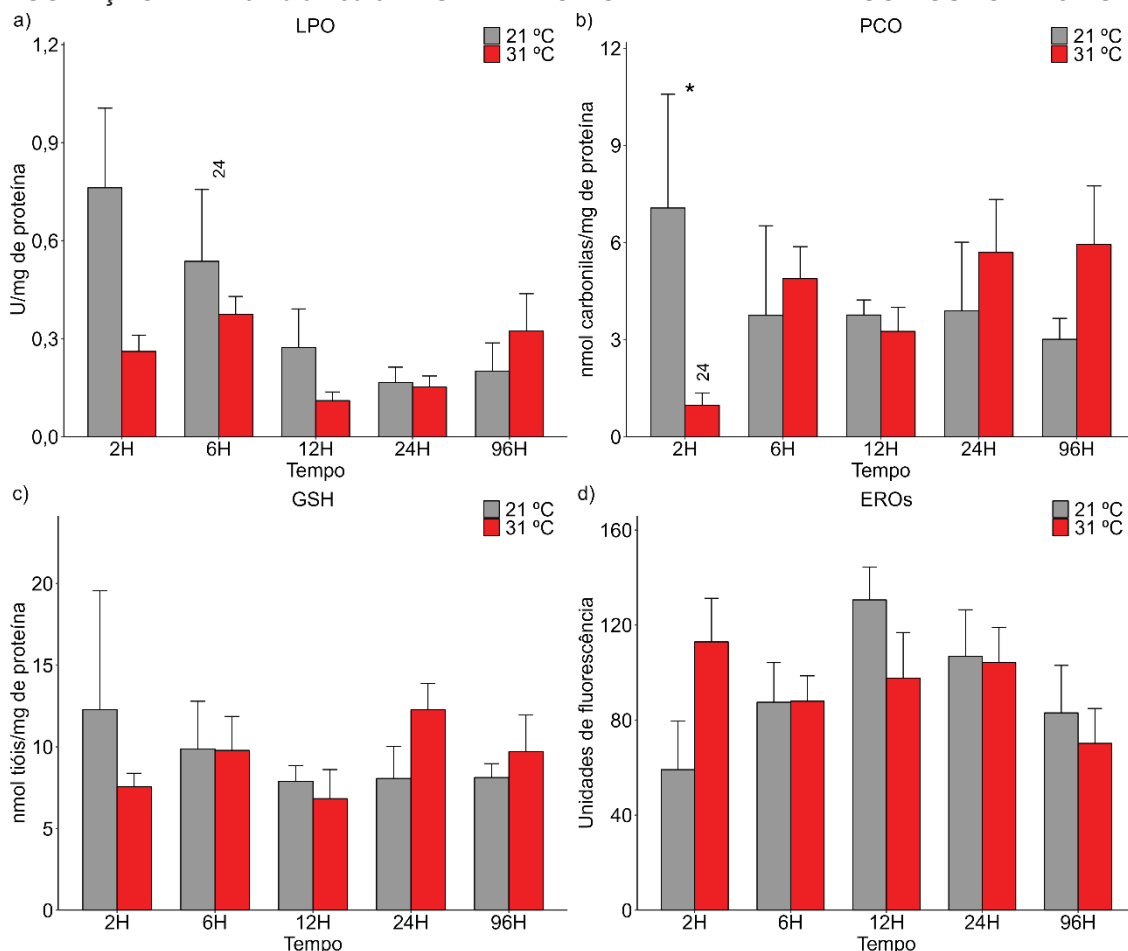
No coração de *R. voulezi* os marcadores de estresse oxidativo SOD, CAT, GPx, GR, GSH, GST, G6PDH, LPO e EROs não apresentaram alterações significativas em relação aos seus controles. Apenas a PCO ($p = 0,0109$) reduziu em 2 horas de exposição, a 31°C, quando comparado com seu controle. As atividades de GST, G6PDH e as concentrações de LPO e PCO apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 96 horas (Figuras 9 e 10).

FIGURA 9: ATIVIDADE DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO CORAÇÃO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Atividade dos marcadores de estresse oxidativo do coração de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) superóxido dismutase (SOD), b) catalase (CAT), c) glutiona S-transferase (GST), d) glutiona peroxidase (GPx), e) glutiona redutase (GR) e f) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

FIGURA 10: CONCENTRAÇÃO DE GSH, EROS E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO DO CORAÇÃO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.

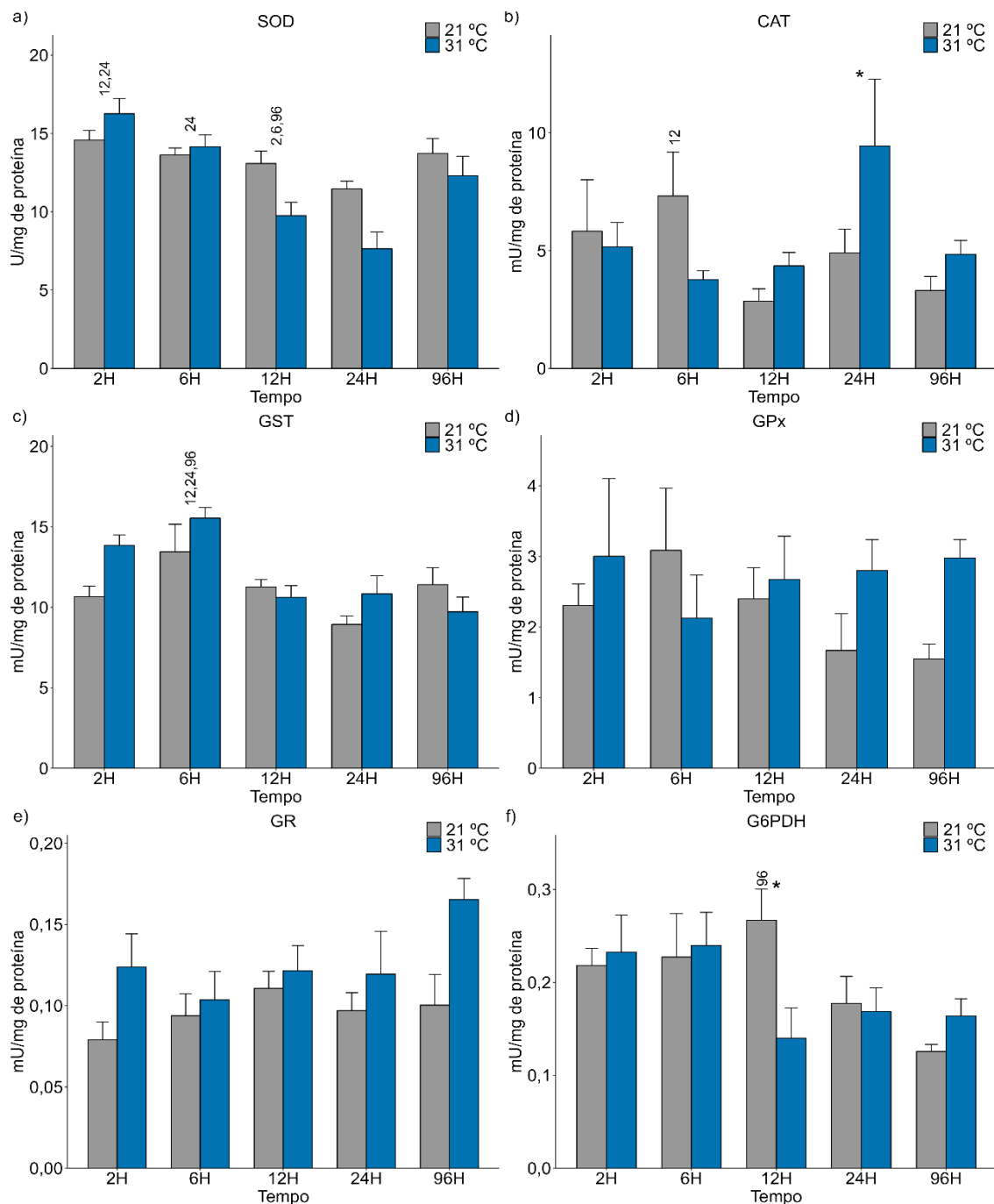


NOTA: Concentração de GSH, EROS e marcadores de dano oxidativo do coração de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31° C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento, enquanto que os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) lipoperoxidação (LPO), b) carbonilação de proteínas (PCO), c) glutatona reduzida (GSH) e d) espécies reativas de oxigênio total (EROs).

5.3 Marcadores bioquímicos: Músculo de *R. voulezi*

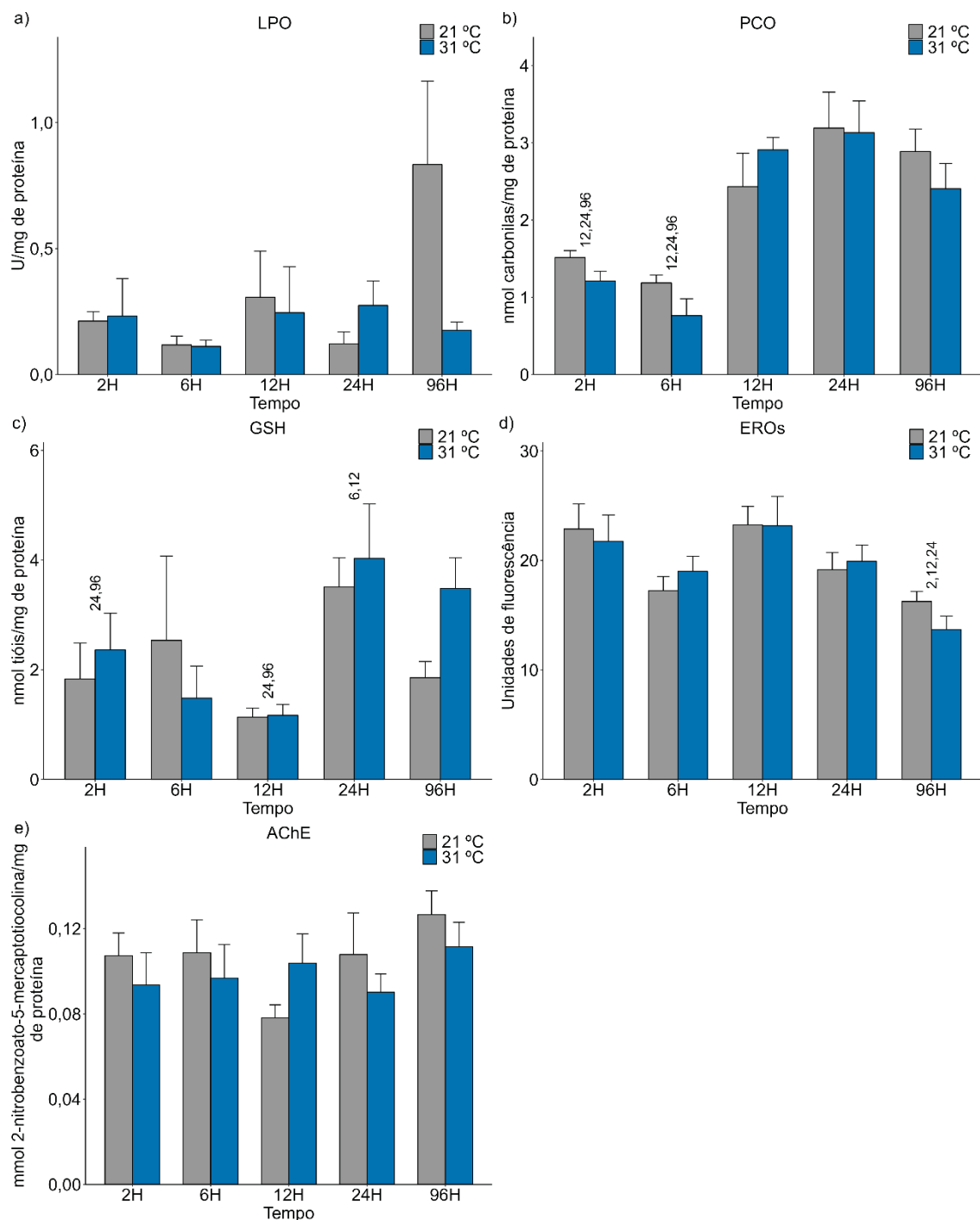
No músculo de *R. voulezi* os marcadores de estresse oxidativo SOD, GPx, GR, GSH, GST, LPO, PCO e EROs não apresentaram alterações significativas em relação aos seus controles, bem como para o marcador colinérgico AChE. A atividade de G6PDH ($p = 0.0019$) diminuiu em 12 horas e a da CAT ($p = 0.0463$) aumentou em 24 horas de exposição quando comparado com seus respectivos controles. As atividades de SOD, CAT, GST, G6PDH, GSH e as concentrações de PCO e EROs apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 96 horas (Figuras 11 e 12).

FIGURA 11: ATIVIDADE DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Atividade dos marcadores de estresse oxidativo do músculo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento, enquanto que os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) superóxido dismutase (SOD), b) catalase (CAT), c) glutathione S-transferase (GST), d) glutathione peroxidase (GPx), e) glutathione redutase (GR) e f) glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).

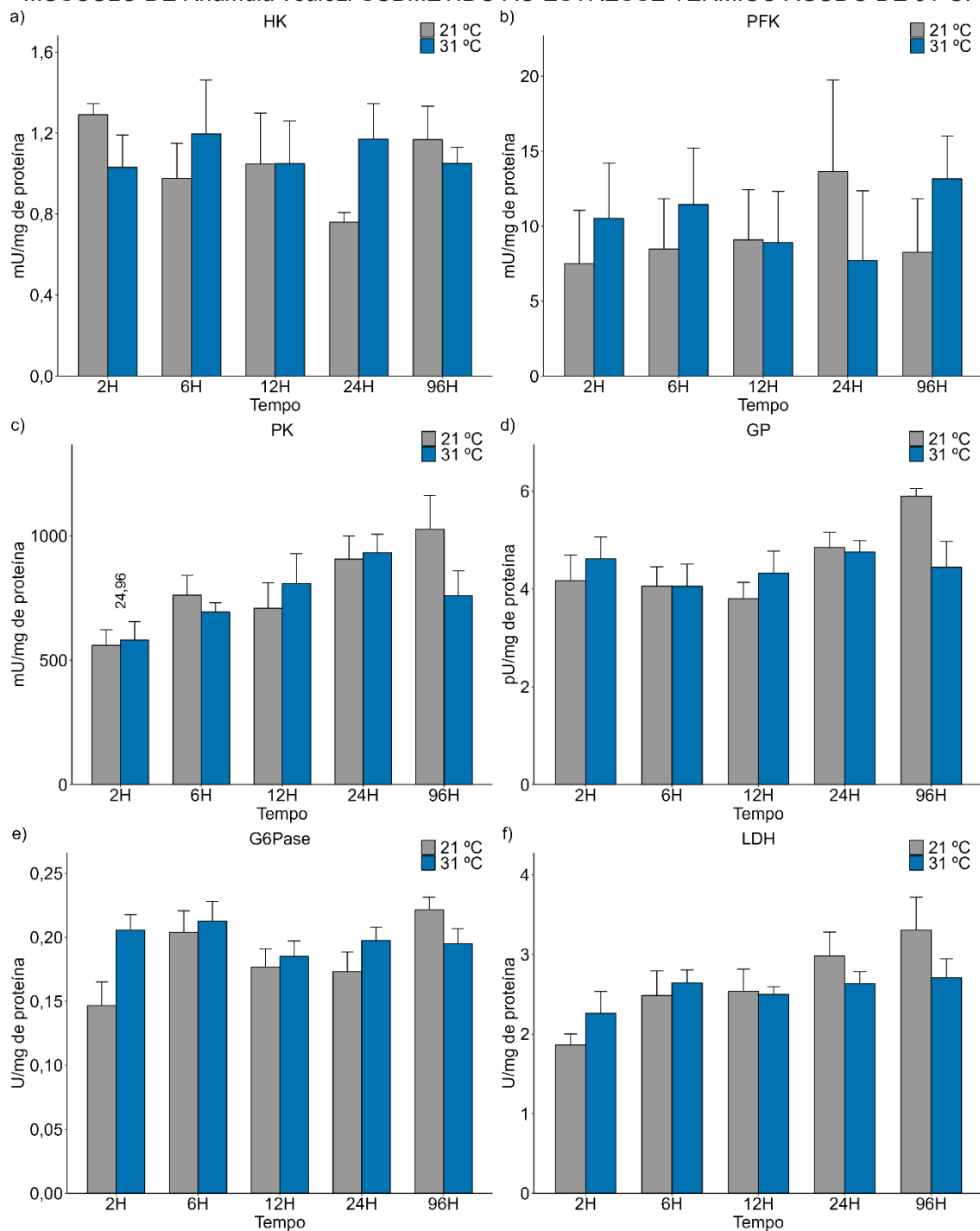
FIGURA 12: CONCENTRAÇÃO DE GSH, EROs, AChE E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Concentração de GSH, EROS e marcadores de dano oxidativo do músculo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31° C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão. Os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição (p < 0,05). a) lipoperoxidação (LPO), b) carbonilação de proteínas (PCO), c) glutatona reduzida (GSH), d) espécies reativas de oxigênio total (EROs) e e) acetilcolinesterase (AChE).

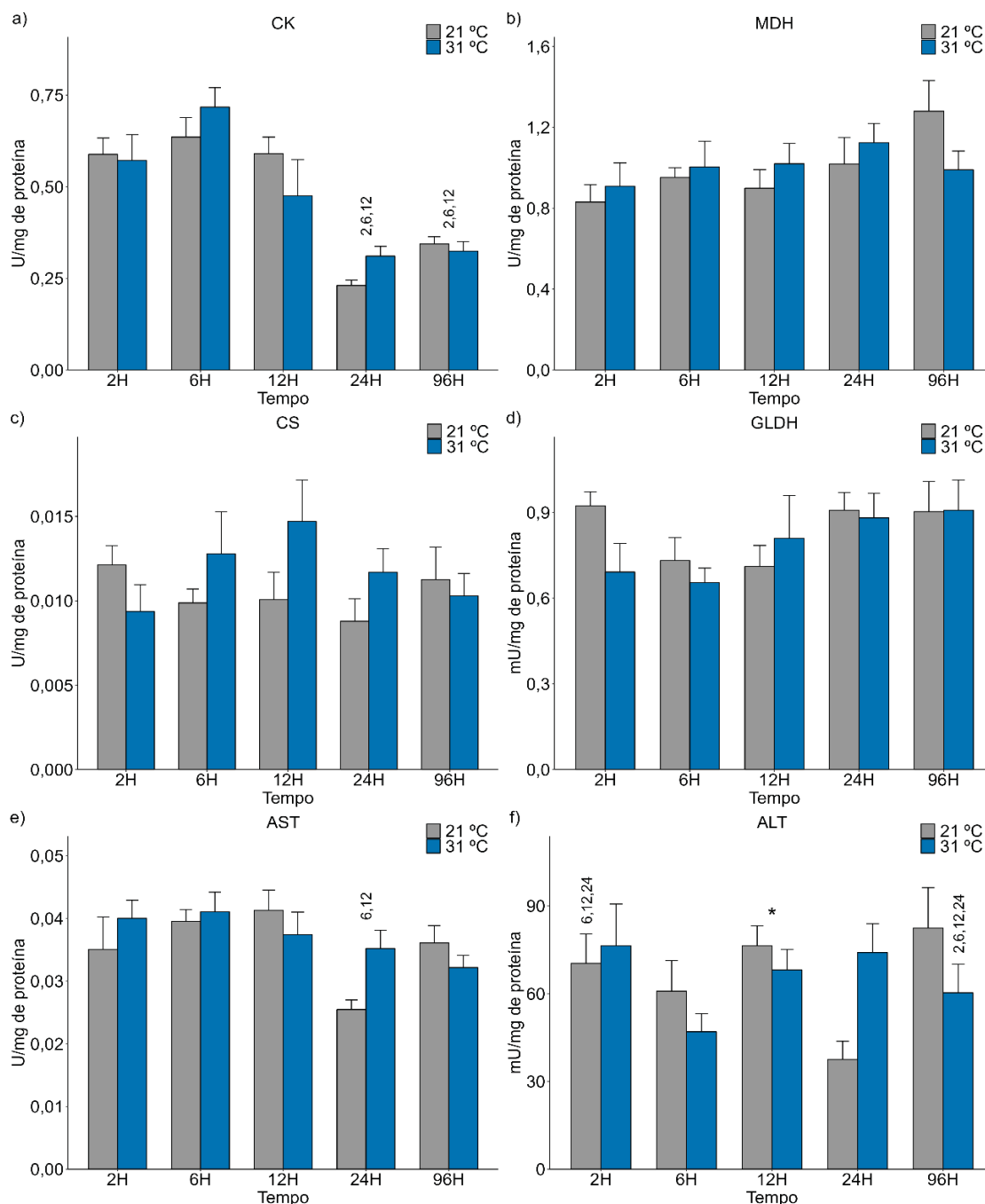
No músculo de *R. voulezi* os marcadores metabólicos CK, CS, G6Pase, GLDH, GP, HK, LDH, MDH, PFK, PK, AST, piruvato e lactato não apresentaram alterações significativas em relação aos seus controles. A atividade de ALT ($p = 0.004$) diminuiu em 12 horas e os níveis de glicogênio ($p = 0.0096$) aumentaram em 96 horas de exposição quando comparado com seus respectivos controles. As atividades de CK, PK, AST, ALT e as concentrações de lactato e glicogênio apresentaram diferenças estatísticas entre os tempos de exposição de 2, 6, 12, 24 e 96 horas (Figuras 13, 14 e 15).

FIGURA 13: ATIVIDADE DOS MARCADORES METABÓLICOS DE CARBOIDRATOS DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



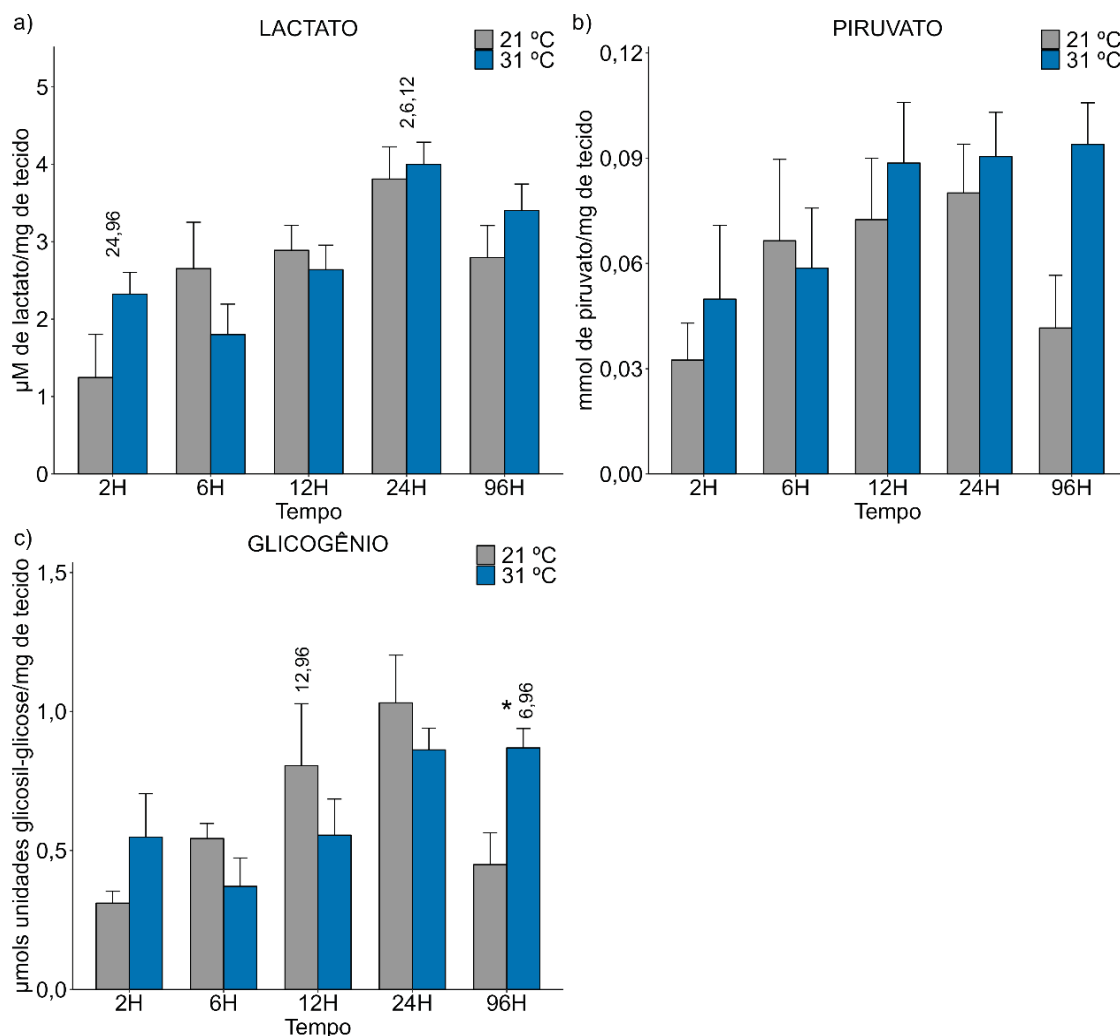
NOTA: Atividade dos marcadores metabólicos de carboidratos do músculo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) hexoquinase (HK), b) fosfofrutoquinase (PFK), c) piruvato quinase (PK), d) glicogênio fosforilase (GP), e) glicose-6-fosfatase (G6Pase) e f) lactato desidrogenase (LDH).

FIGURA 14: ATIVIDADE DOS MARCADORES METABÓLICOS DE CREATINA QUINASE, PROTEÍNA E CICLO DE KREBS DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Atividade dos marcadores metabólicos de creatina quinase, proteína, e ciclo de Krebs do músculo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento, enquanto que os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) creatina quinase (CK), b) malato desidrogenase (MDH), c) citrato sintase (CS), d) glutamato desidrogenase (GLDH), e) aspartato aminotransferase (AST) e f) alanina aminotransferase (ALT).

FIGURA 15: CONCENTRAÇÃO DOS MARCADORES METABÓLICOS LACTATO, PIRUVATO E GLICOGÊNIO DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.

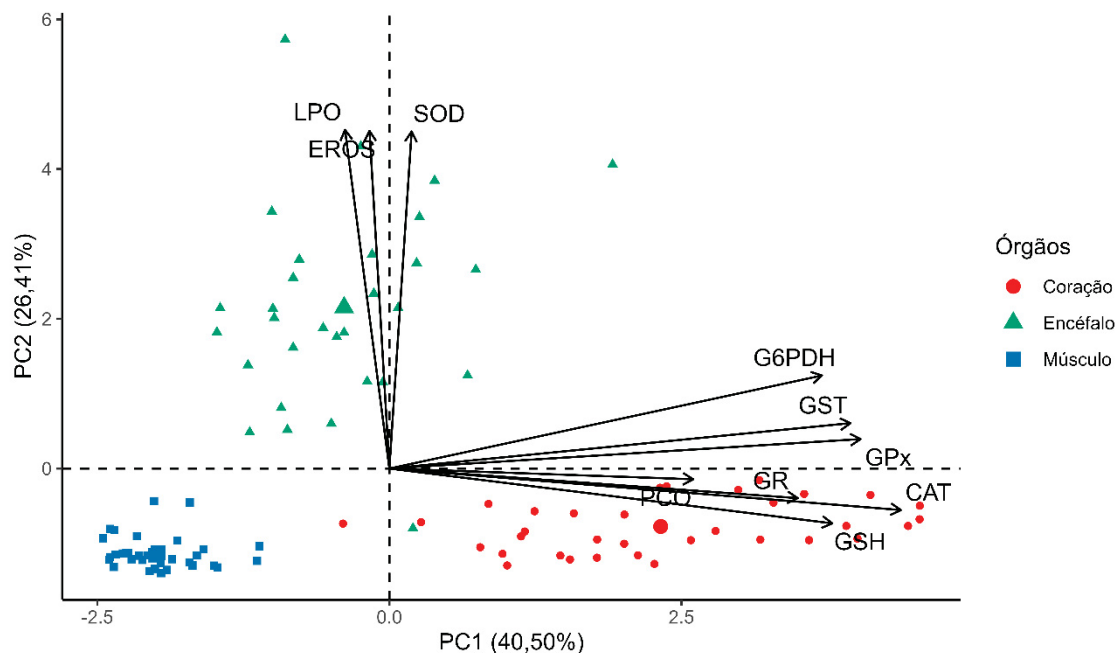


NOTA: Concentração dos marcadores metabólicos lactato, piruvato e glicogênio do músculo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão. Os asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento, enquanto que os números em cima das barras indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). a) lactato, b) piruvato e c) glicogênio.

5.4 Marcadores bioquímicos: Comparação entre os órgãos de *R. voulezi*

A variação dos marcadores de estresse oxidativo do coração, encéfalo e músculo de *R. voulezi* foram explicados na PCA com 66,91%. Sumarizado no primeiro eixo com 40,50% e no segundo eixo com 26,41%. O biplot apontou que CAT, GPx, GR, GSH e PCO possuem associação com o coração. Ficando a G6PDH e a GST próximas. Da mesma forma, EROs, LPO e SOD apresentaram associação com o encéfalo, enquanto, o músculo não obteve associação direta com nenhum marcador (Figura 16).

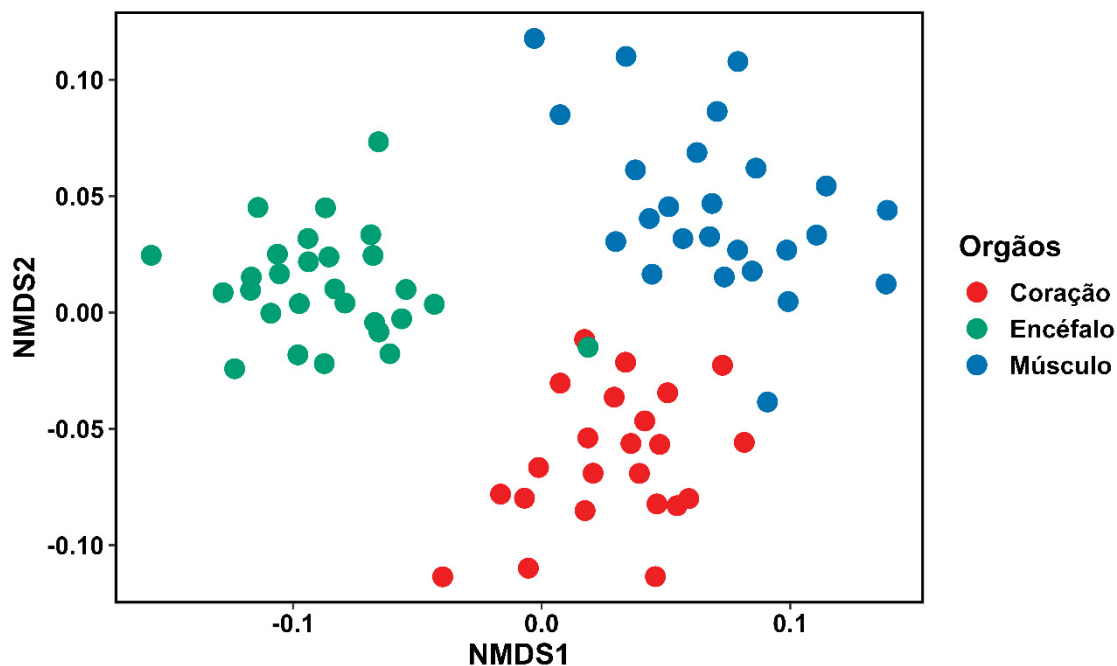
FIGURA 16: ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Biplot da análise de componentes principais (PCA) dos marcadores de estresse oxidativo do coração, encéfalo e músculo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C. SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GST: glutathione S-transferase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione redutase, G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase, LPO: lipoperoxidação, PCO: carbonilação de proteínas, GSH: glutathione reduzida e EROs: espécies reativas de oxigênio.

As observações acima foram comprovadas pela combinação par a par encontrada na PERMANOVA ao indicar diferenças entre os marcadores de estresse oxidativo SOD, CAT, GST, GPx, GSH, G6PDH e EROs ($p < 0,001$) nos três órgãos, com exceção da GR ($p = 0,831$) entre músculo e encéfalo; PCO ($p = 0,057$; $p = 0,903$) entre encéfalo, coração e músculo e LPO ($p = 0,086$) entre coração e músculo que não foram significativas. As diferenças no agrupamento entre coração, encéfalo e músculo ($R^2: 0,57$; $R^2: 0,49$; $R^2: 0,54$; $p = 0,001$) para os marcadores de estresse oxidativo são visualizadas no gráfico de ordenação abaixo (Figura 17).

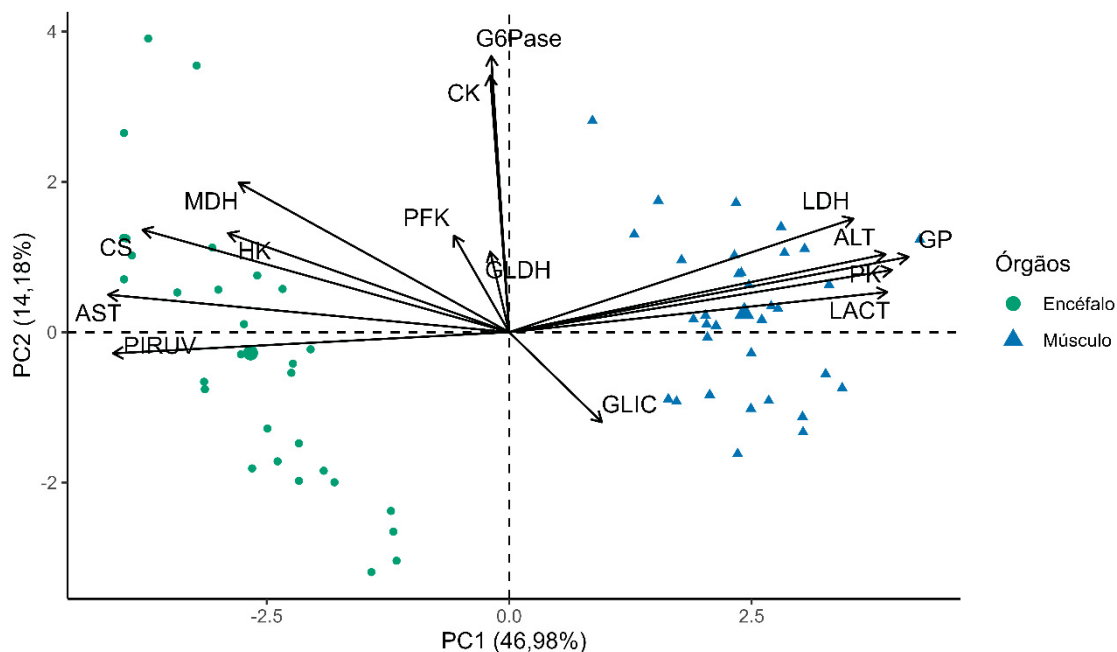
FIGURA 17: DIFERENÇAS NO AGRUPAMENTO ENTRE CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO PARA OS MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: O gráfico de ordenação destaca as diferenças de agrupamento existente entre coração, encéfalo e músculo de *Rhamdia voulezi* para os marcadores de estresse oxidativo.

A variação dos marcadores metabólicos do encéfalo e músculo de *R. voulezi* foram explicados na PCA com 61,16%. Presente no primeiro eixo com 46,98% e no segundo eixo com 14,18%. A dispersão dos dados apontou o encéfalo associado com AST, CS, HK, MDH e piruvato. O músculo associou-se com a ALT, lactato, LDH, GLDH, GP, glicogênio e PK. Além disso, foi observado que os marcadores G6Pase, PFK e CK possuem associação inversa com o glicogênio (Figura 18).

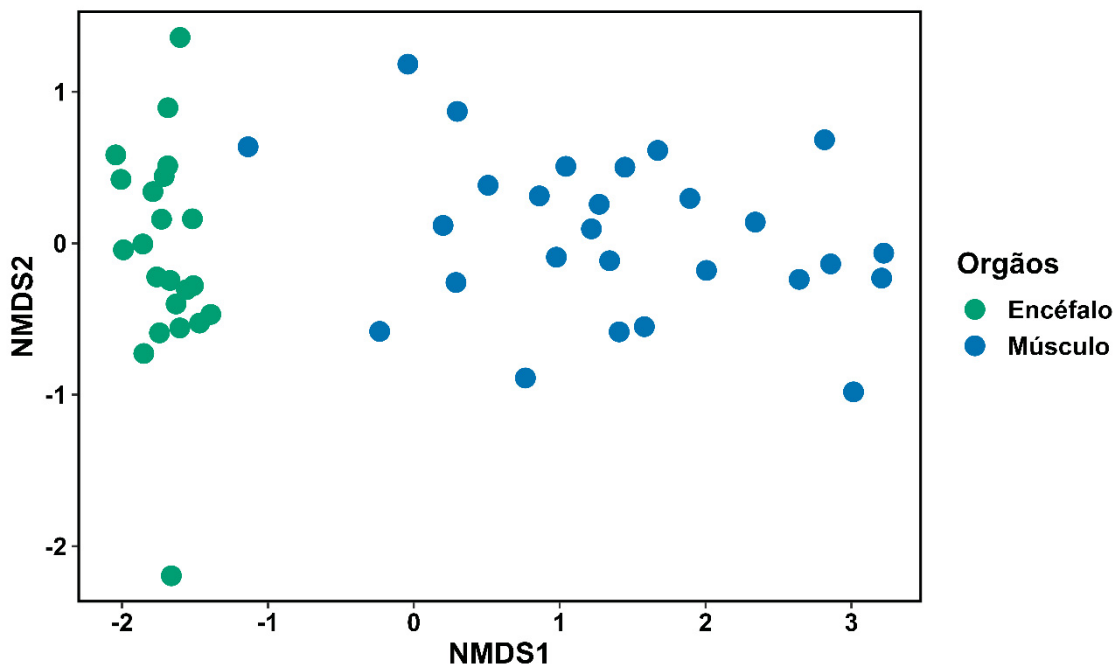
FIGURA 18: ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) DOS MARCADORES METABÓLICOS DO ENCÉFALO E MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Biplot da análise de componentes principais (PCA) dos marcadores metabólicos do encéfalo e músculo de *Rhamdia voulezi* expostos ao estresse térmico de 31°C. G6Pase: glicose-6-fosfatase, HK: hexoquinase, PFK: fosfofrutoquinase, PK: piruvato quinase, piruvato, lactato, LDH: lactato desidrogenase, GP: glicogênio fosforilase, glicogênio, CK: creatina quinase, CS: citrato sintase, MDH: malato desidrogenase, ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase e GLDH: glutamato desidrogenase.

As observações foram comprovadas pela PERMANOVA ao indicar diferenças entre os marcadores metabólicos CS, GP, HK, LDH, MDH, PK, AST, ALT, lactato e piruvato ($p < 0,001$) no encéfalo e músculo, com exceção da CK ($p = 0,118$), G6Pase ($p = 0,213$), GLDH ($p = 0,939$), PFK ($p = 0,514$) e glicogênio ($p = 0,717$). As diferenças no agrupamento entre encéfalo e músculo ($R^2: 0,52$; $p = 0,01$) para os marcadores metabólicos são visualizadas no gráfico de ordenação abaixo (Figura 19).

FIGURA 19: DIFERENÇAS NO AGRUPAMENTO ENTRE ENCÉFALO E MÚSCULO PARA OS MARCADORES METABÓLICOS DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



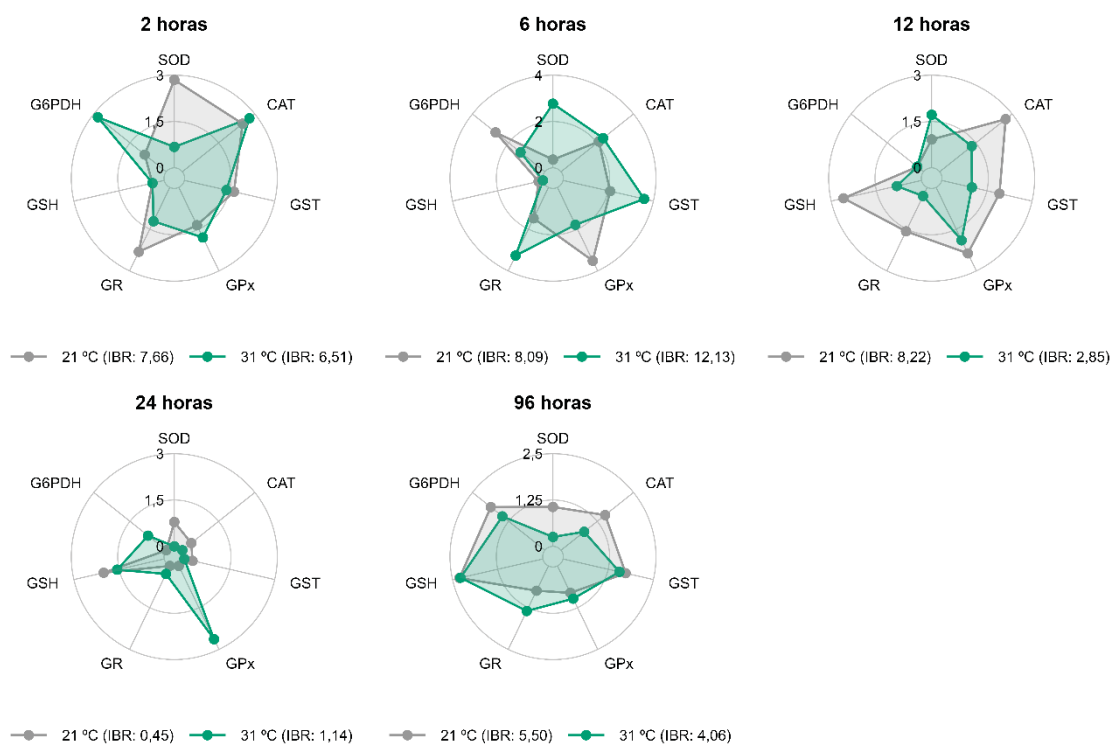
NOTA: O gráfico de ordenação destaca as diferenças de agrupamento existentes entre encéfalo e músculo de *Rhamdia voulezi* para os marcadores metabólicos.

5.5 Resposta integrada dos biomarcadores (IBR) e condição corporal em *R. voulezi*

Encéfalo, coração e músculo possuem respostas diferentes, conforme as categorias de IBR descritas para cada tempo de exposição e órgão. Em 2 horas foram encontrados valores aumentados de IBR no músculo nas categorias de defesa antioxidante (IBR:12,38), metabolismo oxidativo (IBR:1,52), metabolismo de glicogênio (IBR:3,27) e sistema de ATP (IBR:2,50) (Figuras 22, 27, 29 e 31). Em 6 horas foram encontrados valores aumentados de IBR em defesa antioxidante no encéfalo (IBR:12,13) e coração (IBR:10,89) (Figuras 20 e 21); metabolismo oxidativo no encéfalo (IBR:2,41) e músculo (IBR:7,44) (Figuras 26 e 27); EROs e marcadores de dano oxidativo (IBR:5,59) e sistema de ATP (IBR:1,22) no encéfalo (Figuras 23 e 30). Em 12 horas foram encontrados valores aumentados de IBR em EROs e marcadores de dano oxidativo e metabolismo oxidativo no encéfalo (IBR:4,08; IBR:4,57) (Figuras 23 e 26) e músculo (IBR:4,45; IBR:7,74) (Figura 25 e 27); metabolismo de aminoácido no encéfalo (IBR:3,50) (Figura 32) e metabolismo do glicogênio no músculo (IBR:2,08) (Figura 29). Em 24 horas foram encontrados valores aumentados de IBR em todas as categorias

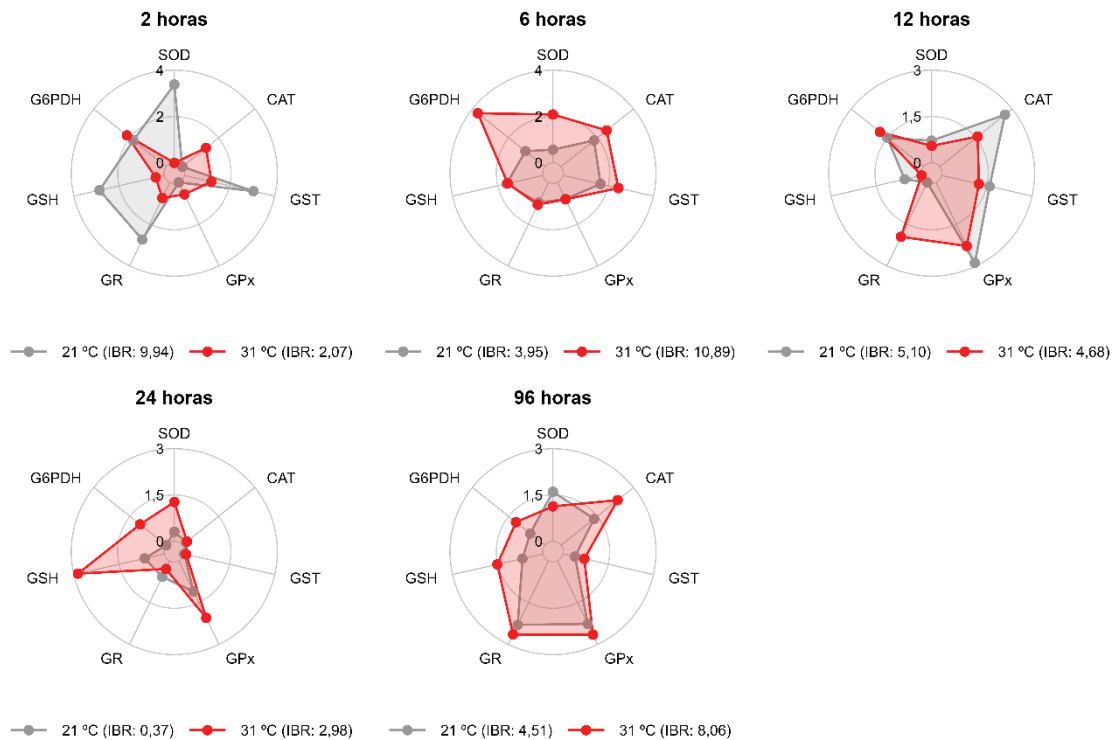
dos três órgãos, com exceção do sistema de ATP no músculo. Em 96 horas foram encontrados valores aumentados de IBR em defesa antioxidante no coração (IBR:8,06) (Figura 21) e músculo (IBR:8,38) (Figura 22); EROs e marcadores de dano oxidativo no coração (IBR:2,21) (Figura 24); metabolismo oxidativo (IBR:17,58), metabolismo do glicogênio (IBR:2,86), sistema de ATP (IBR:8,86) e metabolismo de aminoácido (IBR:11,63) no encéfalo (Figuras 26, 28, 30 e 32).

FIGURA 20: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



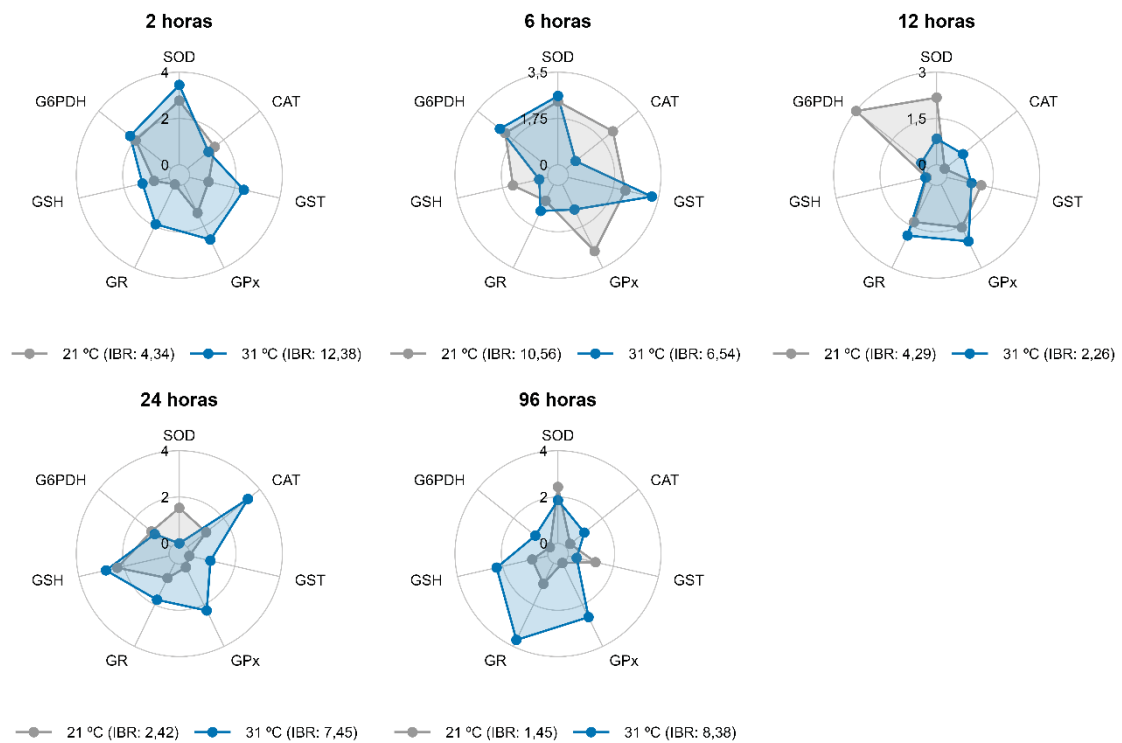
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) da defesa antioxidante do encéfalo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GST: glutatona S-transferase, GPx: glutatona peroxidase, GR: glutatona redutase, GSH: glutatona reduzida e G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase.

FIGURA 21: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO CORAÇÃO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



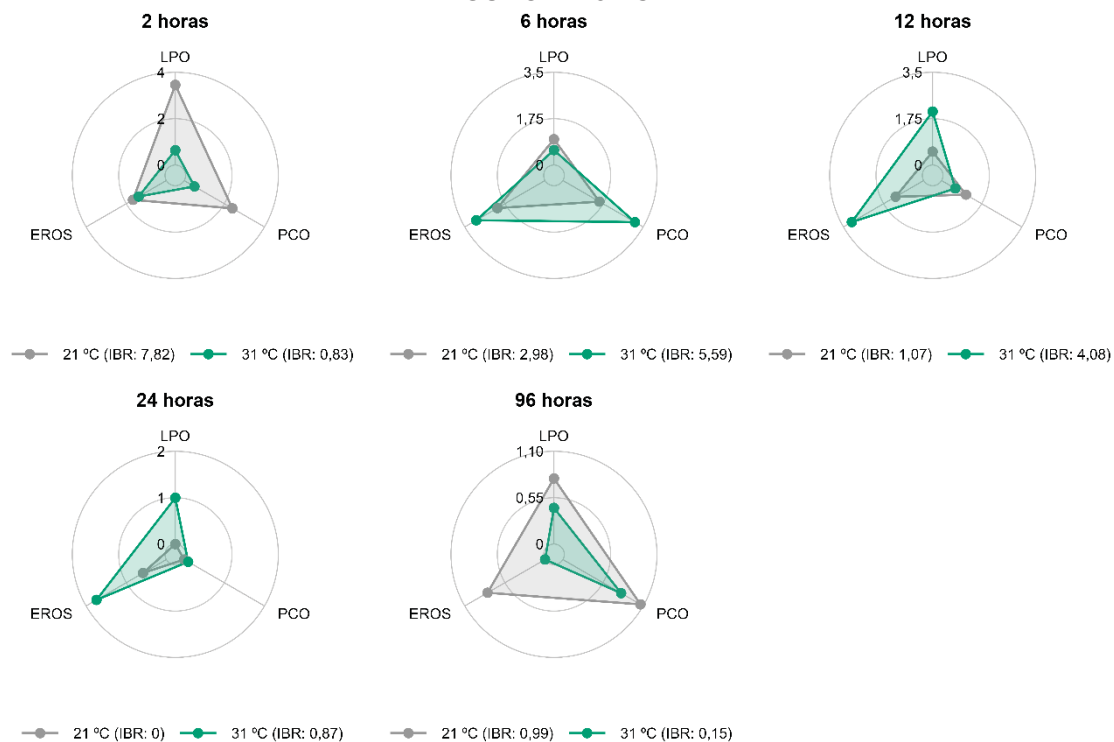
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) da defesa antioxidante do coração de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GST: glutatona S-transferase, GPx: glutatona peroxidase, GR: glutatona redutase, GSH: glutatona reduzida e G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase.

FIGURA 22: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DA DEFESA ANTIOXIDANTE DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



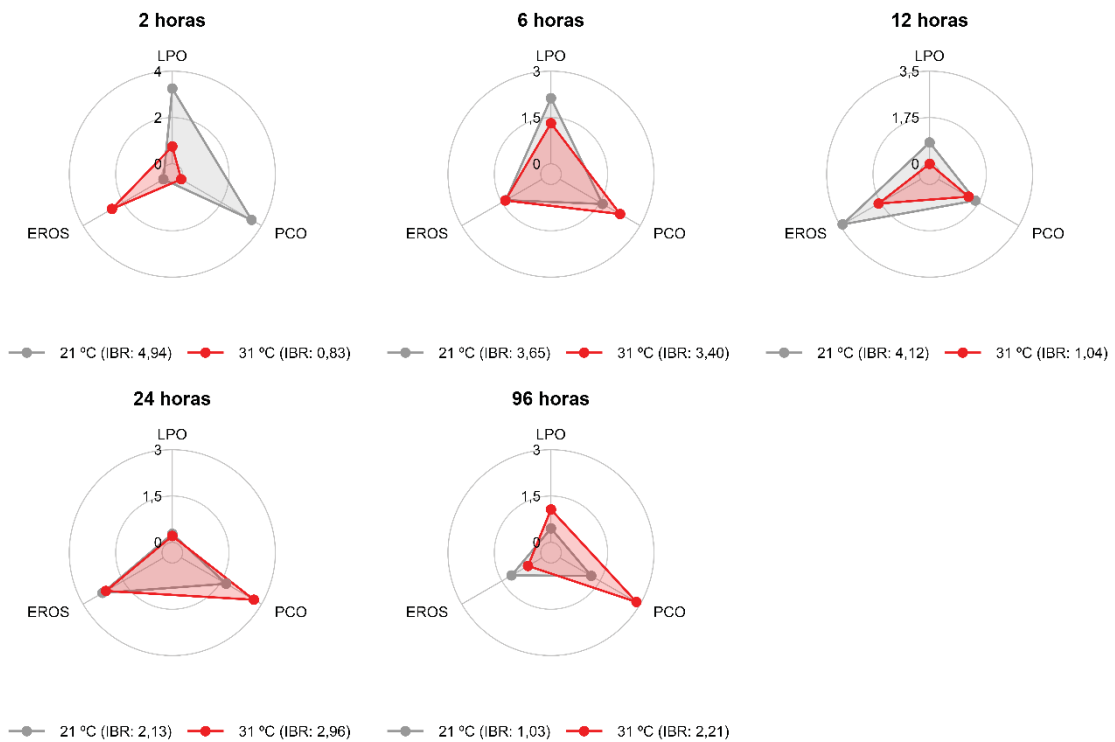
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) da defesa antioxidante do músculo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. SOD: superóxido dismutase, CAT: catalase, GST: glutaciona S-transferase, GPx: glutaciona peroxidase, GR: glutaciona redutase, GSH: glutaciona reduzida e G6PDH: glicose-6-fosfato desidrogenase.

FIGURA 23: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DE EROs E DANO OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



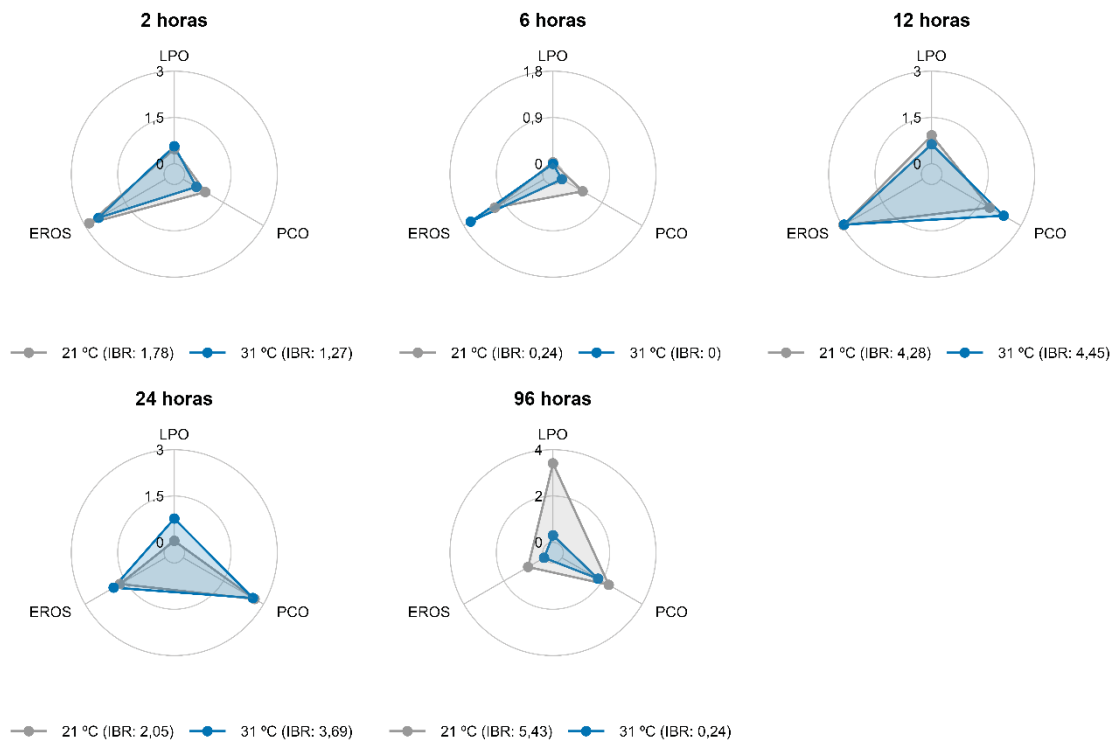
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) de EROs e dano oxidativo do encéfalo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. LPO: lipoperoxidação, PCO: carbonilação de proteínas e EROS: espécies reativas de oxigênio.

FIGURA 24: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DE EROs E DANO OXIDATIVO DO CORAÇÃO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



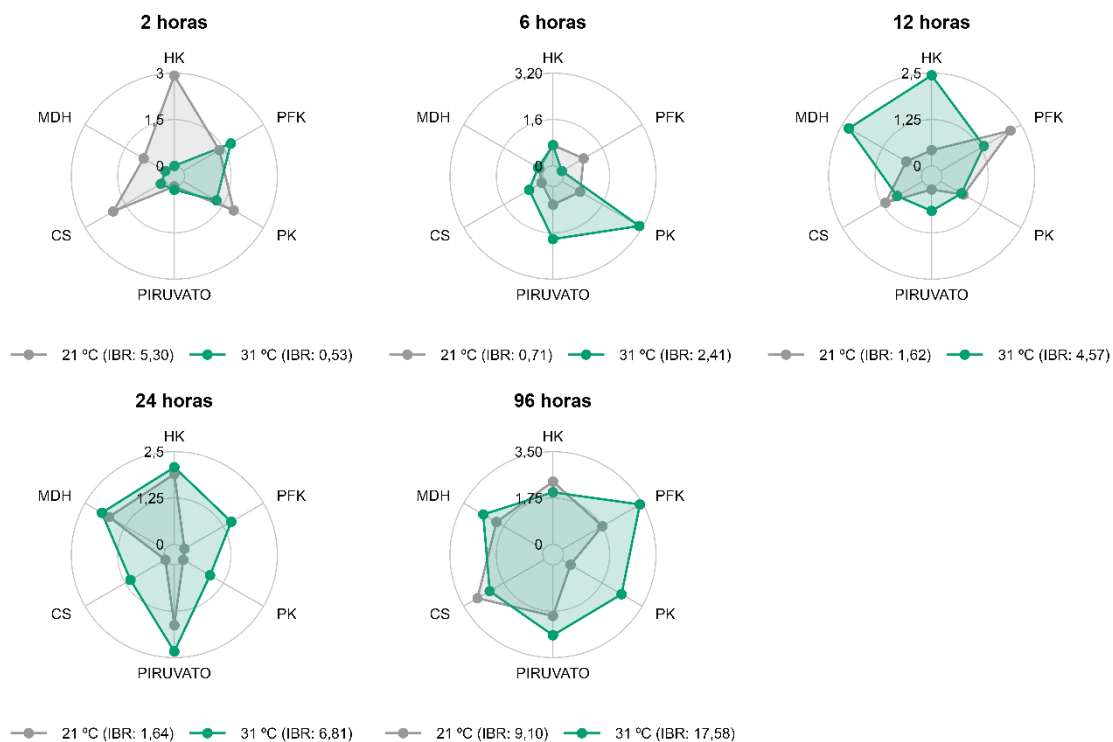
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) de EROs e dano oxidativo do coração de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. LPO: lipoperoxidação, PCO: carbonilação de proteínas e EROs: espécies reativas de oxigênio.

FIGURA 25: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DE EROs E DANO OXIDATIVO DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



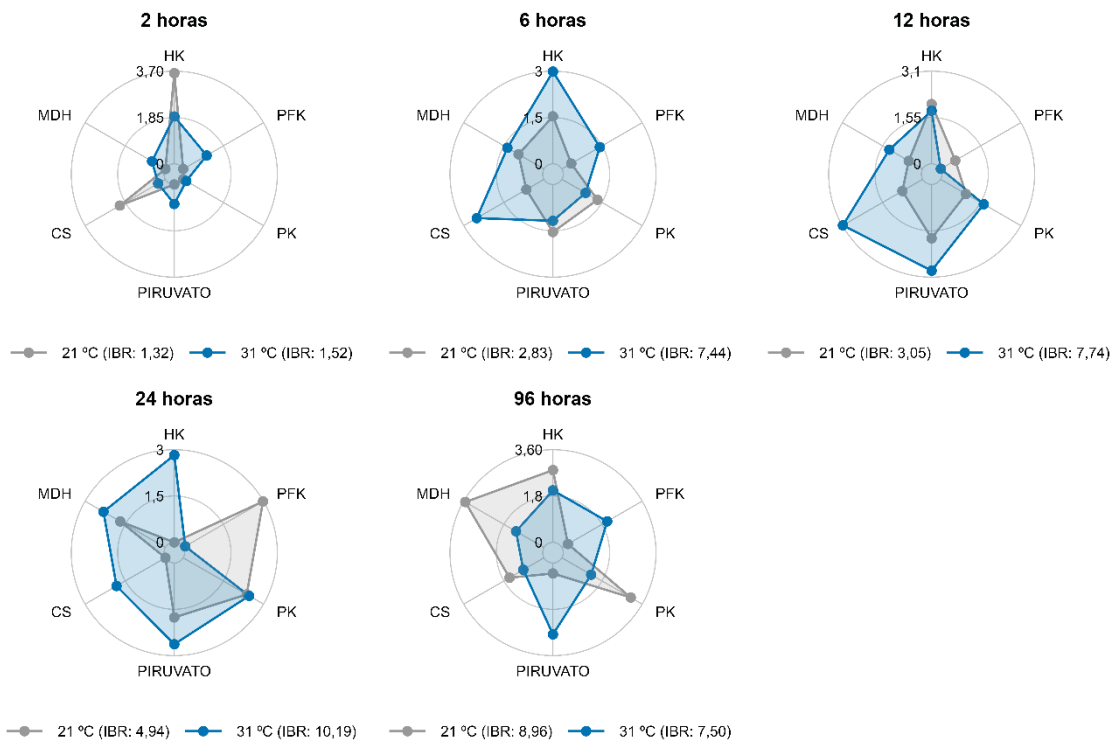
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) de EROs e dano oxidativo do músculo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. LPO: lipoperoxidação, PCO: carbonilação de proteínas e EROS: espécies reativas de oxigênio.

FIGURA 26: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO OXIDATIVO DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



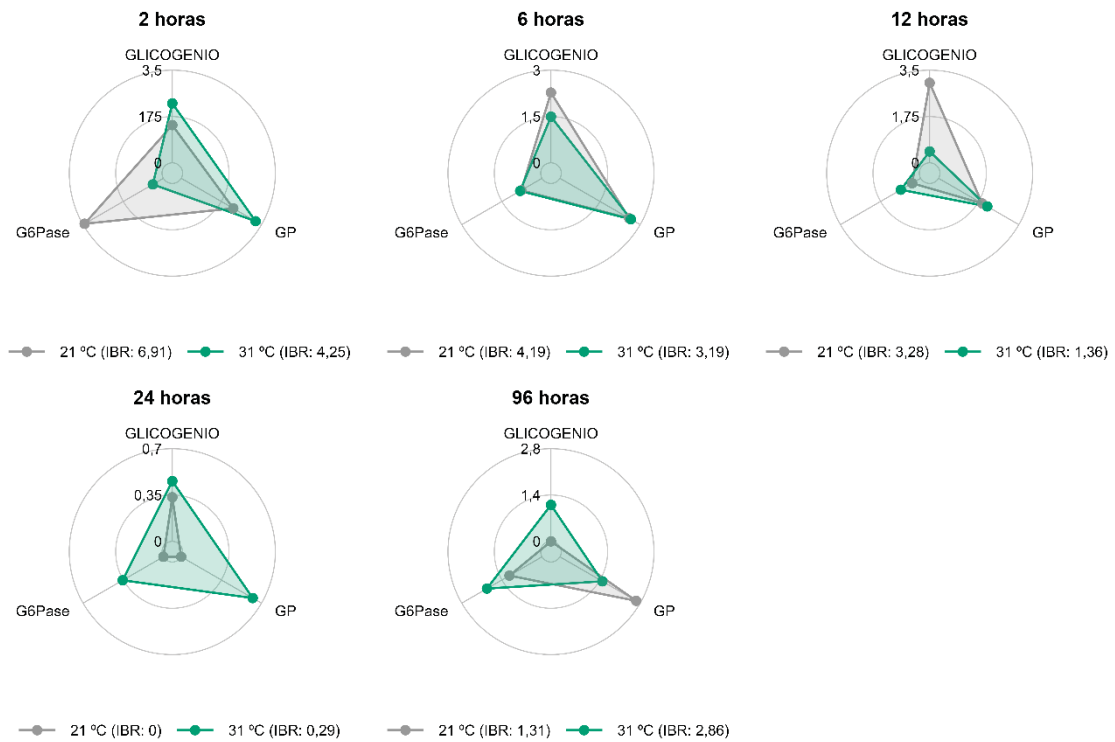
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) do metabolismo oxidativo do encéfalo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. HK: hexoquinase, PFK: fosfofrutoquinase, PK: piruvato, piruvato, CS: citrato sintase e MDH: malato desidrogenase.

FIGURA 27: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO OXIDATIVO DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



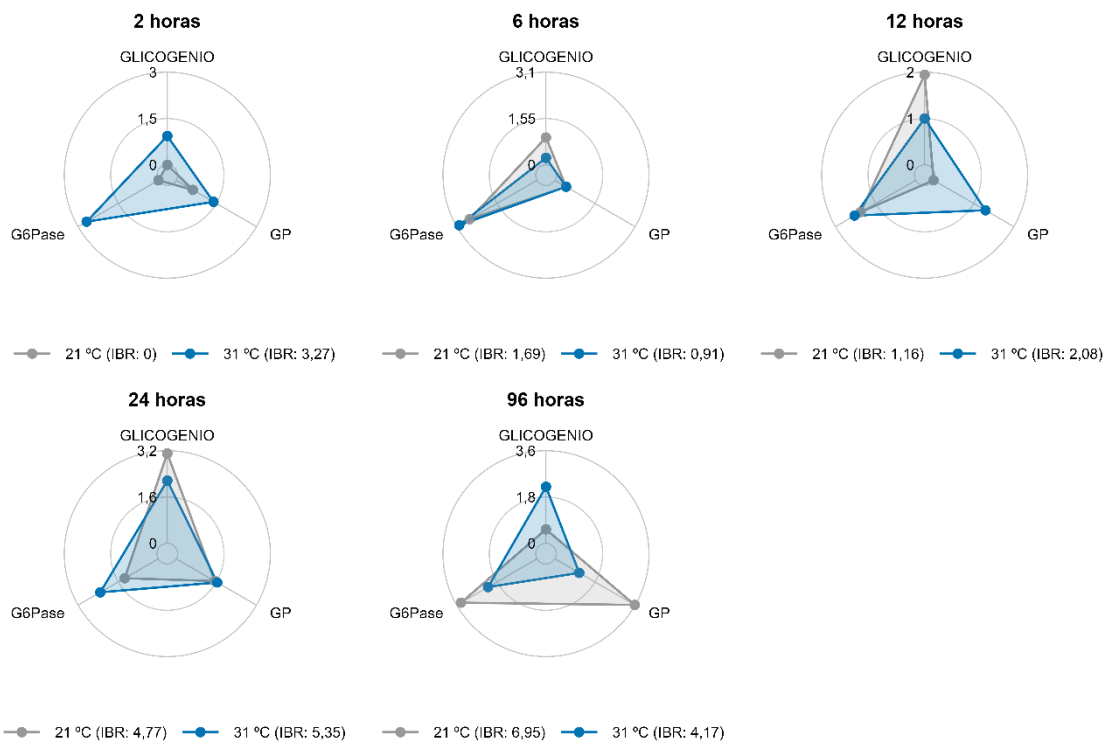
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) do metabolismo oxidativo do músculo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. HK: hexoquinase, PFK: fosfofrutoquinase, PK: piruvato, piruvato, CS: citrato sintase e MDH: malato desidrogenase.

FIGURA 28: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



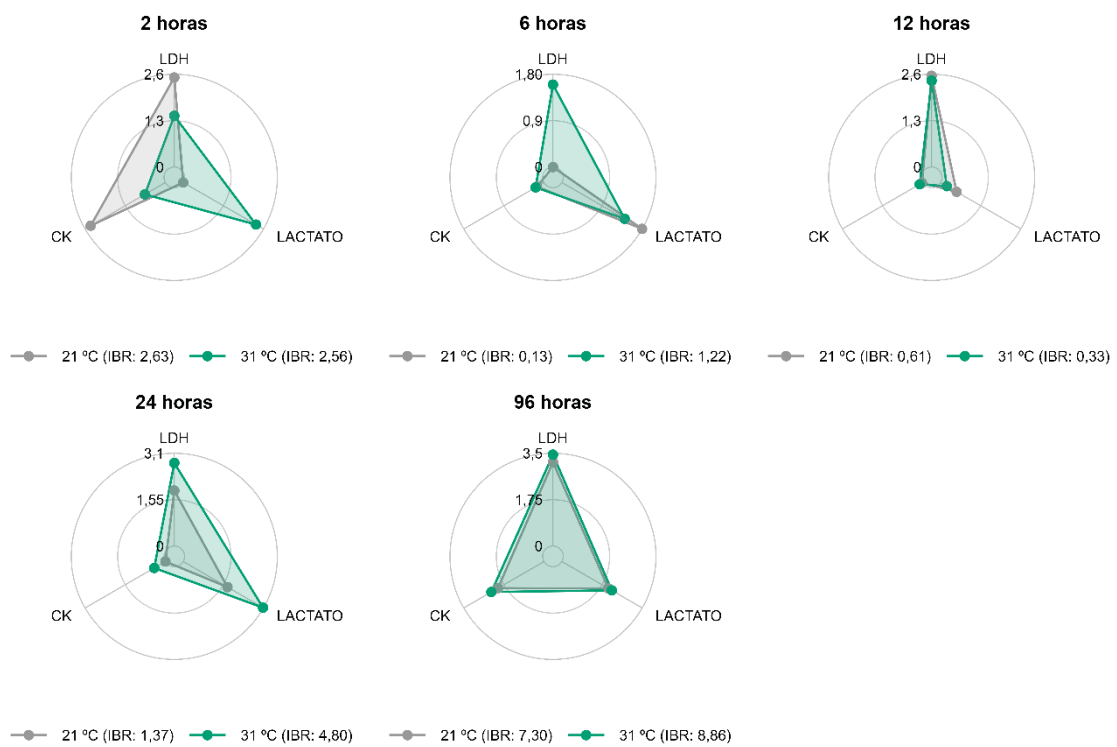
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) do metabolismo do glicogênio do encéfalo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Glicogênio, GP: glicogênio fosforilase e G6Pase: glicose-6-fosfatase.

FIGURA 29: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO DO GLICOGÊNIO DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



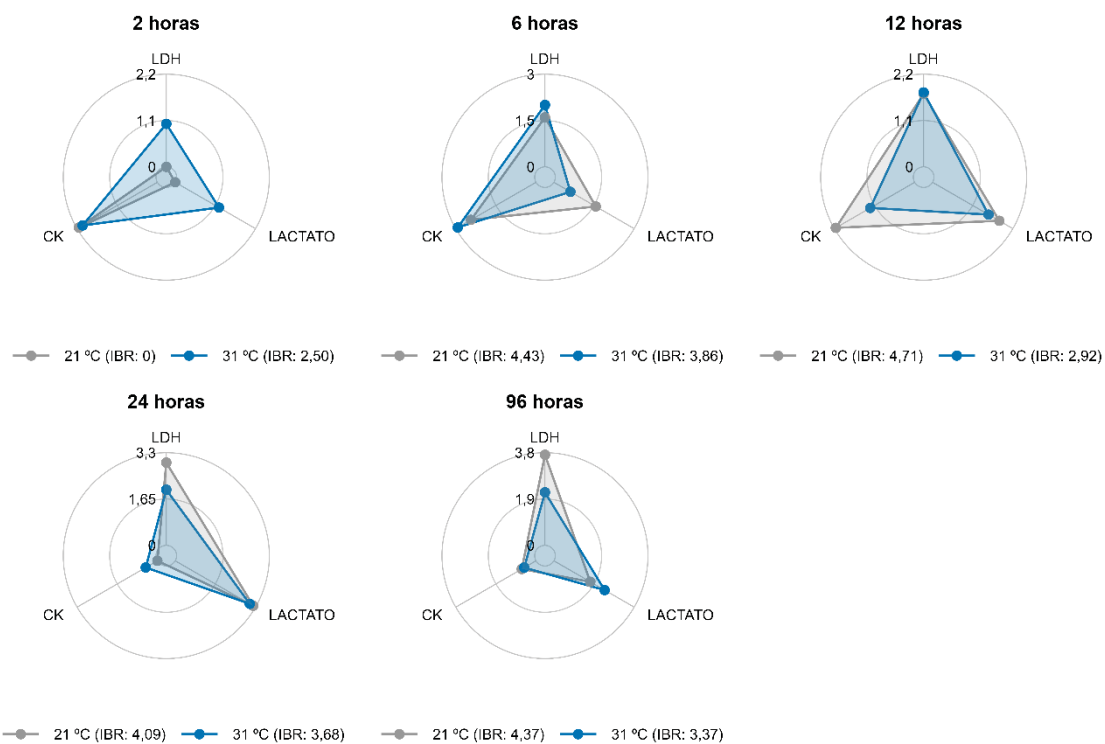
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) do metabolismo do glicogênio do músculo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Glicogênio, GP: glicogênio fosforilase e G6Pase: glicose-6-fosfatase.

FIGURA 30: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO SISTEMA ATP DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



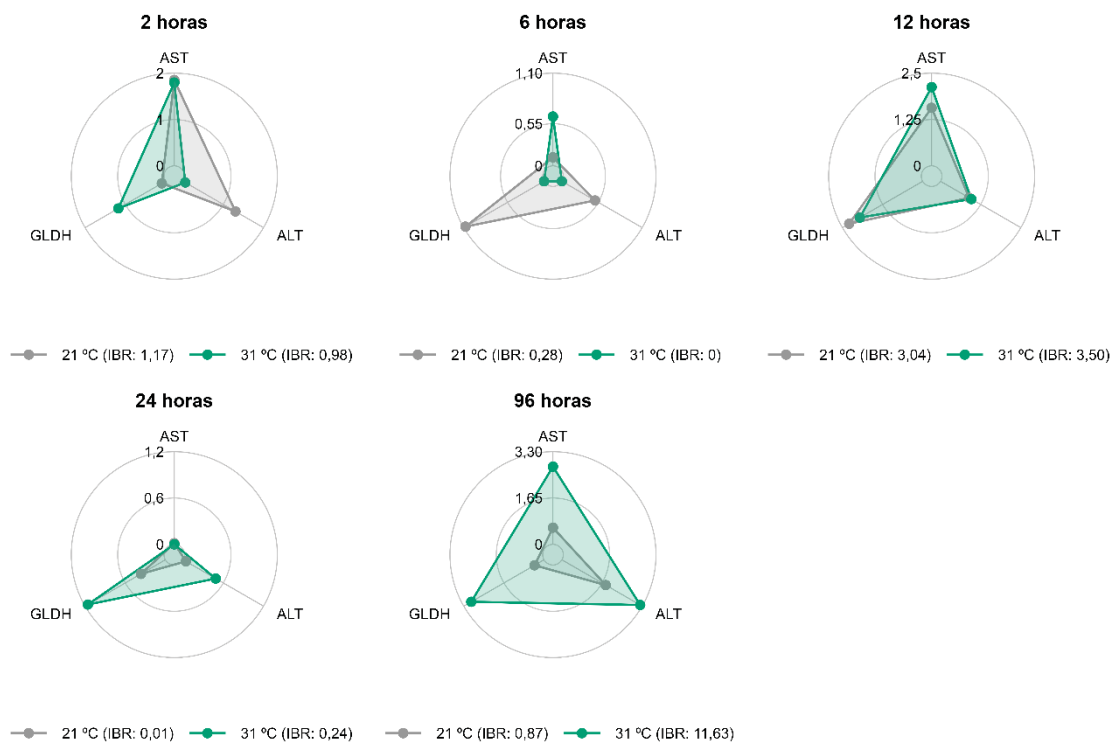
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) do sistema ATP do encéfalo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Lactato, LDH: lactato desidrogenase e CK: creatina quinase.

FIGURA 31: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO SISTEMA ATP DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



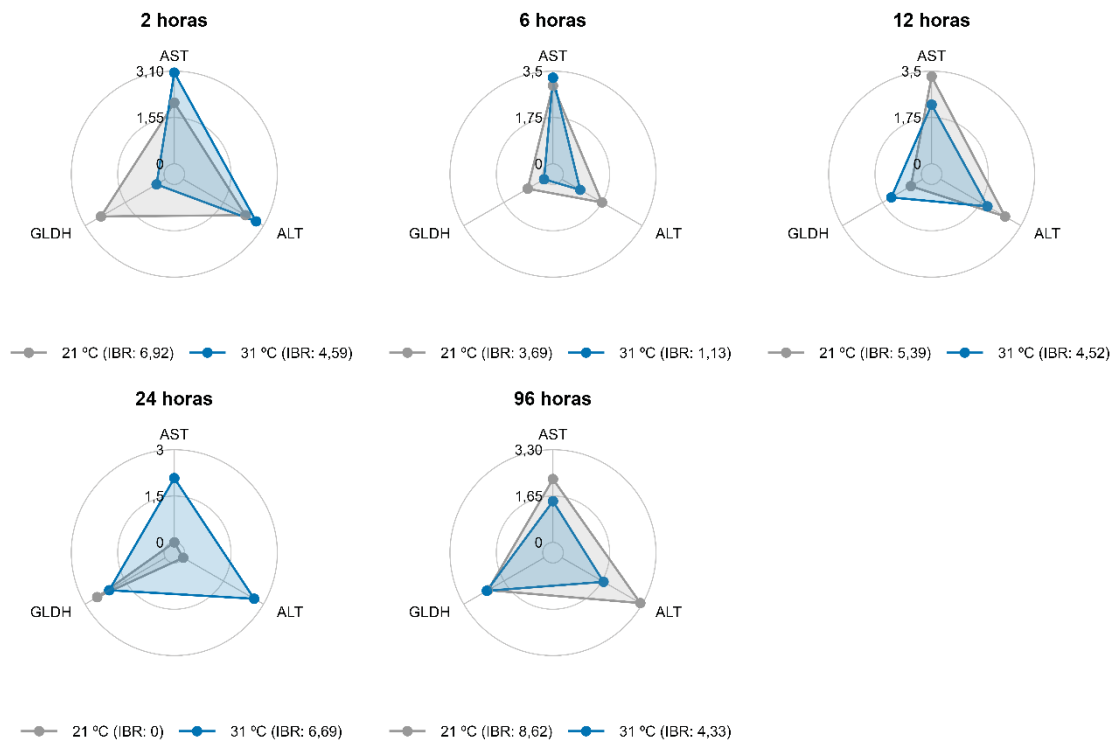
NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) do sistema ATP do músculo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. Lactato, LDH: lactato desidrogenase e CK: creatina quinase.

FIGURA 32: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DO ENCÉFALO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) do sistema ATP do encéfalo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase e GLDH: glutamato desidrogenase.

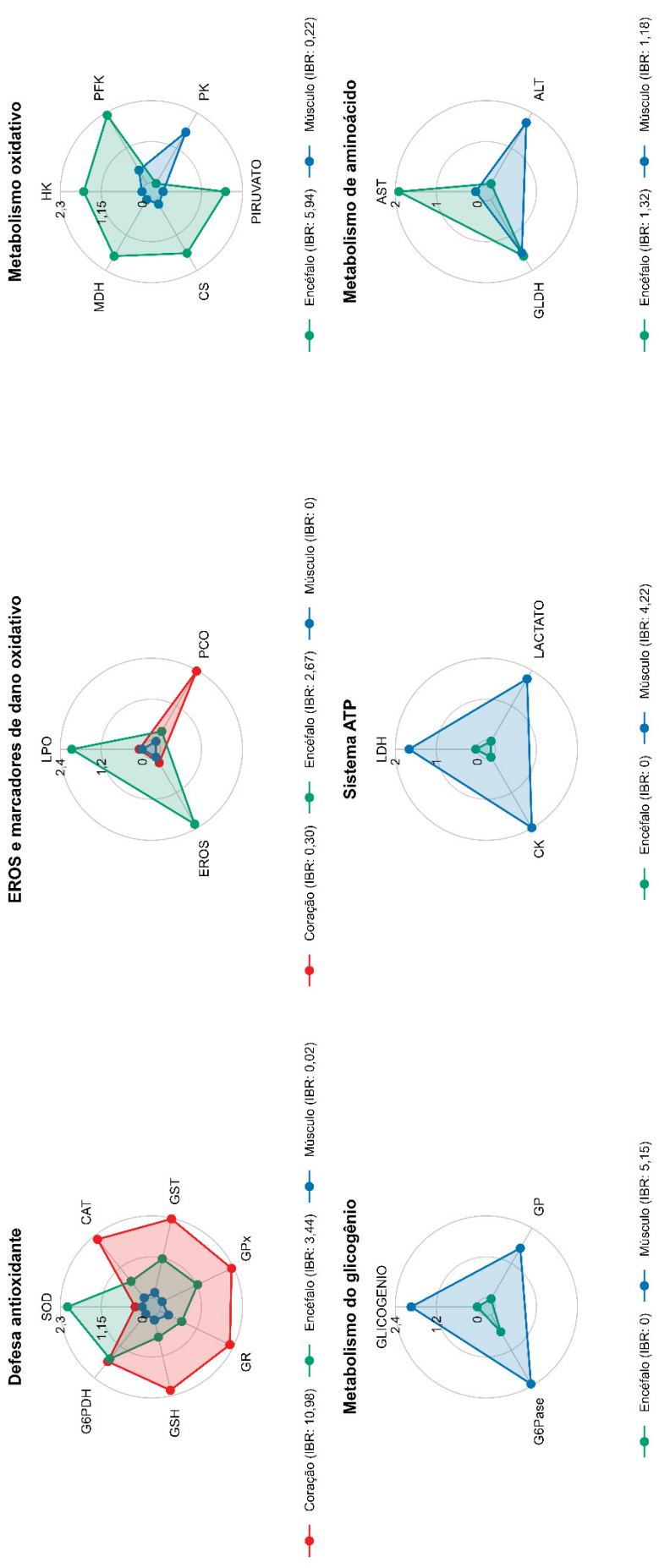
FIGURA 33: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS DO MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.



NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) do sistema ATP do músculo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase e GLDH: glutamato desidrogenase.

A integração de todos os tempos visando comparar as respostas entre os órgãos, indicou que o coração apresentou valor aumentado de IBR para a defesa antioxidante (IBR:10,98); o encéfalo para EROs e marcadores de dano oxidativo (IBR:2,67); metabolismo oxidativo (IBR:5,94) e metabolismo de aminoácidos (IBR:1,32) e; o músculo para o metabolismo de glicogênio (IBR:5,15) e sistema de ATP (IBR:4,22) (Figura 34). Os valores de IBR do grupo controle, experimental e de integração dos órgãos, conforme todas as categorias, foram sumarizados na figura 35 e na figura 36

FIGURA 34: RESPOSTA INTEGRADA DOS BIOMARCADORES (IBR) DA DEFESA ANTIOXIDANTE, EROS E MARCADORES DE DANO OXIDATIVO, METABOLISMO OXIDATIVO, METABOLISMO DO GLICOGÊNIO, SISTEMA ATP E METABOLISMO DE AMINOÁCIDO DO CORAÇÃO, ENCEFALO E MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.




















NOTA: Valores da Resposta Integrada dos Biomarcadores (IBR) da defesa antioxidante, EROS e marcadores de dano oxidativo, metabolismo oxidativo, metabolismo do glicogênio, sistema ATP e metabolismo de aminoácido do coração, encéfalo e músculo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas. A análise foi realizada com a integração de todos os tempos para comparar as respostas geradas entre os três órgãos.

FIGURA 35: RESUMO DOS VALORES GERAIS DAS CATEGORIAS DE IBR DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS.

ÓRGÃOS	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	CATEGORIAS DE IBR PARA O ESTRESSE TÉRMICO DE 31 °C								
		DEFESA ANTIOXIDANTE	EROS E MARCADORES DE DANO	METABOLISMO OXIDATIVO	METABOLISMO DO GLICOGÊNIO	SISTEMA DE ATP	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS			
<div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: center;"> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 5px;"> Coração</div> <div style="display: flex; align-items: center; margin-bottom: 5px;"> Encéfalo</div> <div style="display: flex; align-items: center;"> Músculo</div> </div>	2H									
	6H									
	12H									
	24H									
	96H									

NOTA: Os peixes esquemáticos coloridos destacam os tempos que apresentaram maior mobilização da categoria de IBR dos órgãos em relação ao grupo controle (cinza claro).

FIGURA 36: RESUMO DOS VALORES GERAIS DAS CATEGORIAS DE IBR DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.

CATEGORIAS DE IBR PARA O ESTRESSE TÉRMICO DE 31 °C						
ÓRGÃOS	DEFESA ANTIOXIDANTE	EROS E MARCADORES DE DANO	METABOLISMO OXIDATIVO	METABOLISMO DO GLICOGÊNIO	SISTEMA DE ATP	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
 Coração  Encéfalo  Músculo	  	  	 	 	 	 

NOTA: A análise contém a integração de todos os tempos (2, 6, 12, 24 e 96 horas de exposição) para comparar as respostas geradas entre os três órgãos. Os peixes esquemáticos coloridos destacam a categoria que apresentou maior mobilização do órgão para o estresse térmico de 31°C.

Ao avaliar a sensibilidade dos órgãos sob o efeito do estresse térmico de 31°C, o encéfalo apresentou maior taxa de variação de IBR para a temperatura de 31°C em 6, 24 e 96 horas, seguido do coração em 24 horas e músculo em 96 horas. O que indicou o encéfalo como o órgão mais sensível (Tabela 3).

A temperatura de 31°C também afetou a higidez dos peixes em todos os tempos analisados ($p < 0,001$), conforme o fator de condição, quando comparado com a média geral dos controles. Mas não foram encontradas diferenças estatísticas na exposição de 6 horas em relação a exposição de 2 ($p = 0,76$) e 96 horas ($p = 0,45$) (Tabela 4).

TABELA 3: SENSIBILIDADE DO CORAÇÃO, ENCÉFALO E MÚSCULO DE *Rhamdia voulezi* SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C DURANTE 2, 6, 12, 24 E 96 HORAS DE EXPOSIÇÃO.

SENSIBILIDADE DOS ÓRGÃOS DURANTE OS TEMPOS DE EXPOSIÇÃO A 31°C							
ÓRGÃOS	TEMPO DE EXPOSIÇÃO	DEFESA ANTIOXIDANTE	EROS E MARCADORES DE DANO	METABOLISMO OXIDATIVO	METABOLISMO DO GLICOGÊNIO	SISTEMA DE ATP	METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS
Coração	2H	-79	-83	NA	NA	NA	NA
	6H	176	-7	NA	NA	NA	NA
	12H	-8	-75	NA	NA	NA	NA
	24H	705	39	NA	NA	NA	NA
	96H	79	115	NA	NA	NA	NA
Encéfalo	2H	-15	-89	-90	-38	-3	-16
	6H	50	88	239	-24	838	-100
	12H	-65	281	182	-59	-46	15
	24H	153	0	315	0	250	2300
	96H	-26	-85	93	118	21	1237
Músculo	2H	185	-29	15	0	0	34
	6H	-38	-100	163	-46	-13	-69
	12H	-47	4	154	79	-38	-16
	24H	212	80	106	12	10	0
	96H	478	-96	-16	-40	-23	-50

NOTA: Sensibilidade do encéfalo, coração e músculo de *Rhamdia voulezi* exposto ao estresse térmico de 31°C calculado através da taxa de variação do IBR e expresso em porcentagem (%). As porcentagens negativas correspondem à diminuição dos valores de IBR com o tempo de exposição à temperatura. NA – não houve amostra suficiente.

TABELA 4: DADOS BIOLÓGICOS DE *Rhamdia voulezi* APÓS SER SUBMETIDO AO ESTRESSE TÉRMICO AGUDO DE 31°C.

PARÂMETROS	CONDIÇÃO DE SAÚDE DE <i>Rhamdia voulezi</i> SUBMETIDO A 31°C					
	CONTROLE	2H	6H	12H	24H	96H
Massa corporal (g)	24,68 ± 0,71	26,90 ± 1,05	24,03 ± 0,88	24,63 ± 1,26	26,00 ± 0,84	25,66 ± 1,64
Comprimento total (cm)	140,81 ± 12,58	174,54 ± 25,19	123,35 ± 15,62	142,66 ± 26,47	153,14 ± 16,14	156,29 ± 27,13
Fator de condição (K)	0,00343 ± 0,00004 ^a	0,00475 ± 0,00010 ^{be}	0,00596 ± 0,00007 ^b	0,01575 ± 0,00116 ^c	0,00279 ± 0,00007 ^d	0,00688 ± 0,00019 ^b

NOTA: Os valores do fator de condição (K) e dos parâmetros bióticos de *Rhamdia voulezi* foram apresentados como média ± erro padrão. As letras indicam diferenças significativas entre o controle, tratamento e os tempos de exposição.

6. DISCUSSÃO

Os peixes habitam ambientes aquáticos termicamente diversos e apresentam tolerância térmica que varia entre $-2,5^{\circ}\text{C}$ a $+44^{\circ}\text{C}$ (BENNETT; BEITINGER, 1997; SOMERO; DEVRIES, 1967). Por serem em sua maioria ectotérmicos, são fisiologicamente suscetíveis a sofrer influência direta da temperatura na determinação das taxas metabólicas (JOHNSTON; DUNN, 1987; RITCHIE; FRIESEN, 2022).

Deste modo, os resultados encontrados no comportamento enzimático de alguns marcadores bioquímicos entre os tempos de exposição podem ter associação com o ritmo circadiano e/ou variabilidade individual. Pois há uma maior expressão dos genes enzimáticos num determinado período do dia. O que explica o aumento ou a diminuição da atividade enzimática ou dos níveis de alguns marcadores bioquímicos durante o controle homeostático (CHADWICK; NISLOW; MCCORMICK, 2015; DA SILVA REIS *et al.*, 2019; FADHLAOU; COUTURE, 2016; MACEINA; SAMMONS, 2006; MACHADO *et al.*, 2014; NAVARRO-GUILLÉN; MOYANO; YÚFERA, 2015; SOLOVYEV; GISBERT, 2022; VERA; MIGAUD, 2016). Além do mais, nas reações mediadas por enzimas, o aumento da temperatura aumenta a taxa catalítica das enzimas durante seu estado ativo, da qual aumenta a energia cinética para gerar a sensibilidade térmica (KAZMI *et al.*, 2022).

6.1 Influência do estresse térmico agudo de 31°C sob a fisiologia dos órgãos

No encéfalo, as respostas ao estresse são desencadeadas pelo sistema nervoso central. Por ser um órgão vulnerável às flutuações térmicas e com maior atividade metabólica nos peixes. A alta temperatura pode alterar a dinâmica entre suprimento de substrato e vias metabólicas energéticas do órgão, bem como o sistema de defesa antioxidante (PRZEPIURA *et al.*, 2019; RATKO *et al.*, 2022; TOPAL *et al.*, 2021).

Em *R. voulezi*, a diminuição da atividade de SOD do encéfalo em 2 horas pode indicar que houve consumo da SOD no momento de neutralizar os radicais superóxidos formados para melhorar a capacidade antioxidante do encéfalo, conforme proposto por Dong *et al.* (2022). Porém outros autores acreditam que a diminuição da SOD pode ser devido ao excesso de H_2O_2 , acúmulo de EROs,

produção de oxidantes ou indicativo de danos nos mecanismos antioxidantes (LI *et al.*, 2011; POOPAL *et al.*, 2017; SAGLAM *et al.*, 2014; VUTUKURU *et al.*, 2006). Isso pode fornecer evidências de que a alta temperatura pode alterar a fisiologia dos órgãos dos peixes e corroborar com os estudos de Machado *et al.* (2014) que constataram a mesma observação no fígado do peixe antártico *Notothernia coriiceps* exposto a 0 e 8°C durante 1, 3 e 6 dias. Enquanto que Topal *et al.* (2021) verificaram que os níveis de expressão de mRNA de SOD foram diminuídas no encéfalo de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostas a 15°C, 20°C e 25°C durante 2, 4, 6 e 8 horas de exposição.

Já a redução da atividade de HK, que atua no estágio inicial da via glicolítica ao converter glicose em glicose-6-fosfato através da fosforilação por ATP, assim como da enzima CK, que catalisa a reação de conversão da creatina em fosfocreatina para ATP, demonstraram que o metabolismo energético cerebral de *R. voulezi* em 2 horas pode ser adequado pelas células neuronais, gliais e astrocitárias (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; HEMMER; WALLIMANN, 1993). Posto que os ajustes e a necessidade energética do encéfalo são acompanhados de forma invariável pelas mudanças no fluxo sanguíneo e na utilização da glicose (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; BRANDÃO *et al.*, 2022; HEMMER; WALLIMANN, 1993). A diminuição da HK no encéfalo de salmão do Atlântico e de truta arco-íris privados de alimentos sugeriram que uma possível queda de glicose exógena pode provocar redução nos níveis de glicogênio cerebral nas células da glia (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; SOENGAS; ALDEGUNDE, 2002).

Além do mais, o aumento de temperatura da água pode diminuir o quantitativo de oxigênio solubilizado e causar hipóxia no encéfalo (PÖRTNER, 2001). Segundo Farhat *et al.* (2021), *Carassius auratus* (peixe dourado) aclimatados à hipóxia crônica apresentaram a atividade de HK reduzida e demonstraram que o encéfalo promove supressão metabólica no intuito de ajustar o suprimento glicolítico de piruvato a partir da redução de Na⁺/K⁺-ATPase cerebral e da regulação negativa da citocromo c oxidase diante da diminuição da densidade mitocondrial.

A partir disso, a ATPase que também depende do ATP produzido pelo circuito creatina/fosfocreatina para controlar a homeostase energética cerebral pode ser afetado pela redução da atividade de Na⁺/K⁺-ATPase e reduzir a

atividade de CK no tecido cerebral conforme observado por Souza *et al.* (2019) em *Rhamdia quelen* que foram suplementados por aflatoxina B1. Isso faz com que as células cerebrais sofram injúrias quanto ao gradiente eletroquímico das membranas, volume celular, manutenção do potencial de membrana e dos neurotransmissores excitatórios e celulares (DE LORES ARNAIZ; ORDIERES, 2014; SOUZA *et al.*, 2019; STREIJGER *et al.*, 2010) devido às anormalidades comportamentais já conhecidas e descritas por Streijger *et al.* (2010).

Por outro lado, estudos demonstraram que a diminuição da CK é mediada pela oxidação de lipídios, proteínas e grupos tiol, bem como pela redução da capacidade antioxidante global do encéfalo (GLASER *et al.*, 2010; KOUFEN; STARK, 2000; SOUZA, *et al.*, 2019). De acordo com Koufen; Stark (2000), o grupo tiol é presente no sítio catalítico da CK e exerce papel na proteção contra a inativação de radicais livres para que a atividade enzimática da CK seja adequada.

Em 6 horas, o aumento da atividade da SOD ao indicar que a defesa antioxidante do encéfalo de *R. voulezi* foi mobilizada para neutralizar o radical superóxido (DRINGEN, 2000; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2022; RAJU *et al.*, 2022). Sugeriu que houve uma elevação do sistema antioxidante no combate aos danos associados às células neuronais durante a conversão de O_2^- em H_2O_2 e oxigênio molecular (CUI *et al.*, 2020; DRINGEN, 2000; JOY *et al.*, 2017; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2022). Isso pode ser justificado por Joy *et al.* (2017) ao sugerir que o encéfalo de *Etroplus suratensis* submetido ao estresse térmico gradual de temperatura a 38°C foi capaz de regular a atividade da SOD de forma positiva.

Em 12 horas, o aumento da incidência de MDH no ciclo de Krebs sugeriu que o encéfalo de *R. voulezi* necessitou de energia. Isso pode indicar que os níveis globais de ATP na mitocôndria encontravam-se elevados. O que comprova a necessidade do encéfalo em suprir sua demanda energética para lidar com o estresse sofrido (NAGARJUNA *et al.*, 2019; NAGESWARI *et al.*, 2022). Resultados semelhantes a isso foram relatados por Resende *et al.* (2022) em brânquias de *Psalidodon bifasciatus* submetidas a temperatura de 31°C e Kumar *et al.* (2022) em músculo e fígado de *Labeo rohita* expostos a partículas de superparamagnéticas de óxido de ferro.

Em 24 horas, o aumento da GPx no encéfalo demonstrou a capacidade antioxidante das células astrogliais em eliminar H₂O₂. Isso se dá pela alta afinidade e eficiência da GPx em neutralizar H₂O₂ mesmo que em pequenas quantidades (CUI *et al.*, 2020; KANG *et al.*, 2005). Dado que a família das enzimas glutatônicas detoxifica EROs e protegem os peixes dos danos oxidativos em resposta a flutuações de temperaturas (DO *et al.*, 2019; HEISE *et al.*, 2006). Ratko *et al.* (2022) também encontraram aumento da atividade de GPx no encéfalo de *Astyanax lacustris* submetido a temperatura de 31°C.

Quanto ao controle térmico da excitabilidade elétrica do coração dos peixes para adequar as funções cardíacas de acordo com as mudanças sazonais regulares e agudas de temperatura (VORNANEN, 2016), estudos apontam que tempos iniciais ao aumento de temperatura causam maior demanda da função cardíaca e circulatória do sangue para o ajuste do dióxido de carbono, que refletem nas taxas de abertura e fechamento dos canais iônicos e nas taxas de bombeamento e transporte (GAMPERL; THOMAS; SYME, 2022; KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976; RIYANTO; MAWARDI; KHOERUNNISA, 2022; VORNANEN, 2016). À medida que as exposições crônicas de temperatura remodelam todos os aspectos da função cardíaca (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976; RIYANTO; MAWARDI; KHOERUNNISA, 2022; VORNANEN, 2016).

A redução da PCO no coração de *R. voulezi* em 2 horas pode ser explicada pela diminuição dependente de tiol no conteúdo de carbonila, descrito principalmente em componentes biológicos termolábil. Dado que a glutaredoxina-1 (Grx1) pode atuar como catalisador direto na descarbonilação de proteína primária que ocorre em moléculas de peroxirredoxina, com o objetivo de regular a sinalização celular e o mecanismo de sinalização redox através da conversão de um aminoácido em outro ou da inativação transitória das moléculas de peroxirredoxina, que reduzem H₂O₂ na obtenção de respostas para os ajustes fino da sinalização de EROs (SUZUKI, 2017; WONG *et al.*, 2010, 2013). Madeira *et al.* (2016) afirmaram encontrar redução de PCO em larvas de *Sparus aurata* exposta a 24°C diante a uma simulação do efeito de mudança global, enquanto que Resende *et al.* (2022) observaram reduções em brânquias de *Psalidodon bifasciatus* submetida a temperatura 31°C.

No músculo, estudos apontam que o estresse térmico pode influenciar diretamente o desempenho natatório dos peixes, bem como as propriedades

contráteis das fibras musculares, atividade enzimática, qualidade e ordem de recrutamento das fibras e dinâmica metabólica que são ajustadas durante as mudanças de temperaturas (GUDERLEY; BLIER, 1988; OCHIAI; OZAWA, 2020).

Assim, a diminuição da atividade de G6PDH em 12 horas sugeriu que a função lipogênica do músculo de *R. voulezi* pode ter sido diminuída, bem como o fornecimento de NADPH (YENGGOKPAM *et al.*, 2022). Isso pode indicar prejuízos da reserva e massa muscular de *R. voulezi* que foram explicadas pela diminuição da atividade da AST no citoplasma muscular neste mesmo tempo de exposição (SOARES FILHO *et al.*, 2012). Segundo Kumar *et al.* (2011), o fígado e o músculo de *Labeo rohita* submetido a alta temperatura e alimentado com proteína dietética de 20% e 40% também apresentaram diminuições na atividade de G6PDH e AST. Enquanto que Pereira *et al.* (2022) relataram diminuição da atividade de AST no músculo de *Astyanax lacustris* exposto por 96 horas a temperatura de 31°C. Mostram que a energia fornecida em condição de alta temperatura pode ser dependente de aminoácidos ao invés do catabolismo de carboidratos que ocorre na via das pentoses (KUMAR *et al.*, 2011)

Por outro lado, o aumento da atividade da CAT em 24 horas revelou a capacidade antioxidante do músculo de *R. voulezi* em proteger os miócitos dos efeitos deletérios das EROs. O qual de forma indireta garante o crescimento e a qualidade das fibras musculares (CAI *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2022), bem como o aumento da reserva de glicogênio em 96 horas de exposição, para manter as contrações musculares de *R. voulezi* durante as condições metabólicas extenuantes juntamente com a ressíntese de ATP (OLSEN *et al.*, 2022). São corroborados por Madeira *et al.* (2013) ao afirmar que a influência da alta temperatura aumentou a atividade de CAT do músculo dos peixes estuarinos *Liza ramada* e *Dicentrarchus labrax* e, por Joy *et al.* (2017) em *Etroplus suratensis* submetido a 38°C. Enquanto que Van; Hardewig; Holker (2005) verificaram maior conteúdo de glicogênio muscular de *Rutilus rutilus* aclimatados a 27°C e 20°C em comparação aqueles expostos a 4°C.

6.2 Caracterização dos marcadores antioxidantes e metabólicos de *Rhamdia voulezi* a 31°C

Os resultados encontrados na separação dos marcadores antioxidantes e metabólicos do encéfalo, coração e músculo de *R. voulezi* nas PCAs e nas PERMANOVA podem ser explicados pelos mecanismos citoprotetores e pela necessidade energética de cada órgão.

Os marcadores de estresse oxidativo SOD, LPO e EROs associados com o encéfalo corrobora a teoria deste órgão ser suscetível a danos oxidativos e vulnerável a EROs (LUSHCHAK *et al.*, 2009). Visto que a maior parte do metabolismo oxidativo do encéfalo ocorre nos neurônios e, embora essas células tenham o mecanismo de defesa limitada contra o estresse oxidativo (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011). Estudos indicam que danos oxidativos no encéfalo podem diminuir a função cognitiva e ocasionar perda de comportamento e tempos de resposta durante os processos de termorregulação, devido à alta presença de ácidos graxos insaturados presentes nas membranas (FORSTER *et al.*, 1996; RITCHIE; FRIESEN, 2022). O qual se torna propenso a lipoperoxidação e com a necessidade de um sistema antioxidante altamente eficiente para desempenhar as funções vitais do corpo, bem como de percepção e codificação dos sinais neuroendócrinos durante a mudança de temperatura (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011; LUSHCHAK *et al.*, 2009; PRZEPIURA *et al.*, 2019).

Diante disso, a associação dos marcadores CAT, GPx, GR, GSH, PCO G6PDH e GST no coração de *R. voulezi* caracterizaram a necessidade destas enzimas em remodelar todas as funções cardíacas para responder ao estressor fisiológico (KEEN *et al.*, 2016). Que ocorre por meio de mecanismos bioquímicos, fisiológicos e biomecânicos na tentativa de preservar as funções cardíacas de transporte de oxigênio, substratos e subprodutos metabólicos de todo o corpo durante os processos biológicos ativos (KEEN *et al.*, 2016).

Agora a não associação específica do músculo por nenhum marcador antioxidante sugeriu uma menor resposta das enzimas antioxidantes devido ao processo de adaptação muscular dos peixes para condições extremas do ambiente aquático. Isso se dá pela plasticidade do músculo em poder desempenhar forças necessárias para a locomoção ou forrageamento durante

as diferenças de tempo e velocidade (DR. DEV BRAT MISHRA, 2022; OLSEN *et al.*, 2022).

Assim, os marcadores metabólicos AST, CS, HK, MDH e piruvato no encéfalo explicam o alto requisito de energia deste órgão para as funções cerebrais que correspondem a neurotransmissão glutamatérgica e a utilização de glicose como principal fonte de energia (BÉLANGER; ALLAMAN; MAGISTRETTI, 2011). À medida que a ALT, lactato, LDH, GLDH, GP, glicogênio, PK, G6Pase, PFK e CK ao associar com o músculo indicam a necessidade do metabolismo anaeróbico em fornecer ATP, bem como a fosforilação enzimática de carboidratos para atender as demandas energéticas sob o estímulo ambiental na garantia da sobrevivência (OLSEN *et al.*, 2022).

6.3 Resposta integrada dos biomarcadores (IBR), sensibilidade térmica e condição corporal em *R. voulezi* para a habilidade de aclimação a 31°C

Os resultados de IBR, sensibilidade térmica e fator de condição demonstraram que os ajustes fisiológicos e metabólicos de cada órgão em *R. voulezi* são dependentes do tempo de exposição e da sensibilidade dos mesmos. Ainda que suas características sejam determinadas pelo agente estressor, vulnerabilidade e plasticidade do indivíduo em suportar as mudanças ocasionadas no ambiente (MADEIRA; LEAL; *et al.*, 2018; PARISI; FRANKLIN; CRAMP, 2022).

A habilidade de aclimação de *R. voulezi* a temperatura de 31°C foi dependente dos tempos de exposição e das respostas encontradas nos órgãos para o valor aumentado de IBR conforme considerado por Campos *et al.* (2019) e Madeira; Mendonça *et al.* (2018). Mesmo que haja diferenças na origem e função biológica dos marcadores e tecidos. A sensibilidade dos tecidos a temperatura de 31°C demonstrou induzir um efeito hormético em *R. voulezi* ao definir a relação não linear entre estressor e condicionamento metabólico (CALABRESE, 2013; RITCHIE; FRIESEN, 2022). Posto que os efeitos experimentais de aclimação, sejam estes agudos ou crônicos, ao induzir respostas distintas nos ectotérmicos, destacam expressões filogenéticas de adaptação térmica que são desenvolvidas ao longo do ciclo de vida do indivíduo para a otimização das funções corpóreas, fisiológicas e comportamentais ao nicho ambiental (RITCHIE; FRIESEN, 2022).

A categorização do IBR com base nos marcadores de estresse oxidativo e metabólicos revelou a capacidade de *R. voulezi* em mobilizar e sustentar as necessidades metabólicas através da capacidade de oxigenação e alocação/uso de energia para a produção de ATP dos tecidos. Do qual foram apontados pelas taxas de variação do IBR do encéfalo, coração e músculo respectivamente para a suscetibilidade e sensibilidade térmica. Além disso, o alto percentual de sensibilidade indicado no encéfalo demonstrou a produção de calor intraencefálico que ocorre neste órgão a partir de flutuações mínimas de temperatura que foram sentidas durante sua exposição a temperatura de 31°C em relação ao coração e músculo. Dado que o sangue do encéfalo é mais frio que o próprio encéfalo, as temperaturas no encéfalo tendem aumentar rapidamente, numa escala bem maior do que o sangue arterial em resposta a todos os desafios (KIYATKIN, 2010; RITCHIE; FRIESEN, 2022).

Os valores aumentados de IBR descritos nas categorias para cada órgão e tempo de exposição para a temperatura de 31°C sugeriram que os espécimes de *R. voulezi* sofreram estresse térmico e corroborou com os estudos que utilizaram faixas de temperaturas, espécies de peixes e tempos de exposição diferentes (CAMPOS *et al.*, 2019; DAI *et al.*, 2022; DIAS *et al.*, 2020; FORGATI *et al.*, 2017; KANDALSKI *et al.*, 2019; MADEIRA *et al.*, 2016; MADEIRA; LEAL *et al.*, 2018; MADEIRA; MENDONÇA *et al.*, 2018; MADEIRA *et al.*, 2013; MADEIRA *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2022; PRZEPIURA *et al.*, 2019; RATKO *et al.*, 2022; RESENDE *et al.*, 2022; SCHLEGER *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2018).

Perante a isso, o fator de condição ao demonstrar afetado pela temperatura de 31°C durante os cinco tempos de exposição. Explica a capacidade de aclimação térmica dos indivíduos de *R. voulezi* diante das mudanças de temperatura e da variabilidade térmica de exposição. Que são muitas vezes caracterizadas pelas diferenças de comportamento homeostáticos dos peixes sob a influência da poluição térmica dos rios através do declínio das respostas biológicas que mais tarde impactam no desenvolvimento corporal ou na sobrevivência da espécie (CAMPOS *et al.*, 2019; ILHA *et al.*, 2018; PARISI; FRANKLIN; CRAMP, 2022). Esse resultado também apresenta uma possível avaliação das condições de temperatura da bacia do rio Iguaçu, bem como do estado metabólico dos peixes quando acometidos pela poluição térmica das

usinas de energia instaladas neste rio, como da consequente perda hídrica ocasionada pelas ações antrópicas (BAUMGARTNER *et al.*, 2012). Visto que *R. voulezi* vive sob regime térmico do afluente médio Iguaçu, local de amostragem, que possui temperatura inferior a 22°C na época mais quente do ano (ALVARES *et al.*, 2013; BAUMGARTNER *et al.*, 2012).

7. CONCLUSÕES

Neste estudo, os resultados demonstraram que a temperatura de 31°C teve influência sobre o estado metabólico e oxidativo do encéfalo, coração e músculo de *R. voulezi* durante 2, 6, 12, 24 e 96 horas de exposição após a aclimação de 21°C.

As alterações encontradas na atividade de SOD, HK, CK, GPx e MDH no encéfalo, assim como a integração dos biomarcadores SOD, LPO, EROs, AST, CS, HK, MDH e piruvato na PCA, sugeriram que o encéfalo de *R. voulezi* possui elevada demanda metabólica sob a condição de 31°C para controlar a atividade neuronal e excitatória que ocorrem durante as variações de temperatura. Com um eficiente sistema de defesa antioxidante que protege as membranas de lipoperoxidação.

No coração, a PCO e a associação dos marcadores CAT, GPx, GR, GSH, PCO G6PDH e GST na PCA indicaram que as funções cardíacas de *R. voulezi* foram reajustadas com a temperatura de 31°C a partir da eliminação das EROs e regulação da sinalização celular e dos mecanismos de sinalização redox já conhecidos na literatura, com intuito de fornecer maior quantidade de oxigênio aos tecidos.

Agora as mudanças encontradas na G6PDH, AST, CAT e glicogênio do músculo de *R. voulezi*, assim como a associação dos marcadores ALT, lactato, LDH, GLDH, GP, glicogênio, PK, G6Pase, PFK e CK na PCA. Revelaram que a qualidade das fibras musculares de *R. voulezi* foi mantida pela defesa oxidante sob a condição de 31° C, bem como o fornecimento de energia.

Os dados de IBR e sensibilidade térmica demonstraram que *R. voulezi* possui habilidade de aclimação a temperatura de 31°C após ser aclimatado a 21°C, através de diferentes estratégias metabólicas que foram estabelecidas durante as abordagens biológicas encontradas nos tempos de exposição deste estudo e no fator condição ao fornecer um conhecimento prévio sobre a

qualidade de higidez de *R. voulezi* na bacia hidrográfica do rio Iguaçu e de seus mecanismos de ajuste metabólico e fisiológico frente a exposição do estresse térmico agudo simulados sob o efeito da temperatura de 31°C.

8. REFERÊNCIAS

ABDI, R.; ENDRENY, T. A River Temperature Model to Assist Managers in Identifying Thermal Pollution Causes and Solutions. **Water**, vol. 11, nº 5, p. 1060, 22 maio 2019. <https://doi.org/10.3390/w11051060>.

AEBI, H. Catalase in vitro. [S. l.: s. n.], 1984. p. 121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3).

ALVARES, C. A.; STAPE, J. L.; SENTELHAS, P. C.; DE MORAES GONÇALVES, J. L.; SPAROVEK, G. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, vol. 22, nº 6, p. 711–728, 1 dez. 2013. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. de; SOUZA, R. B. de; SANTOS, S. A. dos; ANDRADE, D. R. de. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, vol. 31, nº 1, p. 60–68, fev. 2005. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132005000100011>.

ANTONIETTA CIARDIELLO, M.; 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 Enzymology**, vol. 1250, nº 1, p. 76–82, jul. 1995. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00046-W](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00046-W).

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**, vol. 342, nº 2, p. 213–225, abr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2006.09.005>.

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

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. de A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, vol. 44, nº 3, p. 453–460, mar. 2014. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782014000300011>.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, vol. 29, nº 1, p. 113–123, fev. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.

BAUMGARTNER, G.; PAVANELLI, C. S.; BAUMGARTNER, D.; BIFI, A. G.; DEBONA, T.; FRANA, V. A. **Peixes do baixo rio Iguaçu**. [S. l.]: EDUEM, 2012. <https://doi.org/10.7476/9788576285861>.

BÉLANGER, M.; ALLAMAN, I.; MAGISTRETTI, P. J. Brain Energy Metabolism: Focus on Astrocyte-Neuron Metabolic Cooperation. **Cell Metabolism**, vol. 14, nº 6, p. 724–738, dez. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.08.016>.

BENNETT, W. A.; BEITINGER, T. L. Temperature Tolerance of the Sheepshead Minnow, *Cyprinodon variegatus*. **Copeia**, vol. 1997, nº 1, p. 77–87, 18 fev. 1997. <https://doi.org/10.2307/1447842>.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L.; GATTO, G. J. **Bioquímica**. 7º ed. Rio de Janeiro: [s. n.], 2014.

BEVITÓRIO, L. Z.; DA SILVA, N. G.; PIROVANI, J. C. M.; MARQUES, J. A.; VIEIRA, C. E. D.; ZEBRAL, Y. D.; DAMASCENO, E. M.; LOPES, L. L. R.; DE SANT'ANA, L. P.; MARUBE, L. C.; DA COSTA, S. R.; MARTINS, C. D. M. G.; SANDRINI, J. Z.; SOUZA, M. M.; BIANCHINI, A.; DO VALE-OLIVEIRA, M. Impacts of tailings of Fundão dam (Brazil) rupture on marine fish: Metals bioaccumulation and physiological responses. **Marine Pollution Bulletin**, vol. 177, p. 1–15, abr. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.113511>.

BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Bol. Tec. CEPTA**, vol. 10, p. 53–60, 1997.

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

BOBAT, A. Thermal Pollution Caused by Hydropower Plants. [S. l.: s. n.], 2015. p. 19–32. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16024-5_2.

BOKOV, A.; CHAUDHURI, A.; RICHARDSON, A. The role of oxidative damage and stress in aging. **Mechanisms of Ageing and Development**, vol. 125, nº 10–11, p. 811–826, out. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2004.07.009>.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, vol. 72, nº 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.

BRANDÃO, F. R.; DUNCAN, W. P.; FARIAS, C. F. S.; DE MELO SOUZA, D. C.; DE OLIVEIRA, M. I. B.; ROCHA, M. J. S.; MONTEIRO, P. C.; MAJOLO, C.; CHAVES, F. C. M.; DE ALMEIDA O'SULLIVAN, F. L.; CHAGAS, E. C. Essential oils of *Lippia sidoides* and *Mentha piperita* as reducers of stress during the transport of *Colossoma macropomum*. **Aquaculture**, vol. 560, p. 738515, nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738515>.

BRASIL. Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005. **Ministério do Meio Ambiente**, 2022. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=2747>. Acessado on: 20 ago. 2022.

BUDANOV, A. v.; LEE, J. H.; KARIN, M. Stressin' Sestrins take an aging fight. **EMBO Molecular Medicine**, vol. 2, n° 10, p. 388–400, 28 out. 2010. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000097>.

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

CAI, M.; CHU, W.; WANG, J.; SHAO, C.; HU, Y.; CHE, C.; ZHANG, J.; DAI, J.; HU, Y. Intervention of taurine on fatty acid profiles, oxidative injury and autophagy status in the muscle of rice field eel (*Monopterus albus*) fed oxidized fish oil. **Aquaculture**, vol. 551, p. 737904, mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737904>.

CALABRESE, E. J. Hormetic mechanisms. **Critical Reviews in Toxicology**, vol. 43, n° 7, p. 580–606, 23 ago. 2013. <https://doi.org/10.3109/10408444.2013.808172>.

CALIBRI. Lorraine University. 2022. Disponível em: <https://lic-univ-lorraine.shinyapps.io/calibri/>.

CAMPOS, D. F.; BRAZ-MOTA, S.; VAL, A. L.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Predicting thermal sensitivity of three Amazon fishes exposed to climate change scenarios. **Ecological Indicators**, vol. 101, p. 533–540, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.01.051>.

CHADWICK, J. G.; NISLOW, K. H.; MCCORMICK, S. D. Thermal onset of cellular and endocrine stress responses correspond to ecological limits in brook trout, an iconic cold-water fish. **Conservation Physiology**, vol. 3, n° 1, p. 1–12, 2015. <https://doi.org/10.1093/conphys/cov017>.

CHANG, J. C.-H.; WU, S.-M.; TSENG, Y.-C.; LEE, Y.-C.; BABA, O.; HWANG, P.-P. Regulation of glycogen metabolism in gills and liver of the euryhaline tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during acclimation to seawater. **Journal of Experimental Biology**, vol. 210, n° 19, p. 3494–3504, 1 out. 2007. <https://doi.org/10.1242/jeb.007146>.

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

CHILDRESS, J. J.; SOMERO, G. N. Depth-related enzymic activities in muscle, brain and heart of deep-living pelagic marine teleosts. **Marine Biology**, vol. 52, n° 3, p. 273–283, 1979. <https://doi.org/10.1007/BF00398141>.

CHIPPARI-GOMES, A. R.; GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B. Lethal Temperatures for Silver Catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings. **Journal of**

Applied Aquaculture, vol. 9, nº 4, p. 11–21, dez. 1999. https://doi.org/10.1300/J028v09n04_02.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, vol. 31, nº 7, p. 1820–1830, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700038>.

COTINGUIBA, G. G.; SILVA, J. R. do N.; AZEVEDO, R. R. de S.; ROCHA, T. J. M.; SANTOS, A. F. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, vol. 15, nº 3, p. 231–237, 2013.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G.; GALBRAITH, R. A.; GALBRAITH, G. M. P.; BUSE, M. G. The Inhibition of Islet Superoxide Dismutase by Diabetogenic Drugs. **Diabetes**, vol. 30, nº 3, p. 235–241, 1 mar. 1981. <https://doi.org/10.2337/diab.30.3.235>.

CUI, Y.; HOU, Z.; REN, Y.; MEN, X.; ZHENG, B.; LIU, P.; XIA, B. Effects of aerial exposure on oxidative stress, antioxidant and non-specific immune responses of juvenile sea cucumber *Apostichopus japonicus* under low temperature. **Fish & Shellfish Immunology**, vol. 101, p. 58–65, jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.03.050>.

CURRIE, S.; TUFTS, B. Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. **Journal of Experimental Biology**, vol. 200, nº 3, p. 607–614, 1 jan. 1997. <https://doi.org/10.1242/jeb.200.3.607>.

DA SILVA REIS, Y.; LEITE, J. L. R.; DE ALMEIDA, C. A. L.; PEREIRA, D. S. P.; VIDAL, L. V. O.; DE ARAUJO, F. G.; FORTES-SILVA, R. New insights into tambaqui (*Colossoma macropomum*) feeding behavior and digestive physiology by the self-feeding approach: effects on growth, diel patterns of food digestibility, amylase activity and gastrointestinal transit time. **Aquaculture**, vol. 498, p. 116–122, jan. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.054>.

DAGA, V.; DEBONA, T.; ABILHOA, V.; GUBIANI, É. A.; VITULE, J. Non-native fish invasions of a Neotropical ecoregion with high endemism: a review of the Iguaçu River. **Aquatic Invasions**, vol. 11, nº 2, p. 209–223, 2016. <https://doi.org/10.3391/ai.2016.11.2.10>.

DAI, Q.; HOSTERT, L. E.; RONDON, J. K.; CAO, Y.; SUSKI, C. D. Thermal tolerance of fish to heatwaves in agricultural streams: What does not kill you makes you stronger? **Freshwater Biology**, p. 1–14, ago. 2022. <https://doi.org/10.1111/fwb.13976>.

DE LORES ARNAIZ, G. R.; ORDIERES, M. G. L. Brain Na (+), K (+)-ATPase Activity In Aging and Disease. **International journal of biomedical science: IJBS**, vol. 10, nº 2, p. 85–102, jun. 2014. .

DECARLI, J. A.; PEDRON, F. A.; LAZZARI, R.; SIGNOR, A.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. Hidrolisados proteicos na alimentação do jundiá (<i> Rhamdia

voulez<i/>). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, vol. 23, nº 3–4, p. 168–173, 2016. <https://doi.org/10.4322/rbcv.2016.051>.

DEVIN, S.; BURGEOT, T.; GIAMBÉRINI, L.; MINGUEZ, L.; PAIN-DEVIN, S. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. **Environmental Science and Pollution Research**, vol. 21, nº 4, p. 2448–2454, 28 fev. 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2169-9>.

DIAS, M.; MADEIRA, C.; JOGEE, N.; FERREIRA, A.; GOUVEIA, R.; CABRAL, H.; DINIZ, M.; VINAGRE, C. Integrative indices for health assessment in reef corals under thermal stress. **Ecological Indicators**, vol. 113, p. 106230, jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106230>.

DIEMER, O.; NEU, D. H.; SARY, C.; FINKLER, J. K.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A. *Artemia* sp. na alimentação de larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Animal Brasileira**, vol. 13, nº 2, p. 175–179, 29 jun. 2012. <https://doi.org/10.5216/cab.v13i2.9011>.

DO, T. D.; THI MAI, N.; DUY KHOA, T. N.; ABOL-MUNAFI, A. B.; LIEW, H. J.; KIM, C.-B.; WONG, L. L. Molecular Characterization and Gene Expression of Glutathione Peroxidase 1 in *Tor tambroides* Exposed to Temperature Stress. **Evolutionary Bioinformatics**, vol. 15, p. 1–8, 13 jan. 2019. <https://doi.org/10.1177/1176934319853580>.

DONG, X.; YANG, Z.; LIU, Z.; WANG, X.; YU, H.; PENG, C.; HOU, X.; LU, W.; XING, Q.; HU, J.; HUANG, X.; BAO, Z. Metabonomic Analysis Provides New Insights into the Response of Zhikong Scallop (*Chlamys farreri*) to Heat Stress by Improving Energy Metabolism and Antioxidant Capacity. **Antioxidants**, vol. 11, nº 6, p. 1084, 30 maio 2022. <https://doi.org/10.3390/antiox11061084>.

DR. DEV BRAT MISHRA. Environmental Pollution Biomarker: Fish Antioxidant Défense System Alterations. **Eurasian Journal of Research, Development and Innovation**, vol. 7, p. 38–46, 20 abr. 2022. Disponível em: <https://geniusjournals.org/index.php/ejrди/article/view/1066>.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progress in Neurobiology**, vol. 62, nº 6, p. 649–671, dez. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(99\)00060-X](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(99)00060-X).

DRIVER, A. S.; KODAVANTI, P. R. S.; MUNDY, W. R. Age-related changes in reactive oxygen species production in rat brain homogenates. **Neurotoxicology and Teratology**, vol. 22, nº 2, p. 175–181, mar. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0892-0362\(99\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0892-0362(99)00069-0).

DUBOIS, Michel.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, Fred. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, vol. 28, nº 3, p. 350–356, 1 mar. 1956. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity.

Biochemical Pharmacology, vol. 7, nº 2, p. 88–95, jul. 1961.
[https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

ENGERS, V. K.; BEHLING, C. S.; FRIZZO, M. N. A influência do estresse oxidativo no processo de envelhecimento celular. **Revista Contexto e Saúde**, vol. 10, nº 20, p. 93–102, 2011. .

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

FARHAT, E.; CHENG, H.; ROMESTAING, C.; PAMENTER, M.; WEBER, J.-M. Goldfish Response to Chronic Hypoxia: Mitochondrial Respiration, Fuel Preference and Energy Metabolism. **Metabolites**, vol. 11, nº 3, p. 1–17, 22 mar. 2021. <https://doi.org/10.3390/metabo11030187>.

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**, vol. 310, nº 2, p. 208–214, nov. 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00377-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00377-9).

FEDERICI, G.; SHAW, B.; HANDY, R. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, vol. 84, nº 4, p. 415–430, 30 out. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>.

FEFILOVA, E. B.; RASOVA, E. E.; VELEGZHANINOV, I. O. Morphological and Genetic Studies of Copepods in River Areas Affected by Thermal Pollution in the Komi Republic. **Contemporary Problems of Ecology**, vol. 14, no. 6, p. 626–632, 20 Nov. 2021. <https://doi.org/10.1134/S1995425521060056>.

FEIDEN, A.; SIGNOR, A. A.; DIEMER, O.; SARY, C.; BOSCOLO, W. R.; HERTES NEU, D. Desempenho de juvenis de jundiás (*Rhamdia voulezi*) submetidos à alimentação com ração orgânica certificada e comercial. **Revista Acadêmica: Ciência Animal**, vol. 8, nº 4, p. 381–387, 15 out. 2010. DOI 10.7213/cienciaanimal.v8i4.10958. Disponível em: <https://periodicos.pucpr.br/index.php/cienciaanimal/article/view/10958>.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 43, nº 1, p. 61–68, mar. 1997.
<https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>.

FICKE, A. D.; MYRICK, C. A.; HANSEN, L. J. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, vol. 17, nº 4, p. 581–613, 2007. DOI 10.1007/s11160-007-9059-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11160-007-9059-5>.

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

FORSTER, M. J.; DUBEY, A.; DAWSON, K. M.; STUTTS, W. A.; LAL, H.; SOHAL, R. S. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 93, nº 10, p. 4765–4769, 14 maio 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.10.4765>.

FRISARD, M. I.; BROUSSARD, A.; DAVIES, S. S.; ROBERTS, L. J.; ROOD, J.; JONGE, L. d.; FANG, X.; JAZWINSKI, S. M.; DEUTSCH, W. A.; RAVUSSIN, E. Aging, Resting Metabolic Rate, and Oxidative Damage: Results From the Louisiana Healthy Aging Study. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, vol. 62, nº 7, p. 752–759, 1 jul. 2007. <https://doi.org/10.1093/gerona/62.7.752>.

GAMPERL, A. K.; THOMAS, A. L.; SYME, D. A. Can temperature-dependent changes in myocardial contractility explain why fish only increase heart rate when exposed to acute warming? **Journal of Experimental Biology**, vol. 225, nº 4, p. 1–12, 15 fev. 2022. <https://doi.org/10.1242/jeb.243152>.

GARAVELLO, J. C.; SHIBATTA, O. A. Reappraisal of *Rhamdia branneri* Haseman, 1911 and *R. voulezi* Haseman, 1911 (Siluriformes: Heptapteridae) from the rio Iguaçu with notes on their morphometry and karyotype. **Neotropical Ichthyology**, vol. 14, nº 1, p. e140111, 2016. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140111>.

GARCIA, L. de O.; OKAMOTO, M. H.; RIFFEL, A. P. K.; SACCOL, E. M.; PAVANATO, M. A.; SAMPAIO, L. A. N. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. **Neotropical Ichthyology**, vol. 13, nº 3, p. 607–612, 25 ago. 2015. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140148>.

GLASER, V.; LEIPNITZ, G.; STRALIOTTO, M. R.; OLIVEIRA, J.; DOS SANTOS, V. V.; WANNMACHER, C. M. D.; DE BEM, A. F.; ROCHA, J. B. T.; FARINA, M.; LATINI, A. Oxidative stress-mediated inhibition of brain creatine kinase activity by methylmercury. **NeuroToxicology**, vol. 31, nº 5, p. 454–460, set. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2010.05.012>.

GUDERLEY, H.; BLIER, P. Thermal acclimation in fish: conservative and labile properties of swimming muscle. **Canadian Journal of Zoology**, vol. 66, nº 5, p. 1105–1115, 1 maio 1988. <https://doi.org/10.1139/z88-162>.

HARROWER, J. R.; BROWN, C. H. Blood lactic acid--a micromethod adapted to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, vol. 32, nº 5, p. 709–711, maio 1972. <https://doi.org/10.1152/jappl.1972.32.5.709>.

HEISE, K.; PUNTARULO, S.; NIKINMAA, M.; ABELE, D.; PÖRTNER, H.-O. Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus* L. **Journal of Experimental Biology**, vol. 209, n° 2, p. 353–363, 15 jan. 2006. <https://doi.org/10.1242/jeb.01977>.

HEMMER, W.; WALLIMANN, T. Functional Aspects of Creatine Kinase in Brain. **Developmental Neuroscience**, vol. 15, n° 3–5, p. 249–260, 1993. <https://doi.org/10.1159/000111342>.

HØRDER, M.; ELSER, R. C.; GERHARDT, W.; MATHIEU, M.; SAMPSON, E. J. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC): Scientific Division, Committee on Enzymes. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 7. IFCC method for creatine kinase (ATP: creatine (N-phosphotransferase, EC 2.7.3.2). IFCC Recommendation. **Journal of Automatic Chemistry**, vol. 12, n° 1, p. 22–40, 1990. <https://doi.org/10.1155/S1463924690000049>.

ILHA, P.; SCHIESARI, L.; YANAGAWA, F. I.; JANKOWSKI, K.; NAVAS, C. A. Deforestation and stream warming affect body size of Amazonian fishes. **PLOS ONE**, vol. 13, n° 5, p. e0196560, 2 maio 2018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196560>.

JESUS, T. F.; INÁCIO, Â.; COELHO, M. M. Different levels of hsp70 and hsc70 mRNA expression in Iberian fish exposed to distinct river conditions. **Genetics and Molecular Biology**, vol. 36, n° 1, p. 061–069, 2013. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000100009>.

JIANG, Y.; CHENG, X.; LU, J.; XU, G.; LIU, Q.; SUN, J. Thermal Stress Induces Metabolic Responses in Juvenile Qingtian Paddy Field Carp *Cyprinus carpio var qingtianensis*. **Animals**, vol. 12, n° 23, p. 1–18, 2 dez. 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12233395>.

JOHNSTON, I. A.; DUNN, J. Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, vol. 41, p. 67–93, 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3332497>.

JOY, S.; ALIKUNJU, A. P.; JOSE, J.; SUDHA, H. S. H.; PARAMBATH, P. M.; PUTHIYEDATHU, S. T.; PHILIP, B. Oxidative stress and antioxidant defense responses of *Etroplus suratensis* to acute temperature fluctuations. **Journal of Thermal Biology**, vol. 70, p. 20–26, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.10.010>.

KANDALSKI, P. K.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; BADUY, F.; EUGÊNIO, D. S.; MACHADO, C.; DE SOUZA, M. R. D. P.; PIECHNIK, C. A.; FÁVARO, L. F.; DONATTI, L. Effect of long-term thermal challenge on the Antarctic notothenioid *Notothenia rossii*. **Fish Physiology and Biochemistry**, vol. 45, n° 4, p. 1445–1461, 7 ago. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00660-3>.

KANG, S. W.; RHEE, S. G.; CHANG, T.-S.; JEONG, W.; CHOI, M. H. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic

implications. **Trends in Molecular Medicine**, vol. 11, nº 12, p. 571–578, dez. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2005.10.006>.

KASSAMBARA A; MUNDT F. factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses. 2020.

KAZMI, S. S. U. H.; WANG, Y. Y. L.; CAI, Y.-E.; WANG, Z. Temperature effects in single or combined with chemicals to the aquatic organisms: An overview of thermo-chemical stress. **Ecological Indicators**, vol. 143, p. 1–9, out. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109354>.

KEEN, A. N.; KLAIMAN, J. M.; SHIELS, H. A.; GILLIS, T. E. Temperature-induced cardiac remodeling in fish. **Journal of Experimental Biology**, vol. 220, p. 147–160, 1 jan. 2016. <https://doi.org/10.1242/jeb.128496>.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 251, nº 20, p. 6183–6188, out. 1976. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0).

KINNULA, V. L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, vol. 60, nº 8, p. 693–700, 1 ago. 2005. <https://doi.org/10.1136/thx.2004.037473>.

KIYATKIN, E. A. Brain temperature homeostasis: physiological fluctuations and pathological shifts. **Frontiers in Bioscience**, vol. 15, nº 1, p. 73–92, 2010. <https://doi.org/10.2741/3608>.

KOUFEN, P.; STARK, G. Free radical induced inactivation of creatine kinase: sites of interaction, protection, and recovery. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, vol. 1501, nº 1, p. 44–50, abr. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00005-3](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00005-3).

KOURY, J. C.; DONANGELO, C. M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, vol. 16, nº 4, p. 433–441, dez. 2003. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732003000400007>.

KUMAR, M.; GUPTA, G.; MUHAMMED, N. P.; R, K.; VARGHESE, T.; SRIVASTAVA, P. P.; BHUSHAN, S.; SHUKLA, S. P.; KRISHNA, G.; GUPTA, S. Toxicity ameliorative effect of vitamin E against super-paramagnetic iron oxide nanoparticles on haemato-immunological responses, antioxidant capacity, oxidative stress, and metabolic enzymes activity during exposure and recovery in *Labeo rohita* fingerlings. **Aquaculture International**, vol. 30, nº 4, p. 1711–1739, 12 ago. 2022. <https://doi.org/10.1007/s10499-022-00870-2>.

KUMAR, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; SUBRAMANIAN, S.; PRIYADARSHI, H.; KUMAR, V. High dietary protein combats the stress of *Labeo rohita* fingerlings exposed to heat shock. **Fish Physiology and Biochemistry**, vol. 37, nº 4, p. 1005–1019, 15 dez. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9504-1>.

LANGAN, S. J.; JOHNSTON, L.; DONAGHY, M. J.; YOUNGSON, A. F.; HAY, D. W.; SOULSBY, C. Variation in river water temperatures in an upland stream over

a 30-year period. **Science of The Total Environment**, vol. 265, n° 1–3, p. 195–207, jan. 2001. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00659-8](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00659-8).

LÊ, S.; JOSSE, J.; HUSSON, F. **FactoMineR**: An R Package for Multivariate Analysis. **Journal of Statistical Software**, vol. 25, n° 1, 2008. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>.

LE-CREN, E. D. The Length-Weight Relationship and Seasonal Cycle in Gonad Weight and Condition in the Perch (*Perca fluviatilis*). **The Journal of Animal Ecology**, vol. 20, n° 2, p. 201–219, nov. 1951. <https://doi.org/10.2307/1540>.

LENTH, R. v. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. 2022.

LERMEN, C. L.; LAPPE, R.; CRESTANI, M.; VIEIRA, V. P.; GIODA, C. R.; SCHETINGER, M. R. C.; BALDISSEROTTO, B.; MORAES, G.; MORSCH, V. M. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, vol. 239, n° 1, p. 497–507, 2004. DOI <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.06.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0044848604003710>.

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**, vol. 60, n° 3–4, p. 257–267, out. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00012-7).

LEVINE, R. L.; WILLIAMS, J. A.; STADTMAN, E. P.; SHACTER, E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. [S. l.: s. n.], 1994. p. 346–357. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(94\)33040-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(94)33040-9).

LI, Y.; YANG, J.; LI, S.; ZHANG, J.; ZHENG, J.; HOU, W.; ZHAO, H.; GUO, Y.; LIU, X.; DOU, K.; SITU, Z.; YAO, L. N-myc Downstream-regulated Gene 2, a Novel Estrogen-targeted Gene, Is Involved in the Regulation of Na⁺/K⁺-ATPase. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 286, n° 37, p. 32289–32299, set. 2011. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.247825>.

LU, G. D. Studies on the metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B1-deficient states. **Biochemical Journal**, vol. 33, n° 2, p. 249–254, 1 fev. 1939. <https://doi.org/10.1042/bj0330249>.

LUSHCHAK, O. v.; KUBRAK, O. I.; TOROUS, I. M.; NAZARCHUK, T. Yu.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Trivalent chromium induces oxidative stress in goldfish brain. **Chemosphere**, vol. 75, n° 1, p. 56–62, mar. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.052>.

MACEINA, M. J.; SAMMONS, S. M. An evaluation of different structures to age freshwater fish from a northeastern US river. **Fisheries Management and Ecology**, vol. 13, n° 4, p. 237–242, ago. 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2006.00497.x>.

MACHADO, C.; ZALESKI, T.; RODRIGUES, E.; CARVALHO, C. dos S.; CADENA, S. M. S. C.; GOZZI, G. J.; KREBSBACH, P.; RIOS, F. S.; DONATTI,

L. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 172–173, p. 21–28, jun. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2014.02.003>.

MADEIRA, C.; LEAL, M. C.; DINIZ, M. S.; CABRAL, H. N.; VINAGRE, C. Thermal stress and energy metabolism in two circumtropical decapod crustaceans: Responses to acute temperature events. **Marine Environmental Research**, vol. 141, p. 148–158, out. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.08.015>.

MADEIRA, C.; MADEIRA, D.; DINIZ, M. S.; CABRAL, H. N.; VINAGRE, C. Thermal acclimation in clownfish: An integrated biomarker response and multi-tissue experimental approach. **Ecological Indicators**, vol. 71, p. 280–292, dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.07.009>.

MADEIRA, C.; MENDONÇA, V.; LEAL, M. C.; FLORES, A. A. V.; CABRAL, H. N.; DINIZ, M. S.; VINAGRE, C. Environmental health assessment of warming coastal ecosystems in the tropics – Application of integrative physiological indices. **Science of The Total Environment**, vol. 643, p. 28–39, dez. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.152>.

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**, vol. 166, n° 2, p. 237–243, out. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.008>.

MADEIRA, Diana; COSTA, P. M.; VINAGRE, C.; DINIZ, M. S. When warming hits harder: survival, cellular stress and thermal limits of *Sparus aurata* larvae under global change. **Marine Biology**, vol. 163, n° 4, p. 1–14, 26 abr. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00227-016-2856-4>.

MALHEIROS, S. V. P. Regulação do metabolismo celular—um resumo. **Revista de Ensino de Bioquímica**, vol. 4, n° 1, p. 23–29, 2006.

MARIANO, W. dos S.; OBA, E. T.; ANTOS, L. R. B.; FERNANDES, M. N. Respostas fisiológicas de jeju (*Hoplerythrinus unitaeniatus*) expostos ao ar atmosférico. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, vol. 10, n° 1, p. 210–223, 2009.

MARTINEZ ARBIZU, P. pairwiseAdonis: Pairwise multilevel comparison using adonis. R package version 0.4. 2020.

MARTINS, F.; ANTUNES, S. Qualidade ecológica de ecossistemas aquáticos. **Revista de Ciência Elementar**, vol. 7, n° 2, p. 1–6, 30 jun. 2019. <https://doi.org/10.24927/rce2019.037>.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. 4° ed. Rio de Janeiro: [s. n.], 2015.

MONIRUZZAMAN, M.; MUKHERJEE, M.; KUMAR, S.; CHAKRABORTY, S. B. Effects of salinity stress on antioxidant status and inflammatory responses in females of a “Near Threatened” economically important fish species *Notopterus chitala*: a mechanistic approach. **Environmental Science and Pollution Research**, 1 jun. 2022. DOI 10.1007/s11356-022-21142-9. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s11356-022-21142-9>.

MORA, C.; MAYA, M. F. Effect of the rate of temperature increase of the dynamic method on the heat tolerance of fishes. **Journal of Thermal Biology**, vol. 31, nº 4, p. 337–341, maio 2006. DOI 10.1016/j.jtherbio.2006.01.005. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306456506000301>.

MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica para o laboratório: princípios e interpretações**. 5º ed. [S. l.: s. n.], 2009.

NAGARJUNA, A.; KARTHIKEYAN, P.; MARIGOUDAR, S. R.; SHARMA, K. V. Effect of sublethal gradient concentrations of nickel on postlarvae of *Penaeus monodon*, *Perna viridis* and *Terapon jarbua*: Enzyme activities and histopathological changes. **Chemosphere**, vol. 237, p. 1–15, dez. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124428>.

NAGESWARI, P.; VERMA, A. K.; GUPTA, S.; JEYAKUMARI, A.; CHANDRAKANT, M. H. Optimization of stocking density and its impact on growth and physiological responses of *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878) fingerlings reared in finger millet based biofloc system. **Aquaculture**, vol. 551, p. 737909, mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.737909>.

NATI, J. J. H.; SVENDSEN, M. B. S.; MARRAS, S.; KILLEN, S. S.; STEFFENSEN, J. F.; MCKENZIE, D. J.; DOMENICI, P. Intraspecific variation in thermal tolerance differs between tropical and temperate fishes. **Scientific Reports**, vol. 11, nº 1, p. 21272, 28 dez. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00695-8>.

NAVARRO-GUILLÉN, C.; MOYANO, F. J.; YÚFERA, M. Diel food intake and digestive enzyme production patterns in *Solea senegalensis* larvae. **Aquaculture**, vol. 435, p. 33–42, jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.09.017>.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; SARAIVA-PEREIRA, M. L.; DALMAZ, C.; TERMIGNONI, C. **Livro Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 8º ed. Porto Alegre: Artmed: [s. n.], 2022.

OCHIAI, Y.; OZAWA, H. Biochemical and physicochemical characteristics of the major muscle proteins from fish and shellfish. **Fisheries Science**, vol. 86, nº 5, p. 729–740, 21 set. 2020. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01444-y>.

OKSANEN, J.; SIMPSON, G. L.; BLANCHET, G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P. **vegan: Community Ecology Package**. 2022.

OLSEN, L.; LEVY, M.; MEDLEY, J. K.; HASSAN, H.; ALEXANDER, R.; WILCOCK, E.; YI, K.; FLORENS, L.; MCKINNEY, S.; PEUSS, R.; PERSONS, J.; KENZIOR, A.; MALDONADO, E.; GLUESENKAMP, A.; MAGER, E.; COUGHLIN,

D.; ROHNER, N. Metabolic reprogramming underlies cavefish muscular endurance despite loss of muscle mass and contractility. **bioRxiv**, 2022. DOI 10.1101/2022.03.12.484091. Disponível em: <https://www.biorxiv.org/content/early/2022/03/14/2022.03.12.484091>.

PARISI, M. A.; FRANKLIN, C. E.; CRAMP, R. L. Can slowing the rate of water temperature decline be utilized to reduce the impacts of cold water pollution from dam releases on fish physiology and performance? **Journal of Fish Biology**, vol. 100, n° 4, p. 979–987, 5 abr. 2022. <https://doi.org/10.1111/jfb.15002>.

PEREIRA, D. M. C.; RESENDE, A. C.; SCHLEGER, I. C.; NEUNDORF, A. K. A.; ROMÃO, S.; SOUZA, M. R. D. P. de; HERRERIAS, T.; DONATTI, L. Integrated biomarker response index as an ally in the observation of metabolic biomarkers in muscle of *Astyanax lacustris* exposed to thermal variation. **Biochimie**, p. 1–11, out. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.10.010>.

PERES, T. v.; SCHETTINGER, M. R. C.; CHEN, P.; CARVALHO, F.; AVILA, D. S.; BOWMAN, A. B.; ASCHNER, M. “Manganese-induced neurotoxicity: a review of its behavioral consequences and neuroprotective strategies”. **BMC Pharmacology and Toxicology**, vol. 17, n° 57, p. 1–20, 4 dez. 2016. <https://doi.org/10.1186/s40360-016-0099-0>.

PERUSSOLO, M. C.; GUILOSKI, I. C.; LIROLA, J. R.; FOCKINK, D. H.; CORSO, C. R.; BOZZA, D. C.; PRODOCIMO, V.; MELA, M.; RAMOS, L. P.; CESTARI, M. M.; ACCO, A.; SILVA DE ASSIS, H. C. Integrated biomarker response index to assess toxic effects of environmentally relevant concentrations of paracetamol in a neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, vol. 182, p. 109438, out. 2019. DOI 10.1016/j.ecoenv.2019.109438. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0147651319307699>.

PETERSON, Ryan, A. Finding Optimal Normalizing Transformations via bestNormalize. **The R Journal**, vol. 13, n° 1, p. 310–329, 2021. <https://doi.org/10.32614/RJ-2021-041>.

PETERSON, Ryan A.; CAVANAUGH, J. E. Ordered quantile normalization: a semiparametric transformation built for the cross-validation era. **Journal of Applied Statistics**, vol. 47, n° 13–15, p. 2312–2327, 17 nov. 2020. <https://doi.org/10.1080/02664763.2019.1630372>.

PIMENTA SIVIDANES, V.; DECARLI, J. A.; FEIDEN, A.; BOSCOLO, W. R.; SIGNOR, A.; SIGNOR, A. A.; DIEMER, O. Desenvolvimento embrionário do jundiá *Rhamdia voulezi*. **Revista Acadêmica Ciência Animal**, vol. 10, n° 4, p. 403–408, 15 out. 2012. <https://doi.org/10.7213/academica.7748>.

POOPAL, R. K.; RAMESH, M.; MARUTHAPPAN, V.; BABU RAJENDRAN, R. Potential effects of low molecular weight phthalate esters (C₁₆H₂₂O₄ and C₁₂H₁₄O₄) on the freshwater fish *Cyprinus carpio*. **Toxicology Research**, vol. 6, n° 4, p. 505–520, 2017. <https://doi.org/10.1039/C7TX00084G>.

PÖRTNER, H. Climate change and temperature-dependent biogeography: oxygen limitation of thermal tolerance in animals. **Naturwissenschaften**, vol. 88, nº 4, p. 137–146, 8 jun. 2001. <https://doi.org/10.1007/s001140100216>.

PORTO, M. de J.; SOUZA, J. P. de; COSTA, E. I. F. S.; OLIVEIRA, C. R. V.; GUERRA, M. de F. S. de S.; ARAUJO, A. M. B.; SOUZA, J. de M. Avaliação toxicológica: alterações em biomarcadores desencadeadas por exposição de trabalhadores rurais a agrotóxicos. **Research, Society and Development**, vol. 10, nº 1, p. 1–10, 11 jan. 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11859>.

PRZEPIURA, T. de C. S.; HERRERIAS, T.; KANDALSKI, P. K.; ZALESKI, T.; MACHADO, C.; FORGATI, M.; SOUZA, M. R. D. P. de; DONATTI, L. Metabolic responses in Antarctic Nototheniidae brains subjected to thermal stress. **Brain Research**, vol. 1708, p. 126–137, abr. 2019. DOI 10.1016/j.brainres.2018.12.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006899318306188>.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. 2022.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, vol. 533, nº 1–3, p. 222–239, mar. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.12.087>.

RAJU, N. V.; PRASANTH, P.; HARSHA, T.; NARAVULA, J.; SRIKANTH, K.; NUTALAPATI, V. Evaluation of oxidative stress biomarkers in *Pila virens* exposed to spinel Co₃O₄ nanoparticles. **Materials Science and Engineering: B**, vol. 282, p. 115757, ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2022.115757>.

RATKO, J.; GONÇALVES DA SILVA, N.; ORTIZ DA SILVA, D.; PAULA NASCIMENTO CORRÊA, A.; MAURO CARNEIRO PEREIRA, D.; CRISTINA SCHLEGER, I.; KARLA ALVES NEUNDORF, A.; HERRERIAS, T.; RITA CORSO, C.; ROSA DMENGEON PEDREIRO DE SOUZA, M.; DONATTI, L. Can high- and low-temperature thermal stress modulate the antioxidant defense response of *Astyanax lacustris* brain? **Brain Research**, vol. 1797, p. 1–11, dez. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2022.148118>.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A Colorimetric Method for the Determination of Serum Glutamic Oxalacetic and Glutamic Pyruvic Transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, vol. 28, nº 1, p. 56–63, 1 jul. 1957. <https://doi.org/10.1093/ajcp/28.1.56>.

RESENDE, A. C.; MAURO CARNEIRO PEREIRA, D.; CRISTINA SCHLEGER, I.; DMENGEON PEDREIRO DE SOUZA, M. R.; ALVEZ NEUNDORF, A. K.; ROMÃO, S.; HERRERIAS, T.; DONATTI, L. Effects of heat shock on energy metabolism and antioxidant defence in a tropical fish species *Psalidodon bifasciatus*. **Journal of Fish Biology**, vol. 100, nº 5, p. 1245–1263, 1 maio 2022. DOI <https://doi.org/10.1111/jfb.15036>. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfb.15036>.

RITCHIE, D. J.; FRIESEN, C. R. Invited review: Thermal effects on oxidative stress in vertebrate ectotherms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, vol. 263, p. 111082, jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111082>.

RIYANTO, M.; MAWARDI, W.; KHOERUNNISA, F. I. Temperature effect on heart rate performance of eel (*Anguila bicolor*). **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, vol. 1033, nº 1, p. 012029, 1 jun. 2022. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1033/1/012029>.

RONSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, vol. 29, nº 3, p. 563–568, jun. 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000300027>.

SABOROWSKI, R.; BUCHHOLZ, F. Metabolic properties of *Northern krill*, *Meganyctiphanes norvegica*, from different climatic zones. II. Enzyme characteristics and activities. **Marine Biology**, vol. 140, nº 3, p. 557–565, 1 mar. 2002. DOI 10.1007/s00227-001-0734-0.

SAGLAM, D.; ATLI, G.; DOGAN, Z.; BAYSOY, emine; GURLER, C.; EROGLU, A.; CANLI, M. Response of the Antioxidant System of Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*) Exposed to Metals (Cd, Cu) in Differing Hardness. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, vol. 14, nº 1, p. 43–52, 2014. https://doi.org/10.4194/1303-2712-v14_1_06.

SANTANA, A. C.; FREITAS, D. A. F. Educação ambiental para a conscientização quanto ao uso da água. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, vol. 28, p. 178–188, 2012. .

SCHILLER, A. D. P.; KUNH, A.; MANFRIN, J.; FERRONATO, M. C.; SCHWANTES, D.; LEISMANN, E. A. V.; GONÇALVES JR, A. C. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta de impacto ambiental de uma bacia hidrográfica. **Revista Gestão & Sustentabilidade Ambiental**, vol. 6, nº 3, p. 165–180, 9 nov. 2017. <https://doi.org/10.19177/rgsa.v6e32017165-180>.

SCHLEGER, I. C.; PEREIRA, D. M. C.; RESENDE, A. C.; ROMÃO, S.; HERRERIAS, T.; NEUNDORF, A. K. A.; SLOTY, A. M.; GUIMARÃES, I. M.; DE SOUZA, M. R. D. P.; CARSTER, G. P.; DONATTI, L. Cold and warm waters: energy metabolism and antioxidant defenses of the freshwater fish *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) under thermal stress. **Journal of Comparative Physiology B**, vol. 192, nº 1, p. 77–94, 30 jan. 2022. <https://doi.org/10.1007/s00360-021-01409-2>.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, vol. 10, nº 4, p. 308–313, ago. 2004. <https://doi.org/10.1590/S1517-86922004000400008>.

SCHNEIDER, M.; PÉRICO, E.; POZZOBON, A. Verificação do dano muscular através da avaliação da concentração de creatina quinase em indivíduos não

atletas após prova de ciclismo não competitivo. **Scientia Medica**, vol. 25, nº 1, p. 1–7, 6 fev. 2015. <https://doi.org/10.15448/1980-6108.2015.1.19819>.

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

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural, Santa Maria**, vol. 40, nº 4, p. 994–1002, 2010.

SILVA, E. G. B.; BRACHT, A. M. K. Creatina, função energética, metabolismo e suplementação no esporte. **Revista da Educação Física/UEM**, vol. 12, nº 1, p. 27–33, 2001.

SOARES FILHO, P. J.; KANAAN, S.; XAVIER, A. R.; HENRIQUES, H. N.; PANTALEÃO, J. A. S.; GUZMAN-SILVA, M. A. Efeito da tibolona na morfologia do músculo esquelético, nas enzimas hepáticas e no nível sérico de glicose em ratas castradas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, vol. 48, nº 3, p. 175–183, jun. 2012. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442012000300005>.

SOENGAS, J. L.; ALDEGUNDE, M. Energy metabolism of fish brain. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 131, nº 3, p. 271–296, mar. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(02\)00022-2](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00022-2).

SOLOVYEV, M.; GISBERT, E. Feeding regimes affected the circadian rhythms of pancreatic digestive enzymes and somatic growth in flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) fry. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, vol. 264, p. 111116, fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2021.111116>.

SOMERO, G. N.; DEVRIES, A. L. Temperature Tolerance of Some Antarctic Fishes. **Science**, vol. 156, nº 3772, p. 257–258, 14 abr. 1967. <https://doi.org/10.1126/science.156.3772.257>.

SOUZA, C. F.; BALDISSERA, M. D.; ZEPPENFELD, C. C.; DESCOVI, S.; STEFANI, L. M.; BALDISSEROTTO, B.; DA SILVA, A. S. Oxidative stress mediated the inhibition of cerebral creatine kinase activity in silver catfish fed with aflatoxin B1-contaminated diet. **Fish Physiology and Biochemistry**, vol. 45, nº 1, p. 63–70, 6 fev. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0534-9>.

SOUZA, M. R. D. P. de; HERRERIAS, T.; ZALESKI, T.; FORGATI, M.; KANDALSKI, P. K.; MACHADO, C.; SILVA, D. T.; PIECHNIK, C. A.; MOURA, M. O.; DONATTI, L. Heat stress in the heart and muscle of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps*: Carbohydrate metabolism and antioxidant defence. **Biochimie**, vol. 146, p. 43–55, mar. 2018. DOI 10.1016/j.biochi.2017.11.010. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030090841730305X>.

STREIJGER, F.; SCHEENEN, W. J. J. M.; VAN LUIJTELAAR, G.; OERLEMANS, F.; WIERINGA, B.; VAN DER ZEE, C. E. E. M. Complete brain-type creatine kinase deficiency in mice blocks seizure activity and affects intracellular calcium kinetics. **Epilepsia**, vol. 51, nº 1, p. 79–88, jan. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02182.x>.

SUZUKI, Y. J. Mechanism and Functions of Protein Decarboxylation. **Protein Carbonylation**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 97–109. <https://doi.org/10.1002/9781119374947.ch5>.

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**, vol. 85, nº 3, p. 603–611, 21 jun. 2005. <https://doi.org/10.1017/S0025315405011537>.

TOPAL, A.; ÖZDEMİR, S.; ARSLAN, H.; ÇOMAKLI, S. How does elevated water temperature affect fish brain? (A neurophysiological and experimental study: Assessment of brain derived neurotrophic factor, cFOS, apoptotic genes, heat shock genes, ER-stress genes and oxidative stress genes). **Fish & Shellfish Immunology**, vol. 115, p. 198–204, ago. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2021.05.002>.

TÕUGU, V.; KESVATERA, T. Role of ionic interactions in cholinesterase catalysis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, vol. 1298, nº 1, p. 12–30, nov. 1996. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(96\)00128-8](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(96)00128-8).

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 39, nº 1, p. 44–84, jan. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.

VAN DIJK, P. L. M.; HARDEWIG, I.; HOLKER, F. Energy reserves during food deprivation and compensatory growth in juvenile roach: the importance of season and temperature. **Journal of Fish Biology**, vol. 66, nº 1, p. 167–181, jan. 2005. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2005.00590.x>.

VASCONCELOS, T. B.; CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENA, R. H. M.; BASTOS, V. P. D. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, vol. 16, nº 3, p. 213–219, 2014. .

VERA, L. M.; MIGAUD, H. Hydrogen peroxide treatment in Atlantic salmon induces stress and detoxification response in a daily manner. **Chronobiology International**, vol. 33, nº 5, p. 530–542, 27 maio 2016. <https://doi.org/10.3109/07420528.2015.1131164>.

VIEIRA, C. E. D.; MARQUES, J. A.; DA SILVA, N. G.; BEVITÓRIO, L. Z.; ZEBRAL, Y. D.; MARASCHI, A. C.; COSTA, S. R.; COSTA, P. G.; DAMASCENO, E. M.; PIROVANI, J. C. M.; DO VALE-OLIVEIRA, M.; SOUZA, M. M.; DE

MARTINEZ GASPAR MARTINS, C.; BIANCHINI, A.; SANDRINI, J. Z. Ecotoxicological impacts of the Fundão dam failure in freshwater fish community: Metal bioaccumulation, biochemical, genetic and histopathological effects. **Science of The Total Environment**, vol. 832, p. 1–15, ago. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154878>.

VOET, D.; VOET, J. G. **Bioquímica**. 4º ed. [S. l.: s. n.], 2013.

VOGEL, C.; ROMAN, A.; SIQUEIRA, L. de O. Efeitos neuroprotetores relacionado à suplementação com creatina. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, vol. 23, nº 1, p. 70–83, 2019.

VORNANEN, M. The temperature dependence of electrical excitability in fish hearts. **Journal of Experimental Biology**, vol. 219, nº 13, p. 1941–1952, 1 jul. 2016. <https://doi.org/10.1242/jeb.128439>.

VUTUKURU, S. S.; CHINTADA, S.; RADHA MADHAVI, K.; VENKATESWARA RAO, J.; ANJANEYULU, Y. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, vol. 32, nº 3, p. 221–229, 25 set. 2006. <https://doi.org/10.1007/s10695-006-9004-x>.

WELCH, K. D.; DAVIS, T. Z.; VAN EDEN, M. E.; AUST, S. D. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules 1 This article is part of a series of reviews on “Iron and Cellular Redox Status.” The full list of papers may be found on the homepage of the journal. 6 Guest Editor: Mario Comporti. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 32, nº 7, p. 577–583, abr. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00760-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00760-8).

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. [S. l.: s. n.], 1981. p. 325–333. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)77046-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)77046-0).

WICKHAM, H. Data Analysis. [S. l.: s. n.], 2016. p. 189–201. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4_9.

WONG, C. M.; MARCOCCI, L.; DAS, D.; WANG, X.; LUO, H.; ZUNGU-EDMONDSON, M.; SUZUKI, Y. J. Mechanism of protein decarboxylation. **Free Radical Biology and Medicine**, vol. 65, p. 1126–1133, dez. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.09.005>.

WONG, C. M.; MARCOCCI, L.; LIU, L.; SUZUKI, Y. J. Cell Signaling by Protein Carbonylation and Decarboxylation. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 12, nº 3, p. 393–404, fev. 2010. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2805>.

YENGGOKPAM, S.; SAHU, N. P.; PAL, A. K.; DEBNATH, D.; JAIN, K. K.; DALVI, R. S.; SLAMA, P.; KESARI, K. K.; ROYCHOUDHURY, S. Biometric Indices, Physio-Metabolic Responses and Carcass Quality in Rohu (*Labeo rohita*) during Feed Deprivation. **Animals**, vol. 12, nº 6, p. 769, 18 mar. 2022. <https://doi.org/10.3390/ani12060769>.

ZHANG, H.; TSAO, R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. **Current Opinion in Food Science**, vol. 8, p. 33–42, abr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>.

ZHAO, H.; KE, H.; ZHANG, L.; ZHAO, Z.; LAI, J.; ZHOU, J.; HUANG, Z.; LI, H.; DU, J.; LI, Q. Integrated analysis about the effects of heat stress on physiological responses and energy metabolism in *Gymnocypris chilianensis*. **Science of The Total Environment**, vol. 806, p. 1–12, fev. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151252>.

ZHU, B.-P.; ZHOU, J.; ZHANG, J.; XU, S.; FU, G.; DAI, J.; CAI, M.; HU, Y. Dietary enzymatic rice protein and enzymatic fish paste affect the growth, muscle development and quality traits of juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Aquaculture**, vol. 559, p. 1–10, out. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738425>.