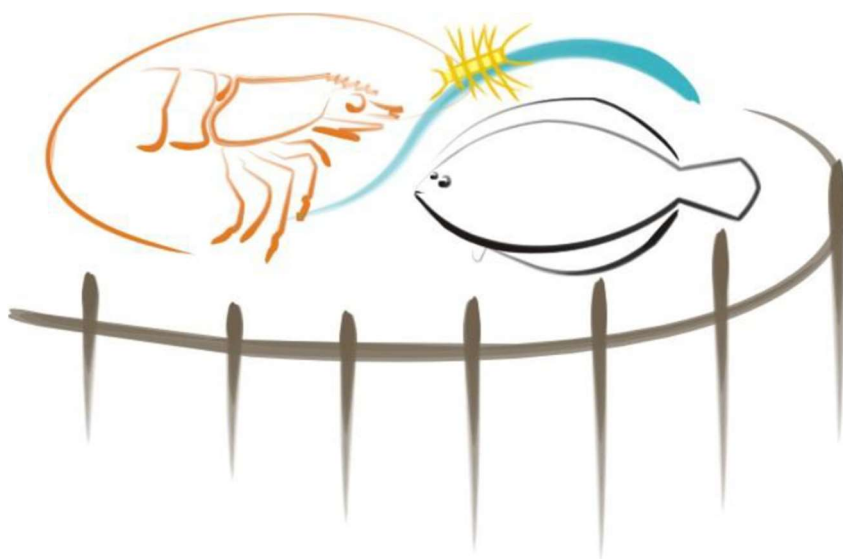




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E OXIGÊNIO
DISSOLVIDO EM JUVENIS DE PACU *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG
1887)**

LILIAN FIORI NITZ

Rio Grande, RS

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA**

**EFEITOS DA INTERAÇÃO ENTRE TEMPERATURA E OXIGÊNIO
DISSOLVIDO EM JUVENIS DE PACU *Piaractus mesopotamicus*
(HOLMBERG 1887)**

LILIAN FIORI NITZ

Orientador: Prof. Dr. Luciano de Oliveira Garcia

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do grau de
Doutor em Aquicultura pelo
Programa de Pós-Graduação em
Aquicultura da Universidade
Federal do Rio Grande.**

Rio Grande, RS

Dezembro de 2020

Ficha Catalográfica

N733e Nitz, Lilian Fiori.
Efeitos da interação entre temperatura e oxigênio dissolvido em juvenis de Pacu *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG 1887) / Lilian Fiori Nitz. – 2020.
161 f.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Rio Grande/RS, 2020.
Orientador: Dr. Luciano de Oliveira Garcia.

1. Estresse Térmico 2. Hipóxia 3. Lipoperoxidação 4. Parâmetros Sanguíneos 5. Reoxigenação I. Garcia, Luciano de Oliveira II. Título.

CDU 597

Catálogo na Fonte: Bibliotecário José Paulo dos Santos CRB 10/2344

Sumário

Epígrafe.....	v
Dedicatória.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Resumo Geral.....	viii
Abstract.....	x
1. Introdução.....	12
1.1 Aquicultura.....	12
1.2 Espécie alvo do estudo - Pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i> (Holmberg, 1887).....	12
1.3 Temperatura da água e suas influências nos peixes.....	15
1.4 Oxigênio dissolvido	17
1.4.1 Hipóxia	18
1.5 Estresse.....	22
1.6 Parâmetros Sanguíneos	24
1.7 Estresse Oxidativo.....	26
2. Referências.....	34
3. Objetivos	55
3.1 Objetivo geral	55
3.2 Objetivos específicos	55
Capítulo I.....	56
Capítulo II.....	93
Capítulo III.....	129
4. Considerações Finais e Perspectivas.....	155
5. Conclusões Gerais	161

**“Aerodinamicamente o corpo de uma
abelha não é feito para voar; o bom é que
a abelha não sabe!”**

(Autor desconhecido)

Dedicatória

Dedico este trabalho a meu marido e companheiro Lucas Pellegrin

A meu pai Wilson e minha amada mãe Teda!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a DEUS por me permitir fazer essa viagem louca chamada VIDA! Agradeço também a minha mãezinha Nossa Senhora Aparecida por sempre estar ao meu lado durante todos os momentos, alegres e difíceis.

Ao meu marido Lucas por ser meu companheiro de vida, de lutas, de alegrias, de noites em que eu não conseguia dormir, fosse por ansiedade ou por insônia mesmo, por sempre me ouvir e principalmente me apoiar. Obrigada por me acompanhar nessa jornada mesmo sem nenhuma certeza do que viria. Meu amor nesses anos passamos por diversos momentos difíceis como a descoberta da ansiedade e como ela seguiria comigo até os confins da terra (risos)! Mas superamos. Como quando chegamos numa cidade desconhecida só nos dois. Mas superamos. Em alguns tropeços durante nossa vida acadêmica. Mas sempre superamos, porque somos uma dupla incrível. Você é meu porto seguro e não tenho palavras para te agradecer. “Nos momentos mais difíceis você é o meu divã” Te amo!!

A minha família por entender minha ausência, falta de tempo e paciência... obrigada pai e mãe por me dar tudo aquilo que o dinheiro não é capaz de comprar! Pelos ensinamentos e conselhos, pelas palavras de apoio e tudo mais que nunca negaram. Mãe obrigada por sempre estar a disposição para ouvir minhas reclamações meus problemas minhas angústias meu choro, te amo infinitamente! Pai obrigada por sempre estar disposto a fazer o que fosse necessário para ter uma filha doutora, apesar do seu jeito turrão. Obrigada por tudo que fez e faz pela nossa família, te amo infinitamente!

Aos amigos que fiz durante essa jornada. Aos amigos do LAC Daniel e Rafa, e a pequena Óli, ao mais rabugento de todos Lucas Maltez meu bródi que me ajudou muito no mestrado, e que me incomodou muito também! Parceiro de viagens e congressos e claro de bebedeiras... (na nossa juventude). A minha querida amiga Lili que sempre me aturou nos melhores e piores momentos. Tenho muito orgulho de nós por sermos as únicas mulheres do laboratório tendo que aguentar todo tipo loucura desses nossos colegas, principalmente do orientador!!!! [(risos)] Te amo amiga, siga firme na tua caminhada.

Ao pessoal do LAC, a Dina, seu Ademir os vigilantes Aldemar, Ricardo, Marquinhos e meu grande amigão que não é mais vigilante Fernando.

Ao meu querido amigo e orientador Dr. Luciano Garcia pela ajuda e ensinamentos durante todos esses anos. Pela amizade de sempre, pelos conselhos e palavras sinceras sempre que precisei. Descobri que tenho mais um pai nesse mundo! Obrigada.

Ao meu querido amigo e orientador de mestrado Dr. Carlos Prentice-Hernández (*in memoriam*).

A FURG pela oportunidade de desfrutar das instalações dessa excelente Universidade. Ao programa de Pós Graduação e a todo corpo docente, me ensinaram muito. A CAPES, FAPERGS e ao CNPq pelo apoio financeiro.

1 **Resumo Geral**

2 O pacu *P. mesopotamicus* é uma espécie que pelas suas características, apresenta grande
3 potencial para cultivos intensivos, nos quais o oxigênio dissolvido (OD) é um dos
4 principais limitantes. Além disso, o cultivo dessa espécie em regiões de clima
5 subtropical, onde ocorre ampla variação térmica, a interação de fatores como o OD e a
6 temperatura podem causar alterações bioquímicas e fisiológicas nos peixes. Dessa
7 forma, o objetivo deste estudo foi verificar os efeitos da interação entre diferentes
8 temperaturas e níveis de OD nos parâmetros hematológicos e de estresse oxidativo em
9 juvenis de pacu. Foram realizados 2 experimentos (EXP): EXP 1 - interação entre
10 diferentes temperaturas (~18, ~23 e ~28 °C) e níveis de OD (~2 - hipóxia, ~4,5 –
11 hipóxia moderada e ~7 mg OD L⁻¹ normóxia) por um período de 12 h. Imediatamente
12 após esse período foram coletadas amostras de sangue, brânquias, fígado, músculo e
13 cérebro de 9 peixes por tratamento. No EXP 2 os peixes foram expostos a interação
14 entre as mesmas temperaturas supracitadas, hipóxia e normóxia (~2 e ~7 mg OD L⁻¹)
15 durante 12 h. Ao final desse período foram submetidos a diferentes velocidades de
16 reoxigenação, abrupta (0,5 h) e gradual (5 h). Após 1, 3 e 12 h do final da reoxigenação
17 foram coletadas amostras de sangue (n=9), e em 1 e 12 h também amostras de brânquias
18 e fígado. Os resultados demonstram que os efeitos da interação entre diferentes
19 temperaturas e níveis de OD em juvenis de pacu são órgão específicos. A análise dos
20 parâmetros sanguíneos durante a exposição a diferentes temperaturas e níveis de hipóxia
21 indicaram alterações mais evidentes na glicose e pH sanguíneos. A reoxigenação
22 abrupta a 23 e 28 °C levou a alterações na glicose sanguínea e na maior temperatura no
23 lactato sanguíneo em até 3 h. Entretanto, na temperatura de 23 °C o aumento do lactato
24 sanguíneo ocorreu após 3h e se manteve elevado até 12 h após o fim da reoxigenação.
25 Uma indução da condição pró oxidante foi observada no fígado, músculo e cérebro

1 impulsionado pela interação de diferentes temperaturas e níveis de hipóxia evidenciado
2 pelo aumento nos níveis de dano oxidativo (lipoperoxidação - LPO e conteúdo de tióis
3 proteicos - PSH) associados a uma inibição do sistema de defesa antioxidante
4 (capacidade antioxidante total - ACAP e glutathione-S-transferase - GST). Com relação
5 às velocidades de reoxigenação, juvenis de pacu mantidos em 18 °C foram capazes de
6 se adaptar melhor com uma reoxigenação abrupta, evidenciada pelos menores níveis de
7 dano oxidativo (LPO) nas brânquias e no fígado. Após 12 h do final da reoxigenação
8 apenas os peixes mantidos em 23 °C e submetidos a reoxigenação abrupta e aqueles
9 mantidos em 28 °C e submetidos a reoxigenação gradual apresentaram todos os
10 parâmetros sanguíneos dentro dos níveis basais. Sendo assim, a interação entre
11 diferentes temperaturas e níveis de OD por um período de 12 h causam distúrbios
12 metabólicos, ácido base, além de induzir estresse oxidativo. Entretanto, essa espécie
13 demonstrou ser tolerante à hipóxia e à reoxigenação, apresentando 100% de
14 sobrevivência. Peixes mantidos entre 23 e 28 °C e submetidos à reoxigenação gradual
15 são menos susceptíveis a danos oxidativos. Um período de 12 h é suficiente para
16 restabelecer os parâmetros bioquímicos e fisiológicos dependendo da temperatura e
17 velocidade de reoxigenação que foram submetidos os pacus.

18 **Palavras chave:** estresse térmico, hipóxia, lipoperoxidação, parâmetros sanguíneos,
19 reoxigenação

1 **Abstract**

2 The pacu, *P. mesopotamicus*, is a species that, due to its characteristics, has great
3 potential for intensive culture, in which dissolved oxygen (DO) is one of the main
4 limitations. In addition, the culture of this species in regions of subtropical climate,
5 where there is wide thermal variation, the interaction of factors such as DO and
6 temperature can cause biochemical and physiological changes in fish. Thus, the aim of
7 this study was to verify the effects of interaction between different temperatures and DO
8 levels on hematological parameters and oxidative stress in pacu juveniles. Two
9 experiments were carried out (EXP): EXP 1 - interaction between different temperatures
10 (~ 18, ~ 23 and ~ 28 ° C) and DO levels (~ 2 - hypoxia, ~ 4.5 - moderate hypoxia and ~
11 7 mg DO L⁻¹ normoxia) for a period of 12 h. Immediately after this period, blood, gills,
12 liver, muscle and brain samples were collected from 9 fish per treatment. In EXP 2 the
13 fish were exposed to interaction between the same temperatures mentioned above,
14 hypoxia and normoxia (~ 2 and ~ 7 mg OD L⁻¹) for 12h. At the end of this period, they
15 were submitted to different speeds of reoxygenation: abrupt (0.5 h) and gradual (5 h).
16 After 1, 3 and 12 h of the end of reoxygenation blood samples were collected (n=9), as
17 well as samples of gills and liver at 1 and 12 h. The results demonstrate that the effects
18 of the interaction between different temperatures and DO levels in pacu juveniles are
19 organ specific. The analysis of blood parameters during exposure to different
20 temperatures and levels of hypoxia indicated more evident changes in blood glucose and
21 pH. The abrupt reoxygenation at 23 and 28 °C provoked changes in blood glucose and
22 at the highest temperature in blood lactate in up to 3 hours. However, at 23 °C, the blood
23 lactate increase occurred after 3 h and remained elevated until 12 hours after the end of
24 reoxygenation. An induction of pro oxidant condition was observed in the liver, muscle
25 and brain driven by the interaction of different temperatures and hypoxia levels,

1 evidenced by increase in oxidative damage levels (lipoperoxidation - LPO and protein
2 thiol content - PSH) associated with an inhibition of antioxidant defense system (total
3 antioxidant capacity - ACAP and glutathione-S-transferase - GST). Regarding
4 reoxygenation speeds, pacu juveniles kept at 18 °C were able to adapt better with abrupt
5 reoxygenation, evidenced by the lower oxidative damage levels (LPO) in the gills and
6 liver. After 12 h from the end of reoxygenation, only fish kept at 23 °C and subjected to
7 abrupt reoxygenation and those kept at 28 °C and subjected to gradual reoxygenation
8 showed all blood parameters within baseline levels. Thus, the interaction between
9 different temperatures and DO levels for a period of 12 h causes metabolic and acid
10 base disturbances, in addition to inducing oxidative stress. However, this species proved
11 to be tolerant to hypoxia and reoxygenation. Fish kept between 23 and 28 °C and
12 subjected to gradual reoxygenation are less susceptible to oxidative damage, present
13 100% survival. A period of 12 h is sufficient to reestablish the biochemical and
14 physiological parameters depending on the temperature and speed of reoxygenation that
15 were submitted the pacu.

16 **Keywords:** thermal stress, hypoxia, lipoperoxidation, blood parameters, re-oxygenation

1 1. Introdução

2 1.1 Aquicultura

3 O crescimento da população mundial está estimado em 9,7 bilhões de pessoas
4 para 2050 (FAO, 2016) e um dos maiores desafios da sociedade atual e futura é garantir
5 a produção de alimentos em quantidade e de qualidade. Nesse sentido a aquicultura
6 surge como uma alternativa para a segurança alimentar, que busca o aprimoramento das
7 técnicas de produção alinhadas ao meio ambiente.

8 A aquicultura é o setor de produção de alimentos de origem animal que mais
9 cresce atualmente. A produção mundial de peixes atingiu o pico em 2018, segundo a
10 FAO, com um montante de cerca de 179 milhões de toneladas. Dessa produção 156
11 milhões de toneladas (52%) foram de peixes para consumo humano direto (FAO, 2020).
12 Este consumo vem aumentando gradativamente e pode ser avaliado pelo consumo per
13 capita que em 1961 era de 9 kg e em 2018 chegou a 20,5 kg (FAO, 2020).

14 O Brasil produziu 758.006 mil toneladas de peixes em 2019 (PEIXE BR, 2020),
15 sendo que a piscicultura continental lidera essa produção, com destaque para tilápia do
16 Nilo com 432.149 t (57%), seguida pelas espécies nativas com 287.930 t (38%). Dentre
17 as espécies nativas merecem destaque o tambaqui (*Colossoma macropomum*), o pacu
18 (*Piaractus mesopotamicus*), a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), e os híbridos
19 tambacu (tambaqui x pacu) e tambatinga (tambaqui x pirapitinga).

20

21 1.2 Espécie alvo do estudo - Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)

22 Popularmente conhecido como pacu, caranha ou pacu caranha (Figura 1) é uma
23 espécie nativa que apresenta ampla distribuição nas bacias dos Rios Paraná, Paraguai e

1 Uruguai (Godoy, 1975) e que apresentou uma produção de 11.542 t no ano de 2020
2 (IBGE, 2020).

3 **Classificação Científica**

4 **Reino:** Animalia

5 **Filo:** Chordata

6 **Superclasse:** Actinopterygii

7 **Classe:** Actinopteri

8 **Superordem:** Characiphysae

9 **Ordem:** Characiformes

10 **Família:** Characidae

11 **Subfamília:** Myleinae

12 **Gênero:** *Piaractus*

13 **Espécie:** *Piaractus mesopotamicus*

14



15

16 Figura 1. Exemplar de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Fonte: arquivo pessoal).

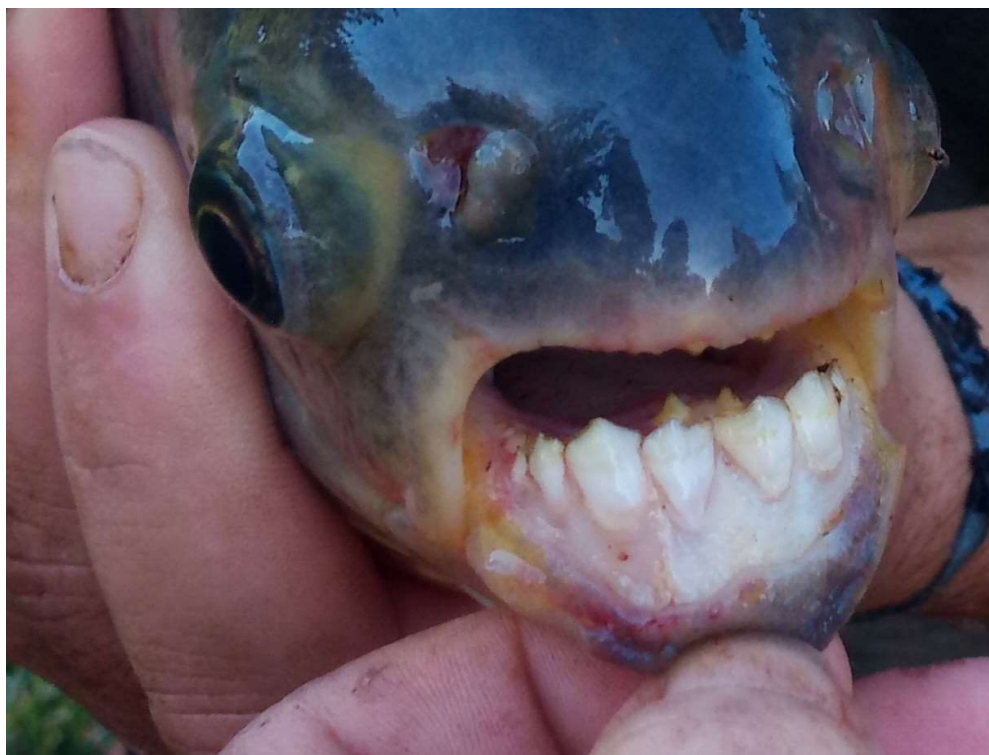
17

18 Habita preferencialmente águas com temperaturas acima de 22 °C (Urbinati et

19 al., 2010). Contudo estudos recentes demonstram que esta espécie é tolerante às

1 temperaturas do sul e sudeste do País (Pinto et al., 2019; Nitz et al., 2020). Em seu
2 ambiente natural pode ser encontrado em águas com até 1 mg L⁻¹ de oxigênio dissolvido
3 (Bastos et al., 2007). Um estudo recente mostrou que essa espécie se adapta a uma
4 ampla faixa de pH e que apresenta desempenho zootécnico superior quando criada em
5 pH 8,5 (Pellegrin et al., 2020). Além disso, essa espécie é resistente a até 1 mg L⁻¹ de
6 amônia não ionizada (Nitz et al., 2019).

7 Apresentam hábito alimentar onívoro, se alimentam principalmente de folhas,
8 caules, flores, frutos, inclusive sementes, pois possuem aparato bucal com adaptação
9 morfológica (dentes molariformes e incisivos) para fragmentar e triturar alimentos
10 duros (Figura 2). Em caso de necessidade e/ou oportunidade podem predar insetos,
11 aracnídeos, moluscos e peixes (Urbinati et al., 2010).



12
13 Figura 2. Detalhe da boca do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Fonte: arquivo pessoal).

14 Na natureza não apresentam comportamento alimentar contínuo por fatores
15 como variações ambientais e migrações reprodutivas. É uma espécie reofílica

1 (migratória) que apresenta desova total e fecundação externa. O tamanho médio da
2 primeira maturação gonadal da fêmea é com 34 cm e idade média de três anos. Em
3 cativeiro a reprodução só ocorre por estímulo hormonal (Urbinati et al., 2010). Seu
4 sucesso na aquicultura se deve a características como sua rusticidade, rápido
5 crescimento, hábito alimentar onívoro e boa aceitação no mercado consumidor. Devido
6 as suas características, a espécie apresenta um grande potencial para sua utilização em
7 sistemas de cultivo intensivos (Oliveira et al., 2004; Urbinati et al., 2013).

8

9 **1.3 Temperatura da água e suas influências nos peixes**

10 Em regiões com condições climáticas como o sul do Brasil, os organismos
11 aquáticos são constantemente expostos a variações de temperatura, tanto em ambiente
12 natural, quanto nos sistemas de produção, devido à grande amplitude térmica observada
13 sazonalmente. No estado do Rio Grande do Sul, por exemplo, a temperatura da água
14 pode variar entre 9 e 28 °C durante o ano (Garcia et al., 2008).

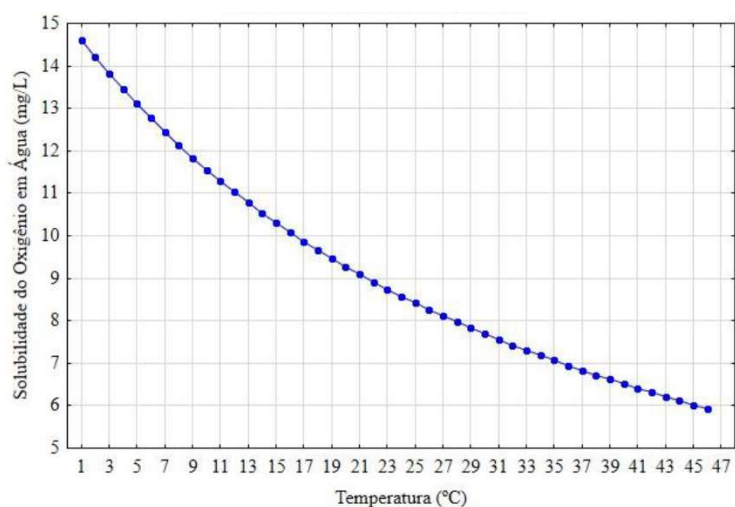
15 As espécies ectotérmicas apresentam sua temperatura corporal determinada pela
16 temperatura da água. As variações na temperatura afetam o metabolismo geral, que
17 envolve o comportamento dos animais e a manutenção de diversos processos
18 fisiológicos e bioquímicos, causando efeitos em nível tecidual, celular e molecular,
19 visto que todos os processos biológicos ocorrem dentro de certa faixa de temperatura
20 (Hazel, 1993; Aguilar et al., 2017). Seus extremos, por outro lado, podem causar
21 distúrbios ou efeitos letais, pois cada espécie possui faixas específicas de conforto e
22 desenvolvimento (Baldisserotto, 2013).

23 O pacu é uma espécie tropical, sua faixa de conforto térmico estimado se
24 encontra entre 20 e 28°C (Urbinati et al., 2020). Estudos recentes mostram que juvenis

1 de pacu criados entre 21 e 27°C apresentam melhor eficiência proteica e
2 consequentemente melhor qualidade da carne (Pinto et al., 2020).

3 Variações na temperatura da água podem afetar a velocidade das reações
4 químicas. Por exemplo, o aumento da temperatura gera elevação da cinética dos átomos
5 e moléculas, e como consequência ocorre a desestabilização de ligações iônicas, que
6 podem facilitar reações químicas e modificar o ponto de equilíbrio de reações de
7 interação entre proteínas (ex.: enzima/substrato, hormônio/receptor) (Baldisserotto,
8 2013). Outro fator que pode ser alterado com a temperatura é o estado nutricional,
9 fazendo com que os peixes aumentem ou diminuam a ingesta de alimento (Buentello et
10 al., 2000). Além disso, esse parâmetro abiótico pode interferir na eficiência alimentar
11 (Van Ham et al., 2003; Wang et al., 2009) digestibilidade dos nutrientes, tempo de
12 trânsito gastrointestinal e utilização adequada dos nutrientes (Craig 2017; Stiller et al.,
13 2017) para o crescimento com assimilação e conversão em tecido muscular.

14 A manipulação da temperatura da água vem sendo estudada como possível
15 alternativa na produção de populações monossexo de tilápia do Nilo (*Oreochromis*
16 *niloticus*), bem como para outras espécies robalo-peva (*Centropomus parallelus*) e
17 robalo-flecha (*Centropomus undecimalis*), salmão do Atlântico (*Salmo salar*), jundiá
18 (*Rhamdia quelen*), pacu (*P. mesopotamicus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*)
19 (Rebouças et al., 2014). Além de seus efeitos diretos sobre os organismos cultivados, a
20 temperatura pode afetar outros parâmetros de qualidade de água, como o oxigênio
21 dissolvido, uma vez que a dissolução do oxigênio diminui com o aumento da
22 temperatura (Del-Toro et al., 2008) (Figura 3).



1

2

3

4

5

1.4 Oxigênio dissolvido

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

Figura 3. Solubilidade do oxigênio dissolvido em relação à temperatura (Fonte: Adaptado de Boyd, 1982).

O oxigênio dissolvido é o parâmetro de qualidade da água considerado limitante para aquicultura, por apresentar oscilações em curto período de tempo, principalmente em sistemas intensivos (Timmons et al., 2001). Na sua forma atômica o oxigênio (O) é um radical livre, e na sua forma molecular (O₂) é um bi-radical livre, que se caracteriza pela presença de um elétron não pareado na sua camada mais externa. Quando dois átomos se unem para formar uma molécula de oxigênio, seus elétrons permanecem como dois elétrons não pareados, e é essa natureza bi-radical que permite as reações de oxidação/redução (Nikinmaa, 2002). Na mitocôndria ocorre a redução tetravalente da molécula de oxigênio, indispensável para manutenção do metabolismo aeróbico, do qual diversos processos fisiológicos vitais dos organismos são dependentes (Onukwufor et al., 2016).

No ambiente aquático a quantidade de oxigênio dissolvido depende de fatores como pressão parcial de oxigênio na atmosfera, que varia com altitude, temperatura e da quantidade de substâncias dissolvidas na água. Basicamente, a entrada de oxigênio

1 ocorre através da fotossíntese e da difusão do ar atmosférico, no caso de sistemas
2 abertos, ou de renovação de água e aeração mecânica, no caso de sistemas fechados
3 (Baldisserotto et al., 2013).

4 O monitoramento constante das concentrações de oxigênio dissolvido é
5 fundamental para que este seja mantido em níveis adequados nos sistemas de produção
6 ou unidades de transporte, a fim de evitar possíveis efeitos negativos no desempenho
7 zootécnico (Bagherzadeh Lakani et al., 2013), afetar o sistema imune (Choi et al.,
8 2007), desencadear o aparecimento de doenças (Espmark et al., 2010) e em casos mais
9 extremos ocasionar a morte dos animais (Miller et al., 2002).

10 ***1.4.1 Hipóxia***

11 No ambiente aquático a disponibilidade de oxigênio é menor que no ambiente
12 terrestre e variações podem ser frequentes pela diversidade de fatores internos e
13 externos envolvidos (Tripathy, 2016), portanto é exigida uma série de respostas
14 adaptativas dos organismos aquáticos frente a essas oscilações. Num sistema de cultivo
15 são basicamente três situações que levam a redução dos níveis de oxigênio dissolvido:
16 presença de matéria orgânica, respiração dos organismos presentes no meio e o aumento
17 da temperatura (Baldisserotto et al., 2013). A depleção de oxigênio no ambiente pode
18 ocorrer quando a taxa de consumo de oxigênio é superior ao “input” de oxigênio no
19 sistema, que muitas vezes é dependente de sistemas de aeração.

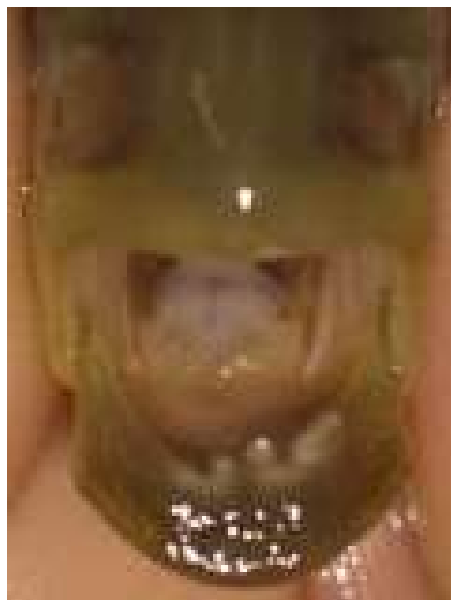
20 Sendo assim, esses organismos podem estar sujeitos tanto a episódios de hipóxia
21 ambiental quanto de hipóxia funcional e, que a diversidade fisiológica das
22 características de transporte de oxigênio no sangue parece projetada para ambas as
23 situações (Wells, 2009). Eventos de hipóxia funcional podem ocorrer quando o
24 metabolismo aeróbico não pode ser mantido durante um exercício exaustivo ou uma

1 atividade muscular excessiva (Wells, 2009), em outras palavras esse tipo de hipóxia
2 reflete uma situação em que a demanda de oxigênio do tecido supera o suprimento
3 circulatório (Farrell & Richards, 2009). Já a hipóxia ambiental ocorre com a redução
4 dos níveis ambientais de OD (Portner et al., 1984). Fisiologicamente pode ser definida
5 como qualquer pressão de oxigênio (PO_2) da água que reduza a concentração de
6 oxigênio no sangue, porém as necessidades rotineiras de oxigênio ainda podem ser
7 atendidas por meio de mecanismos compensatórios (Farrell & Richards, 2009).

8 Na aquicultura de um modo geral, a hipóxia é prejudicial aos peixes (Wu et al.,
9 2016), principalmente quando se trata de cultivos intensivos. Os peixes representam o
10 grupo mais diverso e de maior diversidade genética dentre os vertebrados. Essa
11 plasticidade genética é a matéria prima para as diferentes adaptações evolutivas que
12 esses organismos apresentam (Legatt & Iwama, 2003). Algumas estratégias utilizadas
13 pela ictiofauna para lidar com a hipóxia ambiental são uso de respiração aquática de
14 superfície (ARS) e de mecanismos de tolerância a hipóxia, que incluem depressão
15 metabólica, aumento do volume ventilatório e frequência cardíaca, aumento da
16 superfície labial, entre outros. Entretanto, algumas espécies não apresentam essas
17 adaptações e são conhecidas como espécies oxireguladoras (Fernandes et al., 1999).

18 As estratégias adaptativas se manifestam em diferentes níveis de organização
19 biológica, e são fatores determinantes para a sobrevivência desses organismos.
20 Características comportamentais: quando os animais apresentam estratégia de “fuga” e
21 busca de locais com maior concentração de oxigênio dissolvido, como a superfície.
22 Alterações morfológicas: como o aumento do lábio inferior na tentativa de melhora na
23 captação de oxigênio, no caso de algumas espécies amazônicas, entre elas o tambaqui e
24 o pacu, que apresentam a respiração aquática de superfície (ARS - aquatic surface

1 respiration) (Figura 4). Além disso, algumas espécies na presença de hipóxia podem
2 apresentar quimiorreceptores que promovem o aumento da pressão do sangue nas
3 brânquias, do fluxo lamelar e da área superficial respiratória (Sundin, 1999).



4

5

6

7

8

Figura 4. Detalhe da boca do pacu mostrando o aumento do lábio inferior (prolapso labial). Fonte: (arquivo pessoal).

9 Além dos ajustes comportamentais e morfológicos os peixes podem responder a
10 baixos níveis de oxigênio na água ajustando vários parâmetros fisiológicos e
11 bioquímicos, e com essas modificações direcionadas melhorar a transferência de
12 oxigênio para todos os tecidos.

13 O sucesso dessas espécies depende de suas habilidades em detectar as mudanças
14 nos níveis de oxigênio e utilizar vias sensoriais para ajustes rápidos na função
15 cardiorrespiratória através de quimiorreceptores localizados nas brânquias. A sua
16 localização varia entre cada arco branquial (1°, 2°... etc), espécie e a localização em
17 cada arco (superior, inferior, central). O pacu apresenta quimiorreceptores de oxigênio
18 no primeiro par de arcos branquiais, sensíveis a níveis de oxigênio na água e no sangue
(Leite 2007). É provável que esses ajustes adaptativos e de detecção de mudanças

1 ambientais tenham evoluído simultaneamente, como forma de aumentar a sobrevivência
2 (Val et al., 1998).

3 Caso a situação de hipóxia persistir são ativadas as alterações fisiológicas na
4 tentativa de compensar os seus efeitos. De acordo com isso, são realizadas modificações
5 direcionadas a melhorar a captação e transferência de oxigênio, primeiramente com o
6 aumento da ventilação branquial (volume ventilatório e frequência respiratória) com
7 bradicardia reflexa (Val et al., 1998; Almeida Val et al., 2005). A elevação do fluxo de
8 água nas brânquias é necessária para manter o mais elevado possível o gradiente de
9 difusão entre água e sangue. Através desse “fino” ajuste cardiorrespiratório é possível
10 aumentar o tempo de passagem do sangue através das lamelas secundárias, garantindo
11 assim a maximização da eficiência da transferência de oxigênio para os capilares
12 branquiais e toda circulação sistêmica (Taylor et al., 1999; Baldisserotto et al., 2008;
13 Taylor et al., 2009). Além disso, frente a uma situação de hipóxia prolongada pode
14 ocorrer aumento do número de eritrócitos circulantes, concentração de hemoglobina e
15 de hematócrito, concomitante com aumento da afinidade da hemoglobina-oxigênio (Hb-
16 O₂) (Val, 1996), sendo estas respostas primárias comuns na maioria das espécies
17 expostas à hipóxia.

18 Entretanto, estratégias mais efetivas são aquelas que ocorrem em espécies que
19 conseguem reduzir seu metabolismo. A redução da taxa metabólica ocorre a nível
20 celular e bioquímico e representa uma diminuição controlada nos processos que
21 consomem ATP. O que ocorre é uma reorganização celular para diminuir a demanda de
22 ATP ao nível mais baixo possível, e esse “estado” pode durar horas, dias, estações ou
23 até anos em alguns casos (Lushchak et al., 2001; Richards, 2009).

1 No entanto, a manutenção desses mecanismos adaptativos exige dos organismos
2 um alto preço, como a mobilização de reservas energéticas e reorganização metabólica
3 para reduzir as demandas de ATP, as quais são respostas coordenadas temporariamente.
4 Na aquicultura, a exposição a esse tipo de situação pode ser frequente, o que pode
5 ocasionar nos peixes a redução no desempenho zootécnico (Cuenco, 1985),
6 comprometimento imunológico com maior susceptibilidade a doenças (Choi et al.,
7 2007; Epsmark et al., 2010), ocasionar estresse com alterações comportamentais e
8 bioquímicas através de alterações nas enzimas antioxidantes como a glutathione-S-
9 transferase (GST), e nos parâmetros de estresse oxidativo como a capacidade
10 antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), tióis proteicos e não proteicos (PSH e
11 NPSH), lipoperoxidação (LPO), dentre outras (Zhang et al., 2016; Johannsson et al.,
12 2018; Nitz et al., 2020).

13

14 **1.5 Estresse**

15 Na literatura existem diversos conceitos para o termo estresse. Segundo Iwama
16 et al., (2011) existe uma dificuldade em determinar uma definição universal para o
17 termo “estresse” devido à grande diversidade de definições já propostas (Wendelaar
18 Bonga 1997; Barton, 2002; Balasch & Tort, 2019). Em 1935, Cannon já descrevia o
19 estresse como “qualquer estímulo que promova alterações na homeostase, envolvendo o
20 sistema nervoso central”. Outros autores determinaram o estresse como uma Síndrome
21 Geral de Adaptação, com 3 estágios: i-*reação de alarme*, ii-*resistência* e iii-*exaustão*
22 (Selye 1950, 1973). De acordo com Silva et al. (2020) organismos aquáticos são
23 altamente susceptíveis ao estresse porque sua condição homeostática é dependente de
24 seus arredores.

1 Nesta tese o termo estresse será utilizado para definir qualquer alteração na
2 homeostase do peixe causada por algum agente estressor.

3 Os agentes estressores podem ser de natureza física (manuseio, altas densidades,
4 confinamento, captura e transporte) ou química (oscilações na concentração de oxigênio
5 dissolvido, altas concentrações de amônia e nitrito), e a severidade vai depender do tipo
6 e da duração do estresse (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002).

7 Quando se desencadeia uma situação de estresse, como redução na concentração
8 de oxigênio e da faixa de temperatura ideal, as respostas fisiológicas ocorrem em
9 movimento cascata. Inicialmente há a ativação de dois eixos neuroendócrinos, o
10 Hipotálamo -Sistema Nervoso Simpático - Células Cromafins (HSC) que liberam as
11 catecolaminas como produto final e o Hipotálamo – Hipófise - Interrenal (HHI) que
12 liberam os corticosteroides (Wendelaar Bonga, 1997; Oba et al.,2009; Gorissen & Flick,
13 2016).

14 Os diferentes tipos de reações ao estresse são caracterizados como respostas
15 primárias, secundárias e terciárias de acordo com o nível organizacional que ocorrem.
16 Quando um agente estressor é detectado, essa informação chega rapidamente ao
17 hipotálamo e é transportada até as células cromafins, no rim cefálico, através das fibras
18 simpáticas do sistema nervoso. Esse estímulo gera a liberação das catecolaminas
19 (adrenalina e a noradrenalina) na corrente sanguínea, que se espalham rapidamente por
20 todo o organismo, podendo persistir por até algumas horas. Além disso, neuropeptídios
21 são transportados do hipotálamo até a hipófise, onde estimulam a produção e secreção
22 do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), liberado na corrente sanguínea e chegando
23 às células interrenais, no rim cefálico, onde estimulam a produção e liberação de

1 cortisol. Esta resposta neuroendócrina é conhecida como resposta primária ao estresse
2 (Barton, 2002; Oba et al., 2009).

3 Como consequência da liberação das catecolaminas e do cortisol, desencadeiam-
4 se alterações bioquímicas e fisiológicas, caracterizadas como respostas secundárias.
5 Uma vez liberadas as catecolaminas e o cortisol na corrente sanguínea os efeitos desses
6 hormônios são imediatos, causando uma série de alterações no sistema respiratório,
7 cardiovascular, nos metabolitos plasmáticos (glicose, lactato), no perfil hematológico
8 (hematócrito, hemoglobina), distúrbios osmorregulatórios e mobilização de reservas
9 energéticas (Wendelaar Bonga, 1997; Barton, 2002).

10 Já a resposta terciária se dá a nível de indivíduo ou população, com inibição do
11 sistema reprodutivo e imune, inibição do crescimento, além disso, o organismo pode
12 reduzir a sua capacidade de resistir a estressores posteriores (Wendelaar Bonga, 1997;
13 Iwama, 1998).

14 Apesar de classificadas em diferentes “estágios”, as respostas a um agente
15 estressor fazem parte de um processo dinâmico, podem acontecer de forma integrada e
16 ainda as respostas primárias desencadearem as respostas secundárias e terciárias
17 (Barton, 2002). Existem diversos biomarcadores utilizados para avaliar o estresse
18 desencadeado pela exposição à hipóxia e temperatura, dentre eles podemos citar os
19 parâmetros sanguíneos (Nikinmaa, 2001; Affonso et al., 2002; Baldisserotto et al.,
20 2008; Jerônimo et al., 2011; Cho et al., 2015).

21

22 **1.6 Parâmetros Sanguíneos**

23 Biomarcadores são indicativos de alterações biológicas que evidenciem efeito da
24 exposição a algum agente estressor, comprovada em alterações celulares, bioquímicas,

1 fisiológicas, entre outras (Nascimento et al., 2006). Alguns pontos importantes na
2 escolha de diferentes classes de biomarcadores são que estes permitam refletir a
3 exposição a fatores ambientais e que permitam a mensuração dos efeitos subletais
4 (Hook et al., 2014).

5 A avaliação dos parâmetros sanguíneos é comumente utilizada pela facilidade e
6 rapidez na avaliação dos resultados. Além disso, a coleta de sangue (Figura 5) é um
7 método não letal que garante a detecção preventiva de efeitos adversos (Tavares-Dias et
8 al., 1999; Satheeshkumar et al., 2012; Dal’Bó et al., 2015).



9
10 Figura 5. Coleta de sangue via veia caudal em juvenis de *P. mesopotamicus*
11 (Fonte: Arquivo pessoal).
12

13 Alterações nas condições ambientais podem se refletir nas brânquias, podendo
14 ser verificado através do perfil hematológico. Estas alterações ocorrem devido as
15 brânquias apresentarem várias funções (respiração, osmorregulação, excreção) e uma
16 grande área de contato, sendo, portanto, sensíveis às mudanças físicas e químicas do
17 meio ambiente (Flores-Lopes & Thomaz 2011). Condições ambientais, como
18 temperatura e níveis de oxigênio dissolvido, quando não se encontram dentro da faixa
19 desejável para cada espécie, podem desencadear diversas alterações comportamentais e

1 bioquímicas, como aumento dos níveis de glicose e lactato, no equilíbrio iônico e ácido-
2 base e nas concentrações de hemoglobina (Kristensen et al., 2010; Vanlandeghem et al.,
3 2010; Jeffries et al., 2012; Ni et al., 2014; Zimmer & Wood, 2014; Val et al., 2015; Wu
4 et al., 2016; Samaras et al., 2016; Pinto et al., 2019., Nitz et al., 2020). Desta forma, o
5 uso de parâmetros sanguíneos é uma ferramenta útil na avaliação do estado de saúde
6 dos peixes, por apresentar respostas rápidas frente a agentes estressores (Heath, 1995).

7

8 **1.7 Estresse Oxidativo**

9 O oxigênio é vital para a existência e essencialmente perigoso. Em um ambiente
10 rico em oxigênio o estresse oxidativo é resultado inevitável, desta forma os organismos
11 aeróbicos precisam lidar com o paradoxo do oxigênio que vem da natureza química do
12 próprio oxigênio (Davies, 1995, 2015). Cerca de 95% de todo oxigênio respirado sofre
13 uma redução tetravalente gerando água como produto final. Este processo ocorre na
14 mitocôndria, na cadeia transportadora de elétrons, com a finalidade de produção de
15 energia (ATP). Entretanto, a partir das reações de oxidação/redução ocorre a produção
16 de radicais livres (Davies, 1995). Nos sistemas biológicos a presença de radicais livres
17 foi inicialmente associada a doenças e ao processo de envelhecimento (Harman, 1956).
18 O conceito de estresse oxidativo foi introduzido em pesquisas de biologia e medicina
19 redox em 1985 (Sies, 2015). Durante o processo de redução do oxigênio as principais
20 espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas são os radicais, ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$),
21 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^{\bullet}), os quais podem causar danos a
22 macro e micromoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos, DNA e RNA) (Valavanidis et
23 al., 2006; Luschak 2011). A formação das ERO é um processo natural no organismo
24 como resultado da geração de subprodutos do metabolismo oxidativo (Schieber &

1 Chandel, 2014) e depende de um ajuste bioquímico para proteção e reparo (sistema
2 antioxidante) e a formação de compostos reativos (pro-oxidantes) que desempenham
3 papel importante na sinalização redox (Pisoschi & Pop, 2015).

4 Contudo, quando ocorre desequilíbrio entre a produção de oxidantes e
5 antioxidantes, em favor dos oxidantes, ou seja, desequilíbrio entre produção e
6 eliminação de ERO, ocorre o chamado estresse oxidativo (Sies, 1986; Luschak, 2016).
7 Outros autores enfatizam a importância do status redox e reformularam o conceito
8 original de estresse oxidativo como um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em
9 favor dos oxidantes levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou
10 dano molecular (Sies, 2015).

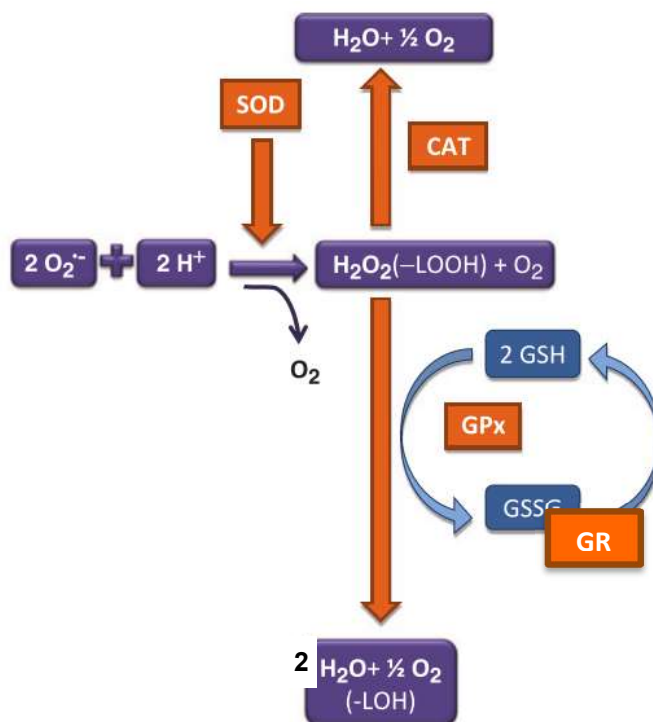
11 Evolutivamente todos os organismos aeróbicos desenvolveram um sistema de
12 defesa antioxidante para combater as reações iniciadas pelas ERO, além de contar com
13 uma série de aparatos para prevenção, remoção e reparo de moléculas danificadas
14 (Davies, 1995; Pisoschi & Pop, 2015). Segundo Halliwell & Gutteridge (1989),
15 qualquer substância que mesmo que em baixa concentração comparada a de um
16 oxidante retarde significativamente ou impeça a oxidação desse substrato é considerada
17 um antioxidante. O sistema de defesa dos organismos aeróbicos é dividido em
18 enzimático e não enzimático.

19 Os antioxidantes não enzimáticos são moléculas de baixo peso molecular, na sua
20 grande maioria de origem exógena, ou seja, aquelas provenientes da alimentação como
21 a vitamina E (α -tocoferol), o ácido ascórbico (vitamina C), vitamina A e seus
22 precursores (α e β -caroteno), além de minerais como cobre, manganês, zinco, selênio e
23 ferro (Papas, 1999; Johnson et al., 2003; Fogaça, 2009). Já o sistema de defesa
24 enzimático é composto por moléculas sintetizadas pelo próprio organismo como a

1 superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona
2 redutase (GR) e a Glutaciona-S-Transferase (GST) (Hermes-Lima, 2004; Pisoschi &
3 Pop 2015).

4 A resposta do sistema antioxidante depende do tecido, duração da exposição e
5 concentração, além de fatores ambientais e fisiológicos (Atli et al., 2016). As enzimas
6 atuam de forma integrada na proteção celular contra radicais oxidativos, como por
7 exemplo, a SOD catalisa a degradação do $O_2^{\bullet-}$ em O_2 e H_2O_2 , e então atua a CAT para
8 catalisar o H_2O_2 em O_2 e H_2O . A glutaciona redutase recicla a glutaciona de forma
9 oxidada (GSSG) em GSH (forma reduzida). A glutaciona peroxidase catalisa a redução
10 de hidroperóxidos em grupos alcoólicos e água usando como co-substrato a GSH, nessa
11 reação a GSH é oxidada a GSSG (Figura 6).

12 A atividade enzimática no organismo pode ser influenciada por diversos fatores,
13 sendo um dos principais a temperatura. A temperatura pode interferir na velocidade das
14 reações químicas e, além disso, pode causar alteração na estrutura tridimensional das
15 proteínas, dificultando sua ligação ao sítio ativo, ocasionando a perda da sua função
16 (Somero, 1995).



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16

Figura 6. Esquema que demonstra a atuação das enzimas antioxidantes conjuntamente contra radicais oxidativos (Fonte: Adaptado de Sáez & Están-Capell, 2017).

O aumento da temperatura ao estimular o metabolismo, aumenta o consumo de oxigênio, sendo esperado também um aumento na produção de ERO, que pode resultar em dano oxidativo (Lushchak, 2011), como já demonstrado em diversas espécies de peixes (Heise et al., 2006; Lushchak & Bagnyukova, 2006; Bagnyukova et al., 2007a,b; Madeira et al., 2013; Pinto et al., 2020). Animais ectotérmicos geralmente não mantêm a temperatura corporal constante, porém cada espécie possui uma temperatura ideal para seu desenvolvimento e manutenção dos processos biológicos. Temperaturas fora da faixa de conforto, ou choques térmicos (mudanças abruptas de temperatura), também podem induzir um cenário pró-oxidante (Feng et al., 2012; Vinagre et al., 2012; Garcia et al., 2015). Isto pode estar relacionado a uma deficiência na eliminação de ERO do organismo (diminuição das defesas antioxidantes) e/ou a um aumento na geração de

1 ERO em situações de estresse associado a condições ambientais desfavoráveis
2 (Lushchak, 2011). Por outro lado, uma resposta adaptativa dos peixes a baixas
3 temperaturas é o aumento do grau de insaturação dos lipídios das membranas para
4 manutenção da sua fluidez (Crockett, 2008; Grim et al., 2010). Entretanto, este
5 mecanismo pode levar a um aumento nos níveis de dano oxidativo, uma vez que os
6 ácidos graxos insaturados são altamente susceptíveis a passarem por um processo de
7 peroxidação lipídica (Crockett, 2008).

8 Em uma condição normal a produção e eliminação de ERO no organismo
9 apresenta certo equilíbrio. Entretanto, quando se trata de sistemas de cultivo, as
10 variáveis ambientais podem sofrer alterações abruptamente. Assim como a temperatura,
11 o oxigênio dissolvido é um fator limitante na aquicultura e, além disso, esses fatores
12 podem ser fonte de energia e uma das principais fontes de combustível para o estresse
13 oxidativo.

14 No caso de uma situação de hipóxia seria lógico esperar que houvesse uma
15 diminuição na produção de radicais livres no organismo (Lushchak, 2011), devido a
16 menor disponibilidade de oxigênio, principal substrato para formação de ERO (Welker
17 et al., 2013). Ransberry et al. (2016) demonstraram este tipo de resposta nas brânquias
18 de *Fundulus heteroclitus* expostos a concentrações de oxigênio dissolvido de
19 aproximadamente 2 mg/L, observando menores níveis de dano proteico. Por vezes
20 frente a um cenário pró-oxidante menos intenso e com limitada disponibilidade de
21 energia por via aeróbica, os organismos podem entrar em estado hipometabólico
22 (Azambuja et al., 2011; Welker et al., 2013), e uma queda no sistema de defesa
23 antioxidante pode ser esperada. Redução na atividade das enzimas antioxidantes como a
24 catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione-S-transferase (GST) e

1 glutationa peroxidase (GPx) já foram relacionadas aos efeitos da hipóxia em peixes
2 (Lushchak & Bagnyukova, 2007; Sampaio et al., 2008; Azambuja et al., 2011; Riffel et
3 al., 2012).

4 Por outro lado, estudos demonstram que durante a hipóxia pode haver uma
5 resposta contrária, com a ativação do sistema antioxidante (Lushchak et al., 2001;
6 Wilhelm Filho et al., 2005; Pan et al., 2010; Pérez-Jiménez et al., 2012; Huang et al.,
7 2015), o que suporta a ideia de uma resposta adaptativa antecipatória denominada
8 “preparação para o estresse oxidativo” (Hermes-Lima et al., 1998). Esta resposta está
9 envolvida em evitar ou minimizar o estresse oxidativo durante uma posterior
10 reoxigenação após um período de limitada disponibilidade de oxigênio.

11 No momento da reperfusão dos tecidos, um vazamento intenso dos elétrons
12 acumulados na cadeia transportadora, durante o período de hipóxia, pode gerar uma
13 superprodução de ERO (Ruuge et al., 1991). Lushchak et al. (2001) foram os primeiros
14 a demonstrar os efeitos da reoxigenação nos parâmetros de estresse oxidativo em
15 peixes, reportando um aumento nos níveis de peroxidação lipídica no fígado e cérebro
16 de goldfish (*Carassius auratus*) após 1 e 14 h de reoxigenação, respectivamente. Em
17 outro estudo também se verificou um aumento nos níveis de dano proteico no fígado de
18 carpa (*Cyprinus carpio*) após 14 h de reoxigenação (Lushchak et al., 2005). Zhang et al.
19 (2016) reportaram aumento da peroxidação lipídica (LPO) no fígado e cérebro de
20 *Pelteobagrus vachelli* ao longo de 6,5 h de recuperação em condições de normóxia (6,8
21 mg/L), após submetidos ao mesmo tempo de hipóxia (0,7 mg/L). Estudos recentes
22 demonstraram que a teoria da preparação ao estresse oxidativo está presente em
23 diversas espécies e já foi evidenciada em pelo menos 83 espécies animais de diferentes

1 filas estudadas nos últimos 20 anos (Hermes-Lima, 2015; Giraud Billoud et al., 2019;
2 Geihs et al., 2020).

3 Evidências de que a hipóxia por si só também é capaz de induzir um aumento na
4 produção de ERO foi descrita em diversos estudos (Lushchak & Bagnyukova, 2007;
5 Chandel, 2010; Mustafa et al., 2011), e levaram Welker et al. (2013) a propor um
6 modelo hipotético no qual tanto hipóxia, hiperóxia e a reoxigenação podem induzir
7 estresse oxidativo pela formação excessiva de ERO. Neste contexto, os mesmos autores
8 sugeriram uma reformulação no conceito de “preparação para o estresse oxidativo”, já
9 que as respostas antioxidantes reportadas durante a hipóxia podem estar relacionadas a
10 um cenário pró-oxidante de fato e não a uma resposta adaptativa para a posterior
11 reoxigenação. Entretanto, os mecanismos bioquímicos envolvidos na indução ao
12 estresse oxidativo durante a hipóxia ainda não estão bem estabelecidos (Lushchak,
13 2011; Welker et al., 2013).

14 Acredita-se que a produção de radicais livres e o controle antioxidante seja um
15 sistema fortemente integrado e regulado onde as ERO produzidas durante a hipóxia
16 sejam moléculas sinalizadoras utilizadas para iniciar uma resposta hipóxica (Johannsson
17 et al., 2018). O processo inicia com a mitocôndria enviando uma explosão de H_2O_2 para
18 as células e sinalizando o início da hipóxia (Chandel et al 1998). São utilizadas
19 respostas fisiológicas (prontamente) e transcricionais (tardiamente) que auxiliam na
20 manutenção do suprimento de O_2 aos tecidos e a garantir a sobrevivência das células
21 durante a privação grave de O_2 (Chandel et al., 2000; Sena e Chandel, 2012). Entre eles
22 em nível tecidual está a eritropoietina (EPO), responsável pela proliferação de
23 eritrócitos, tirosina hidroxilase, para a síntese de dopamina nos corpos carotídeos (efeito
24 excitatório na ventilação), e o fator angiogênico VEGF (vascular endothelial growth

1 fator), que estimula o crescimento de novos capilares. Em nível celular, os produtos que
2 aumentam a sobrevivência durante a hipóxia incluem as enzimas glicolíticas e os
3 transportadores de glicose (Glut1 e Glut3) (Machado, 1998).

1 2. Referências

- 2 Affonso, E.G., Polez, V.L.P., Correa, C.F., Mazon, A.F., Araujo, M.R.R., G. Moraes,
3 G., Rantin, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma*
4 *macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology*
5 C, 133: 375–382. [https://doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00127-8](https://doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00127-8).
- 6 Aguilar, F.A.A., Da Cruz, T.M.P. Mourão, G.B., Cyrino, J.E.P. 2017. Water
7 temperature, body mass and fasting heat production of pacu (*Piaractus mesopotamicus*).
8 *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(2): 1305-1312.
9 <https://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160639>.
- 10 Almeida-Val, V.M.F., Chippari-Gomes, A.R., Lopes, N.P. 2005. Metabolic and
11 physiological adjustments to low oxygen and high temperature in fishes of the Amazon.
12 pp 443-500. In: Adalberto Val, A., Almeida Val, V.M.F., Randall, D. (Eds). *Fish*
13 *Physiology: The Physiology of Tropical Fishes*, Academic Press. 634p.
14 [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(05\)21010-5](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(05)21010-5).
- 15 Atli, G., Canli, E.G., Eroglu, A., Canli, M. 2016. Characterization of antioxidant system
16 parameters in four freshwater fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*,
17 126: 30–37. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.012>.
- 18 Azambuja, C.R., Mattiazzi, J., Riffel, A.P.K., Finamor, I.A., Garcia, L.O., Heldwein,
19 C.G., Heizmann, B.M., Baldisseroto, B., Pavanato, M.A., Llesuy, S.F. 2011. Effect of
20 the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia*
21 *quelen*) subjected to transport. *Aquaculture*, 319: 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.002>.

- 1 Baldisserotto, B., Copatti, C. E., Gomes, L. C., Chagas, E. C., Brinn, R. P., Roubach, R.
2 2008. Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale* (tamoata) and
3 the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to different Amazonian
4 waters. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34: 405–412. [https://doi.org/10.1007/s1069](https://doi.org/10.1007/s10695-008-9200-y)
5 [5-008-9200-y](http://dx.doi.org/). <http://dx.doi.org/> <http://dx.doi.org/>.
- 6 Baldisserotto, B. 2013. *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Editora UFSM,
7 Santa Maria, RS.349p.
- 8 Bagherzadeh Lakani, F., Sattari, M., Falahatkar, B. 2013. Effect of different oxygen
9 levels on growth performance, stress response and oxygen consumption in two weight
10 groups of great sturgeon *Huso huso*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(3): 533-
11 549.
- 12 Bagnyukova, T.V., Danyliv, S.I., Zin'ko, O.S., Lushchak, V.I. 2007a. Heat shock
13 induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. *Journal of Thermal Biology*,
14 32: 255–260. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.014>.
- 15 Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I. 2007b. Oxidative
16 stress and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of
17 temperature from 3 to 23 °C. *Journal of Thermal Biology*, 32: 227–234.
18 <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.004>.
- 19 Balasch, J.C., Tort, L. 2019. Netting the Stress Responses in Fish. *Frontiers in*
20 *Endocrinology*, 10:62. [https://doi: 10.3389/fendo.2019.00062](https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00062).

- 1 Barton, B.A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to
2 changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42: 517–
3 525. <http://dx.doi.org/10.1093/icb/42.3.517>.
- 4 Bastos, V.C., Salles, J.B., Valente, R.H., Le'on, I.R., Perales, J., Dantas, R.F., Albano,
5 R.M., Bastos, F.F., Bastos, J.C. 2007. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of
6 pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. *Biochimie*, 89:
7 1332–1342. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.003>.
- 8 Boyd, C.E. 1997. Practical Aspects of Chemistry in Pond Aquaculture. *The Progressive*
9 *Fish-Culturist*, 59(2): 85-93. <https://doi.org/10.1577/1548-8640>.
- 10 Boyd, C.E. 1982. *Water quality management for pond fish culture*. Elsevier, Amsterdam.
11 330p.
- 12 Buentello, J.A., Gatlin, D.M., Neill, W.H. 2000. Effects of water temperature and
13 dissolved oxygen on daily feed consumption, feed utilization and growth of channel
14 catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 182: 339–352. PII: S 0 0 4 4 - 8 4 8 6 9 9 0 0
15 2 7 4 – 4.
- 16 Cannon, W. 1935. Stress and strains of homeostasis. *American Journal of the Medical*
17 *Sciences*, 189: 1-14. <https://doi :10.1097/00000441-193501000-00001>.
- 18 Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumacker,
19 P.T. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription.
20 *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95: 11715–11720. <https://doi:>
21 [10.1073/pnas.95.20.11715](https://doi.org/10.1073/pnas.95.20.11715).

1 Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Ana,
2 M., Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T. 2000. Reactive oxygen species generated at
3 mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia. Journal
4 of Biological Chemistry, 275: 25130–25138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001914200>.

5 Chandel, N.S. 2010. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. Advances in
6 Experimental Medicine and Biology, 661: 339–354. [https://doi: 10.1007/978-1-60761-](https://doi:10.1007/978-1-60761-500-2_22)
7 [500-2_22](https://doi:10.1007/978-1-60761-500-2_22).

8 Cho, H.C., Kim, J.E., Kim, H.B., Baek, H.J. 2015. Effects of water
9 temperature change on the hematological responses and plasma cortisol levels in
10 growing of red spotted grouper, *Epinephelus akaara*. Development & Reproduction,
11 19(1): 19. <https://doi.org/10.1007/s00360-012-0658-7>.

12 Choi, k., Lehmann, D.W., Harms, C.A., Law, J.M. 2007. Acute Hypoxia–Reperfusion
13 Triggers Immunocompromise in Nile Tilapia. Journal of Aquatic Animal Health, 19:2,
14 128-140. [https://doi: 10.1577/H06-010.1](https://doi:10.1577/H06-010.1).

15 Cuenco, M.L., Stickney, R.R., Grant, W.E. 1985. Fish bioenergetics and growth in
16 aquaculture ponds: ii. effects of interactions among size, temperature, dissolved oxygen
17 unionized ammonia and food on growth of individual fish. Ecological Modelling, 27:
18 191-206. [https://doi.org/10.1016/0304-3800\(85\)90002-X](https://doi.org/10.1016/0304-3800(85)90002-X).

19 Craig, S., Helfrich, L.A., Kuhn, D., Schwarz, M.H. 2017. Understanding fish nutrition,
20 feeds, and feeding. Virginia Cooperative Extension, Publication 420-256, 1-6.

21 Crockett, E.L. 2008. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid
22 restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review.

1 Journal of Comparative Physiology B, 178: 795–809. <https://doi.org/10.1007/s00360->
2 008-0275-7.

3 Dal’Bó, G.A., Sampaio, F.G., Losekann, M.E., Queiroz, J.F., Luiz, A.J.B., Gyárfas,
4 Wolf, V.H., Gonçalves, V.T., Carra, M.L. 2015. Hematological and morphometric
5 blood value of four cultured species of economically important tropical foodfish.
6 Neotropical Ichthyology, 13(2): 439-446. <https://doi: 10.1590/1982-0224-20140115>.

7 Davies, K.J.A. 1995. Oxidative stress: the paradox aerobic life. Biochem. SOC. Symp. 6
8 I, 1-31. <https:// doi: 10.1042/bss0610001>.

9 Davies, K.J.A. 2015. The Oxygen Paradox, Oxidative Stress, and Ageing. Archives of
10 Biochemistry and Biophysics, 595: 28–32. <https://doi:10.1016/j.abb.2015.11.015>.

11 Del Toro-Silva, F.M., Miller, J.M., Taylor, J.C., Ellis, T.A. 2008. Influence of oxygen
12 and temperature on growth and metabolic performance of *Paralichthys lethostigma*
13 (Pleuronectiformes: Paralichthyidae). Journal of Experimental Marine Biology and
14 Ecology, 358: 113–123. <https:// doi.org/10.1016/j.jembe.2008.01.019>.

15 Espmark, A.M., Hjelde, K., Baeverfjord, G. 2010. Development of gas bubble disease in
16 juvenile Atlantic salmon exposed to water supersaturated with oxygen. Aquaculture,
17 306: 198-204. <https:// doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.001>.

18 Farrel, A.P., Richards, J.G. 2009. Defining hypoxia: an integrative synthesis of the
19 responses of fish to hypoxia. pp 487-503. In: Richards, J.G., Farrell, A.P., Brauner, C.J.
20 (Eds). Fish Physiology: Hypoxia. 27, Burlington: Academic Press. 517p.

21 FAO. 2016. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. Contributing to food
22 security and nutrition for all. Rome. 200 p.

1 FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action.
2 Rome. 220p. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>.

3 Feng, G.P., Zhuang, P., Zhang, L.Z., Duan, M., Liu, J.Y. 2012. Effects of temperature
4 on oxidative stress biomarkers in juvenile Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) under
5 laboratory conditions. *Advanced Materials Research*, 343: 497–504. <https://doi.org/10.4>
6 [028/www.scientific.net/AMR.343-344.497](https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.497).

7 Fernandes, M.N., Sanches, J.R., Matsuzaki, M., Panepucci, L., Rantin, F.T. 1999.
8 Aquatic respiration in facultative air-breathing fish: effects of temperature and hypoxia.
9 pp. 341-352. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds.). *Biology of Tropical Fishes*.
10 Manaus: INPA. 460p.

11 Flores-Lopes, F., Thomaz, A.T. 2011. Histopathologic alterations observed in fish gills
12 as a tool in environmental monitoring. *Brazilian Journal of Biology*, 71(1): 179-188.
13 <https://doi.org/10.1590/S1519-69842011000100026>.

14 Fogaça, F.H.S., Sant'ana, L.S. 2009. Lipid oxidation in fishes: action mechanism and
15 prevention. *Archives of Veterinary Science*, 14(2): 117-127.

16 Garcia, L.O., Copatti, C.E., Wachholz, F., Pereira Filho, W., Baldisserotto, B. 2008.
17 Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its
18 implication for fish culture. *Neotropical Ichthyology*, 6: 275–281.
19 <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200016>.

20 Garcia, L.O., Okamoto, M.H., Riffel, A.P.K., Saccol, E.M., Pavanato, M.A., Sampaio,
21 L.A.N. 2015. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys*
22 *orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold

1 and heat shocks. *Neotropical Ichthyology*, 13: 607–612. [https://doi.org/10.1590/1982-](https://doi.org/10.1590/1982-0224-20140148)
2 0224-20140148.

3 Geihs, M.A., Moreira, D.C., López-Martínez, G., Minari, M., Ferreira-Cravo, M.,
4 Carvajalino-Fernández, J.M., Hermes-Lima, M. 2020. Commentary: Ultraviolet
5 radiation triggers “preparation for oxidative stress” antioxidant response in animals:
6 Similarities and interplay with other stressors. *Comparative Biochemistry and*
7 *Physiology A*, 239: 110585. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.110585>.

8 Giraud-Billoud, M., Rivera-Ingraham, G.A., Moreira, D.C., Burmester, T., Castro-
9 Vazquez, A., Carvajalino-Fernández, J.M., Dafre, A., Niu, C., Tremblay, N., Paital, B.,
10 Rosa, R., Storey, J.M., Veja, I.A., Zhang, W., Yepiz-Plascencia, G., Zenteno-Savin, T.,
11 Storey, K.B., Hermes-Lima, M. 2019. Twenty years of the ‘Preparation for Oxidative
12 Stress’ (POS) theory: Ecophysiological advantages and molecular strategies.
13 *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 234: 36–49.
14 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.04.004>.

15 Godoy, M.P., 1975. *Peixes Do Brasil: Subordem Characoidei: Bacia Do Rio Mogi-*
16 *Guassu*. Piracicaba, SP: Franciscana. 846p.

17 Gorissen, M., Flik, G. 2016. The endocrinology of the stress response in fish: An
18 Adaptation-Physiological View. pp. 75-111. In: Schreck, C.B., Tort, L., Farrell, A.P.,
19 Brauner, C.J. (Eds). *Fish Physiology: Biology of Stress in Fish*, Academic Press, 35: 75-
20 111. 590p. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00003-5>.

21 Grim, J.M., Miles, D.R.B., Crockett, E.L. 2010. Temperature acclimation alters
22 oxidative capacities and composition of membrane lipids without influencing activities

1 of enzymatic antioxidants or susceptibility to lipid peroxidation in fish muscle. The
2 Journal of Experimental Biology 213, 445-452. [https:// doi:10.1242/jeb.036939](https://doi.org/10.1242/jeb.036939).

3 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 1989. Free Radicals in Biology and Medicine (2nd
4 edition). Oxford, UK: Clarendon Press. 543p.

5 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2015. Free radicals in biology and medicine (5th ed).
6 New York, USA: Oxford University Press. 943p.

7 Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. Journal
8 of Gerontology 11(3):298-300. [https:// doi: 10.1093/geronj/11.3.298](https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298).

9 Hazel, J.R. 1993. Thermal biology. In: Evans, D.H. (Ed.), The Physiology of Fishes.
10 CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 427–467.

11 Heath, A.G. 1995. Water pollution and fish physiology. Florida: Lewis Publishers.
12 359p.

13 Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., Portner, H.O. 2006. Oxidative stress
14 during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus*
15 L. The Journal of Experimental Biology, 209: 353–363.
16 <https://doi.org/10.1242/jeb.01977>.

17 Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B. 1998. Antioxidant defenses and metabolic
18 depression. the hypothesis of preparation for oxidative stress in lands nails.
19 Comparative Biochemistry and Physiology B, 12: 437–448.
20 [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(98\)10053- 6](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(98)10053-6).

- 1 Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. pp
2 319-368. In: Storey, K.B. (editor) *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*.
3 616p. ISBN 0-471-41090-X John Wiley & Sons, Inc.
- 4 Hook, S.E., Gallagher, E.P., Batley, G.E. 2014. The role of biomarkers in the
5 assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and*
6 *Management*, 10(3): 327–341. [https://doi: 10.1002/ieam.1530](https://doi.org/10.1002/ieam.1530).
- 7 Huang, C.Y., Lin, H.C., Lin, C.H. 2015. Effects of hypoxia on ionic regulation,
8 glycogen utilization and antioxidative ability in the gills and liver of the aquatic air-
9 breathing fish *Trichogaster microlepis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*,
10 179: 25–34. [https://doi.org/ 10.1016/j.cbpa.2014.09.001](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.001).
- 11 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2020. Sistema IBGE de
12 Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/>.
- 13 Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. 2011. Fish stress and health
14 in aquaculture. Cambridge University Press, Nova Iorque. 290p.
- 15 Jeffries, K.M., Hinch, S.G., Martins, E.G., Clark, T.D., Lotto, A.G., Patterson, D.A.,
16 Cooke, S.J., Farrell, A.P., Miller, K.M. 2012. Sex and proximity to reproductive
17 maturity influence the survival, final maturation, and blood physiology of Pacific
18 salmon when exposed to high temperature during a simulated migration. *Physiological*
19 *and Biochemical Zoology*, 85(1): 62-73. [https://doi: 10.1086/663770](https://doi.org/10.1086/663770).
- 20 Jerônimo, G.T., Laffitte, L.V., Speck, G.M. Martins, M.L. 2011. Seasonal influence on
21 the hematological parameters in cultured Nile tilapia from southern Brazil. *Brazilian*

1 Journal of Biology, 71(3): 719-725. <https://doi.org/10.1590/S1519->
2 69842011000400017.

3 Johannsson, O.E., Giacomini, M., Henrique, H. S., Campos, D., Braz Mota, S.,
4 Heinrichs-Caldas, W., Val, A.L. 2018. Does hypoxia or different rates of re-
5 oxygenation after hypoxia induce an oxidative stress response in *Cyphocharax*
6 *abramoides* (Kner 1858), a Characid fish of the Rio Negro? Comparative Biochemistry
7 and Physiology A, 224: 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.019>.

8 Johnson, L.J., Meacham, S.L., Kruskall, L.J. 2003. The Antioxidants- Vitamin C,
9 Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Journal of Agromedicine, 9(1): 65-82. <https://>
10 10.1300/J096v09n01_07.

11 Kristensen, T., Rosseland, B.O., Kiessling, A., Djordevic, B., Massabau, J.C. 2010.
12 Lack of arterial PO₂ downregulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during long-
13 term normoxia and hyperoxia. Fish Physiology and Biochemistry, 36: 1087–1095.
14 [https://doi: 10.1007/s10695-010-9386-7](https://doi:10.1007/s10695-010-9386-7).

15 Legatt, R.A., Iwama, G.K. 2003. Occurrence of polyploidy in the fishes. Fish Biology
16 and Fisheries, 13: 237-246. <https://doi.org/10.1023/B:RFBF.0000033049.00668.fe>.

17 Leite, C.A.C., Florindo, L.H., Kalinin, A.L., Milsom, W.K., Rantin, F.T. 2007. Gill
18 chemoreceptors and cardio-respiratory reflexes in the neotropical teleost pacu,
19 *Piaractus mesopotamicus*. Journal of Comparative Physiology A, 193:1001-1011
20 [https://doi 10.1007/s00359-007-0257-3](https://doi.10.1007/s00359-007-0257-3).

21 Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M. 2001. Oxidative stress
22 and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and

1 reoxygenation. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 280: 100–107.
2 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2001.280.1.R100>.

3 Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M., Storey, K.B. 2005.
4 Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in
5 common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. The International Journal of Biochemistry &
6 Cell Biology, 37: 1319–1330. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>.

7 Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. 2006. Effects of different environmental oxygen
8 levels on free radical processes in fish. Comparative Biochemistry and Physiology B,
9 144: 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>.

10 Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. 2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of
11 a goby, the rotan *Perccottus glenii*. Comparative Biochemistry and Physiology B, 148:
12 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.007>.

13 Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.
14 Aquatic Toxicology, 101: 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.

15 Lushchak, V.I. 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic
16 approach. Fish Physiology and Biochemistry, 42: 711-747.
17 <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0171-5>.

18 Machado, U.F. 1998. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. Arquivos
19 Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 42 (6): 413-421.
20 <https://doi.org/10.1590/S0004-27302006000200004>.

21 Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S. 2013. Influence of
22 temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. Comparative

1 Biochemistry and Physiology A, 166: 237–243.
2 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.008>.

3 Miller, D., Poucher, S., Coiro, L. 2002. Determination of lethal dissolved oxygen levels
4 for selected marine and estuarine fishes, crustaceans, and a bivalve. *Marine Biology*,
5 140(2): 287-296. <https://doi.org/10.1007/s002270100702>.

6 Mustafa, S.A., Al-Subiai, S.N., Davies, S.J., Jha, A.N. 2011. Hypoxia-induced oxidative
7 DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in
8 common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology*, 20: 1455–1466. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1007/s10646-011-0702-5)
9 [10.1007/s10646-011-0702-5](https://doi.org/10.1007/s10646-011-0702-5).

10 Nascimento, I.A., Pereira, S. A., Leite, M.B. 2006. Biomarcadores como instrumentos
11 preventivos de poluição. pp. 413-431. In: Zagatto, P.A., Bertoletti, E. (eds.).
12 *Ecotoxicologia Aquática- Princípios e Aplicações*. São Paulo. 478p.

13 Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Bu, Y., Ren, Y., Ding, H. 2014. The physiological
14 performance and immune responses of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*)
15 to stocking density and hypoxia stress. *Fish and Shellfish Immunology*, 36: 325–335.
16 <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.002>.

17 Nikinmaa, M. 2002. Oxygen-dependent cellular functions—why fishes and their aquatic
18 environment are a prime choice of study. *Comparative Biochemistry and Physiology A*,
19 133:1–16. [Httpa:// doi: 10.1016/s1095-6433\(02\)00132-0](http://doi:10.1016/s1095-6433(02)00132-0).

20 Nitz, L.F., Maltez, L.C., Pellegrin, L., Garcia, L.O., Barbas, L.A.L., Prentice-
21 Hernández, C. 2019. Flesh quality and stress responses of *Piaractus mesopotamicus*
22 after exposure to sublethal levels of ammonia and subsequent recovery. *Boletim do*

1 Instituto de Pesca, 45, e325. <http://doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.1.325>.

2 <https://doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.1.325>.

3 Nitz, L.F., Pellegrin, L., Maltez, L.C., Pinto, D., Sampaio, L.A., Monserrat, J.M.,
4 Garcia, L. 2020. Temperature and hypoxia on oxidative stress responses in pacu
5 *Piaractus mesopotamicus*. Journal of Thermal Biology, 92: 102682.
6 <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102682>.

7 Oba, E.T., Mariano, W.S., Santos, L.R.B. 2009. Estresse em peixes cultivados:
8 agravantes e atenuantes para o manejo rentável. pp. 226-247. In: Tavares-Dias, M.
9 (Org.) Manejo e sanidade de peixes em cultivo. Embrapa, Amapá, Macapá.723p.

10 Oliveira, R.D., Lopes, J.M., Sanchez, J.R., Kalinin, A.L., Glass, M., Rantin, F.T. 2004.
11 Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus*
12 *unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae) exposed to graded ambient hypoxia. Comparative
13 Biochemistry and Physiology A, 139: 479-485. <https://doi:10.1016/j.cbpb.2004.10.011>.

14 Onukwufor, J.O., Kibenge, F., Stevens, D., Kamunde, C. 2016. Hypoxia-reoxygenation
15 differentially alters the thermal sensitivity of complex I basal and maximal
16 mitochondrial oxidative capacity. Comparative Biochemistry and Physiology A, 201:
17 87-94. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.033>.

18 Pan, C., Chien, Y., Wang, Y. 2010. The antioxidant capacity response to hypoxia stress
19 during transportation of characins (*Hyphessobrycon callistus* Boulenger) fed diets
20 supplemented with carotenoids. Aquaculture Research, 41: 973-981. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2009.02380.x>.

21 10.1111/j.1365-2109.2009.02380. x.

1 Papas, A.M. 1999. Diet and Antioxidant Status. *Food and Chemical Toxicology*, 37:
2 999-1007. [https://doi: 10.1016/s0278-6915\(99\)00088-5](https://doi:10.1016/s0278-6915(99)00088-5).

3 PEIXE BR. Anuário Peixe BR da Piscicultura 2020. São Paulo: Associação Brasileira
4 de Piscicultura, 2020. 136p.

5 Pellegrin, L., Nitz, L.F., Maltez, L.C., Copatti, C.E., Garcia, L. 2020. Alkaline water
6 improves the growth and antioxidant responses of pacu juveniles (*Piaractus*
7 *mesopotamicus*). *Aquaculture*, 519, 734713. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734713>.

9 Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V.C., Oliva-Teles, A. 2012. The effect of hypoxia
10 on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead seabream (*Sparus aurata*)
11 fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comparative Biochemistry*
12 *and Physiology C*, 155: 506–516. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.12.005>.

13 Pinto, D., Pellegrin, L., Nitz, L. F., da Costa, S. T., Monserrat, J. M., Garcia, L. 2019.
14 Haematological and oxidative stress responses in *Piaractus mesopotamicus* under
15 temperature variations in water. *Aquaculture Research*, 50: 3017–3027.
16 <https://doi.org/10.1111/are.14260>.

17 Pinto, D., Pellegrin, L., Nitz, L. F., Monserrat, J. M., Garcia, L. 2020. Influence of
18 temperature on growth, feed consumption and chemical composition in the muscle of
19 Pacu *Piaractus mesopotamicus*. *Aquaculture Research*, 00:1–8. [https://doi](https://doi.org/10.1111/are.14726)
20 [10.1111/are.14726](https://doi.org/10.1111/are.14726).

1 Pisoschi, A.M., Pop, A. 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative
2 stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: 55-74.
3 <https://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.

4 Portner, H.O., Kreutzer, U., Siegmund, B., Heisler, N., Grieshaber, M.K. 1984.
5 Metabolic adaptation of the intertidal worm *Sipunculus nudus* to functional and
6 environmental hypoxia. *Marine Biology*, 79: 237-247.

7 Ransberry, V.E., Blewett, T.A., McClelland, G.B. 2016. The oxidative stress response in
8 freshwater-acclimated killifish (*Fundulus heteroclitus*) to acute copper and hypoxia
9 exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 179: 11–18.
10 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.08.001>.

11 Rebouças, P.M., Lima, L.R., Dias, I.F., Barbosa Filho, J.A.D. 2014. Influência da
12 oscilação térmica na água da piscicultura. *Journal of Animal Behaviour and*
13 *Biometeorology*, 2: 2: 35-42. <https://dx.doi.org/10.14269/2318-1265.v02n02a01>

14 Richards J.G. 2009. Metabolic rate suppression as a mechanism for surviving
15 environmental challenge in fish. pp. 113-139. In: Navas, C.A., Carvalho J.E. (eds)
16 Aestivation. *Progress in molecular and subcellular biology*, 49. Springer, Berlin,
17 Heidelberg. 286p. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02421-4_6.

18 Riffel, A.P.K., Garcia, L.O., Finamor, I.A., Saccol, E.M.H., Meira, M., Kolberg, C.,
19 Horst, A., Partata, W., Llesuy, S., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A. 2012. Redox
20 profile in liver of *Leporinus macrocephalus* exposed to different dissolved oxygen
21 levels. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38: 797–805. [https://doi.org/10.1007/s10695-](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9563-3)
22 [011-9563-3](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9563-3).

1 Ruuge, E.K., Ledenev, A.N., Lakomkin, V.L., Konstantinov, A.A., Ksenzenko, M.Y.
2 1991. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion.
3 American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology, 261: 81–86.
4 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.4.81>.

5 Sáez, G.T., Están-Capell, N. 2017. Antioxidant Enzymes. In: Schwab, M. (ed)
6 Encyclopedia of cancer. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
7 https://doi.org/10.1007/978-3-662-46875-3_7210.

8 Samaras, A., Papandroulakis, N., Costari, M., Pavlidis, M. 2016. Stress and metabolic
9 indicators in a relatively high (European sea bass, *Dicentrarchus labrax*) and a low
10 (meagre, *Argyrosomus regius*) cortisol responsive species, in different water
11 temperatures. Aquaculture Research, 47: 3501–3515. <https://doi.org/10.1111/are.12800>.

12 Sampaio, F.G., Bojink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Rantin, F.T.
13 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus*
14 *mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure.
15 Comparative Biochemistry and Physiology C, 147: 43–51.
16 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.07.009>.

17 Satheeshkumar, P., Ananthan, G., Senthilkumar, D., Khan, A.B., Jeevanantham, K.
18 2012. Comparative investigation on haematological and biochemical studies on wild
19 marine teleost fishes from Vellar estuary, southeast coast of India. Comparative Clinical
20 Pathology, 21:275–281. <https://doi.org/10.1007/s00580-010-1091-5>.

21 Schieber, M., Chandel, N.S. 2014. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative
22 Stress. Current Biology, 24(10): 453–462. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.

1 Selye, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*.
2 1:1383. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4667.1383>.

3 Sena, L.A., Chandel, N.S. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen
4 species. *Molecular Cell*, 48(2): 158–167. <https://doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025>.

5 Sies, H. 1986. *Biochemistry of Oxidative Stress*. *Angewandte Chemie International*
6 *Edition*, 25: 1058-1071.

7 Sies, H. 2015. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox*
8 *Biology*, 4: 180–183. <https://doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002>.

9 Silva, L.L., Souza, C.F., Parodi, T.V., Gindri, A.L., Pacheco, P.S., Bianchini, A.E.,
10 Baldisserotto, B. 2020. Ethanolic extract of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq.: An effective
11 sedative and antioxidant agent in fish. *Aquaculture*,
12 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735940>.

13 Somero, G.N. 1995. Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology*, 57:43-68.

14 Stiller, K. T., Vanselow, K. H., Moran, D., Riesen, G., Koppe, W., Dietz, C., Schulz, C.
15 2017. The effect of diet, temperature and intermittent low oxygen on the metabolism of
16 rainbow trout. *British Journal of Nutrition*, 117(6): 784-795. [https://doi:](https://doi: 10.1017/S0007114517000472)
17 [10.1017/S0007114517000472](https://doi: 10.1017/S0007114517000472).

18 Sundin, L. 1999. Hypoxia and blood flow control in fish gills. pp. 353-362. In: Val,
19 A.L., Almeida-Val, V.M.F. (Eds.). *Biology of Tropical Fishes*. Manaus: INPA. 460p.

20 Tavares-Dias, M., Tenani, R.A., Gioli, L.D., Faustino, C.D. 1999. Características
21 hematológicas de teleósteos brasileiros. II. Parâmetros sanguíneos do *Piaractus*

1 *mesopotamicus* Holmberg (Osteichthyes, Characidae) em policultivo intensivo. Revista
2 Brasileira de Zoologia, 16 (2): 423 -431.

3 Taylor, E.W., Jordan, D., Coote, J.H. 1999. Central Control of the Cardiovascular and
4 Respiratory Systems and Their Interactions in Vertebrates. *Physiological Reviews*,
5 79(3):855-916. [https://doi: 10.1152/physrev.1999.79.3.855](https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.3.855).

6 Taylor, E.W., Leite, C.A.C., Florindo, L.H., Belão, T., Rantin, F.T. 2009. The basis of
7 vagal efferent control of heart rate in a neotropical fish, the pacu, *Piaractus*
8 *mesopotamicus*. *Journal of Experimental Biology*, 212: 906-913. [https://doi:](https://doi.org/10.1242/jeb.020529)
9 [10.1242/jeb.020529](https://doi.org/10.1242/jeb.020529).

10 Timmons, M.B., Ebeling, J.M., Wheaton, F.W., Summerfelt, S.T., Vinci, B.J. 2001.
11 Recirculating Aquaculture Systems. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY. NRAC
12 Publication. 650p.

13 Tripathy, A. 2016. Oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) and antioxidative
14 defense system, with special reference to fish. *International Journal of Current Research*
15 *in Biosciences and Plant Biology*, 3(10): 79-89.
16 <https://dx.doi.org/10.20546/ijcrbp.2016.310.010>.

17 Urbinati, E.C.; Goncalves, F.D.; Takahashi, L.S. 2020. Pacu *Piaractus mesopotamicus*.
18 In: Baldisseroto B.(Org.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 3ª ed. Santa
19 Maria: UFSM. 544p.

20 Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. 2006. Molecular
21 biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental

1 pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64: 178–189.
2 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013>.

3 Val, A.L. 1996. Surviving low oxygen levels: Lessons from fishes of the Amazon. 59-
4 73p. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. (Eds.). *Physiology and*
5 *Biochemistry of the fishes of the Amazon*, INPA, Manaus, Brazil.

6 Val, A.L., Paula-Silva, M.N., Almeida-Val, V.M.F. 1998. Hypoxia adaptation in fish of
7 the Amazon: a never ending task. *South African Journal of Zoology*, 33(2):107-114.
8 <https://doi.org/10.1080/02541858.1998.11448459>.

9 Val, A.L., Katia Regina Maruyama Gomes, K.R.M., Almeida-Val, V.M.F. 2015. Rapid
10 regulation of blood parameters under acute hypoxia in the Amazonian fish *Prochilodus*
11 *nigricans*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 184: 125–131.
12 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.02.020>.

13 Van Ham, E.H., Berntssen, M.H., Imsland, A.K., Parpoura, A.C., Bonga, S.E.W.,
14 Stefansson, S.O. 2003. The influence of temperature and ration on growth, feed
15 conversion, body composition and nutrient retention of juvenile turbot (*Scophthalmus*
16 *maximus*). *Aquaculture*, 217(1-4): 547-558. [https://doi.org/10.1016/S0044-](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00411-8)
17 [8486\(02\)00411-8](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00411-8).

18 Vanlandeghem, M.M., Wahl, D.H., Suski, C.D. 2010. Physiological responses of
19 largemouth bass to acute temperature and oxygen stressors. *Fisheries Management and*
20 *Ecology*, 17: 414-425. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2010.00740.x>.

21 Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M. 2012. Effect of
22 temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the

- 1 muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators*, 23: 274–279.
2 [https://doi.org/ 10.1016/j.ecolind.2012.04.009](https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.04.009).
- 3 Wang, N., Xu, X., Kestemont, P. 2009. Effect of temperature and feeding frequency on
4 growth performances, feed efficiency and body composition of pikeperch juveniles
5 (*Sander lucioperca*). *Aquaculture*, 289: 70-73.
6 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.01.002>.
- 7 Wells, R. M. 2009. Blood-gas transport and hemoglobin function: Adaptations for
8 functional and environmental hypoxia. pp. 255-299. In: Farrell, A.P., J.G. Richards,
9 J.G., Brauner, C.J. (Eds.), *Fish physiology: Hypoxia*. London, UK: Academic Press.
10 517p. [http://doi.org/10.1016/ S1546-5098\(08\)00006-X](http://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00006-X).
- 11 Welker, A.F., Moreira, D.C., Campos, E.G., Hermes-Lima, M. 2013. Role of redox
12 metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability.
13 *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 165: 384–404. [https://doi.org/10.1016/j.](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003)
14 [cbpa.2013.04.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003).
- 15 Wendelaar Bonga, S.E. 1997. The stress response in fish. *Physiology Reviews*, 77: 591–
16 625. <https://doi.org/10.1152/physr ev.1997.77. 3.591>.
- 17 Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C. 2005. Effect of
18 different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in
19 piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, 244: 349–357.
20 <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.024>.
- 21 Iwama, G. 1998. Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851,
22 304–310. [https://doi: 10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x](https://doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x).

- 1 Zhang, L., Feng, L., Jiang, W.D., Liu, Y.; Jiang, J., Li, S.H., Tang, L.; Kuang, S.Y.,
2 Zhou, X.Q. 2016. The impaired flesh quality by iron deficiency and excess is associated
3 with increasing oxidative damage and decreasing antioxidant capacity in the muscle of
4 young grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture Nutrition*, 22(1): 191-201.
5 [https://doi: 10.1111/anu.12237](https://doi.org/10.1111/anu.12237).
- 6 Zimmer, A.M., Wood, C.M. 2014. Exposure to acute severe hypoxia leads to increased
7 urea loss and disruptions in acid-base and ionoregulatory balance in dogfish sharks
8 (*Squalus acanthias*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 87(5): 623-639.
9 [https://doi: 10.1086/677884](https://doi.org/10.1086/677884).

1 **3. Objetivos**

2

3 **3.1 Objetivo geral**

4 Verificar os efeitos da interação entre diferentes temperaturas e níveis de
5 oxigênio dissolvido da água nos parâmetros sanguíneos e de estresse oxidativo em
6 diferentes órgãos de juvenis de pacu.

7

8 **3.2 Objetivos específicos**

9 - Verificar os efeitos da interação de diferentes temperaturas e níveis de oxigênio
10 dissolvido na água nos parâmetros sanguíneos de juvenis de pacu;

11 - Analisar os efeitos da interação de diferentes temperaturas e níveis de oxigênio
12 dissolvido na água sobre os parâmetros de estresse oxidativo de juvenis de pacu;

13 - Avaliar os efeitos da interação de diferentes temperaturas e velocidades de
14 reoxigenação nos parâmetros sanguíneos em juvenis de pacu;

15 - Determinar os efeitos da interação de diferentes temperaturas e velocidades de
16 reoxigenação nos parâmetros bioquímicos em juvenis de pacu.

1 **Capítulo I**

2

3 **Temperature and hypoxia on oxidative stress responses in pacu *Piaractus***
4 ***mesopotamicus***

5

6 Lilian F Nitz^a, e-mail address: lilian_fiori@hotmail.com

7 Lucas Pellegrin^a, e-mail address: lucapelagres@gmail.com

8 Lucas C Maltez^b, e-mail address: lucascmaltez@gmail.com

9 Daniel Pinto^a, e-mail address: danielpintozootecnista@gmail.com

10 Luís A Sampaio^b, e-mail address: sampaio@mikrus.com.br

11 José M Monserrat^{c,d}, e-mail address: monserrat_jm@furg.br

12 Luciano Garcia^{a*}, e-mail address: garcia_log@hotmail.com

13

14 ^aLaboratório de Aquicultura Continental (LAC), Instituto de Oceanografia (IO),
15 Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil.

16 ^bLaboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha (LAPEM), Instituto de Oceanografia
17 (IO), Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS, Brazil.

18 ^cLaboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA), Instituto de
19 Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS,
20 Brazil.

21 ^dInstituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
22 Rio Grande, RS, Brazil.

23

24 **Artigo publicado na revista *Journal of Thermal Biology*. doi:**
25 **10.1016/j.jtherbio.2020.102682**

1 **Abstract**

2 The aim of this study was to verify the effects of the interaction between different
3 temperatures and levels of dissolved oxygen in the oxidative stress parameters of pacu
4 juveniles. A total of 81 pacu juveniles (61.7 ± 9.1 g) were exposed to three temperatures
5 (18, 23, and 28°C), acclimated for a period of 30 days, and then submitted to three
6 levels of dissolved oxygen: control or normoxia (7 mg L^{-1}); moderate hypoxia (4 mg L^{-1});
7 and severe hypoxia (2 mg L^{-1}) for 12 h. Glutathione-S-transferase (GST) activity,
8 total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP), and protein thiol content
9 (PSH) and LPO (lipid peroxidation) [measured by the TBARS] were measured in gill,
10 liver, muscle and brain. The results indicated that the interaction between different
11 temperatures and dissolved oxygen levels caused alterations in the antioxidant system
12 and induced lipid and protein damage in pacu juveniles. In addition, the effects were
13 organ specific. In conclusion, exposure to moderate and severe hypoxia affect oxidative
14 stress parameters and have been shown to be organ-specific in pacu juveniles. The
15 interaction between 23°C and hypoxia caused greater disturbances in oxidative stress
16 markers, such as PSH in the gills and liver and LPO in the muscle.

17

18 **Keywords:** biochemical parameters, Glutathione-S-transferase, lipoperoxidation, redox
19 status

1 **1. Introduction**

2 Aerobic organisms must deal with oxygen toxicity due to the formation of
3 reactive oxygen species (ROS) during metabolic processes involved in ATP production
4 (Hermes Lima, 1998), which are able to react with and oxidize macromolecules,
5 compromising biochemical and physiological functions. Therefore, organisms have
6 developed a complex antioxidant system.

7 Oxidative stress can be defined as a transient or chronic imbalance caused by an
8 increase in ROS concentration and/or impairment in the antioxidant system results in
9 damage to biomolecules (Halliwell & Gutteridge, 2015; Lushchak, 2011). This
10 condition can be caused by changes in environmental variables such as temperature and
11 dissolved oxygen (Lushchak, 2011), frequently observed in aquaculture facilities.

12 In ectothermic species, body temperature is determined mainly by water
13 temperature, and consequently this parameter directly affects the general metabolism,
14 behavior, and maintenance of various biochemical and physiological processes of
15 animals (Hazel, 1993). The increase in metabolism caused by raising the temperature
16 also results in higher oxygen consumption and, consequently, an increase in ROS
17 production, which can result in oxidative stress (Lushchak, 2011), as has been
18 demonstrated in several fish species (Heise *et al.*, 2006; Lushchak & Bagnyukova,
19 2006; Bagnyukova *et al.*, 2007a, 2007b; Madeira *et al.*, 2013).

20 The temperature outside of the tolerated range or abrupt changes in temperature
21 can also induce a pro-oxidant scenario (Feng *et al.*, 2012; Vinagre *et al.*, 2012; Garcia *et*
22 *al.*, 2015). Furthermore, the adaptive response of fish to low temperatures is an increase
23 in the degree of unsaturation of lipids to maintain the fluidity of biological membranes.
24 However, this mechanism may lead to an increase in oxidative damage, since

1 unsaturated fatty acids are highly susceptible to the lipid peroxidation (LPO) (Crockett,
2 2008).

3 In addition to its direct effect on cultured organisms, temperature also affects
4 dissolved oxygen concentrations in the aquatic environment. Oxygen depletion in the
5 environment can occur when the rate of oxygen uptake, is higher than the oxygen input
6 in the system (Boyd & Tucker, 2012). In aquaculture facilities, this input depends on
7 aeration systems, especially in high-density cultures. However, aeration systems are
8 susceptible to technical and operational problems, such as lack of energy (Dong *et al.*,
9 2011), and can thus cause shortcomings in oxygen input and availability to organisms
10 (Timmons *et al.*, 2001).

11 During hypoxia, it would be logical to expect a decrease in the production of free
12 radicals in the body (Lushchak, 2011), due to the lower availability of oxygen, the
13 primary substrate for ROS formation (Welker *et al.*, 2013). Ransberry *et al.* (2016)
14 demonstrated lower levels of protein damage in the gills of *Fundulus heteroclitus*
15 exposed to 2 mg L⁻¹ of dissolved oxygen. The lower formation of ROS also results in
16 the downregulation of antioxidant defences (Lushchak & Bagnyukova, 2007; Sampaio
17 *et al.*, 2008; Azambuja *et al.*, 2011; Riffel *et al.*, 2012) and the limited aerobic energy
18 availability may trigger a hypometabolic state in organisms (Azambuja *et al.*, 2011;
19 Welker *et al.*, 2013).

20 Other studies have shown that during hypoxia, there may be a contrary response,
21 via activation of the antioxidant system (Lushchak *et al.*, 2001; Wilhelm Filho *et al.*,
22 2005; Pan *et al.*, 2010; Pérez-Jiménez *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2015), which supports
23 the idea of an early adaptive response called "preparation for oxidative stress" (Hermes-
24 Lima & Zenteno-Savín, 2002). This biochemical response is important for avoiding or

1 minimizing oxidative stress during reoxygenation after a period of limited oxygen
2 availability. In tissue reperfusion, an intense leakage of the electrons that accumulate in
3 the electron transport chain during the period of hypoxia can generate an
4 overproduction of ROS (Ruuge *et al.*, 1991).

5 However, evidence that only hypoxia is capable of inducing increased ROS
6 production (Lushchak & Bagnyukova, 2007; Chandel, 2000; Mustafa *et al.*, 2011) has
7 led to a hypothetical model in which hypoxia, hyperoxia, and reoxygenation may induce
8 oxidative stress by excessive ROS production (Welker *et al.*, 2013). The same authors
9 suggest a reformulation of the concept of "preparation for oxidative stress", since the
10 antioxidant responses reported during hypoxia may, in fact, be related to a pro-oxidant
11 scenario and not to an adaptive response for subsequent reoxygenation. At present, the
12 biochemical mechanisms involved in hypoxia-induced oxidative stress are still not
13 completely understood (Lushchak, 2011; Welker *et al.*, 2013).

14 The pacu *Piaractus mesopotamicus* is a native species of the Prata basin (Godoy,
15 1975) that is widely distributed in South America (Schenone *et al.*, 2011). It prefers to
16 inhabit water at temperatures above 22 °C, with an optimal temperature above 25 °C
17 (Urbinati & Gonçalves, 2005). The success of this species in aquaculture is due to
18 characteristics such as fast growth, omnivorous food habits, and acceptance in the
19 consumer market. These characteristics also give to this species great potential for use
20 in intensive production systems (Oliveira *et al.*, 2004; Urbinati *et al.*, 2013).

21 Studies evaluating the interaction between temperature and levels of dissolved
22 oxygen are needed (Del Toro *et al.*, 2008; Clotfelter *et al.*, 2013; McBryan *et al.*, 2013),
23 especially with respect to the assessment of antioxidants and oxidative damage
24 responses in fish. Thus, the aim of this study was to determine the effects of the

1 interaction of different temperatures and levels of dissolved oxygen in the water on the
2 oxidative stress parameters of pacu juveniles.

3

4 **2. Materials and methods**

5

6 **2.1 Ethic Animal**

7 The experimental protocol was approved by the Committee on Animal
8 Experimentation of Universidade Federal do Rio Grande - FURG, process number
9 P049/2017.

10

11 **2.2 Fish and experimental conditions**

12 Pacu juveniles (61.7 ± 9.1 g; 13.6 ± 0.63 cm) were purchased from a fish farmer in
13 Ajuricaba, Rio Grande do Sul state, Brazil and transported to the Laboratorio de
14 Aquacultura Continental at the Universidade Federal do Rio Grande - FURG.

15 Prior to the experiment, 81 fish were randomly placed in twenty-seven 100L
16 circular tanks (3 per tank– 30 L useful volume) distributed in nine recirculating
17 aquaculture systems (three replicates), equipped with mechanical and biological filters.
18 Fish were acclimated in this systems for 30 days to three temperatures 18°C ($18.07 \pm$
19 0.09°C); 23°C ($23.08 \pm 0.11^{\circ}\text{C}$), and 28°C ($27.70 \pm 0.13^{\circ}\text{C}$) in normoxia (7.35 ± 1.5 mg
20 L^{-1}), nine tanks per temperature. The temperatures were chosen based on the data of
21 annual variation of water temperature in the state of Rio Grande do Sul - Southern
22 Brazil (Garcia *et al.*, 2008).

23 After the acclimation period, the fish were subjected to nine treatments, hereafter
24 referred to normoxia - 18, 23 and 28°C ; moderate hypoxia - 18, 23 and 28°C ; and severe

1 hypoxia - 18, 23 and 28°C, for a period of 12 h. All treatments were performed in
2 triplicate in the same tanks of acclimation.

3 The temperature of the water was maintained at the desired ranges using an air
4 conditioner ($23.08 \pm 0.11^\circ\text{C}$), and heaters ($27.70 \pm 0.13^\circ\text{C}$) or chillers ($18.07 \pm 0.09^\circ\text{C}$)
5 equipped with a thermostat placed in the sump. The water was distributed through the
6 recirculation system with the aid of a submersible pump. To maintain oxygen levels in
7 normoxia treatments and during acclimation, an air blower (1 HP) was used, which
8 supplied each tank through an aeration system. Hypoxia levels were obtained by
9 injecting pure nitrogen gas through individual air diffusers into each tank. Nitrogen
10 injection was started 1h before to the experiment to achieve the desired oxygen levels
11 (moderate hypoxia – 0.75 mg L^{-1} and severe hypoxia – 1.25 mg L^{-1}). After achieved
12 desired oxygen levels for each treatment the experiment began.

13 Dissolved oxygen was maintained at adequate levels ($7.35 \pm 0.62 \text{ mg L}^{-1}$) during
14 the acclimation period, and after were modified according to each treatment (table 1).

15 The pH (7.45 ± 0.13) (pH meter FE 20-FiveEasy TM, Mettler Toledo), total
16 ammonia ($0.08 \pm 0.04 \text{ mg L}^{-1}$) (UNESCO, 1983), nitrite ($0.17 \pm 0.09 \text{ mg L}^{-1}$)
17 (Bendschneider and Robinson, 1952), and total alkalinity ($59.60 \pm 6.89 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
18 (Eaton *et al.*, 1995) were measured daily. The photoperiod was fixed at 12-h light:12-h
19 dark.

20 The fish were fed twice daily (9:00 and 16:00) with commercial food (320 g kg^{-1}
21 crude protein) until apparent satiety during the acclimation period. Feeding was ceased
22 24 h prior to sampling day and during the experimental period. The water lost through
23 evaporation or tank cleaning (siphoning to remove excess feces and feed residues) was
24 replaced with water under the respective treatment conditions.

1 **2.3 Organ sampling**

2 Three fish from each tank (n = 9 per treatment) were euthanized with a lethal
3 concentration of hydrochloride benzocaine (500 ppm) at the end of the experimental
4 period. Gill, liver, brain, and muscle samples were collected, immediately frozen in
5 liquid nitrogen, and stored at -80°C .

6

7 **2.4 Sample homogenization**

8 Tissue samples were homogenised (1:5, w/v) in buffer solution (pH 7.75)
9 containing Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM), and Mg^{2+} (5 mM) (Da Rocha *et al.*,
10 2009). The supernatants resulting from centrifugation of the homogenates ($10.000 \times g$,
11 20 min, 4°C) were used for further analysis.

12

13 **2.5 Biochemical parameters**

14 The total protein content of homogenized samples was determined in a
15 spectrofluorimeter (Biotek[®], Synergy HT) with the Biuret method (550 nm) using a
16 commercial kit (Doles[®]). GST activity (nmol of CDNB-GSH conjugate min^{-1} mg wet
17 tissue⁻¹) was determined according to Habig *et al.* (1974) and Habig & Jakoby (1981).
18 Total ACAP (relative area) was determined by Amado *et al.* (2009), where, according to
19 technique, a lower relative area means higher antioxidant capacity and vice-versa. To
20 measure protein thiol - PSH (nmol SH mg protein⁻¹) levels method based on Sedlak &
21 Lindsay (1968) was used. LPO levels (nmol TMP mg wet tissue⁻¹) were determined
22 according to Oakes & Van der Kraak (2003).

23

24 **2.6 Statistical analysis**

1 All data were expressed as means \pm standard deviation. Analyzed data were the
2 mean of the three fish sampled at each tank, meaning that each treatment presented -
3 from a statistical point of view- three replicated per treatment. Normality and variance
4 homogeneity were verified by Shapiro–Wilk and Levene tests, respectively. Two-way
5 analysis of variance (factors: dissolved oxygen and temperature) and post-hoc Tukey’s
6 test were performed to check for differences among treatments. The significance level
7 was set at 5% in all cases ($\alpha= 0.05$).

8

9 **3. Results**

10 **3.1 Glutathione-S-transferase activity**

11 Fish exposed to moderate hypoxia showed lower GST activity in the gills when
12 compared to the other treatments at 18 and 23°C ($p<0.05$). By contrast, enhanced GST
13 activity was demonstrated in fish exposed to moderate hypoxia in comparison to
14 normoxia and severe hypoxia at 28°C. Fish kept at 18°C showed higher GST activity in
15 the gills when compared to warmer temperatures (Figure 1A).

16 The liver of fish exposed to normoxia showed higher GST activity when
17 compared to moderate and severe hypoxia at 23°C. At 28°C, the liver of fish exposed to
18 moderate hypoxia showed lower GST activity in comparison to severe hypoxia. GST
19 activity was significantly lower at 18 and 23°C when compared to 28°C in animals
20 exposed to severe hypoxia (Figure 1B).

21 In muscle, fish exposed to moderate and severe hypoxia showed the higher
22 activity of GST when compared to the normoxia at 18°C ($p<0.05$). Fish exposed to
23 23°C and severe hypoxia showed lower GST activity ($p<0.05$) in relation to normoxia
24 and moderate hypoxia. At 28°C, GST activity was significantly lower in severe and

1 moderate hypoxia treatments compared to normoxia. GST activity was significantly
2 lower ($p<0.05$) at 23 and 28°C compared to 18°C in conditions of hypoxia severe. In
3 addition, GST activity was significantly lower ($p<0.05$) in the fish maintained in 28°C
4 in both levels of hypoxia (moderate and severe) when compared to 18°C (Figure 1C).

5 GST activity in the brains of fish maintained at 18°C was significantly higher
6 ($p<0.05$) in severe hypoxia compared to the other treatments. Already at the temperature
7 of 23°C, lower GST activity was observed in severe hypoxia compared to moderate
8 hypoxia and normoxia ($p<0.05$). GST activity was significantly higher in fish kept at
9 18°C compared to fish exposed to other temperatures in severe hypoxia. Otherwise, in
10 the normoxia treatment, GST activity was significantly lower at 18°C compared to 23
11 and 28°C (Figure 1D).

12

13 **3.2 Total antioxidant capacity against peroxy radicals**

14 ACAP was significantly higher (low relative area) and lower (high relative area)
15 in the gills and muscle, respectively, in fish exposed to severe hypoxia compared with
16 normoxia at 23°C (Figure 2A and C). Fish exposed to 18°C showed significantly higher
17 ACAP in normoxia and severe hypoxia in relation to moderate hypoxia in the liver and
18 brain ($p<0.05$) (Figure 2B and D).

19 Fish kept at 28°C in normoxia showed higher ACAP levels in the gills in
20 comparison to 23°C in normoxia ($p<0.05$) (Figure 2A). Moreover, fish liver exposed to
21 normoxia at 18°C showed higher ACAP levels compared to those maintained at 23 and
22 28°C ($p<0.05$) (Figure 2B). A temperature of 18°C led to higher ACAP values in
23 moderate and severe hypoxia when compared to the same treatments at 23°C in muscle
24 ($p<0.05$) (Figure 2C). In normoxia and moderate hypoxia the fish showed lower ACAP

1 values at 23°C and 18 and 23°C, respectively, when compared to 28°C in the brain
2 ($p<0.05$) (Figure 2D). ACAP in the brains of fish exposed to moderate hypoxia at 18°C
3 showed lower values compared to 23 and 28°C ($p<0.05$) (Figure 2D).

4

5 **3.3 Protein thiol content (PSH)**

6 Fish exposed to moderate hypoxia at 23°C had lower protein thiol content in the
7 gills when compared to normoxia and severe hypoxia ($p<0.05$) (Figure 3A). At 28°C,
8 reduced PSH content was observed in fish exposed to severe hypoxia compared to
9 normoxia and moderate hypoxia in the gills (Figure 3A) ($p<0.05$).

10 There was a significant reduction in PSH content in the gills of fish maintained in
11 conditions of normoxia as the temperature increased ($p<0.05$). Lower PSH content in
12 the gills was reported in fish exposed to 28°C compared to other temperatures in
13 conditions of severe hypoxia ($p<0.05$). In the moderate hypoxia treatment at 23°C, the
14 greatest reduction in PSH content was observed in the gills ($p<0.05$) (Figure 3A).

15 PSH content was higher in the liver of fish submitted to severe hypoxia when
16 compared to normoxia at 18°C. Fish exposed to 23°C in conditions of moderate and
17 severe hypoxia showed reduced PSH concentration when compared to normoxia (i.e.,
18 normoxia > moderate hypoxia > severe hypoxia) ($p<0.05$) (Figure 3B). Lower PSH
19 content was also demonstrated in liver of fish submitted to severe hypoxia when
20 compared to normoxia and moderate hypoxia treatments at 28°C ($p<0.05$) (Figure
21 3B). In conditions of normoxia, the PSH content was significantly higher in the liver of
22 pacu at 23°C compared to 28°C ($p<0.05$) (Figure 3B).

23 Muscle of pacu presented higher and lower PSH concentrations in moderate and
24 severe hypoxia compared to normoxia at 18 and 23°C, respectively ($p<0.05$). Fish

1 presented a higher PSH content at 28°C in muscle in conditions of severe hypoxia
2 compared with moderate hypoxia (Figure 3C). Exposure to moderate hypoxia and
3 severe hypoxia at 23 and 28°C showed lower PSH content compared with fish exposed
4 to the same conditions at 18°C ($p<0.05$) (Figure 3C).

5 Moderate hypoxia led to reduced PSH content in the brains of fish when
6 compared to severe hypoxia at 18 and 23°C ($p<0.05$). At 28°C, lower PSH
7 concentration was observed in conditions of severe hypoxia when compared to
8 normoxia ($p<0.05$). Fish exposed to severe hypoxia presented lower PSH content at 18
9 and 28°C than those kept at 23°C ($p<0.05$) (Figure 3D).

10

11 **3.4 Lipid peroxidation**

12 Fish submitted to moderate hypoxia presented higher and lower LPO levels
13 compared to severe hypoxia at 18°C in the gills ($p<0.05$) (Figure 4A). At 23°C,
14 moderate and severe hypoxia resulted in lower LPO values in gills when compared to
15 normoxia ($p<0.05$). Moderate hypoxia resulted in significantly lower LPO levels in gills
16 when compared to normoxia when the fish were kept at 28°C ($p<0.05$) (Figure 4A). In
17 moderate and severe hypoxia, there was an increase in LPO levels at low acclimation
18 temperature. At 28°C, normoxia resulted in lower levels of LPO compared with same
19 treatment at 18 and 23°C ($p<0.05$) (Figure 4A).

20 At 23°C, the liver of fish exposed to moderate hypoxia presented significantly
21 higher LPO values when compared to normoxia and severe hypoxia. The fish exposed
22 to normoxia at 18 and 28°C showed higher LPO values compared to normoxia at 23°C
23 ($p<0.05$) (Figure 4B). In addition, the fish exposed to severe hypoxia presented

1 significantly lower LPO values at 23 and 28°C when compared to 18°C, and minimal
2 observed occur in 23°C ($p<0.05$) (Figure 4B).

3 The LPO level in the muscle of pacu exposed to 23°C was higher in severe
4 hypoxia when compared to normoxia and moderate hypoxia ($p<0.05$). Fish exposed to
5 moderate hypoxia at 23 and 28°C presented significantly lower LPO values compared
6 with those maintained at 18°C ($p<0.05$). In severe hypoxia, fish kept at 28°C presented
7 significantly lower LPO levels when compared to 23°C ($p<0.05$) (Figure 4C).

8 The brains of fish kept at 28°C showed significantly lower LPO levels when
9 compared to fish exposed to normoxia and moderate hypoxia at 18 and 23°C ($p<0.05$).
10 In conditions of severe hypoxia, fish maintained at 28°C showed lower LPO levels in
11 comparison to those maintained at 23°C ($p<0.05$) (Figure 4D).

12

13 **4. Discussion**

14 The success of intensive aquaculture involves many factors, including the
15 maintenance of water quality. Systems with high densities present high demand for
16 dissolved oxygen and the maintenance of a suitable temperature is crucial for optimal
17 performance of the farmed species. However, oscillations in these parameters can result
18 in biochemical and physiological alterations that could compromise the growth
19 performance, health, and survival of the animals.

20 In this study, we did not observe any mortality of the pacu juveniles, indicating
21 that this species can be considered tolerant to hypoxia, even when severe. This species
22 is native to Pantanal - Brazil, which naturally experiences periods of low levels of
23 dissolved oxygen, which can reach 1 mg L⁻¹ (Bastos *et al.*, 2007).

1 However, our results demonstrated that the interaction between different
2 temperatures and dissolved oxygen levels causes different alterations in the antioxidant
3 system and levels of oxidative damage in gill, liver, muscle and brain (except brain in
4 LPO) in pacu juveniles (Table 2). In addition, the effects were organ-specific.

5 GST represents a major group of xenobiotic detoxification enzymes, which act in
6 pro-oxidant conditions to promote the detoxification of toxic metabolites (harmful by-
7 products generated by ROS – MDA, toxic carbonyl-, peroxide-, and epoxide-containing
8 metabolites) produced by oxidative damage (Blanchette *et al.*, 2007; Maltez *et al.*,
9 2018). GST activity in the gills was highest at 18°C, suggesting a protective response of
10 the antioxidant defense system at this temperature (Lushchak *et al.*, 2001). Another
11 interpretation is to consider that a higher number of GST enzyme units were produced at
12 the lower temperatures just to compensate the higher activation energy expected for the
13 reactions catalyzed by these enzymes. In this way, the higher GST activity registered in
14 our measurements could be considered an acclimation response to maintain a relatively
15 stable detoxification capacity at the lowest temperatures. Note that, however, the
16 hypoxic response is temperature and organ specific. For example, in brain GST activity
17 was lower at 18°C when compared with GST activity registered at 23 and 28°C under
18 normoxia. However, the results were quite opposite under severe hypoxia: GST activity
19 at 18°C was higher than at 23 and 28°C.

20 A decrease in temperature causes a reduction in metabolism in ectothermic
21 organisms, which also causes an increase in the degree of lipid unsaturation of
22 biological membranes. This scenario favors the production of ROS by increased of
23 mitochondria density in tissues (Sladjan *et al.*, 2010), and an increased amount of
24 substrate for oxidative damage, since polyunsaturated fatty acids are highly susceptible

1 to LPO (Crockett, 2008). This fact was evidenced by the higher LPO observed in the
2 gills of fish kept at 18°C.

3 In general, some reductions in GST activity were observed in the gill, liver, and
4 muscle of fish during hypoxia in the present study. According to Kaur *et al.* (2005),
5 antioxidant enzymes can be induced by mild oxidative stress, or suppressed/inhibited in
6 the case of severe oxidative stress. In addition, a oxidant condition related to the limited
7 availability of oxygen can reduce GST activity, which affects enzymes involved in the
8 detoxification of metabolites that are a result of oxidative damage.

9 Muscle, in conditions of moderate and severe hypoxia, and the brain, in
10 conditions of severe hypoxia, of fish kept at 18°C showed higher GST activity,
11 indicating an adaptive response against a pro-oxidant condition induced by low levels of
12 dissolved oxygen associated with low temperature. This antioxidant and detoxification
13 mechanism may be important in the maintenance of LPO at basal levels, as observed in
14 the muscle and brain in the abovementioned treatments.

15 The evaluation of ACAP characterizes the general antioxidant status of the
16 organism to detoxify peroxy radicals, which involves different enzymatic and non-
17 enzymatic antioxidant components (Amado *et al.*, 2009). In the present study, there was
18 no change in ACAP at 28°C in any organ evaluated, demonstrating that the antioxidant
19 system of pacu juveniles was not affected by conditions of moderate and severe hypoxia
20 conditions at this temperature.

21 There was an increase in ACAP in the gills of fish exposed to hypoxia at 23°C.
22 This response can be related to the decreased ROS production in hypoxic conditions,
23 and, consequently, a sparing effect of the antioxidants produced by the organism.

1 On the other hand, the reduction in antioxidant capacity in the muscle of pacu
2 exposed to hypoxia may be related to lower availability of oxygen with a concomitant
3 ATP production, which can compromise antioxidants synthesis. Reduced total
4 antioxidant capacity can also be a result of the use of antioxidant components to counter
5 the increased production of free radicals in hypoxia scenario. This scenario observed in
6 antioxidant competence can be linked with increased oxidative damage demonstrated by
7 higher LPO values (in 23°C severe hypoxia) observed in the muscle, which suggest that
8 it is a low prioritized organ during a survival situation (Clanton, 2007).

9 At 18°C, fish exposed to moderate hypoxia showed reduced total antioxidant
10 capacity in the brain, while in the liver this reduction occur in fish exposed to both
11 levels of hypoxia (moderate and severe). These two organs are considered key organs in
12 the maintenance of homeostasis and survival of the organism (Lushchak &
13 Bagnyukova, 2007) and despite oscillations in antioxidant capacity, these organs did not
14 present alterations in the LPO level at this temperature. In the case of moderate hypoxia,
15 downregulation of the antioxidant system can occur due to a lower production of ROS
16 as a result of a condition characterized by a lower amount of oxygen.

17 Thiols are organic sulphur compounds with at least one sulfhydryl group. PSH
18 have high molecular mass and are involved in ROS-mediated signaling and
19 transcription processes that maintain the redox state in cells (Dalle-Donne *et al.*, 2008).
20 The reduction in PSH content could be interpreted as an indication of a more pro-
21 oxidant condition in cells, leading to oxidative degradation of proteins (Mitton *et al.*,
22 2016). In general, higher temperatures led to reduced PSH content in pacu tissues,
23 except in the brain.

1 The interactions between moderate hypoxia and temperatures of 18 and 23°C, and
2 severe hypoxia at 28°C, reduced PSH in the gills of pacu. Similarly, both hypoxia
3 treatments led to decreased PSH content in muscle and to a greater extent in the liver. A
4 reduction in the levels of PSH has also been reported for fish *Perccottus glenii*
5 submitted to hypoxia ($0.4 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$) (Lushchak & Bagnyukova, 2007).

6 The levels of lipid peroxidation in the gills and brain were higher at 18 and 23°C.
7 Higher mitochondria density is common in fish adapted to low temperatures, which can
8 also increase ROS production (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005). In addition, an increase
9 in polyunsaturated fatty acids is required to maintain membrane fluidity (Hazel, 1993).
10 However, this class of fatty acids is more susceptible to oxidative damage (Halliwell &
11 Gutteridge, 2015).

12 Exposure to 23°C and moderate and severe hypoxia resulted in less lipid damage
13 in the gills. Among the factors that must be taken into account in terms of ROS
14 generation, the most important is oxygen availability (Hermes-Lima, 2004). In this
15 sense, the reduced environmental oxygen concentration can lead to reduced ROS levels.

16 On the other hand, a reduction in metabolic rate is associated with adaptation to
17 hypoxic conditions in fish. The decrease in environmental oxygen levels activates the
18 hypoxia signaling system (HIF factor), which controls the production and use of ATP to
19 ensure survival (Xiao, 2015), impairing protein synthesis, including enzymes such as
20 GST, involved in the detoxification of LPO by-products (Blanchette *et al.*, 2007). In our
21 study, this fact can be observed with the reduction of LPO in gills and increase in
22 muscle, when the animals are submitted to interaction of 23°C and severe hypoxia.
23 However, changes in LPO caused by variations in dissolved oxygen levels can be
24 different for each organ (Lushchak *et al.*, 2001; Lushchak & Bagnyukova, 2007).

1 At 23°C, the liver of fish presented increased lipid damage following exposure to
2 moderate hypoxia. Similarly, muscle presented higher levels of LPO during severe
3 hypoxia at the same temperature. According to these results, we can consider that both
4 conditions caused a pro-oxidant scenario. It would be logical to expect an increase in
5 the production of ROS in a situation of high oxygen availability. However, production
6 of ROS can also increase in conditions of hypoxia since the reduction potential
7 (NADH/NAD⁺) is high (Clanton, 2007). The compromise of the antioxidant system was
8 also evidenced by reduced GST activity and/or total antioxidant capacity in these
9 tissues. Wilhelm Filho *et al.* (2005) demonstrated increased lipid peroxidation in the
10 liver of piapara (*Leporinus elongatus*) maintained at 25°C when submitted to moderate
11 hypoxia (3.91 mg L⁻¹) compared with severe hypoxia (1.92 mg L⁻¹).

12 Hypoxia causes oxidative stress, but the mechanisms that cause this condition
13 have not yet been fully elucidated. The study of ROS production during hypoxia is
14 based entirely on mammalian systems (Chandell et al., 1998, Bell et al., 2007). It is
15 believed that the production of ROS and antioxidant control is an integrated system and
16 that the ROS produced in hypoxia are signaling molecules used to initiate a hypoxic
17 response. In this case, mitochondria H₂O₂ burst signals to the cell the onset of hypoxia
18 (Johannsson et al., 2018).

19 In this study, it is evident that a temperature of 28°C, regardless of the availability
20 of dissolved oxygen, does not influence LPO in the brain of pacu juvenile. Increased
21 lipid peroxidation levels in fish exposed to interaction of severe hypoxia and 23°C can
22 compromise several physiological processes (Livingstone, 2003), as well as the growth
23 and survival of animals (Frag *et al.*, 2006).

1 In conclusion, exposure to moderate and severe hypoxia at different temperatures
2 cause changes in antioxidant defenses and oxidative damage levels in an organ-specific
3 way in pacu juveniles. At 23°C, both hypoxia levels caused disturbances in oxidative
4 status in pacu juveniles. Otherwise, fish showed greater tolerance to reduced oxygen
5 levels when reared at 28°C.

6

7 **Acknowledgments**

8 This study was supported by research funds from the Fundação de Amparo a
9 Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS – PQG - 19/2551-0001890-8), Coordenação
10 de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de
11 Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq). The authors are grateful to CNPq for
12 productivity research fellowships provide for Garcia, L. (311298/2017-6), Sampaio,
13 L.A. and Monserrat, J.M. (308539/2016-8) and to Coordenação de Aperfeiçoamento de
14 Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Finance Code 001 for a PhD scholarship provided
15 for MSc. Nitz, L.F.

16

17 **Conflict of interests**

18 The authors declare that there is not conflict of interests.

19

20 **References**

21 Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R.,
22 Yunes, J.S., Monserrat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity
23 against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins

1 toxicity. Science of the Total Environment, 407, 2115-2123. doi:
2 10.1016/j.scitotenv.2008.11.038.

3 Azambuja, C.R., Mattiazzi, J., Riffel, A.P.K., Finamor, I.A., Garcia, L.O., Heldwein,
4 C.G., Heizmann, B.M., Baldisseroto, B., Pavanato, M.A., Llesuy, S.F. 2011. Effect of
5 the essential oil of *Lippia alba* on oxidative stress parameters in silver catfish (*Rhamdia*
6 *quelen*) subjected to transport. Aquaculture, 319, 156-161. doi:
7 10.1016/j.aquaculture.2011.06.002.

8 Bagnyukova, T.V., Danyliv, S.I., Zin'ko, O.S., Lushchak, V.I. 2007a. Heat shock
9 induces oxidative stress in rotan *Perccottus glenii* tissues. Journal of Thermal Biology,
10 32, 255-260. doi: 10.1016/j.jtherbio.2007.01.014.

11 Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I. 2007b. Oxidative stress
12 and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature
13 from 3 to 23°C. Journal of Thermal Biology, 32, 227-234. doi: 10.1016/j.jtherbio.
14 2007.01.004.

15 Baldisserotto, B. 2013. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura (3th ed.). Santa
16 Maria, RS: UFSM.

17 Bastos, V.C., Salles, J.B., Valente, R.H., León, I.R., Perales, J., Dantas, R.F., Albano,
18 R.M., Bastos, F.F., Bastos, J.C. 2007. Cytosolic glutathione peroxidase from liver of
19 pacu (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. Biochimie, 89,
20 1332-1342. doi: 10.1016/j.biochi.2007.04.003.

21 Bendschneider, K., Robinson, R.J. 1952. A new spectrophotometric method for the
22 determination of nitrite in sea water. Journal of Marine Research, 11: 87-96.

1 Blanchette, B., Feng, X., Singh, B.R. 2007. Marine glutathione S-transferases. *Marine*
2 *Biotechnology*, 9, 513-542. doi: 10.1007/s10126-007-9034-0.

3 Boyd, C.E., & Tucker, C.S. 2012. Pond aquaculture water quality management.
4 Alabama, USA: Springer Science & Business Media.

5 Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Ana M.
6 Rodriguez, A.M., Schumacker, P.T. 2000. Reactive oxygen species generated at
7 mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1 α during hypoxia. *Journal*
8 *of Biological Chemistry*, 275, 25130-25138. doi: 10.1074/jbc.M001914200.

9 Clanton, T.L. 2007. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal
10 muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102, 2379-2388. doi:
11 10.1152/jappphysiol.01298.2006.

12 Clotfelter, E.D., Lapidus, S.J.H., Brown, A.C. 2013. The effects of temperature and
13 dissolved oxygen on antioxidant defences and oxidative damage in the fathead minnow
14 *Pimephales promelas*. *Journal of Fish Biology*, 82, 1086-1092. doi: 10.1111/jfb.12050.

15 Crockett, E.L. 2008. The cold but not hard fats in ectotherms: consequences of lipid
16 restructuring on susceptibility of biological membranes to peroxidation, a review.
17 *Journal of Comparative Physiology B*, 178, 795-809. doi: 10.1007/s00360-008-0275-7.

18 Da Rocha, A.M., Salomão De Freitas, D.P., Burns, M., Vieira, J.P., De La Torre, F.R.,
19 Monserrat, J.M. 2009. Seasonal and organ variations in antioxidant capacity,
20 detoxifying competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from
21 Southern Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 150, 512-520. doi:
22 10.1016/j.cbpc.2009.07.012.

- 1 Dalle-Donne, I., Milzani, A., Gagliano, N., Colombo, R., Giustarini, D., Rossi, R.
2 2008. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation.
3 *Antioxid. Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 445-473. doi:10.1089/ars.2007.1716.
- 4 Del Toro-Silva, F.M., Miller, J.M., Taylor, J.C., Ellis, T.A. 2008. Influence of oxygen
5 and temperature on growth and metabolic performance of *Paralichthys lethostigma*
6 (Pleuronectiformes: Paralichthyidae). *Journal of Experimental Marine Biology and*
7 *Ecology*, 358, 113-123. doi: 10.1016/j.jembe.2008.01.019.
- 8 Dong, X.Y., Qin, J.G., Zhang, X.M. 2011. Fish adaptation to oxygen variations in
9 aquaculture from hypoxia to hyperoxia. *Journal of Fisheries and Aquaculture*, 2, 23-28.
- 10 Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., & Greenberg, A.E. 1995. Standard methods for
11 the examination of water and wastewater (21th ed.). Washington, DC: American Public
12 Health Association.
- 13 Farag, A.M., May, T., Marty, G.D., Easton, M., Harper, D.D., Little, E.E., Cleveland, L.
14 2006. The effect of chronic chromium exposure on the health of Chinook salmon
15 (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquatic Toxicology*, 76, 246-257. doi:
16 10.1016/j.aquatox.2005.09.011.
- 17 Feng, G.P., Zhuang, P., Zhang, L.Z., Duan, M., Liu, J.Y. 2012. Effects of temperature on
18 oxidative stress biomarkers in juvenile chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) under
19 laboratory conditions. *Advanced Materials Research*, 343, 497-504. doi:
20 10.4028/www.scientific.net/AMR.343-344.497.
- 21 Garcia, L., Copatti, C.E., Wachholz, F., Pereira Filho, W., Baldisserotto, B. 2008.
22 Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and its

1 implication for fish culture. *Neotropical Ichthyology*, 6, 275-281. doi:10.1590/S1679-
2 62252008000200016.

3 Garcia, L.O., Okamoto, M.H., Riffel, A.P.K., Saccol, E.M., Pavanato, M.A., Sampaio,
4 L.A.N. 2015. Oxidative stress parameters in juvenile Brazilian flounder *Paralichthys*
5 *orbignyanus* (Valenciennes, 1839) (Pleuronectiformes: Paralichthyidae) exposed to cold
6 and heat shocks. *Neotropical Ichthyology*, 13, 607-612. doi: 10.1590/1982-0224-
7 20140148.

8 Godoy, M.P. 1975. Peixes do Brasil: subordem *Characoidei*: bacia do rio Mogi-Guassu.
9 Piracicaba,SP: Franciscana.

10 Guderley, H. 2004. Metabolic responses to low temperature in fish muscle. *Biological*
11 *Reviews*, 79, 409-427. doi:10.1017/S1464793103006328.

12 Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases: the first
13 enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249,
14 7130-7139.

15 Habig, W.H., Jakoby, W.B. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases.
16 *Methods Enzymology*, 77, 398-405. doi: 10.1016/S0076-6879(81)77053-8.

17 Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 2015. *Free radicals in biology and medicine* (5th ed).
18 New York, USA: Oxford University Press.

19 Hazel, J.R. 1993. Thermal Biology In D.H. Evans, *The Physiology of Fishes* (pp.427-
20 467). Boca Raton, FL: CRC Press.

- 1 Hegazi, M.M., Attia, Z.I., Ashour, O.A. 2010. Oxidative stress and antioxidant enzymes
2 in liver and white muscle of Nile tilapia juveniles in chronic ammonia exposure.
3 *Aquatic Toxicology*, 99, 118-125. doi: 10.1016/j.aquatox.2010.04.007.
- 4 Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., Portner, H.O. 2006. Oxidative stress
5 during stressful heat exposure and recovery in the North Sea eelpout *Zoarces viviparus*
6 *L.* *The Journal of Experimental Biology*, 209, 353-363. doi: 10.1242/jeb.01977.
- 7 Hermes-Lima, M., Storey, J.M., Storey, K.B. 1998. Antioxidant defenses and metabolic
8 depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in lands nails.
9 *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 12, 437-448. doi: 10.1016/s0305-
10 0491(98)10053-6.
- 11 Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T. 2002. Animal response to drastic changes in
12 oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and*
13 *Physiology C*, 133, 537-556. doi: 10.1016/S1532-0456(02)00080-7.
- 14 Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In
15 K.B. Storey, (Eds.), *Functional Metabolism: regulation and adaptation* (pp. 319-368).
16 Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons. doi: 10.1002/04716 7558X.ch12.
- 17 Huang, C.Y., Lin, H.C., Lin, C.H. 2015. Effects of hypoxia on ionic regulation, glycogen
18 utilization and antioxidative ability in the gills and liver of the aquatic air-breathing fish
19 *Trichogaster microlepis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 179, 25-34. doi:
20 10.1016/j.cbpa.2014.09.001.

- 1 Kaur, M., Atif, F., Ali, M., Rehman, H., Raisuddin, S. 2005. Heat stress-induced
2 alterations of antioxidants in the freshwater fish *Channa punctata* Bloch. Journal of Fish
3 Biology, 67, 1653-1665. doi:10.1111/j.1095-8649.2005.00872. x.
- 4 Livingstone, D.R. 2003. Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution
5 and aquaculture. Revue de Médecine Vétérinaire, 154, 427-430.
- 6 Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M. 2001. Oxidative stress
7 and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and
8 reoxygenation. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 280, 100-107. doi:
9 10.1152/ajpregu.2001.280.1. R100.
- 10 Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. 2006. Temperature increase results in oxidative stress
11 in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. Comparative Biochemistry
12 and Physiology C, 143, 36-41. doi: 10.1016/j.cbpc.2005.11.018.
- 13 Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. 2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a
14 goby, the rotan *Perccottus glenii*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B:
15 Biochemistry and Molecular Biology, 148, 390-397. doi: 10.1016/j.cbpb.2007.07.007.
- 16 Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.
17 Aquatic Toxicology, 101, 13-30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006.
- 18 Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S. 2013. Influence of
19 temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. Comparative
20 Biochemistry and Physiology A, 166, 237-243. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008.
- 21 Maltez, L.C., Barbas, A.L., Okamoto, M.H., Lopes, D.L.A., Romano, L.A., Sampaio,
22 L.A., Garcia, L. 2018. Secondary stress responses in juvenile Brazilian flounder,

1 *Paralichthys orbignyanus*, throughout and after exposure to sublethal levels of ammonia
2 and nitrite. *Journal of the World Aquaculture Society*, 50, 346-358. doi:
3 10.1111/jwas.12497.

4 Martínez-Alvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A. 2005. Antioxidant defenses in fish:
5 Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 75-88. doi:
6 10.1007/s11160-005-7846-4.

7 McBryan, T.L., Anttila, K., Healy, T.M., Schulte, P.M. 2013. Responses to temperature
8 and hypoxia as interacting stressors in fish: implications for adaptation to environmental
9 change. *Integrative and Comparative Biology*, 53, 648–659. doi:10.1093/icb/ict066.

10 Mitton, F.M., Ferreira, J.L.R., Gonzalez, M., Miglioranza, K.S.B., Monserrat, J.M. 2016.
11 Antioxidant responses in soybean and alfalfa plants grown in DDTs contaminated soils:
12 Useful variables for selecting plants for soil phytoremediation? *Pesticide Biochemistry
13 and Physiology*, 130, 17-21. doi: 10.1016/j.pestbp.2015.12.005

14 Mustafa, S.A., Al-Subiai, S.N., Davies, S.J., Jha, A.N. 2011. Hypoxia-induced oxidative
15 DNA damage links with higher levelbiological effects including specific growth rate in
16 common carp, *Cyprinus carpio L.* *Ecotoxicology*, 20, 1455-1466. doi: 10.1007/s10646-
17 011-0702-5.

18 Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting
19 oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp
20 mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63, 447-463. doi: 10.1016/S0166-445X (02)00204-7.

21 Oliveira, A.M.B.M.S., Conte, J.E., Possebon, J.E. 2004. Produção de Characiformes
22 autóctones. *In: Cyрино, J.E.P., Criscuolo-Urbinati, E., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N.*

1 (eds.), Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva, 217-238.
2 São Paulo.

3 Pan, C., Chien, Y., Wang, Y. 2010. The antioxidant capacity response to hypoxia stress
4 during transportation of characins (*Hyphessobrycon callistus Boulenger*) fed diets
5 supplemented with carotenoids. *Aquaculture Research*, 41, 973–981. doi:
6 10.1111/j.1365-2109.2009.02380. x.

7 Pérez-Jiménez, A., Peres, H., Rubio, V.C., Oliva-Teles, A. 2012. The effect of hypoxia
8 on intermediary metabolism and oxidative status in gilthead seabream (*Sparus aurata*)
9 fed on diets supplemented with methionine and white tea. *Comparative Biochemistry*
10 *and Physiology C*, 155, 506-516. doi: 10.1016/j.cbpc.2011.12.005.

11 Ransberry, V.E., Blewett, T.A., McClelland, G.B. 2016. The oxidative stress response in
12 freshwater-acclimated killifish (*Fundulus heteroclitus*) to acute copper and hypoxia
13 exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 179, 11-18. doi:
14 10.1016/j.cbpc.2015.08.001.

15 Riffel, A.P.K., Garcia, L.O., Finamor, I.A., Saccol, E.M.H., Meira, M., Kolberg, C.,
16 Horst, A., Partata, W., Llesuy, S., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A. 2012. Redox profile
17 in liver of *Leporinus macrocephalus* exposed to different dissolved oxygen levels. *Fish*
18 *Physiology and Biochemistry*, 38, 797-805. doi: 10.1007/s10695-011-9563-3.

19 Ruuge, E.K., Ledenev, A.N., Lakomkin, V.L., Konstantinov, A.A., Ksenzenko, M.Y.
20 1991. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion.
21 *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 261, 81-86. doi:
22 10.1152/ajpheart.1991.261.4.81.

- 1 Sampaio, F.G., De Lima Boijink, C., Oba, E.T., Dos Santos, L.R.B., Kalinin, A.L.,
2 Rantin, F.T. 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus*
3 *mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure.
4 *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 147, 43-51. doi:
5 10.1016/j.cbpc.2007.07.009.
- 6 Sedlak, J., Lindsay, R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein
7 sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-
8 205. doi: 10.1016/0003-2697(68)90092-4.
- 9 Schenone, N.F., Vackova, L., Cirelli, A.F. 2011. Fish-farming water quality and
10 environmental concerns in Argentina: a regional approach. *Aquaculture International*,
11 19, 855-863. doi: 10.1007/s10499-010-9404-x.
- 12 Sladjan, Z. P., Slavica, S.B.M., Tijana, B.R., Branka, R.P., Svetlana, G.D., Jelena, P.G.,
13 Zorica, S.S. 2010. Seasonal variations of the activity of antioxidant defense enzymes in
14 the red mullet (*Mullus barbatus l.*) from the Adriatic Sea. *Marine Drugs*, 8, 413-428. doi:
15 10.3390/md8030413.
- 16 Timmons, M.B., Ebeling, J.M., Wheaton, F.W., Summerfelt, S.T., & Vinci, B.J. 2001.
17 *Recirculating Aquaculture Systems*. Cayuga Aqua Ventures, Ithaca, NY: NRAC
18 Publication.
- 19 UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
20 Manual and guides (p. 56). Intergovernmental Oceanographic Commission.
21 <https://www.oceanbestpractices.net/handle/11329/87>
- 22 Urbinati, E.C., Goncalves, F.D., & Takahashi, L.S. 2013. Pacu *Piaractus*

- 1 *mesopotamicus*. In B. Baldisseroto, L.C. Gomes (Orgs.), Espécies Nativas para
2 piscicultura no Brasil (pp. 1-606). Santa Maria, RS: UFSM.
- 3 Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Diniz, M. 2012. Effect of
4 temperature on oxidative stress in fish: lipid peroxidation and catalase activity in the
5 muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. Ecological Indicators, 23, 274-279.
6 doi: 10.1016/j.ecolind.2012.04.009.
- 7 Welker, A.F., Moreira, D.C., Campos, É.G., Hermes-Lima, M. 2013. Role of redox
8 metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability.
9 Comparative Biochemistry and Physiology A, 165, 384-404. doi:
10 10.1016/j.cbpa.2013.04.003.
- 11 Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Zaniboni-Filho, E., Pedrosa, R.C. 2005. Effect of
12 different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in
13 piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). Aquaculture, 244, 349-357. doi:
14 10.1016/j.aquaculture.2004.11.024.
- 15 Xiao, W. 2015. The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes. Science
16 China Life Sciences, 58: 148-155. doi: 10.1007/s11427-015-4801-z.
- 17 Zhang, G., Mao, J., Liang, F., Chen, J., Zhao, C., Yin, S., Wang, L., Tang, Z., Chen, S.
18 2016. Modulated expression and enzymatic activities of Darkbarbel catfish,
19 *Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and reoxygenation.
20 Chemosphere, 151, 271-279. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.02.072.

1 **Figure legends**

2 **FIGURE 1.** Glutathione-S-transferase (GST) activity (nmol CNDB-GSH min⁻¹ mg wet
3 tissue⁻¹) in gill (A), liver (B), muscle (C) and brain (D) of juvenile pacu exposed to the
4 interaction of different temperatures and dissolved oxygen levels. Data were expressed
5 as means ± SD (n=9). Different lowercase letters indicate significant differences among
6 oxygen levels in the same temperature and different uppercase letters indicate
7 significant differences among temperatures in the same oxygen levels (Tukey's test, p
8 <0.05).

9

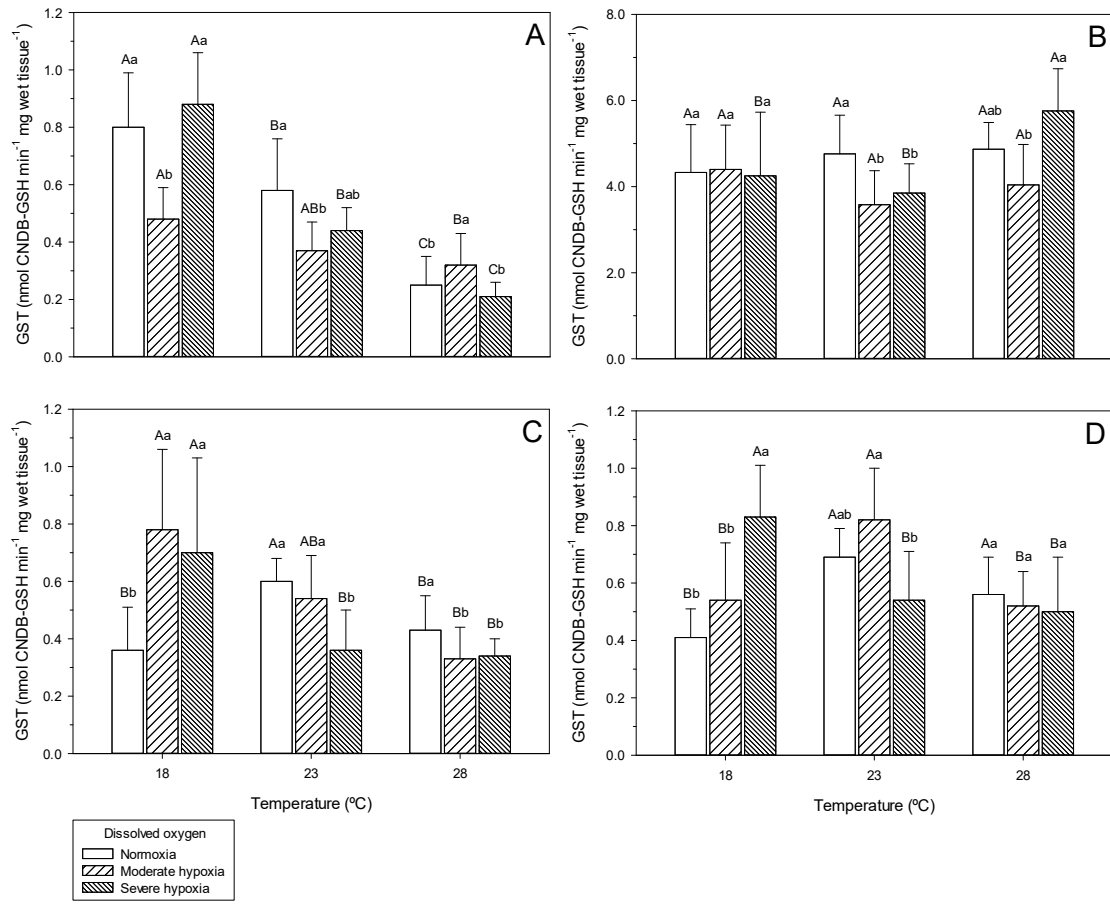
10 **FIGURE 2.** Total antioxidant capacity against peroxil radicals (ACAP) (relative area) in
11 gill (A), liver (B), muscle (C) and brain (D) of juvenile pacu exposed to the interaction
12 of different temperatures and dissolved oxygen levels. Data were expressed as means ±
13 SD (n=9). Different lowercase letters indicate significant differences among dissolved
14 oxygen levels in the same temperature and different uppercase letters indicate significant
15 differences among temperatures in the same oxygen levels (Tukey's test, p <0.05). In
16 this variable, a lower relative area means higher antioxidant capacity and vice-versa.

17

18 **FIGURE 3.** Content of protein thiols (PSH) (nmol SH mg protein⁻¹) in gill (A), liver
19 (B), muscle (C) and brain (D) of juvenile pacu exposed to the interaction of different
20 temperatures and dissolved oxygen levels. Data were expressed as means ± SD (n=9).
21 Different lowercase letters indicate significant differences among dissolved oxygen
22 levels in the same temperature and different uppercase letters indicate significant
23 differences among temperatures in the same oxygen levels (Tukey's test, p <0.05).

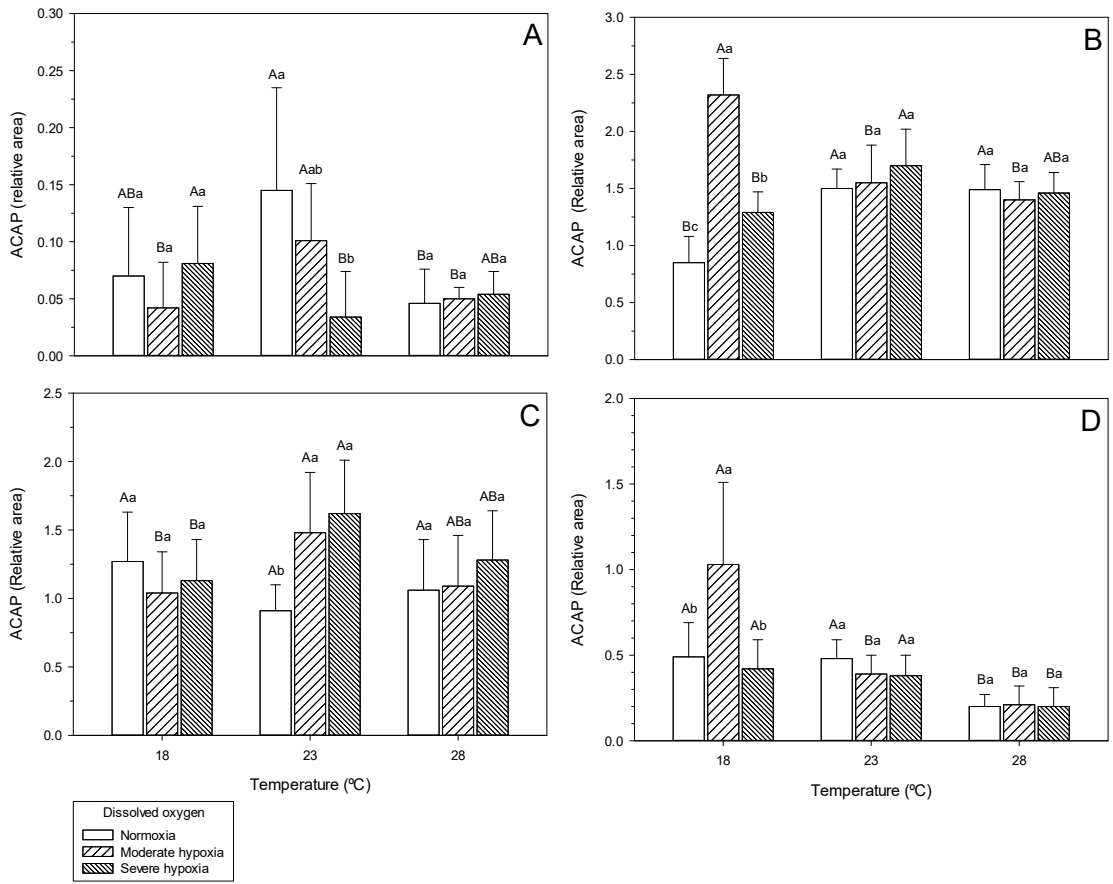
1 **FIGURE 4.** Lipid peroxidation (LPO) content (nmol TMP mg wet tissue⁻¹) in gill (A),
2 liver (B), muscle (C) and brain (D) of juvenile pacu exposed to the interaction of
3 different temperatures and dissolved oxygen levels. Data were expressed as means \pm SD
4 (n=9). Different lowercase letters indicate significant differences among dissolved
5 oxygen levels in the same temperature and different uppercase letters indicate
6 significant differences among temperatures in the same oxygen levels (Tukey's test, p
7 <0.05).

1 **FIGURE 1**



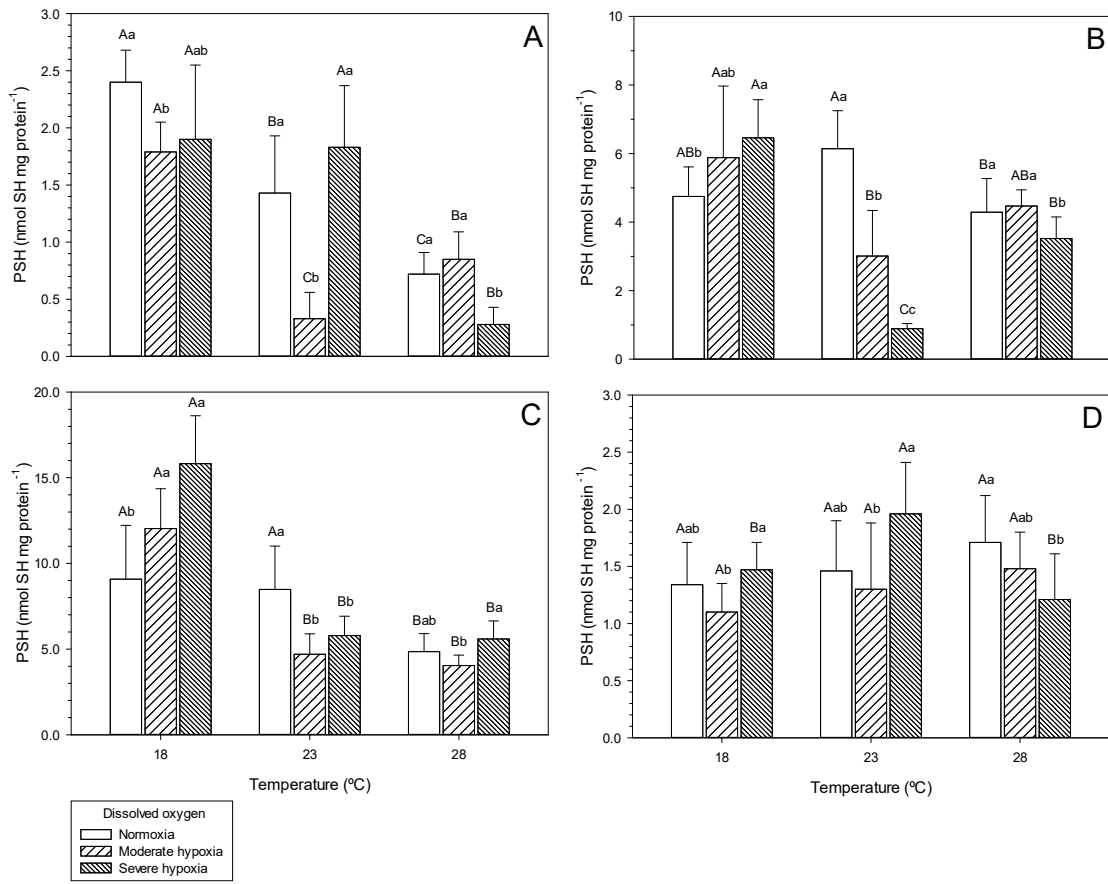
2

1 **FIGURE 2**



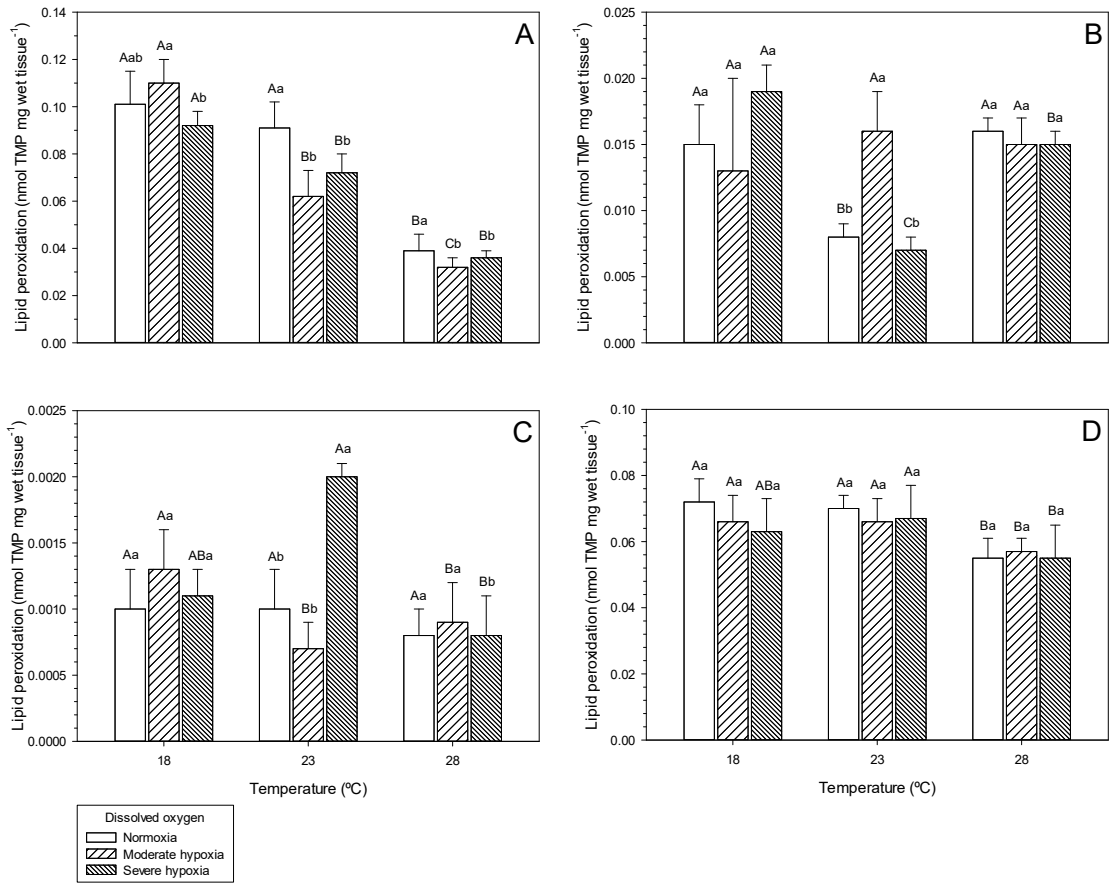
2

1 **FIGURE 3**



2

1 **FIGURE 4**



2

1 **Table legends**

2

3 **TABLE 1.** Dissolved oxygen levels (mg L⁻¹ and % saturation) at different temperatures
4 in each treatment.

5

6 **TABLE 2.** Summary of Two-Way ANOVA analysis applied to verified the effects of
7 temperature and dissolved oxygen levels, and the interaction between then on the
8 Glutathione-S-transferase activity (GST), total antioxidant capacity (ACAP), protein
9 thiol content (PSH) and lipid peroxidation (LPO) in gills, liver, muscle and brain of
10 juvenile pacu.

1 TABLE 1

T (°C)	Normoxia (control)		Moderate hypoxia		Severe hypoxia	
	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%	mg L ⁻¹	%
18	8.27 ± 0.71	87.51 ± 7.53	4.58 ± 0.14	48.47 ± 1.53	2.42 ± 0.22	26.63 ± 2.34
23	7.35 ± 0.62	85.84 ± 7.28	4.51 ± 0.23	52.62 ± 2.64	2.35 ± 0.49	27.43 ± 2.36
28	6.09 ± 0.47	78.06 ± 6.07	4.51 ± 0.08	57.92 ± 1.23	2.36 ± 0.18	30.19 ± 2.26

2 TABLE 2

Two-way ANOVA <i>GST</i>								
	Gill		Liver		Muscle		Brain	
	F	p<	F	p<	F	p<	F	p<
Temperature	81.547	0.001	4.981	0.05	12.770	0.001	6.542	0.05
Hypoxia	9.753	0.001	3.733	0.05	2.069	0.134	1.688	0.192
Temperature x Hypoxia	9.865	0.001	3.415	0.05	8.764	0.001	11.339	0.001
Two-way ANOVA <i>ACAP</i>								
	F	p<	F	p<	F	p<	F	p<
	Temperature	5.467	0.05	2.111	0.128	1.961	0.148	34.604
Hypoxia	2.769	0.069	25.197	0.001	2.359	0.102	8.260	0.001
Temperature x Hypoxia	5.166	0.001	30.287	0.001	4.326	0.05	8.535	0.001
Two-way ANOVA <i>PSH</i>								
	F	p<	F	p<	F	p<	F	p<
	Temperature	94.413	0.001	32.010	0.001	109.208	0.001	3.155
Hypoxia	13.469	0.001	11.463	0.001	8.612	0.001	3.111	0.05
Temperature x Hypoxia	18.503	0.001	23.790	0.001	14.005	0.001	4.523	0.05
Two-way ANOVA <i>LPO</i>								
	F	p<	F	p<	F	p<	F	p<
	Temperature	338.962	0.001	25.141	0.001	5.2487	0.05	19.168
Hypoxia	8.887	0.001	1.363	0.262	5.0882	0.05	1.749	0.181
Temperature x Hypoxia	11.797	0.001	14.056	0.01	5.7109	0.001	0.806	0.525

1 **Capítulo II**

2

3 **Secondary stress responses to hypoxia and re-oxygenation at different**
4 **temperatures in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles**

5

6 Short running title: hypoxia and re-oxygenation in pacu

7

8 Lilian F. Nitz¹, Lucas Pellegrin¹, Daniel S. B. Pinto¹, Lucas C. Maltez², Carlos E.
9 Copatti³, Luciano Garcia¹

10

11

12 ¹Laboratório de Aquacultura Continental, Instituto de Oceanografia, Universidade
13 Federal do Rio Grande - FURG, RS, Brazil

14

15 ²Laboratório de Piscicultura Estuarina e Marinha, Instituto de Oceanografia,
16 Universidade Federal do Rio Grande - FURG, RS, Brazil

17

18 ³Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Av. Adhemar de Barros, s/n, 12
19 Salvador, BA, 40170-290, Brazil.

20

21

22 Correspondence

23 E-mail address: garcia_log@hotmail.com (L. Garcia)

24

25 **Artigo publicado na revista *Aquaculture Research*. doi: 10.1111/are.14792**

1 **Abstract**

2 This study aimed to verify the effects of interaction between different temperatures
3 (~18, ~23 and ~28°C) with different dissolved oxygen levels (~2.0, ~4.5 and ~7.0 mg
4 O₂ L⁻¹) and different re-oxygenation rates (0.5 and 5 h) after hypoxia in pacu (*Piaractus*
5 *mesopotamicus*). In experiment 1, fish were exposed to hypoxia, mild hypoxia, or
6 normoxia at low, medium, or high temperature for 12 h. In experiment 2, fish were
7 exposed to hypoxia or normoxia at low, medium, or high temperature for 12 h and, after
8 hypoxia, rapid or gradual re-oxygenation were performed with a return to normoxia
9 achieved in 0.5 or 5 h. In experiment 1, blood glucose and pH levels were higher in the
10 hypoxic treatment. The haematocrit and erythrocyte values were lower in mild hypoxia
11 at low and high temperatures, respectively. In experiment 2, blood lactate and glucose
12 levels in rapid re-oxygenation increased after 1 and 12 h, respectively. Twelve hours
13 after rapid re-oxygenation, haematological values were similar or lower than in the
14 normoxia or gradual re-oxygenation. In conclusion, exposure of pacu to hypoxic
15 conditions increased blood glucose and pH levels (experiment 1). Additionally, 12 h
16 after gradual re-oxygenation, blood variables returned to homeostatic levels (experiment
17 2).

18

19 **KEYWORDS**

20 erythrocytes, glucose, haematocrit, hypoxic conditions, lactate, re-oxygenation

1 1. INTRODUCTION

2

3 Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) lives in tropical and subtropical regions of
4 South America, mainly in the Plata Basin and the Pantanal. Pacu can survive under
5 conditions of low dissolved oxygen (DO), being considered a hypoxia tolerant fish
6 (Rocha-Santos et al., 2018). In Pantanal ecosystems, pacu migrates to smaller streams,
7 channels, and floodplains during the flood season. After the floods recedes, many of
8 them remain behind in shallow lakes and basins which can extend for miles, where the
9 amount of DO may vary from hypoxia to normoxia (Cunha Bastos et al., 2007). In
10 addition, the natural habitat encompasses a wide range of temperatures from 12 to 32°C
11 (Garcia, Copatti, Wachholz, Pereira Filho, & Baldisserotto, 2008; Barbieri & Bondioli,
12 2015). In addition, pacu is an established aquaculture species with good potential for
13 intensive aquaculture due to its hardiness including a high tolerance to low DO levels,
14 different temperature ranges, as well as contrasting pH levels and high concentrations of
15 ammonia. It also has high growth performance and produces fillets with excellent
16 nutritional quality that are well-accepted by the consumer market (Jomori, Carneiro,
17 Malheiros, & Portella, 2003; Sampaio et al., 2008; Nitz et al., 2019; Pinto et al., 2019;
18 Pellegrin, Nitz, Maltez, Copatti, & Garcia, 2020). In fish farms, it is also susceptible to
19 hypoxia conditions due to high stocking density conditions (Bittencourt et al., 2010).

20 The increase in aquaculture production in recent years was accompanied by an
21 increase in the demand for fish consumed by the population. Continental aquaculture
22 stands out on the global scenario, reaching 51.4 million tons in 2016, which represents
23 64.25% of the total world aquaculture production (FAO, 2018). With the development
24 of aquaculture, many species end up being confined and changes in water quality

1 variables can occur in specific situations; for example decreased DO levels due to
2 stagnant waters (Baldisserotto et al., 2008), lack of light, because it reduces the
3 photosynthesis of plants and algae (Boyd & Tucker, 2014; Copatti et al., 2019a), and
4 variations in water temperature due to the different seasons in temperate and subtropical
5 regions (Pinto et al., 2019). In fish aquaculture, changes in DO levels and temperature
6 can affect several physiological processes (Chen et al., 2017; Aboagye & Allen, 2018),
7 impairing growth performance and health.

8 Temperature generally affects the growth, health, welfare, physiology, and
9 reproduction of fish (El-Sayed & Kawanna, 2008). So, it is considered one of the most
10 important factors for the success of aquaculture systems (Johnston, Bower, &
11 Macqueen, 2011). In southern South America, there is a wide variation in water
12 temperature throughout the year (Garcia et al., 2008). In addition, being tolerant to low
13 temperatures, pacu could be cultivated in a wide range of latitudes (Bechara, Roux,
14 Diaz, Quintana, & Longoni de Meabe, 2005). However, if temperatures exceed
15 tolerance limits, it can trigger undesirable results on pacu growth and health (Barbieri &
16 Bondioli, 2015; Pinto et al., 2019).

17 In hypoxic conditions, fish initially adopt behavioural strategies, such as decreased
18 mobility or moving to more oxygenated environments. However, if hypoxia is
19 unavoidable, as a physiological strategy to survive, fish increase the oxygen transfer
20 capacity of their gill lamellae or reduce mitochondrial respiration through metabolic
21 depression (Moraes, Avilez, Altran, & Barbosa, 2002). Although hypoxia is a major
22 challenge for fish survival and physiological homeostasis, rapid re-oxygenation can be
23 even more stressful than hypoxia, mainly because of the excess reactive oxygen species
24 (Lushchak & Bagnyukova, 2006; Cunha Bastos et al., 2007). The adjustment response

1 of fish to rapid or gradual re-oxygenation stress is less known (Napolitano et al., 2019).
2 Thus, the re-oxygenation rate should be considered, since fish kept in hypoxic waters
3 activate mechanisms for adjustment and maintenance of homeostasis (Lushchak,
4 Lushchak, Mota, & Hermes-Lima, 2001).

5 For aquaculture success, fish adaptation requires tolerance to different
6 temperatures, low DO levels, and re-oxygenation. Therefore, the purpose of the current
7 study was to verify how pacu blood parameters are affected by interactions between
8 different temperatures (~18, ~23 and ~28°C) with (i) hypoxic, mildly hypoxic, or
9 normoxic conditions (~2.0, ~4.5 and ~7.0 mg O₂ L⁻¹, respectively) for 12 h, and (ii)
10 rapid or gradual re-oxygenation rates (0.5 and 5 h, respectively) following hypoxia. We
11 hypothesised that medium temperature, as well as a gradual re-oxygenation rate may
12 improve physiological responses in pacu juveniles in comparison with low or high
13 temperature and rapid re-oxygenation rate.

14

15 **2. MATERIALS AND METHODS**

16

17 **2.1 Animal ethics**

18 The experimental protocol was approved by the Committee on Animal
19 Experimentation of Universidade Federal do Rio Grande (FURG) - process number
20 P049/2017.

21

22 **2.2 Fish and experimental conditions**

23 Fish (n = 405; weight 47.94 ± 1.97 g [mean ± SEM]) were purchased from fish
24 farmers in Ajuricaba, Rio Grande do Sul, Southern Brazil. These juveniles were

1 transferred to the Continental Aquaculture Laboratory at the FURG, where they were
2 maintained in 27 continuously aerated 210 L tanks, with mechanical and biological
3 filters set to a 12:12 h light:dark photoperiod for 15 days. The same system was used
4 during the experimental procedures.

5 Twice a day (09:00 and 16:00 h), the fish were fed commercial food (32% crude
6 protein, Supra Aqua Line[®], São Leopoldo, RS, Brazil) until apparent satiety. Feeding
7 was ceased 24 h prior to, and during, the experimental period. The survival rate was
8 100% during the acclimation and experimental periods.

9 Water quality parameters were maintained at desirable levels for the species
10 (Boyd and Tucker, 2014) during the acclimation period. The water physical-chemical
11 variables were monitored daily for pH (7.5 ± 0.01 ; pH meter HANNA HI 8424),
12 temperature ($26.01 \pm 0.4^{\circ}\text{C}$), DO ($6.58 \pm 0.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$; oximeter YSI 5908), nitrite
13 ($0.07 \pm 0.02 \text{ mg N-NO}_2 \text{ L}^{-1}$; Boyd and Tucker, 2014), total ammonia ($0.15 \pm 0.05 \text{ mg N-}$
14 $\text{NH}_3 \text{ L}^{-1}$; UNESCO, 1983), alkalinity and hardness (135 ± 12.3 and $50 \pm 0.03 \text{ mg}$
15 $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, respectively; Eaton, Clesceri, Rice, & Greenberg, 2005). These variables
16 (with the exception of temperature and DO which were treatment variables) were
17 maintained throughout the experimental period.

18 We carried out a first experiment to verify the effects of interactions between
19 low, medium and high temperatures (~ 18 , ~ 23 and $\sim 28^{\circ}\text{C}$, respectively) under hypoxia,
20 mild hypoxia, or normoxia (~ 2.0 , ~ 4.5 and $\sim 7.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$, respectively); and a second
21 experiment to verify the effects of interaction between the same temperatures and
22 normoxia or rapid or gradual re-oxygenation rates (0,5 and 5 h, respectively) after
23 hypoxia in blood variables.

1 Before starting the experiments, the water temperature of the tanks was
2 gradually changed over ten days and fish were acclimatised at the respective tested
3 temperature for 30 days. The water temperature was adjusted to medium temperature
4 ($\sim 23^{\circ}\text{C}$) with the aid of an air conditioner, to high temperature ($\sim 28^{\circ}\text{C}$) with heaters
5 with a thermostat, and to low temperature ($\sim 18^{\circ}\text{C}$) with a chiller (Gelaqua 1 HP) with a
6 thermostat. The heaters and the chiller were placed in the sump and the water then
7 distributed through the recirculation system. The temperatures were chosen according to
8 the temperatures observed in South Brazil (Garcia et al., 2008).

9 For maintenance of DO levels in normoxia ($\sim 7.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) an air
10 blower (1 HP) was used, which supplied each experimental unit individually through an
11 aeration system. In hypoxia ($\sim 2.0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) or mild hypoxia ($\sim 4.5 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$)
12 treatments, maintenance of DO levels occurred by regulating bubbling nitrogen gas (for
13 deoxygenation; medicinal nitrogen) in the water through individual diffusers in each
14 tank for 2 h until reaching a constant level of DO. Before starting nitrogen injection, the
15 aeration system was turned off. As soon as the hypoxia levels of the treatments were
16 reached, the maintenance of these levels was performed through constant monitoring
17 (every 30 min) with the aid of an oximeter (YSI 5908). The specific DO levels were
18 chosen because they are normal (normoxia) or sublethal (in hypoxia and/or mild
19 hypoxia) values found in South Brazil (Copatti et al., 2019a), and because pacu is a
20 hypoxia-tolerant fish.

21

22 **2.3 Experiment 1 – interaction of different DO levels and temperatures**

23 The experimental design for the first experiment was completely randomised
24 with nine treatments and three replicates (nine fish per treatment) under the following

1 experimental conditions for 12 h: hypoxia ($2.38 \pm 0.04 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), mild hypoxia (4.53
2 $\pm 0.04 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), or normoxia ($7.24 \pm 1.09 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) at three different temperatures -
3 low ($18.08 \pm 0.25^\circ\text{C}$), medium ($23.08 \pm 0.11^\circ\text{C}$), and high ($27.70 \pm 0.12^\circ\text{C}$).

4

5 **2.4 Experiment 2 – hypoxia and re-oxygenation rates in different temperatures**

6 The experimental design for the second experiment was also completely
7 randomised with nine treatments and three replicates (nine fish per treatment) under the
8 following experimental conditions for 12 h: hypoxia ($2.02 \pm 0.06 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) or
9 normoxia ($6.39 \pm 1.05 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) at three different temperatures - low ($18.05 \pm 0.09^\circ\text{C}$),
10 medium ($23.10 \pm 0.23^\circ\text{C}$), and high ($27.80 \pm 0.20^\circ\text{C}$). After 12 h of hypoxia, two types
11 of re-oxygenation rates were immediately performed: rapid (fast) re-oxygenation where
12 return to normoxia was performed within 0.5 h; or gradual (slow) re-oxygenation where
13 the DO levels were gradually increased by $1 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ per h over 5 h. Oxygen
14 saturation was continuously measured with an oximeter (YSI 5908). These re-
15 oxygenation rates were chosen based on Johannsson et al. (2018).

16

17 **2.5 Sample collection and analysis**

18 Three fish from each tank ($n = 9$ per treatment) were randomly sampled at the
19 end of the 12 h experimental period in the first experiment, and after 1, 3, and 12 h re-
20 oxygenation or normoxia in the second experiment. The fish were removed from the
21 tank and anaesthetised with benzocaine (50 ppm) for blood collection (1.5 mL) from
22 venous puncturing of the tail caudal using heparinised syringes.

1 Blood glucose and lactate were recorded using a digital glucometer and digital
2 lactate meter, respectively (Roche[®] Diagnosis). A quantity of 0.5 mL blood was
3 measured for blood pH by a pH meter (HI2210/HANNA[®]) sensor (HI1083/HANNA[®]).

4 Samples were subsequently transferred to heparinised capillaries and centrifuged
5 at 4°C at 12,000 × *g* for 5 min for determination of haematocrit (Hct) by the
6 microhaematocrit method (Goldenfarb, Bowyer, Hall, & Brosious, 1971). Erythrocyte
7 (Ery) numbers were counted in a Neubauer chamber, with the aid of a binocular optical
8 microscope after dilution of 0.02 mL blood (1:200) in 0.65% sodium chloride solution
9 (Ranzani-Paiva, Pádua, Tavares-Dias & Egami, 2013). Haemoglobin (Hb)
10 concentration was quantified in a colorimetric kit (Bioclin[®]) and read
11 spectrophotometrically at 540 nm.

12 Calculations of the haematimetric indices were estimated according to the
13 following equations: mean corpuscular volume (MCV, fL) = $\text{Hct} \times 10 / \text{Ery} (\times 10^6 \mu\text{L})$;
14 mean corpuscular haemoglobin (MCH, pg) = $\text{Hb} \times 10 / \text{Ery}$; mean corpuscular
15 haemoglobin concentration (MCHC, g dL⁻¹) = $\text{Hb} \times 100 / \text{Hct}$.

16

17 **2.6 Statistical analysis**

18 A total of nine treatments were performed in triplicate for each experiment. All
19 results are expressed as mean ± SEM. The normality and homogeneity of the data were
20 previously tested by the Levene and Shapiro-Wilk tests, respectively. Two-way
21 ANOVA (temperature x DO or re-oxygenation) tests were performed, followed by a
22 post-hoc Tukey's test. The significance level was set at 5% in all cases ($p < 0.05$).

23

24 **3. RESULTS**

1 **3.1 Experiment 1**

2 Blood glucose levels in fish subjected to hypoxia at medium or high temperature
3 were significantly higher when compared to those exposed to the other treatments at the
4 same DO level or temperature ($p < 0.05$). Significantly higher blood glucose levels were
5 found in fish exposed to medium than to low temperature in mild hypoxia ($p < 0.05$)
6 (Fig. 1a). Blood pH levels in fish subjected to hypoxia at low or medium temperature
7 were significantly higher when compared to those exposed to the other treatments at the
8 same DO level or temperature ($p < 0.05$) (except fish under normoxia at medium
9 temperature) (Fig. 1b).

10 Haematocrit and MCV values were significantly lower in pacu exposed to mild
11 hypoxia at low temperature compared with those subjected to other treatments at the
12 same DO level or temperature ($p < 0.05$) (except for MCV values of fish under
13 normoxia at low temperature). Erythrocytes values were significantly lower in pacu
14 exposed to mild hypoxia at high temperature compared with those subjected to other
15 temperatures ($p < 0.05$). The MCHC values were significantly higher in pacu subjected
16 to hypoxia or mild hypoxia at low temperature than those exposed to other temperatures
17 ($p < 0.05$) (except for fish under hypoxia at high temperature) (Table 1).

18

19 **3.2 Experiment 2**

20 Blood glucose levels in fish subjected to rapid re-oxygenation at high
21 temperature were significantly higher when compared to those exposed to the other
22 treatments at the same re-oxygenation rate or temperature after 1 or 3 h following re-
23 oxygenation ($p < 0.05$). Blood glucose levels in fish subjected to gradual re-oxygenation
24 at high temperature were significantly higher than those exposed to gradual re-

1 oxygenation at low or medium temperature, or in normoxia at high temperature after 1
2 or 3 h following re-oxygenation ($p < 0.05$). Blood glucose levels in pacu subjected to
3 rapid re-oxygenation at low temperature were significantly higher than those subjected
4 in normoxia or gradual re-oxygenation after 1 and 3 h of re-oxygenation, respectively (p
5 < 0.05). Blood glucose levels were significantly higher in pacu exposed to rapid re-
6 oxygenation than fish exposed to normoxia at low or high temperature after 12 h
7 recovery ($p < 0.05$) (Table 2).

8 Blood lactate levels in fish subjected to rapid re-oxygenation at high temperature
9 were significantly higher when compared to those exposed to the other treatments at the
10 same re-oxygenation rate or temperature 1 h after re-oxygenation ($p < 0.05$). Blood
11 lactate levels in fish subjected to gradual re-oxygenation at low temperature were
12 significantly lower than those subjected to the other treatments at the same re-
13 oxygenation rate or temperature 1 h after re-oxygenation ($p < 0.05$). After 3 and 12 h of
14 recovery, in general, blood lactate levels were significantly higher in fish belonging to
15 treatments with medium temperature in relation to other temperatures ($p < 0.05$). Blood
16 lactate levels in fish exposed to rapid re-oxygenation were significantly higher than
17 those subjected to normoxia at low temperature after 12 h ($p < 0.05$) (Table 2).

18 After 1 h of recovery, blood pH levels were significantly higher in fish under
19 gradual re-oxygenation at low temperature compared to those exposed to other
20 treatments at the same re-oxygenation rate or temperature ($p < 0.05$). After 3 h of
21 recovery, blood pH levels were significantly higher in fish under normoxia at low
22 temperature compared to those exposed to rapid re-oxygenation at the same temperature
23 or to other temperatures under normoxia ($p < 0.05$). After 3 h of recovery, blood pH
24 levels were significantly lower in fish in rapid re-oxygenation or normoxia at medium

1 temperature than those exposed to other temperatures at the same re-oxygenation
2 rate/normoxia or medium temperature at rapid re-oxygenation ($p < 0.05$). After 12 h of
3 recovery, blood pH levels were significantly lower in pacu exposed at medium
4 temperature than those subjected at other temperatures ($p < 0.05$) (Table 2).

5 Haematocrit values were significantly higher in pacu subjected to normoxia at
6 low temperature than those exposed to rapid re-oxygenation at the same temperature or
7 to other temperatures in normoxia after 1 or 3 h of recovery ($p < 0.05$). After 12 h of
8 recovery, haematocrit values were significantly higher in pacu exposed to rapid or
9 gradual re-oxygenation at high temperature compared to low temperature, and to
10 normoxia at high temperature compared to low or medium temperatures ($p < 0.05$). In
11 general, haemoglobin values were significantly lower in juveniles exposed to low
12 temperature than other temperatures after 1 or 3 h of recovery ($p < 0.05$). After 12 h
13 recovery, haemoglobin values were significantly higher in pacu exposed to rapid or
14 gradual re-oxygenation at medium temperature compared to low temperature, and to
15 normoxia at medium or high temperature compared to low temperature ($p < 0.05$).
16 Erythrocytes values were significantly higher in pacu subjected to rapid re-oxygenation
17 at medium temperature than those exposed to gradual re-oxygenation or normoxia at the
18 same temperature, or to rapid re-oxygenation at other temperatures after 1 or 3 h of
19 recovery ($p < 0.05$). After 12 h of recovery, erythrocytes values were significantly
20 higher in pacu exposed to gradual re-oxygenation at medium temperature than other
21 temperatures at the same re-oxygenation rate ($p < 0.05$) (Table 3).

22 After 1 h of recovery, MCH values were significantly higher in pacu exposed to
23 rapid re-oxygenation at high temperature compared to those subjected at low
24 temperature ($p < 0.05$). At the same time (1 h), MCHC values in pacu subjected to

1 gradual re-oxygenation at low or medium temperatures, and to normoxia at low
2 temperature, were significantly lower than those subjected to the same re-oxygenation
3 rate or normoxia at the other temperatures ($p < 0.05$). After 3 h of recovery, MCH
4 values were significantly lower in fish exposed to rapid re-oxygenation at medium
5 temperature than those subjected to gradual re-oxygenation or normoxia at the same
6 temperature ($p < 0.05$). After 12 h of recovery, MCV values were significantly higher in
7 pacu exposed to gradual re-oxygenation at high temperature than those subjected at
8 medium temperature ($p < 0.05$) (Table 3).

9

10 **4. DISCUSSION**

11

12 Low DO and low or high temperature are very common stressors to tropical fish
13 (Copatti et al., 2019a; Pinto et al., 2019). High water temperature in synergism with
14 hypoxia impairs the DO availability, the dynamics after recovery events, and fish
15 metabolism (McBryan, Anttila, Healy, & Schulte, 2013). In the present paper, the
16 effects of interaction between different temperatures and DO levels or re-oxygenation
17 rates revealed some secondary stress responses, as alterations in haematological
18 parameters and an increased blood glucose and lactate levels in fish under hypoxia,
19 mainly in interaction with low or high temperature and exposed to rapid re-oxygenation
20 rate. This is a relevant result for aquaculture. Pacu juveniles are produced in spring–
21 summer (Milstein, Zoran, Peretz, & Joseph, 2000), when temperatures are higher. If this
22 production occurs under conditions of low DO levels, the health of the fish should be
23 impaired, which will result in less fish production. Similarly, McBryan et al. (2013)

1 verified in killifish (*Fundulus heteroclitus*) that high temperature has a strong effect on
2 tolerance to hypoxia.

3 The interaction of two stressors can generate an integrated stress response
4 (Wendelaar Bonga, 1997; Lemos, Ribeiro, Oliveira, Couto, & Copatti, 2018). In fish
5 that live in hypoxic waters with high temperatures, metabolic changes can be even more
6 dramatic because there is an increase in the metabolic rate and therefore a greater
7 dependence on oxygen demand (Houston & Murad, 1992). This was verified in the
8 current study, where pacu juveniles revealed increased blood glucose levels when
9 subjected to hypoxia or mild hypoxia in interaction with medium or high temperatures
10 for 12 h. Similar results also occurred in fish 1 or 3 h following re-oxygenation at these
11 same temperatures, as well as those exposed to low temperature and rapid re-
12 oxygenation rate. However, after 12 h recovery, only fish exposed to hypoxia followed
13 by rapid re-oxygenation had blood glucose levels higher than fish in normoxia,
14 including at low temperature. An elevation of blood glucose level at low temperature
15 indicates retarded metabolism; an index of sublethal stress (Best, Eddy, & Codd, 2001).

16 An increase of blood glucose and lactate levels result from the release of
17 catecholamines and corticosteroids into the bloodstream, which may in turn initiate
18 mobilisation of energy reserves, with increased circulating levels of these metabolites
19 (Cho et al., 2015). A similar result was seen in piava (*Megaleporinus obtusidens*) under
20 hypoxia, where metabolic reserves were increased (e.g glucose and lactate levels in the
21 kidney and muscle) (Copatti et al., 2019a). In case of exposure to hypoxic waters, the
22 production of energy by oxidative metabolism is hampered, so the use of energy
23 reserves increases due to the increase in circulating glucose (Wright, Perry, & Moon,
24 1989). The mobilisation of energy substrates can result in hyperglycaemia related to

1 carbohydrate metabolism, such as glycogenolysis and gluconeogenesis (Wendelaar
2 Bonga, 1997).

3 Lactate is the end product of glycolysis and is naturally produced by the
4 metabolism of animals mainly in organs with higher metabolic rate (Chen et al., 2017).
5 However, when oxygen supply or pathways begin to fail, life-sustaining alternatives
6 such as metabolic suppression and/or anaerobic pathways need to be recruited (Pörtner,
7 2010). The increase in blood lactate levels after 1 h of recovery in fish kept at low and
8 high temperatures (mainly) and subjected to rapid re-oxygenation compared to gradual
9 re-oxygenation or normoxia suggests an adjustment response with the use of anaerobic
10 metabolic pathway. Even after 12 h of recovery, these levels remained higher compared
11 to juveniles maintained under normoxia at low temperature. Considering that blood
12 glucose and lactate levels can be used as biomarkers for secondary stress (Wendelaar
13 Bonga, 1997), this explains their increased levels found in fish subjected to abrupt re-
14 oxygenation. At this same time (12 h), this outcome was not verified at medium
15 temperature under rapid re-oxygenation, suggesting that at this temperature, the 12 h
16 recovery period apparently was sufficient for pacu to re-establish their blood glucose
17 and lactate levels. In addition, blood lactate levels were higher at medium temperature
18 than other temperatures after 12 h recovery. This was possibly a compensatory effect of
19 lower alkalosis recorded at this time at medium temperature for all treatments according
20 to our results for blood pH levels.

21 In response to hypoxic conditions, fish may hyperventilate; that is, increase the
22 frequency of opercular movements in an attempt to capture more oxygen from the
23 environment (Maxime, Pichavant, Boeuf, & Nonnotte, 2000). However, this mechanism
24 leads to decreased carbon dioxide pressure and increased blood pH levels, a condition

1 called metabolic alkalosis (Johnson, 2017), which was verified in the current study,
2 after 12 h of recovery, at low or high temperature. Pacu is able to reversibly modify
3 portions of the respiratory system to prevent the effects of hypoxia. It develops lower
4 lip, anterior border of maxillary and opercular valve in order to drive the water surface's
5 oxygen-rich water over its gills (Fernández-Osuna & Scarabotti, 2016). In this way,
6 pacu may obtain sufficient oxygen to prevent metabolic alkalosis, as found in this study
7 for fish exposed to mild hypoxia (experiment 1) or rapid re-oxygenation (experiment 2).

8 Maintaining blood pH at homeostatic levels in fish is essential for enzyme
9 function and protein stability (Aboagye & Allen, 2018). Immediate re-oxygenation
10 ensures the re-establishment of substrates for ATP generation, as well as instant oxygen
11 increase and normalisation of blood pH levels. However, normalisation of extracellular
12 pH creates an extreme H⁺ gradient that can trigger the "reverse mode" that can lead to
13 an overload of reactive oxygen species (Aboagye & Allen, 2018). In the current study,
14 the re-oxygenation rates, however, apparently interfered less than temperature in blood
15 pH values. In general, blood pH levels were higher when fish were exposed to low or
16 high temperatures, even after 12 h recovery or normoxia.

17 Changes in oxygen availability activate mechanisms of adjustment and
18 metabolic pathway change that can modify blood pH (Perry & Gilmour, 2006). In order
19 to repair this blood pH decrease, the Na⁺/H⁺ exchanger is activated. In addition, the
20 Na⁺/H⁺ β adrenergic exchanger is located in the erythrocyte membrane, which controls
21 the erythrocyte pH for higher or lower affinity of haemoglobin for oxygen (Aboagye &
22 Allen, 2018), which also interferes with haematocrit values. Decreased blood pH levels
23 could still be a compensatory response in which low blood pH levels would be offset by
24 an increase in haemoglobin and erythrocyte variables, as found in the present study at

1 medium temperature. Therefore, more information on the changes induced by
2 temperature or hypoxia and re-oxygenation rates come from the haematological
3 analysis.

4 Reduction in DO availability is associated with increased water temperature and
5 the effects of hypoxia are particularly significant in the context of acute exposures to
6 high temperatures and hypoxia (McBryan et al., 2013). In general, in the current study,
7 after recovery, haematological values were higher not only at high temperature, but also
8 at 1 or 3 h after rapid re-oxygenation, in comparison to normoxia or gradual re-
9 oxygenation. This could have occurred as a compensatory mechanism for an increase in
10 oxygen consumption and mitochondrial respiration by fish, as observed by Napolitano
11 et al. (2019) in zebrafish (*Danio rerio*) after rapid re-oxygenation (20 min). At low
12 temperature, cellular respiration is more resistant to hypoxia with or without re-
13 oxygenation (Onukwufor, Stevens, & Kamunde, 2017). The increase of oxygen
14 consumption capacity in tissue and at the mitochondrial level can be considered as a fast
15 response to counteract the deleterious effects of hypoxia (Napolitano et al., 2019).

16 Our study showed that 12 h after rapid re-oxygenation, haematological values
17 were similar or lower than normoxia or gradual re-oxygenation, demonstrating a
18 possible late adjustment to increase pacu tolerance after exposure to hypoxic conditions
19 (Xiao, 2015). In addition, the affinity of haemoglobin to oxygen increases with a
20 decrease in MCHC (Nikinmaa, 2001), what was most evidenced at medium temperature
21 in our experiments, demonstrating that this is the best temperature for pacu rearing.
22 Similarly, in a previous study, Pinto et al. (2019) verified 24°C as the ideal temperature
23 for pacu, and found that temperatures exceeding a 3°C change from 24°C (positive or
24 negative) over five days were stressful for juveniles. A prolonged period at 18–20°C has

1 been found to decrease feeding and subsequent growth rate of pacu (Milstein et al.,
2 2000).

3 Previous studies showed that haematocrit and erythrocyte parameters are
4 increased after hypoxia in fish (Petersen & Gamperl, 2011; Richards, 2011; Ni et al.,
5 2014). Increased haematocrit may indicate spleen contraction or other rapid
6 physiological adjustment (Fazio et al., 2015). Fish may increase oxygen carrying
7 capacity with increased haematocrit due to increased erythrocyte mass and haemoglobin
8 concentration (Witeska, 2013), as evidenced in this study in fish under hypoxia at low
9 temperature, or up to 3 h after rapid re-oxygenation at medium temperature. Similarly,
10 in fish from the Amazon Basin, an increase in the oxygen transport capacity was
11 observed with increased haematocrit (Powers, Martin, Garlick, Fyhn, & Fyhn, 1978). In
12 contrast, increased haematocrit volume and no change in erythrocytes, as observed
13 following rapid re-oxygenation at high temperature, can be associated with
14 haemoconcentration, or caused by an ion imbalance or increased concentration of
15 haemoglobin in erythrocytes (Morgan & Iwama, 1997). Additionally, in general, there
16 was no increase in MCV, indicating an absence of microcytosis (Verde, Giordano, & di
17 Prisco, 2011).

18 Increased haemoglobin synthesis leading to a higher number of erythrocytes is a
19 mechanism aimed at effectively meeting tissue oxygen demand under functional or
20 environmental hypoxia conditions (Wells, 2009), because oxygen is transported by
21 erythrocytes. Temperature is the main factor affecting metabolic rate in fish, and it
22 causes changes in haematological variables; for example, higher erythrocytes counts are
23 observed at higher temperatures (Svetina, Matasin, Tofant, Vucemilo, & Fijan, 2002).
24 In the current study, haemoglobin concentration was lower at low temperature,

1 regardless of the type of re-oxygenation to which juvenile pacu were exposed. This was
2 expected because a lower temperature strongly influences a greater DO availability
3 (Witeska, 2013), driving an decrease in haemoglobin synthesis.

4 Hypoxia tolerant fish species, such as pacu, show high haemoglobin-oxygen
5 affinity (Nikinmaa, 2001). This is in line with our results which indicated that fish can
6 adjust to different water temperature and DO, and therefore that pacu can be reared in
7 aquaculture systems with different water quality conditions. However, gradual re-
8 oxygenation presented better results than rapid re-oxygenation following hypoxic
9 conditions. The present observation is indicative of hypoxia-triggered physiological
10 modifications that enhance oxygen uptake when the animal is returned gradually to
11 normoxia. Similarly, in Atlantic salmon (*Salmo salar*) a recovery period (~1h 40min)
12 was indicative of metabolic compensation to acclimation after re-exposure to normoxia
13 (Polymeropoulos, Elliott, & Frappell, 2017). For instance, higher haemoglobin values
14 were found in fish exposed to gradual re-oxygenation than those exposed to normoxia at
15 medium temperature. Furthermore, the metabolic adjustments verified in the current
16 study after re-oxygenation can indicate secondary responses against stress caused by
17 hypoxia or different temperatures.

18 Blood responses of fish are an attempt to maintain the cell status (Copatti,
19 Baldisserotto, Souza, & Garcia, 2019b). Similarly, in *Cyphocharax abramoides*, another
20 hypoxia-tolerant fish, it was verified that most of the oxidative damage occurs during
21 hypoxia not during re-oxygenation (Johannsson et al., 2018). However, rapid re-
22 oxygenation can interfere with the antioxidant status of cells, causing more stress to fish
23 (Johannsson et al., 2018). Therefore, an effect of hypoxia and rapid re-oxygenation and

1 related metabolic changes on the blood ability to deliver oxygen to the tissues cannot be
2 ruled out (DiMichele & Powers, 1982).

3 In an integrative view, the present study demonstrated that hypoxic waters
4 trigger physiological changes in fish, such as increased blood glucose, lactate and pH
5 levels. This occur due to a reduction in the oxygen supply that compromises the
6 availability of energy necessary for the fish to be able to perform their physiological
7 functions in a homeostatic way using glucose as an energy substrate. In addition, the
8 current study also showed that a longer recovery period after hypoxia associated with a
9 medium temperature has the potential to effectively restore pacu homeostasis. This
10 temperature range did not exceed the species thermal tolerance limits. Temperatures
11 outside the ideal range can be even more stressful combined with conditions of hypoxia
12 or rapid re-oxygenation. In addition, an abrupt recovery period can affect the metabolic
13 recovery capacity of pacu juveniles. Thus, we suggest that a gradual infusion of oxygen
14 into water will facilitate a set of orderly reactions regarding the use of oxygen by tissues
15 and cells of pacu, allowing adequate time to restore their physiological homeostasis
16 through modifications of haematological variables or metabolism. This discovery will
17 benefit the production of pacu in fish farms where episodic situations of hypoxia occur.

18

19 **5. CONCLUSION**

20

21 Exposure of pacu juveniles to hypoxia caused an increase in blood glucose and
22 pH levels. At medium temperature, fish exposed to hypoxia had recovered 12 h after re-
23 oxygenation, demonstrating that this is the most suitable temperature for pacu
24 homeostasis according to secondary stress results. In general, 12 h after gradual re-

1 oxygenation, blood variables returned to homeostatic levels, indicating that this re-
2 oxygenation rate is best for restoring species homeostasis.

3

4 **Acknowledgements**

5 The authors acknowledge support from FAPERGS (Fundação de Amparo à Pesquisa do
6 Rio Grande do Sul – process number 19/2551-0001890-8). The authors are grateful to
7 CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil) for
8 research fellowships provided for L. Garcia (process number 311298/2017-6), and to
9 CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil) for a
10 research grant provided for L.F. Nitz.

11

12 **Data Availability Statement**

13 The data used to support the findings of this study are available from the corresponding
14 author upon reasonable request.

15

16 **Conflict of Interest Statement**

17 The authors declare that they have no known competing financial interests or personal
18 relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

19

20 **REFERENCES**

21

22 Aboagye, D. L., & Allen, P. J. (2018). Effects of acute and chronic hypoxia on acid–
23 base regulation, hematology, ion, and osmoregulation of juvenile American
24 paddlefish. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and*

1 *Environmental Physiology*, 188, 77–88. <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-017->
2 1104-7

3 Baldisserotto, B., Copatti, C. E., Gomes, L. C., Chagas, E. C., Brinn, R. P., & Roubach,
4 R. (2008). Net ion fluxes in the facultative air-breather *Hoplosternum littorale*
5 (tamoata) and the obligate air-breather *Arapaima gigas* (pirarucu) exposed to
6 different Amazonian waters. *Fish Physiology and Biochemistry*, 34, 405–412.
7 <http://dx.doi.org/10.1007/s10695-008-9200-y>

8 Barbieri, E., & Bondioli, A. C. V. (2015). Acute toxicity of ammonia in pacu fish
9 (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887) at different temperatures levels.
10 *Aquaculture Research*, 46, 565–571. <http://dx.doi.org/10.1111/are.12203>

11 Bechara, J. A., Roux, J. P., Diaz, J. F. R., Quintana, C. I. F., & Longoni de Meabe, C.
12 A. (2005). The effect of dietary protein level on pond water quality and feed
13 utilization efficiency of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887).
14 *Aquaculture Research*, 36, 546–553. <https://doi.org/10.1111/j.1365->
15 2109.2005.01252.x

16 Best, J. H., Eddy, F. B., & Codd, G. H. (2001). Effects of purified microcystin-LR and
17 cell extracts of microcystis strains PCC 7813 and function in brown trout (*Salmo*
18 *trutta*) alevins. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 171–178.
19 <https://doi.org/10.1023/A:1014081827372>

20 Bittencourt, F., Feiden, A., Signor, A. A., Boscolo, W. R., Lorenz, E. K., & Maluf, M.
21 L. F. (2010). Densidade de estocagem e parâmetros eritrocitários de pacus criados
22 em tanques-rede. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39, 2323–2329.
23 <https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001100002>

- 1 Boyd, C. E., & Tucker, C. S. (2014). *Handbook for aquaculture water quality*. Auburn,
2 AL: Craftmaster Printers Inc.
- 3 Chen, N., Wu, M., Tang, G. P., Wang, H. J., Huang, C. X., Wu, X. J., ... Wang, H. L.
4 (2017). Effects of acute hypoxia and reoxygenation on physiological and immune
5 responses and redox balance of wuchang bream (*Megalobrama amblycephala*
6 Yih, 1955). *Frontiers in Physiology*, 8, 375.
7 <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2017.00375>
- 8 Copatti, C. E., Bolner, K. C. S., Londero, E. P., De Rosso, F. L., Pavanato, M. A.,
9 Baldisserotto, B. (2019a). Low dissolved oxygen levels increase stress in piava
10 (*Megaleporinus obtusidens*): Iono-regulatory, metabolic and oxidative responses.
11 *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 91, e20180395.
12 <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201920180395>
- 13 Copatti, C. E., Baldisserotto, B., Souza, C. F., & Garcia, L., (2019b). Protective effect
14 of high hardness in pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) under acidic or
15 alkaline pH: Biochemical and haematological variables. *Aquaculture*, 502, 250–
16 257. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.028>
- 17 Cunha Bastos, V. L. F., Salles, J. B., Valente, R. H. León, I. R., Perales, J., Dantas, R.
18 F., ... Cunha Bastos, J. (2007). Cytosolic glutathione peroxidase from liver of pacu
19 (*Piaractus mesopotamicus*), a hypoxia-tolerant fish of the Pantanal. *Biochimie*,
20 89, 1332–1342. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.003>
- 21 De Souza, P. C., & Bonilla-Rodriguez, G. O. (2007). Fish hemoglobins. *Brazilian*
22 *Journal of Medical and Biological Research*, 40, 769–778.
23 <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2007000600004>

- 1 DiMichele, L., & Powers, D. A. (1982). Physiological basis for swimming endurance
2 differences between LDH-B genotypes of *Fundulus heteroclitus*. *Science*, *216*,
3 1014–1016. <http://doi.org/10.1126/science.7079747>
- 4 Eaton, A. D., Clesceri, L. S., Rice, E. W., & Greenberg, A. E. (2005). *Standard methods*
5 *for the examination of water and wastewater*. 21st ed. Washington, DC: APHA.
- 6 El-Sayed, A. F. M., & Kawanna, M. (2008). Optimum water temperature boosts the
7 growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry reared in a
8 recycling system. *Aquaculture Research*, *39*, 670–672.
9 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.01915.x>
- 10 FAO (2018). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the*
11 *sustainable development goals*. Rome.
- 12 Fazio, F., Ferrantelli, V., Fortino, G., Arfuso, F., Giangrosso, G., & Faggio, C. (2015).
13 The influence of acute handling stress on some blood parameters in cultured sea
14 bream (*Sparus Aurata* Linnaeus, 1758). *Italian Journal of Food Safety*, *4*, 4174.
15 <https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.4174>
- 16 Fernández-Osuna, M. A., & Scarabotti, P. (2016). Phenotypic plasticity associated to
17 environmental hypoxia in the neotropical serrasalmid *Piaractus mesopotamicus*
18 (Holmberg, 1887) (Characiformes: Serrasalminidae). *Neotropical Ichthyology*, *14*,
19 e150187. <http://doi.org/10.1590/1982-0224-20150187>
- 20 Garcia, L. O., Copatti, C. E., Wachholz, F., Pereira Filho, W., & Baldisserotto, B.
21 (2008). Freshwater temperature in the state of Rio Grande do Sul, Southern
22 Brazil, and its implication for fish culture. *Neotropical Ichthyology*, *6*, 275–281.
23 <http://doi.org/10.1590/S1679-62252008000200016>

- 1 Goldenfarb, P. B., Bowyer, F. P., Hall, E., & Brosious, E. (1971). Reproducibility in the
2 hematology laboratory: The microhematocrit determination. *The American*
3 *Journal of Clinical Pathology*, 56, 35–39. <http://doi.org/10.1093/ajcp/56.1.35>
- 4 Houston, A. H., & Murad, A. (1992). Erythrodynamic in goldfish, *Carassius auratus*
5 L.: Temperature effects. *Physiological Zoology*, 65, 55–76.
6 <http://doi.org/10.1086/physzool.65.1.30158239>
- 7 Johannsson, O. E., Giacomini, M., Henrique, H. S., Campos, D., Braz-Mota, S.,
8 Heinrichs-Caldas, W., Val, A. L. (2018). Does hypoxia or different rates of re-
9 oxygenation after hypoxia induce an oxidative stress response in *Cyphocharax*
10 *abramoides* (Kner 1858), a Characid fish of the Rio Negro? *Comparative*
11 *Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 224,
12 53–67. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.019>
- 13 Johnson, R. A. (2017). A quick reference on respiratory alkalosis. *Veterinary Clinics:*
14 *Small Animal Practice*, 47, 181–184. <http://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.10.005>
- 15 Johnston, I. A., Bower, N. I., & Macqueen, D. J. (2011). Growth and the regulation of
16 myotomal muscle mass in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 214,
17 1617–1628. <http://doi.org/10.1242/jeb.038620>
- 18 Jomori, R. K., Carneiro, D. J., Malheiros, E. B., & Portella, M. C. (2003). Growth and
19 survival of pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) juveniles reared in
20 ponds or at different initial larviculture periods indoors. *Aquaculture*, 221, 277–
21 287. [http://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00069-3](http://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00069-3)
- 22 Lemos, C. H da P., Ribeiro, C. V. di M., Oliveira, C. P. B. de, Couto, R. D., & Copatti,
23 C. E. (2018). Effects of interaction between pH and stocking density on the

1 growth, haematological and biochemical responses of Nile tilapia juveniles.
2 *Aquaculture*, 495, 62–67. <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.037>

3 Lushchak, V. I., & Bagnyukova, T. V. (2006). Effects of different environmental
4 oxygen levels on free radical processes in fish. *Comparative Biochemistry and*
5 *Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 144, 283–289.
6 <http://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.02.014>

7 Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., & Hermes-Lima, M. (2001). Oxidative
8 stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and
9 reoxygenation. *The American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and*
10 *Comparative, Physiology*, 280, 100–107.
11 <http://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.1.R100>

12 Maxime, V., Pichavant, K., Boeuf, G., & Nonnotte, G. (2000). Effects of hypoxia on
13 respiratory physiology of turbot, *Scophthalmus maximus*. *Fish Physiology and*
14 *Biochemistry*, 22, 51–59. <http://doi.org/10.1023/A:1007829214826>

15 McBryan, T. L., Anttila, K., Healy, T. M., & Schulte, P. M. (2013). Responses to
16 temperature and hypoxia as interacting stressors in fish: Implications for
17 adaptation to environmental change. *Integrative and Comparative Biology*, 53,
18 648–659. <http://doi.org/10.1093/icb/ict066>

19 Milstein, A., Zoran, M., Peretz, Y., & Joseph, D. (2000). Low temperature tolerance of
20 pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Biology of Fishes*, 58, 455–460.
21 <http://doi.org/10.1023/A:1007672401544>

22 Moraes, G., Avilez, I. M., Altran, A. E., & Barbosa, C. C. (2002). Biochemical and
23 hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Linnaeus,

1 1758) exposed to environmental hypoxia. *Brazilian Journal of Biology*, 62, 633–
2 640. <http://doi.org/10.1590/S1519-69842002000400011>

3 Morgan, J. D., & Iwama, G. K. (1997). *Measurements of stressed states in the field*. In
4 G. K. Iwana, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, & C. B. Schreck (Eds.), *Fish stress*
5 *and health in aquaculture* (pp. 247–270). New York, NY: Cambridge University
6 Press.

7 Napolitano, G., Venditti, P., Fasciolo, G., Esposito, D., Uliano, E., & Agnisola, C.
8 (2019). Acute hypoxia/reoxygenation affects muscle mitochondrial respiration
9 and redox state as well as swimming endurance in zebrafish. *Journal of*
10 *Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental*
11 *Physiology*, 189, 97–108. <http://doi.org/10.1007/s00360-018-1198-6>

12 Ni, M., Wen, H., Li, J., Chi, M., Bu, Y., Ren, Y., ... Ding, H. (2014). The physiological
13 performance and immune responses of juvenile Amur sturgeon (*Acipenser*
14 *schrenckii*) to stocking density and hypoxia stress. *Fish and Shellfish*
15 *Immunology*, 36, 325–335. <http://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.12.002>

16 Nikinmaa, M. (2001). Haemoglobin function in vertebrates: Evolutionary changes in
17 cellular regulation in hypoxia. *Respiratory Physiology*, 128, 317–329.
18 [http://doi.org/10.1016/s0034-5687\(01\)00309-7](http://doi.org/10.1016/s0034-5687(01)00309-7)

19 Nitz, L. F, Maltez, L. C., Pellegrin, L., Garcia, L. O., Barbas, L. A. L., & Prentice-
20 Hernández, C. (2019). Flesh quality and stress responses of *Piaractus*
21 *mesopotamicus* after exposure to sublethal levels of ammonia and subsequent
22 recovery. *Boletim do Instituto de Pesca*, 45, e325. [http://doi.org/10.20950/1678-](http://doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.1.325)
23 [2305.2019.45.1.325](http://doi.org/10.20950/1678-2305.2019.45.1.325)

- 1 Onukwufor, J. O., Stevens, D., & Kamunde, C. (2017). Combined effects of cadmium,
2 temperature and hypoxia-reoxygenation on mitochondrial function in rainbow
3 trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 182, 129–141.
4 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.11.015>
- 5 Pellegrin, L., Nitz, L. F., Maltez, L. C., Copatti, C. E., & Garcia, L. (2020). Alkaline
6 water improves the growth and antioxidant responses of pacu juveniles (*Piaractus*
7 *mesopotamicus*). *Aquaculture*, 519, 734713.
8 <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734713>
- 9 Perry, S. F., & Gilmour, K. M. (2006). Acid–base balance and CO₂ excretion in fish:
10 Unanswered questions and emerging models. *Respiratory Physiology &*
11 *Neurobiology*, 154, 199–215. <http://doi.org/10.1016/j.resp.2006.04.010>
- 12 Petersen, L. H., & Gamperl, A. K. (2011). Cod (*Gadus morhua*) cardiorespiratory
13 physiology and hypoxia tolerance following acclimation to low-oxygen
14 conditions. *Physiology and Biochemistru Zoology*, 284, 18–31.
15 <http://doi.org/10.1086/657286>
- 16 Pinto, D., Pellegrin, L., Nitz, L. F., da Costa, S. T., Monserrat, J. M., & Garcia, L.
17 (2019). Haematological and oxidative stress responses in *Piaractus*
18 *mesopotamicus* under temperature variations in water. *Aquaculture Research*, 50,
19 3017–3027. <http://dx.doi.org/10.1111/are.14260>
- 20 Polymeropoulos, E. T., Elliott, N. G., & Frappell, P. B. (2017). Hypoxic acclimation
21 leads to metabolic compensation after reoxygenation in Atlantic salmon yolk-sac
22 alevins. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular &*
23 *Integrative Physiology*, 213, 28–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.08.011>

- 1 Pörtner, H. O. (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: A matrix
2 for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Experimental*
3 *Biology and Medicine*, 213, 881–893. [http:// doi:10.1242/jeb.037523](http://doi:10.1242/jeb.037523)
- 4 Powers, D. A., Martin, J. P., Garlick, R. G., Fyhn, H. J., & Fyhn, U. E. H. (1978). O
5 efeito da temperatura sobre os equilíbrios de oxigênio das hemoglobinas de peixe
6 em relação à variabilidade térmica ambiental. *Acta Amazônica*, 8, 113–123.
- 7 Ranzani-Paiva, M. J. T., de Pádua, S. B., Tavares-Dias, M., & Egami, M. I. (2013).
8 *Métodos para análise hematológica em peixes*. Maringá: EDUEM.
- 9 Richards, J. G. (2011). Physiological, behavioral and biochemical adaptations of
10 intertidal fishes to hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 214, 191–199.
11 <http://doi.org/10.1242/jeb.047951>
- 12 Rocha-Santos, C., Bastos, F. F., Dantas, R. F., Hauser-Davis, R. A., Rodrigues, L. C.,
13 Cunha Bastos, V. L. F., & Cunha Bastos, J. (2018). Glutathione peroxidase and
14 glutathione S-transferase in blood and liver from a hypoxia-tolerant fish under
15 oxygen deprivation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 163, 604–611.
16 <http://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.089>
- 17 Sampaio, F. G., Bojink, C. L., Oba, E. T., Santos, L. R. B., Kalinin, A. L., & Rantin, F.
18 T. (2008). Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus*
19 *mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia
20 exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology &*
21 *Pharmacology*, 147, 43–51. <http://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.07.009>
- 22 Svetina, A., Matasin, Z., Tofant, A., Vucemilo, M., & Fijan, N. (2002). Haematology
23 and some blood chemical parameters of young carp till the age of three years.

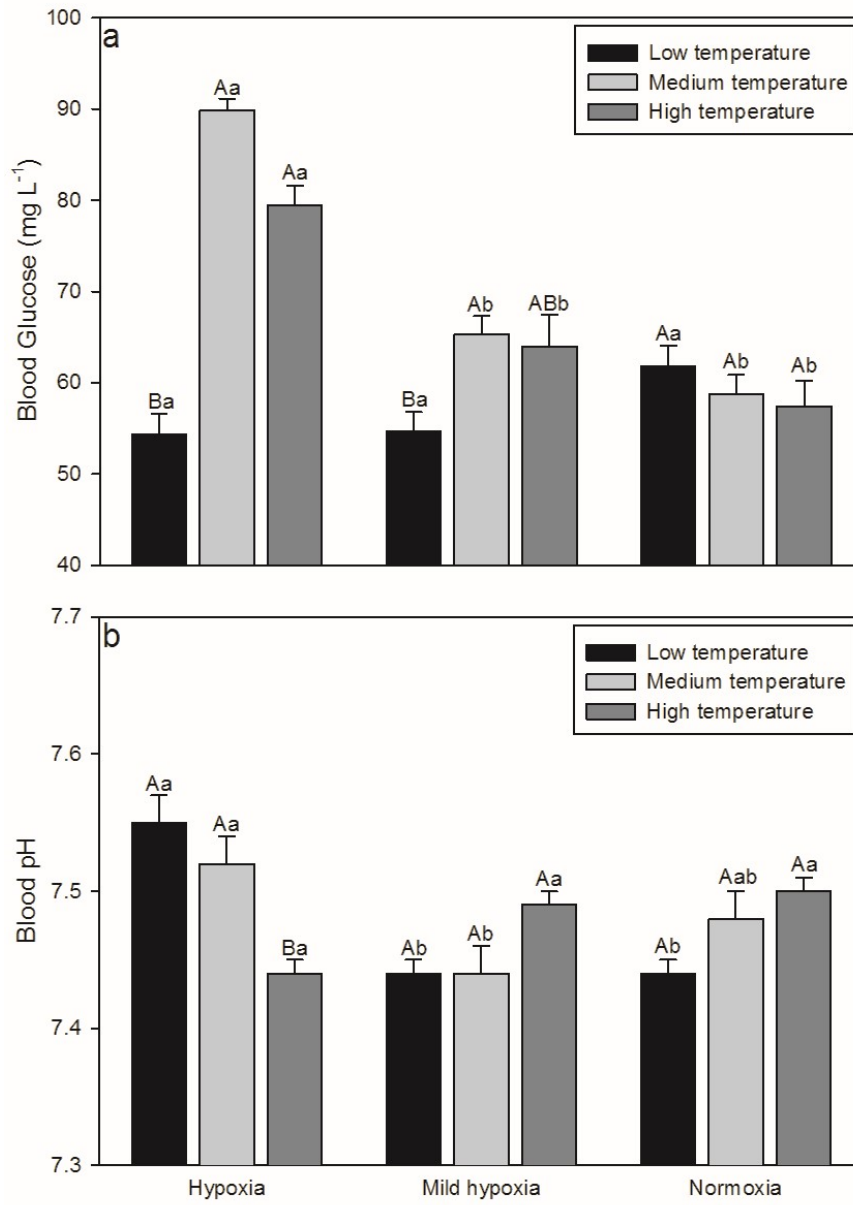
- 1 *Acta Veterinaria Hungarica*, 50, 459–467.
2 <http://doi.org/10.1556/AVet.50.2002.4.8>
- 3 UNESCO. 1983. Chemical methods for use in marine environmental monitoring.
4 Intergovernmental Oceanographic Commission, Paris.
- 5 Verde, C., Giordano, D., & di Prisco, G. (2011). Erythropoiesis in fishes. In A. P.
6 Farrell, E. D. Stevens, J. J. Cech, & J. G. Richards (Eds.), *Encyclopaedia of fish*
7 *physiology: From genome to environment* (pp. 992–997). London, UK:
8 Elsevier/Academic Press. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00268-9>
- 9 Wells, R. M. (2009). *Blood-gas transport and hemoglobin function: Adaptations for*
10 *functional and environmental hypoxia*. In A. P. Farrell, J.G. Richards, & C. J.
11 Brauner (Eds.), *Fish physiology* (pp. 255–299). London, UK: Academic Press.
12 [http://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)00006-X](http://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)00006-X)
- 13 Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiology Reviews*, 77,
14 591–625. <http://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- 15 Witeska, M. (2013). Erythrocytes in teleost fishes: A review. *Zoology and Ecology*, 23,
16 275–281. <http://doi.org/10.1080/21658005.2013.846963>
- 17 Wright, P. A., Perry, S. F., & Moon, T. W. (1989). Regulation of hepatic
18 gluconeogenesis and glycogenolysis by catecholamines in rainbow trout during
19 environmental hypoxia. *Journal of Experimental Biology*, 147, 169–18.
- 20 Xiao, W. (2015). The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes.
21 *Science China Life Sciences*, 58, 148–155. [http://doi.org/10.1007/s11427-015-](http://doi.org/10.1007/s11427-015-4801-z)
22 4801-z

1 **Figure legends**

2

3 **FIGURE 1** Blood variables of pacu juveniles (*Piaractus*
4 *mesopotamicus*) after 12 h of exposure to hypoxia (2.38 mg O₂ L⁻¹),
5 mild hypoxia (4.53 mg O₂ L⁻¹), or normoxia (7.24 mg O₂ L⁻¹), at low
6 (18.05°C), medium (23.08°C), or high (27.70°C) temperature by 12 h.
7 a = glucose. b = pH. Data are presented as mean ± SEM (n = 9 fish per
8 treatment). Different uppercase letters indicate statistically significant
9 differences between temperature at the same dissolved oxygen level (*p*
10 < 0.05). Different lowercase letters indicate statistically significant
11 differences between dissolved oxygen level at the same temperature (*p*
12 < 0.05).

1 **Figure 1**



2

1 **Table legends**

2

3 **TABLE 1** Haematological variables of pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) after 12 h
4 of exposure to hypoxia (2.38 mg O₂ L⁻¹), mild hypoxia (4.53 mg O₂ L⁻¹), or normoxia (7.24
5 mg O₂ L⁻¹), at low (18.05°C), medium (med) (23.08°C), or high (27.70°C) temperature.

6

7 **TABLE 2** Blood variables of pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) evaluated at 1, 3 or
8 12 h after 12 h of hypoxia (2.02 mg O₂ L⁻¹) followed by rapid (0.5 h) or gradual (5 h) re-
9 oxygenation, or maintained only under normoxia (6.39 mg O₂ L⁻¹) at low (18.08°C), medium
10 (23.10°C), or high (27.80°C) temperature.

11

12 **TABLE 3** Haematological variables of pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) evaluated
13 at 1, 3 or 12 h after 12 h of hypoxia (2.02 mg O₂ L⁻¹) followed by rapid (0.5 h) or gradual (5
14 h) re-oxygenation, or maintained only under normoxia (6.39 mg O₂ L⁻¹) at low (18.08°C),
15 medium (23.10°C), or high (27.80°C) temperature

1 **Table 1**

2

Variables						
Temp (°C)	Hct (%)	Hb (g dL ⁻¹)	Ery (10 ⁶ μL ⁻¹)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g dL ⁻¹)
Hypoxia						
Low	33.56 ± 0.82 ^{Aa}	7.58 ± 0.24 ^{Aa}	1.68 ± 0.06 ^{Aa}	201.10 ± 5.85 ^{Aa}	46.61 ± 1.15 ^{Aa}	22.81 ± 0.44 ^{Aa}
Med	34.50 ± 1.07 ^{Aa}	6.64 ± 0.28 ^{Aa}	1.71 ± 0.06 ^{Aa}	206.57 ± 9.31 ^{Aa}	39.01 ± 2.91 ^{Aa}	19.33 ± 1.24 ^{Ba}
High	31.25 ± 1.29 ^{Aa}	7.15 ± 0.11 ^{Aa}	1.63 ± 0.07 ^{Aa}	199.31 ± 9.74 ^{Aa}	44.96 ± 1.87 ^{Aa}	22.61 ± 0.81 ^{ABa}
Mild hypoxia						
Low	27.75 ± 0.59 ^{Bb}	7.30 ± 0.19 ^{Aa}	1.77 ± 0.05 ^{Aa}	159.56 ± 4.43 ^{Bb}	41.62 ± 1.70 ^{Aa}	26.47 ± 0.70 ^{Aa}
Med	34.44 ± 0.63 ^{Aa}	6.74 ± 0.37 ^{Aa}	1.63 ± 0.07 ^{Aa}	215.29 ± 13.43 ^{Aa}	41.62 ± 2.48 ^{Aa}	19.68 ± 1.27 ^{Ba}
High	32.11 ± 0.92 ^{Aa}	6.82 ± 0.16 ^{Aa}	1.53 ± 0.07 ^{Ba}	212.13 ± 6.92 ^{Aa}	45.28 ± 2.01 ^{Aa}	21.36 ± 0.78 ^{Ba}
Normoxia						
Low	32.12 ± 1.09 ^{Aa}	7.12 ± 0.34 ^{Aa}	1.71 ± 0.07 ^{Aa}	189.23 ± 7.14 ^{Aab}	41.69 ± 1.79 ^{Aa}	22.25 ± 1.14 ^{Aa}
Med	31.78 ± 0.47 ^{Aa}	6.90 ± 0.35 ^{Aa}	1.48 ± 0.05 ^{Aa}	216.39 ± 5.88 ^{Aa}	47.06 ± 2.98 ^{Aa}	21.75 ± 1.19 ^{Aa}
High	33.33 ± 1.09 ^{Aa}	6.62 ± 0.14 ^{Aa}	1.57 ± 0.06 ^{Aa}	213.74 ± 6.98 ^{Aa}	42.74 ± 2.00 ^{Aa}	20.00 ± 0.67 ^{Aa}

3 Hct = Haematocrit; Hb = Haemoglobin; Ery = Erythrocytes; MCV = Mean Corpuscular Volume; MCH = Mean
 4 Corpuscular Haemoglobin and; MCHC = Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration. Data are presented as
 5 the mean ± SEM (n = 9 fish per treatment). Different uppercase letters indicate statistically significant differences
 6 between temperature at the same dissolved oxygen level ($p < 0.05$). Different lowercase letters indicate
 7 statistically significant differences between dissolved oxygen level at the same temperature ($p < 0.05$).

1 **Table 2**
2

Temp (°C)	Variables		
	Glucose (mg L ⁻¹)	Lactate (nmol L ⁻¹)	pH (units)
1 h			
Hypoxia + rapid re-oxygenation			
Low	96.33 ± 4.59 ^{Ba}	4.31 ± 0.18 ^{Ba}	7.53 ± 0.03 ^{Ab}
Med	100.33 ± 4.55 ^{Ba}	4.40 ± 0.22 ^{Ba}	7.44 ± 0.01 ^{Aa}
High	159.44 ± 5.14 ^{Aa}	6.90 ± 0.19 ^{Aa}	7.48 ± 0.03 ^{Aa}
Hypoxia + gradual re-oxygenation			
Low	82.00 ± 2.03 ^{Bab}	2.81 ± 0.15 ^{Bb}	7.64 ± 0.03 ^{Aa}
Med	85.00 ± 3.36 ^{Ba}	4.49 ± 0.28 ^{Aa}	7.46 ± 0.01 ^{Ba}
High	129.22 ± 5.09 ^{Ab}	4.60 ± 0.29 ^{Ab}	7.55 ± 0.01 ^{Ba}
Normoxia			
Low	71.22 ± 4.07 ^{Ab}	3.23 ± 0.28 ^{Ab}	7.51 ± 0.02 ^{Ab}
Med	63.11 ± 2.16 ^{Ab}	4.19 ± 0.14 ^{Aa}	7.39 ± 0.01 ^{Ba}
High	77.22 ± 3.22 ^{Ac}	3.99 ± 0.15 ^{Ab}	7.50 ± 0.02 ^{Aa}
3 h			
Hypoxia + rapid re-oxygenation			
Low	95.22 ± 1.90 ^{Ca}	4.20 ± 0.11 ^{Ba}	7.46 ± 0.01 ^{Ab}
Med	117.22 ± 4.18 ^{Ba}	6.64 ± 0.67 ^{Aa}	7.33 ± 0.01 ^{Bb}
High	140.00 ± 4.83 ^{Aa}	5.36 ± 0.20 ^{ABa}	7.49 ± 0.02 ^{Aa}
Hypoxia + gradual re-oxygenation			
Low	72.22 ± 3.00 ^{Bb}	4.34 ± 0.15 ^{Ba}	7.54 ± 0.02 ^{Aab}
Med	107.22 ± 3.63 ^{Aa}	6.92 ± 0.36 ^{Aa}	7.48 ± 0.03 ^{Aa}
High	109.56 ± 3.99 ^{Ab}	3.82 ± 0.14 ^{Bb}	7.50 ± 0.02 ^{Aa}
Normoxia			
Low	75.11 ± 2.27 ^{Ab}	3.10 ± 0.19 ^{Ba}	7.59 ± 0.02 ^{Aa}
Med	65.22 ± 3.62 ^{Ab}	6.11 ± 0.09 ^{Aa}	7.34 ± 0.01 ^{Cb}
High	75.33 ± 4.30 ^{Ac}	3.61 ± 0.21 ^{Bb}	7.48 ± 0.02 ^{Ba}
12 h			
Hypoxia + rapid re-oxygenation			
Low	85.22 ± 4.70 ^{Aa}	4.46 ± 0.25 ^{Ba}	7.54 ± 0.02 ^{Aa}
Med	73.22 ± 2.10 ^{Aa}	6.74 ± 0.44 ^{Aa}	7.32 ± 0.01 ^{Ba}
High	86.38 ± 3.37 ^{Aa}	4.74 ± 0.28 ^{Ba}	7.57 ± 0.01 ^{Aa}
Hypoxia + gradual re-oxygenation			
Low	73.00 ± 2.74 ^{Aab}	4.22 ± 0.29 ^{Bab}	7.53 ± 0.01 ^{Aa}
Med	66.33 ± 3.65 ^{Aa}	6.44 ± 0.42 ^{Aa}	7.35 ± 0.02 ^{Ba}
High	78.67 ± 4.28 ^{Aab}	3.76 ± 0.07 ^{Ba}	7.59 ± 0.02 ^{Aa}
Normoxia			
Low	69.22 ± 2.44 ^{Ab}	3.01 ± 0.18 ^{Bb}	7.59 ± 0.01 ^{Aa}
Med	69.67 ± 2.55 ^{Aa}	6.41 ± 0.30 ^{Aa}	7.36 ± 0.02 ^{Ba}
High	68.11 ± 2.47 ^{Ab}	4.11 ± 0.17 ^{Ba}	7.54 ± 0.02 ^{Aa}

3 Data are presented as the mean ± SEM (n = 9 fish per treatment).
4 Different uppercase letters indicate statistically significant differences
5 between temperature at the same re-oxygenation rate or normoxia ($p <$
6 0.05). Different lowercase letters indicate statistically significant
7 differences between re-oxygenation rate or normoxia at the same
8 temperature ($p <$ 0.05).

1 **Table 3**

2

Variables						
Temp (°C)	Hct (%)	Hb (g dL ⁻¹)	Ery (10 ⁶ µL ⁻¹)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g dL ⁻¹)
1 h						
Hypoxia + rapid re-oxygenation						
Low	30.00 ± 0.53 ^{Ba}	6.87 ± 0.09 ^{Bb}	1.70 ± 0.07 ^{Ba}	179.02 ± 9.39 ^{Aa}	40.94 ± 1.92 ^{Ba}	22.74 ± 0.79 ^{Aa}
Med	35.22 ± 1.14 ^{Aa}	8.89 ± 0.10 ^{Aa}	2.07 ± 0.08 ^{Aa}	172.00 ± 7.67 ^{Aa}	43.43 ± 1.47 ^{ABa}	25.38 ± 0.90 ^{Ab}
High	33.22 ± 0.78 ^{ABa}	8.63 ± 0.14 ^{Aa}	1.76 ± 0.06 ^{Ba}	190.41 ± 6.16 ^{Aa}	49.56 ± 1.83 ^{Aa}	26.28 ± 0.76 ^{Aa}
Hypoxia + gradual re-oxygenation						
Low	29.89 ± 0.91 ^{Aa}	7.65 ± 0.17 ^{Ba}	1.71 ± 0.07 ^{Aa}	177.28 ± 9.69 ^{Aa}	45.36 ± 2.24 ^{Aa}	25.34 ± 0.90 ^{Ba}
Med	32.33 ± 0.82 ^{Aab}	8.38 ± 0.10 ^{Aa}	1.74 ± 0.02 ^{Ab}	185.91 ± 5.49 ^{Aa}	48.16 ± 0.90 ^{Aa}	25.24 ± 0.68 ^{Bb}
High	30.11 ± 0.90 ^{Aab}	8.53 ± 0.21 ^{Aa}	1.71 ± 0.06 ^{Aa}	178.71 ± 10.19 ^{Aa}	50.48 ± 2.24 ^{Aa}	28.33 ± 1.08 ^{Aa}
Normoxia						
Low	27.11 ± 0.77 ^{Aa}	6.95 ± 0.24 ^{Bab}	1.62 ± 0.04 ^{Aa}	168.91 ± 8.14 ^{Aa}	43.08 ± 1.76 ^{Aa}	25.89 ± 1.14 ^{Ba}
Med	28.78 ± 1.14 ^{Ab}	8.56 ± 0.13 ^{Aa}	1.69 ± 0.04 ^{Ab}	170.86 ± 7.10 ^{Aa}	50.88 ± 1.40 ^{Aa}	29.22 ± 0.87 ^{Aa}
High	27.00 ± 0.87 ^{Ab}	8.21 ± 0.18 ^{Aa}	1.64 ± 0.05 ^{Aa}	164.25 ± 3.45 ^{Aa}	49.90 ± 1.78 ^{Aa}	28.24 ± 1.58 ^{Aa}
3 h						
Hypoxia + rapid re-oxygenation						
Low	30.67 ± 1.15 ^{Ba}	7.17 ± 0.12 ^{Ba}	1.63 ± 0.03 ^{Ba}	188.25 ± 7.30 ^{Aa}	44.08 ± 1.17 ^{Aa}	23.61 ± 0.87 ^{Aa}
Med	35.33 ± 1.08 ^{Aa}	8.90 ± 0.17 ^{Aa}	2.03 ± 0.04 ^{Aa}	175.00 ± 8.07 ^{Aa}	43.82 ± 0.71 ^{Ab}	25.45 ± 1.16 ^{Aa}
High	33.00 ± 0.83 ^{ABa}	8.48 ± 0.16 ^{Aa}	1.72 ± 0.05 ^{Ba}	192.81 ± 6.46 ^{Aa}	49.55 ± 1.60 ^{Aa}	25.85 ± 0.95 ^{Aa}
Hypoxia + gradual re-oxygenation						
Low	30.33 ± 0.64 ^{Aa}	7.41 ± 0.12 ^{Ba}	1.54 ± 0.04 ^{Aa}	197.56 ± 5.27 ^{Aa}	48.40 ± 1.77 ^{Aa}	24.52 ± 0.67 ^{Aa}
Med	33.33 ± 0.78 ^{Aab}	8.75 ± 0.14 ^{Aab}	1.70 ± 0.06 ^{Ab}	199.76 ± 12.36 ^{Aa}	52.31 ± 2.74 ^{Aa}	26.36 ± 0.67 ^{Aa}
High	30.33 ± 0.85 ^{Aab}	8.30 ± 0.17 ^{Aa}	1.69 ± 0.04 ^{Aa}	181.29 ± 6.83 ^{Aa}	49.48 ± 1.72 ^{Aa}	27.39 ± 0.74 ^{Aa}
Normoxia						
Low	27.00 ± 0.76 ^{Aa}	7.11 ± 0.11 ^{Ba}	1.42 ± 0.03 ^{Aa}	190.29 ± 6.50 ^{Aa}	50.16 ± 1.32 ^{Aa}	26.46 ± 0.63 ^{Aa}
Med	29.44 ± 0.80 ^{Ab}	8.20 ± 0.13 ^{Ab}	1.60 ± 0.04 ^{Ab}	185.90 ± 8.68 ^{Aa}	51.75 ± 2.31 ^{Aa}	28.01 ± 0.87 ^{Aa}
High	28.56 ± 0.87 ^{Ab}	8.19 ± 0.10 ^{Aa}	1.45 ± 0.05 ^{Aa}	197.87 ± 6.70 ^{Aa}	56.83 ± 1.63 ^{Aa}	28.83 ± 0.69 ^{Aa}
12 h						
Hypoxia + rapid re-oxygenation						
Low	28.89 ± 0.93 ^{Ba}	7.46 ± 0.14 ^{Ba}	1.59 ± 0.05 ^{Aa}	181.23 ± 5.68 ^{Aa}	47.24 ± 1.32 ^{Aa}	26.11 ± 1.18 ^{Aa}
Med	31.44 ± 0.69 ^{ABa}	8.42 ± 0.13 ^{Aab}	1.68 ± 0.06 ^{Aa}	188.09 ± 5.54 ^{Aa}	50.56 ± 1.90 ^{Aa}	26.94 ± 0.92 ^{Aa}
High	33.11 ± 0.89 ^{Aa}	7.91 ± 0.18 ^{ABb}	1.65 ± 0.06 ^{Aa}	201.25 ± 8.46 ^{Aa}	48.39 ± 1.87 ^{Aa}	23.98 ± 0.59 ^{Aa}
Hypoxia + gradual re-oxygenation						
Low	28.44 ± 0.50 ^{Ba}	7.56 ± 0.10 ^{Ba}	1.51 ± 0.02 ^{Ba}	190.54 ± 4.55 ^{ABa}	50.26 ± 1.26 ^{Aa}	26.65 ± 0.65 ^{Aa}
Med	31.11 ± 1.05 ^{ABa}	8.91 ± 0.16 ^{Aa}	1.80 ± 0.06 ^{Aa}	174.52 ± 9.11 ^{Ba}	49.80 ± 1.56 ^{Aa}	28.87 ± 1.07 ^{Aa}
High	32.78 ± 0.49 ^{Aa}	8.24 ± 0.22 ^{ABab}	1.57 ± 0.05 ^{Ba}	210.56 ± 7.74 ^{Aa}	52.96 ± 2.24 ^{Aa}	25.18 ± 0.69 ^{Aa}
Normoxia						
Low	26.56 ± 0.90 ^{Ba}	7.43 ± 0.09 ^{Ba}	1.52 ± 0.04 ^{Aa}	176.05 ± 8.35 ^{Aa}	49.18 ± 1.39 ^{Aa}	28.23 ± 0.95 ^{Aa}
Med	28.89 ± 0.90 ^{Ba}	8.19 ± 0.15 ^{Ab}	1.67 ± 0.05 ^{Aa}	174.08 ± 5.65 ^{Aa}	49.40 ± 1.25 ^{Aa}	28.48 ± 0.58 ^{Aa}
High	34.11 ± 0.95 ^{Aa}	8.64 ± 0.15 ^{Aa}	1.70 ± 0.04 ^{Aa}	200.47 ± 5.16 ^{Aa}	51.08 ± 1.98 ^{Aa}	25.52 ± 0.94 ^{Aa}

3 Hct = Haematocrit; Hb = Haemoglobin; Ery = Erythrocytes; MCV = Mean Corpuscular Volume; MCH = Mean
4 Corpuscular Haemoglobin and; MCHC = Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration. Data are presented as the
5 mean ± SEM (n = 9 fish per treatment). Different uppercase letters indicate statistically significant differences between
6 temperature at the same re-oxygenation rate or normoxia ($p < 0.05$). Different lowercase letters indicate statistically
7 significant differences between re-oxygenation rate or normoxia at the same temperature ($p < 0.05$).

8

1 **Capítulo III**

2

3 **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) é hipóxia tolerante e realiza ajustes antioxidantes**
4 **após reoxigenação rápida em temperatura baixa**

5 Lilian F Nitz¹, Lucas Pellegrin¹, Daniel Sá Britto Pinto¹, Jose Maria Monserrat^{2,3},

6 Luciano Garcia^{1*}

7

8 ¹Laboratório de Aquacultura Continental, Instituto de Oceanografia, Universidade
9 Federal do Rio Grande - FURG, RS, Brasil

10 ²Laboratório de Bioquímica Funcional de Organismos Aquáticos (BIFOA), Instituto de
11 Oceanografia (IO), Universidade Federal do Rio Grande - FURG, Rio Grande, RS,
12 Brasil.

13 ³Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande - FURG,
14 Rio Grande, RS, Brasil.

15

16

17

18

19 *Autor correspondente: Laboratório de Aquacultura Continental, Universidade Federal
20 do Rio Grande – FURG, 96203-900, Rio Grande, RS, Brasil. Fone: 55 99814706; E-
21 mail: garcia¬_log@hotmail.com

1 **Resumo**

2 O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da interação de diferentes temperaturas e
3 velocidades de reoxigenação nos parâmetros de defesa antioxidante e estresse oxidativo
4 em juvenis de pacu. Os animais foram expostos a 12 h de hipóxia ($\sim 2,0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) com
5 posterior reoxigenação rápida ou gradual (com retorno a níveis normóxicos em 0,5 ou 5
6 h, respectivamente) em interação com três diferentes temperaturas (~ 18 ; ~ 23 e ~ 28 °C).
7 Para cada temperatura também foi estabelecido um grupo controle em normoxia ($\geq 7,0$
8 $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), que não foi submetido nem à hipóxia, nem à reoxigenação, totalizando 9
9 tratamentos (em triplicata). Após 1 e 12 h do final do período de reoxigenação foram
10 coletados tecidos (brânquias e fígado) para determinação da capacidade antioxidante
11 total contra radicais peroxil (ACAP), peroxidação lipídica (LPO) e conteúdo de tiois
12 proteicos (PSH). Os resultados mostraram alterações transitórias na ACAP em ambos os
13 órgãos, com menores níveis em 18 e 28 °C nos tempos 1 e 12 h após a reoxigenação,
14 respectivamente. As melhores condições para redução da LPO nas brânquias foram
15 observadas em 18 °C após rápida reoxigenação e em 23 °C após reoxigenação gradual.
16 No fígado, a temperatura de 23 °C desencadeou maiores níveis de LPO. Em geral, o
17 conteúdo de PSH apresentou mais alterações em 1 h que em 12 h após a reoxigenação e
18 foi menor em 18 °C e maior em 23 °C. Em conclusão, pacu é hipóxia tolerante e pode
19 lidar bem com uma rápida reoxigenação se os exemplares forem mantidos em 18 °C.
20 Além disso, os ajustes do sistema antioxidante foram suficientes para a retomada parcial
21 da homeostase 12 h após a reoxigenação.

22

23 **Palavras chave:** hipóxia, estresse oxidativo, peroxidação lipídica, reoxigenação,
24 temperatura.

1 **1. Introdução**

2

3 O oxigênio é considerado o principal fator limitante para organismos aeróbicos
4 (terrestres ou aquáticos) devido ao seu papel na liberação de energia das mitocôndrias
5 para os tecidos (Sena & Chandel 2012; Chen et al., 2017). A par disso, os organismos
6 precisam lidar com seus efeitos nocivos, como um aumento na concentração de espécies
7 reativas de oxigênio (ERO) devido a um desbalanço entre pró-oxidantes e antioxidantes,
8 resultando em estresse oxidativo nas macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídeos
9 (Lushchak, 2011; Halliwell & Gutteridge, 2015).

10 A concentração de oxigênio dissolvido (OD) é dependente de alguns fatores
11 como fotossíntese, respiração dos organismos e difusão de oxigênio atmosférico
12 (Abdel-Tawwab et al., 2019). Na água, a solubilidade do oxigênio é menor que na
13 atmosfera (Tripathy, 2016), e ela é reduzida quando a temperatura da água aumenta, ao
14 mesmo tempo em que a demanda metabólica de oxigênio também aumenta (Campos et
15 al., 2017). Portanto, outra possível consequência da elevação da temperatura da água
16 relacionada a um aumento no consumo de oxigênio é um aumento do fluxo de elétrons
17 da cadeia respiratória e, conseqüentemente, uma maior produção de ERO (Halliwell &
18 Gutteridge, 2015; Nitz et al., 2020a). Em adição, uma redução da temperatura da água
19 também pode ter implicações no aumento do estresse oxidativo, devido à redução da
20 atividade enzimática e da fluidez das membranas (Tattersall et al., 2012) que podem
21 elevar os níveis de peroxidação lipídica (LPO) (Rossi et al., 2017).

22 Organismos aquáticos estão mais vulneráveis a variações naturais diárias ou
23 sazonais de OD (Riffel et al., 2012). Períodos de flutuações mais extremas de oxigênio,
24 denominados hipóxia, podem ser frequentes e causarem efeitos negativos no

1 comportamento, fisiologia, imunologia e crescimento. Em peixes, as concentrações
2 ideais de oxigênio variam não apenas conforme a espécie, mas também se as mesmas
3 apresentam alguma adaptação à hipóxia (Toni et al., 2017). As adaptações à hipóxia são
4 variadas e ocorrem em diferentes níveis de organização. Adicionalmente, a tolerância a
5 períodos prolongados de hipóxia pode requerer dos peixes capacidade de redução da
6 taxa metabólica, tolerância a subprodutos metabólicos e, principalmente capacidade de
7 evitar/reparar lesões celulares causadas pelo período que sucede a hipóxia, conhecida
8 como período de reoxigenação (Bickler et al., 2007; Xiao, 2015). Neste sentido,
9 evidências de que a hipóxia causa a ativação do sistema antioxidante e pode induzir o
10 estresse oxidativo pela formação excessiva de ERO, já foi amplamente mostrada em
11 estudos prévios em peixes (Lushchak & Bagnyukova, 2007; Chandel, 2010; Mustafa et
12 al., 2011; Huang et al., 2015; Nitz et al., 2020a).

13 Outro momento crucial que exige ajustes para o equilíbrio metabólico nos peixes
14 é quando ocorre a reoxigenação da água, a qual pode desencadear um vazamento
15 intenso de elétrons acumulados na cadeia transportadora durante o período de hipóxia,
16 ocasionando assim uma superprodução de ERO (Ruuge et al., 1991). A peroxidação
17 lipídica é um dos processos mais comuns de lesão celular. Inicia com ataque de ERO a
18 ácidos graxos insaturados e poli-insaturados (PUFAs) gerando uma reação em cadeia,
19 causando lesões graves às membranas plasmáticas com perda da integridade e função
20 (Madeira et al., 2013).

21 Lushchak et al. (2001) foram os primeiros a demonstrar os efeitos da
22 reoxigenação nos parâmetros de estresse oxidativo em peixes, reportando um aumento
23 nos níveis de LPO no fígado e cérebro de goldfish (*Carassius auratus*), respectivamente
24 1 e 14 h após a reoxigenação. Zhang et al. (2016) demonstram aumento da LPO após a

1 reoxigenação no fígado e cérebro de darkbarbel catfish (*Pelteobagrus vachelli*) expostos
2 à hipóxia durante 1,5; 4 e 6,5 h seguida da reoxigenação rápida (20-30 min).

3 Alterações causadas individualmente como temperatura e variações nos níveis
4 de OD já foram demonstradas em várias espécies (Lushchak & Bagnyukova 2006;
5 Boltaña et al., 2017; Islam et al., 2019; Welker et al., 2012; Chen et al., 2017; Copatti et
6 al., 2019b). Portanto, a interação destes fatores pode desencadear respostas diferentes,
7 com interações aditivas, sinérgicas e/ou antagônicas (Maher et al., 2019), podendo gerar
8 uma situação de estresse com sérios prejuízos a saúde dos peixes (McBryan et al.,
9 2013).

10 O pacu (*Piaractus mesopotamicus*), nativo das Bacias dos rios Paraná e Paraguai
11 (América do Sul), é considerado um peixe tolerante à hipóxia, que habita
12 principalmente regiões subtropicais do Brasil e de outros países da América do Sul,
13 sendo exposto a baixas temperaturas no inverno (abaixo de 15 °C) e a altas temperaturas
14 no verão (acima de 30 °C) (Garcia et al., 2008; Nitz et al., 2020a, b). Nestas regiões ele
15 tem alta aceitação pelo mercado consumidor, sendo seu cultivo altamente valorizado em
16 sistemas aquícolas (Aguilar et al., 2017; Copatti et al., 2019a), onde é frequentemente
17 exposto a condições de altas densidades de estocagem, as quais podem tornar o
18 ambiente suscetível à hipóxia (Bittencourt et al., 2010).

19 O objetivo do corrente estudo foi avaliar respostas de estresse oxidativo em
20 juvenis de pacu após 12 h de hipóxia ($\sim 2,0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) e submetidos a reoxigenação
21 rápida (0,5 h) ou gradual (5 h) em interação com três diferentes temperaturas (~ 18 , ~ 23
22 e ~ 28 °C). Nossa hipótese é que o pacu, por ser tolerante à hipóxia e à reoxigenação,
23 pode suportar uma rápida reintrodução de OD se mantido em temperatura baixa (18 °C),

1 o que propiciaria uma condição menos oxidante (com menor geração de ERO ou uma
2 redução das defesas antioxidantes).

3

4 **2. Material e Métodos**

5

6 **2.1 Ética animal**

7 O presente estudo foi aprovado pelo comitê de Experimentação Animal da
8 Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil (FURG), processo número
9 P049/2017.

10

11 **2.2 Peixes e condições experimentais**

12 Foram utilizados 162 juvenis de pacu ($61,7 \pm 9,1$ g; $13,6 \pm 0,63$ cm) adquiridos
13 de uma piscicultura comercial em Ajuricaba, RS, Brasil. Os peixes foram mantidos em
14 sistemas de recirculação com filtro mecânico e biológico em tanques de 250 L até a
15 realização do experimento. Durante este período e também durante o processo de
16 aclimação às diferentes temperaturas, os peixes foram alimentados com dieta
17 comercial extrusada (32% PB, Supra Acqua Line®, São Leopoldo, RS, Brasil) até
18 saciedade aparente duas vezes ao dia (9:00 e 16:00 h). Durante o período experimental,
19 bem como 24 h antes do início do experimento, os peixes foram mantidos em jejum.

20 Previamente ao início do experimento, os peixes foram aclimatados a cada uma
21 das temperaturas a serem testadas por um período de 30 dias em sistemas de
22 recirculação com unidades experimentais de 80 L de volume útil. Para manutenção da
23 temperatura foram utilizados “chiller” com termostato Gelaqua 1/3HP (18 °C),
24 condicionadores de ar (23 °C) e aquecedores com termostato (28 °C).

1 Para a realização do experimento, os animais foram expostos por um período de
2 12 h de hipóxia ($2,02 \pm 0,06 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Após, os peixes foram submetidos a
3 reoxigenação (com retorno a níveis normóxicos de $\sim 7,0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) rápida (0,5 h) ou
4 gradual (5 h) em três diferentes temperaturas ($18,05 \pm 0,09$, $23,10 \pm 0,23$ ou $27,80 \pm$
5 $0,20 \text{ }^\circ\text{C}$). Além disso, um grupo controle mantido em normoxia ($\geq 7,0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$), sem
6 exposição à hipóxia ou à reoxigenação foi exposto as mesmas temperaturas. Os níveis
7 específicos de OD foram escolhidos por serem valores normais (normóxia) ou subletais
8 (em hipóxia) encontrados no sul da Brasil (Copatti et al., 2019b), uma vez que pacu é
9 um peixe tolerante à hipóxia. O tempo de 12 h de hipóxia e as taxas de reoxigenação
10 foram escolhidas de acordo com Nitz et al. (2020b). Ao total, foram 9 tratamentos
11 randomizados em triplicata ($n = 18$ peixes por tratamento).

12 A manutenção dos níveis de OD em normóxia foi realizada com auxílio de um
13 compressor radial (1 HP), que supriu cada unidade experimental individualmente
14 através de um sistema de aeração. A redução dos níveis de OD até o nível de hipóxia foi
15 realizada pela injeção de nitrogênio puro através de difusores individuais em cada caixa.
16 Antes de iniciar a injeção de nitrogênio, o sistema de aeração foi desligado. Foi
17 reduzido $\pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ de OD a cada 30 min. Após 2 h do início da injeção de nitrogênio
18 puro, foi alcançado o nível desejado de hipóxia ($2,0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) para o início do
19 experimento, o qual teve duração de 12 h. Assim que os níveis de hipóxia dos
20 tratamentos foram alcançados, a mensuração do OD para manutenção no nível de
21 hipóxia estabelecido foi realizada por meio de monitoramento constante (a cada 30 min)
22 com auxílio de um oxímetro (YSI 5908).

23 Após o período de hipóxia (12 h), procedeu-se a reoxigenação rápida (0,5 h) ou
24 gradual (5 h) até alcançar a condição de normóxia ($\text{OD} \sim 7,0 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$) através do

1 controle dos difusores de ar. Na reoxigenação abrupta, os níveis de OD retornaram à
2 normóxia após 0,5 h. Na reoxigenação gradual, os níveis de OD foram aumentados
3 gradualmente em 1 mg L⁻¹ a cada 1 h durante 5 h. A saturação de oxigênio foi medida
4 continuamente com oxímetro (YSI 5908).

5 Devido aos diferentes tempos necessários para a reoxigenação (rápida ou
6 gradual), bem como a existência de um grupo controle não submetido à hipóxia ou à
7 reoxigenação, o planejamento experimental foi adequado para que a coleta dos tecidos
8 ocorresse simultaneamente em todos os tratamentos.

9

10 **2.3 Qualidade da água**

11 Os parâmetros de qualidade da água foram mantidos durante a aclimatação e o
12 período experimental para pH ($7,5 \pm 0,01$ pH meter HANNA HI 8424), temperatura
13 ($26,01 \pm 0,4$ °C), OD ($6,58 \pm 0,5$ mg O₂ L⁻¹; oxímetro YSI 5908), nitrito ($0,07 \pm 0,02$
14 mg N-NO₂ L⁻¹; Boyd e Tucker, 2014), amônia total ($0,15 \pm 0,05$ mg N-NH₃ L⁻¹;
15 UNESCO, 1983), alcalinidade e dureza total ($135 \pm 12,3$ e $50 \pm 0,03$ mg CaCO₃ L⁻¹,
16 respectivamente; Eaton et al., 2005). Exceções foram consideradas quando a
17 temperatura e os níveis de OD foram alterados para atender aos tratamentos propostos.
18 O fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro.

19

20 **2.4 Coleta de tecidos**

21 A coleta de tecidos (brânquias e fígado) foi feita em 1 e 12 h após o término da
22 reoxigenação (Nitz et al., 2020b). Antes da coleta de tecidos, os animais foram
23 eutanizados com concentração letal de hidrocloreto de benzocaína (500 ppm). As
24 amostras de tecido (9 peixes/tratamento/hora) foram coletadas com auxílio de pinças e

1 tesouras, sendo posteriormente armazenadas em microtubos de 2 mL, congeladas em
2 nitrogênio líquido e mantidas em um ultrafreezer (-80 °C) até o momento da realização
3 das análises dos parâmetros de estresse oxidativo.

4

5 **2.5 Análises de defesa antioxidante e estresse oxidativo**

6 As amostras foram homogeneizadas (1:5, m/v) em tampão (pH ajustado em
7 7,75) contendo Tris-HCl (100 mM), EDTA (2 mM) e Mg^{2+} (5 mM) (Da Rocha et al.,
8 2009). O sobrenadante resultante da centrifugação dos homogeneizados (10000 x g, 20
9 min, 4 °C) foram utilizadas para as análises.

10 A concentração de proteínas totais dos homogeneizados foi determinada em
11 leitor de microplacas (BioTek LX 800, Wisconsin, USA) pelo método de Biureto (550
12 nm) utilizando kit comercial (Doles[®], Goiânia, GO, Brasil). Após este procedimento, os
13 homogeneizados foram utilizados para as determinações dos parâmetros de estresse
14 oxidativo. A capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) foi
15 determinada de acordo com Amado et al. (2009), onde de acordo com esta técnica
16 quanto menor a área relativa maior a ACAP e vice-versa. Os níveis de LPO foram
17 determinados pela técnica de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)
18 (Oakes & Van Der Kraak, 2003) e o conteúdo de tiois proteicos (PSH) baseou-se no
19 método de Sedlak & Lindsay (1968).

20

21 **2.6 Análise estatística**

22 Todos os resultados são expressos como média \pm erro padrão. A homogeneidade
23 das variâncias e a normalidade dos dados foram previamente testadas pelos testes de
24 Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Uma vez que os pressupostos foram

1 atendidos, os dados foram submetidos à ANOVA de duas vias (temperatura x OD ou
2 reoxigenação) dentro de cada tempo de coleta. Havendo diferença significativa, foi
3 aplicado um teste post-hoc de Tukey. Todas as análises foram realizadas com um nível
4 mínimo de significância de 5%.

5

6 **3. Resultados**

7

8 Não ocorreu mortalidade durante o período de aclimatação ou durante o período
9 experimental.

10

11 **3.1 Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)**

12 Nas brânquias, 1 h após a reoxigenação, em todos os tratamentos, os níveis de
13 ACAP foram significativamente menores (maior área relativa) em 18 °C quando
14 comparado a outras temperaturas (exceto em 28 °C e reoxigenação gradual) ($p < 0,05$).
15 Além disso, os níveis de ACAP foram significativamente menores em 28 °C que em 23
16 °C na reoxigenação abrupta ($p < 0,05$) (Fig. 1a).

17 Neste mesmo tecido (brânquias), 12 h após a reoxigenação, verificou-se no
18 grupo controle e no grupo submetido à reoxigenação abrupta (0,5 h) que os níveis de
19 ACAP foram significativamente menores (maior área relativa) em 28 °C em
20 comparação com 23 e 18 °C e em 23 °C em comparação com 18 °C ($p < 0,05$). Em
21 adição, em 28 °C os níveis de ACAP foram significativamente menores na
22 reoxigenação abrupta que na reoxigenação gradual ($p < 0,05$) (Fig. 1b).

23 No fígado, 1 h após a reoxigenação, houve um aumento significativo dos níveis
24 de ACAP (menor área relativa) para reoxigenação gradual e abrupta, nesta ordem,

1 quando comparados ao grupo controle em 18 °C ($p < 0,05$). Em adição, os níveis de
2 ACAP foram significativamente maiores em 23 °C do que em 28 e 18 °C e em 28 °C
3 em comparação com 18 °C, tanto no grupo controle, quanto para reoxigenação abrupta
4 (0,5 h) ($p < 0,05$). Além disso, na reoxigenação gradual (5 h), os níveis de ACAP foram
5 significativamente menores em 28 que em 18 °C ($p < 0,05$) (Fig. 1c).

6 No fígado, 12 h após a reoxigenação, os níveis de ACAP foram
7 significativamente maiores (menor área relativa) na reoxigenação abrupta em
8 comparação com os demais tratamentos em 28 °C ($p < 0,05$). Neste mesmo tempo (12
9 h), em todos os tratamentos, os níveis de ACAP foram significativamente menores em
10 28 °C que nas demais temperaturas ($p < 0,05$) (Fig. 1d).

11

12 **3.2 Peroxidação lipídica (LPO)**

13 Nas brânquias, 1 h após a recuperação, os níveis de LPO foram
14 significativamente menores na interação reoxigenação abrupta (0,5 h) e 18 °C do que
15 em outros tratamentos mantidos na mesma temperatura ou no mesmo tratamento em 23
16 e 28 °C ($p < 0,05$). Os peixes mantidos em 23 °C apresentaram níveis de LPO
17 significativamente menores em relação tanto ao grupo controle em 18 °C, quanto na
18 reoxigenação gradual (5 h) em 28 °C ($p < 0,05$) (Fig. 2a).

19 Ainda em relação as brânquias, 12 h após a reoxigenação, em todos os
20 tratamentos, os níveis de LPO foram significativamente maiores em 28 °C do que em 18
21 °C ($p < 0,05$). Os níveis de LPO também foram significativamente maiores na interação
22 reoxigenação abrupta (0,5 h) e 23 °C que nas interações reoxigenação gradual (5 h) e 23
23 °C ou reoxigenação abrupta e 18 °C ($p < 0,05$) (Fig. 2b).

1 No fígado, 1 h após a recuperação, em 18 °C os níveis de LPO foram
2 significativamente maiores na seguinte ordem: reoxigenação gradual > reoxigenação
3 abrupta > grupo controle ($p < 0,05$). No grupo controle, os níveis de LPO foram
4 significativamente maiores em 23 °C que nas outras temperaturas ($p < 0,05$).
5 Adicionalmente, de forma geral, em 28 °C, os níveis de LPO foram significativamente
6 menores que nas demais temperaturas ($p < 0,05$) (Fig. 2c). Neste mesmo tecido, em 12 h
7 após a reoxigenação, em todos os tratamentos, os níveis de LPO foram
8 significativamente maiores em 23 °C que nas demais temperaturas ($p < 0,05$) (Fig. 2d).

9

10 **3.3 Conteúdo de tióis proteicos (PSH)**

11 Nas brânquias, 1 h após a recuperação, o conteúdo de PSH na reoxigenação
12 gradual foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle em 23 °C (p
13 $< 0,05$). Neste mesmo tempo (1 h), em todos os tratamentos, o conteúdo de PSH foi
14 significativamente menor em 18 °C que em 23 °C ($p < 0,05$). Adicionalmente, para o
15 grupo controle, o conteúdo de PSH foi significativamente maior em 28 °C que em 18 °C
16 ($p < 0,05$) (Fig. 3a). Em 12 h após a recuperação não foram encontradas diferenças
17 significativas no conteúdo de PSH nas brânquias ($p > 0,05$) (Fig. 3b).

18 No fígado, 1 h após a reoxigenação, o conteúdo de PSH na reoxigenação gradual
19 foi significativamente maior e menor que nos demais tratamentos nas temperaturas de
20 23 e 28 °C, respectivamente ($p < 0,05$). Ainda em relação à reoxigenação gradual, o
21 conteúdo de PSH foi significativamente maior em 23 °C que nas outras temperaturas (p
22 $< 0,05$). No mesmo tempo (1 h), o conteúdo de PSH no grupo controle foi
23 significativamente maior em 28 °C que em 18 °C ($p > 0,05$) (Fig. 3c).

1 Para o mesmo tecido (fígado), 12 h após a recuperação, o conteúdo de PSH foi
2 significativamente maior em 23 °C que em 28 °C ($p > 0,05$). Em adição, para a
3 reoxigenação abrupta (0,5 h), o conteúdo de PSH foi significativamente maior em 23 °C
4 que em 18 °C ($p > 0,05$) (Fig. 3d).

5

6 **4. Discussão**

7

8 Flutuações nos níveis de OD são comuns em ambientes naturais, assim como em
9 condições de cativeiro com altas densidades de estocagem de peixes (Copatti et al.,
10 2019b; Pontin et al., 2020). Para a sobrevivência nestas condições, muitas vezes os
11 organismos precisam apresentar capacidade de tolerância à hipóxia e à reoxigenação
12 (Nitz et al., 2020b). No presente estudo não houve mortalidade, demonstrando que pacu
13 é resistente não somente à hipóxia, mas também à reoxigenação, independentemente da
14 temperatura avaliada. Além disso, os parâmetros de estresse oxidativo demonstraram
15 que em condições de menor temperatura, os pacus lidam bem com uma rápida
16 reoxigenação, embora tais parâmetros possam demorar mais tempo (12 h) para se
17 estabilizarem, o que confirma a hipótese do nosso estudo.

18 O sistema de defesa antioxidante é composto por diferentes componentes
19 enzimáticos e não enzimáticos que atuam como agentes de desintoxicação dos radicais
20 peroxil , os quais representam o estado antioxidante geral do organismo (Amado et al.,
21 2009). No presente estudo, foram observadas alterações nos níveis de ACAP em ambas
22 as velocidades de reoxigenação e em condições térmicas diferentes.

23 Nas brânquias, 1 h após a reoxigenação, os níveis de ACAP se apresentaram
24 elevados nas duas maiores temperaturas (23 e 28 °C). Isto também foi verificado no

1 fígado (principalmente em 23 °C), contudo apenas para o grupo que sofreu rápida
2 recuperação (0,5 h). Levando em consideração que o estresse oxidativo ocorre logo
3 após os primeiros momentos da recuperação (Welker et al., 2013; Johannsson et al.,
4 2018), este seria um comportamento esperado do sistema de defesa antioxidante. Um
5 aumento da ACAP em temperaturas elevadas está relacionado a um ajuste fisiológico
6 gerado para interceptar uma maior produção de ERO (Lushchak 2011; Zebreal et al.,
7 2016). Portanto, isto era esperado, pois nos ectotérmicos a elevação da temperatura está
8 associada a um aumento da taxa metabólica e respiratória, podendo causar estresse
9 oxidativo nestes organismos (Bagnyukova et al., 2007; Madeira et al., 2013).

10 Além disso, a redução dos níveis de ACAP em 1 h após a reoxigenação pode ser
11 resultado do uso de componentes antioxidantes para conter o aumento da produção de
12 radicais livres em um cenário de hipóxia recente (Clanton, 2007). Este cenário parece
13 ter sido evitado no presente estudo tanto nas brânquias quanto no fígado sob condições
14 de temperatura intermediária (23 °C) e rápida recuperação (0,5 h), e no fígado dos
15 juvenis submetidos a 18 °C e que se sofreram uma recuperação gradual (5 h) após
16 hipóxia de 12 h. Similarmente, uma elevação nos níveis de ACAP em brânquias de pacu
17 expostos à hipóxia em 23 °C foi verificada por Nitz et al. (2020a).

18 Em adição, 12 h após a reoxigenação, os níveis de ACAP foram mais baixos em
19 28 °C (brânquias e fígado), embora a ACAP tenha apresentado comportamento distinto
20 neste tempo (12 h) nos órgãos avaliados. Enquanto para as brânquias notou-se uma
21 elevação dos níveis de ACAP na recuperação gradual frente a recuperação rápida, o
22 inverso ocorreu no fígado nesta temperatura (28 °C). Pode-se dizer que tais alterações
23 foram órgão específicas. Devido a distintas demandas metabólicas, os diferentes tecidos
24 apresentam tensões de oxigênio particulares (Johannsson et al., 2018) que podem

1 desencadear diferentes respostas oxidativas, onde um órgão pode compensar o aumento
2 do estresse oxidativo de outro órgão.

3 De maneira geral, a ACAP pode fornecer uma compreensão da resistência de
4 cada organismo frente à toxicidade causada pelas ERO (Amado et al., 2009). As ERO
5 têm um papel fundamental para a ativação do sistema de defesa e o sucesso de cada
6 espécie depende da sua capacidade de ativação de mecanismos que servirão de escudo
7 para lidar com o período de privação de OD e que sejam capazes de remover ERO de
8 maneira eficiente no período subsequente, quando o oxigênio é reintroduzido
9 (Onukwufor et al., 2016). No presente estudo, parece ter ocorrido uma recuperação dos
10 níveis de ACAP 12 h após a reoxigenação nos peixes mantidos em 18 °C, indicando que
11 as alterações de ACAP foram transitórias nesta temperatura.

12 No momento da reperusão, o sangue oxigenado inunda os órgãos e em paralelo
13 acontece um aumento na geração de ERO com indução da peroxidação lipídica,
14 oxidação de proteínas e danos ao DNA (Hermes-Lima & Zenteno-Savin, 2002).
15 Segundo Johannsson et al. (2018), a reoxigenação geralmente não acarreta novos danos
16 oxidativos em espécies tolerantes à hipóxia, como o pacu. No presente estudo, as
17 melhores condições para redução da LPO nas brânquias tanto em 1 h, quanto em 12 h
18 após a reoxigenação foram observadas em 18 °C para rápida recuperação e em 23 °C
19 para gradual recuperação. De forma geral, o aumento da temperatura causou elevação
20 da LPO, podendo causar danos oxidativos numa condição intermediária (23 °C) para
21 rápida recuperação. Contudo, se a recuperação for gradual, esta seria a melhor
22 temperatura, sendo que danos oxidativos nas brânquias estariam atrelados apenas à
23 temperatura mais alta (28 °C). Por outro lado, no fígado, a temperatura de 23 °C
24 apresentou maiores níveis de LPO nos diferentes tempos de recuperação avaliados (1 e

1 12 h). Lushchak et al. (2005) também observaram aumento do dano lipídico (TBARS)
2 no fígado de carpa comum (*Cyprinus carpio*) 14 h após a reoxigenação rápida (em até
3 30 min) em exemplares mantidos por 5,5 h em hipóxia.

4 Organismos ectotérmicos em baixas temperaturas desenvolvem estratégias para
5 a manutenção da fluidez das membranas biológicas com adaptação homeoviscosa e
6 ajustes como o aumento do grau de insaturação lipídica e o acúmulo de PUFA
7 (Bagnyukova et al., 2007). Porém essa maior concentração de PUFA implica em
8 maiores riscos de estresse oxidativo, visto que estes são alvos primários das ERO, que
9 agem removendo um próton do sistema de dupla ligação conjugada criando assim um
10 radical peroxil, que desencadeia o início das reações de peroxidação lipídica (Abele &
11 Puntarulo, 2004). Assim, uma peroxidação lipídica pode ter ocorrido no fígado de pacu
12 nas temperaturas mais baixas usadas neste estudo (principalmente 23 °C).
13 Diferentemente, em estudo prévio com *Cyphocharax abramoides*, uma espécie hipóxia
14 tolerante, não foi verificada alteração na LPO após 3 h de hipóxia independente da
15 velocidade de reoxigenação (Johannsson et al., 2018).

16 Além de ácidos graxos, proteínas também são afetadas pela superprodução de
17 ERO, resultando em carbonilação, agregação, fragmentação, modificação de
18 aminoácidos, alteração de carga elétrica e inativação de enzimas de membrana,
19 receptores e proteínas de transporte e oxidação dos grupos sulfidril (Lushchak, 2011;
20 Madeira et al., 2013). Embora a modificação de proteínas por radicais livres não seja tão
21 crítica como a peroxidação lipídica, isto poderia gerar perda das suas funções e
22 principalmente sua finalidade de comunicação intra e intercelular (Lushchak, 2007).

23 No corrente estudo, foi observada uma redução do conteúdo de PSH nas
24 brânquias de juvenis de pacu 1 h após o período de recuperação. Contudo, no tempo de

1 12 h após a reoxigenação, não foram verificadas alterações no conteúdo de PSH neste
2 tecido. No fígado, de forma geral, a temperatura intermediária (23 °C) elevou os valores
3 de PSH. Isto pode ter ocorrido porque numa situação de estresse podem ocorrer
4 alterações no conteúdo de tióis, numa tentativa de remover componentes deletérios que
5 prontamente são substituídos por um dissulfeto (ou pontes dissulfeto -SS-), por meio de
6 redução enzimática, sempre que possível como reação protetora das células (Dikinson
7 & Forman, 2002). Além disso, no presente estudo, na interação 23 °C e reoxigenação
8 gradual, os peixes desencadearam mecanismos de resposta protetora, conforme
9 evidenciado pelo aumento do conteúdo de tióis proteicos.

10 Em conclusão, o pacu confirmou sua capacidade de tolerar hipóxia e
11 reoxigenação. O pacu pode lidar bem com uma rápida reoxigenação se os exemplares
12 forem mantidos em 18 °C. De forma geral, após a hipóxia, os danos oxidativos foram
13 menores 12 h após a reoxigenação, o que sugere que os ajustes do sistema antioxidante
14 foram suficientes para a retomada da homeostase neste tempo (12 h).

15

16 **Agradecimentos**

17 Os autores agradecem o suporte financeiro da FAPERGS (Fundação de Amparo à
18 Pesquisa do Rio Grande do Sul- número 19/2551-0001890-8). Os autores agradecem ao
19 CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) pela
20 bolsa de pesquisa concedida a L. Garcia (processo número 311298 / 2017-6), e à
21 CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasil) pela
22 bolsa de pesquisa concedida a L.F. Nitz.

1 **Referências**

2

3 Abdel-Tawwab, M., Monier, M.N., Hoseinifar, S.H., Faggio, C. 2019. Fish response to
4 hypoxia stress: Growth, physiological, and immunological biomarkers. *Fish Physiology*
5 *Biochemistry*, 45:997–1013. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00614-9>.

6 Abele, D., Puntarulo, S. 2004. Formation of reactive species and induction of
7 antioxidant defence systems in polar and temperate marine invertebrates and fish.
8 *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 138: 405 – 415.
9 <https://doi:10.1016/j.cbpb.2004.05.013>.

10 Aguilar, F.A.A., Da Cruz, T.M.P. Mourão, G.B., Cyrino, J.E.P. 2017. Water
11 temperature, body mass and fasting heat production of pacu (*Piaractus mesopotamicus*).
12 *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 89(2): 1305-1312.
13 <https://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201720160639>.

14 Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., Zafalon, B., Ferreira, J.L.R.,
15 Yunes J.S., Monserrat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity
16 against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins
17 toxicity. *Science of the Total Environment*, 407: 2115–2123. [https:// doi:](https://doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.038)
18 [10.1016/j.scitotenv.2008.11.038](https://doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.038).

19 Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, K.B., Lushchak, V.I. 2007. Oxidative stress
20 and antioxidant defense responses by goldfish tissues to acute change of temperature
21 from 3 to 23 oC. *Journal of Thermal Biology*, 32: 227–234. [https://doi.org/10.1016/j.](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.004)
22 [jtherbio.2007.01.004](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2007.01.004).

- 1 Bickler, P. E., Buck, L.T. 2007. Hypoxia tolerance in reptiles, amphibians, and fishes:
2 life with variable oxygen availability. *Annual Review of Physiology*, 69:145–70.
3 <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.162529>.
- 4 Bittencourt, F., Feiden, A., Signor, A.A., Boscolo, W.R., Lorenz, E.K., Maluf, M.L.F.
5 2010. Densidade de estocagem e parâmetros eritrocitários de pacus criados em tanques-
6 rede. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 39: 2323–2329. [https://doi.org/10.1590/S1516-](https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001100002)
7 [35982010001100002](https://doi.org/10.1590/S1516-35982010001100002).
- 8 Boltaña, S., Sanhueza, N., Aguilar, A., Gallardo-Escarate, C., Arriagada, G., Valdes,
9 J.A., Soto, D., Quiñones, R.A. 2017. Influences of thermal environment on fish growth.
10 *Ecology and Evolution*, 7: 6814–6825. <https://doi.org/10.1002/ece3.3239>.
- 11 Boyd, C.E., Tucker, C.S. 2014. *Handbook for aquaculture water quality*. Auburn, AL:
12 Craftmaster Printers Inc.
- 13 Campos, D.F., Jesus, T.F., Kochhann, D., Heinrichs-Caldas, W., Coelho, M.M.,
14 Almeida-Val, V.M.F. 2017. Metabolic rate and thermal tolerance in two congeneri
15 Amazon fishes: *Paracheirodon axelrodi* Schultz, 195 and *Paracheirodon simulans*
16 Géry, 1963 (Characidae). *Hydrobiologia*, 789:133–142. [https://doi.org/10.1007/s10750-](https://doi.org/10.1007/s10750-016-2649-2)
17 [016-2649-2](https://doi.org/10.1007/s10750-016-2649-2).
- 18 Chandel, N.S. 2010. Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Advances in*
19 *Experimental Medicine and Biology*, 661: 339–354. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-500-2_22)
20 [500-2_22](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-500-2_22).
- 21 Chen, N., Wu, M., Tang, G.P., Wang, H.J., Huang, C.X., Wu, X.J., Wang, H.L. 2017.
22 Effects of acute hypoxia and reoxygenation on physiological and immune responses and

1 redox balance of Wuchang bream (*Megalobrama amblycephala* Yih, 1955). *Frontiers in*
2 *Physiology*, 8: 375. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00375>.

3 Clanton, T.L., 2007. Hypoxia-induced reactive oxygen species formation in skeletal
4 muscle. *Journal of Applied Physiology*, 102: 2379–2388.
5 <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01298.2006>.

6 Copatti, C.E., Baldisserotto, B., Souza, C.F., Garcia, L., 2019a. Protective effect of high
7 hardness in pacu juveniles (*Piaractus mesopotamicus*) under acidic or alkaline pH:
8 Biochemical and haematological variables. *Aquaculture*, 502: 250–257.
9 <http://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.12.028>.

10 Copatti, C.E., Bolner, K.C.S., Londero, E.P., De Rosso, F.L., Pavanato, M.A.,
11 Baldisserotto, B. 2019b. Low dissolved oxygen levels increase stress in piava
12 (*Megaleporinus obtusidens*): Iono-regulatory, metabolic and oxidative responses. *Anais*
13 *Da Academia Brasileira De Ciências*, 91: e20180395. [https://doi.org/10.1590/0001-](https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180395)
14 [3765201920180395](https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180395).

15 Da Rocha, A.M., Salomão De Freitas, D.P., Burns, M., Vieira, J.P., De La Torre, F.R.,
16 Monserrat, J.M. 2009. Seasonal and organ variations in antioxidant capacity,
17 detoxifying competence and oxidative damage in freshwater and estuarine fishes from
18 Southern Brazil. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, 150: 512–520.
19 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2009.07.012>.

20 Dickinson, D.A., Forman, H.J. 2002. Cellular glutathione and thiols metabolism.
21 *Biochemical Pharmacology*, 64: 1019-1026. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01172-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01172-3).

- 1 Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Rice, E.W., Greenberg, A.E. 2005. Standard methods for
2 the examination of water and wastewater. 21st ed. Washington, DC: APHA.
- 3 Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. 2015. Free radicals in biology and medicine, 5th edn.
4 Oxford: Clarendon Press.
- 5 Hermes-Lima, M., Zenteno-Savin, T. 2002. Animal response to drastic changes in
6 oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and*
7 *Physiology C*, 133: 537–556. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2002.00080-7>.
- 8 Huang, C.Y., Lin, H.C., Lin, C.H. 2015. Effects of hypoxia on ionic regulation,
9 glycogen utilization and antioxidative ability in the gills and liver of the aquatic air-
10 breathing fish *Trichogaster microlepis*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*,
11 179: 25–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2014.09.001>.
- 12 Islam, A., Uddin, H., Uddin, J., Shahjahan. 2019. Temperature changes influenced the
13 growth performance and physiological functions of Thai pangas *Pangasianodon*
14 *hypophthalmus*. *Aquaculture Reports*, 13: 100179.
15 <https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2019.100179>.
- 16 Johannsson, O.E., Giacomini, M., Henrique, H.S., Campos, D., Braz Mota, S.,
17 Heinrichs-Caldas, W., Val, A.L. 2018. Does hypoxia or different rates of re-
18 oxygenation after hypoxia induce an oxidative stress response in *Cyphocharax*
19 *abramoides* (Kner 1858), a Characid fish of the Rio Negro? *Comparative Biochemistry*
20 *and Physiology A*, 224: 53–67. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.05.019>.
- 21 Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M. 2001. Oxidative stress
22 and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and

1 reoxygenation. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 280: 100–107.
2 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2001.280.1.R100>.

3 Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Lushchak, O.V., Storey, J.M., Storey, K.B. 2005.
4 Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in
5 common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. The International Journal of Biochemistry &
6 Cell Biology 37: 1319–1330. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.01.006>.

7 Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. 2006. Temperature increase results in oxidative
8 stress in goldfish tissues. 2. Antioxidant and associated enzymes. Comparative
9 Biochemistry and Physiology C, 143: 36–41.
10 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.018>.

11 Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. 2007. Hypoxia induces oxidative stress in tissues of
12 a goby, the rotan *Perccottus glenii*. Comparative Biochemistry and Physiology B, 148:
13 390–397. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.07.007>.

14 Lushchak, V.I. 2007. Free Radical Oxidation of Proteins and Its Relationship with
15 Functional State of Organisms. Biochemistry, 72(8): 809–827.
16 <https://doi.org/10.1134/S0006297907080020>.

17 Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.
18 Aquatic Toxicology, 101: 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>.

19 Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., Vinagre, C., Diniz, M.S. 2013. Influence of
20 temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. Comparative
21 Biochemistry and Physiology A, 166: 237–243.
22 <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.008>.

1 Maher, R.L., Rice, M.M., McMinds, R., Burkepille, D., Thurber, R.V. 2019. Multiple
2 stressors interact primarily through antagonism to drive changes in the coral
3 microbiome. *Scientific Reports*, 9: 6834. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43274-8>.

4 Maltez, L.C., Barbas, L.A.L., Nitz, L.F., Lucas Pellegrin, L., Okamoto, M.H., Sampaio,
5 L.A., Monserrat, J.M., Garcia, L. 2018. Oxidative stress and antioxidant responses in
6 juvenile Brazilian flounder *Paralichthys orbignyanus* exposed to sublethal levels of
7 nitrite. *Fish Physiology and Biochemistry*, 44: 1349–1362.
8 <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0526-9>.

9 McBryan, T.L., Anttila, K., Healy, T.M., Schulte, P.M. 2013. Responses to temperature
10 and hypoxia as interacting stressors in fish: implications for adaptation to environmental
11 change. *Integrative and Comparative Biology*, 53: 648–659. [https://doi.org/10.1093/](https://doi.org/10.1093/icb/ict066)
12 [icb/ict066](https://doi.org/10.1093/icb/ict066).

13 Mustafa, S.A., Al-Subiai, S.N., Davies, S.J., Jha, A.N. 2011. Hypoxia-induced oxidative
14 DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in
15 common carp, *Cyprinus carpio* L. *Ecotoxicology*, 20: 1455–1466. [https://doi.org/](https://doi.org/10.1007/s10646-011-0702-5)
16 [10.1007/s10646-011-0702-5](https://doi.org/10.1007/s10646-011-0702-5).

17 Nitz, L.F., Pellegrin, L., Maltez, L.C., Pinto, D., Sampaio, L.A., Monserrat, J.M.,
18 Garcia, L. 2020a. Temperature and hypoxia on oxidative stress responses in pacu
19 *Piaractus mesopotamicus*. *Journal of Thermal Biology*, 92: 102682.
20 <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102682>.

21 Nitz, L.F., Lucas Pellegrin, L., Pinto, D.S.B., Maltez, L.C., Copatti, C.E., Garcia, L.
22 2020b. Secondary stress responses to hypoxia and re-oxygenation at different

1 temperatures in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juveniles. *Aquaculture Research*, 51:
2 4471–4481. <https://doi.org/10.1111/are.14792>.

3 Oakes, K.D., Van Der Kraak, G.J. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting
4 oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp
5 mill effluent. *Aquatic Toxicology*, 63: 447-463. [https://doi: 10.1016/s0166-445x](https://doi:10.1016/s0166-445x)
6 (02)00204-7.

7 Onukwufor, J.O., Kibenge, F., Stevens, D., Kamunde, C. 2016. Hypoxia-reoxygenation
8 differentially alters the thermal sensitivity of complex I basal and maximal
9 mitochondrial oxidative capacity. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, 201:
10 87–94. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.033>.

11 Pontin, M.C.F., Nordi, W.M.N., Pampolini, J., Machado-Neto, R., Moretti, D.B. 2020.
12 Protective effect of nutraceutical food on the intestinal mucosa of juvenile pacu
13 *Piaractus mesopotamicus* under high stocking density. *Aquaculture International*,
14 28:1981–1995.

15 Riffel, A.P.K., Garcia, L.O., Finamor, I.A., Saccol, E.M.H., Meira, M., Kolberg, C.,
16 Horst, A., Partata, W., Llesuy, S., Baldisserotto, B., Pavanato, M.A. 2012. Redox
17 profile in liver of *Leporinus macrocephalus* exposed to different dissolved oxygen
18 levels. *Fish Physiology Biochemistry*, 38: 797–805. <https://doi.org/10.1007/s10695->
19 011-9563-3.

20 Rossi, A., Bacchetta, C., Cazenave, J. 2017. Effect of thermal stress on metabolic and
21 oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae).
22 *Ecological Indicators*, 79: 361–370. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.042>.

1 Ruuge, E.K., Ledenev, A.N., Lakomkin, V.L., Konstantinov, A.A., Ksenzenko, M.Y.
2 1991. Free radical metabolites in myocardium during ischemia and reperfusion.
3 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 261: 81–86.
4 <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1991.261.4.81>.

5 Sedlak, J. Lindsay, R.H. 1968. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein
6 sulfhydryl groups in tissue with Ellman’s reagent. Analytical Biochemistry, 25: 192–
7 205. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4).

8 Sena, L.A., Chandel, N.S. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen
9 species. Molecular Cell, 48(2): 158–167. <https://doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025>.

10 Tattersall, G.J., Sinclair, B.J., Withers, P.C., Fields, P.A., Seebacher, F., Cooper, C.E.,
11 Maloney, S.K. 2012. Coping with thermal challenges: physiological adaptations to
12 environmental temperatures. Comprehensive Physiology, 2: 2151–2201. [https://doi:](https://doi:10.1002/cphy.c110055)
13 [10.1002/cphy.c110055](https://doi:10.1002/cphy.c110055).

14 Toni, M., Anguilli, E., Malavasi, S., Alleva, E., Cioni, C. 2017. Variation in
15 Environmental Parameters in Research and Aquaculture: Effects on Behaviour,
16 Physiology and Cell Biology of Teleost Fish. Journal of Aquaculture & Marine
17 Biology, 5(6): 00137. <https://doi 10.15406/jamb.2017.05.00137>.

18 Tripathy, A. 2016. Oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) and antioxidative
19 defense system, with special reference to fish. International Journal of Current Research
20 in Biosciences and Plant Biology, 3(10): 79-89.
21 <https://dx.doi.org/10.20546/ijcrbp.2016.310.010>.

1 UNESCO, 1983. Chemical Methods for Use in Marine Environmental Monitoring.
2 Manual and Guides. Intergovernmental Oceanographic Commission, p. 56.
3 <https://www.oceanbestpractices.net/handle/11329/87>.

4 Welker, A.F., Campos, E.G., Cardoso, L.A., Hermes-Lima, M. 2012. Role of catalase
5 on the hypoxia/reoxygenation stress in the hypoxia-tolerant Nile tilapia. American
6 Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 302: 1111–
7 1118. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00243.2011>.

8 Welker, A.F., Moreira, D.C., Campos, E.G., Hermes-Lima, M. 2013. Role of redox
9 metabolism for adaptation of aquatic animals to drastic changes in oxygen availability.
10 Comparative Biochemistry and Physiology A, 165: 384–404. [https://doi.org/10.1016/j.](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003)
11 [cbpa.2013.04.003](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.04.003).

12 Xiao, W. 2015. The hypoxia signaling pathway and hypoxic adaptation in fishes.
13 Science China Life Sciences, 58: 148–155. <https://doi.org/10.1007/s11427-015-4801-z>.

14 Zhang, G., Mao, J., Liang, F., Chen, J., Zhao, C., Yin, S., Wang, L., Tang, Z., Chen, S.
15 2016. Modulated expression and enzymatic activities of Darkbarbel catfish,
16 *Pelteobagrus vachelli* for oxidative stress induced by acute hypoxia and reoxygenation.
17 Chemosphere, 151: 271e279. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.072>.

18 Zebral, Y.D., Roza, M., Fonseca, J.S., Costa, P.G., Oliveira, C.S., Zocke, T.G., Dal
19 Pizzol, J.L., Robaldo, R.B., Bianchini, A. 2016. Waterborne copper is more toxic to the
20 killifish *Poecilia viviparain* elevated temperatures: Linking oxidative stress in the liver
21 with reduced organismal thermal performance. Aquatic Toxicology, 209: 142–149.
22 <https://doi.org/1>

1 **Legendas das figuras**

2

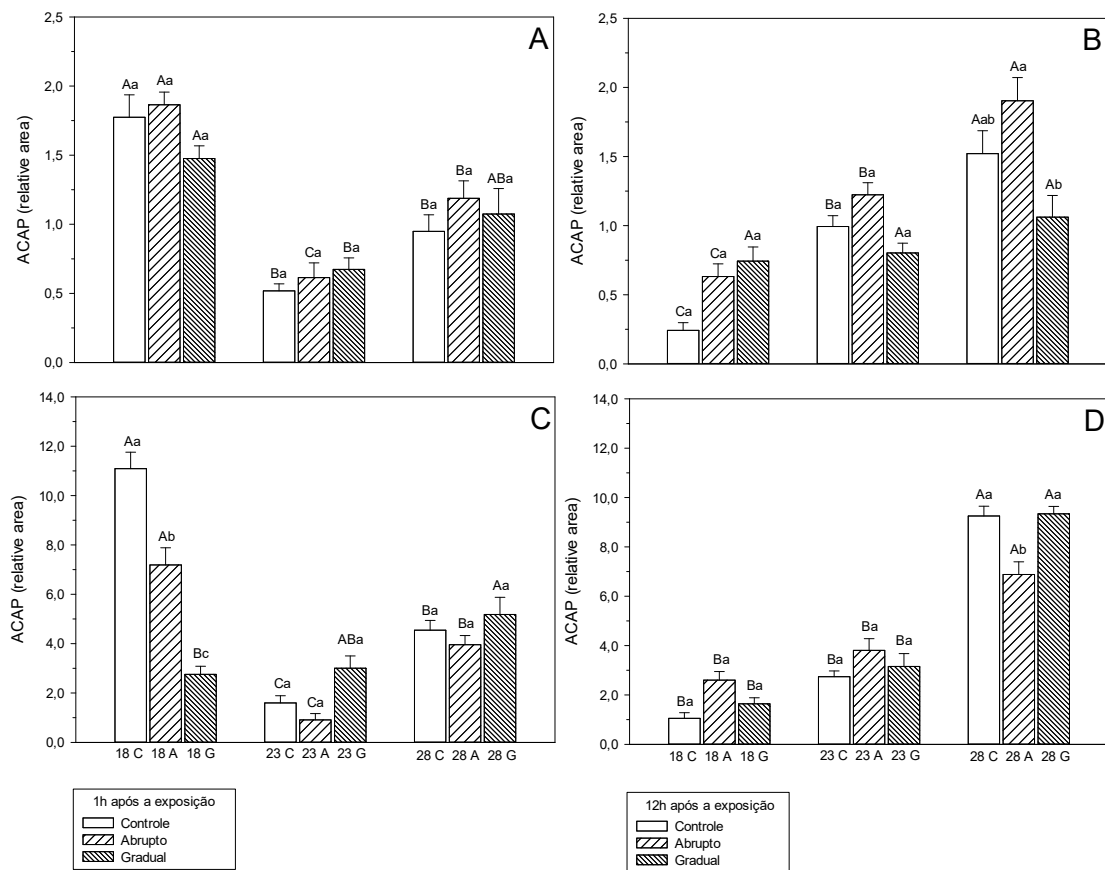
3 **FIGURA 1.** Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP) nas
4 brânquias (A, B) e fígado (C, D) em 1 e 12h após a reoxigenação em juvenis de pacu
5 expostos à interação entre diferentes temperaturas e velocidades de reoxigenação.
6 Resultados são expressos em média \pm EP (n=6). Letras minúsculas indicam diferenças
7 significativas entre velocidades de reoxigenação nas mesmas temperaturas e letras
8 maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre temperaturas nas mesmas
9 velocidades de reoxigenação (ANOVA de duas vias e teste Tukey, $p < 0,05$). Nesta
10 variável, uma menor área relativa indica uma maior capacidade antioxidante e vice
11 versa.

12 **FIGURA 2.** Peroxidação lipídica (LPO) em brânquias (A, B) e fígado (C, D) em 1 e
13 12h após a reoxigenação em juvenis de pacu expostos à interação entre diferentes
14 temperaturas e velocidades de reoxigenação. Resultados são expressos em média \pm EP
15 (n=6). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre velocidades de
16 reoxigenação nas mesmas temperaturas e letras maiúsculas diferentes indicam diferença
17 significativa entre temperaturas nas mesmas velocidades de reoxigenação (ANOVA de
18 duas vias e teste Tukey, $p < 0,05$).

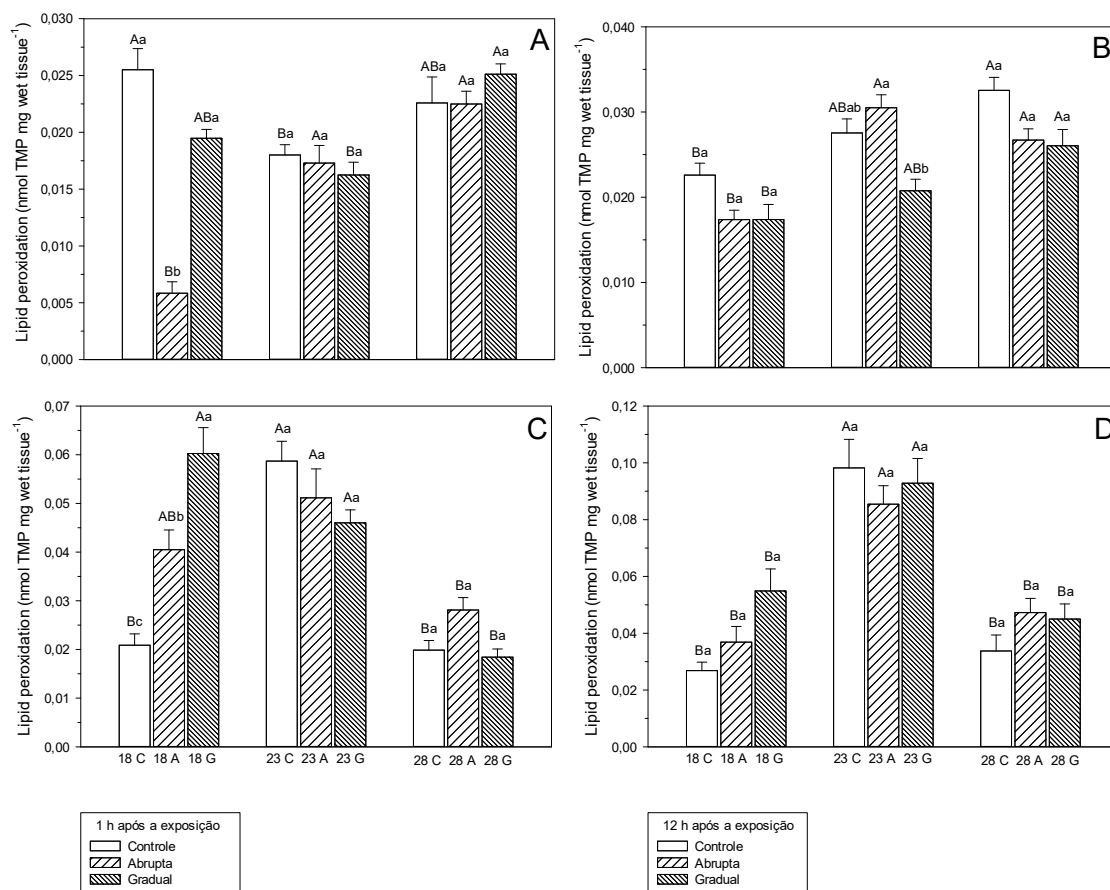
19 **FIGURA 3.** Conteúdo de tióis proteicos (PSH) em brânquias (A, B) e fígado (C, D) em
20 1 e 12h após a reoxigenação em juvenis de pacu expostos à interação entre diferentes
21 temperaturas e velocidades de reoxigenação. Resultados são expressos em média \pm EP
22 (n=6). Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre velocidades de
23 reoxigenação nas mesmas temperaturas e letras maiúsculas diferentes indicam diferença

- 1 significativa entre temperaturas nas mesmas velocidades de reoxigenação (ANOVA de
- 2 duas vias e teste Tukey, $p < 0,05$).

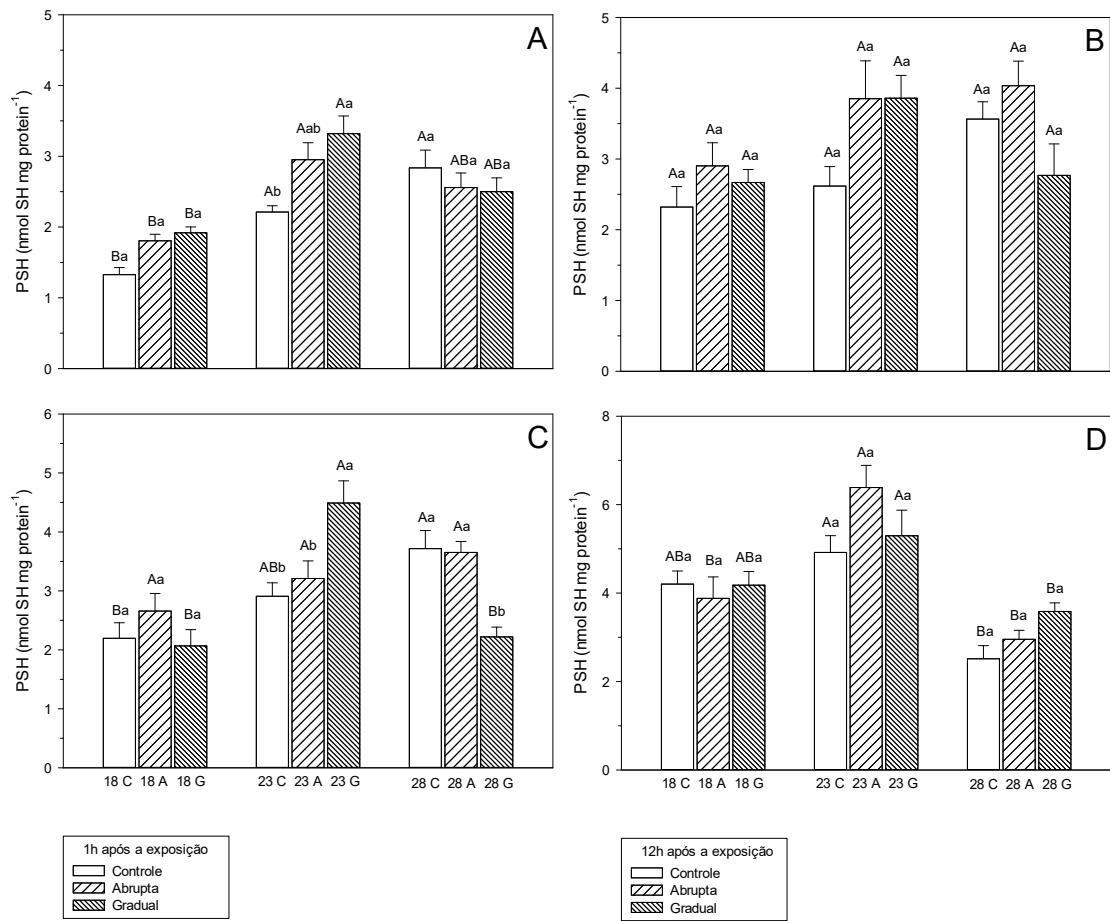
3 Figura 1



1 Figura 2



1 Figura 3



1 **4. Considerações Finais e Perspectivas**

2

3 De acordo com os resultados obtidos, ficou evidente que a interação entre
4 temperatura e oxigênio dissolvido pode interferir na criação do pacu, uma vez que causa
5 alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. A temperatura exerce forte
6 influência sobre o metabolismo dos peixes, que se mostra interligada com variações dos
7 parâmetros hematológicos, bioquímicos e fisiológicos como hiperglicemia,
8 hiperlactemia, episódios de acidose e alterações nas proporções de células sanguíneas
9 que permitem ajustes para a manutenção da homeostase.

10 Concentrações ideais de OD garantem que processos altamente dependentes de
11 energia sejam mantidos através do metabolismo aeróbico. Mesmo níveis de OD
12 inferiores a 4 mg L⁻¹, que configuram níveis de hipóxia moderada, devem ser evitados
13 nos sistemas de produção do pacu porque são capazes de causar estresse nos animais.
14 Contudo, destaca-se que esta recomendação se aplica a sistemas similares ao utilizado
15 no presente estudo.

16 O pacu demonstrou ser uma espécie tolerante a baixa temperatura testada (18
17 °C). Entretanto, a redução do metabolismo nessas condições pode determinar uma taxa
18 de crescimento menor, pouco interessante ao produtor. Além disso, o pacu demonstrou
19 estar mais preparado para lidar com situações de privação de oxigênio quando mantido
20 em 28°C, em relação a temperaturas mais baixas de 23 e 18 °C. A manutenção dos
21 parâmetros de qualidade da água ideais para cada espécie é fundamental para o bem
22 estar dos peixes, o que permite que os animais apresentem melhor desempenho
23 zootécnico. Devido a isso, é indicado um monitoramento constante e a adoção de
24 estratégias que permitam um reconhecimento precoce de situações estressantes no

1 ambiente de cultivo, principalmente destes dois fatores cruciais ao desenvolvimento dos
2 animais, temperatura e OD.

3 Todavia, independentemente do tipo de sistema de cultivo, episódios de privação
4 de OD devem ser evitados, pois podem ser responsáveis por eventos de estresse nos
5 peixes. Além disso, o período subsequente é considerado mais desafiador aos
6 organismos aquáticos, visto que no momento da reoxigenação o organismo precisa
7 utilizar-se de mecanismos para evitar danos as macromoléculas. O pacu é uma espécie
8 tolerante à hipóxia e diferentes taxas de reoxigenação podem ser aplicadas em diferentes
9 condições de cultivo. Uma reoxigenação feita rapidamente pode ser tolerada em peixes
10 mantidos em baixas temperaturas (18 °C) e até mesmo ser mais eficiente pela menor
11 prevalência de danos oxidativos (LPO e PSH). Já em temperaturas intermediárias (23
12 °C) uma reoxigenação gradual é indicada por acarretar menores oscilações nos
13 parâmetros hematológicos e menor peroxidação lipídica (LPO) 12 h após o fim da
14 reoxigenação.

15 De maneira geral, um período de 12 h é suficiente para a restauração das
16 condições fisiológicas normais nos peixes mantidos em 23 °C e que foram submetidos a
17 reoxigenação abrupta e 28 °C que foram submetidos a reoxigenação gradual. Os peixes
18 mantidos em 18 °C necessitam de um período maior de tempo, o qual poderá ser
19 estabelecido em estudos futuros.

20 Além disso, recomenda-se que futuros estudos avaliem a interação das
21 temperaturas testadas nesta tese e diferentes níveis de hipóxia, bem como diferentes
22 velocidades de reoxigenação sobre os efeitos no desempenho zootécnico desta espécie.

1 **5. Conclusões Gerais**

2

3 - A interação entre diferentes temperaturas e níveis de OD causam alterações
4 fisiológicas e bioquímicas que se mostraram órgão específicas, nos juvenis de pacu.

5 - A exposição à hipóxia (2 e 4 mg OD L⁻¹) por um período de 12 h causam distúrbios
6 metabólicos, ácido base, além de induzir estresse oxidativo e ativação do sistema
7 antioxidante.

8 - Os efeitos da rápida reoxigenação desencadearam maiores variações nos parâmetros
9 sanguíneos do que nos parâmetros bioquímicos, e estes foram mais acentuados com o
10 aumento da temperatura.

11 - O pacu demonstrou ser uma espécie tolerante a hipóxia e a reoxigenação. Juvenis de
12 pacu mantidos em 18 °C podem lidar melhor com uma reoxigenação rápida. Para peixes
13 mantidos entre 23 e 28 °C uma reoxigenação gradual ocasiona menores variações na
14 homeostase e estes são menos susceptíveis a danos oxidativos de macromoléculas.

15 - Um período de 12 h foi suficiente para restabelecer total ou em parcialmente as
16 alterações nos parâmetros sanguíneos de pacu dependendo da temperatura e da
17 velocidade de reoxigenação que foram submetidos.