



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUIZ NEVES NETO

DEFESAS ANTIOXIDANTES NO CORAÇÃO DE *Astyanax lacustris*
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE): EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE
ALTA E BAIXA TEMPERATURA

CURITIBA

2024

LUIZ NEVES NETO

DEFESAS ANTIOXIDANTES NO CORAÇÃO DE *Astyanax lacustris*
(CHARACIFORMES: CHARACIDAE): EFEITOS DO ESTRESSE TÉRMICO DE
ALTA E BAIXA TEMPERATURA

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti

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

CURITIBA

2024

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

Neves Neto, Luiz

Defesas antioxidantes no coração de *Astyanax lacustris*
(Characiformes : Characidae) : efeitos do estresse térmico de alta
e baixa temperatura / Luiz Neves Neto. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucélia Donatti.

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

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

Bibliotecária: Giana Mara Seniski Silva CRB-9/1406

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 **LUIZ NEVES NETO** intitulada: **Defesas antioxidantes no coração de *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae): efeitos do estresse térmico de alta e baixa temperatura**, 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, 24 de Abril de 2024.

Assinatura Eletrônica

26/04/2024 15:22:42.0

LUCELIA DONATTI

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

30/04/2024 11:39:44.0

KATYA NALIWAICO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/04/2024 13:12:17.0

TATIANA HERRERIAS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA)

Assinatura Eletrônica

25/04/2024 13:18:08.0

LUIS FERNANDO FÁVARO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a minha família, os quais me apoiaram nessa jornada.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Lucélia Donatti, que me proporcionou essa oportunidade nesta linha de pesquisa me motivando a crescer profissionalmente.

À minha coorientadora Prof^a. Dr^a. Maria Rosa Dmengeon Pedreiro de Souza pela paciência, compreensão e por me conduzir com foco na elaboração desta dissertação.

Ao Centro de Pesquisas e Extensão em Aquicultura Ildo Zago, situado no município de União da Vitória-PR, pela colaboração durante a realização dos bioensaios.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular e a Universidade Federal do Paraná pela infraestrutura e aos seus professores que contribuíram para a minha formação.

Por fim, à banca examinadora por aceitarem o convite e por todas as significativas contribuições para esta dissertação.

Assim como o coração é o centro vital do corpo humano, a ciência é o coração
pulsante da evolução intelectual da humanidade.

Herbert Spencer

RESUMO

A temperatura está entre os principais fatores abióticos que influenciam a sobrevivência e a homeostase dos peixes, podendo causar estresse e efeitos fisiológicos negativos nos organismos, quando os seus limites adequados são extrapolados. Nativa do Brasil, *Astyanax lacustris* possui relevância na alimentação e na pesca, em programas de aquicultura e de monitoramento ambiental, além de potencial expressivo na pesquisa. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar as enzimas de defesa antioxidante e marcadores de dano celular no miocárdio de *A. lacustris* expostos a estresse térmico de alta e baixa temperatura. Os 240 espécimes de *A. lacustris* foram coletados na região de União da Vitória (PR), em lagos artificiais, e expostos, posteriormente a baixa ($15^{\circ}\text{C} \pm 1$) e alta ($31^{\circ}\text{C} \pm 1$) temperatura, com um grupo controle ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) para cada situação experimental. Os peixes foram mantidos nestas temperaturas em regimes distintos de tempo: 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Em 31°C foi observado um aumento da enzima superóxido dismutase (SOD) no tempo de 12 horas e uma redução em 72 horas. A enzima glutatona peroxidase (GPx) em 31°C diminuiu sua atividade em 12 horas, sugerindo maior susceptibilidade dos miócitos à degradação causada pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e aumentou em 96 horas. A glutatona reduzida (GSH) reduziu em 6 horas e aumentou em 96 horas de exposição a alta temperatura. Em 15°C , foram observadas alterações em GPx, que aumentou sua atividade em 48 e 96 horas e diminuiu em 72 horas, e em GSH que aumentou em 2 horas. Os resultados indicam que os componentes basais do sistema de defesa antioxidante no tecido cardíaco de *A. lacustris*, são eficientes em eliminar peróxidos de hidrogênio durante a exposição à 31°C e a 15°C , evitando assim danos às estruturas celulares. A análise de componentes principais (PCA) não conseguiu agrupar eficientemente as temperaturas alta (31°C) e baixa (15°C) para tirar conclusões sobre diferentes tratamentos, destacando a importância do índice integrado de respostas de biomarcadores (IBR) nesse contexto, ampliando a sensibilidade nas comparações considerando um conjunto de biomarcadores.

Palavras-chave: peixes subtropicais; temperatura; biomarcadores; coração; bioenergética.

ABSTRACT

Temperature is among the main abiotic factors that influence the survival and homeostasis of fish, potentially causing stress and negative physiological effects on organisms when their appropriate limits are exceeded. Native to Brazil, *Astyanax lacustris* holds relevance in both food consumption and fishing, aquaculture programs, environmental monitoring, and significant potential in research. Thus, the objective of this study was to evaluate antioxidant defense enzymes and cellular damage markers in the myocardium of *A. lacustris* exposed to high and low thermal stress. The 240 specimens of *A. lacustris* were collected in the União da Vitória region (PR), in artificial lakes, and subsequently exposed to low ($15^{\circ}\text{C} \pm 1$) and high ($31^{\circ}\text{C} \pm 1$) temperatures, with a control group ($23^{\circ}\text{C} \pm 1$) for each experimental condition. The fish were kept at these temperatures for different time regimes: 2, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 hours. At 31°C , an increase in the enzyme superoxide dismutase (SOD) was observed at 12 hours and a decrease at 72 hours. The enzyme glutathione peroxidase (GPx) at 31°C decreased its activity at 12 hours, suggesting greater susceptibility of the myocytes to degradation caused by H_2O_2 , and increased at 96 hours. Reduced glutathione (GSH) decreased at 6 hours and increased at 96 hours of exposure to high temperature. At 15°C , alterations in GPx markers were observed, which increased their activity at 48 and 96 hours and decreased at 72 hours, and GSH increased at 2 hours. The results indicate that the basal components of the antioxidant defense system in the cardiac tissue of *A. lacustris* are efficient in eliminating hydrogen peroxides during exposure to 31°C and 15°C , thus avoiding damage to cellular structures. Principal component analysis (PCA) failed to efficiently group high (31°C) and low (15°C) temperatures to draw conclusions about different treatments, highlighting the importance of the integrated biomarker response index (IBR) in this context, increasing sensitivity in comparisons considering a set of biomarkers.

Keywords: subtropical Fish; temperature; biomarkers; heart; bioenergetics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1 - LAMBARI-DO-RABO-AMARELO <i>Astyanax lacustris</i> | 15 |
| FIGURA 2 - SISTEMA CIRCULATÓRIO DE PEIXES..... | 16 |
| FIGURA 3 - ESTRESSE OXIDATIVO NO CORAÇÃO HUMANO..... | 18 |
| FIGURA 4 - ATIVIDADE DE ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS EXPOSIÇÃO AO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA..... | 32 |
| FIGURA 5 - ATIVIDADE DE ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS EXPOSIÇÃO AO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA..... | 34 |
| FIGURA 6 - VALORES DO ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTAS DE BIOMARCADORES (IBR) APÓS EXPOSIÇÃO AO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA..... | 36 |
| FIGURA 7 - VALORES DO ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTAS DE BIOMARCADORES (IBR) APÓS EXPOSIÇÃO AO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA..... | 38 |
| FIGURA 8 - BILOT DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) PARA AS TEMPERATURAS DE 31 °C E 15 °C..... | 40 |
| FIGURA 9 - LINHA DO TEMPO DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NAS ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO EM <i>Astyanax lacustris</i> ... | 45 |

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DEFESA ANTIOXIDANTE. .27

TABELA 2 - MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE DANOS CELULARES E
GSH.....28

SUMÁRIO

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| AGRADECIMENTOS..... | 4 |
| RESUMO..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| LISTA DE ILUSTRAÇÕES..... | 8 |
| LISTA DE TABELAS..... | 9 |
| SUMÁRIO..... | 10 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 11 |
| 1.1 Visão translacional do estudo sobre o coração e suas patologias..... | 11 |
| 1.2 <i>Astyanax lacustris</i> e o sistema cardiovascular de teleósteos..... | 14 |
| 1.3 Estresse oxidativo em mamíferos e não mamíferos..... | 17 |
| 1.4 Estresse oxidativo em peixes..... | 20 |
| 2. OBJETIVOS..... | 24 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 24 |
| 2.2 Objetivos específicos..... | 24 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 24 |
| 3.1 Amostragem e aclimação da espécie testada <i>A. lacustris</i> | 24 |
| 3.2 Delineamento experimental..... | 25 |
| 3.3 Procedimentos analíticos..... | 27 |
| 3.3.1 Determinação da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante..... | 27 |
| 3.3.2 Determinação dos marcadores de danos oxidativos e da concentração de glutathiona reduzida (GSH)..... | 28 |
| 3.3.3 Análises estatísticas..... | 29 |
| 4. RESULTADOS..... | 30 |
| 4.1. Efeito do choque térmico de alta e baixa temperatura no miocárdio de <i>A. lacustris</i> | 31 |
| 4.2. Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) para o choque térmico de alta e baixa temperatura no miocárdio de <i>A. lacustris</i> | 34 |
| 4. 3. Respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo entre temperaturas no miocárdio de <i>A. lacustris</i> | 39 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 41 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 49 |
| REFERÊNCIAS..... | 51 |

1.INTRODUÇÃO

1.1 Visão translacional do estudo sobre o coração e suas patologias

A função do coração humano é de extrema importância, entretanto, sua suscetibilidade a doenças e sua capacidade limitada de regeneração o tornam um órgão de notável fragilidade. A doença cardíaca é uma das principais causas de mortalidade em escala mundial (JEWHURST; MCLAUGHLIN, 2016). Em 2020, aproximadamente 19 milhões de mortes foram atribuídas às doenças cardiovasculares em todo o mundo, o que representou um aumento de 18,7% em relação a 2010 (TSAO *et al.*, 2022). Segundo a Organização Mundial de Saúde 78,57 a cada 100.000 pessoas morrem no Brasil por doença cardíaca isquêmica, sendo, esta, a principal causa de morte entre brasileiros (WHO, 2019).

Um dos grandes problemas enfrentados no desenvolvimento de tratamentos para lesões no tecido cardíaco está relacionada à limitada capacidade de reparação do coração de mamíferos adultos. Eventos como infartos ou lesões físicas no coração frequentemente culminam em cicatrizes permanentes, desencadeando processos de remodelação cardíaca e disfunção cardíaca, os quais, em última análise, contribuem para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca progressiva (SCHWINGER, 2021) As pesquisas no campo da reparação cardíaca em mamíferos geralmente se dividem em duas abordagens distintas: terapias baseadas em células-tronco ou células progenitoras cardíacas e a exploração das vias de reparo endógenas (MÜLLER; LEMCKE; DAVID, 2018). No entanto, recentemente, tem surgido a compreensão de que essas duas abordagens podem estar mais interligadas do que previamente considerado. Evidências sugerem que estratégias

baseadas em células-tronco podem operar de maneira indireta, agindo sobre as células cardíacas existentes e estimulando os processos de reparação endógenos, em vez de promover diretamente a restauração do tecido por meio das próprias células-tronco (MÜLLER; LEMCKE; DAVID, 2018; VUJIC; NATARAJAN; LEE, 2020). Assim, a compreensão da capacidade intrínseca de reparação do coração emerge como uma abordagem integral no desenvolvimento de novos métodos de tratamento.

Na maioria dos vertebrados, o desenvolvimento do coração pode ser artificialmente dividido nas seguintes etapas: (1) indução de células cardiogênicas a partir do mesoderma embrionário; (2) coalescência dessas células em um tubo cardíaco linear; (3) looping cardíaco e desenvolvimento assimétrico; e (4) especialização das câmaras e crescimento cardíaco. Esses processos são altamente semelhantes na maioria dos vertebrados, o que indica a conservação evolutiva do plano de construção do coração (XIA *et al.*, 2020).

Devido à conservação evolutiva do desenvolvimento, observações em modelos não mamíferos têm contribuído com *insights* básicos sobre os mecanismos de desenvolvimento cardíaco e nos permitem fazer extrapolações para os seres humanos. Apesar das diferenças na forma final e na fisiologia, muitas descobertas importantes sobre o desenvolvimento do coração humano foram guiadas por estudos em modelos não mamíferos (XIA *et al.*, 2020). Nesse contexto, as redes genéticas que controlam o desenvolvimento do coração em vertebrados também são altamente conservadas, permitindo a modelagem de distúrbios cardíacos humanos em modelos animais. Diferentes modelos animais, tanto mamíferos (como ratos, porcos e coelhos) quanto não mamíferos (como moscas-das-frutas, sapos, peixes e galinhas), têm sido usados para investigar patologias das doenças cardíacas, cada

um com suas vantagens e limitações. Os dados e conclusões obtidos desses modelos podem ser complementares e contribuir para uma visão mais abrangente do desenvolvimento cardíaco e das doenças (XIA *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas, a comunidade científica direcionou sua atenção para os corações de não mamíferos como modelos de reparação cardíaca. Em particular, os "vertebrados inferiores", que incluem anfíbios e peixes, têm se mostrado sistemas de estudo altamente acessíveis nessa área de pesquisa. Pesquisas foram conduzidas na regeneração cardíaca de anfíbios urodelos, principalmente no tritão *Notophthalmus viridescens*, mas também em outros, como o axolote *Amblystoma mexicanum* e a salamandra *Triturus viridescens*. Muitos dos eventos morfológicos e celulares associados à regeneração cardíaca foram primeiramente caracterizados nesses sistemas de anfíbios, e eles ainda desempenham um papel crucial como modelos para o estudo dos processos regenerativos (BECKER; CHAPIN; SHERRY, 1974; JEWHRST; MCLAUGHLIN, 2016; OBERPRILLER; OBERPRILLER, 1974)

Foi apenas em 2002 que se descobriu que uma espécie de peixe era capaz de regeneração cardíaca em organismos adultos - o *zebrafish*, *Danio rerio*. Poss *et al.* (2002) demonstraram que corações de *zebrafish* podem regenerar completamente o tecido cardíaco ausente, sem sinais de cicatrização e com restauração total da funcionalidade, tudo em um prazo de 60 dias após a lesão (POSS; WILSON; KEATING, 2002). Desde essa descoberta, *D. rerio* se tornou, de longe, o organismo modelo mais utilizado e bem caracterizado para o estudo da regeneração cardíaca. Com uma ampla variedade de ferramentas moleculares e dados genômicos disponíveis para a espécie, a análise da expressão gênica, a criação de organismos transgênicos e a mutagênese tornaram-se significativamente mais acessíveis do que em sistemas de modelos menos caracterizados

(BAXENDALE; VAN EEDEN; WILKINSON, 2017; HOWE *et al.*, 2013; LÓPEZ *et al.*, 2018). Além de *D. rerio*, outras espécies de peixes são modelos de estudo de regeneração cardíaca, dentre elas, *Danio aequippinatus*, *Carassius auratus* e *Polypterus senegalus*(JEWHURST; MCLAUGHLIN, 2016)

Nesse sentido, carecem na literatura informações mais detalhadas sobre aspectos fisiológicos do coração de *Astyanax lacustris*, um peixe teleósteo abundante no Brasil e pertencente a infraordem dos *Teleostei* e família *Characidae*. Conhecer os aspectos de estresse oxidativo no coração de *Astyanax lacustris* pode trazer diversas vantagens para a ciência biomédica, por exemplo, ajudar a entender como as células cardíacas desse peixe lidam com danos e se mantêm funcionais, o que poderia levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para minimizar os efeitos do estresse oxidativo no coração humano.

Ademais, estudar *A. lacustris* em relação ao estresse oxidativo apresenta várias vantagens em comparação ao modelo estabelecido - *Danio rerio*. Como uma espécie nativa do Brasil, *A. lacustris* oferece maior relevância ecológica e facilidade de acesso para pesquisadores locais. Além disso, a diversidade genética e filogenética entre essas espécies pode revelar novas estratégias evolutivas de regeneração e manejo do estresse oxidativo, complementando os conhecimentos obtidos com o *zebrafish*. Essas diferenças podem proporcionar *insights* valiosos sobre a reparação tecidual e a proteção celular, potencialmente levando ao desenvolvimento de novas terapias para doenças cardíacas humanas.

1.2 *Astyanax lacustris* e o sistema cardiovascular de teleósteos

O *Astyanax lacustris* (Lütken, 1875), ou *Astyanax altiparanae* popularmente conhecido por lambari-do-rabo-amarelo (LUCENA; SOARES, 2016) é caracterizado

por ter um corpo prateado com a parte inferior branca e a parte superior cinza, e suas nadadeiras caudal, anal e pélvicas são amareladas enquanto as outras são transparentes ou levemente amareladas. A nadadeira caudal possui uma faixa escura no meio, que se estende até a extremidade dos raios da nadadeira, (GARUTTI; BRITSKI, 1997) conforme mostrado na FIGURA 1.

FIGURA 1 - LAMBARI-DO-RABO-AMARELO *Astyanax lacustris*



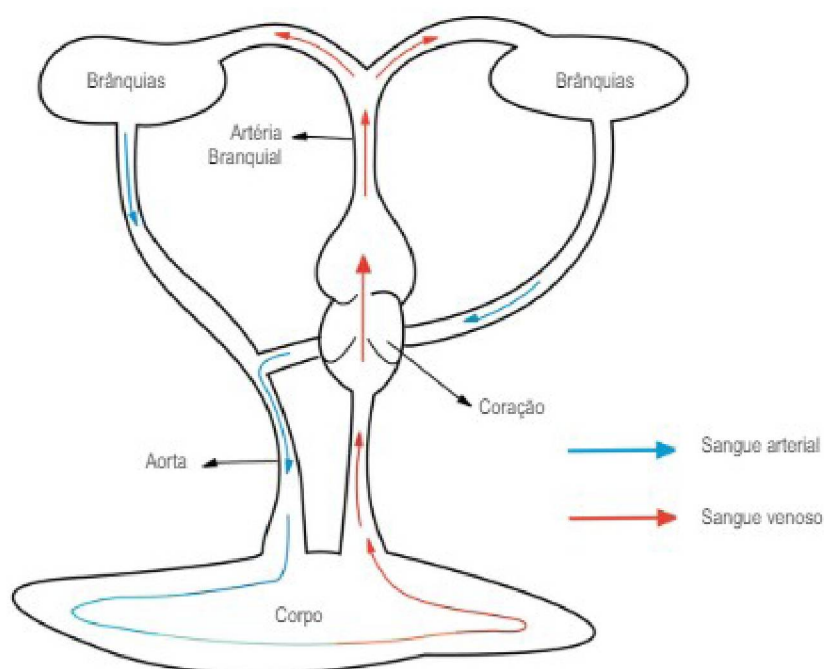
LEGENDA: Foto do lambari-do-rabo-amarelo *Astyanax lacustris* (LÜTKEN, 1875). FONTE: <https://detalhes.net/piaba/>

A. lacustris são comuns em águas continentais brasileiras, habitando riachos, rios, brejos e lagoas, e são conhecidos por serem uma espécie onívora, muito prolífera, com desova parcelada ao longo do ano, desde que as temperaturas estejam acima de 23°C (BENNEMANN *et al.*, 2005; PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005; VIANA; SUAREZ; LIMA-JUNIOR, 2013). Peixes do gênero *Astyanax* têm sido muito utilizados para alimentação, aquarismo, piscicultura e como bioindicadores de contaminação ambiental devido à sua tolerância relativamente elevada à poluição (WARREN; BURR, 2020). O lambari-do-rabo-amarelo tem sido utilizado como espécie modelo no monitoramento ambiental (GNOCCHI *et al.*, 2020; MACÊDO *et al.*, 2020; STEVANATO; OSTRENSKY, 2018; ZAFRA-LEMOS *et al.*, 2021) sendo estudado e descrito em várias situações, incluindo a presença de agrotóxicos, metais pesados, vazamentos de combustíveis

e medicamentos (AKAISHI *et al.*, 2004; GALVAN *et al.*, 2016; SCHULZ; MARTINS-JUNIOR, 2001).

O sistema circulatório na maioria dos peixes teleósteos é relativamente simples, composto por artérias aferentes que transportam o sangue do coração para as brânquias e artérias eferentes que o levam das brânquias para o corpo (MORO *et al.*, 2013). O coração dos peixes tem uma forma tubular, sacular ou piramidal e é composto por tecido elástico e músculo cardíaco. O sangue venoso flui do seio venoso para o átrio e, em seguida, para o ventrículo através da junção sinoatrial e atrioventricular. O sangue venoso é bombeado do ventrículo através de um par de válvulas na junção ventrículo-bulbar e, em seguida, flui pela aorta abdominal. A estrutura do bulbo arterial varia entre as espécies, com alguns peixes teleósteos tendo tecido elástico não contrátil e outros apresentando um cone arterioso com músculo contrátil (CARNIATTO *et al.*, 2019; MORO *et al.*, 2013; SHERRILL *et al.*, 2009).

FIGURA 2 - SISTEMA CIRCULATÓRIO DE PEIXES



LEGENDA: Representação esquemática do sistema circulatório de peixes teleósteos. FONTE:
extraído de (MORO *et al.*, 2013).

Cabe ressaltar que o coração dos peixes teleósteos apresenta diferenças consideráveis em relação a morfologia, histologia e vascularização quando comparado com o coração dos mamíferos (CARNIATTO *et al.*, 2019). Embora o desenvolvimento embrionário cardíaco dos peixes seja semelhante ao dos mamíferos e anfíbios, não evoluiu para a septação (CARNIATTO *et al.*, 2019). Entretanto, apesar de possuir apenas duas cavidades, a eletrofisiologia desses miocárdios se assemelha à dos mamíferos em muitos aspectos, principalmente em relação aos potenciais de ação. Devido a essa semelhança, os peixes podem ser utilizados como modelos biológicos em estudo da fisiologia do miocárdio, possibilitando extrapolações para mamíferos (SEDMERA *et al.*, 2003).

Sumariamente, o sistema circulatório dos peixes teleósteos é adaptado para transportar sangue oxigenado para as brânquias, onde ocorrem as trocas gasosas, e, em seguida, distribuí-lo pelo corpo. Essa adaptação é essencial para lidar com os desafios do ambiente aquático, como a variação de temperatura e a necessidade de ajustar a temperatura corporal ao ambiente circundante (BALDISSEROTTO, 2009; MORO *et al.*, 2013). Alterações no meio ambiente podem desencadear desequilíbrios na fisiologia do animal resultando entre outras consequências na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

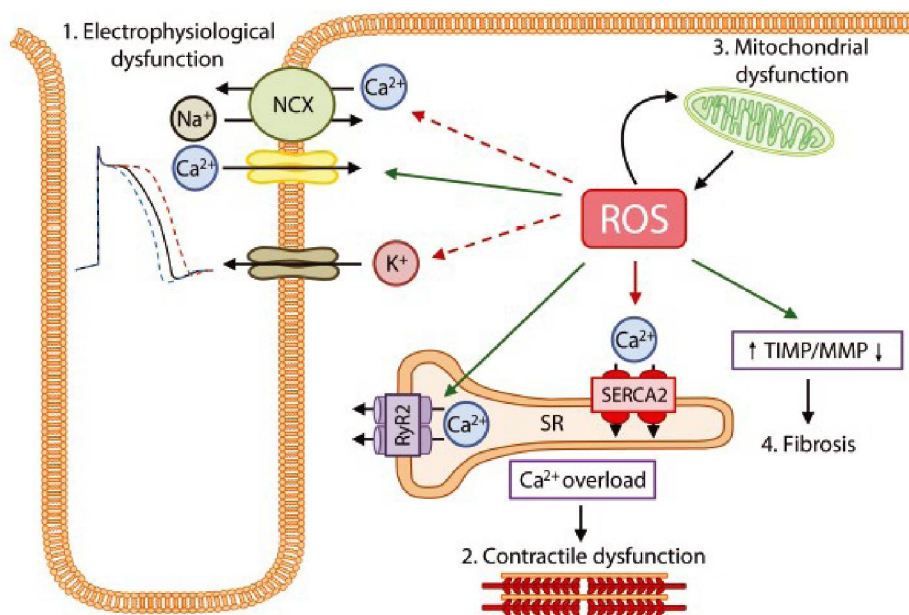
1.3 Estresse oxidativo em vertebrados

O estresse oxidativo é definido como uma desregulação entre a produção de EROs e os mecanismos endógenos de defesa antioxidante, o chamado 'estado redox' (LUSHCHAK, 2011; VASCONCELOS *et al.*, 2014). Quando presentes em

baixas concentrações, as EROs desempenham uma função importante na homeostase celular. No entanto, o excesso de EROs causa disfunção celular, peroxidação de lipídios, carbonilação de proteínas, danos ao DNA e, eventualmente, leva a danos celulares irreversíveis e morte (VAN DER POL *et al.*, 2019; VINAGRE *et al.*, 2012).

No coração humano, um excesso de EROs pode levar ao desenvolvimento e progressão da remodelação miocárdica mal adaptativa e insuficiência cardíaca. O acúmulo de EROs prejudica diretamente a eletrofisiologia e a maquinaria contrátil dos cardiomiócitos, modificando proteínas centrais para o acoplamento excitação-contracção, incluindo canais de cálcio do tipo L, canais de sódio, canais de potássio e o trocador sódio-cálcio. Também podem alterar a atividade da Ca^{2+} adenosina trifosfatase do retículo sarcoplasmático e reduzir a sensibilidade ao cálcio dos miofilamentos. Além disso, as EROs induzem um déficit energético afetando a função de proteínas envolvidas no metabolismo energético. Por fim, as EROs têm função pró-fibrótica, induzindo a proliferação de fibroblastos cardíacos e metaloproteinases de matriz, resultando em remodelação extracelular (FIGURA 2) (VAN DER POL *et al.*, 2019).

FIGURA 3 - ESTRESSE OXIDATIVO NO CORAÇÃO HUMANO



LEGENDA: Esquema do estresse oxidativo no coração humano. ROS - espécies reativas de oxigênio; NCX - Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; RyR2 – receptor de rianodina; SERCA 2 - retículo sarcoplasmático Ca^{2+} -adenosina trifosfatase 2; TIMP - inibidores de metaloproteinases nos tecidos; MMP - matrix metaloproteinase. FONTE: extraído de (VAN DER POL *et al.*, 2019).

A produção de EROs no coração é predominantemente realizada pelas mitocôndrias, NADPH oxidases, xantina oxidase e óxido nítrico sintase (NOS) desacoplada (KUZNETSOV *et al.*, 2019). Sob condições patológicas, a cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias induz a geração de quantidades significativas de superóxido, o que foi comprovado como um contribuinte para danos nos cardiomiócitos e lesões miocárdicas extensas após um infarto agudo do miocárdio (KUZNETSOV *et al.*, 2019).

A produção de ERO também é intensificada devido ao aumento na expressão e atividade da NADPH oxidase, desencadeada por diversos estímulos patológicos, incluindo estiramento mecânico, angiotensina II, endotelina-1 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (CAPPOLA *et al.*, 2001; DOUGHAN; HARRISON; DIKALOV, 2008). De forma semelhante, a expressão e atividade da xantina oxidase também estão elevadas no coração em falência, resultando novamente em uma maior produção de ERO (CAPPOLA *et al.*, 2001). Como consequência de lesões cardíacas, a NOS torna-se desacoplada e instável em termos estruturais, o que leva a uma geração

aumentada de ERO. Em modelos com camundongos, o aumento na produção de ERO resulta em dilatação do ventrículo esquerdo (VE), disfunção contrátil e remodelação do VE (TAKIMOTO *et al.*, 2005)

Além do aumento substancial na produção de estresse oxidativo, a insuficiência cardíaca também se caracteriza pelo esgotamento do mecanismo natural de defesa antioxidante. Nas células cardíacas, assim como na maioria dos tipos celulares, existem componentes endógenos essenciais desse mecanismo, responsáveis por neutralizar as EROs, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e glutatona reduzida (GSH) (ANDRADE JÚNIOR *et al.*, 2005; KINNULA, 2005; RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006).

Estudos em modelos animais de insuficiência cardíaca demonstraram uma significativa redução na atividade dessas enzimas, como SOD, CAT e GPx (HILL; SINGAL, 1996; KHAPER; SINGAL, 1997). Além disso, camundongos geneticamente deficientes em SOD ou GPx, quando expostos a lesões cardíacas, apresentaram também apresentam tais reduções em comparação com seus controles (FORGIONE *et al.*, 2002; SHIOMI *et al.*, 2004; VAN DEEL *et al.*, 2008).

Ademais, a GSH desempenha um papel crucial como antioxidante nas células, agindo na neutralização de radicais livres e na eliminação de produtos de peroxidação lipídica (FANG *et al.*, 2020; JANG *et al.*, 2021). Já foi observada uma redução em GSH em animais após lesões cardíacas (ADAMY *et al.*, 2007; BOURRAINDELOUP *et al.*, 2004). Além disso, o esgotamento de GSH demonstrou uma forte correlação com os níveis séricos de Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (BOURRAINDELOUP *et al.*, 2004). Em tecido do ventrículo esquerdo (VE) de pacientes com cardiomiopatia dilatada ou isquêmica em estágio avançado, houve

uma diminuição de 54% nos níveis totais de GSH em comparação com controles (ADAMY *et al.*, 2007). Em outro estudo, os níveis séricos de GSH apresentaram uma correlação significativa com a gravidade dos sintomas em pacientes com insuficiência cardíaca (DAMY *et al.*, 2009).

1.4 Estresse oxidativo e temperatura em peixes

As semelhanças nos tipos de danos oxidativos e nas defesas antioxidantes entre mamíferos e peixes sugerem que estes últimos podem ajudar a compreender melhor como as EROs afetam as células, como estas respondem e se recuperam desses danos e como o estresse oxidativo está relacionado às doenças. Os peixes têm defesas antioxidantes semelhantes às dos mamíferos contra o estresse oxidativo. Essas semelhanças incluem removedores de radicais livres de baixo peso molecular, como GSH, α -tocoferol (ot-TOH) e ácido ascórbico, bem como defesas enzimáticas, como SOD, CAT e GPx. As atividades dessas defesas antioxidantes variam entre as espécies de peixes, com atividades mais baixas de SOD e CAT, mas atividades aumentadas de GPx em comparação com outros vertebrados (KELLY *et al.*, 1998; MATKOVICS *et al.*, 1977).

Um dos principais fatores abióticos causadores do estresse é a variação de temperatura (HARDEWIG; PÖRTNER; VAN DIJK, 2004; YANG *et al.*, 2020), principalmente nos organismos ectotérmicos, nos quais a variação da temperatura do corpo se altera conforme o meio em que estão, situação essa característica da maioria das espécies de peixes (LOGAN; BUCKLEY, 2015). O metabolismo e a fisiologia são diretamente influenciados quando os limites adequados de temperatura para o organismo são ultrapassados (CHENG *et al.*, 2018a; FU *et al.*, 2018; GARBERN; LEE, 2013; ISLAM *et al.*, 2020).

Altas temperaturas acarretam o aumento da frequência respiratória, a redução na concentração de hemoglobinas e hemácias, enquanto baixas temperaturas provocam o inverso (SUN *et al.*, 2019). Uma vez instalado um dos dois extremos térmicos, alterações são ocasionadas, tanto nos níveis dos marcadores de danos como nas atividades das enzimas antioxidantes (GARCIA *et al.*, 2015; JOY *et al.*, 2017).

O estresse envolve respostas da organização animal em diversos níveis (JOËLS; BARAM, 2009; KOAKOSKI *et al.*, 2012), cuja divisão pode se dar nas seguintes fases: identificação da ameaça à homeostase, resposta ao fator estressor e o resultado causado pelo estresse. Esse conjunto de respostas caracteriza a Síndrome de Adaptação Geral (SAG) (SILVA; GOULART; GUIDO, 2018). Inicialmente, são desencadeadas respostas neuroendócrinas envolvendo o eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal (HHI) e o eixo Hipotálamo-Sistema Nervoso Simpático-Células Cromafins (HSC) (KOAKOSKI *et al.*, 2012), liberando, nesse processo, hormônios corticosteroides e catecolaminas na corrente sanguínea (SCHRECK; TORT, 2016).

Na sequência, transformações de ordem fisiológica acontecem em decorrência, na maioria das vezes, da ação provocada pelos hormônios liberados na resposta inicial, acarretando alterações em níveis cardiovascular, respiratório, hidromineral, além de mobilização de substratos energéticos (RODNICK; PLANAS, 2016). No final, alterações no crescimento, comportamento e no sistema imune podem provocar respostas do animal, o que impactará na sua sobrevivência (SCHRECK; TORT, 2016).

Dentre os biomarcadores associados às funções fisiológicas ligadas à preservação da saúde dos peixes frente a agentes estressores, os parâmetros de

danos oxidativos e as enzimas antioxidantes possuem fundamental importância (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2015; FORGATI *et al.*, 2017; PRZEPIURA *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 2018)

Parihar e Dubey encontraram que o bagre indiano de água doce (*Heteropneustes fossilis*), exposto a um aumento de temperatura (de 25 para 37°C), apresentou aumentos significativos nos níveis de MDA em tecidos branquiais e bexiga natatória (PARIHAR; DUBEY, 1995). O sistema antioxidante é considerado como a primeira defesa da célula frente ao estresse oxidativo (CHENG *et al.*, 2018b). A função das enzimas antioxidantes é a de transformar os oxidantes em moléculas com menor reatividade (LUO *et al.*, 2014).

Na linha de defesa antioxidante, a primeira enzima é a superóxido dismutase (SOD) (PAITAL; CHAINY, 2016), sendo a responsável pela redução em peróxido de hidrogênio do radical superóxido (CHENG *et al.*, 2018a). A enzima catalase (CAT), na sequência, faz a degradação do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água (CHENG *et al.*, 2018a), refletindo, dessa forma, no estado de saúde e na capacidade em resistir à oxidação (CHENG *et al.*, 2018b). A conjugação de metabólitos é catalisada pela atuação da glutathione S-transferase (GST) pelo processo de biotransformação, deixando facilmente excretáveis os compostos tóxicos (MODESTO; MARTINEZ, 2010).

A redução em água do peróxido de hidrogênio (resultado da ação dos radicais livres) é catalisada pela glutathione peroxidase (GPx) (MASSARSKY; KOZAL; DI GIULIO, 2017; SATTIN *et al.*, 2015), sendo a enzima responsável pela catalização à glutathione oxidada (GSSG) da oxidação de GSH, removendo, dessa forma, os peróxidos tóxicos formados em condições aeróbicas (MASSARSKY; KOZAL; DI GIULIO, 2017).

Considera-se a glutathiona reduzida (GSH) um antioxidante não enzimático(MODESTO; MARTINEZ, 2010), que age pela biotransformação na defesa da célula(MASSARSKY; KOZAL; DI GIULIO, 2017). Quando está na forma oxidada (GSSG), tem como característica duas moléculas de glutathiona, interligadas por uma ligação de dissulfeto (NELSON; COX, 2014). Também é possível avaliar e usar a carbonilação de proteínas (PCO) e a lipoperoxidação (LPO) como formas de indicação de dano e estresse oxidativo (GOBI *et al.*, 2018).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no coração do peixe subtropical *Astyanax lacustris* submetido a estresse térmico de alta (31°C ±1) e baixa (15°C ±1) temperatura durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.

2.2 Objetivos específicos

- Investigar a atividade das enzimas de defesa antioxidante: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona S-transferase (GST), e glutathiona redutase (GR) em *A. lacustris*, submetidos durante 2,6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas a alta (31°C) e baixa (15°C) temperaturas;
- Avaliar as alterações existentes nos marcadores de dano celular: lipoperoxidação (LPO) e glutathiona reduzida (GSH) em *A. lacustris*, submetidos durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas a alta (31°C) e baixa (15°C) temperaturas;

- Comparar as respostas das defesas oxidantes no coração de *A. lacustris* submetidos a alta (31°C) e baixa (15°C) temperatura durante 2,6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostragem e aclimação da espécie testada *A. lacustris*

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

Espécimes de *A. lacustris* (n= 280; comprimento $6,17 \pm 0,87$ cm e peso $9,15 \pm 3,4$ g) foram capturados por redes de pesca (tecido de multifilamento, malha de 12 mm entre os nós) em lagos artificiais do Centro de Pesquisa e Extensão em Aquicultura Ildo Zago, situados no município de União da Vitória - PR ($26^{\circ}13'12.15''S$; $51^{\circ}7'51.07''O$) ($26^{\circ}13'12.2''S$; $51^{\circ}07'51.1''W$). Na piscicultura, os peixes foram mantidos em lagos artificiais por aproximadamente 60 dias.

Após a coleta, os peixes foram levados para tanque de 830 litros, no qual permaneceram durante três dias (72 horas), em temperatura de $23^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ (BUENO-KRAWCZYK *et al.*, 2015; LERMEN *et al.*, 2004), para aclimação e recuperação do estresse da captura (FORGATI *et al.*, 2017; PEREIRA-DA-SILVA; OLIVEIRA, 2017; SCHLEGER *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2018). A água utilizada para o abastecimento do tanque era de nascente própria, com vazão contínua de 4 L/min com temperatura controlada de $23^{\circ}C \pm 0,5$. Foi utilizado o fotoperíodo de

aproximadamente 13:30 horas luz/10:30 horas escuro (BAGNYUKOVA *et al.*, 2007; LIRA *et al.*, 2018; NAVARRO *et al.*, 2014).

Durante a aclimação dos peixes, foram monitoradas as condições físico-químicas da água: oxigênio dissolvido ($9,31 \pm 2,17$ mg/L), amônia tóxica (NH_3) ($0,009 \pm 0,004$ mg/L), pH ($7,4 \pm 0,31$), nitrato (0,00 mg/L), nitrito (0,00 mg/L), dureza (75 ± 9 mg/L de CaCO_3) e a ausência de cloro residual.

3.2 Delineamento experimental

Espécimes de *A. lacustris*, após aclimação, foram separados randomicamente e transferidos diretamente para aquários com água nas temperaturas de $15^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (baixa temperatura) ou $31^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ (alta temperatura) (LERMEN *et al.*, 2004). A densidade máxima foi de dez peixes por 50 litros de água ou 1,8 g de peixe/L de água (VIEIRA; CORREIA; MOREIRA, 2013). Cada grupo experimental estava dividido em dois aquários com cinco peixes, onde cada aquário é considerado uma réplica, ou seja, o meio experimental, cada peixe é considerado a unidade experimental e os biomarcadores são considerados as unidades observacionais (TINCANI *et al.*, 2017). Os peixes foram mantidos nas temperaturas experimentais (15°C ou 31°C) durante 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Para cada grupo experimental, havia o respectivo controle a $23^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Os aquários eram sistemas estáticos, limpos por sucção a cada 48h, com cerca de 50% da água renovada (experimentos acima de 24 horas de exposição), e originária de nascente própria. Foram instalados, previamente, nos aquários termostatos eletrônicos submersos (Aqua One, VigoAr e Atman, com potência de 100W), para a regulação e controle da temperatura. Para a temperatura de 15°C , os

espécimes foram alocados em aquários no interior de um refrigerador horizontal (Consul/530 L), com controlador digital de temperatura (TC-900E POWER/07).

Os espécimes foram alimentados diariamente com ração comercial para peixes (Supra® Aqua Line com teor de proteína de 42 %) em uma proporção de 1% do peso animal (LERMEN *et al.*, 2004). Para todos os grupos, o primeiro dia de aclimação foi o primeiro dia do fornecimento de alimentos e a última alimentação foi fornecida entre 22 e 24 horas antes da eutanásia (ROSSI; BACCHETTA; CAZENAVE, 2017). *A. lacustris* e outras espécies pertencentes do gênero esvaziam seu sistema gastrointestinal em um período de 24-48h, evitando interferências do estado nutricional nos resultados.

Ao final de cada experimento, os peixes foram anestesiados com 20 mg. L⁻¹ de benzocaína e eutanasiados por secção medular, sendo, imediatamente, dissecados e o miocárdio coletado e mantido em nitrogênio líquido, a temperatura de -196 °C. As amostras foram processadas no Laboratório de Biologia Adaptativa - Departamento de Biologia Celular - Setor de Ciências Biológicas - UFPR.

3.3 Procedimentos analíticos

Após pesagem, houve a homogeneização das amostras de miocárdio, em tampão Tris-HCl (50 mM, pH 7,4) utilizando-se um homogeneizador motorizado da marca Potter-Elvehjem. Em seguida as amostras foram centrifugadas a temperatura de 4°C a 12.000 g por um período de 20 minutos, obtendo-se, assim, os sobrenadantes.

A concentração de proteínas das amostras foi mensurada pelo método de Bradford, usando Coomassie Brilliant Blue G-250 e albumina de soro bovina (BSA) como padrão.

Os níveis de marcadores e as atividades enzimáticas foram determinados por espectrofotometria feita na leitora de microplacas (EPOCH Microplate Spectrophotometer, Biotek, Winooski, VT, USA). A atividade enzimática foi expressa em unidade internacional, onde 01 U equivale a 01 μmol de substrato convertido em produto por minuto.

3.3.1 Determinação da atividade das enzimas do sistema de defesa antioxidante

A determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) ocorreu em sistema de reação com tampão carbonato de sódio (pH 10,2). A absorbância foi lida em 560 nm (CROUCH; GANDY; KINSEY, 1981). Determinou-se a atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6) em reação com tampão Tris-HCl (pH 8,0), a 240 nm de leitura de absorbância (AEBI, 1984). A avaliação da atividade da glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) ocorreu em reação com tampão fosfato de potássio (pH 6,5) com 340 nm de leitura de absorbância (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976). A avaliação da atividade enzimática da glutathione peroxidase (GPx, EC 1.11.1.9) foi feita em sistema de reação com tampão fosfato de sódio (pH 7,0), empregando leitura de absorbância a 340 nm (WENDEL, 1981). Já a determinação da atividade enzimática da glutathione redutase (GR, EC 1.8.1.7) foi feita mediante sistema de reação com tampão fosfato de potássio (pH 7,6), cuja leitura de absorbância ocorreu a 340 nm (SIES *et al.*, 1979). Maiores informações sobre as metodologias empregadas podem ser visualizadas na Tabela 1.

TABELA 1 - MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES ENZIMAS ANTIOXIDANTES

| Enzima | EC | Método de observação | Abs | Componentes do sistema de reação | Referência |
|--------|----------|---------------------------------------------|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| SOD | 1.15.1.1 | Redução do NBT | 560 | Carbonato de sódio (pH 10,2) 91 mM, EDTA 17.5 µM, NBT 0,1 mM e cloreto de hidroxilamina 37 mM. | (CROUCH <i>et al.</i> , 1981) |
| CAT | 1.11.1.6 | Degradação do H ₂ O ₂ | 240 | Tris (pH 8,0) 50 mM e H ₂ O ₂ 30 mM | (AEBI, 1984) |
| GST | 2.5.1.18 | Formação do tioéster GS-DNB | 340 | Fosfato de potássio (pH 6,5) 85,5 mM, GSH 1,36 mM e CDNB 2,7 Mm. | (KEEN; HABIG; JAKOBY, 1976) |
| GR | 1.8.1.7 | Oxidação do NADPH | 340 | Fosfato de potássio (pH 7,6) 100 mM em EDTA 5mM, NADPH 0,5 mM e GSSG mM. | (SIES <i>et al.</i> , 1979) |

Legenda: Para cada enzima é apresentado o EC (do inglês Enzyme Commission Numbers), o método de observação referente ao que é detectado durante a espectrofotometria, realizado em um determinado comprimento de onda definido pela absorvância (abs). Também são apresentados os componentes do sistema de reação e a referência utilizada como base para a metodologia da enzima. SOD – superóxido dismutase, CAT – catalase, GST – glutathione S-transferase, GPx, glutathione peroxidase e GR – glutathione reductase.

3.3.2 Determinação dos marcadores de danos oxidativos e da concentração de glutathione reduzida (GSH)

A determinação dos níveis tanto de glutathione reduzida (GSH) quanto de outros tióis ocorreu pela precipitação de proteínas e reação posterior de tióis não proteicos com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), o que gerou um produto com 415 nm de leitura de absorvância (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A determinação da peroxidação lipídica (LPO) foi feita pela contagem dos produtos da peroxidação lipídica, empregando a leitura de absorvância a 535 nm pelo método de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) conforme se pode observar na tabela 2 a seguir.

TABELA 2 - MÉTODOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE DANOS CELULARES E GSH

| Biomarcador | Método de observação | Abs (nm) | Padrão | Referência |
|-------------|-------------------------------------|----------|--------|---------------------------------|
| LPO | MDA reativo ao TBARS | 535 | MDA | (FEDERICI <i>et al.</i> , 2007) |
| GSH | Tióis não protéicos reativo ao DTNB | 415 | GSH | (SEDLAK; LINDSAY, 1968) |

Legenda: Para cada biomarcador é apresentado o método de observação referente ao que é detectado durante espectrofotometria, realizado em um determinado comprimento de onda definido pela absorvância (abs), o padrão utilizado como referência (traço - indica ausente), os componentes do sistema de reação e a referência utilizada como base para a metodologia do biomarcador. LPO – lipoperoxidação e GSH – glutathione reduzida.

3.3.3 Análises estatísticas

Os dados dos biomarcadores avaliados foram previamente transformados utilizando o sistema box-cox (BOX; COX, 1964), para atender os pressupostos da análise de variância (ANOVA), com a utilização do pacote MASS (RIPLEY *et al.*, 2021).

O teste de Levene foi o primeiro ao qual os dados foram submetidos, objetivando avaliar a homogeneidade das amostras, depois de verificada a distribuição normal dos dados pelo teste de normalidade ShapiroWilk. Uma análise de variância de dois fatores (ANOVA *two-way*) foi feita para avaliar o efeito das duas variáveis independentes, tempo de exposição (2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas) e temperatura (15°C, 23°C e 31°C), assim como a existência de qualquer relação entre elas e o biomarcador em questão, em relação a variável dependente. O pós-teste de Tukey foi realizado, a fim de comparar as médias e identificar como a variação ocorreu. Para isso, o nível de significância de 5% foi utilizado e os dados foram apresentados em média e erro padrão da média.

A abordagem do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) foi aplicada para entender as relações entre os biomarcadores analisados (DEVIN *et al.*, 2014). O cálculo foi realizado através da Interface CALculate IBR, desenvolvida pelo Laboratório Interdisciplinar para Ambientes Continentais da Universidade de Lorraine, na França (CALIBRI, [s.d.]). A plataforma considera o cálculo proposto por (BELIAEFF; BURGEOT, 2002) e revisitado por (DEVIN *et al.*, 2014). Os gráficos radar foram obtidos através do pacote ggradar (BION, 2022).

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada com os pacotes factoextra (KASSAMBARA; MUNDT, 2020) e FactoMineR (LÊ; JOSSE; HUSSON, 2008) para investigar quais biomarcadores do estresse oxidativo foram importantes

descritores das temperaturas analisadas (15 °C e 31 °C). Para verificar se houve diferença nas respostas dos biomarcadores entre as temperaturas foi utilizada a análise multivariada da variância (MANOVA) com o teste de Pillai ($p < 0,05$). A diferença entre os grupos foi investigada a partir do teste *post hoc* de Tukey ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

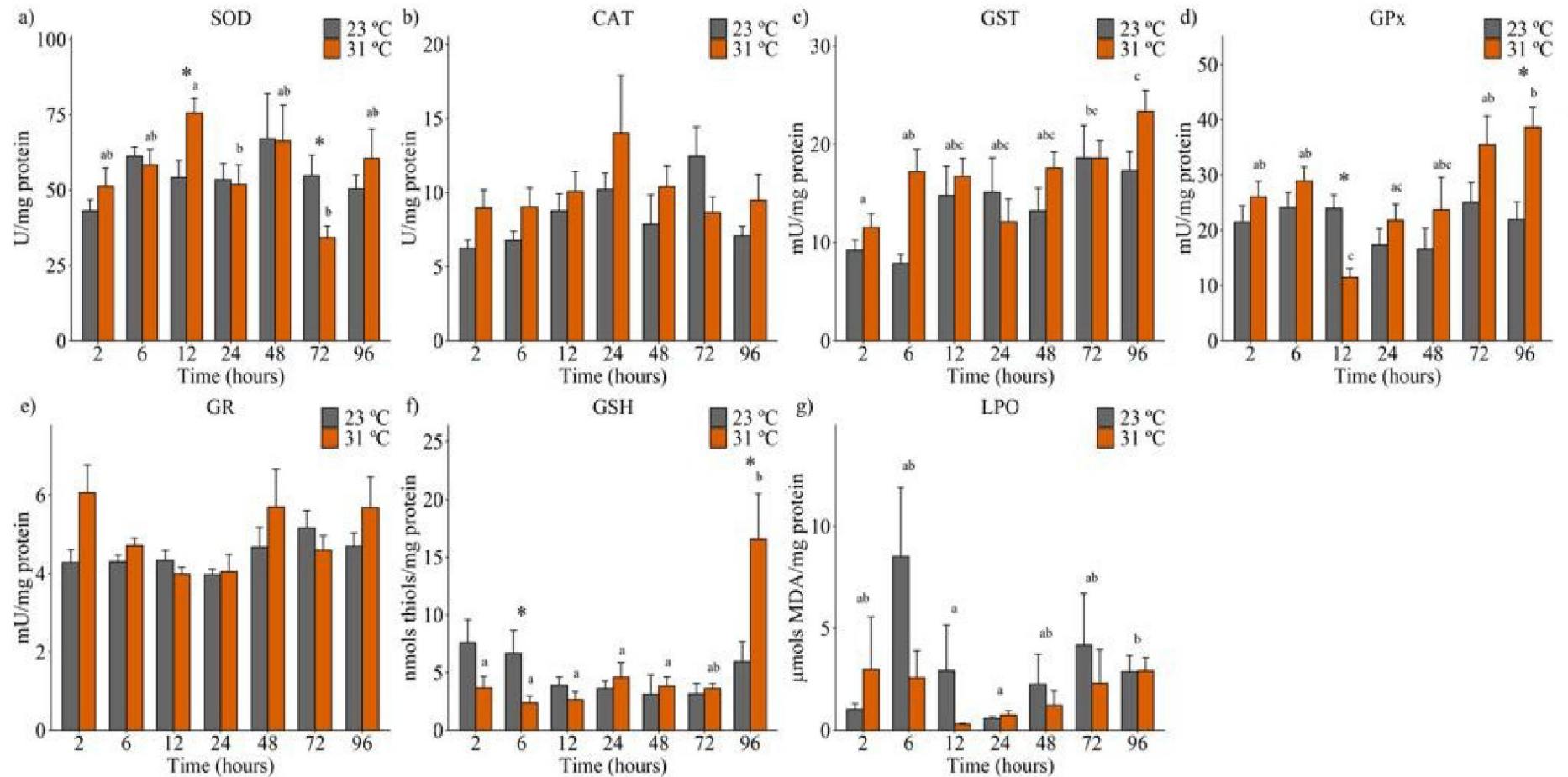
Ao longo do experimento foram observadas 9 mortes (3,9 %) nos peixes, ocorridas nos grupos controles (7 peixes) e tratamento à 15 °C (2 peixes). Observou-se que os peixes mantidos à 15 °C apresentaram baixa atividade natatória e pouca ingestão de alimentos, enquanto os peixes à 31 °C apresentaram maior atividade natatória e se alimentaram imediatamente após a oferta de alimento, consumindo-o totalmente.

4.1. Efeito do choque térmico de alta e baixa temperatura sobre o miocárdio de *A. lacustris*

A exposição de *A. lacustris* à temperatura de 31 °C, promoveu modificações na atividade das enzimas do sistema antioxidante. Foi observado um aumento da enzima SOD no tempo de 12 horas ($p= 0,0114$) e uma redução no tempo de 72 horas ($p= 0,0237$) (FIGURA 3A). Para a enzima GPx na temperatura de 31°C observou-se uma diminuição em sua atividade no tempo de 12 horas ($p= 0,0025$) e um aumento no tempo de 96 horas ($p= 0,0023$) (FIGURA 3D). Adicionalmente para o marcador GSH foi encontrado redução e posteriormente um aumento da concentração nos tempos de 6 horas ($p= 0,0134$) e 96 horas ($p= 0,0040$) respectivamente (FIGURA 3F). Os marcadores CAT, GST, GR e LPO não

apresentaram alterações na temperatura de 31°C quando comparados com a temperatura controle de 23°C (FIGURA 3A).

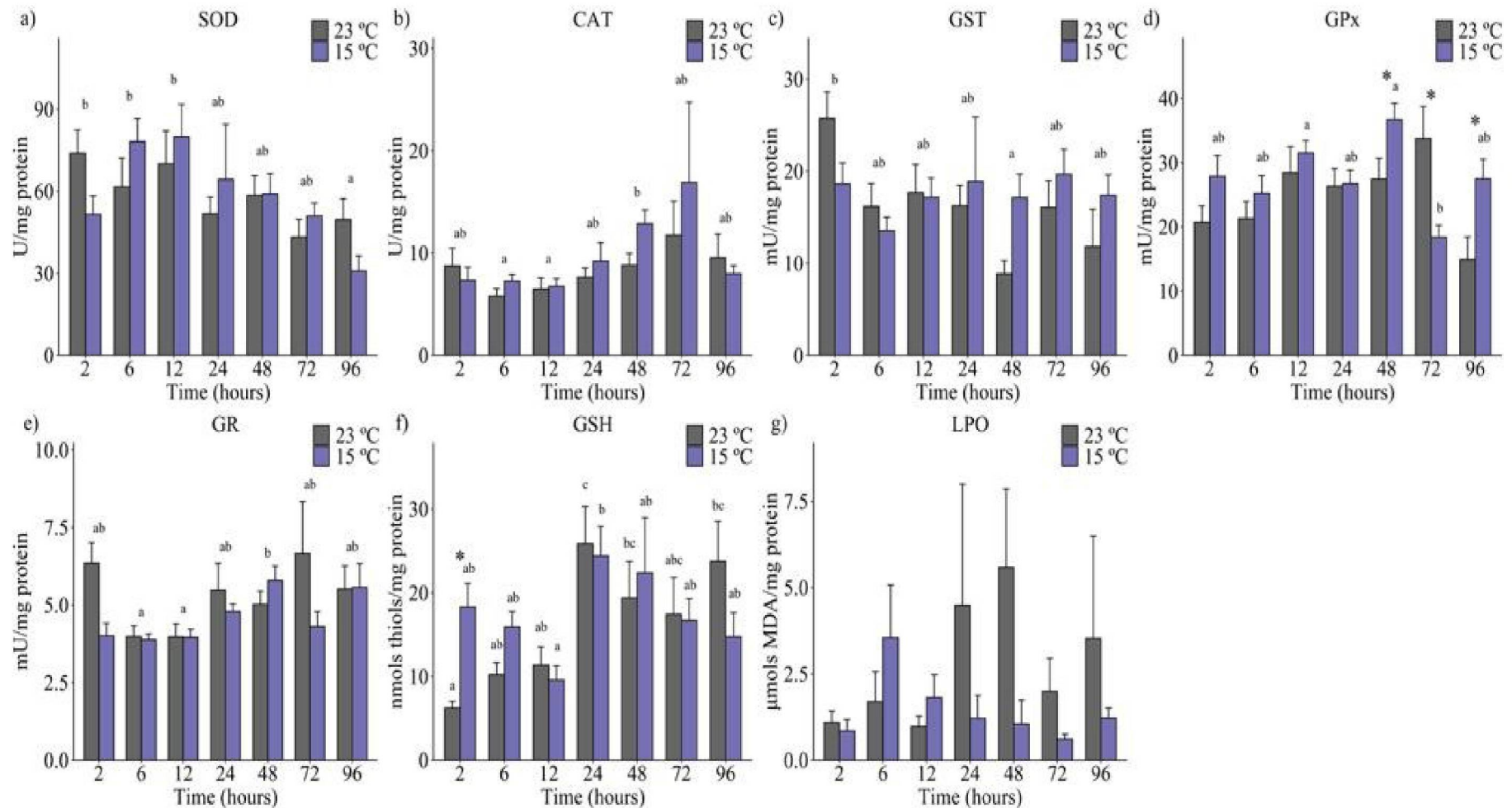
FIGURA 4 - ATIVIDADE DE ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS EXPOSIÇÃO AO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



LEGENDA: Atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em miocárdio de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao choque térmico de alta temperatura (31°C). a- superóxido dismutase (SOD), b- catalase (CAT), c- glutatona S-transferase (GST), d- glutatona peroxidase (GPx), e- glutatona redutase (GR), f- glutatona reduzida (GSH) e g- lipoperoxidação (LPO). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, já as letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição (p < 0,05). FONTE: o autor

Considerando a temperatura de 15°C, foram observadas alterações no miocárdio de *A. lacustris* alterações nos marcadores GPx e GSH. Para GPx, houve um aumento nos tempos de 48 (p= 0,0329) e 96 horas (p= 0,0454) e uma redução em 72 horas (p= 0,0024) (FIGURA 4D). Já a GSH esteve aumentada no tempo de 2 horas (p= 0,0005) (FIGURA 4F). Os marcadores CAT, SOD, GST, GR e LPO não apresentaram alterações na temperatura de 15°C quando comparados com a temperatura controle de 23°C (FIGURA 4).

FIGURA 5 - ATIVIDADE DE ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO APÓS EXPOSIÇÃO AO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



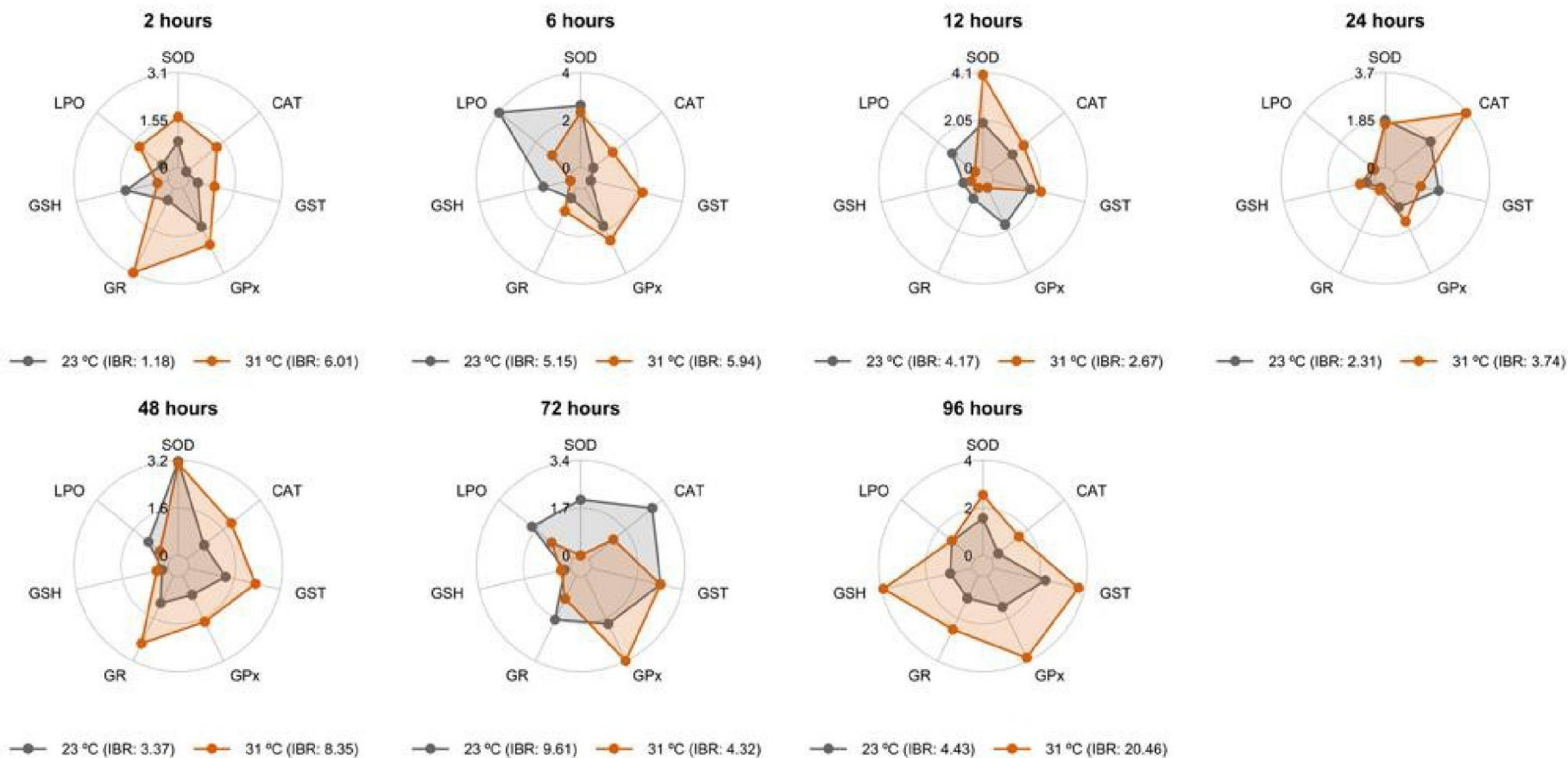
LEGENDA: Atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em miocárdio de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao choque térmico de baixa temperatura (15°C). a- superóxido dismutase (SOD), b- catalase (CAT), c- glutiona S-transferase (GST), d- glutiona peroxidase (GPx), e- glutiona redutase (GR), f- glutiona reduzida (GSH) e g- lipoperoxidação (LPO). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos, já as letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os tempos de exposição ($p < 0,05$). Fonte: o autor.

4.2. Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) para o choque térmico de alta e baixa temperatura no miocárdio de *A. lacustris*

Foram construídos *starplots* relacionando os diferentes marcadores de estresse oxidativo no miocárdio de *A. lacustris* nas duas temperaturas avaliadas 31°C e 15°C conforme estão apresentados nas FIGURAS 5 e 6 respectivamente.

Para a temperatura de 31°C os marcadores mais responsivas de acordo com o tempo avaliado foram: LPO, SOD, CAT, GST, GPx e GR no período de 2 horas; CAT, GST, GPx e GR em 6 horas; SOD, CAT, GST em 12 horas; CAT e GPx em 24 horas; CAT, GST, GPx; GR e GSH em 48 horas; GPx e GSH EM 72 horas e LPO, SOD, CAT, GST, GPx, GR e GSH em 96 horas (FIGURA 5).

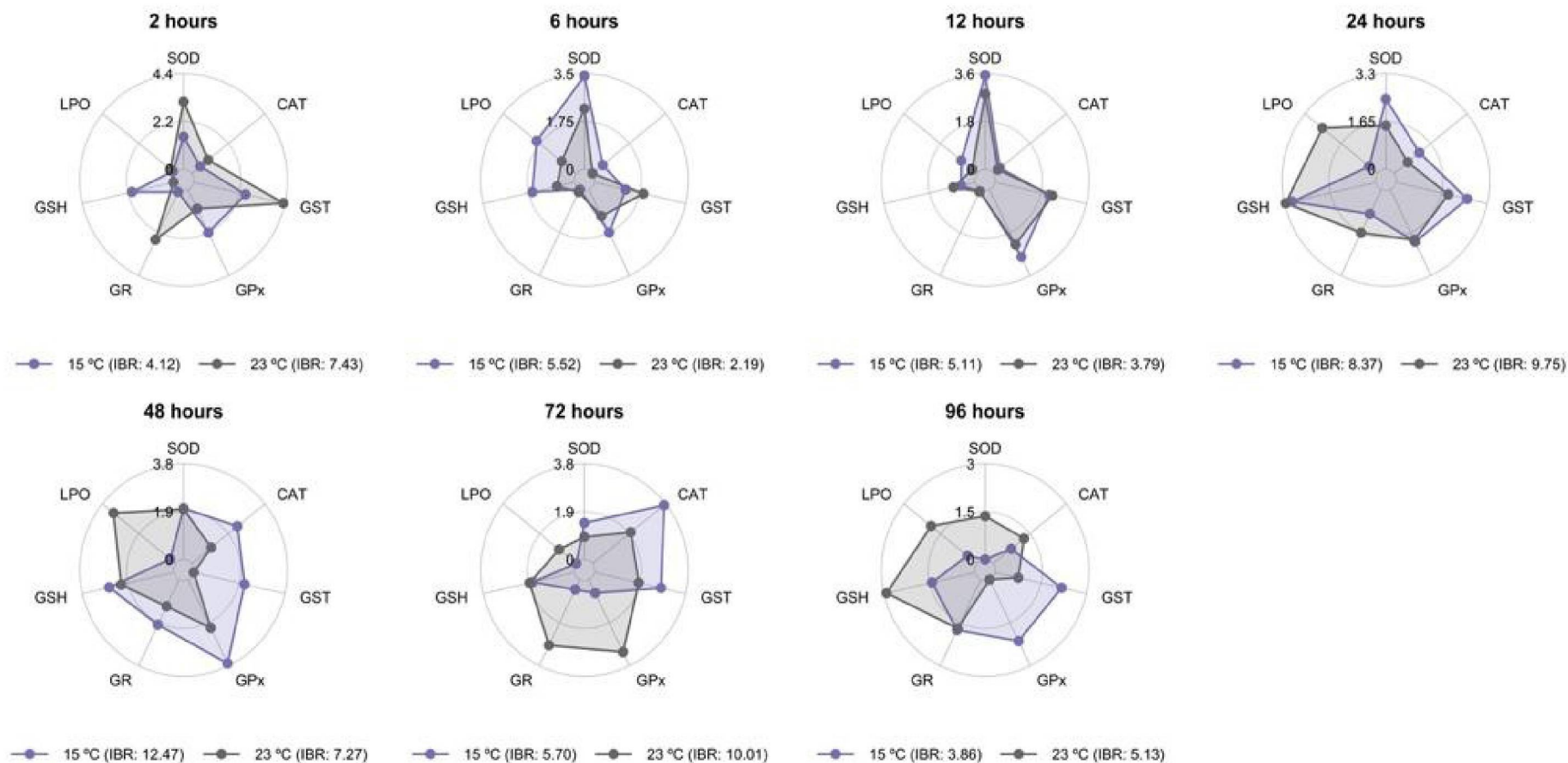
FIGURA 6 - VALORES DO ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTAS DE BIOMARCADORES (IBR) APÓS EXPOSIÇÃO AO CHOQUE TÉRMICO DE ALTA TEMPERATURA



LEGENDA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) do miocárdio de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao choque térmico de alta temperatura (31°C). SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutathiona S-transferase, GPx- glutathiona peroxidase, GR- glutathiona redutase, GSH- glutathiona reduzida e LPO- lipoperoxidação. Fonte: o autor.

Para a temperatura de 15°C os marcadores mais responsivas foram: GPx e GSH em 2 horas; LPO, SOD, GPx e GSH em 6 horas; LPO, SOD, GPx em 12 horas; SOD, CAT e GST em 24 horas; SOD, CAT, GST, GPx, GR e GSH em 48 horas; SOD, CAT, GST em 72 horas e GST, GPx e GR em 96 horas (FIGURA 6).

FIGURA 7 - VALORES DO ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTAS DE BIOMARCADORES (IBR) APÓS EXPOSIÇÃO AO CHOQUE TÉRMICO DE BAIXA TEMPERATURA



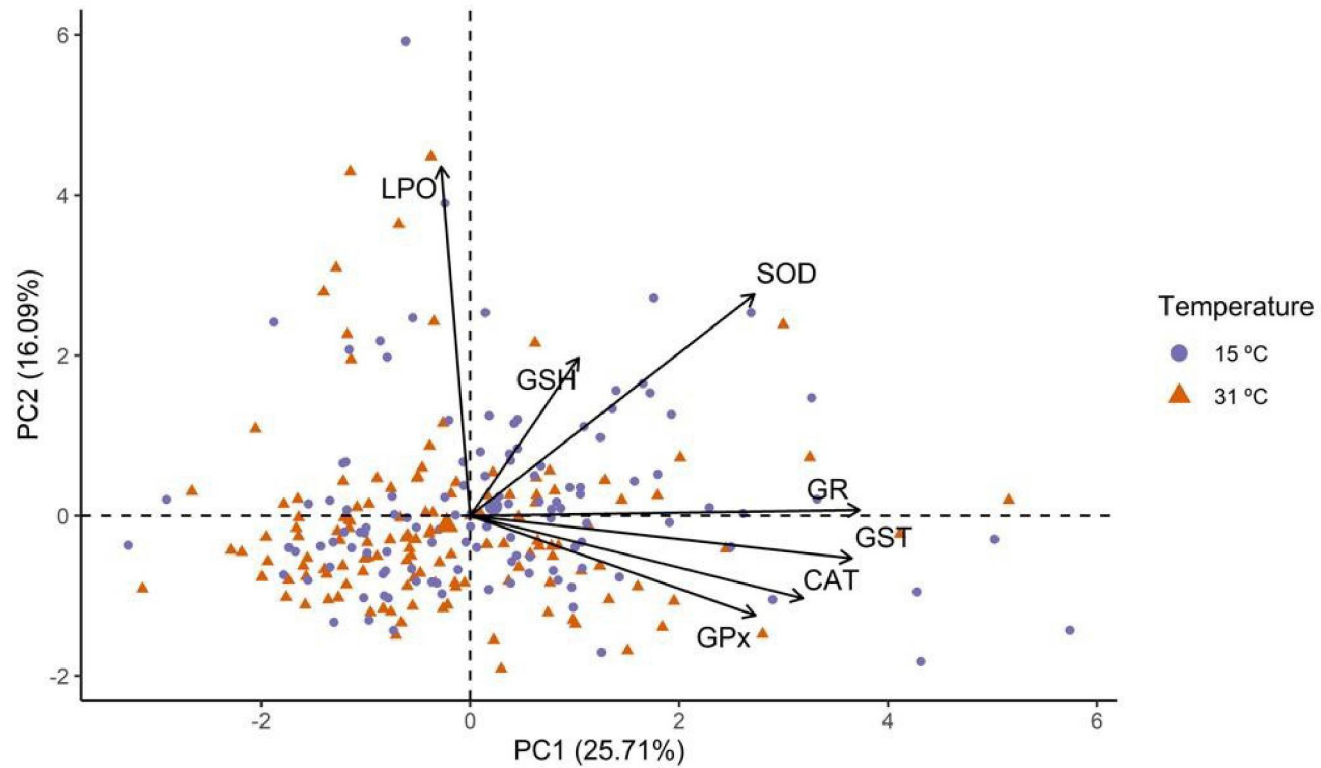
LEGENDA: Valores do Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR) do miocárdio de *Astyanax lacustris* após 2, 6, 12, 24, 48, 72 e 96 horas de exposição ao choque térmico de alta temperatura (15°C). SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutationa S-transferase, GPx- glutationa peroxidase, GR- glutationa redutase, GSH- glutationa reduzida e LPO- lipoperoxidação. Fonte: o autor.

4. 3. Respostas dos biomarcadores de estresse oxidativo entre temperaturas no miocárdio de *A. lacustris*

A PCA de 41,8% apresentada na FIGURA 7 sumariza os níveis de diferentes enzimas do estresse oxidativo nas temperaturas estudadas, 15 °C e 31 °C. O eixo x representa 25,71% e o eixo y 16,09% da variação dos dados. Os marcadores LPO, SOD, GSH e GR estão mais associados a temperatura de 15 °C e as enzimas GST, CAT e GPx estão associados a alta temperatura (31 °C).

A MANOVA com teste de Pillai mostrou-se estatisticamente significativa ($p < 0,001$), bem como a ANOVA univariada para GST ($p = 0,0422$) e GSH ($p < 0,001$), no entanto, os demais marcadores avaliados não apresentaram diferentes respostas entre as temperaturas de 15 °C e 31°C. A LPO apresentou correlação de Spearman positiva para GSH ($R = 0,21$, $p = 0,0381$) em alta temperatura (31 °C) e para SOD ($R = 0,24$, $p = 0,0095$) em baixa temperatura (15 °C).

FIGURA 8 - BIPLLOT DA ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA) PARA AS TEMPERATURAS DE 31 °C E 15 °C



LEGENDA: Biplot da análise de componentes principais (PCA) de marcadores do estresse oxidativo do miocárdio de *Astyanax lacustris* para as temperaturas de 31 °C e 15 °C. SOD- superóxido dismutase, CAT- catalase, GST- glutationa S-transferase, GPx- glutationa peroxidase, GR- glutationa redutase, GSH- glutationa reduzida e LPO- lipoperoxidação. Fonte: o autor.

5. DISCUSSÃO

As mudanças na temperatura ambiental têm impactos significativos na fisiologia dos peixes ectotérmicos, influenciando aspectos como consumo de alimentos, sobrevivência, crescimento, reprodução, comportamento e distribuição (ISLAM; KUNZMANN; SLATER, 2022). Estudos relatam casos de mortalidade em massa de peixes durante extremos de inverno e verão, afetando a homeostase fisiológica, regulação osmótica e iônica (MADEIRA; VINAGRE; DINIZ, 2016; SHIN *et al.*, 2018).

Neste trabalho a taxa de mortalidade observada durante os bioensaios foi de 3,9%, índice considerado baixo para condições experimentais (ALMEIDA; GRAVATO; GUILHERMINO, 2015). Provavelmente as mortes ocorreram por influência de fatores fisiológicos individuais, uma vez os fatores abióticos intrínsecos do experimento (O_2 dissolvido, amônia e pH), foram testados e estavam adequados durante todo o experimento. Além disso, ao longo dos tempos de exposição, foram observadas algumas alterações significativas nos marcadores utilizados neste estudo, no entanto acredita-se que o ciclo circadiano possa ter influenciado tais mudanças (BALASCH; TORT, 2019). O sistema circadiano nos organismos é responsável pela organização temporal de processos fisiológicos, como a regulação hormonal de melatonina e cortisol, por exemplo (ISORNA *et al.*, 2017). A melatonina, além de estar envolvida em processos de sono e vigília, é capaz de neutralizar radicais livres e induzir o aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como GPx, SOD e CAT (PROKKOLA; NIKINMAA, 2018; SÁNCHEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2019).

A escassez de conhecimento sobre a fisiologia cardíaca de peixes impede generalizações sobre o efeito da temperatura nesse sistema. Grande parte da literatura abrange os efeitos toxicológicos (KOCALAR; CANLI; CANLI, 2023; YANG; LIM; SONG, 2020) sobre as defesas antioxidantes dos organismos, no entanto alguns estudos com peixes mostraram que a temperatura também pode causar alterações no sistema de defesa antioxidante em diversos tecidos (CARNEY ALMROTH *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2014; MUELLER *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2018). Nesse contexto, os resultados encontrados neste trabalho para as temperaturas testadas (15°C e 31°C), mostraram que no coração de *A. lacustris* houve alterações no sistema de defesa antioxidante frente a estresse térmico.

A SOD é uma metaloenzima responsável pela decomposição de radicais superóxido em O_2 e H_2O_2 , sendo este último decomposto em O_2 e H_2O pela CAT; estas duas enzimas são fundamentais na neutralização de EROs (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Considerando esta primeira linha de defesa antioxidante, no coração de *A. lacustris*, apenas a SOD teve sua atividade aumentada em resposta ao estresse térmico de alta temperatura (31°C), sendo que em 12 horas o aumento na atividade da enzima sugere que foi necessária uma maior neutralização de íons superóxido. Era esperada uma resposta simultânea e semelhante da CAT, para a decomposição dos H_2O_2 resultantes da ação da SOD, no entanto isto não foi observado. Pesquisas sobre a atividade da CAT em resposta ao estresse térmico em diversos órgãos de peixes antárticos e subtropicais também documentaram a falta de alterações na atividade dessa enzima (MUELLER *et al.*, 2012; RATKO *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2018). Esses resultados sugerem a possibilidade de que outros sistemas de defesa antioxidante possam estar desempenhando um papel na neutralização de peróxidos.

Outra enzima capaz de neutralizar os peróxidos de hidrogênio é a GPx, mas em 12 horas (31°C) a resposta apresentada foi de redução na sua atividade, indicando assim maior susceptibilidade dos miócitos aos danos causada pelo H₂O₂. Já em 72 horas (31°C) as únicas modulações observadas foram a diminuição da SOD em 31°C e da GPx em 15°C. Estas respostas somadas à ausência de lipoperoxidação em ambas as temperaturas, pode demonstrar que os componentes basais do sistema de defesa antioxidante no tecido cardíaco de *A. lacustris*, são eficientes em eliminar peróxidos de hidrogênio durante a exposição à 31°C e a 15°C, evitando assim danos às estruturas celulares. Além disso, Schleger *et al.* (2022) também não encontraram alterações na lipoperoxidação no fígado de *A. lacustris* a 31°C. Essas constatações sugerem uma robustez na capacidade antioxidante desses organismos, mesmo diante de condições de aumento de temperatura.

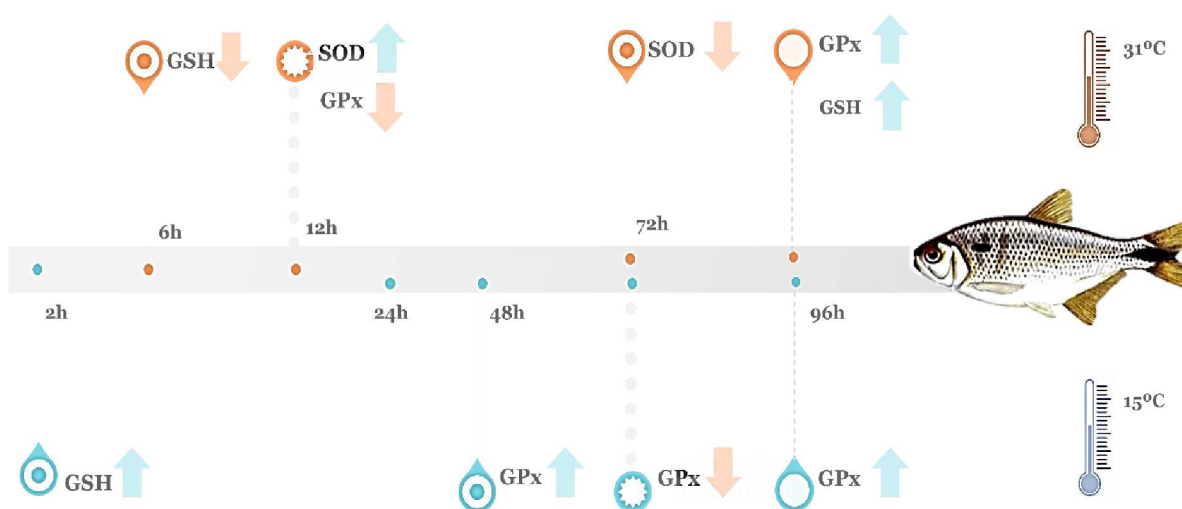
As enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e GPx, são reconhecidas por serem enzimas induzíveis em peixes, e suas atividades normalmente aumentam em resposta ao estresse oxidativo leve, atuando como uma resposta compensatória (JOY *et al.*, 2017; NAKANO *et al.*, 2014). Esse padrão é observado no cérebro e no coração de *Carassius auratus* (*goldfish*, peixes dourados) expostos ao Ni²⁺, uma vez que ambas as enzimas demonstram atividades aprimoradas em circunstâncias específicas (KUBRAK *et al.*, 2014). Mas no coração de peixes, especificamente, não é comum se observar variações na atividade de SOD com o aumento da temperatura (SOUZA *et al.*, 2018).

GST e GR também são importantes enzimas antioxidantes que estão presentes em peixes. No entanto, para um funcionamento eficiente sob condições de estresse, a GST necessita de glutathiona. A demanda por glutathiona é predominantemente atendida pela GR, pois a redução da glutathiona pela GR é

menos dispendiosa energeticamente do que a síntese de novo (KUBRAK *et al.*, 2014). A redução da atividade de GR foi observada no coração de peixes-dourados em um modelo de intoxicação por Ni²⁺ (KUBRAK *et al.*, 2014). No entanto, nesta investigação não foram encontradas alterações nas atividades enzimáticas de GR e níveis de GSH. Outro componente fundamental para o sistema de defesa antioxidante é a GSH, utilizada como substrato para conversão de composto eletrofílicos em condições fisiológicas pela GPx e GST. E os níveis citosólicos deste tiol não proteico, são dependentes de sua síntese ou da redução de glutathiona oxidada (GSSG) pela enzima GR. Para manter a homeostase os níveis de GSH normalmente se encontram maiores que os de GSSG (DEPONTE, 2013). Neste estudo, entre estas enzimas, o estresse térmico foi capaz de alterar apenas a atividade da GPx e os níveis de GSH, sendo que em 31°C ambos os marcadores foram modulados positivamente em 96 horas, demonstrando um aumento na demanda por defesas antioxidantes a fim de evitar danos em componentes celulares. Já em 15°C houve modulações da GPx a partir de 48 horas e uma alteração isolada de GSH em 2 horas.

As respostas encontradas neste trabalho para os marcadores utilizados, corroboram o que vários estudos têm demonstrado; as respostas do sistema de defesa antioxidante ao estresse térmico são específicas em relação ao órgão, espécie, temperatura e tempo de duração (SCHLEGER *et al.*, 2022, 2024). A FIGURA 8 esquematiza resumidamente, em forma de linha do tempo as alterações encontradas nas enzimas relacionadas ao estresse oxidativo no coração de *A. lacustris*.

FIGURA 9 - LINHA DO TEMPO DAS ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NAS ENZIMAS RELACIONADAS AO ESTRESSE OXIDATIVO EM *Astyanax lacustris*



LEGENDA: Linha do tempo das alterações encontradas nas enzimas relacionadas ao estresse oxidativo em *A. lacustris* submetidos a alta (31°C) e baixa (15°C) temperatura. As setas vermelhas e azuis indicam redução e aumento das atividades enzimáticas, respectivamente. GPx - glutathiona peroxidase; SOD - superóxido dismutase; GSH - glutathiona. h – Horas. Fonte: o autor

Vale ressaltar que mesmo em *A. lacustris*, diversas respostas foram apresentadas por outros órgãos expostos ao estresse térmico. Por exemplo, no fígado em 31°C houve o aumento de CAT, GST e GSH após 72 horas indicando que o sistema de defesa antioxidante foi capaz de responder a um possível aumento na formação de EROs causada pelo estresse térmico de alta temperatura (SCHLEGER *et al.*, 2022). No músculo de *A. lacustris* a 15 °C, houve um aumento na atividade de GR e um aumento nos níveis de proteínas carboniladas, indicando a ocorrência de estresse oxidativo, enquanto em altas temperaturas houve um aumento pontual de GR em 24 horas de exposição (PEREIRA *et al.*, 2023). Já no cérebro do referido peixe a 31°C, as enzimas mais responsivas foram GPx, G6PDH e GSH (RATKO *et al.*, 2022). Interessante que o resultado encontrado para GPx no cérebro foi similar ao encontrado neste estudo, onde GPx esteve reduzida em 12 horas e aumentada em 96 horas na temperatura de 31°C, houve também ausência de lipoperoxidação. Esses resultados corroboram a evidência que *A. lacustris* possui um sistema

eficiente de defesa antioxidante com a capacidade de se aclimatar às temperaturas testadas (RATKO *et al.*, 2022). Além disso, em *A. lacustris*, o órgão que foi mais responsivo em relação ao sistema de defesa antioxidante foram as brânquias (SCHLEGER *et al.*, 2024), corroborando outros estudos que analisaram diversos órgãos do mesmo animal (RESENDE *et al.*, 2022).

A ausência de alterações observadas neste estudo no coração de *A. lacustris*, comparado aos outros órgãos, pode demonstrar maior capacidade antioxidante deste tecido em relação aos outros tecidos uma vez que o impacto do estresse térmico no coração não se limita apenas à demanda crescente por oxigênio; ele também tem implicações significativas no funcionamento desse órgão, que é considerado o mais suscetível a variações de temperatura (SOUZA *et al.*, 2018). Alguns estudos têm relacionado as respostas antioxidantes às modulações de proteínas de choque térmico (HSPs). As HSPs atuam como sensores de alterações redox nas células, e ativam enzimas como a SOD, CAT e outras peroxidases, além de estimular processos que mantêm a integridade das membranas mitocondriais (MADEIRA *et al.*, 2013). Inclusive os níveis constitutivos de HSP70, aumentariam antecipadamente nos tecidos em preparação ao estresse térmico (VINAGRE *et al.*, 2021). Ainda para altas temperaturas (31°C) os valores de IBR do coração de *A. lacustris* mostraram maior mobilização de enzimas do sistema antioxidante nos períodos de 2, 48 e 96 horas, havendo também uma correlação positiva entre LPO e GSH nessa temperatura.

Outro ponto a ser considerado ao analisarmos o conjunto de respostas (SOD, CAT, GPX e LPO), principalmente em relação à possível susceptibilidade do coração em 12 horas a 31°C, é que vários autores sugerem que os níveis de peróxidos lipídicos podem atuar como moléculas sinalizadoras que iniciariam respostas de

HSPs e outros mecanismos celulares a fim de ajustar a extensão da termo-sensibilidade celular (LIU *et al.*, 2020; MADEIRA *et al.*, 2021). Este mecanismo seria possível quando o estresse oxidativo permanece abaixo do nível limite de causar danos celulares, ou quando o animal é mais resistente à lipoperoxidação (MUNRO; BLIER, 2012) e neste caso um processo de aclimação é induzido a fim de alcançar a homeostase fisiológica. É um processo temporário e pode durar até 3 semanas (MADEIRA *et al.*, 2021).

Como uma resposta clássica ao estresse térmico é esperado que diversos tecidos de peixes aumentem os níveis de suas defesas antioxidantes (DISSANAYAKE *et al.*, 2011; (DIAS *et al.*, 2019; FONSECA *et al.*, 2011; MADEIRA *et al.*, 2013; VINAGRE *et al.*, 2012). No entanto, espécies que ocupam nichos térmicos diferentes irão apresentar picos distintos de biomarcadores ao longo do processo de aclimação (MADEIRA *et al.*, 2013). Peixes marinhos que vivem em ambientes rochosos, por exemplo, estão expostos a poças de água criadas nos habitats entre marés, nas quais, durante o verão a temperatura alcança altos níveis (MADEIRA *et al.*, 2017). Em condições naturais, as temperaturas da água no rio Iguaçu variam entre 15,5 °C a 28,8°C (NARDELLI *et al.*, 2016). Em ambientes aquáticos a diminuição da temperatura da água está ligada a variações rápidas no calor solar, à renovação da água em lagoas e reservatórios, à mudanças sazonais e à eventos climáticos. Essas baixas temperaturas têm o potencial de causar estresse e comprometer fisiologicamente os organismos (DONALDSON *et al.*, 2008; PANASE; SAENPHET; SAENPHET, 2018). No entanto, no presente estudo o coração de *A. lacustris* mostrou-se tolerante também ao estresse térmico de baixas temperaturas (15°C).

Processo semelhante é visualizado em humanos nas cirurgias cardíacas. A utilização de baixas temperaturas, conhecida como hipotermia, durante esse tipo de cirurgia oferece um benefício protetor significativo para o coração. Essa abordagem visa diminuir o metabolismo do músculo cardíaco, proporcionando uma redução na demanda de oxigênio e, conseqüentemente, minimizando os danos causados pela isquemia durante procedimentos cirúrgicos. A hipotermia facilita intervenções delicadas com menor risco de lesões ao tecido cardíaco. Essa técnica tem sido uma ferramenta valiosa para garantir a segurança e o sucesso de cirurgias cardíacas, contribuindo para a preservação da função cardíaca e a recuperação bem-sucedida dos pacientes (BAIKOUSSIS *et al.*, 2015).

É comum utilizar uma bateria de biomarcadores para avaliar efeitos da exposição a alguma condição nociva na resposta ao estresse. Considerando a dificuldade de unir os dados em uma única análise, Beliaeff e Burgeot (2002) propuseram o Índice Integrado de Respostas de Biomarcadores (IBR do inglês - Integrated Biomarker Response). O índice IBR já foi estudado em análises com diversos biomarcadores para investigar a influência de vários componentes, como poluição ambiental, contaminação, concentração de metais, temperatura, acidificação, entre outros fatores, ao comparar diferentes locais (BAAG; MAHAPATRA; MANDAL, 2021; DAMIENS *et al.*, 2007; KAMEL *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2011). Por exemplo, Vieira *et al.* (2014) examinaram *A. lacustris* em diferentes ambientes quanto à sua suscetibilidade à contaminação por pesticidas. O índice serviu como uma ferramenta crucial, correlacionando positivamente os valores do IBR com o grau de interferência humana nessas áreas (VIEIRA *et al.*, 2014). Também foi eficaz para avaliar respostas ao comparar temperaturas em vez de locais (DIAS *et al.*, 2020; MADEIRA *et al.*, 2018; MAULVAULT *et al.*, 2019). Madeira

et al. (2016) observaram que o tempo de exposição mais responsivo (como um aumento significativo nos níveis de biomarcadores) foi de 7 dias sob alta temperatura. Isso foi respaldado pelos resultados do índice IBR, que apresentou valores mais altos sob alta temperatura em comparação com o grupo de controle (MADEIRA *et al.*, 2016).

Com base nessas informações, neste estudo, propôs-se o uso do IBR para examinar as variações nos biomarcadores, através da comparação de temperaturas. Os valores do IBR foram analisados quanto à sua associação com variações individuais em enzimas, alinhando-se com a tendência metabólica de cada via observada. Os resultados do IBR corroboraram com diversas alterações nos biomarcadores avaliados neste estudo como, por exemplo, o aumento de GPx e GSH a 31°C no tempo 96 horas e os aumento e redução de GPx a 15°C nos tempos 48 e 72 horas, respectivamente. Adicionalmente, os gráficos de radar com dados intermediários do índice IBR revelaram-se uma maneira interessante de apresentar os resultados, onde a área representa o valor do índice IBR, esclarecendo como a via metabólica se comporta em cada período de exposição.

Neste estudo, a análise de PCA não conseguiu agrupar eficientemente as temperaturas alta e baixa para tirar conclusões sobre diferentes tratamentos, destacando a importância do IBR nesse contexto, ampliando a sensibilidade nas comparações considerando um conjunto de biomarcadores.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo avaliou temporalmente o sistema de defesa antioxidante de *A. lacustris* sob choque térmico de 31 °C e 15 °C. Os resultados indicam que esse sistema é eficiente com predominância no aumento de SOD (12 horas) e GPx e

também de GSH (96 horas) na temperatura de 31°C. Com relação ao estresse térmico na temperatura de 15°C a GSH (2 horas) e GPx (48, 72 e 96 horas) foram predominantes.

As poucas alterações nos componentes de defesas antioxidantes, combinadas à ausência de lipoperoxidação demonstrou que o coração foi capaz de superar os desafios impostos pelo estresse térmico de alta e baixa temperatura nos tempos propostos neste estudo. Se o estresse perdurar, talvez o sistema entre em falência.

Além disso, os gráficos de radar e os valores do IBR mostraram-se aliados na análise de biomarcadores. Os resultados do IBR, em sua maioria, corroboram aqueles obtidos por meio da ANOVA para cada uma das enzimas individualmente. Assim, essa análise possibilitou a visualização das diferenças entre as temperaturas para vários biomarcadores simultaneamente, aprimorando a comparação entre as situações experimentais na avaliação do estresse oxidativo no miocárdio de *A. lacustris*, uma vez que as informações relativas a esse órgão em peixes só estão disponíveis para peixes antárticos de sangue branco.

REFERÊNCIAS

- ADAMY, Christophe *et al.* Neutral sphingomyelinase inhibition participates to the benefits of N-acetylcysteine treatment in post-myocardial infarction failing heart rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 344–353, 2007. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2007.06.010.
- AEBI, Hugo. Catalase in vitro. *Em*: [s.l: s.n.]. p. 121–126. DOI: 10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- AKAISHI, F. M. *et al.* Morphological and Neurotoxicological Findings in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax* sp.) After Waterborne and Acute Exposure to Water Soluble Fraction (WSF) of Crude Oil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 244–253, 2004. DOI: 10.1007/s00244-003-2260-1.
- ALMEIDA, Joana R.; GRAVATO, Carlos; GUILHERMINO, Lúcia. Effects of Temperature in Juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) Biomarker Responses and Behaviour: Implications for Environmental Monitoring. **Estuaries and Coasts**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 45–55, 2015. DOI: 10.1007/s12237-014-9792-7.
- ANDRADE JÚNIOR, Dahir Ramos De; SOUZA, Rodrigo Becco De; SANTOS, Sânia Alves Dos; ANDRADE, Dahir Ramos De. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S. l.], v. 31, n. 1, p. 60–68, 2005. DOI: 10.1590/S1806-37132005000100011.
- BAAG, Sritama; MAHAPATRA, Sayantan; MANDAL, Sumit. An Integrated and Multibiomarker approach to delineate oxidative stress status of *Bellamyia bengalensis* under the interactions of elevated temperature and chlorpyrifos contamination. **Chemosphere**, [S. l.], v. 264, p. 128512, 2021. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.128512.
- BAGNYUKOVA, Tetyana V.; DANYLIV, Svitlana I.; ZIN'KO, Oksana S.; LUSHCHAK, Volodymyr I. Heat shock induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. **Journal of Thermal Biology**, [S. l.], v. 32, n. 5, p. 255–260, 2007. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2007.01.014.
- BAIKOUSSIS, NikolaosG; PAPAKONSTANTINOUS, NikolaosA; VERRA, Chrysoula; KAKOURIS, Georgios; CHOUNTI, Maria; HOUNTI, Panagiotis; DEDEILIAS, Panagiotis; ARGIRIOU, Michalis. Mechanisms of oxidative stress and myocardial protection during open-heart surgery. **Annals of Cardiac Anaesthesia**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 555, 2015. DOI: 10.4103/0971-9784.166465.
- BALASCH, Joan Carles; TORT, Lluís. Netting the Stress Responses in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00062.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à aquicultura**. 2. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2009.

BAXENDALE, Sarah; VAN EEDEN, Freek; WILKINSON, Robert. The Power of Zebrafish in Personalised Medicine. **Adv Exp Med Biol**, [S. l.], v. 1007, p. 179–197, 2017. DOI: 10.1007/978-3-319-60733-7_10.

BECKER, ROBERT O.; CHAPIN, SHARON; SHERRY, RICHARD. Regeneration of the ventricular myocardium in amphibians. **Nature**, [S. l.], v. 248, n. 5444, p. 145–147, 1974. DOI: 10.1038/248145a0.

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

BENNEMANN, Sirlei Terezinha; GEALH, Ana Maria; ORSI, Mário Luís; SOUZA, Leda Maria De. Ocorrência e ecologia trófica de quatro espécies de Astyanax (Characidae) em diferentes rios da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, [S. l.], v. 95, n. 3, p. 247–254, 2005. DOI: 10.1590/S0073-47212005000300004.

BION, R. **Ggradar: Create radar charts using ggplot2**. 2022. Disponível em: <https://r-charts.com/ranking/ggradar/>. Acesso em: 13 mar. 2024.

BOURRAINDELOUP, Marie *et al.* N-Acetylcysteine Treatment Normalizes Serum Tumor Necrosis Factor- α Level and Hinders the Progression of Cardiac Injury in Hypertensive Rats. **Circulation**, [S. l.], v. 110, n. 14, p. 2003–2009, 2004. DOI: 10.1161/01.CIR.0000143630.14515.7C.

BOX, G. E. P.; COX, D. R. An Analysis of Transformations. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, [S. l.], v. 26, n. 2, p. 211–252, 1964. DOI: 10.1111/j.2517-6161.1964.tb00553.x.

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

CALIBRI. **CALculate IBR Interface**. [s.d.]. Disponível em: <https://shiny.otelo.univ-lorraine.fr/calibri/R/>. Acesso em: 28 mar. 2022.

CAPPOLA, Thomas P.; KASS, David A.; NELSON, Gregory S.; BERGER, Ronald D.; ROSAS, Gisele O.; KOBEISSI, Zouficar A.; MARBÁN, Eduardo; HARE, Joshua M. Allopurinol Improves Myocardial Efficiency in Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. **Circulation**, [S. l.], v. 104, n. 20, p. 2407–2411, 2001. DOI: 10.1161/hc4501.098928.

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

CARNIATTO, Caio Henrique de Oliveira; VIDOTTI, Ana Paula; BIANCHI, Larissa Renata de Oliveira; MELLO, Josiane Medeiros De. Morfologia e evolução do coração nos vertebrados: uma revisão. **Arquivos do Mudi**, [S. l.], v. 23, n. 3, p. 290–303, 2019. DOI: 10.4025/arqmudi.v23i3.51553.

CHENG, Chang-Hong; GUO, Zhi-Xun; LUO, Sheng-Wei; WANG, An-Li. Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 150, p. 190–198, 2018. a. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.045.

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

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**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 235–241, 1981. DOI: 10.2337/diab.30.3.235.

DAMIENS, G.; GNASSIA-BARELLI, M.; LOQUÈS, F.; ROMÉO, M.; SALBERT, V. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. **Chemosphere**, [S. l.], v. 66, n. 3, p. 574–583, 2007. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.05.032.

DAMY, Thibaud *et al.* Glutathione Deficiency in Cardiac Patients Is Related to the Functional Status and Structural Cardiac Abnormalities. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. e4871, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0004871.

DEPONTE, Marcel. Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, [S. l.], v. 1830, n. 5, p. 3217–3266, 2013. DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.09.018.

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

DIAS, Marta; FERREIRA, Ana; GOUVEIA, Raúl; MADEIRA, Carolina; JOGEE, Nadia; CABRAL, Henrique; DINIZ, Mário; VINAGRE, Catarina. Long-term exposure to increasing temperatures on scleractinian coral fragments reveals oxidative stress. **Marine Environmental Research**, [S. l.], v. 150, p. 104758, 2019. DOI: 10.1016/j.marenvres.2019.104758.

DIAS, Marta; MADEIRA, Carolina; JOGEE, Nadia; FERREIRA, Ana; GOUVEIA, Raúl; CABRAL, Henrique; DINIZ, Mário; VINAGRE, Catarina. Integrative indices for health assessment in reef corals under thermal stress. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 113, p. 106230, 2020. DOI: 10.1016/j.ecolind.2020.106230.

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

DOUGHAN, Abdulrahman K.; HARRISON, David G.; DIKALOV, Sergey I. Molecular Mechanisms of Angiotensin II–Mediated Mitochondrial Dysfunction. **Circulation Research**, [S. l.], v. 102, n. 4, p. 488–496, 2008. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.162800.

FANG, Xuexian *et al.* Loss of Cardiac Ferritin H Facilitates Cardiomyopathy via Slc7a11-Mediated Ferroptosis. **Circulation Research**, [S. l.], v. 127, n. 4, p. 486–501, 2020. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.316509.

FEDERICI, Gillian; SHAW, Benjamin J.; HANDY, Richard D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, [S. l.], v. 84, n. 4, p. 415–430, 2007. DOI: 10.1016/J.AQUATOX.2007.07.009.

FONSECA, V. F.; FRANÇA, S.; VASCONCELOS, R. P.; SERAFIM, A.; COMPANY, R.; LOPES, B.; BEBIANNO, M. J.; CABRAL, H. N. Short-term variability of multiple biomarker response in fish from estuaries: Influence of environmental dynamics. **Marine Environmental Research**, [S. l.], v. 72, n. 4, p. 172–178, 2011. DOI: 10.1016/j.marenvres.2011.08.001.

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

FORGIONE, Marc A.; CAP, Andre; LIAO, Ronglih; MOLDOVAN, Nicanor I.; EBERHARDT, Robert T.; LIM, Chee Chew; JONES, John; GOLDSCHMIDT-CLERMONT, Pascal J.; LOSCALZO, Joseph. Heterozygous Cellular Glutathione Peroxidase Deficiency in the Mouse. **Circulation**, [S. l.], v. 106, n. 9, p. 1154–1158, 2002. DOI: 10.1161/01.CIR.0000026820.87824.6A.

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

GALVAN, Gabrieli L.; LIROLA, Juliana R.; FELISBINO, Karoline; VICARI, Taynah; YAMAMOTO, Carlos I.; CESTARI, Marta M. Genetic and Hematologic Endpoints in *Astyanax altiparanae* (Characidae) After Exposure and Recovery to Water-Soluble Fraction of Gasoline (WSFG). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 63–70, 2016. DOI: 10.1007/s00128-016-1816-5.

GARBERN, Jessica C.; LEE, Richard T. **Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration**. Cell Stem Cell Press, , 2013. DOI: 10.1016/j.stem.2013.05.008.

GARCIA, Luciano de O.; OKAMOTO, Marcelo H.; RIFFEL, Ana Paula K.; SACCOL, Etiane M.; PAVANATO, Maria A.; SAMPAIO, Luís André N. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold and heat shocks. **Neotropical Ichthyology**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 607–612, 2015. DOI: 10.1590/1982-0224-20140148.

GARUTTI, V.; BRITSKI, Heraldo. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei, Characidae), com mancha umeral horizontalmente ovalada, da bacia do rio Guaporé, Amazônia. **Papéis Avulsos de Zoologia**, [S. l.], v. 40, n. 14, p. 217–229, 1997.

GNOCCHI, Karla Giavarini; BOLDRINI-FRANÇA, Johara; GOMES, Levy Carvalho; CHIPPARI-GOMES, Adriana Regina. De novo assembly and annotation of the transcriptome of *Astyanax lacustris* liver unveils candidate genes to monitor response to environmental stress. **Marine Genomics**, [S. l.], v. 54, p. 100784, 2020. DOI: 10.1016/j.margen.2020.100784.

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

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

HILL, M. F.; SINGAL, P. K. Antioxidant and oxidative stress changes during heart failure subsequent to myocardial infarction in rats. **The American journal of pathology**, [S. l.], v. 148, n. 1, p. 291–300, 1996.

HOWE, Kerstin *et al.* The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, [S. l.], v. 496, n. 7446, p. 498–503, 2013. DOI: 10.1038/nature12111.

ISLAM, Md Jakiul; KUNZMANN, Andreas; BÖGNER, Mirko; MEYER, Achim; THIELE, Rajko; JAMES SLATER, Matthew. Metabolic and molecular stress responses of European seabass, *Dicentrarchus labrax* at low and high temperature extremes. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 112, p. 106118, 2020. DOI: 10.1016/j.ecolind.2020.106118.

ISLAM, Md Jakiul; KUNZMANN, Andreas; SLATER, Matthew James. Responses of aquaculture fish to climate change-induced extreme temperatures: A review. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S. l.], v. 53, n. 2, p. 314–366, 2022. DOI: 10.1111/jwas.12853.

ISORNA, Esther; DE PEDRO, Nuria; VALENCIANO, Ana I.; ALONSO-GÓMEZ, Ángel L.; DELGADO, María J. Interplay between the endocrine and circadian

systems in fishes. **Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 232, n. 3, p. R141–R159, 2017. DOI: 10.1530/JOE-16-0330.

JANG, Sehwan; CHAPA-DUBOCQ, Xavier R.; TYURINA, Yulia Y.; ST CROIX, Claudette M.; KAPRALOV, Alexandr A.; TYURIN, Vladimir A.; BAYIR, Hülya; KAGAN, Valerian E.; JAVADOV, Sabzali. Elucidating the contribution of mitochondrial glutathione to ferroptosis in cardiomyocytes. **Redox Biology**, [S. l.], v. 45, p. 102021, 2021. DOI: 10.1016/j.redox.2021.102021.

JEWHURST, Kyle; MCLAUGHLIN, Kelly A. Beyond the mammalian heart: Fish and amphibians as a model for cardiac repair and regeneration. **Journal of Developmental Biology**, [S. l.], v. 4, n. 1, 2016. DOI: 10.3390/jdb4010001.

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

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

KAMEL, Naouel; BURGEOT, Thierry; BANNI, Mohamed; CHALGHAF, Mohamed; DEVIN, Simon; MINIER, Christophe; BOUSSETTA, Hamadi. Effects of increasing temperatures on biomarker responses and accumulation of hazardous substances in rope mussels (*Mytilus galloprovincialis*) from Bizerte lagoon. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 6108–6123, 2014. DOI: 10.1007/s11356-014-2540-5.

KASSAMBARA, A.; MUNDT, F. **Factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses**. 2020. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=factoextra>. Acesso em: 13 mar. 2024.

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

KELLY, Sue A.; HAVRILLAL', Christine M.; BRADY, Todd C.; ABRAMO, Kimberly Harris; LEVIN, Edward D. Reviews' Oxidative Stress in Toxicology: Established Mammalian and Emerging Piscine Model Systems. **Environmental health perspectives**, [S. l.], v. 106, n. 7, p. 375–384, 1998.

KHAPER, Neelam; SINGAL, Pawan K. Effects of Afterload-Reducing Drugs on Pathogenesis of Antioxidant Changes and Congestive Heart Failure in Rats. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 856–861, 1997. DOI: 10.1016/S0735-1097(96)00574-8.

KINNULA, V. L. Focus on antioxidant enzymes and antioxidant strategies in smoking related airway diseases. **Thorax**, [S. l.], v. 60, n. 8, p. 693–700, 2005. DOI: 10.1136/thx.2004.037473.

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

KOCALAR, Kadir; CANLI, Esin Gülnaz; CANLI, Mustafa. Responses of oxidative stress biomarkers of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) exposed to Cr⁶⁺, Hg²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ in differing calcium levels. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S. l.], v. 267, p. 109577, 2023. DOI: 10.1016/j.cbpc.2023.109577.

KUBRAK, Olga I.; POIGNER, Harald; HUSAK, Viktor V.; ROVENKO, Bohdana M.; MEYER, Stefanie; ABELE, Doris; LUSHCHAK, Volodymyr I. Goldfish brain and heart are well protected from Ni²⁺-induced oxidative stress. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S. l.], v. 162, p. 43–50, 2014. DOI: 10.1016/j.cbpc.2014.03.011.

KUZNETSOV; JAVADOV; MARGREITER; GRIMM; HAGENBUCHNER; AUSSERLECHNER. The Role of Mitochondria in the Mechanisms of Cardiac Ischemia-Reperfusion Injury. **Antioxidants**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. 454, 2019. DOI: 10.3390/antiox8100454.

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

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

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

LIU, Chengyue; GE, Jian; ZHOU, Yangen; THIRUMURUGAN, Ramasamy; GAO, Qinfeng; DONG, Shuanglin. Effects of decreasing temperature on phospholipid fatty acid composition of different tissues and hematology in Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture**, [S. l.], v. 515, p. 734587, 2020. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2019.734587.

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

LÓPEZ, Vladimir; RISALDE, María Angeles; CONTRERAS, Marinela; MATEOS-HERNÁNDEZ, Lourdes; VICENTE, Joaquin; GORTÁZAR, Christian; DE LA FUENTE, José. Heat-inactivated *Mycobacterium bovis* protects zebrafish against mycobacteriosis. **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 41, n. 10, p. 1515–1528, 2018. DOI: 10.1111/jfd.12847.

LUCENA, Carlos Alberto; SOARES, Helena Gouvea. Review of species of the *Astyanax bimaculatus* “caudal peduncle spot” subgroup sensu Garutti & Langeani (Characiformes, Characidae) from the rio La Plata and rio São Francisco drainages and coastal systems of southern Brazil and Uruguay. **Zootaxa**, [S. l.], v. 4072, n. 1, p. 101, 2016. DOI: 10.11646/zootaxa.4072.1.5.

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

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

MACÊDO, Anderson Kelvin Saraiva; SANTOS, Keiza Priscila Enes Dos; BRIGHENTI, Ludmila Silva; WINDMÖLLER, Cláudia Carvalhinho; BARBOSA, Francisco Antônio Rodrigues; RIBEIRO, Rosy Lara Maciel de Azambuja; SANTOS, Hélio Batista Dos; THOMÉ, Ralph Gruppi. Histological and molecular changes in gill and liver of fish (*Astyanax lacustris* Lütken, 1875) exposed to water from the Doce basin after the rupture of a mining tailings dam in Mariana, MG, Brazil. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 735, p. 139505, 2020. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139505.

MACHADO, Cintia; ZALESKI, Tania; RODRIGUES, Edson; CARVALHO, Cleoni dos Santos; CADENA, Sílvia Maria Suter Correia; GOZZI, Gustavo Jabor; KREBSBACH, Priscila; RIOS, Flávia Sant Anna; DONATTI, Lucélia. Effect of temperature acclimation on the liver antioxidant defence system of the Antarctic nototheniids *Notothenia coriiceps* and *Notothenia rossii*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 172–173, n. 1, p. 21–28, 2014. DOI: 10.1016/j.cbpb.2014.02.003.

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

MADEIRA, Carolina; MADEIRA, Diana; LADD, Nemiah; SCHUBERT, Carsten J.; DINIZ, Mário S.; VINAGRE, Catarina; LEAL, Miguel C. Conserved fatty acid profiles and lipid metabolic pathways in a tropical reef fish exposed to ocean warming – An adaptation mechanism of tolerant species? **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 782, p. 146738, 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.146738.

MADEIRA, Carolina; MENDONÇA, Vanessa; LEAL, Miguel C.; FLORES, Augusto A. V.; CABRAL, Henrique N.; DINIZ, Mário S.; VINAGRE, Catarina. Thermal stress, thermal safety margins and acclimation capacity in tropical shallow waters—An experimental approach testing multiple end-points in two common fish. **Ecological Indicators**, [S. l.], v. 81, p. 146–158, 2017. DOI: 10.1016/j.ecolind.2017.05.050.

MADEIRA, Carolina; MENDONÇA, Vanessa; LEAL, Miguel C.; FLORES, Augusto A. V.; CABRAL, Henrique N.; DINIZ, Mário S.; VINAGRE, Catarina. Environmental health assessment of warming coastal ecosystems in the tropics – Application of integrative physiological indices. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 643, p. 28–39, 2018. DOI: 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**, [S. l.], v. 166, n. 2, p. 237–243, 2013. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008.

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

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

MATKOVICS, B.; NOVÁK, R.; HANH, Hoang Duc; SZABÓ, L.; VARGA, Sz. I.; ZALEŚNA, G. A comparative study of some more important experimental animal peroxide metabolism enzymes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 31–34, 1977. DOI: 10.1016/0305-0491(77)90218-8.

MAULVAULT, Ana Luísa; CAMACHO, Carolina; BARBOSA, Vera; ALVES, Ricardo; ANACLETO, Patrícia; POUSÃO-FERREIRA, Pedro; ROSA, Rui; MARQUES, António; DINIZ, Mário Sousa. Living in a multi-stressors environment: An integrated biomarker approach to assess the ecotoxicological response of meagre (*Argyrosomus regius*) to venlafaxine, warming and acidification. **Environmental Research**, [S. l.], v. 169, p. 7–25, 2019. DOI: 10.1016/j.envres.2018.10.021.

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

MORO, Giovanni Vitti; RODRIGUES, Ana Paula Oeda; TORATI, Lucas Simon; BARROSO, Renata Melon; LUNDSTEDT, Lícia Maria. Anatomia e fisiologia de peixes de água doce. *Em: Piscicultura de água doce - Multiplicando conhecimentos* . [s.l.] : Embrapa, 2013. p. 1–440.

MUELLER, Irina A.; DEVOR, Devin P.; GRIM, Jeffrey M.; BEERS, Jody M.; CROCKETT, Elizabeth L.; O'BRIEN, Kristin M. Exposure to critical thermal maxima

increases oxidative stress in hearts of whitebut not red-blooded Antarctic notothenioid fishes. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 215, n. 20, p. 3655–3664, 2012. DOI: 10.1242/jeb.071811.

MÜLLER, Paula; LEMCKE, Heiko; DAVID, Robert. Stem Cell Therapy in Heart Diseases – Cell Types, Mechanisms and Improvement Strategies. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [S. l.], v. 48, n. 6, p. 2607–2655, 2018. DOI: 10.1159/000492704.

MUNRO, Daniel; BLIER, Pierre U. The extreme longevity of *Arctica islandica* is associated with increased peroxidation resistance in mitochondrial membranes. **Aging Cell**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 845–855, 2012. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2012.00847.x.

NAKANO, Toshiki; KAMEDA, Masumi; SHOJI, Yui; HAYASHI, Satoshi; YAMAGUCHI, Toshiyasu; SATO, Minoru. Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. **Redox Biology**, [S. l.], v. 2, p. 772–776, 2014. DOI: 10.1016/j.redox.2014.05.007.

NARDELLI, M. S.; BUENO, N. C.; LUDWIG, T. A. V.; GUIMARÃES, A. T. B. Structure and dynamics of the planktonic diatom community in the Iguassu River, Paraná State, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 374–386, 2016. DOI: 10.1590/1519-6984.16114.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OBERPRILLER, John O.; OBERPRILLER, Jean C. Response of the adult newt ventricle to injury. **Journal of Experimental Zoology**, [S. l.], v. 187, n. 2, p. 249–259, 1974. DOI: 10.1002/jez.1401870208.

PAITAL, B.; CHAINY, G. B. N. Redox metabolism in fishes under thermal stress warrants more attention. **Fisheries Science**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 22–26, 2016. DOI: 10.2015/Accepted.

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

PARIHAR, M. S.; DUBEY, A. K. Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, [S. l.], v. 112, n. 3, p. 309–313, 1995. DOI: 10.1016/0742-8413(95)02025-X.

PEREIRA, Diego Mauro Carneiro; RESENDE, Anna Carolina; SCHLEGER, Ieda Cristina; NEUNDORF, Ananda Karla Alves; ROMÃO, Silvia; SOUZA, Maria Rosa Dmengeon Pedreiro De; HERRERIAS, Tatiana; DONATTI, Lucélia. Integrated biomarker response index as an ally in the observation of metabolic biomarkers in muscle of *Astyanax lacustris* exposed to thermal variation. **Biochimie**, [S. l.], v. 210, p. 3–13, 2023. DOI: 10.1016/j.biochi.2022.10.010.

PEREIRA-DA-SILVA, Elyara Maria; OLIVEIRA, Ricardo Henrique Franco De. Glicosímetro portátil como ferramenta alternativa para monitoramento da glicose sanguínea em lambaris *Astyanax altiparanae*: efeitos do estresse e sexo. **Boletim do Instituto de Pesca**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 557–568, 2017. DOI: 10.20950/1678-2305.2017v43n4p557.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). *Em: Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. [s.l.]: UFSM, 2005. v. 2p. 101–116.

POSS, Kenneth D.; WILSON, Lindsay G.; KEATING, Mark T. Heart Regeneration in Zebrafish. **Science**, [S. l.], v. 298, n. 5601, p. 2188–2190, 2002. DOI: 10.1126/science.1077857.

PROKKOLA, Jenni M.; NIKINMAA, Mikko. Circadian rhythms and environmental disturbances – underexplored interactions. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 221, n. 16, 2018. DOI: 10.1242/jeb.179267.

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

RAHMAN, Irfan; BISWAS, Saibal K.; KODE, Aruna. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 533, n. 1–3, p. 222–239, 2006. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.12.087.

RATKO, Jonathan *et al.* Can high- and low-temperature thermal stress modulate the antioxidant defense response of *Astyanax lacustris* brain? **Brain Research**, [S. l.], v. 1797, 2022. DOI: 10.1016/j.brainres.2022.148118.

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

RIPLEY, Brian; VENABLES, Bill; BATES, Douglas M.; HORNIK, Kurt; GEBHARDT, Albrecht; FIRTH, David. **MASS: Support Functions and Datasets for Venables and Ripley's MASS**. , 2021.

RODNICK, Kenneth J.; PLANAS, Josep V. The Stress and Stress Mitigation Effects of Exercise: Cardiovascular, Metabolic, and Skeletal Muscle Adjustments. *Em: Fish physiology*. [s.l.] : Academic Press, 2016. p. 251–294. DOI: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00007-2.

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

SÁNCHEZ-VÁZQUEZ, Francisco Javier; LÓPEZ-OLMEDA, Jose Fernando; VERA, Luisa Maria; MIGAUD, Herve; LÓPEZ-PATIÑO, Marcos Antonio; MÍGUEZ, Jesús M. Environmental Cycles, Melatonin, and Circadian Control of Stress Response in Fish. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 10, 2019. DOI: 10.3389/fendo.2019.00279.

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

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

SCHLEGER, Ieda Cristina; PEREIRA, Diego Mauro Carneiro; RESENDE, Anna Carolina; ROMÃO, Silvia; HERRERIAS, Tatiana; NEUNDORF, Ananda Karla Alves; DE SOUZA, Maria Rosa Dmengenon Pedreiro; DONATTI, Lucélia. Metabolic responses in the gills of Yellowtail Lambari *Astyanax lacustris* under low- and high-temperature thermal stress. **Journal of Aquatic Animal Health**, [S. l.], 2024. DOI: 10.1002/aah.10199.

SCHRECK, Carl B.; TORT, Lluís. The Concept of Stress in Fish. *Em: Fish physiology*. [s.l.] : Academic Press, 2016. p. 1–34. DOI: 10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1.

SCHULZ, U. H.; MARTINS-JUNIOR. *Astyanax fasciatus* AS BIOINDICATOR OF WATER POLLUTION OF RIO DOS SINOS, RS, BRAZIL. **Braz. J. Biol.**, [S. l.], v. 61, n. 4, p. 615–622, 2001.

SCHWINGER, Robert H. G. Pathophysiology of heart failure. **Cardiovascular Diagnosis and Therapy**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 263–276, 2021. DOI: 10.21037/cdt-20-302.

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

SEDMERA, David *et al.* Functional and morphological evidence for a ventricular conduction system in zebrafish and *Xenopus* hearts. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 284, n. 4, p. H1152–H1160, 2003. DOI: 10.1152/ajpheart.00870.2002.

SHERRILL, Johanna; WEBER, E. Scott; MARTY, Gary D.; HERNANDEZ-DIVERS, Stephen. Fish Cardiovascular Physiology and Disease. **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 11–38, 2009. DOI: 10.1016/j.cvex.2008.08.002.

SHIN, Moon-Kyeong; PARK, Ho-Ra; YEO, Won-Jun; HAN, Kyung-Nam. Effects of Thermal Stress on the mRNA Expression of SOD, HSP90, and HSP70 in the Spotted Sea Bass (*Lateolabrax maculatus*). **Ocean Science Journal**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 43–52, 2018. DOI: 10.1007/s12601-018-0001-7.

SHIOMI, Tetsuya *et al.* Overexpression of Glutathione Peroxidase Prevents Left Ventricular Remodeling and Failure After Myocardial Infarction in Mice. **Circulation**, [S. l.], v. 109, n. 4, p. 544–549, 2004. DOI: 10.1161/01.CIR.0000109701.77059.E9.

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

SILVA, R. M.; GOULART, C. T.; GUIDO, L. A. Evolução histórica do conceito de estresse. **Revista de Divulgação Científica Sena Aires**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 148–156, 2018.

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

STEVANATO, Diego J.; OSTRENSKY, Antonio. Ontogenetic development of tetra *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, [S. l.], v. 16, n. 2, 2018. DOI: 10.1590/1982-0224-20170073.

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

TAKIMOTO, Eiki *et al.* Oxidant stress from nitric oxide synthase–3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. **Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 115, n. 5, p. 1221–1231, 2005. DOI: 10.1172/JCI21968.

TINCANI, Flávio H.; GALVAN, Gabrieli L.; MARQUES, Antonio E. M. L.; SANTOS, Gustavo S.; PEREIRA, Letícia S.; DA SILVA, Thiago A.; SILVA DE ASSIS, Helena C.; BARBOSA, Ronilson V.; CESTARI, Marta M. Pseudoreplication and the usage of

biomarkers in ecotoxicological bioassays. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 2868–2874, 2017. DOI: 10.1002/etc.3823.

TSAO, Connie W. *et al.* **Heart Disease and Stroke Statistics-2022 Update: A Report from the American Heart Association. Circulation**Lippincott Williams and Wilkins, , 2022. DOI: 10.1161/CIR.0000000000001052.

VAN DEEL, Elza D.; LU, Zhongbing; XU, Xin; ZHU, Guangshuo; HU, Xinli; OURY, Tim D.; BACHE, Robert J.; DUNCKER, Dirk J.; CHEN, Yingjie. Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 1305–1313, 2008. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.12.007.

VAN DER POL, Atze; VAN GILST, Wiek H.; VOORS, Adriaan A.; VAN DER MEER, Peter. **Treating oxidative stress in heart failure: past, present and future. European Journal of Heart Failure**John Wiley and Sons Ltd, , 2019. DOI: 10.1002/ejhf.1320.

VASCONCELOS, Thiago Brasileiro; CARDOSO, Ana Richelly Nunes Rocha; JOSINO, Jeanne Batista; MACENA, Raimunda Hermelinda Maia; BASTOS, Vasco Pinheiro Diógenes. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde** , [S. l.], v. 16, n. 3, p. 213–219, 2014.

VIANA, Lucilene Finoto; SUAREZ, Yzel Rondon; LIMA-JUNIOR, Sidnei Eduardo. Influence of environmental integrity on the feeding biology of *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 in the Ivinhema river basin / Influência da integridade ambiental na biologia alimentar de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 na bacia do rio Ivinhema. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, [S. l.], v. 35, n. 4, 2013. DOI: 10.4025/actascibiols.v35i4.19497.

VIEIRA, Carlos Eduardo Delfino; ALMEIDA, Mayara da Silva; GALINDO, Bruno Ambrssio; PEREIRA, Lindalva; MARTINEZ, Claudia Bueno dos Reis. Integrated biomarker response index using a Neotropical fish to assess the water quality in agricultural areas. **Neotropical Ichthyology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 153–164, 2014. DOI: 10.1590/S1679-62252014000100017.

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

VINAGRE, Catarina; MADEIRA, Diana; MENDONÇA, Vanessa; MADEIRA, Carolina; DINIZ, Mário S. Warming in shallow waters: Seasonal response of stress biomarkers in a tide pool fish. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, [S. l.], v. 251, p. 107187, 2021. DOI: 10.1016/j.ecss.2021.107187.

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

VUJIC, Ana; NATARAJAN, Niranjana; LEE, Richard T. Molecular mechanisms of heart regeneration. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [S. l.], v. 100, p. 20–28, 2020. DOI: 10.1016/j.semcdb.2019.09.003.

WANG, Chao; LU, Guanghua; PEIFANG, Wang; WU, Hao; QI, Pengde; LIANG, Yan. Assessment of Environmental Pollution of Taihu Lake by Combining Active Biomonitoring and Integrated Biomarker Response. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 45, n. 8, p. 3746–3752, 2011. DOI: 10.1021/es1037047.

WARREN, M. L.; BURR, B. M. **Freshwater fishes of north America**. . [s.l.] : Johns Hopkins University Press, 2020. v. 2

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

WHO. **Top 10 causes of death in Brazil for both sexes aged all ages (2019)**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-leading-causes-of-death>. Acesso em: 18 set. 2023.

XIA, Jianhong; MENG, Zhongxuan; RUAN, Hongyue; YIN, Wenguang; XU, Yiming; ZHANG, Tiejun. **Heart Development and Regeneration in Non-mammalian Model Organisms**. **Frontiers in Cell and Developmental Biology** Frontiers Media S.A., , 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.595488.

YANG, Changwon; LIM, Whasun; SONG, Gwonhwa. Mediation of oxidative stress toxicity induced by pyrethroid pesticides in fish. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, [S. l.], v. 234, p. 108758, 2020. DOI: 10.1016/j.cbpc.2020.108758.

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

ZAFRA-LEMOS, Layon; LOPES, Vera Lúcia; RAMPAZZO, Ana Paula de Santi; NATALI, Maria Raquel Marçal; BORIN-CARVALHO, Luciana Andreia; PORTELA-CASTRO, Ana Luiza Brito. Evidence of cytogenetic and histological damage in specimens of *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae) exposed to the hydrogen cyanide-based herbicide Dormex®. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, [S. l.], v. 43, p. e51425, 2021. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v43i1.51425.