



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CÁSSIA REGINA BRUNO NASCIMENTO

**RESPOSTA DE ESTRESSE NO PEIXE *PROCHILODUS*  
*LINEATUS* COM E SEM A INTERFERÊNCIA DO METAL  
COBRE E DO HERBICIDA ATRAZINA**

CÁSSIA REGINA BRUNO NASCIMENTO

**RESPOSTA DE ESTRESSE NO PEIXE *PROCHILODUS*  
*LINEATUS* COM E SEM A INTERFERÊNCIA DO METAL  
COBRE E DO HERBICIDA ATRAZINA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Dra. Marta Marques de Souza

Londrina  
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

N244r Nascimento, Cássia Regina Bruno.

Resposta de estresse no peixe *Prochilodus lineatus* com e sem a interferência do metal cobre e do herbicida atrazina / Cássia Regina Bruno Nascimento. – Londrina, 2011.  
80 f.; il.

Orientador: Marta Marques de Souza.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Efeito do stress – Teses. 2. Peixe – Fisiologia – Teses. 3. Peixe – Contaminação – Cobre – Teses. 4. Peixe – Contaminação – Herbicidas – Teses. 5. Regulação osmótica – Teses. 6. *Prochilodus lineatus* – Teses. I. Souza, Marta Marques de. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 597-044

CÁSSIA REGINA BRUNO NASCIMENTO

**RESPOSTA DE ESTRESSE NO PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS*  
COM E SEM A INTERFERÊNCIA DO METAL COBRE E DO  
HERBICIDA ATRAZINA**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Marta Marques de Souza  
FURG – Rio Grande – RS

---

Cláudia Bueno dos Reis Martinez  
UEL – Londrina – PR

---

Renata Guimarães Moreira  
USP – São Paulo – SP

---

Marisa Narciso Fernandes  
UFSCAR – São Carlos – SP

Londrina, 28 de março de 2011.

Dedico este meu trabalho ao meu marido que após anos juntos, é capaz de transformar as minhas necessidades, em suas necessidades, me acompanhando e apoiando nesta minha longa caminhada pela busca de conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Ao programa, ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática - INCT e aos órgãos financiadores Capes, CNPq e Fundação Araucária pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

À Estação de piscicultura da UEL pelo fornecimento dos animais.

À competente e dedicada, secretária do programa Daniela Grosso Borin; a Dani.

À professora Silvia Ponzoni por, todas as vezes que me encontrava pela Universidade, me confortava e no final dizia: “vai dar tudo certo”.

À Dra Cláudia, por me acolher com idéias, palavras e sabedoria. Muito obrigada pela paciência que teve comigo. Foi muito bom fazer parte do LEFA, um laboratório que reflete a sua competência e dedicação no que faz.

À minha família pelo suporte e em especial, minha mãe e pai que sempre estiveram prontos a me ajudar quando necessário.

Ao meu marido, que fica ao meu lado, mesmo em momentos de tristeza, raiva e desespero. À Thamy, minha filha, que mesmo não gostando de Londrina, aceitou a mudança e está presente quando mais preciso dela. À Marcela, minha filha, que ficou firme quando eu não estava presente, por agüentar, sem reclamar, os atrasos de seus compromissos provocados pelo meu atraso, e por sempre ser carinhosa.

### **À Deus.....**

“O Senhor é o meu rochedo, minha força! Meu Deus é a minha rocha, onde encontro o meu refúgio, meu escudo, força de minha salvação e minha cidadela“ (Salmo 18).

À turma do LEFA: Luciana (loira de verdade); Carolzinha (meiga com seus múltiplos cabelos); Fran (vamos beber?); Cy (a apaixonada Cy!); Thais (séria!!); Nati (que “cuti-cuti”, Natinha!); Ju (a inteligente Ju!); Kelly (só no som); Alexandre

(o “resmungão”, mas super gente boa!); Thiago (eta Thi, vamos pra São Paulo?); Rafa (puro perfume!); Bruna (cadê o passarinho?); Lindi (Lindalva para os menos íntimos) sempre lembrarei e agradecerei por toda a força que me deu, também pela amizade e conforto nas horas difíceis; à minha Dedéia, que pessoa especial! Me ajudou em tudo, obrigaaaaada!; à Dalita, como me ajudo nas madrugadas! E sempre com paciência ao me ensinar, e com boas risadas!

Devo meu mestrado a todos vocês “lefianos”, porque me ajudaram em tudo, desde as atividades no laboratório, até a de me dar forças quando precisava!

Dra. Marta...

à você Marta, meu MUITO obrigado por acreditar em mim, confiar em mim, apostar em mim! Nunca me senti abandonada depois que foi embora, porque sempre esteve presente, por email, por telefone ou mesmo por torpedo no celular. Eu te agradeço, de coração, a maneira que conduziu o meu mestrado, pois foi e é uma ótima orientadora. Obrigada por ter me ensinado a cada dia que estive sob a sua orientação e por eu saber, que sempre pude contar contigo!

"Gestos de carinho, atenção e delicadeza fazem-nos perceber quanto algumas pessoas são especiais na forma de ser e como são bem-vindas as suas ações. Muito obrigada!"

“O estudo, a busca da verdade e da beleza,  
são domínios em que nos é consentido sermos  
crianças por toda a vida”

Albert Einstein

NASCIMENTO, Cássia Regina Bruno. **Resposta de estresse no peixe *prochilodus lineatus* com e sem a interferência do metal cobre e do herbicida atrazina**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## RESUMO

Animais, como os peixes, estão constantemente expostos ao estresse que pode ser de natureza química, física ou comportamental. A fim de avaliar a resposta de estresse em *Prochilodus lineatus*, peixes foram submetidos à exposição aérea e confinamento (grupo *estresse*) e analisados os parâmetros: hematológico (número de eritrócitos - RBC, hematócrito e conteúdo de hemoglobina), endócrino e metabólico (cortisol, glicose plasmática e glicogênio hepático) e osmorregulatórios ( $\text{Na}^+$  plasmático, atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e da anidrase carbônica branquiais) após 0, 1, 3 e 6 h do estresse (t0, t1, t3 e t6). Os resultados obtidos foram comparados com os dos animais não submetidos ao estresse. Foi observado que houve aumento de RBC em t0 e diminuição de hematócrito em t1. A glicose e o cortisol aumentaram em t1 e t3; enquanto o glicogênio hepático diminuiu em todos os tempos experimentais. Quanto aos parâmetros osmorregulatórios, o  $\text{Na}^+$  plasmático diminuiu em t0, a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase aumentou em t0, t1 e t3 e a da anidrase carbônica diminuiu em t0, t1 e t3 e aumentou em t6. As variações hematológicas e do glicogênio indicam ativação adrenérgica. Assim como os resultados obtidos com cortisol (pico em t1 e t3 depois do estresse, e recuperação em t6) e demais variáveis apontam a resposta adaptativa ao estresse com envolvimento do sistema neuroendócrino (ativação dos eixos HSC e HPI). Com a exposição dos peixes a um metal, cobre, e a um herbicida, atrazina, foram analisados os efeitos de contaminantes sobre a resposta ao estresse. Foi utilizado o mesmo delineamento experimental que o grupo *estresse*, mas na presença dos contaminantes (grupo *cobre + estresse* e grupo *atrazina + estresse*). Os mesmos parâmetros foram analisados e comparados com os resultados obtidos na situação de *estresse*. Para o grupo *cobre + estresse* foi observado diminuição de RBC em t0 e t6; diminuição de hemoglobina em t1 e t6; aumento de hematócrito em t0 e diminuição em t3. Quanto aos parâmetros metabólicos, a glicose plasmática apresentou-se diminuída em t0, t1 e t3 e aumentada em t6; o cortisol e o glicogênio apresentaram-se diminuídos em todos os tempos experimentais. O sódio plasmático manteve-se estável; a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase apresentou-se diminuída em t0 e t1 e a atividade da anidrase carbônica foi aumentada em t1 e t3. Para o grupo *atrazina + estresse* foi observado aumento de RBC em t0 e diminuição em t3; aumento de hemoglobina em t0 e diminuição em t3; aumento de hematócrito em t0. A glicose e o cortisol plasmático diminuíram em t1 e t3; o glicogênio hepático diminuiu em t0. O sódio plasmático diminuiu em t3; a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase diminuiu em t1 e t3 e a atividade da anidrase carbônica aumentou em t0 e t1 e diminuiu em t6. Os contaminantes cobre e atrazina atuam como disruptores endócrino impedindo a liberação do hormônio cortisol à corrente sanguínea levando *P. lineatus* a apresentar prejuízo na resposta adaptativa ao estresse.

**Palavras-chave:** Peixe dulcícola. Estresse. Hematologia. Metabolismo. Osmorregulação. Disruptor endócrino.

NASCIMENTO, Cássia Regina Bruno. **Resposta de estresse no peixe *prochilodus lineatus* com e sem a interferência do metal cobre e do herbicida atrazina**. 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

## ABSTRACT

Animals such as fish face various environmental stresses, including: chemical, physical and social. In order to evaluate *Prochilodus lineatus* responses, fish were submitted to stress by air exposure and confinement (*stress* group) and then we analyzed hematological (RBC – erythrocytes number, hematocrit and hemoglobin contents), endocrine and metabolical (cortisol, plasmatic glucose, hepatic glycogen) and osmoregulatory parameters (plasmatic  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase and carbonic anhydrase activity) at the experimental time points 0, 1, 3 and 6 h after stress, and subsequently compared with fish not submitted to stress (controls). We observed an RBC increase at t0 and a hematocrit decrease at t1. Concerning the endocrine and metabolical parameters, the glucose increased at t1 and t3; cortisol increased at t1 and t3; while hepatic glycogen decreased throughout all experimental times. Regarding the osmoregulatory parameters, plasma  $\text{Na}^+$  decreased at t0;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase activity increased at t0, t1 and t3 while carbonic anhydrase activity decreased at t0, t1 and t3 and increased at t6. The hematological variations and glycogen results indicate adrenergic activation. Additionally, the results obtained with cortisol (peak at 1 and 3 h after stress, and recovery at 6h) point to an adaptative neuro-endocrine response (HSC and HPI axes activation). We analyzed the interference of contaminants on the stress responses, for that, we performed a pre-exposure of a metal copper, and an herbicide, atrazine. For these analyses, the same experimental design was repeated, but with the addition of contaminants (*copper + stress* and *atrazine + stress*). The same parameters were analyzed, and were compared with the results obtained from the stress alone group. The *copper + stress* group showed an RBC decrease at t0 and t6; a hemoglobin decrease at t1 and t6; a hematocrit increase at t0 and decrease at t3. With regard to the endocrine and metabolical parameters, glucose decreased at the times 0, 1 and 3 h, and increased at t6; cortisol and glycogen decreased at all experimental time points. Plasma  $\text{Na}^+$  was stable;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase activity decreased at t0 and t1, and carbonic anhydrase activity increased at t1 and t3. Concerning the *atrazine + stress* group we observed an RBC increase at t0 and decrease at t3; a hemoglobin increase at t0 and decrease at t3; a hematocrit increase at t0. Plasma glucose and cortisol decreased at the times 1 and 3 h; glycogen decreased at t0. While plasma  $\text{Na}^+$  decreased at t3;  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase activity decreased at t1 and t3 and carbonic anhydrase activity increased at t0, t1, and decreased at t6. The results obtained in this study indicate that the contaminants employed in this study, copper and atrazine, act as endocrine disruptors in *P. lineatus*, which impairs its adaptive responses to stress.

**Keywords:** Freshwater fish. Stress. Hematology. Metabolism. Osmoregulation. Endocrine disruptor.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 –** Esquema da resposta fisiológica ao estresse em peixes. Quadro pontilhado representa os eixos HSC (hipotálamo-simpático-células cromafins) e HPI (hipotálamo-hipófise-células interrenais). CRH, hormônio liberador de corticotropina; ACTH, hormônio adrenocorticotrópico; SNA, sistema nervoso autônomo .....17
- Figura 2 –** (a) Localização do rim anterior e posterior em teleósteos. (b) Fotografia do rim anterior (asterisco) e rim posterior (seta). Barra de escala= 0,3 cm .....18
- Figura 3 –** Efeito metabólico do cortisol em teleósteos. Duas vias independentes no fígado que fornecem glicose ao sangue: Glicogenólise (seta espessa). Gliconeogênese (setas pontilhadas). (\*) proteólise no músculo e lactato produzido na respiração anaeróbia; (\*\*) lipólise no tecido adiposo. (\*\*\*) nas brânquias há diferenciação das células cloreto e aumento de atividade das ATPases. G-6-P, glicose 6 fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; CK, ciclo de Krebs; AA, aminoácidos.....21
- Figura 4 –** Esquema representando a osmorregulação em peixes dulcícola. Em destaque, um esquema simplificado da atividade das células cloreto (baseado em Evans, 1997 e Lingwood et al., 2006). Círculo cheio, representa a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase; AC, anidrase carbônica .....23
- Figura 5 –** Estrutura química do herbicida atrazina .....26
- Figura 6 –** Juvenis de *Prochilodus lineatus* .....27
- Figura 7 –** (A) foto dos aquários de vidro (80 L) onde foram realizados os experimentos. (B) Rede onde os peixes foram submetidos ao estresse aéreo e confinamento (4,5 cm<sup>3</sup>).....29
- Figura 8 –** Esquema representando o desenho experimental dos testes de exposição para o grupo estresse .....31
- Figura 9 –** Número de eritrócitos - RBC (A), conteúdo de hemoglobina (B) e hematócrito (C) em *Prochilodus lineatus* amostrados

	imediatamente (t0) ou após 1, 3 e 6 h de serem submetidos ao estresse. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 6). * indica diferença em relação ao grupo <i>sem estresse</i> , para o mesmo tempo (P ≤ 0,05).....	38
<b>Figura 10 –</b>	Valores (média ± EP) de glicose plasmática (A), cortisol plasmático (B) e conteúdo de glicogênio hepático (C) em <i>Prochilodus lineatus</i> amostrados imediatamente (t0) ou após 1, 3 e 6 h de serem submetidos ao estresse. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 6). * indica diferença em relação ao grupo <i>sem estresse</i> , para o mesmo tempo (P ≤ 0,05).....	40
<b>Figura 11 –</b>	Valores (média ± EP) de sódio plasmático (A), atividade da enzima Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> ATPase (B) e atividade da enzima anidrase carbônica (C) em <i>Prochilodus lineatus</i> amostrados imediatamente (t0) ou após 1, 3 e 6 h de serem submetidos ao estresse. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 6). * indica diferença em relação ao grupo <i>sem estresse</i> , para o mesmo tempo (P ≤ 0,05).....	42
<b>Figura 12 –</b>	Número de eritrócitos - RBC (A), conteúdo de hemoglobina (B) e hematócrito (C) em <i>Prochilodus lineatus</i> na situação <i>cobre + estresse</i> nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). * indica diferença em relação ao grupo <i>estresse</i> , para o mesmo tempo (P ≤ 0,05).....	44
<b>Figura 13 –</b>	Valores (média ± EP) de glicose plasmática (A), cortisol plasmático (B) e conteúdo de glicogênio hepático (C) em <i>Prochilodus lineatus</i> na situação <i>cobre + estresse</i> nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= de 4 a 7). * indica diferença em relação ao grupo <i>estresse</i> , para o mesmo tempo (P ≤ 0,05).....	46

- Figura 14** – Valores (média ± EP) de sódio plasmático (A), atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (B) e atividade da enzima anidrase carbônica (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *cobre + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \*indica diferença em relação ao grupo estresse, para o mesmo tempo (P ≤ 0,05) .....48
- Figura 15** – Número de eritrócitos - RBC (A), conteúdo de hemoglobina (B) e hematócrito (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *atrazina + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \* indica diferença em relação ao grupo estresse, para o mesmo tempo (P ≤ 0,05) .....50
- Figura 16** – Valores (média ± EP) de glicose plasmática (A), cortisol plasmático (B) e conteúdo de glicogênio hepático (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *atrazina + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \* indica diferença em relação ao grupo estresse, para o mesmo tempo (P ≤ 0,05).....52
- Figura 17** – Valores (média ± EP) de sódio plasmático (A), atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase (B) e atividade da enzima anidrase carbônica (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *atrazina + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representa as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \* indica diferença em relação ao grupo estresse, para o mesmo tempo (P ≤ 0,05) .....54

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 –** Valor da concentração medida de cobre ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), total e dissolvido, na água dos aquários onde os peixes foram expostos. (A) Aquários com respectivos tempos experimentais onde os peixes foram expostos antes de serem submetidos ao estresse aéreo e confinamento. (B) Aquários com respectivos tempos experimentais onde os peixes foram colocados logo após serem submetidos ao estresse aéreo e confinamento.....37
- Tabela 2 –** Valores (média  $\pm$  EP) de VCM, HCM e CHCM em *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente (t0) ou após 1, 3 e 6 h de serem submetidos ao estresse (n= 4 a 6). \*indica diferença em relação ao grupo *sem estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ). .....38
- Tabela 3 –** Valores (média  $\pm$  EP) de VCM, HCM e CHCM em *Prochilodus lineatus* na situação *cobre + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h), n= 4 a 7. \*indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ). .....45
- Tabela 4 –** Valores de VCM, HCM e CHCM em *Prochilodus lineatus* na situação *atrazina + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h), n= 4 a 7. \*indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ). .....51

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1	RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ESTRESSE	16
1.2	ESTRESSE AÉREO E CONFINAMENTO	19
1.3	PARÂMETROS QUE INDICAM O ESTRESSE EM PEIXES	19
1.3.1	Parâmetros Hematológicos	20
1.3.2	Parâmetro Endócrino e Metabólico	20
1.3.3	Parâmetros Osmorregulatórios	21
1.4	DISRUPTOR ENDÓCRINO (DE): COBRE (METAL) E ATRAZINA (HERBICIDA)	23
1.4.1	Cobre	24
1.4.2	Atrazina	25
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E METODOS</b>	29
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	29
3.1.1	Estresse Aéreo e Confinamento (Estresse)	29
3.1.2	Exposição ao Cobre (Cobre + Estresse)	32
3.1.3	Exposição à Atrazina (Atrazina + Estresse)	32
3.1.4	Amostragem	32
3.1.5	Análise da Água com Cobre	33
3.1.6	Análises Hematológicas: Hematócrito, Hemoglobina e RBC	33
3.1.7	Análise Endócrina e Metabólica: Glicose, Cortisol e Glicogênio Hepático	34
3.1.8	Análises Osmorregulatórias: Na <sup>+</sup> plasmático, atividade da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> - ATPase (NKA) e da Anidrase Carbônica (AC)	35
3.1.9	Análise Estatística	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	37
4.1	ESTRESSE AÉREO E CONFINAMENTO (ESTRESSE)	37
4.1.1	Análise de Cobre na Água	37

4.1.2	Parâmetros Hematológicos .....	37
4.1.3	Parâmetro Endócrino e Metabólico.....	39
4.1.4	Parâmetro Osmorregulatórios .....	41
4.2	COBRE + ESTRESSE .....	43
4.2.1	Parâmetros Hematológicos .....	43
4.2.2	Parâmetro Endócrino e Metabólico.....	45
4.2.3	Parâmetros Osmorregulatórios.....	47
4.3	ATRAZINA + ESTRESSE .....	49
4.3.1	Parâmetros Hematológicos .....	49
4.3.2	Parâmetro Endócrino e Metabólico.....	51
4.3.3	Parâmetros Osmorregulatórios.....	52
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
5.1	ESTRESSE AÉREO E CONFINAMENTO (ESTRESSE) .....	55
5.2	COBRE + ESTRESSE .....	59
5.3	ATRAZINA + ESTRESSE .....	66
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>72</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>73</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos estudos envolvendo estresse têm sido freqüentemente realizados na área da fisiologia de peixes (DEMER; BAYNE, 1997; JENTOFT et al., 2002; TELES et al. 2005; HONTELA et al., 2009). Os peixes são expostos na natureza, bem como em cativeiro, a fatores estressantes, tanto biológicos como abióticos. Os poluentes ambientais, doenças e vários aspectos da aquicultura intensiva são alguns exemplos de tais fatores (IWAMA et al., 1999). O organismo frente a fatores que lhe causam estresse gera uma resposta generalizada que pode perder seu valor adaptativo tornando-se disfuncional, o que pode resultar na inibição do crescimento, falhas na reprodução e redução da resistência a doenças (WENDELAAR BONGA, 1997).

A definição de estresse tem uma longa história caracterizada por muitas controvérsias. O fato é que este termo é aceito pelos biólogos, fisiologistas e toxicologistas como um fenômeno que envolve diferentes níveis organizacionais como células, órgãos, organismos, população e ecossistema, sendo definido como uma condição na qual a homeostase é ameaçada, como resultado das ações de estímulos intrínsecos ou extrínsecos, comumente definidos como estressores (WENDELAAR BONGA, 1997). Os estressores podem ser de natureza física, como o transporte, confinamento ou manuseio, de natureza química como contaminantes, baixo teor de oxigênio ou pH na água e de natureza comportamental, como por exemplo, a presença de predadores (BARTON, 2002).

Existe, hoje, uma extensa literatura sobre as bases endócrinas e fisiológicas de estresse em peixes, em grande parte construída a partir de estudos de peixes em cativeiro, e dentro desta, em grande parte, examinando os efeitos de peixes teleósteos (PANKHURST, 2010).

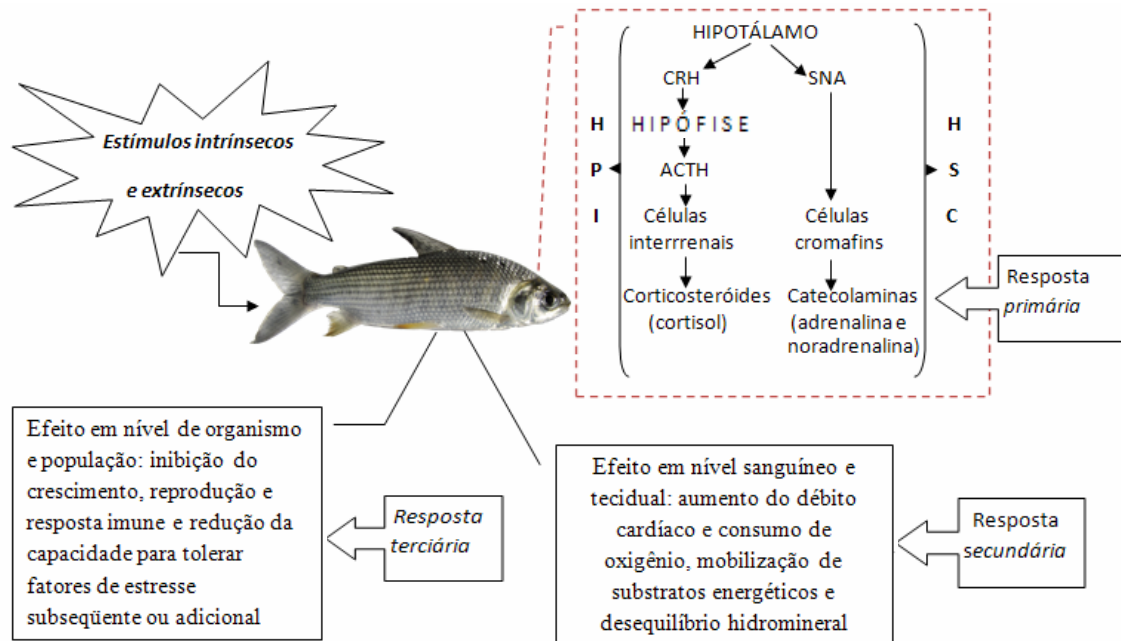
O estresse pode ser considerado como um estado que ameaça a saúde do animal, mas que é restabelecida por um conjunto de respostas adaptativas benéficas ao organismo. Mas se a resposta adaptativa não for eficaz ou deixar de ocorrer, haverá prejuízo ao organismo do animal.

## 1.1 RESPOSTAS FISIOLÓGICAS AO ESTRESSE

A resposta fisiológica do peixe diante de uma situação que lhe causa estresse é complexa, pois envolve sua capacidade de mobilizar reservas energéticas de forma a evitar ou vencer imediatamente a situação de ameaça. Diante do agente estressor, o peixe necessita de uma resposta imediata que pode ser de curto ou longo prazo, sendo caracterizada por três fases: primária, secundária e terciária (Figura 1) (ALURU; VIJAYAN, 2007).

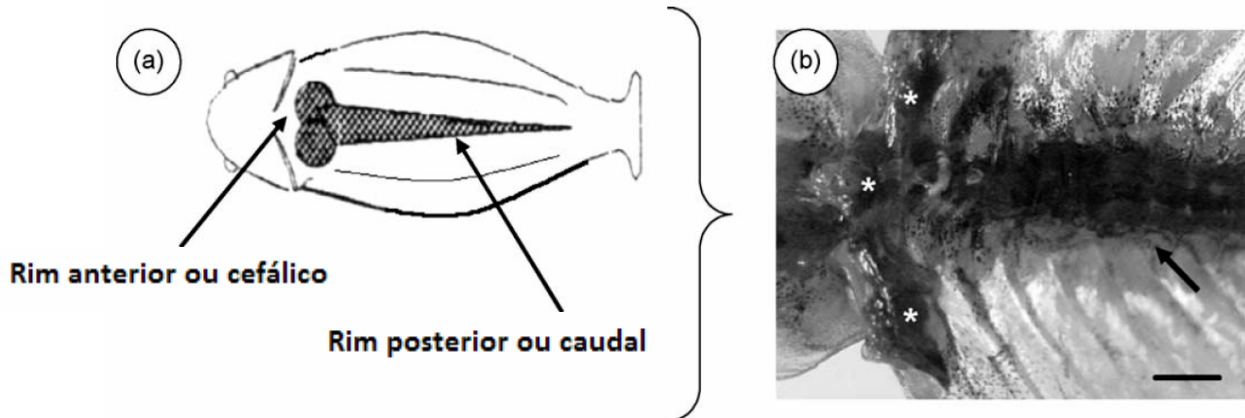
A resposta primária é neuroendócrina; nela ocorre a ativação de centros cerebrais, resultando na liberação maciça das catecolaminas e corticosteróides. Com estímulo do eixo hipotálamo-simpático-cromafins (HSC) (Figura 1) há a liberação na circulação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), secretadas pelas células cromafins que ocorrem dispersas ou em pequenos grupos no rim anterior ou cefálico (Figura 2) e atuam em condições que exigem reforço de transporte de oxigênio no sangue e na mobilização de substratos energéticos (WENDELAAR BONGA, 1997). A estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HPI) (Figura 1) resulta na liberação de cortisol na circulação (BARTON, 2002). Este hormônio é secretado pelo tecido interrenal, situado na região do rim anterior (Figura 2) e está envolvido em diversas funções, incluindo o crescimento e metabolismo, osmorregulação, função imune e reprodução (ALURU; VIJAYAN, 2007).

**Figura 1** – Esquema da resposta fisiológica ao estresse em peixes. Quadro pontilhado representa os eixos HSC (hipotálamo-simpático-células cromafins) e HPI (hipotálamo-hipófise-células interrenais). CRH, hormônio liberador de corticotropina; ACTH, hormônio adrenocorticotrópico; SNA, sistema nervoso autônomo.



A resposta secundária é definida os efeitos imediato desses hormônios, em nível sanguíneo e tecidual, incluindo o aumento do débito cardíaco e consumo de oxigênio, mobilização de substratos energéticos e desequilíbrio hidromineral. Já a resposta terciária estende-se em nível do organismo e população com inibição do crescimento, reprodução e resposta imune e redução da capacidade para tolerar fatores de estresse subsequente ou adicional (WENDELAAR BONGA, 1997).

**Figura 2** – (a) Localização do rim anterior e posterior em teleósteos. (b) Fotografia do rim anterior (asterisco) e rim posterior (seta). Barra de escala= 0,3 cm.



Fonte: Extraído de Silva e Martinez (2006).

A liberação de cortisol nos animais é mais lenta que a liberação de catecolaminas. A ativação direta das células cromafins por terminações nervosas simpáticas permite que a liberação das catecolaminas seja mais rápida. A via para liberação do cortisol se inicia no eixo HPI, com a liberação do hormônio de liberação de corticotropina (CRH) pelo hipotálamo, que estimula as células da hipófise anterior a liberar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH por sua vez, estimula as células interrenais no rim a sintetizar e liberar cortisol na circulação para atuar em tecidos alvos (BARTON, 2002). No plasma, o cortisol tem amplo efeito metabólico, incluindo a ativação da gliconeogênese no fígado com liberação de glicose para a corrente sanguínea, proteólise no músculo com liberação de aminoácidos para servirem de substratos para a gliconeogênese, e lipólise no tecido adiposo com aumento de ácidos graxos livres no sangue (PANKHURST, 2010). A capacidade do fígado em utilizar a via gliconeogênica é uma adaptação ao estresse importante. Como a glicose é o combustível principal para atender a demanda energética, esta via torna-se essencial para a recuperação da homeostase (ALURU; VIJAYAN, 2007). Além do efeito metabólico, o cortisol desempenha funções importantes no equilíbrio hidromineral (osmorregulação), atuando em grande parte, através do seu efeito sobre a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase importante para captação de íons nos teleósteos dulcícola (PANKHURST, 2010). Vários estudos foram realizados tendo o cortisol como um hormônio atuando no aumento da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase e

dentre algumas espécies estudadas há o bagre africano (*Clarias gariepinus*), a truta-arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) e os salmonídeos (BABITHA; PETER, 2010; SHRIMPTON; STEPHEN, 1999; Mc CORMICK et al., 1991). O motivo para que este hormônio seja um bom indicador de estresse é que os níveis plasmáticos de cortisol tendem a aumentar com a exposição a estressores (MOMMSEN et al., 1999).

Embora a resposta de cortisol aos estressores esteja bem estabelecida em vários teleósteos, a magnitude e duração dessa resposta hormonal é dependente do tipo, intensidade e duração do estressor, assim como a história deste animal (WENDELAAR BONGA, 1997; BARTON, 2002).

## 1.2 ESTRESSE AÉREO E CONFINAMENTO

Vários são os agentes estressores, que têm como consequência uma complexa resposta fisiológica. O confinamento atua como agente estressor de natureza física (BARTON, 2002) e pode ocorrer em aquicultura intensiva. A cultura de peixes é praticada em tanques ou açudes e tem como objetivo a criação racional, incluindo o controle de crescimento e reprodução. Além de rentável, a cultura do peixe é necessária para reestoque artificial devido à grande perda por poluição, métodos errôneos de pesca e outros usos levados a efeito nessas águas ou ao redor delas (SOUZA; TEIXEIRA FILHO, 2007). Com o aumento da produção intensiva, os peixes são criados em alta densidade, promovendo além do confinamento, a diminuição de oxigênio dissolvido na água. A despesca, como é chamada a colheita de peixes criados em cativeiros (AZZOLINI et al., 2010), são realizadas com redes de arrasto ficando os peixes em exposição aérea por alguns minutos até a sua retirada. Os estressores como manipulação, geram hipóxia e confinamento, que perturbam o estado homeostático promovendo uma resposta imediata de estresse verificada com o aumento da glicose sanguínea (ARENDS et al., 1999).

## 1.3 PARÂMETROS QUE INDICAM O ESTRESSE EM PEIXES

A manutenção da homeostase inclui mecanismos regulatórios como a osmorregulação e ajustes metabólicos. Brânquias, rins e intestino, os principais

órgãos osmorregulatórios de peixes, coordenam a homeostase hidromineral, enquanto o fígado, com o auxílio de hormônios, atua na homeostase metabólica (BABITHA et al., 2010). Para obter dados que informe sobre a saúde do peixe são utilizados alguns parâmetros: hematológico, endócrino e metabólico, assim como, osmorregulatório, que podem variar em decorrência da ativação da resposta adaptativa ao estresse.

### 1.3.1 Parâmetros Hematológicos

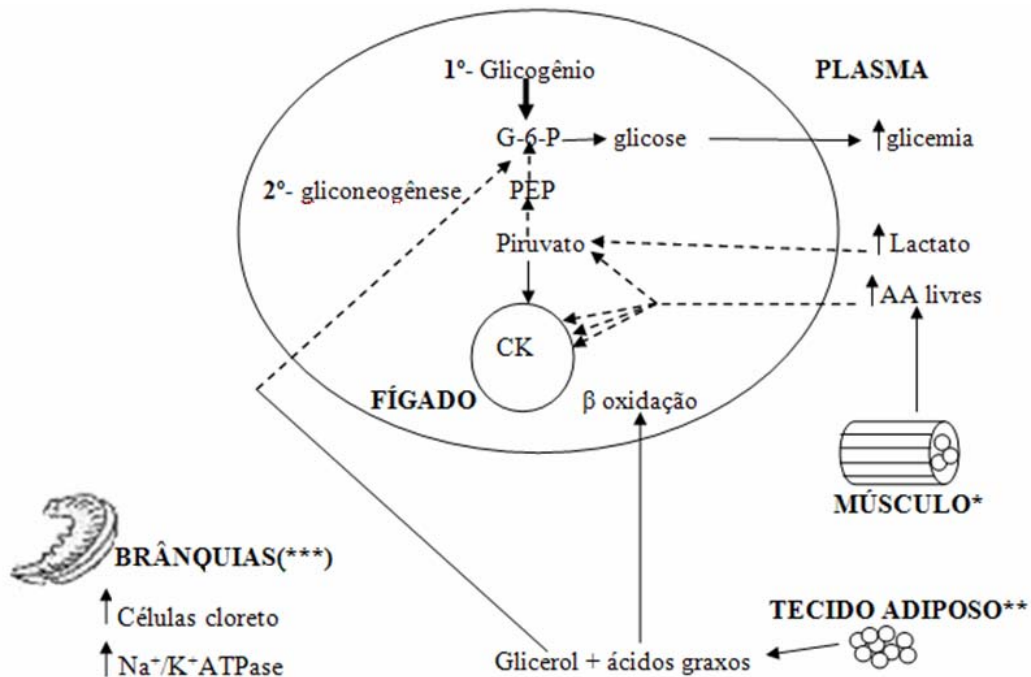
Alguns métodos de rotina hematológica para o exame de sangue de peixe incluem: dosagem da concentração de hemoglobina (metaloproteína que contém ferro presente nos eritrócitos), hematócrito (percentual de células vermelhas no volume total sangue), RBC (*Red blood cells*) ou o número de eritrócitos, bem como a taxa de sedimentação de eritrócitos, contagem total e diferencial de leucócitos e outros (BLAXHALL; DAISLEY, 1973). A utilização de parâmetros hematológicos em peixes, como indicadores de saúde, foram propostos por Hesser (1960). A hematologia é usada como um índice do estado de saúde em muitos organismos, assim como em várias espécies de peixes, para detectar alterações fisiológicas após diferentes condições de estresse, como exemplo, a exposição a poluentes, doenças e hipóxia. Estas técnicas hematológicas são os métodos mais comuns para determinar o estresse e os efeitos sub-letais de poluentes ambientais (ALWAN et al., 2009).

### 1.3.2 Parâmetro Endócrino e Metabólico

Algumas alterações biológicas em peixes podem ser avaliadas através de parâmetros metabólicos e endócrinos. A verificação da glicemia, cortisol, adrenalina, glicogênio, ácidos graxos livres e lactato podem servir como indicadores gerais de estresse fisiológico em peixes. O cortisol, como hormônio utilizado como indicador de estresse (SIMONATO et al., 2008; LANGIANO; MARTINEZ, 2008; CERICATO et al., 2008; CAMARGO et al., 2009), atua no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas. Seu efeito é observado em vários tecidos, nas brânquias atua na diferenciação de células cloreto e aumenta a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase. No fígado, promove a glicogenólise (quebra do glicogênio) e

gliconeogênese, com liberação de glicose na corrente sanguínea. No músculo, promove a proteólise, com liberação de aminoácidos para servirem de substrato na gliconeogênese, e aumento de lactato no sangue resultado da respiração anaeróbia. No tecido adiposo, promove a lipólise com liberação de glicerol e ácidos graxos livre na corrente sanguínea (MOMMSEN et al., 1999) (Figura 3).

**Figura 3** – Efeito metabólico do cortisol em teleósteos. Duas vias independentes no fígado que fornecem glicose ao sangue: Glicogenólise (seta espessa). Gliconeogênese (setas pontilhadas). (\*) proteólise no músculo e lactato produzido na respiração anaeróbia; (\*\*) lipólise no tecido adiposo. (\*\*\*) nas brânquias há diferenciação das células cloreto e aumento de atividade das ATPases. G-6-P, glicose 6 fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; CK, ciclo de Krebs; AA, aminoácidos.



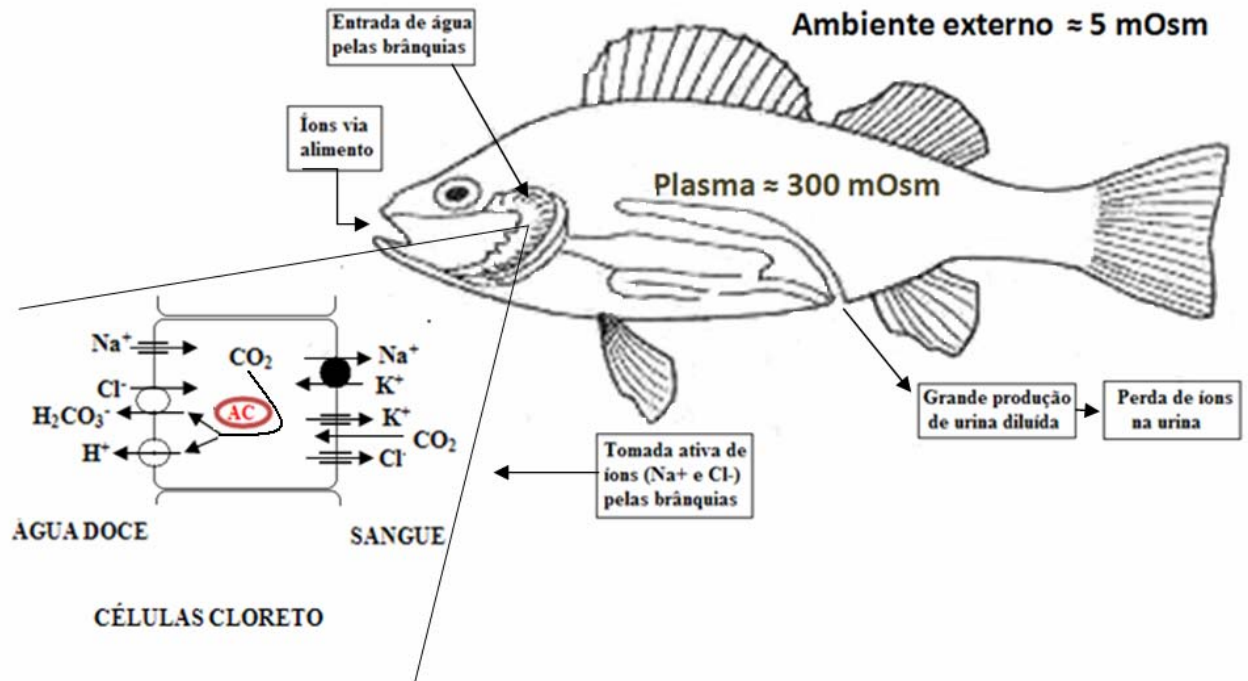
Fonte: Adaptado de Mommsen et al. (1999).

### 1.3.3 Parâmetros Osmorregulatórios

Os peixes dulcícolas são hiperosmóticos em relação ao meio externo, com isto, tendem a ganhar água constantemente. Para evitar a diluição do meio interno e a turgescência de suas células, eles produzem grande quantidade de urina diluída. Isto faz com que percam sais pela urina, que são absorvidos novamente através das brânquias por transporte ativo (Figura 4). As brânquias têm

várias funções, além de promoverem as trocas gasosas, possuem este importante papel na regulação osmótica e iônica, assim como na regulação de ácido e base e na excreção de nitrogênio (EVANS et al., 2008). As células cloreto (Figura 4) presentes no epitélio branquial constituem um local importante para a movimentação destes íons e estão sob controle hormonal, incluindo o cortisol (BABITHA et al., 2010). Estas células têm um elevado potencial metabólico, pois há uma grande quantidade de mitocôndrias para suprir a demanda energética das ATPases que transportam os íons (MARSHALL; BRYSON, 1998). A ATPase mais abundante nesta célula é a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (Figura 4) que participa no transporte de íons, quer diretamente através do movimento de sódio e potássio através da membrana plasmática, ou indiretamente através da geração de gradiente iônico e elétrico (Mc CORMICK, 1995). O cortisol atua na diferenciação das células cloreto e aumenta a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (MOMMSEN et al., 1999). Outra enzima importante nos processos gerais de osmorregulação é a anidrase carbônica (Figura 4). Esta enzima participa nos processo de regulação ácido-base mantendo o pH dentro dos limites fisiológicos, através da catálise da reação de hidratação do  $\text{CO}_2$ :  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}^+ + \text{HCO}_3^-$  (Swenson, 2003), além de participar da tomada iônica. As variações destas enzimas podem indicar a exposição do peixe a um agente estressor.

**Figura 4** – Esquema representando a osmorregulação em peixes dulcícola. Em destaque, um esquema simplificado da atividade das células cloreto (baseado em Evans, 1997 e Lingwood et al., 2006). Círculo cheio, representa a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ; AC, anidrase carbônica.



#### 1.4 DISRUPTOR ENDÓCRINO (DE): COBRE (METAL) E ATRAZINA (HERBICIDA)

A resposta ao estresse, em si, não é prejudicial para os peixes, pois é um mecanismo adaptativo que permite que o peixe possa lidar com o agente estressor a fim de manter o seu estado homeostático. O estresse pode ser considerado como um estado ameaçador da homeostase, mas que é restabelecido por um conjunto de respostas adaptativas. Mas se a intensidade do estressor é muito grave ou de longa duração, no entanto, os mecanismos de resposta fisiológica pode ser comprometida e tornar-se prejudicial à saúde do peixe (BARTON, 2002). Esta interferência à resposta adaptativa ao estresse pode ser causada por alguns poluentes como hidrocarbonetos poliaromáticos, metais pesados como cádmio, cobre e mercúrio (KIME, 1998). As águas de superfícies em muitas bacias hidrográficas recebem o escoamento e descargas de origem urbana, agrícola e doméstico, que podem levar ao acúmulo de misturas de contaminantes contendo compostos tóxicos.

A significância biológica dessas misturas é de importância ecológica (TILTON et al., 2011). Estas substâncias, interferirem no sistema endócrino dos peixes são chamadas de disruptores endócrinos. Segundo definição apresentada no *Weybridge workshop (EUROPEN COMMISSION 1996)*, “um disruptor endócrino é uma substância exógena que causa efeitos adversos à saúde de um organismo intacto, ou a seus descendentes, devido às mudanças nas funções endócrinas”, enquanto “um disruptor endócrino em potencial é uma substância que possui propriedades que podem levar à disrupção endócrina em um organismo intacto.” O sistema endócrino é o sistema de comunicação química do organismo que regula as atividades, tais como a homeostase dos fluidos corporais, adaptação ao estresse, e talvez a mais importante, a reprodução e fertilidade que são necessárias para a propagação das espécies (KIME, 1998). Os alvos potenciais dos DE podem ser os receptores hormonais específicos das células alvo (onde podem atuar como inibidor ou induzir uma mudança conformacional), assim como também podem atuar sobre os processos metabólicos e ainda sobre enzimas que levam à síntese hormonal (Kloas e Lutz, 2006). Este trabalho foi utilizado um metal (cobre) e um herbicida (atrazina) para avaliar se interferem no sistema endócrino do *P. lineatus*, atuando como disruptores endócrinos na resposta adaptativa ao estresse causada pela exposição aérea e confinamento.

#### 1.4.1 Cobre

O cobre não é apenas um metal presente no ambiente, é também essencial para a função da maioria dos organismos vivos. Sua importância nestes organismos não pode ser subestimada. Ele pode servir como um componente essencial de metaloproteínas e macromoléculas. No entanto, em concentrações elevadas o cobre é tóxico para a vida celular (ZAVITSANOS et al., 2011). A contaminação aquática por cobre se dá por diferentes formas, ou seja, a partir de diferentes fontes naturais, pois é amplamente distribuído na natureza no estado elementar, sulfetos, arsenitos, cloretos e carbonatos (PEDROSO; LIMA, 2001) e antropogênica, incluindo esgotos industriais ou domésticos, águas da chuva, atividades portuárias e de navegação (AKTAR et al., 2010).

Diante da contaminação do meio ambiente por este metal, há grande interesse em conhecer seus efeitos sobre os organismos a ele expostos. Por isto, o

cobre vem sendo estudado como contaminante em diferentes animais aquáticos, como em rã (FERREIRA, 1978), em moluscos (GREIG, 1979) e várias espécies de peixes, onde citaremos apenas algumas, como em tilápia - *Oreochromis mossambicus* (PELROM et al., 1995), carpa - *Cyprinus carpio* (FLIK et al., 2002), truta arco-íris - *Oncorhynchus mykiss* (Gagnon et al., 2006) e uma espécie de carpa - *Carassius gibelio* (ARNAUDOV et al., 2008). Nestes animais foram avaliados diferentes aspectos, desde genotóxicos, passando-se para diferentes parâmetros fisiológicos, até aspectos comportamentais.

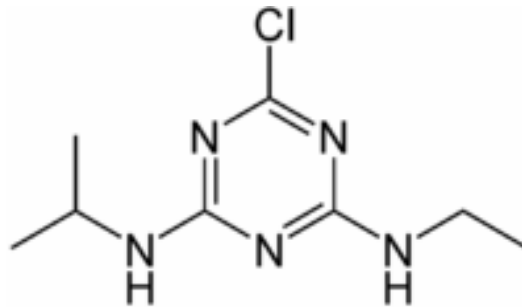
Os efeitos dos disruptores endócrinos têm sido uma importante questão para estudos na última década e o cobre pode atuar na desregulação endócrina (HANDY, 2003), inibindo a resposta adaptativa ao estresse em peixes e sua capacidade de retornar a homeostase (KIME, 1999). O cobre foi utilizado neste trabalho, pelo laboratório já realizar estudos tendo-o como contaminante no organismo do *P. lineatus*.

#### 1.4.2 Atrazina

A agricultura é a causa da contaminação aquática por atrazina (Figura 5). A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um herbicida de triazina, sua fórmula química é  $C_8H_{14}ClN_5$ , e é utilizado extensivamente para o controle pré ou pós-emergente de plantas invasoras de folhas largas e gramíneas, particularmente em milho. É um dos herbicidas mais utilizados em nível mundial, conseqüentemente, é um contaminante comum em águas superficiais e subterrâneas (CHOUNG et al., 2010). No sul do Brasil, a aquicultura ainda é considerada como uma atividade complementar à agricultura, e assim muitas lagoas utilizadas para o cultivo de peixe, estão localizadas ou dentro das áreas agrícolas ou próximos das nascentes que percorrem o solo cultivado. Por causa das pragas nas lavouras, grandes quantidades de agrotóxicos são inseticidas usados em lavouras e, como resultado, pequenas quantidades destes produtos podem atingir, tanto as nascentes dos rios, quanto as lagoas utilizadas para o cultivo de peixes (CERICATO et al., 2008). É conhecido que a atrazina pode afetar a secreção de cortisol (BISSON; HONTELA, 2002; NIEVES-PUIGDOLLER et al., 2007; FORTIN et al., 2008) e em altas concentrações, pode levar à inativação enzimática, peroxidação

lipídica, danos ao DNA e até mesmo à morte, como já observado em peixes (NWANI et al., 2010).

**Figura 5** – Estrutura química do herbicida atrazina.



**Fonte:** Extraído de Bisson e Hontela (2002).

A exposição à atrazina pode causar no organismo dos peixes, prejuízos no crescimento, na ionoregulação e na reprodução. Há alguns estudos que observam a ação deste herbicida promovendo distúrbios endócrinos (WIEGAND et al., 2001; BRINGOLF et al., 2004; SANDERSON, 2006; NIEVES-PUIGDOLLER et al., 2007).

O presente estudo foi realizado com a espécie *Prochilodus lineatus*, curimba (Figura 6). O *P. lineatus* é um peixe neotropical, teleósteo dulcícola, amplamente distribuído na bacia do Prata, onde representa 50-60% do ictiofauna total (Lombardi et al., 2010). Esta espécie é detritívora sendo capaz se incorporar contaminantes presentes não só na coluna de água, mas também em sedimentos (Lombardi et al., 2010) tornando-a um bom bioindicador para ambientes contaminados. É amplamente utilizada em projetos de piscicultura principalmente no sul do Brasil (VOLTOLIN et al., 2010).

*Prochilodus lineatus* é uma espécie de peixe nativa bastante estudada em nosso laboratório, tendo originado várias publicações (algumas delas, MADUENHO; MARTINEZ, 2008; SIMONATO et al., 2008; LANGIANO; MARTINEZ, 2008; CAMARGO et al., 2009) sobre diferentes aspectos, desde ecológicos, passando por estruturais, funcionais, bioquímicos e genotóxicos, diante de condições naturais, patológicas e adaptativas.

**Figura 6** – Juvenis de *Prochilodus lineatus*



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta de estresse no peixe *Prochilodus lineatus* com e sem a interferência do metal cobre e do herbicida atrazina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a variação temporal do cortisol e seus efeitos em *Prochilodus lineatus* submetidos ao estresse aéreo e confinamento (*estresse*);
- Verificar o efeito de um metal (cobre)\* e um herbicida (atrazina)\*\* na resposta de estresse deflagrada por exposição aérea e confinamento.

\**cobre + estresse*

\*\**atrazina + estresse*

### 3 MATERIAIS E METODOS

Foram utilizados juvenis de *P. lineatus*, pesando  $15 \pm 5$  g e medindo  $11,1 \pm 1,6$  cm (média  $\pm$  DP - desvio padrão, n=104) obtidos na Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina. Os peixes foram aclimatados por um período de no mínimo 5 dias (Temperatura =  $22,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ ; pH  $7,5 \pm 0,3$ ; oxigênio dissolvido =  $7,5 \pm 0,9$  mg  $\text{O}_2\text{L}^{-1}$ ; condutividade =  $123,4 \pm 9,7$   $\mu\text{S cm}^{-1}$ ; dureza =  $42,5 \pm 6,0$  mg $\text{CaCO}_3\text{L}^{-1}$ ), com fotoperíodo de claro e escuro de 12/12 h. A alimentação foi feita com ração comercial, Fish 42% - Integrada Cooperativa Agroindustrial, Brasil, a cada dois dias com interrupção de 48 h antes do experimento. Os animais não foram alimentados durante o experimento.

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

##### 3.1.1 Estresse Aéreo e Confinamento (*Estresse*)

Para o experimento, os peixes (6 animais por aquário) foram colocados em aquários de vidro contendo 80 L de água desclorada (Figura 7) por um período de 24 h.

- Para o tempo 0h (t0) os animais, que haviam ficado 24 h no aquário, foram submetidos ao *estresse* com rede de  $4,5\text{ cm}^3$  (Figura 7) ficando em exposição aérea e confinamento por 3 min. (Figura 8).
- Para o tempo 1h (t1) os animais ficaram 23 h no aquário, sendo submetidos ao *estresse* e transferidos para outro aquário por mais 1 h (Figura 8).
- Para o tempo 3h (t3) os animais ficaram 21 h no aquário, sendo submetidos ao *estresse* e transferidos para outro aquário por mais 3 h (Figura 8).
- Para o tempo 6h (t6) os animais ficaram 18 h no aquário, sendo submetidos ao *estresse* e transferidos para outro aquário por mais 6 h (Figura 8).

O estresse por confinamento é utilizado em vários estudos (PANKHURST; SHARPLES, 1992; VIJAYAN et al., 1997; JENTOFT et al., 2002), sendo o confinamento aplicado de formas variáveis. Neste trabalho, optou-se por confinar os animais individualmente, em uma rede de 4,5 cm<sup>3</sup> por 3 minutos.

**Figura 7** – (A) foto dos aquários de vidro (80 L) onde foram realizados os experimentos. (B) Rede onde os peixes foram submetidos ao estresse aéreo e confinamento (4,5 cm<sup>3</sup>).

(A)

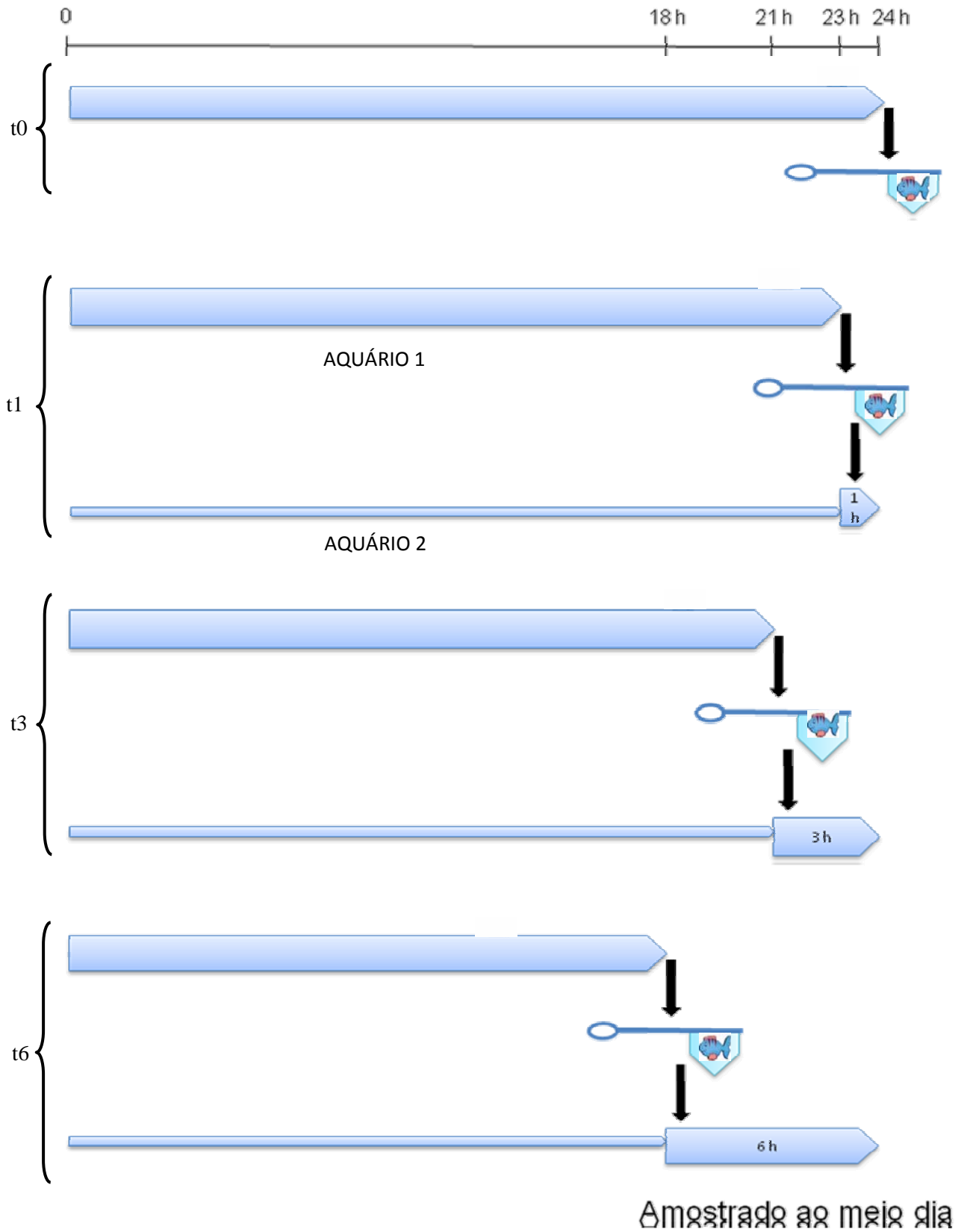


(B)



Para o grupo controle o desenho experimental utilizado foi o mesmo que o descrito acima, mas durante a transferência dos animais para o segundo aquário, **não** havia estresse aéreo e confinamento.

**Figura 8** – Esquema representando o desenho experimental dos testes de exposição para o grupo *estresse*.



### 3.1.2 Exposição ao Cobre (*cobre + estresse*)

Para exposição aguda de cobre os peixes foram colocados em aquários de vidro contendo 80 L de água desclorada (Figura 7) com concentração nominal de  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cu, sob a forma de cloreto de cobre diidratado (Acros Organics, EUA), por um período de 24 h (7 animais por aquário), sem renovação de água. O cobre foi colocado na água 3 h antes dos animais. Teve-se o cuidado de se utilizar uma concentração menor que a  $CL_{50}$  para o tempo de 96h, determinada por Mazon e Fernandes (1999) para a espécie.

O desenho experimental foi o mesmo descrito acima para a exposição aérea e confinamento, grupo *estresse* (Figura 8), e foram mantidos os 4 tempos experimentais, mas os aquários foram contaminados por cobre.

### 3.1.3 Exposição à Atrazina (*Atrazina + Estresse*)

Para exposição aguda de atrazina (Sigma-Aldrich, EUA) os peixes foram colocados em aquários de vidro contendo 80 L de água desclorada (Figura 7) com 80  $\mu\text{l}$  de atrazina, para uma concentração final de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , que equivale a 40% da concentração utilizada na lavoura e já utilizada em nosso laboratório, por um período de 24 h (7 animais por aquário). A atrazina foi colocada na água meia hora antes dos peixes serem colocados nos aquários e o delineamento experimental foi o mesmo utilizado para o grupo *estresse* (Figura 8), mas com os aquários contaminados com atrazina.

### 3.1.4 Amostragem

Os animais foram amostrados sempre ao meio dia. Para a amostragem os animais foram anestesiados com benzocaína ( $0,12 \text{ g.L}^{-1}$ ) para a retirada de sangue através da veia caudal com seringa lavada com heparina. O sangue foi armazenado em tubos plásticos para as análises hematológicas e as células foram separadas por centrifugação ( $1870\text{g}$ , 10 min). Foi realizada a morte por secção medular para a retirada das brânquias e fígado. Os arcos branquiais foram lavados com solução salina (NaCl, 154 mM e sacarose, 25 mM) e armazenados para as análises enzimáticas. Para a determinação da atividade da

Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA), os filamentos foram separados dos arcos branquiais e armazenados em tampão SEI (composição em mM: 300 de sacarose, 0,1 de EDTA e 30 de Imidazol) em *ultrafreezer* a -70° C. Para a verificação da atividade da enzima anidrase carbônica (AC) foram separados os filamentos dos arcos branquiais e armazenados a seco em tubos plásticos também em *ultrafreezer* -70° C. O fígado foi retirado e armazenado a seco em tubos plásticos em *ultrafreezer* -70° C para análise do conteúdo de glicogênio.

### 3.1.5 Análise da Água com Cobre

Para analisar as concentrações de cobre total e dissolvido onde os animais foram expostos, foi coletada a água dos aquários, os aquários onde os peixes foram colocados antes do estresse e após o estresse, no início e no término do experimento (Tabela 1). Para a análise do cobre total, a água foi coletada com uma seringa de vidro (10 mL) e acondicionada em tubos plásticos cônicos e adicionado 0,5% de (HNO<sub>3</sub> – FMaia, Brasil). Para a análise de cobre dissolvido as amostras de água foram filtradas (0,45 µm) e então foi adicionado 0,5% de HNO<sub>3</sub> (FMaia, Brasil). As amostras foram mantidas a 4° C até o momento das análises por ionização eletrotérmica de cobre em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA-AAAnalyst 700, Perkin Elmer, EUA), no modo forno de grafite.

### 3.1.6 Análises Hematológicas: Hematócrito, Hemoglobina e RBC

Para verificação do hematócrito, o sangue de cada animal foi colocado em um tubo capilar e centrifugado (1.200 g; 5 min) em centrífuga de micro-capilar (Luguimac – S. R. C., modelo LC-5, Argentina), para a separação das células e do plasma, e assim obter a estimativa de porcentagem de células sanguíneas.

Um volume (5 µL) de sangue foi adicionado a tampão formol citrato (citrato de sódio diluído em 0,4% de formol em solução) para a contagem do número de eritrócitos (RBC) em câmara de *Neubauer* ao microscópio óptico.

O conteúdo de hemoglobina foi estimado pelo método colorimétrico com cianeto da hemoglobina utilizando *kit* comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil). O Fe (II) da hemoglobina, oxihemoglobina e carboxihemoglobina, é oxidada para o estado férrico pelo ferricianeto, formando hemiglobina, que combina com o cianeto

ionizado para produzir cianeto de hemiglobina (HiCN), que é medido em 540 nm (Libra S32, Biochrom, Reino Unido) em espectrofotômetro.

Após as análises hematológicas o sangue foi centrifugado (1870 g, 15 min, centrífuga Hsiangtai, modelo MCD-2000) e o plasma separado e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para as demais análises plasmáticas. Com os resultados de RBC e hematócrito, foram calculados os valores de VCM (volume corpuscular médio) por meio da equação:  $\text{Hematócrito} \times 10/\text{RBC}$ ; HCM (hemoglobina corpuscular média) por meio da equação:  $\text{Hemoglobina} \times 10/\text{RBC}$  e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) com a equação:  $\text{Hemoglobina} \times 100/\text{Hematócrito}$ . O resultado de hematócrito foi expresso em porcentagem, a hemoglobina em gramas por decilitro ( $\text{g.dL}^{-1}$ ), o RBC em número de células por milímetro cúbico ( $\text{n}^{\circ}\text{cél.s.mm}^{-3}$ ), o VCM por micrômetro cúbico ( $\mu\text{m}^3$ ), HCM por ( $\text{pg.célula}^{-1}$ ) e CHCM em porcentagem.

### 3.1.7 Análise Endócrina e Metabólica: Glicose, Cortisol e Glicogênio Hepático

A glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase com *kit* comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (a 505 nm, Victor 3, Perkin Elmer, USA). O hormônio cortisol foi medido por imunoensaio com a utilização de *kit* comercial (Monobind Inc., USA) que utiliza um anticorpo anti-cortisol monoclonal biotilado e a absorbância lida em leitora de microplacas (450 e 620 nm, ELX 800, BioTek, USA). O resultado de glicose foi expresso em  $\text{mg.dL}^{-1}$  e o de cortisol em  $\text{ng.mL}^{-1}$ .

A determinação do glicogênio hepático foi realizada segundo método descrito por Bidinotto e colaboradores (1997). Foram incubadas 50 mg de fígado em tubos de ensaio com 1,0 mL de KOH 6,0N por 3 min em banho-maria a  $100^{\circ}\text{C}$ . Após a dissolução dos tecidos, foram transferidas para outro tubo de ensaio e logo adicionados 3 ml de etanol, 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (10%). Logo em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 3 min. O sobrenadante foi descartado por inversão e o precipitado ressuspenso em 2,5ml de água destilada. A dissolução foi analisada quanto ao seu teor de açúcares redutores totais pelo método hidrolítico ácido de Dubois e colaboradores (1956). Esta análise consiste na adição de 50  $\mu\text{L}$  de extrato a 500  $\mu\text{L}$  de fenol 4,1% e 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, rapidamente adicionado ao meio de reação e imediatamente resfriados. A

absorbância foi determinada em 480 nm (espectrofotômetro, Libra S32, Biochrom, Reino Unido). O conteúdo de glicogênio foi expresso em  $\mu\text{moles}$  de glicosil-glicose.mg de tecido<sup>-1</sup>.

### 3.1.8 Análises Osmorregulatórias: Na<sup>+</sup> plasmático, atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA) e da Anidrase Carbônica (AC)

As análises de sódio plasmáticos foram realizadas com amostras de plasma diluída em água deionizada, em fotômetro de chama (900, Analyser, Brasil), e expressas em relação a curva padrão de NaCl (de 0,35 a 2,8 mM). O resultado de sódio foi expresso em mM.

Para a atividade da NKA, os filamentos branquiais separados dos arcos foram homogeneizados em solução SEI - sacarose, EDTA e Imidasol (10x o peso) e centrifugados (7500 g, 15 min, 4° C). O sobrenadante foi usado para medir atividade da enzima NKA segundo o protocolo estabelecido por Quabius e colaboradores (1997) e adaptado para leitora de microplacas por Nolan (2000). Este ensaio consiste em medir a atividade da enzima de modo indireto através da produção de fosfato inorgânico proveniente da quebra de ATP, em amostras incubadas com KCl (fornece substrato para a NKA) e com ouabaína (inibidor da NKA), e como padrão foi utilizada uma solução padrão de fósforo 650  $\mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich). Os ensaios foram realizados em leitora de microplacas (620 nm, ELx 800, BioTek, USA).

Para a atividade da enzima AC, os filamentos branquiais foram homogeneizados com solução tampão (composição em mM: 225 de manitol, 75 de sacarose, 10 de TRIS e 10 de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) e centrifugados (7500 g, 15 min, 4° C). Uma amostra de 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi adicionada ao mesmo tampão e a uma solução de água saturada de CO<sub>2</sub>. O decaimento do pH foi monitorado por um tempo de 20 segundos a cada 4 segundos. O método foi estabelecido por Vitale e colaboradores (1999) e baseia-se na catálise da solução saturada de CO<sub>2</sub> com correspondente liberação de H<sup>+</sup>, e conseqüente decaimento do pH.

Ambas enzimas (NKA e AC) foram expressas por proteínas totais das amostras, quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando soro albumina bovina como padrão.

### 3.1.9 Análise Estatística

Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  EP (erro padrão da média). Os valores médios obtidos de cada parâmetro (em cada tempo experimental t0, 1, 3 e 6 h) foram submetidos ao teste *t* ou Mann-Whitney, dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância), para cada condição experimental:

- *estresse* (submetidos ao estresse aéreo e confinamento, comparado com o grupo *sem estresse*),
- *cobre + estresse* (submetido ao *estresse* com exposição ao cobre, comparando com *estresse* sem contaminante);
- *Atrazina + estresse* (submetidos ao *estresse* com exposição à atrazina, com *estresse* sem contaminante).

Foram considerados significativamente valores de  $P \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESTRESSE AÉREO E CONFINAMENTO (ESTRESSE)

#### 4.1.1 Análise de Cobre na Água

Os resultados obtidos da concentração de cobre nas águas dos aquários estão expressos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Valor da concentração medida de cobre ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), total e dissolvido, na água dos aquários onde os peixes foram expostos. (A) Aquários com respectivos tempos experimentais onde os peixes foram expostos antes de serem submetidos ao estresse aéreo e confinamento. (B) Aquários com respectivos tempos experimentais onde os peixes foram colocados logo após serem submetidos ao estresse aéreo e confinamento.

Antes do estresse – [ ] Cu $\mu\text{g.L}^{-1}$				
	Início		Término	
	Total	Dissolvido	Total	Dissolvido
t0	23,78	22,19	15,40	14,01
t1	21,74	18,53	18,13	16,62
t3	20,16	17,39	19,92	18,49
t6	22,37	20,03	20,44	19,76

(A)

Pós estresse – [ ] Cu $\mu\text{g.L}^{-1}$				
Tempo	Início		Término	
	Total	Dissolvido	Total	Dissolvido
t1	22,88	21,03	20,06	19,65
t3	24,64	22,64	21,59	21,08
t6	22,05	18,54	23,86	19,65

(B)

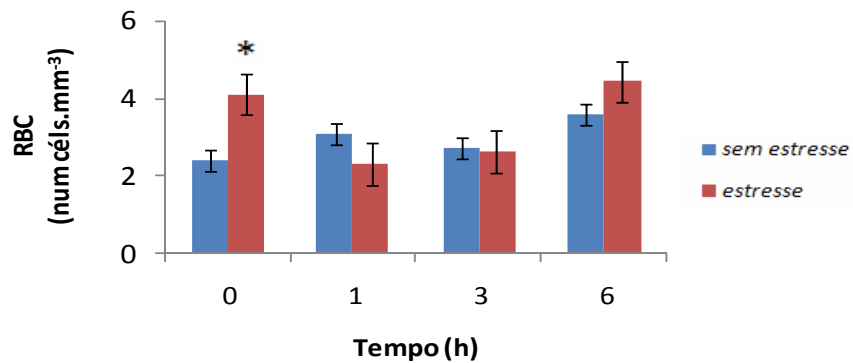
#### 4.1.2 Parâmetros Hematológicos

Como parâmetros hematológicos foram utilizados as seguintes análises: RBC, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM e CHCM. Quando os peixes foram submetidos ao *estresse*, somente no t0, foi observado aumento do RBC de  $2,40 \pm 0,23$  para  $4,11 \pm 0,4$  céls. $\text{mm}^{-3}$  ( $n = 5-6$ ,  $P \leq 0,05$ ; Figura 9A). Nos valores de hemoglobina não foi observado diferença estatística em nenhum tempo experimental (Figura 9B). Já para o hematócrito, após 1 h dos peixes serem submetidos ao

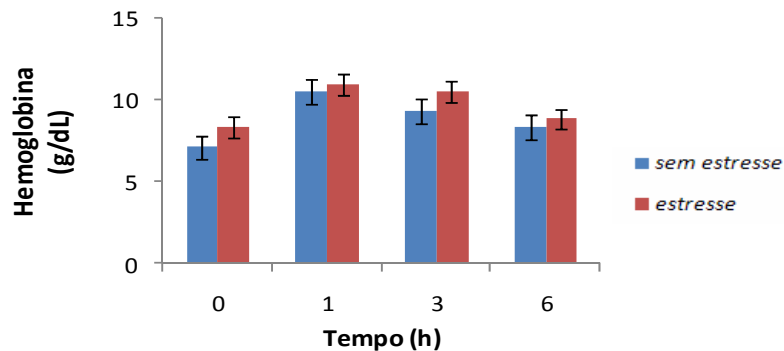
estresse, houve diminuição de  $35,17 \pm 0,87$  % para  $31,60 \pm 1,21$  %; ( $n= 5-6$ ,  $P \leq 0,05$ ; Figura 9C).

**Figura 9** – Número de eritrócitos - RBC (A), conteúdo de hemoglobina (B) e hematócrito (C) em *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente (t0) ou após 1, 3 e 6 h de serem submetidos ao estresse. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n= 4$  a  $6$ ). \* indica diferença em relação ao grupo *sem estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

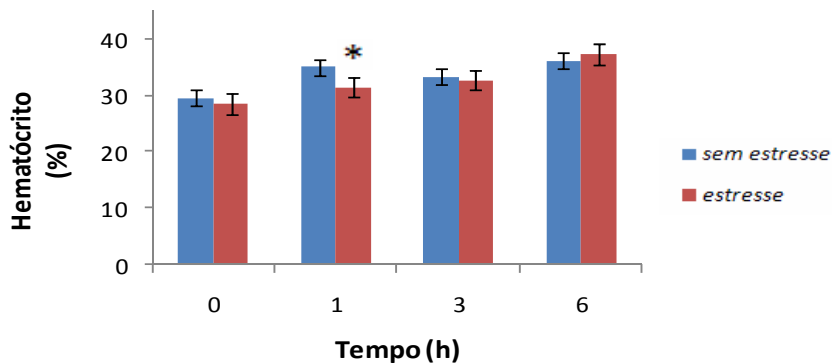
(A)



(B)



(C)



Foi observado que quando os peixes foram submetidos ao *estresse* o VCM, no t0, apresentou-se diminuído e em t1, apresentou-se aumentado (Tabela 2). A HCM do grupo submetido ao *estresse* mostrou-se diminuída em t0 e aumentada no t1 (Tabela 2). Não foi observada diferença do grupo submetido ao *estresse* em relação ao grupo *sem estresse* para os valores de CHCM (Tabela 2).

**Tabela 2** – Valores (média ± EP) de VCM, HCM e CHCM em *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente (t0) ou após 1, 3 e 6 h de serem submetidos ao *estresse* (n= 4 a 6). \*indica diferença em relação ao grupo *sem estresse*, para o mesmo tempo (P ≤ 0,05).

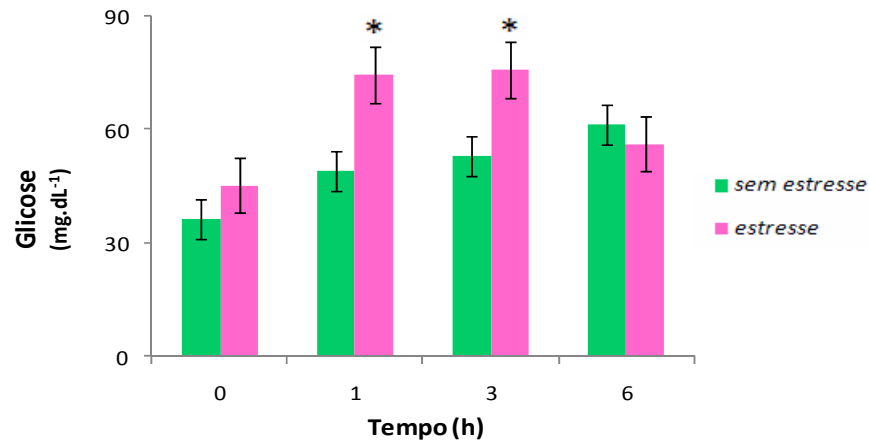
		VCM $\mu\text{m}^3$	HCM pg.células <sup>-1</sup>	CHCM %
t0	sem	113,11 ± 7,38	30,68 ± 3,04	24,49 ± 2,85
	<i>Estresse</i>	74,73* ± 8,74	20,26* ± 2,82	27,39 ± 2,75
t1	sem	105,93 ± 3,53	31,93 ± 2,84	29,90 ± 2,31
	<i>Estresse</i>	138,56* ± 4,0	46,79* ± 0,43	34,56 ± 1,11
t3	sem	126,13 ± 9,99	35,35 ± 4,42	27,57 ± 1,53
	<i>Estresse</i>	128,79 ± 9,04	37,26 ± 2,88	30,74 ± 1,10
t6	sem	95,51 ± 6,90	24,51 ± 3,67	22,93 ± 1,31
	<i>Estresse</i>	100,24 ± 4,18	20,49 ± 1,65	23,75 ± 1,37

#### 4.1.3 Parâmetro Endócrino e Metabólico

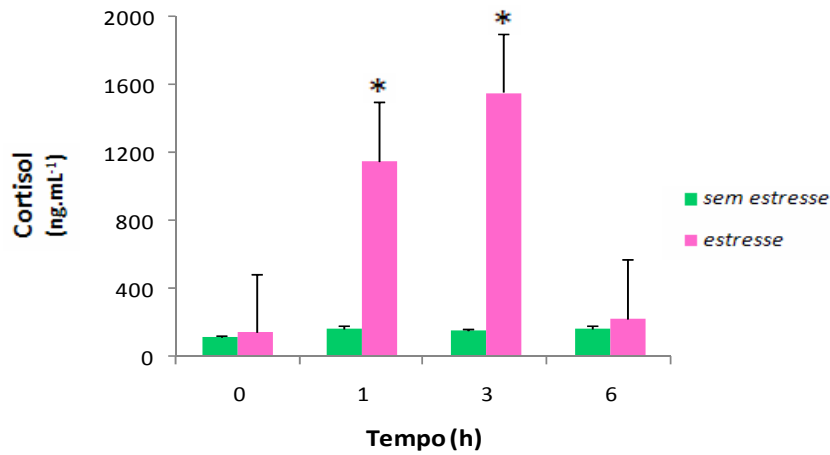
Como parâmetro endócrino foi utilizado a seguinte análise: cortisol. E como parâmetros metabólicos foram utilizados as seguintes análises: glicose plasmática e glicogênio hepático. A glicose plasmática dos peixes submetidos ao *estresse*, em t1, mostrou-se aumentada (de  $49,10 \pm 5,39$  para  $74,53 \pm 4,33$  mg.dL<sup>-1</sup>; n= 5-6, P ≤ 0,05; Figura 10A) assim como também para o t3 (de  $53,09 \pm 5,54$  para  $75,75 \pm 3,86$  mg.dL<sup>-1</sup>; n=4-6, P ≤ 0,05; Figura 10A). Assim como a glicose, o cortisol plasmático dos animais submetidos ao *estresse*, em t1 e t3, apresentou-se aumentado (de  $165,94 \pm 22,21$  para  $1157,91 \pm 237,38$  ng.mL<sup>-1</sup> e de  $154,52 \pm 26,20$  para  $1556,06 \pm 58,85$  ng.mL<sup>-1</sup> respectivamente; n= 4-6, P ≤ 0,05; Figura 10B). O glicogênio hepático apresentou-se diminuído em todos os tempos experimentais, sendo em t0 de  $2130,95 \pm 113,84$  para  $1724,03 \pm 88,54$   $\mu\text{mols glicosil-glicose.g}^{-1}$  tecido, em t1 de  $1975,11 \pm 148,25$  para  $1037,34 \pm 92,87$   $\mu\text{mols glicosil-glicose.g}^{-1}$  tecido, em t3 de  $1895,02 \pm 191,48$  para  $858,77 \pm 45,71$   $\mu\text{mols glicosil-glicose.g}^{-1}$  tecido e em t6 de  $1883,12 \pm 433,75$  para  $774,35 \pm 30,15$   $\mu\text{mols glicosil-glicose.g}^{-1}$  tecido (n= 4-6, P ≤ 0,05; Figura 10C).

**Figura 10** – Valores (média  $\pm$  EP) de glicose plasmática (A), cortisol plasmático (B) e conteúdo de glicogênio hepático (C) em *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 e 6 h de serem submetidos ao estresse. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão ( $n= 4$  a 6). \* indica diferença em relação ao grupo *sem estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

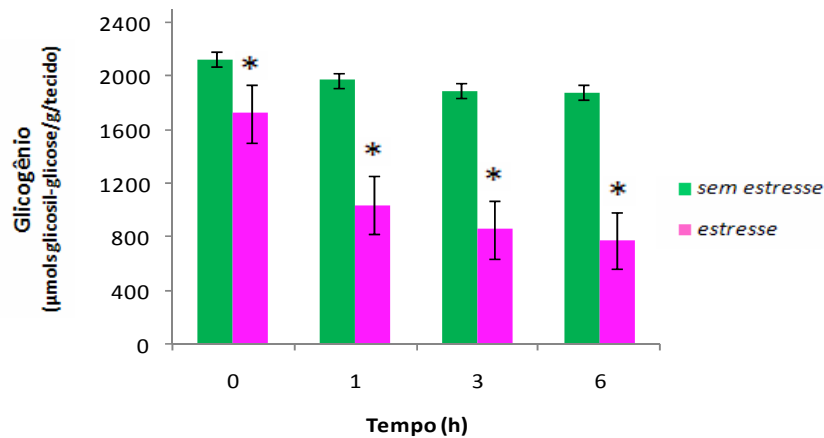
(A)



(B)



(C)

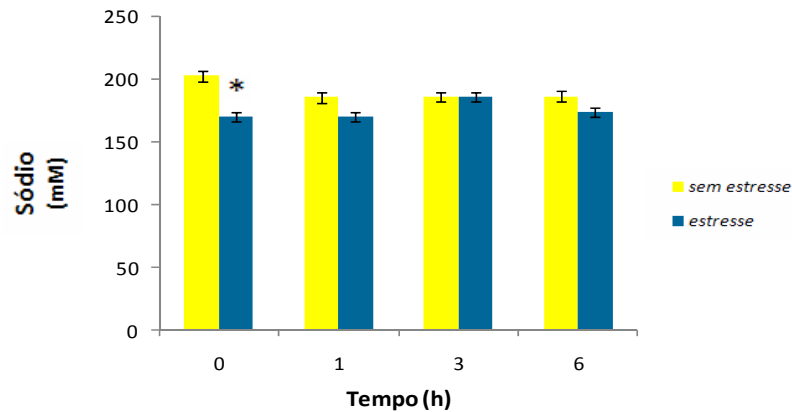


#### 4.1.4 Parâmetros Osmorregulatórios

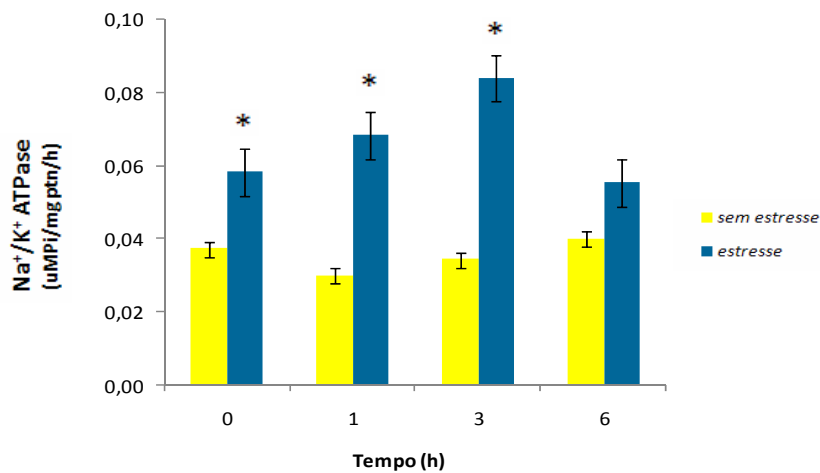
Como parâmetros osmorregulatórios foram utilizados as seguintes análises: sódio plasmático e atividades das enzimas NKA e AC. O sódio plasmático apresentou-se diminuído apenas em t0 de  $201,86 \pm 5,25$  para  $169,28 \pm 0,62$  mM (n= 5,  $P \leq 0,05$ ; Figura 11A). Quanto à atividade da NKA houve aumento nos tempos 0, 1 e 3 h (de  $0,04 \pm 0,00$  para  $0,06 \pm 0,00$   $\mu\text{MPi.mg}^{-1}$  ptn.h<sup>-1</sup>; de  $0,03 \pm 0,00$  para  $0,07 \pm 0,01$   $\mu\text{MPi.mg}^{-1}$  ptn.h<sup>-1</sup>; de  $0,03 \pm 0,00$  para  $0,08 \pm 0,01$   $\mu\text{MPi.mg}^{-1}$  ptn.h<sup>-1</sup>, respectivamente; n= 4-6,  $P \leq 0,05$ ; Figura 11B). Ao contrário da atividade da NKA, nos tempos 0, 1 e 3 h, a enzima AC apresentou-se diminuída, de  $3,12 \pm 0,23$  para  $1,92 \pm 0,27$  por g.ptn<sup>-1</sup>, de  $1,63 \pm 0,10$  para  $0,74 \pm 0,10$  por g.ptn<sup>-1</sup> e de  $1,75 \pm 0,13$  para  $0,98 \pm 0,19$  por g.ptn<sup>-1</sup>, respectivamente, mas com aumento em t6 de  $0,62 \pm 0,09$  para  $2,86 \pm 0,25$  por g.ptn<sup>-1</sup> (n= 4-5,  $P \leq 0,05$ ; Figura 11C).

**Figura 11** – Valores (média  $\pm$  EP) de sódio plasmático (A), atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (B) e atividade da enzima anidrase carbônica (C) em *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 e 6 h de serem submetidos ao estresse. As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 6). \* indica diferença em relação ao grupo *sem estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

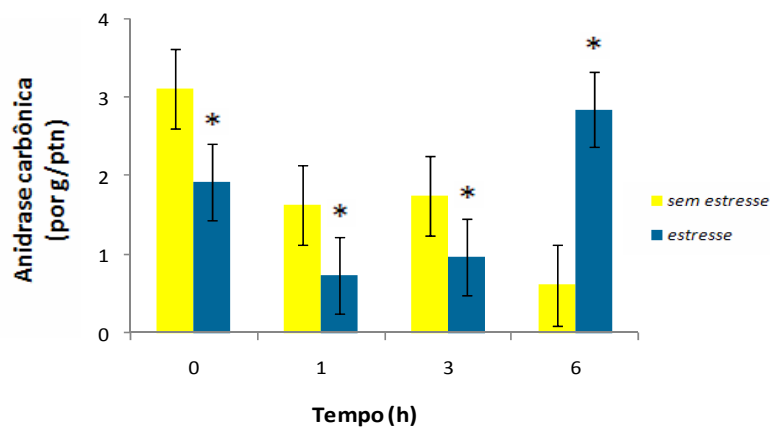
(A)



(B)



(C)



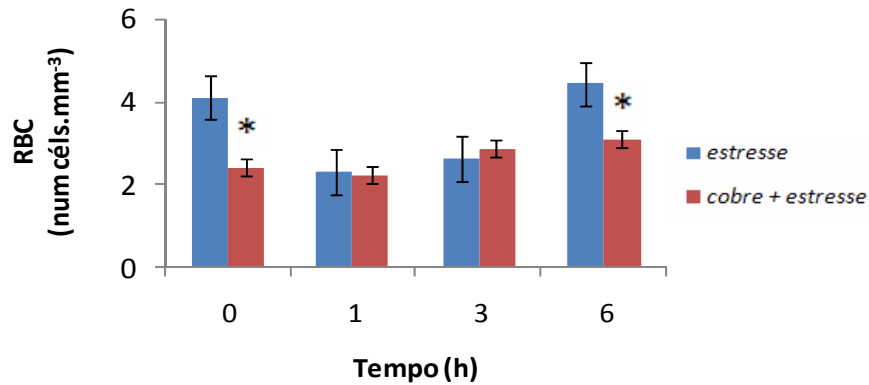
## 4.2 COBRE + ESTRESSE

### 4.2.1 Parâmetros Hematológicos

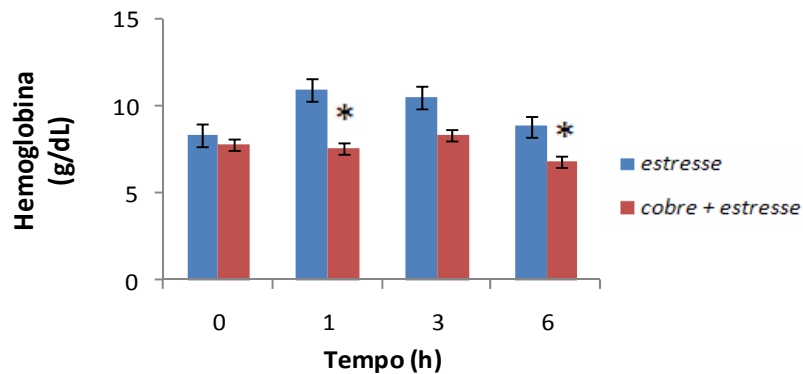
Quando os peixes foram expostos ao cobre e submetidos ao estresse o RBC apresentou-se diminuído em t0, de  $4,11 \pm 0,40$  para  $2,41 \pm 0,15$  céls.  $\text{mm}^{-3}$  (n= 5,  $P \leq 0,05$ ; Figura 12A), e em t6, de  $4,43 \pm 0,43$  para  $3,09 \pm 0,21$  céls.  $\text{mm}^{-3}$  (n=6,  $P \leq 0,05$ ; Figura 13A). Houve diminuição nos valores de hemoglobina em t1 e t6 (de  $10,88 \pm 0,28$  para  $7,57 \pm 0,32$   $\text{g.dL}^{-1}$  e de  $8,80 \pm 0,53$  para  $6,81 \pm 0,56$   $\text{g.dL}^{-1}$ , respectivamente, n= 5-7,  $P \leq 0,05$ ; Figura 12B). O hematócrito mostrou aumento em t0, de  $28,50 \pm 1,19$  para  $33,43 \pm 1,13$  % e diminuição em t3, de  $32,80 \pm 1,02$  para  $22,57 \pm 1,25$  % (n= 4-7,  $P \leq 0,05$ ; Figura 12C).

**Figura 12** – Número de eritrócitos - RBC (A), conteúdo de hemoglobina (B) e hematócrito (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *cobre + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \* indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

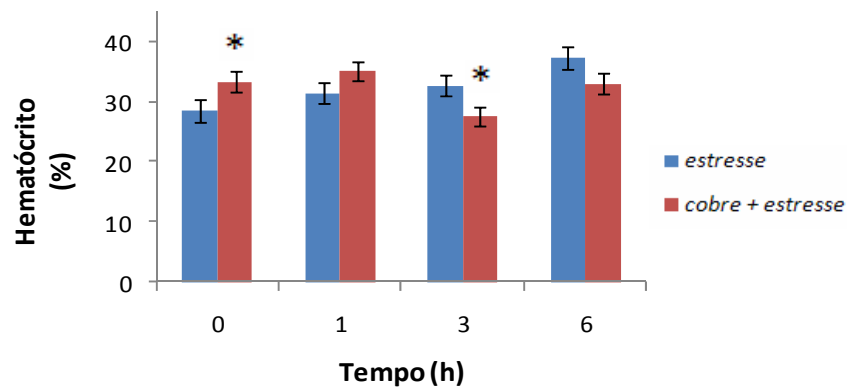
(A)



(B)



(C)



Houve aumento nos valores do VCM em t0, aumento da HCM também em t0, mas com diminuição em t1. O percentual de CHCM apresentou-se diminuído em t1 (Tabela 3).

**Tabela 3** – Valores (média  $\pm$  EP) de VCM, HCM e CHCM em *Prochilodus lineatus* na situação *cobre + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h), n= 4 a 7. \*indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

		VCM $\mu\text{m}^3$	HCM $\text{pg.células}^{-1}$	CHCM %
t0	<i>Estresse</i>	74,73 $\pm$ 8,74	20,26 $\pm$ 2,82	27,39 $\pm$ 2,75
	Cobre + <i>estresse</i>	136,24* $\pm$ 10,45	35,72* $\pm$ 3,16	26,84 $\pm$ 3,19
t1	<i>Estresse</i>	138,56 $\pm$ 4,0	46,79 $\pm$ 0,43	34,56 $\pm$ 1,11
	Cobre + <i>estresse</i>	158,48 $\pm$ 6,14	34,46* $\pm$ 2,26	21,65* $\pm$ 0,79
t3	<i>Estresse</i>	128,79 $\pm$ 9,04	37,26 $\pm$ 2,88	30,74 $\pm$ 1,10
	Cobre + <i>estresse</i>	117,79 $\pm$ 17,73	29,24 $\pm$ 3,93	36,53 $\pm$ 4,44
t6	<i>Estresse</i>	87,99 $\pm$ 8,87	20,49 $\pm$ 1,65	23,75 $\pm$ 1,37
	Cobre + <i>estresse</i>	112,63 $\pm$ 4,70	23,44 $\pm$ 3,20	20,59 $\pm$ 2,15

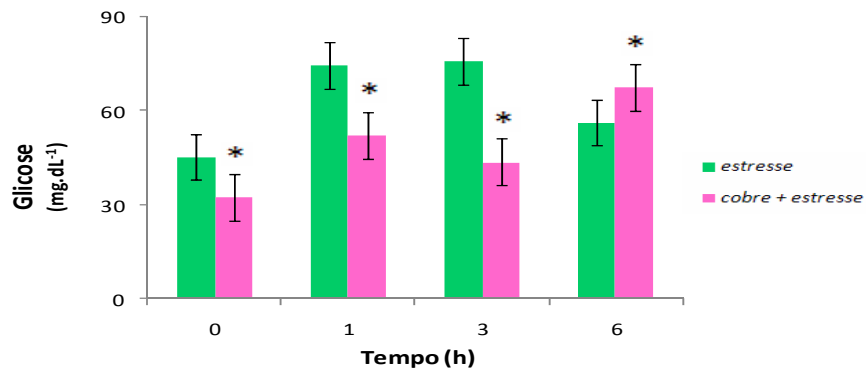
#### 4.2.2 Parâmetro Endócrino e Metabólico

A glicose plasmática apresentou-se diminuída no tempo zero de 45,38  $\pm$  2,27 para 32,39  $\pm$  1,67  $\text{mg.dL}^{-1}$ , no tempo de 1 h de 78,59  $\pm$  1,95 para 52,05  $\pm$  2,34  $\text{mg.dL}^{-1}$ , no tempo de 3 h de 75,75  $\pm$  3,86 para 43,65  $\pm$  4,62  $\text{mg.dL}^{-1}$  e aumentada no tempo de 6 h após o *estresse* de 56,33  $\pm$  2,49 para 67,68  $\pm$  3,06  $\text{mg.dL}^{-1}$  (n= 4-7,  $P \leq 0,05$ ; Figura 13A). O cortisol apresentou-se diminuído em todos os tempos experimentais, em t0 de 142,43  $\pm$  16,45 para 75,56  $\pm$  9,73  $\text{ng.mL}^{-1}$ , em t1 de 1147,91  $\pm$  237,38 para 92,99  $\pm$  2,58  $\text{ng.mL}^{-1}$ , em t3 de 1556,06  $\pm$  58,85 para 86,94  $\pm$  4,58  $\text{ng.mL}^{-1}$  e t6 de 222,92  $\pm$  34,86 para 77,35  $\pm$  4,07  $\text{ng.mL}^{-1}$  (n= 4-5,  $P \leq 0,05$ ; Figura 13B), assim como também houve diminuição do glicogênio em todos os tempos experimentais, em t0 de 1724,03  $\pm$  88,54 para 731,17  $\pm$  35,18  $\mu\text{mols glicosil-glicose.g}^{-1}$  tecido, em t1 de 1037,34  $\pm$  92,87 para 490,91  $\pm$  36,36  $\mu\text{mols glicosil-glicose.g}^{-1}$  tecido, em t3 de 858,77  $\pm$  45,71 para 496,10  $\pm$  39,10  $\mu\text{mols glicosil-glicose.g}^{-1}$  tecido.

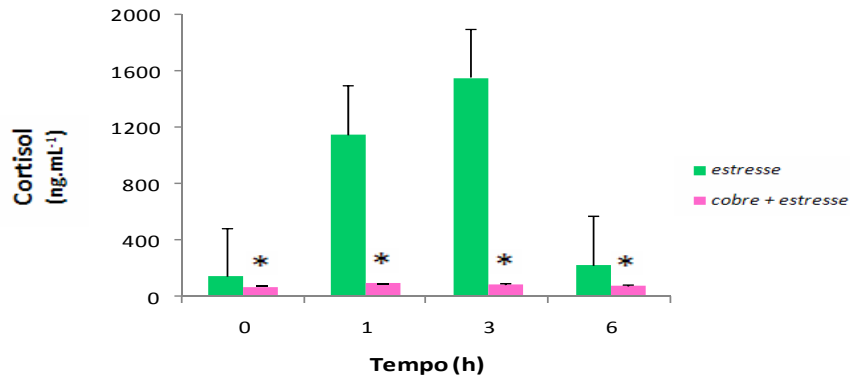
glicose.g<sup>-1</sup> tecido e em t6 de 774,35 ± 30,15 para 566,66 ± 23,62 μmols glicosil-glicose.g<sup>-1</sup> tecido (n= 4-5, P ≤ 0,05; Figura 13C).

**Figura 13** – Valores (média ± EP) de glicose plasmática (A), cortisol plasmático (B) e conteúdo de glicogênio hepático (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *cobre + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= de 4 a 7). \* indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo (P ≤ 0,05).

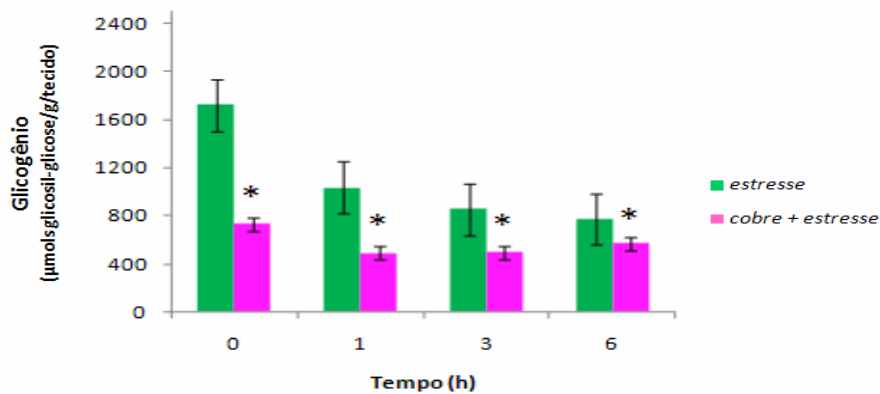
(A)



(B)



(C)

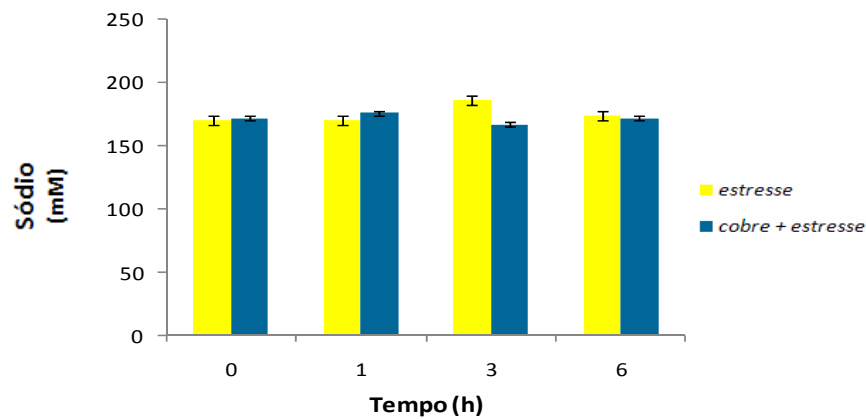


#### 4.2.3 Parâmetros Osmorregulatórios

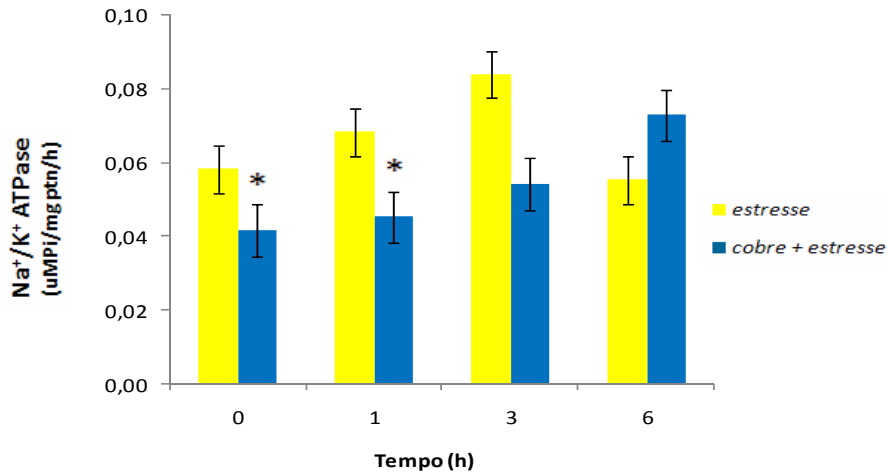
Os peixes na situação *cobre + estresse* não apresentaram diferença significativa nos valores de sódio plasmático (Figura 14A) nos tempos experimentais investigados. Para a atividade da NKA, foi observado diminuição em t0, de  $0,06 \pm 0,00$  para  $0,04 \pm 0,00$   $\mu\text{MPi.mg}^{-1}$   $\text{ptn.h}^{-1}$  e em t1 de  $0,07 \pm 0,01$  para  $0,05 \pm 0,00$   $\mu\text{MPi.mg}^{-1}$   $\text{ptn.h}^{-1}$  (n= 4-6,  $P \leq 0,05$ ; Figura 14B). Já a anidrase carbônica apresentou-se aumentada em t1 de  $0,74 \pm 0,10$  para  $1,88 \pm 0,25$  por  $\text{g.ptn}^{-1}$  e em t3 de  $0,98 \pm 0,19$  para  $2,99 \pm 0,34$  por  $\text{g.ptn}^{-1}$  (n= 4-5,  $P \leq 0,05$ ; Figura 14C).

**Figura 14** – Valores (média  $\pm$  EP) de sódio plasmático (A), atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (B) e atividade da enzima anidrase carbônica (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *cobre + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \*indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

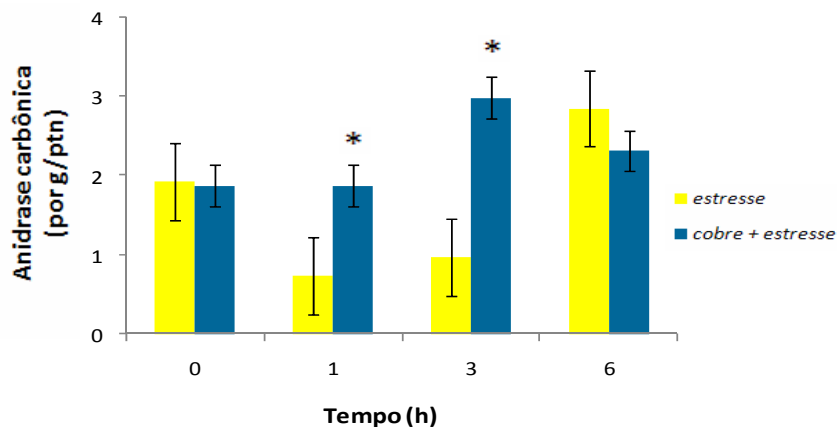
(A)



(B)



(C)



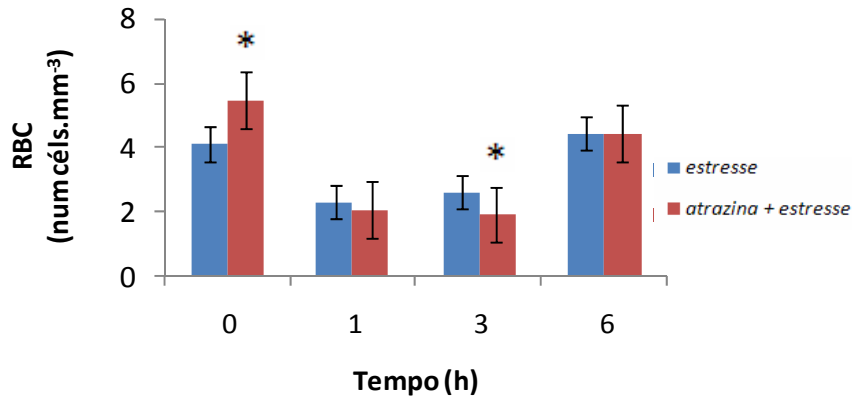
### 4.3 ATRAZINA + ESTRESSE

#### 4.3.1 Parâmetros Hematológicos

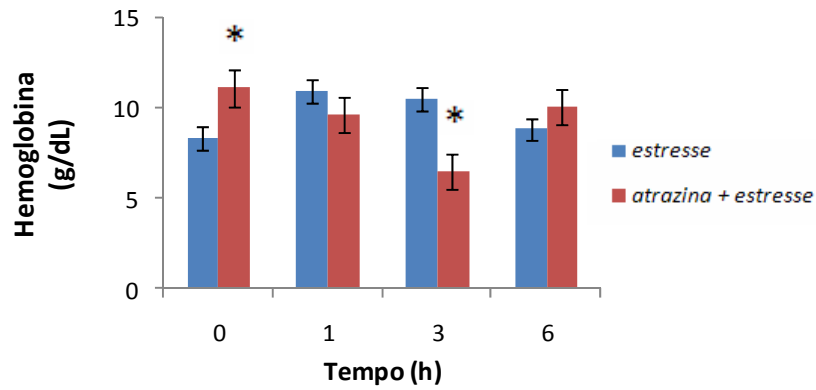
Na situação *atrazina + estresse*, os peixes apresentaram aumento do RBC em t0 e diminuição em t3 (de  $4,11 \pm 0,40$  para  $5,46 \pm 0,32$  céls.  $\text{mm}^{-3}$  e de  $2,63 \pm 0,16$  para  $1,92 \pm 0,15$  céls.  $\text{mm}^{-3}$ , respectivamente,  $n= 5-7$ ,  $P \leq 0,05$ ; Figura 15A). Para os valores de hemoglobina, foi observada a mesma resposta com aumento em t0 de  $8,31 \pm 0,68$  para  $11,06 \pm 0,76$  céls.  $\text{mm}^{-3}$  e diminuição em t3 de  $10,50 \pm 0,65$  para  $6,45 \pm 0,68$  céls.  $\text{mm}^{-3}$  ( $n= 5-6$ ,  $P \leq 0,05$ ; Figura 15B). O hematócrito apenas em t0 apresentou diferença e com aumentado de  $28,50 \pm 1,19$  para  $37,00 \pm 0,98$  % ( $n= 4-7$ ,  $P \leq 0,05$ ; Figura 15C).

**Figura 15** – Número de eritrócitos - RBC (A), conteúdo de hemoglobina (B) e hematócrito (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *atrazina* + estresse nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \* indica diferença em relação ao grupo estresse, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

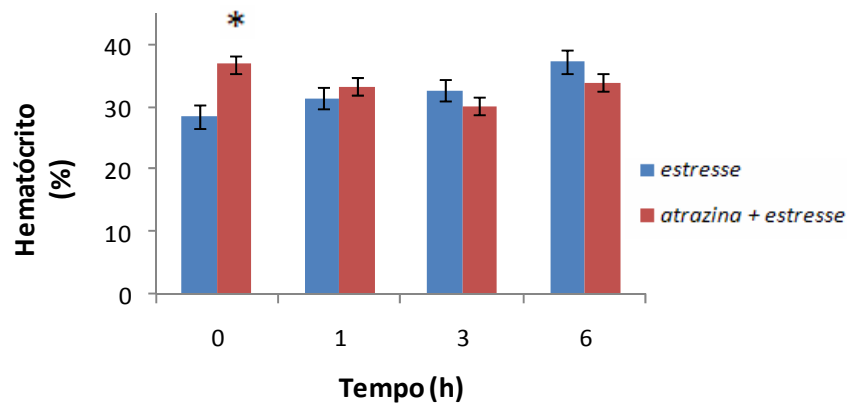
(A)



(B)



(C)



O valor do VCM aumentou em t3 e diminuiu em t6 na situação *atrazina + estresse*. Não foi observada diferença significativa nos valores de HCM em nenhum dos tempos experimentais. Já para CHCM, houve diminuição em t1 (Tabela 4).

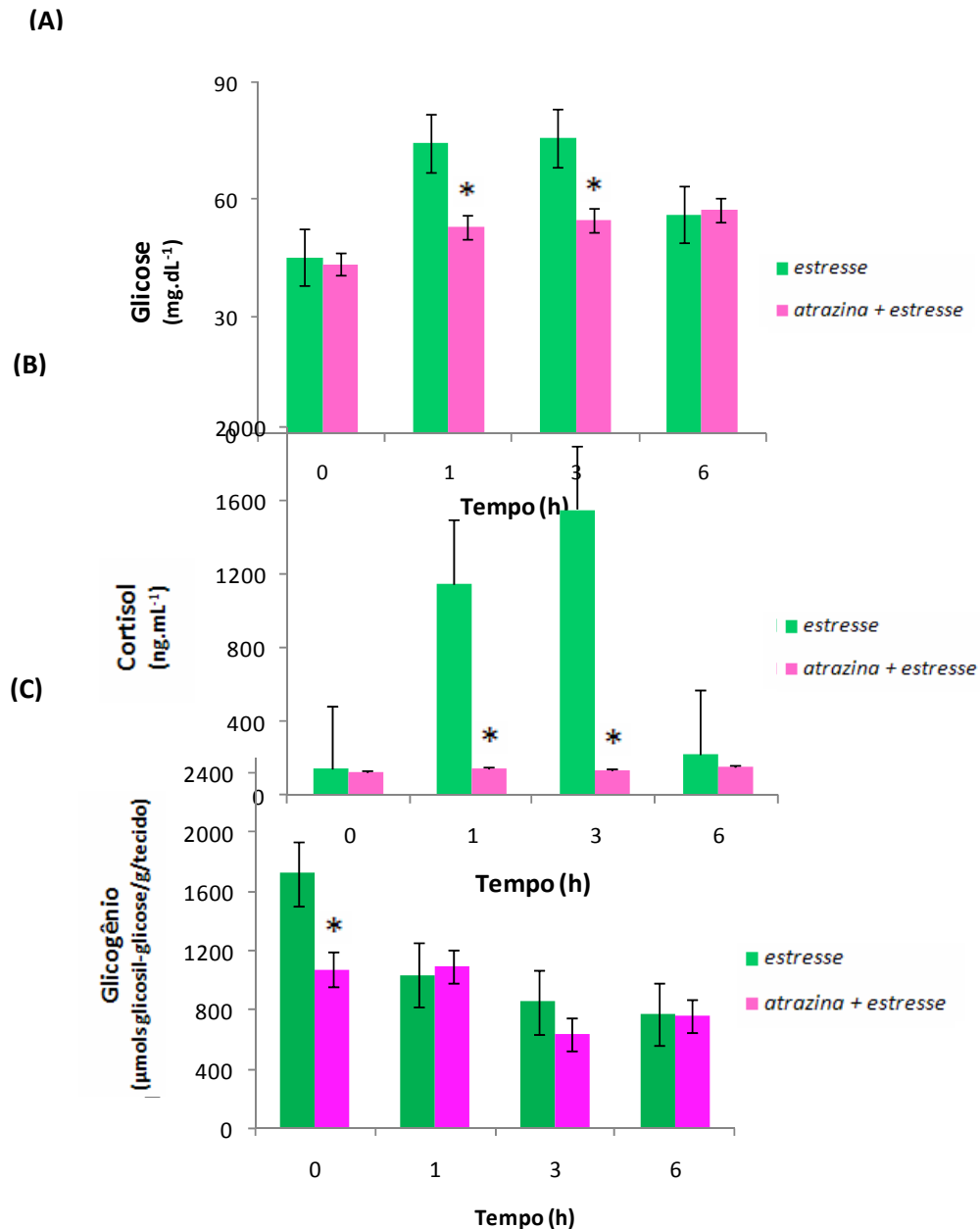
**Tabela 4** – Valores de VCM, HCM e CHCM em *Prochilodus lineatus* na situação *atrazina + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h), n= 4 a 7. \*indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

		VCM $\mu\text{m}^3$	HCM $\text{pg.células}^{-1}$	CHCM %
t0	<i>Estresse</i>	74,73 $\pm$ 8,74	20,26 $\pm$ 2,82	27,39 $\pm$ 2,75
	<i>Atrazina + estresse</i>	68,73 $\pm$ 3,35	19,97 $\pm$ 1,50	30,74 $\pm$ 2,07
t1	<i>Estresse</i>	138,56 $\pm$ 4,0	46,79 $\pm$ 0,43	34,56 $\pm$ 1,11
	<i>Atrazina + estresse</i>	182,93 $\pm$ 23,49	46,52 $\pm$ 9,52	25,43* $\pm$ 1,51
t3	<i>Estresse</i>	128,79 $\pm$ 9,04	37,26 $\pm$ 2,88	30,74 $\pm$ 1,10
	<i>Atrazina + estresse</i>	156,79* $\pm$ 5,51	37,41 $\pm$ 4,50	24,24 $\pm$ 3,84
t6	<i>Estresse</i>	87,99 $\pm$ 8,87	20,49 $\pm$ 1,65	23,75 $\pm$ 1,37
	<i>Atrazina + estresse</i>	68,55* $\pm$ 3,50	21,25 $\pm$ 1,21	26,28 $\pm$ 1,51

#### 4.3.2 Parâmetro Endócrino e Metabólico

Os peixes na situação *atrazina + estresse* apresentaram a glicose plasmática diminuída nos tempos 1 e 3 h (de 78,59  $\pm$  1,95 para 53,12  $\pm$  4,64  $\text{mg.dL}^{-1}$  e de 75,75  $\pm$  3,86 para 54,82  $\pm$  0,99  $\text{mg.dL}^{-1}$ , respectivamente, n= 4-5,  $P \leq 0,05$ ; Figura 16A). Igualmente, o cortisol plasmático apresentou-se diminuído nos tempos 1 e 3 h (de 1147,91  $\pm$  237,38 para 148,46  $\pm$  22,10  $\text{ng.mL}^{-1}$  e de 1556,06  $\pm$  58,85 para 135,43  $\pm$  5,95  $\text{ng.mL}^{-1}$ , respectivamente, n= 4-5,  $P \leq 0,05$ ; Figura 16B). O glicogênio hepático mostrou-se diminuído em t0, de 1724,03  $\pm$  88,54 para 1075,76  $\pm$  65,10  $\mu\text{mols glicosil-glicose.g}^{-1}$  tecido (n= 6,  $P \leq 0,05$ ; Figura 16C).

**Figura 16** – Valores (média  $\pm$  EP) de glicose plasmática (A), cortisol plasmático (B) e conteúdo de glicogênio hepático (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *atrazina + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \* indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).



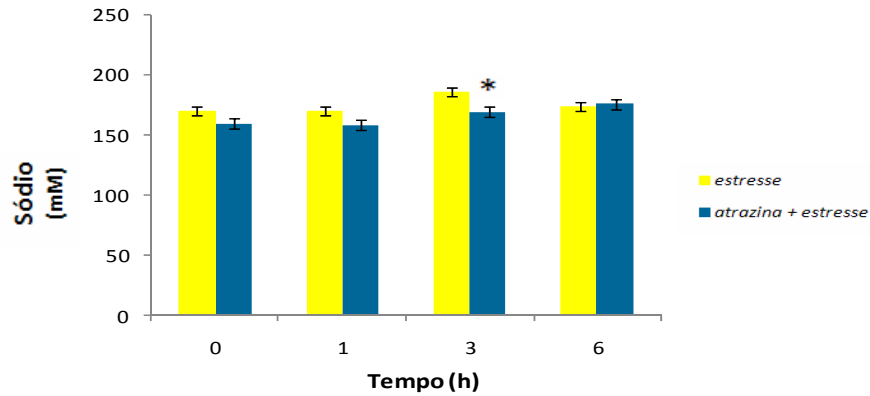
#### 4.3.3 Parâmetros Osmorregulatórios

O sódio plasmático apresentou-se diminuído em t3 na situação *atrazina + estresse*, de  $185,08 \pm 3,36$  para  $168,75 \pm 6,60$  mM, n= 4-6,  $P \leq 0,05$ ; Figura 17A. Houve diminuição da atividade da enzima NKA em t1 de  $0,07 \pm 0,01$  para  $0,02 \pm 0,00$   $\mu\text{MPi.mg}^{-1}$  ptn.h<sup>-1</sup> e em t3 de  $0,08 \pm 0,01$  para  $0,04 \pm 0,00$   $\mu\text{MPi.mg}^{-1}$

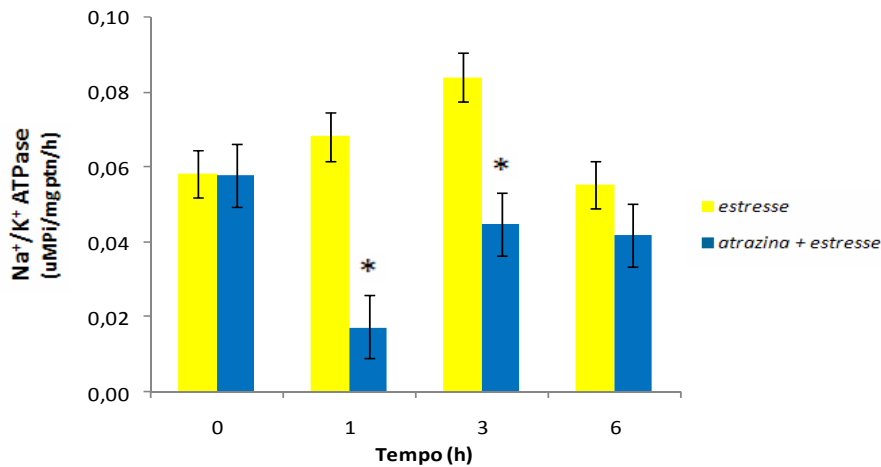
$^1 \text{ ptn.h}^{-1}$  ( $n= 4$ ,  $P \leq 0,05$ ; Figura 17B). Já a anidrase carbônica apresentou-se aumentada nos tempos zero de  $1,92 \pm 0,27$  para  $3,38 \pm 0,16$  por  $\text{g.ptn}^{-1}$  e no tempo de 1 h de  $0,74 \pm 0,10$  para  $2,46 \pm 0,38$  por  $\text{g.ptn}^{-1}$ , e diminuída no tempo de 6 h de  $2,86 \pm 0,25$  para  $1,53 \pm 0,10$  por  $\text{g.ptn}^{-1}$  ( $n= 5-7$ ,  $P \leq 0,05$ ; Figura 17C).

**Figura 17 –** Valores (média  $\pm$  EP) de sódio plasmático (A), atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (B) e atividade da enzima anidrase carbônica (C) em *Prochilodus lineatus* na situação *atrazina + estresse* nos diferentes tempos experimentais (0, 1, 3, e 6h). As colunas representam as médias e as linhas verticais o erro padrão (n= 4 a 7). \* indica diferença em relação ao grupo *estresse*, para o mesmo tempo ( $P \leq 0,05$ ).

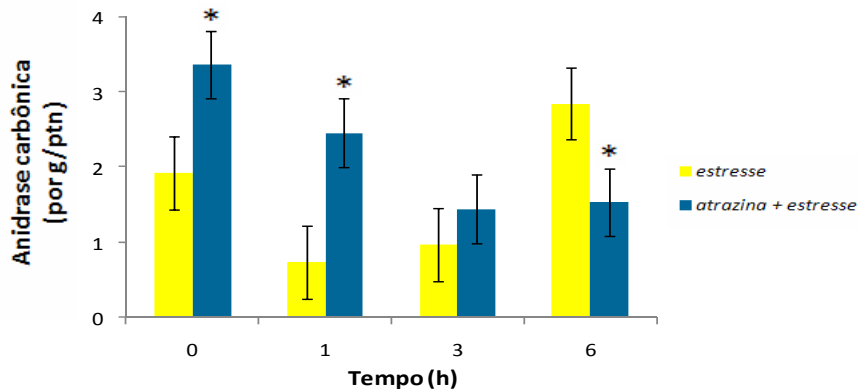
(A)



(B)



(C)



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ESTRESSE AÉREO E CONFINAMENTO (*ESTRESSE*)

O papel das catecolaminas e glicocorticóides já é conhecido em teleósteos (WENDELAAR BONGA, 1997). Primariamente, o estresse ativa o eixo HSC com liberação de catecolaminas pelas células cromafins e mais lentamente, a ativação do eixo HPI com liberação de cortisol pelas células interrenais (BARTON, 2002). A adrenalina aumenta imediatamente após o estresse, e isto resulta em rápida quebra do glicogênio hepático e conseqüentemente, numa maior concentração de glicose no sangue (PANKHURST, 2010). Isto foi confirmado no trabalho realizado por Vijayan e colaboradores (1997) que, após observarem o efeito do estresse em Tilápia (*Oreochromis mossambicus*) submetida a 2 h de confinamento, mostrou o aumento da glicose proveniente da glicogenólise. Enquanto a enzima chave da gliconeogênese, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), permaneceu inativa. No presente trabalho, os peixes apresentaram diminuição do glicogênio hepático em t<sub>0</sub>, mas não foi acompanhado pelo aumento significativo de glicose no sangue. No entanto, há evidência de glicogenólise, com a diminuição do glicogênio, o que demonstra a ativação do eixo HSC com liberação de adrenalina. Esta ausência da variação de glicose pode ser explicada pela rápida amostragem logo após o estresse de 3 min, onde pode ter havido liberação não significativa de glicose no sangue e/ou uma rápida metabolização, já que o peixe estava no processo “luta e fuga” do estresse. O peixe dourada (*Sparus aurata L.*) foi submetido ao estresse aéreo por 3 min em gaiola de arame e logo após foram devolvidos ao tanque (ARENDS et al., 1999). Somente na amostragem de 30 min após a exposição ao ar foi observado uma elevação de cerca de 75% da glicose plasmática em relação aos peixes controles. Este estudo sugere que no tempo zero de estresse no *P. lineatus*, pode estar no início da liberação da glicose plasmática sem a detecção de aumento significativo, mas detectada em t<sub>1</sub> e t<sub>3</sub> o que corrobora estes dados.

Outra evidência da ativação do eixo HSC com liberação de adrenalina é o aumento de RBC, diminuição do VCM e HCM observados neste trabalho em t<sub>0</sub>. A exposição ao ar induz hipoxia, (ARENDS et al., 1999) com diminuição de oxigênio no sangue e liberação das catecolaminas

(predominantemente, adrenalina em teleósteos) como resposta compensatória que visa otimizar a função cardiovascular e respiratória (FABRI et al., 1998). O baço é um reservatório de eritrócitos e quando o peixe necessita de maior capitação de oxigênio, há contração deste órgão e liberação de eritrócitos imaturos no sangue (VALENZUELA et al., 2005). Esta contração é mediada por receptores  $\alpha$ -adrenérgicos para adrenalina (Wendelaar Bonga, 1997) e pode ser induzida pelo estresse (EVANS, 2009). Isto explica os achados com *P. lineatus* que apresentou aumento do RBC com diminuição do VCM e HCM, uma vez que os eritrócitos liberados estão imaturos.

O sódio plasmático, em t0, apresentou-se diminuído, isto pode ter ocorrido devido à própria exposição ao ar e a não capitação de sódio do meio externo, já que a reposição deste e outros íons são através da água e alimentação e estes peixes não retornaram a água sendo imediatamente amostrados. Para manter o fluído corpóreo e a homeostase osmoiônica, os teleósteos de água doce tentam compensar a perda passiva de eletrólitos através da tomada ativa de íons, pelas brânquias, mediada pelas células cloreto. Um dos mecanismos para esta compensação é a ativação da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (Hirose et al., 2003). A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase é altamente expressa em células cloreto, é uma ATPase eletrogênica, densamente localizada na membrana basal e gera a força motriz para o transporte de íons, incluindo o sódio (HIROSE et al., 2003). A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase, nas brânquias de *P. lineatus*, apresentou-se aumentada, refletindo a tentativa de capitação de sódio para a manutenção da homeostase.

A exposição de *P. lineatus* ao estresse promoveu o aumento do cortisol plasmático nos t1 e 3h. Há na literatura informações variáveis sobre a ação e liberação do cortisol. O que gera esta variação está relacionado às diferenças entre as espécies e os métodos empregados para gerar o estresse e aumentar os níveis deste hormônio. Assim como também podem ser causas de variação, o procedimento de amostragem, mudanças sazonais, fotoperíodo, condições nutricionais e maturação sexual dos peixes (MOMMSEN et al., 1999). No estudo realizado por Barton e colaboradores (2000), esturjão (*Scaphirhynchus albus*) foram transportados por 7,5 h em tanques apropriados, passada 1 h após final de transporte os animais apresentaram aumento do cortisol plasmático. Um estudo para verificar o tempo de liberação do cortisol em tilapia (*Oreochromis mossambicus*), utilizou outro tipo de estímulo estressor, a mudança de salinidade, onde o cortisol

apresentou um aumento máximo após 3 h em água do mar, e permaneceu elevado por 3 dias (KAMMERER et al., 2010). Independentemente do estímulo estressor, há o consenso de que o cortisol é o hormônio liberado em resposta ao estresse em teleósteos. Ele ativa um conjunto de respostas bioquímicas e fisiológicas, incluindo aumento da glicose plasmática e diminuição no conteúdo de glicogênio hepático, aumento do ritmo cardíaco e aumento do fluxo de sangue para as brânquias, entre outras (HONTELA, 1998). Além disto, o cortisol não só aumenta o número de células cloreto nas brânquias, mas também a expressão de  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  (Hirose et al., 2003). Alguns destes efeitos puderam ser observados no *P. lineatus* que apresentou a glicose plasmática elevada nos tempos de 1 e 3 h após estresse acompanhada de glicogênio hepático diminuído e atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  aumentada. O cortisol, quando injetado em carpa (*Cyprinus carpio*), após 24 e 72 h, promoveu a elevação da glicose plasmática quase duas vezes maior que a dos animais controle e ainda era 50% maior após 216 h (DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA et al., 2003). Um estudo sobre o efeito do cortisol na liberação da glicose plasmática e na glicogenólise, foi realizado por Barton e colaboradores (1987) onde juvenis de truta arco-íris (*Salmo gairdneri*) eram alimentadas diariamente com ração suplementada de cortisol durante 10 dias. O trabalho tinha o objetivo de determinar os efeitos a longo prazo do cortisol sobre o crescimento e a resposta ao estresse. Durante o estudo foi observado que o crescimento e o glicogênio hepático foram reduzidos e a glicose plasmática foi aumentada. Laiz-Carrión e colaboradores (2002) injetaram uma dose de cortisol no peixe dourada (*Sparus auratus*), para atingir os níveis circulantes semelhantes ao observado durante a adaptação ao estresse. O trabalho tinha como objetivo avaliar como a elevação dos níveis deste hormônio afeta as capacidades metabólicas e osmorregulatórias, e foi observado que o cortisol eleva os níveis plasmáticos de glicose, promove glicogenólise no fígado e aumenta a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  branquial. Tilápia (*Oreochromis mossambicus*) após receber cortisol via alimento por 5 dias e apresentou não só aumento do número das células cloreto, mas também da densidade de  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  nestas células (DANG et al., 2000).

Quanto aos parâmetros hematológicos, o *P. lineatus* apresentou, no t1, hematócrito diminuído, VCM e HCM aumentados. As variações observadas em VCM e HCM podem ser explicadas pelo inchaço que ocorre nos eritrócitos após estímulo adrenérgico. O estresse agudo libera catecolaminas na circulação,

reduzindo, na maioria dos casos, o conteúdo de oxigênio celular e a oferta aos tecidos, como já mencionado anteriormente, podendo causar danos às brânquias e a acidificação do sangue. As catecolaminas se ligam ao receptor  $\beta$ -adrenérgico do eritrócito ativando a adenilato ciclase. Elevação do AMP cíclico ativa o trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  na membrana do eritrócito causando o aumento intracelular da concentração de sódio, alcalinizando o meio intracelular e acidificando o meio extracelular. Conseqüentemente a concentração de bicarbonato aumenta no meio intracelular causando um desequilíbrio do trocador de ânions, ocorrendo um movimento de cloreto para dentro e bicarbonato para fora da célula. O influxo de sódio e cloreto é seguido por água e os eritrócitos incham (NIKINMAA, 1992).

Uma possibilidade da diminuição do hematócrito após 1 hora do estresse aéreo seria pela hemólise das células inchadas ao passarem pelo próprio baço. O conhecimento da destruição de células vermelhas de mamíferos pelo baço já é bem antigo. Em 1944, Ponder publicou uma revisão mostrando que o baço é um órgão que destrói células vermelhas, descreveu que as células vermelhas quando expostas a solução salina hipotônica, aumentam seu volume e sofrendo hemólise pelo baço. Entretanto esta resposta adrenérgica observada no tempo zero, pelo aumento de RBC e diminuição de VCM, não pode ser evidenciada pelo inchaço de eritrócitos que só ocorreu após 1 h do *estresse*. Já 3 e 6 h após o *estresse*, todos os parâmetros hematológicos foram restabelecidos.

Nossos dados sugerem que, a variação da atividade da anidrase carbônica, nas condições onde *P. lineatus* estava sobre *estresse*, parece ser sensível à variação da NKA, pois se a NKA apresenta-se aumentada a AC apresenta-se diminuída.

Assim como os parâmetros hematológicos, após 6 h que os juvenis de *P. lineatus* foram submetidos ao *estresse*, o nível de glicose e cortisol plasmático não era diferente aos dos animais *sem estresse*. Isto provavelmente reflete que a fase adaptativa tem seu efeito até 6 h após o *estresse*, retornando a homeostase após este período. Apenas o glicogênio permaneceu com valores diminuídos em conseqüência da glicogenólise ocorrida durante a fase adaptativa e por não serem alimentados neste período, não podendo assim repor reserva.

## 5.2 COBRE + ESTRESSE

A resposta imediata ao estresse é a liberação de catecolaminas pelas células cromafins. Handy (2003) estudou os efeitos crônicos da exposição ao cobre sobre as funções neuroendócrinas em diferentes espécies de peixes. O autor sugeriu que a morfologia do rim permanece intacta durante a exposição crônica ao cobre e, segundo ele, isto suportaria a idéia de que o rim estaria mantendo a liberação de catecolaminas. Se em algumas espécies o cobre não interfere na liberação das catecolaminas, como sugerido pelo autor citado acima, em *P. lineatus* na situação *cobre + estresse*, a liberação de adrenalina, através de alguns parâmetros hematológicos obtidos, pode não estar atuando.

Os resultados das análises hematológicas na situação de *cobre + estresse* sugerem algumas mudanças em relação àquelas da resposta ao *estresse*, anteriormente discutidas. Quando *P. lineatus* foi submetido ao *cobre + estresse*, em t0, foi observado aumento do hematócrito e do VCM, o que sugeriria a ação da adrenalina promovendo a ativação do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  dos eritrócitos levando ao inchaço celular (já discutido acima). No entanto, no peixe submetido apenas ao *estresse* ocorreu a diminuição do RBC que havia se apresentado elevado neste mesmo tempo (pela liberação de eritrócitos imaturos), esta seria uma outra resposta à ação adrenérgica. Assim, nossos dados indicam uma alteração do efeito adrenérgico sobre os parâmetros hematológicos estudados. Por outro lado, outra possibilidade seria a hipertrofia dos eritrócitos causada pela citotoxicidade do cobre e esta seria corroborada pelo aumento da HCM. Um estudo (ARNAUDOV et al., 2008) realizado com *Carassius gibelio* para avaliar a influência do cobre e zinco nos parâmetros métricos dos eritrócitos expostos por 96 h em 3 diferentes concentrações, revelou que houve aumento dos eritrócitos quando expostos a maior concentração de cobre estudada ( $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ). Os autores sugerem que este aumento pode ser explicado pelo aparecimento de células hipertrofiadas, acompanhado de aumento de hemoglobinas, causando anisocitose (alteração no tamanho das células com presença de células tanto pequenas como grandes). Esta provavelmente seria por uma reação compensatória, já que diante de um agente estressor, há aumento do metabolismo na tentativa de combater o agressor, e isto requer um aporte maior de oxigênio e que se não houver a liberação de eritrócitos pelo baço (não observado aqui), seria fornecido pelo maior conteúdo de

hemoglobinas nos eritrócitos. O fato de em *Carassius gibelio* esta hipertrofia ocorrer em 96 h de exposição ao cobre, não implica que em *P. lineatus* esta resposta não possa estar ocorrendo em 24 h de exposição.

No presente trabalho, a exposição dos animais ao cobre levou, em diferentes tempos, à diminuição dos valores de hemoglobina, diminuição no RBC, assim como do hematócrito em relação à situação somente de estresse. Dentre esses dados, a variação de hematócrito poderia sugerir perda celular, no entanto, os valores de RBC e hemoglobina variou ao longo dos diferentes tempos experimentais, sugerindo que com a exposição ao cobre, não há alteração em seus valores.

O cortisol apresentou-se diminuído, em relação à situação de estresse (sem cobre), em *P. lineatus* em todos os tempos experimentais. Segundo Kime (1999), metais traços como cobre promovem inibição da resposta ao estresse em peixes, e desajuste da atividade interrenal, podendo afetar a capacidade dos peixes para lidar com situações de estresse.

Alterações de precursores, como o colesterol, podem resultar em variação na biossíntese dos hormônios esteróides, como o cortisol (JANZ, 2000). O cobre é um metal que pode atuar como disruptor endócrino (DE) em organismos aquáticos (HANDY, 2003). Uma das possibilidades da atuação do cobre como um DE na diminuição de cortisol é através da inibição da esteroidogênese. O passo limitante da síntese dos hormônios esteróides é o movimento de colesterol através da membrana mitocondrial mediada pela proteína StAR (regulação aguda da esteroidogênese) que promove a conversão do colesterol em pregnenolona (precursor dos hormônios esteróides) no tecido interrenal de peixes e outros grupos (ARUKWE, 2008). Esta proteína desempenha um papel importante na esteroidogênese transferindo o colesterol para a CYP450scc para a conversão em pregnenolona (Stocco, 2000). A interrupção desta primeira etapa na cascata da esteroidogênese, induzida pela toxicidade de um DE (por exemplos, metais pesados), representa prejuízos aos organismos, como alterações na diferenciação sexual, reprodução e no metabolismo. Este mecanismo não envolve a ligação direta do DE aos receptores de esteróides, mas sim, atua reduzindo a expressão da StAR neste tecido (ARUKWE, 2008).

Outra provável via para diminuição do cortisol na resposta ao estresse, seria através das enzimas monooxigenases (que catalisam a formação do

grupo hidroxil) (KIME, 1999). A síntese de hormônios esteróides ocorre através de uma seqüência de reações catalisadas por monooxigenases associada com a família do citocromo P450 (JANZ, 2000) (os esteróides são hidroxilados por monooxigenases com citocromo P450). Uma variedade de metais pesados pode induzir ou inibir a atividade das monooxigenases do citocromo P450. Na espécie estudada, *P. lineatus*, o herbicida atrazina inibiu a enzima EROD, etoxiresorufina-O-desetilase (uma das formas de se medir a atividade da CYP1A). Por 24 e 48 horas de exposição e na concentração de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , a atrazina inibiu a atividade da EROD no fígado destes peixes (SANTOS, 2011). Embora seja um herbicida (não um metal), e em outro órgão (não as brânquias), se há inibição da CYP1A em *P. lineatus*, pode também ter inibição desta enzima nas células interrenais, impossibilitando que as monooxigenases sintetizem o cortisol, sendo uma hipótese a ser avaliada e com a exposição ao cobre. Alterações na atividade de enzimas específicas na biossíntese de esteróides têm um significativo potencial de modular a produção de hormônios (JANZ, 2000). Nas células interrenais as monooxigenases são afetadas por cobre e outros metais traços (KIME, 1999). Segundo este autor, há uma evidência muito clara de que os peixes capturados em ambientes poluídos sofrem a ação de uma variedade de disruptores endócrinos e uma das conseqüências é a diminuição da resposta ao estresse.

Gagnon e colaboradores (2006) realizaram um trabalho *in vitro* com células interrenais de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Os autores expuseram os animais por 30 dias ao cobre (pré-exposição a  $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e 45 min antes da amostragem submeteram a estresse aéreo. Isolaram as células interrenais destes animais e a expuseram novamente ao cobre ( $200 \mu\text{M}$ ) e utilizaram ACTH sintético para estimular a secreção de cortisol, no entanto, foi observada redução na secreção do hormônio. Os autores sugerem que a concentração de cobre utilizada *in vitro* é muito mais elevada do que a concentração observada no sangue durante a exposição *in vivo*. Assim, concluíram que um aumento da concentração de cobre levaria a adrenotoxicidade e falha na secreção hormonal.

*Prochilodus lineatus* é uma espécie sensível a vários tipos de contaminantes, por isto, é utilizada como espécie bioindicadora (CAMARGO; MARTINEZ, 2006). Esta sensibilidade pode estar relacionada à diminuição de cortisol em situação de contaminação, como a observada na exposição ao cobre + estresse. Alguns estudos realizados com *P. lineatus* expostos a outros

contaminantes, obtiveram diferentes respostas na liberação de cortisol. Camargo e colaboradores (2009) expuseram o *P. lineatus* ao alumínio por 6, 24 e 96 h e não observaram diferença nos valores do cortisol plasmático, assim como Maduenho e Martinez (2008) ao exporem ao inseticida diflubenzuron, e Langiano e Martinez (2008) ao exporem ao herbicida Roundup®. Já o estudo realizado por Simonato e colaboradores (2008) ao submeterem o *P. lineatus* à fração solúvel de óleo diesel por 6, 24, 96 e 15 dias, revelou uma redução do cortisol plasmático nos animais expostos por 15 dias ao estressor. Estas diferentes respostas do *P. lineatus* à liberação de cortisol pode ser atribuída pela sua sensibilidade a diferentes contaminantes.

Muitas espécies apresentam diferentes respostas durante a exposição ao cobre, mostrando elevação do cortisol plasmático em diferentes períodos, como a tilápia (*Oreochromis mossambicus*) em 6 dias de exposição (PELROM et al., 1995), carpa (*Cyprinus carpio*), com 168 h (FLIK et al., 2002) e por 14 dias de exposição (AFAGHI et al., 2007), ou truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposto por 24 h (MUÑOZ et al., 1995). Por outro lado, observa-se a diminuição deste hormônio na truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) exposta ao cobre por 21 dias (MUÑOZ et al., 1991) ou por 6 semanas (NOWAK; DUDA, 1996). O que estes trabalhos têm em comum é a exposição a concentrações sub-letais de cobre para cada espécie, além de utilizar o metal como único agente estressor.

Uma análise similar a do presente estudo, mas com outra espécie de peixe, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), foi realizada por Gagnon e colaboradores (2006). Por 30 dias os animais foram expostos ao cobre (30 e 80  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e, 45 min antes da amostragem, foram submetidos ao estresse aéreo por 1 min. O que os autores observaram foi o aumento do cortisol plasmático em ambas concentrações, mas menor que o grupo controle que não foi exposto ao cobre, e que a amplitude, ou seja, a capacidade de aumentar a concentração plasmática de cortisol foi ainda menor na concentração maior (80  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). A conclusão foi que as trutas quando expostas ao cobre, não são capazes de responder aos estímulos adicionais que lhe são impostos sem, no entanto, este metal atuar como disruptor endócrino.

Entretanto, pode ser observado no presente estudo que o cobre atua em *P. lineatus* como um DE inibindo a resposta primária de liberação de corticosteróides, quando submetidos ao estresse, e conseqüentemente inibindo a

resposta secundária. Uma vez que foi observada a diminuição da glicose plasmática nos tempos zero, 1 e 3 h após a exposição ao *cobre + estresse*. O aumento da glicose plasmática em t6 h pode estar relacionado com a atuação de outros hormônios envolvidos na resposta ao estresse (WENDELAAR BONGA, 1997), já que o cortisol apresenta-se diminuído. O glucagon, hormônio liberado pelo pâncreas (MOMMSEN, 2000) exerce um importante papel fisiológico no fígado de peixes, onde uma das funções é ativar a via da gliconeogênese (produção de glicose a partir de compostos que não sejam carboidratos) com liberação de glicose para sangue (MOMMSEN; MOJSOV, 1998; MOMMSEN, 2000). Este aumento da glicose provavelmente é porque, após 6 h submetidos ao *cobre + estresse* e na situação de inibição do cortisol, o organismo deva tentando retornar à homeostase através da liberação de outro hormônio que promova a liberação de glicose ao sangue (BARTON et al., 1987). A gliconeogênese é uma importante adaptação ao estresse, pois a glicose é o combustível principal para demanda de energia das vias essenciais para a recuperação da homeostase (ALURU; VIJAYAN, 2007).

O fato dos peixes (*P. lineatus*) estarem expostos ao cobre, mesmo sem *estresse*, já seria um estímulo que levaria à diminuição do glicogênio hepático. Esta diminuição é sustentada pelos resultados obtidos por Reddy e colaboradores (2008) que expuseram carpa (*Cyprinus carpio*) a concentrações sub-letais de cobre ( $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no período de 1, 7, 15 e 30 dias. Os autores observaram que houve diminuição do glicogênio hepático de peixes em todos os períodos de exposição, indicando a ocorrência de glicogenólise. Cabe ressaltar que nesta situação, os autores não mencionaram análise de variação de cortisol.

Como dito anteriormente, o cortisol desempenha funções importantes no equilíbrio hidromineral, dentre elas a ativação da NKA nas células cloreto. A atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  (NKA) nas brânquias de *P. lineatus*, foi diminuída em t=0 e t=1h da exposição ao *cobre + estresse*. Outros estudos também evidenciaram que a exposição de peixes ao cobre leva à diminuição da atividade desta enzima. Tilápias e truta arco-íris expostas ao cobre, com diferentes delineamentos experimentais, também apresentaram diminuição da atividade da NKA (LI et al., 1998; DANG et al., 2000; GROSELL; WOOD, 2002).

Os resultados apresentados aqui evidenciaram este aumento da NKA, por intervenção do cortisol, na situação de *estresse* (já discutido). No entanto, o cortisol apresentou-se diminuído quando os peixes foram expostos ao *cobre +*

estresse e comparados com apenas os submetidos ao estresse. Assim, a não liberação do cortisol na situação de *cobre + estresse* explicaria a falta do estímulo para a ativação da NKA.

Embora os resultados obtidos no experimento com *P. lineatus* sugerem ser a falta do cortisol o motivo para a diminuição da atividade da NKA, há um estudo que mostra resultados que levantam dúvidas sobre a hipótese. O estudo foi realizado com tilápias (*Oreochromis mossambicus*) que ficaram expostas ao cobre em diferentes tempos experimentais (0, 12, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 h). O que os autores observaram foi o aumento do cortisol no tempo de 96 h e, no entanto, a diminuição da atividade da NKA em todos os tempos, inclusive a partir do tempo de 96 h onde houve liberação do cortisol. Os autores sugerem que mesmo na presença do cortisol a NKA não foi capaz de retornar a sua atividade (WU et al., 2008). Estes resultados mostram que há outras possibilidades para a diminuição da atividade da NKA, na presença de cobre, e não seria apenas pela ausência do estímulo que o cortisol promoveria. Estas possibilidades podem ser, ou a diminuição do número de células cloreto (CC) ocasionada por necrose celular ou por este metal atuar na estrutura e/ou ativação da molécula da NKA.

A primeira possibilidade sugerida seria decorrente da degeneração que o cobre promove nas células cloreto das brânquias através da necrose (Pelgrom et al., 1995a). O que aparentemente mostra uma diminuição de sua atividade seria, na verdade menor expressão desta enzima decorrente do número diminuído das células cloreto, onde elas se encontram. Na mesma espécie estudada, *P. lineatus*, foi observada a redução do número de CC quando os animais foram expostos por 24 e 96 h a outro metal, o alumínio (CAMARGO et al., 2009). Quando a mesma espécie foi exposta ao cobre, foi observado até 70% de necrose nas CC, mas a uma concentração de 29  $\mu\text{g.L}^{-1}$  por 96 horas (MAZON, 2002). Sabe-se que a necrose pode ocorrer no tecido branquial quando exposto ao cobre (EVANS, 1997; BURY et al., 1998; De BOECK, 2001) e a importância da resposta adaptativa ao estresse que inclui a liberação do cortisol, é que este hormônio tem um efeito protetor sobre a necrose das células cloreto. Este efeito protetor pode ser atribuído ou ao fato do cortisol induzir a expressão gênica das metalotioneínas (ROESIJUDI, 1996; DANG et al., 2000; LAFLAMME et al. 2000) ou por ele promover a proliferação de células cloretos nas brânquias (LI et al., 1998; SLOMAN et al., 2001; WONG; CHAN, 2010).

Se com exposição ao cobre não ocorre a liberação de cortisol, este efeito protetor está ausente, podendo causar prejuízo ao organismo do *P. lineatus*.

Por outro lado, se há diminuição da atividade da NKA pela necrose causada pelo cobre, também haveria diminuição da atividade da anidrase carbônica (AC) presentes nas CC, e esta não ocorreu na situação *cobre + estresse*, ao contrário, apresentou-se elevada. Há o conhecimento da presença da AC nas CC como sendo uma enzima essencial na captação de  $\text{Na}^+$  através do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (PERRY, 1997; SENDER et al., 1999; EVANS et al., 2008). Neste caso a segunda possibilidade (sugerida acima) seria mais provável, onde o cobre atuaria na estrutura da NKA e não na diminuição do número de células (CC). As enzimas NKA contêm em sua estrutura grupo enxofre no resíduo de aminoácido cisteína (SH-grupos), e em seu sítio de ligação contém  $\text{Mg}^{2+}$ . Os autores Pelgrom e colaboradores (1995b) e Dange colaboradores (1999) evidenciaram a diminuição da atividade da NKA em tilapia, (*Oreochromis mossambicus*) exposta ao cobre e argumentaram que o cobre pode ligar-se tanto no SH-grupo como também, interagir com o  $\text{Mg}^{2+}$  e assim, promover a inativação da NKA.

O aumento da atividade da AC nos tempos 1 e 3 h ocorrida no *P. lineatus* em situação de *cobre + estresse* está correlacionado com a diminuição da NKA. Em  $t_0$ , a atividade da NKA está diminuída e ainda não há aumento da atividade da AC. Já após 1 h de *cobre + estresse*, a NKA continua com sua atividade diminuída, mas já ocorre o aumento da AC na tentativa de compensar a diminuição da atividade da NKA sobre a captação de  $\text{Na}^+$ . Este efeito compensatório pode ser atribuído à ativação da AC fornecendo substrato ( $\text{H}^+$ ) para a captação de  $\text{Na}^+$ . A inibição da NKA deixa de gerar o gradiente necessário para a tomada de  $\text{Na}^+$ , e assim favorece a ativação do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , favorecendo a tomada de  $\text{Na}^+$  (EVANS, 1997). Após 3 h de *cobre + estresse* ainda há o efeito compensatório da AC sobre a captação de  $\text{Na}^+$ . Após 6 horas de *cobre + estresse* não há mais diferença entre as atividades das enzimas com o peixe *estresse* já que, como descrito acima, a fase adaptativa tem uma duração até 6 h após o *estresse*. Um estudo onde foi avaliada a atividade de ambas as enzimas (NKA e AC) e tendo a salinidade como um estressor adicional, foi realizado com o peixe da espécie *Fundulus heteroclitus* expostos por 24 h ao cobre. O que os autores observaram foi a redução da atividade da NKA e a atividade da AC permaneceu normal. Outro dado importante observado pelos autores foi a diminuição da concentração plasmática de

Na<sup>+</sup>. (BLANCHARD; GROSELL, 2006). Ao contrário dos resultados com *P. lineatus*, em *F. heteroclitus* não foi observado o efeito compensatório entre as enzimas, mesmo sendo o mesmo tempo de exposição, com o mesmo contaminante e com um estresse adicional. Mas em *P. lineatus* o efeito compensatório entre a NKA e a AC, na situação *cobre + estresse*, teve um resultado positivo sobre o Na<sup>+</sup> plasmático, pois não houve alteração em nenhum tempo experimental.

Se por um lado, no peixe *P. lineatus*, a AC não foi inibida pela presença de cobre, em caranguejo (*Chasmagnathus granulata*) esta enzima mostrou-se sensível a este metal, ocorrendo sua inibição (VITALE et al., 1999). Em eritrócitos bovinos a AC também mostrou-se inibida pelo cobre e os autores sugeriram que pode ter ocorrido através de três diferentes sítios de ligação para cobre existentes nesta enzima. Numa visão geral, parece que o cobre pode ligar-se em um destes sítios o que poderia induzir sua mudança conformacional, desestabilizando-a e com isto, reduzindo sua atividade catalítica (SARRAF et al., 2005). A atuação do cobre sobre a AC em brânquias de peixes ainda requer maiores estudos.

### 5.3 ATRAZINA + ESTRESSE

*Prochilodus lineatus* quando expostos à *atrazina + estresse* mostrou aumento de RBC em t0 quando comparado com a situação de *estresse*, entretanto vale lembrar que este aumento já era evidenciado no peixe que sofreu *estresse* sem contaminante. Portanto, com a exposição à *atrazina*, houve um maior número de eritrócitos liberados na corrente sanguínea, e esta liberação foi ocasionada pelo estímulo adrenérgico sobre o baço em t0 (WENDELAAR BONGA, 1997) como já explicado acima. Este aumento dos eritrócitos é seguido por aumento dos valores de hemoglobina e hematócrito sem, no entanto alterar o valor de VCM, o que indica a liberação de células imaturas (VALENZUELA et al., 2005). Após 3 h de *atrazina + estresse* o VCM está aumentado refletindo o inchaço celular, provavelmente pelo ganho de água para o meio intracelular, pela ativação do trocador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, como já discutido anteriormente (NIKINMAA, 1992). Este inchaço favorece a hemólise dos eritrócitos quando o sangue circula pelo baço (PONDER, 1944), também discutido anteriormente, hipótese esta corroborada pelo valor diminuído do RBC e hemoglobina. Como consequência a esta hemólise, os peixes submetidos à *atrazina*

+ estresse em t6 apresentaram o VCM diminuído, o que reflete a sobrevivência de eritrócitos que não sofreram inchaço e assim foram mais resistentes a passagem pelo baço.

Quanto à análise dos parâmetros metabólicos, durante a exposição *atrazina*+ estresse a diminuição do glicogênio hepático só foi detectada em t0, sendo esta promovida, também, pela adrenalina. Deve ser lembrado que os peixes nesta situação (*atrazina* + estresse) estão sendo comparados com os animais que sofreram apenas estresse e estes já apresentavam diminuição do conteúdo de glicogênio hepático. Apenas o fato dos peixes serem expostos a um contaminante, no caso a *atrazina*, parece já ser estímulo para diminuição do glicogênio, como já comentado na situação *cobre* + estresse. Os efeitos produzidos em tainhas (*Liza ramada*) expostas por 11 dias à *atrazina* mostraram uma redução do conteúdo de glicogênio hepático e, segundo os autores esta redução é decorrente da condição de estresse promovida pela *atrazina* (BIAGIANTI-RISBOURG; BASTIDE, 1995). Os autores sugerem, ainda, que a quantidade de glicogênio hepático é apenas um valor limitado para o diagnóstico da exposição crônica a contaminantes, porém é um parâmetro adequado para indicar o estresse agudo ou a curto prazo sobre os organismos (BIAGIANTI-RISBOURG; BASTIDE, 1995).

Os peixes (*P. lineatus*) que apenas sofreram estresse apresentaram pico de cortisol e glicose nos tempos de 1 e 3 h. Este aumento de glicose plasmática, indica o efeito do cortisol no fígado promovendo a glicogenólise ou gliconeogênese. Nos peixes expostos à *atrazina* nestes mesmos tempos (t=1 e 3h) a resposta observada foi diminuição do cortisol e da glicose plasmática. A diminuição da glicose é decorrente da falta do cortisol para estímulo do tecido alvo (fígado) na sua liberação. O fato do cortisol não ter aumentado sugere o efeito da *atrazina* como um disruptor endócrino (DE), o que prejudica, assim, a capacidade do peixe de responder a situações de estresse. Esta atuação da *atrazina* sobre a liberação de cortisol pode ser explicada pela neurotoxicidade ou pela adrenotoxicidade que este herbicida causa no peixe. A resposta de diminuição de cortisol plasmático, com provável neurotoxicidade, foi estudada em alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a 5 agrotóxicos (dentre eles o herbicida *atrazina*), por 96 h seguido por um estresse adicional, que se caracterizava pela perseguição dos animais no aquário (CERICATO et al., 2008). Os autores observaram que estes animais diminuiriam sua capacidade em ter uma resposta adequada ao adicional estressor, e

consequente manutenção da homeostase, obtendo níveis de cortisol circulantes mais baixo que a do grupo controle. Os mesmos autores (CERICATO et al., 2009) em outro estudo, com a mesma espécie, demonstram a possível atuação da atrazina como disruptor endócrino no eixo HPI. Os peixes foram expostos por 96 h a concentração sub-letal de diferentes agrotóxicos (incluindo atrazina) e após este tempo de exposição, receberam injeção de ACTH intraperitonealmente e foram amostrados após 1 hora. Os autores observaram que os peixes expostos à atrazina e estimulados com ACTH mostraram um aumento do cortisol plasmático muito semelhante aos peixes controle (que não foram expostos à atrazina, mas receberam a mesma dose de ACTH). Os autores concluíram que não há comprometimento da resposta do cortisol pelo tecido renal e que a diminuição do cortisol evidenciado em seu trabalho anterior (onde expuseram os peixes às mesmas concentrações de atrazina), parece estar relacionada com a regulação da secreção de cortisol em níveis mais altos no eixo HPI. O ponto do eixo HPI onde a atrazina atua como disruptor endócrino, ainda não é claro, assim como no *P. lineatus* não há conhecimento da ação deste herbicida sobre a liberação do cortisol, ou seja, se está atuando em algum ponto do eixo HPI ou nas células interrenais.

O mecanismo de ativação do eixo HPI com um estressor estimulando o hipotálamo a secretar CRH, seguido da estimulação da hipófise para secretar ACTH, é bastante conhecido em peixes, já mencionado acima (Wendelaar Bonga, 1997; (MOMMSEN et al., 1999; BARTON, 2002). Sabe-se que a ligação do ACTH a receptores de membrana das células esteroideogênicas ativa uma série de reações que implica na formação do AMPc, que por sua vez atua na síntese do cortisol, tendo o colesterol como seu precursor. Com objetivo de avaliar a adrenotoxicidade da atrazina e outros 3 agrotóxicos, Bisson e Hontela (2002) realizaram ensaio *in vitro* com células adrenocorticais de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Neste estudo os autores queriam avaliar se o efeito tóxico da atrazina seria no receptor de ACTH ou na etapa intracelular de geração de AMPc. Na presença de cada um dos pesticidas, a secreção de cortisol foi avaliada em resposta ao estímulo por ACTH e ao estímulo por um análogo do AMPc (dibutilil AMPc). Foi observado que a secreção de cortisol em resposta ao ACTH foi inibida pela atrazina enquanto que a por dibutilil AMPc não foi. Isto sugere que a atrazina atua antes da etapa de AMPc. Embora haja evidências que a atrazina pode atuar tanto na neurotoxicidade quanto na adrenotoxicidade, os nossos dados não nos

permite afirmar estas hipóteses, pois apenas observamos a diminuição do cortisol plasmático e não avaliamos o mecanismo que levou a esta diminuição.

Embasado em alguns estudos, discutimos em vários momentos neste trabalho, que o cortisol leva a ativação da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$  (NKA) nas brânquias (Mc CORMICK et al., 1991; SHRIMPTON; STEPHEN, 1999; BABITHA; PETER, 2010). Nos tempos de 1 e 3 h na situação *atrazina + estresse* a atividade da NKA branquial de *P. lineatus* está diminuída, justamente nos mesmos tempos onde o cortisol também apresentou-se diminuído. A falta de níveis circulantes deste hormônio, provocado pela exposição à atrazina, possivelmente resultou na diminuição da atividade da NKA. Esta seria uma possibilidade para a diminuição da atividade desta enzima, entretanto outra espécie de peixe obteve resultados diferentes ao encontrado em *P. lineatus*. Com a pré-exposição, de 5 dias, à atrazina e tendo a salinidade como outro estressor adicional, salmão (*Salmo salar*) apresentou a atividade da NKA diminuída, mas com o cortisol plasmático aumentado (WARING; MOORE, 2004). Os autores não discutem o mecanismo de ação da atrazina sobre a inibição da NKA. Com estes resultados, mesmo na presença do cortisol a atividade da NKA não ter sido restabelecida, sugerimos que outro mecanismo, e não a falta de estímulo do cortisol, parece estar atuando na inibição da enzima. Outra possibilidade seria que a atrazina atuaria sobre a estrutura da NKA. Porém, se a atrazina atua diretamente na NKA inibindo-a, esta inibição não ocorreu totalmente em bagre africano (*Clarias gariepinus*) quando exposto a duas concentrações de atrazina por diferentes tempos (3, 6, 9, 24, 48, 72 e 168 h). Foi observado que em alta concentração ( $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), a atividade de NKA apresentou-se aumentada, mas em baixa concentração ( $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), a NKA diminuiu sua atividade nos tempos 3 até 24 h e aumentou sua atividade conforme ficaram expostas de 24 a 168 h. Os autores sugerem que este aumento da atividade da NKA é uma resposta ao estresse diante do estressor (atrazina), mas não discutem o mecanismo que levou a este aumento (ASSEM et al., 1995). Analisando os resultados deste estudo, o que provavelmente promoveria um efeito da atrazina sobre a atividade da NKA é: concentração/tempo de exposição. Ou seja, uma concentração elevada para a espécie, ativaria a NKA, enquanto que, uma concentração menor de atrazina dependeria de um tempo mais prolongado de exposição para ativá-la. A literatura sugere que a atrazina tem atuação variável sobre a atividade da NKA, seja em função do tempo e/ou concentração, não sendo claro se possa ter efeito diretamente

sobre a estrutura da enzima. Os resultados obtidos com *P. lineatus* indicam uma aparente dependência da NKA no estímulo por cortisol, mas diante de pouca informação sobre o assunto, acreditamos que mais estudos sejam necessários para confirmar a relação com cortisol ou indicar o mecanismo de ação da atrazina sobre a atividade da NKA.

Estudo realizado com túbulo proximal de uma espécie de linguado (*Pleuronectes americanus*) mostram que o cortisol aumenta a expressão e a atividade de anidrase carbônica (PELIS et al., 2003). Embora a atrazina seja o herbicida mais utilizado em nível mundial (CHOUNG et al., 2010) pouco se sabe sobre sua atuação em diferentes aspectos fisiológicos, como na enzima anidrase carbônica de peixes. O que há é estudo demonstrando a atuação de pesticidas e fungicidas na atividade desta enzima. Com objetivo de analisar a atuação de agrotóxicos sobre a enzima AC, truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) foi exposta a alguns pesticidas e fungicidas. Foi observada que na presença destes agrotóxicos, houve diminuição da atividade da AC no fígado, músculo, rim e cérebro (EKINCI; BEYDEMIR, 2010). Para analisarmos o efeito compensatório na tomada de  $\text{Na}^+$  entre a NKA e anidrase carbônica (AC) pelas brânquias de *P. lineatus*, correlacionaremos as duas enzimas nos tempos experimentais. Este efeito compensatório pode ser atribuído pela ativação da AC fornecendo substrato ( $\text{H}^+$ ) para a captação de  $\text{Na}^+$  através do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  presente nas brânquias (EVANS, 1997). No tempo zero, a NKA está com sua atividade normal, mas diante da situação *atrazina + estresse*, há aumento da atividade da AC na tentativa de melhorar, indiretamente, a tomada de  $\text{Na}^+$ . Neste tempo não ocorre diminuição do sódio plasmático. No tempo de 1 h, continua o efeito compensatório da AC agora mais evidente, pois a NKA apresenta sua atividade diminuída e a AC está com sua atividade aumentada que no  $t_0$ . Neste tempo também não houve diminuição do sódio plasmático demonstrando a eficácia do efeito compensatório. Já no tempo de 3 h, a NKA está diminuída e a AC está com sua atividade normal. Neste momento há diminuição do sódio plasmático. A atividade da AC não foi suficiente para a tomada de sódio pelas brânquias. No tempo de 6 h, o sódio plasmático está normalizado, assim como a atividade da NKA, mas a AC apresenta-se diminuída. Vale lembrar que a AC está diminuída quando comparada ao grupo *estresse* que neste momento, estava bem aumentada. Assim, em *P. lineatus*, no tempo de exposição e na concentração utilizada, a atrazina não mostrou inibir a atividade da

AC, seja por uma ação direta ou pela falta de aumento do cortisol. Estudos com exposição prolongada e com diferentes concentrações podem trazer maiores informações sobre a atuação deste herbicida sobre uma enzima importante na osmorregulação de peixes. Nossos dados sugerem que, a variação da atividade da anidrase carbônica, nas condições experimentais estudadas, responde mais à variação da NKA do que propriamente ao herbicida ou mesmo ao cortisol.

Neste trabalho, foi observada a resposta adaptativa ao estresse em *P. lineatus*, através da ativação neuroendócrina dos eixos HSC (liberação adrenérgica) e HPI (liberação de cortisol). Parâmetros hematológicos, metabólicos e osmorregulatórios evidenciaram recuperação da homeostase de *P. lineatus* após 6 h de estresse aéreo com confinamento, através da mediação adrenérgica e do cortisol.

Na situação *cobre + estresse*, assim como na *atrazina + estresse* *P. lineatus* não apresenta liberação de cortisol, quanto às evidências de ativação adrenérgica elas não são claras, observou-se uma alteração do padrão de resposta hematológica observada na situação *estresse*. Diante de ambos contaminantes observou-se variações dos parâmetros estudados em relação à situação de somente *estresse*. Os contaminantes utilizados podem ter atuado indiretamente sobre os parâmetros estudados, interferindo na ativação dos eixos HSC e/ou HPI, ou ainda atuando diretamente através de sua toxicidade sobre diferentes tecidos/órgãos alvos. Nossos resultados sugerem cobre e atrazina como disruptores endócrinos comprometendo a resposta adaptativa de *P. lineatus* ao estresse.

Mais estudos são necessários para se compreender melhor os mecanismos de ação dos disruptores se como agentes neurotóxicos ou adrenotóxicos. Avaliando ainda a possível ação direta dos contaminantes sobre os diferentes parâmetros estudados em *P. lineatus*.

## 6 CONCLUSÃO

- *Prochilodus lineatus* exibe rápida resposta adrenérgica à situação de estresse, evidenciada pelas alterações de parâmetros hematológicos e diminuição de glicogênio hepático;
- Pico do cortisol em *P. lineatus* ocorre 1 e 3 h após serem submetidos ao estresse agudo;
- Com elevação do cortisol observa-se aumento de glicose plasmática e ativação da NAK;
- A resposta ao estresse restabeleceu a homeostase em *P. lineatus*, tendo os parâmetros hematológicos, endócrino e metabólico, assim como osmoregulatórios, normalizados após 6 h da ocorrência do estresse;
- O cobre e a atrazina atuam como disruptores endócrino não estimulando o aumento na liberação do hormônio cortisol diante de estresse;
- Não há evidências de resposta adrenérgica na presença de cobre e atrazina;
- O cobre e a atrazina, direta ou indiretamente, impedem a elevação de glicose em *P. lineatus* para enfrentar o estresse;
- Em ambas situações de estresse, com e sem contaminante, a enzima Anidrase Carbônica é sensível à ativação NKA, apresentando participação compensatória para a captação de  $\text{Na}^+$  pelas brânquias;
- A exposição aos contaminantes cobre e atrazina (por 24 h), através dos parâmetros hematológicos, endócrino e metabólico, assim como osmorregulatórios, indica que *P. lineatus* apresenta prejuízo na fase primária e secundária da resposta adaptativa ao estresse;

## REFERÊNCIAS

- AFAGHI, A.; ZARE, S.; HEIDARI, R.; ASADPOOR, Y.; VIAYEH, R. M. Effects of copper sulfate (CuSO<sub>4</sub>) on the levels of glucose and cortisol in common carp, *Cyprinus carpio*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 10:1655-60, 2007.
- AKTAR, W.; SENGUPTA, D.; CHOWDHURY, A. Occurrence of heavy metals in fish: a study for impact assessment in industry prone aquatic environment around Kolkata in India. **Environmental Monitoring and Assessment**, 2010.
- ALURU, N.; VIJAYAN, M. M. Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in rainbow trout. **Physiological Genomics**, 31: 483–491, 2007.
- ALWAN, S. F.; HADI, A. A.; SHOKR, A. E. Alterations in hematological parameters of fresh water fish, tilapia *zillii*, exposed to aluminum. **Journal of Science and Its Applications**, 3:12-19, 2009.
- ARENDS, R. J.; MANCERA, J. M., MUÑOZ, J. L.; WENDELAAR BONGA, S. E.; FLIK, G. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata L.*) to air exposure and confinement. **Journal of Endocrinology**, 163:149–157, 1999.
- ARNAUDOV, A. D.; VELCHEVA, I. G.; TOMOVA, E. S. Influence of copper and zinc on the erythrocyte-metric parameters of *Carassius gibelio* (pisces, cyprinidae). **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 14:557-563, 2008.
- ARUKWE, A. Steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and cholesterol side-chain cleavage (P450scc)-regulated steroidogenesis as an organ-specific molecular and cellular target for endocrine disrupting chemicals in fish. **Cell Biology and Toxicology**, 24:527-540, 2008.
- ASSEM, H.; ELSAEIDY, I.; ABO HEGAB, S. *In vivo* changes in the activity of gill ATPases, muscle cell volume, and plasma and cellular ionic concentration of the african catfish, *Clarias gariepinus* induced by atrazine or DDT at different sublethal concentrations. **Journal of King Abdulaziz University: Marine Science**, 6:135-150, 1995.
- AZZOLINI, J. C.; ZARDO, F.; SEGALIN, C. A. Monitoramento dos efluentes de despesca de tanques de piscicultura em diferentes níveis de deságüe. **Unoesc & Ciência – ACET**, Joaçaba, 1: 59-68, 2010.
- BABITHA, G. S.; PETER, M. C. S. Cortisol promotes and integrates the osmotic competence of the organs in North African catfish (*Clarias gariepinus*): Evidence from *in vivo* and *in situ* approaches. **General and Comparative Endocrinology**, 168: 14–21, 2010.
- BARTON, B. A. Stress in Fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, 42:517–525, 2002.
- BARTON, B. A.; SCHRECK, C. B.; BARTON, L. D. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress

responses in juvenile rainbow trout. **Diseases of Aquatic Organisms**, 2:173-185, 1987.

BARTON, B. A.; BOLLIG, H.; HAUSKINS, B. L.; JANSEN, C. R. Juvenile pallid (*Scaphirhynchus albus*) and hybrid pallid x shovelnose (*S. albus x platyrhynchus*) sturgeons exhibit low physiological responses to acute handling and severe confinement. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 126A:125-134, 2000.

BIAGIANTI-RISBOURG, S.; BASTIDE, J. Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an ultrastructural study. **Aquatic Toxicology**, 31:217- 229, 1995.

BIDINOTTO, P. M.; MORAES, G.; SOUZA, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico do Centro de Pesquisa e Treinamento em Agricultura**, 10:53-60, 1997.

BISSON, M.; HONTELA, A. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed *in vitro*. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 180:110-117, 2002.

BLANCHARD, J.; GROSELL, M. Copper toxicity across salinities from freshwater to seawater in the euryhaline fish *Fundulus heteroclitus*: is copper an ionoregulatory toxicant in high salinities? **Aquatic Toxicology**, 80:131-139, 2006.

BLAXHALL, P. C.; DAISLEY, K. W. Routine haematological methods for use with fish blood. **Journal of Fish Biology**, 5:771-781, 1973.

BRINGOLF, R. B.; BELDEN, J. B.; SUMMERFELT, R. C. Effects of atrazine on fathead minnow in a short-term reproduction assay. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 23:1019-1025, 2004.

BURY, N. R.; JIE, L.; FLIK, G.; LOCK, R. A. C.; WENDELAAR BONGA, S. E. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells *in vitro*. **Aquatic Toxicology**, 40:193-202, 1998.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to *in situ* tests in an urban stream in southern Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 21:61-69, 2006.

CAMARGO, M. M. P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, 94:40-46, 2009.

CARBALLO, M.; MUÑOZ, M. J.; CUELLAR, M.; TARAZONA, J. V. Effects of waterborne copper, cyanide, ammonia, and nitrite on stress parameters and changes in susceptibility to saprolegniosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Applied and Environmental Microbiology**, 61:2108-2112, 1995.

CERICATO, L.; MACHADO NETO, J. G.; FAGUNDES, M.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; FINCO, J.; ROSA, J. G. S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; ANZILIERO, D.; BARCELLOS, L. J. G. Cortisol response to acute

stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 148C:281–286, 2008.

CERICATO, L.; MACHADO NETO, GONÇALVES, J.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; ROSA, J. G. S.; KOAKOSKI, G.; CENTENARO, L.; POTTKER, E.; MARQUEZE, A.; BARCELLOS, L. J. G. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an *in vivo* ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 149C:363-367, 2009.

CHOUNG, C. B.; HYNE, R. V.; STEVENS, M. M.; HOSE, G. C. A low concentration of atrazine does not influence the acute toxicity of the insecticide terbufos or its breakdown products to *Chironomus tepperi*. **Ecotoxicology**, 19:1536–1544, 2010.

DANG, Z.; LOCK, R. A. C.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. **The Journal of American Physiological Society**, 277:320-331, 1999.

DANG, Z.; BALM, P. H. M.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E.; LOCK, R. A. C. Cortisol increases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. **The Journal of Experimental Biology**, 203:2349-2355, 2000.

DANG, Z.; LOCK, R. A. C.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. E. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of oreochromis mossambicus exposed to copper. **The Journal of Experimental Biology**, 203:379-387, 2000.

DE BOECK, G.; VLAEMINCK, A.; BALM, P. H. M.; LOCK, R. A. C.; DE WACHTER, B.; BLUST, R. Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: interactions between Cu<sup>2+</sup> and plasma cortisol elevation. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 20:374-381, 2001.

DEMER, N. E.; BAYNE, C. J. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. **Developmental & Comparative Immunology**, 21:363-373, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28:350-356, 1956.

DZIEWULSKA-SZWAJKOWSKA, D.; LOZINSKA-GABSKA, M.; ADAMOWICZ, A.; WOJTASZEK, J.; DZUGAJ, A. The effect of high dose of cortisol on glucose-6-phosphatase and fructose-1,6-bisphosphatase activity, and glucose and fructose-2,6-bisphosphate concentration in carp tissues (*Cyprinus carpio* L.). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 135B:485-491, 2003.

EKINCI, D.; BEYDEMIR, S. Risk assessment of pesticides and fungicides for acid–base regulation and salt transport in rainbow trout tissues. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 97:66-70, 2010.

European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife (Weybridge, UK; 1996). European Union Report EUR17459.

- EVANS, D. H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. **Environmental Health Perspectives**, 71:47-58, 1987.
- EVANS, D. H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, 295:704–713, 2008.
- EVANS, G. O. **Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers**. CRC Press: Boca Raton, 2009. Cap. 2, p. 8-22.
- FABBRI, E.; CAPUZZO, A.; MOON, T. W. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: an overview. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 120C:177-192, 1998.
- FERREIRA, K. T. G. The effect of copper on frog skin. The role of sulphhydryl groups. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 510:298-304, 1978.
- FLIK, G.; STOUTHART, X. J. H. X.; SPANINGS, F. A. T.; LOCK, R. A. C.; FENWICK, J. C.; WENDELAAR BONGA, S. E. Stress response to waterborne Cu during early life stages of carp, *Cyprinus carpio*. **Aquatic Toxicology**. 56:167-176, 2002.
- FORTIN, M. G.; COUILLARD, C. M.; PELLERIN, J.; LEBEUF, M. Effects of salinity on sublethal toxicity of atrazine to mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae. **Marine Environmental Research**, 65:158–170, 2008.
- GAGNON, A.; JUMARIE, C.; HONTELA, A. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquatic Toxicology**, 78:59-65, 2006.
- GREIG, R. A. Trace metal uptake by three species of mollusks. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 22:643-647, 1979.
- GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. **The Journal of Experimental Biology**, 205:1179-1188, 2002.
- HANDY, R. D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? **Comparative Biochemistry and Physiology**, 135A:25-38, 2003.
- HESSER, E. F. Methods for routine on fish hematology. **The Progressive Fish Culturist**, 22:164-171, 1960.
- HIROSE, S.; KANEKO, T.; NAITO, N.; TAKEI, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 136B:593-620, 2003.
- HONTELA, A. Interrenal dysfunction in fish from contaminated sites: *in vivo* and *in vitro* assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 17:44-48, 1998.

- IWAMA, G. K.; VIJAYAN, M. M.; FORSYTH, R. B.; ACKERMAN, P. A. Heat shock proteins and physiological stress in fish. **American Zoologist**, 39:901-909, 1999.
- JANZ, D. M. Endocrine System. In: OSTRANDER, G. K. (Ed.) **The Laboratory Fish**. Academic Press: San Diego, 2000. Cap. 13, p. 189-212.
- JENTOFT, S.; HELD, J. A.; MALISON, J. A.; BARRY, T. P. Ontogeny of the cortisol stress response in yellow perch (*Perca flavescens*). **Fish Physiology and Biochemistry**, 26: 371–378, 2002.
- KAMMERER, B. D.; CECH JR, J. J.; KÜLTZ, D. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 157A:260-265, 2010.
- KIME, D. E. **Endocrine disruption in fish**. Kluwer Academic Publishers: Massachusetts, 1998. 397 p.
- KIME, D. E. Environmentally Induced Endocrine Abnormalities in Fish. In: HESTER, R. E.; HARRISON, R. M. (Ed.). **Endocrine Disrupting Chemicals**. The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1999. p. 27-48.
- KLOAS, W.; LUTZ, I. Amphibians as model to study endocrine disrupters. **Journal Chromatography A**, 1130:16–27, 2006.
- LAFLAMME, J. S.; COUILLARD, Y.; CAMPBELL, P. G. C.; HONTELA, A. Interrenal metallothionein and cortisol secretion in relation to Cd, Cu, and Zn exposure in yellow perch, *Perca flavescens*, from Abitibi lakes. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, 57:1692–1700, 2000.
- LAIZ-CARRIÓN, R.; SANGIAO-ALVARELLOS, S.; GUZMÁN, J. M.; DEL RÍO, M. P. M.; MÍGUEZ, J. M.; SOENGAS, J. L.; MANCERA, J. M. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. **Fish Physiology and Biochemistry**, 27:179–188, 2002.
- LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R.; Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 147C:222-231, 2008.
- Li, J.; QUABIU, E. S.; WENDELAAR BONGA, S. E.; FLIK, G.; LOCK, R. A. C. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Aquatic Toxicology**, 43:1-11, 1998.
- LINGWOOD, D.; HARAUZ, G.; BALLANTYNE J. S. Decoupling the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase *in vivo*: a possible new role in the gills of freshwater fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 144A:451– 457, 2006.
- LOMBARDI, P. E.; PERI, S. I.; GUERRERO, N. R. V. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 73: 1704–1711, 2010.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein

measurements with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 193:265-275, 1951.

MADUENHO, L. P.; MARTINEZ, C. B. R. Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*, **Comparative Biochemistry and Physiology**, 148C:265-272, 2008.

MARSHALL, W. S.; BRYSON, S. E. Transport mechanisms of seawater teleost chloride cells: an inclusive model of a multifunctional cell. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 119A:97-106, 1998.

MAZON, A. F.; CERQUEIRA, C. C. C.; FERNANDES, M. N. Gill cellular changes induced by copper exposure in the south American tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. **Environmental Research Section**, 88A:52-63, 2002.

MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, 63:797-804, 1999.

MC CORMICK, S. D.; DICKHOFF, W. W.; DUSTON, J.; NISHIOKA, R. S.; BERN, H. A. Developmental differences in the responsiveness of gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase to cortisol in salmonids. **General and comparative Endocrinology**, 84:308-17, 1991.

Mc CORNICK, S. D. Hormonal control of grill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase and chloride cells funcion. In: Wood, C. M.; SHUTTLEWORTH, T. J. (Eds) **Celular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation**. Academic Press: London, 1995. Cap. 11, p. 285-315.

MILLER, L. L.; RASMUSSEN, J. B.; PALACE, V. P.; HONTELA, A. The physiological stress response and oxidative stress biomarkers in rainbow trout and brook trout from selenium-impacted streams in a coal mining region. **Journal Applied Toxicology**, 29:681-688, 2009.

MOMMSEN, T. P.; MOJISOV, S. Glucagon-like peptide-1 activates the adenylyl cyclase system in rockfish enterocytes and brain membranes. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 121B:49-56, 1998.

MOMMSEN, T. P.; VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, 9: 211-268, 1999.

MOMMSEN, T. P. Glucagon-like peptide-1 in fishes: the liver and beyond. **American Zoologist**, 40:259-268, 2000.

MUÑOZ, M. J.; CARBALLO, M.; TARAZONA, J. V. The effect of sublethal levels of copper and cyanide on some biochemical parameters of rainbow trout along subacute exposition. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 100C:577-582, 1991.

NIEVES-PUIGDOLLER, K.; BJORNSSON, B. T.; MC CORMICK, S. D. Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon. **Aquatic Toxicology**, 84:27-37, 2007.

NIKINMAA, M. How does environmental pollution affect red cell function in fish? **Aquatic Toxicology**, 22:227-238, 1992.

NOLAN, D. T. Skin response of fish to stressors. Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda, 2000. 182p.

NOWAK, B.; DUDA, S. Effects of exposure to sub-lethal levels of copper on growth and health of sea farmed rainbow trout. **Commonwealth Australia**, 1996.

NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S. K. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, 7:3298-3312, 2010.

PANKHURST, N. W. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. **General and Comparative Endocrinology**, 170:265-77, 2010.

PANKHURST, N. W.; SHARPLES, D. F. Effects of capture and confinement on plasma cortisol concentrations in the snapper, *Pagrus auratus*. **Australian Journal of Marine & Freshwater Research**, 43:345-356, 1992.

PEDROSO, M. F. M.; LIMA, I. V. Ecotoxicologia do cobre e seus compostos. Série **Cadernos de Referência Ambiental**, 2:1-128, 2001.

PELGROM, S. M. G. J.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. **Aquatic Toxicology**, 32:303-320, 1995a.

PELGROM, S. M. G. J.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Effects of combined waterborne Cd and Cu exposures on ionic composition and plasma cortisol in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Comparative Biochemistry Physiology**. 111C:227-235, 1995b.

PELIS, R. M.; GOLDMEYER, J. E.; CRIVELLO, J.; RENFRO, J. L. Cortisol alters carbonic anhydrase-mediated renal sulfate secretion. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 285:1430-1438, 2003.

PERRY, S. F. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. **Annual Review of Physiology**, 59:325-47, 1997.

PONDER, E. The kinetics of *in vivo* hemolytic systems. (From The Nassau Hospital, Mineola, Long Island). **The Journal of General Physiology**, 483-512, 1944.

QUABIUS, E. S.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **General and Comparative Endocrinology**. 108:472-482, 1997.

REDDY, A. S.; REDDY, M. V.; RADHAKRISHNAIAH, K. Impact of copper on the oxidative metabolism of the fry of common carp, *Cyprinus carpio* (Linn.) at different

pH. **Journal of Environmental Biology**, 29:721-4, 2008.

ROESIJUDI, G. Metallothionein and its Role in toxic metal regulation. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 113C:117-123, 1996.

SANDERSON, T. The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals. **Toxicological Sciences**, 94:3–21, 2006.

SANTOS, T. G. Biomarcadores Bioquímicos e Genéticos para a Detecção dos Efeitos do Herbicida Atrazina no Peixe Neotropical *Prochilodus lineatus*. Dissertação de mestrado – Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2011. 87p.

SARRAF, N. S.; MAMAGHANI-RAD, S.; KARBASSI, F.; SABOURY, A. A. Thermodynamic studies on the interaction of copper ions with carbonic anhydrase. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, 26:1051- 1056, 2005.

SENDER, S.; BÖTTCHER, K.; CETIN, Y.; GROS, G. Carbonic anhydrase in the gills of seawater and freshwater-acclimated flounders *Platichthys flesus*: purification, characterization and immunohistochemical localization. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 47:43-50, 1999.

SHRIMPTON, J. M.; Mc CORMICK, S. D. Responsiveness of gill Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase to cortisol is related to gill corticosteroid receptor concentration in juvenile rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, 202:987-995, 1999.

SILVA, A. G.; MARTINEZ, C. B. R. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, 3:185-192, 2006.

SIMONATO, J. D.; GUEDES, C. L. B.; MARTINEZ, C. B. R. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 69:112-120, 2008.

SLOMAN, K. A.; DESFORGES, P. R.; GILMOUR, K. M. Evidence for a mineralocorticoid-like receptor linked to branchial chloride cell proliferation in freshwater rainbow trout. **The Journal of Experimental Biology**, 204:3953-3961, 2001.

SOUZA, E. C. P. M.; TEIXEIRA FILHO, A. R. **Psicultura fundamental**. 4. ed. São Paulo: Nobel, 2007.

STOCCO, D. M. The role of the StAR protein in steroidogenesis: challenges for the future. **Journal of Endocrinology**, 164:247-253, 2000.

SWENSON, E. R. A comparative approach to carbonic anhydrase: the work of Thomas H. Maren. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 136A:229–241, 2003.

TELES, M.; OLIVEIRA, M.; PACHECO M.; SANTOS, M. A. Endocrine and metabolic changes in *Anguilla anguilla* L. following exposure to β-naphthoflavone - a microsomal enzyme inducer. **Environment International**, 31:99-104, 2005.

TILTON, F. A.; BAMMLER, T. K.; GALLAGHER, E. P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebra fish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. **Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology and Pharmacology**, 153:9-16, 2011.

VALENZUELA, A.; SILVA, V.; TARIFENÑO, E.; KLEMPAU, A. Effect of acute

hypoxia in trout (*Oncorhynchus mykiss*) on immature erythrocyte release and production of oxidative radicals. **Fish Physiology and Biochemistry**, 31:65-72, 2005.

VIJAYAN, M. M.; PEREIRA, C.; GRAU, E. G.; IWAMA, G. K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: the role of cortisol. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 116C:89-95, 1997.

VITALE, A. M.; MONSERRAT, J. M.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E. M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, 122C:121-129, 1999.

VOLTOLIN, T. A.; SENHORINI, J. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; BORTOLOZZI, J.; PORTO-FORESTI, F. Supernumerary chromosome inheritance in the curimatá (*Prochilodus lineatus*) of the Mogi-Guaçu. **Hereditas**, 147: 127–131, 2010.

WARING, C. P.; MOORE, A. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. **Aquatic Toxicology**, 66:93-104, 2004.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, 77: 591-625, 1997.

WIEGAND, C.; KRAUSE, E.; STEINBERG, C.; PFLUGMACHER, S. Toxicokinetics of atrazine in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 49:199-205, 2001.

WONG, C. K.; CHAN, D. K. Effects of cortisol on chloride cells in the gill epithelium of Japanese eel, *Anguilla japonica*. **Journal of Endocrinology**, 168:185-92, 2010.

WU, S. M.; DING, H. R.; LIN, L. Y.; LIN, Y. S. Juvenile tilapia (*Oreochromis mossambicus*) strive to maintain physiological functions after waterborne copper exposure. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 54:482-492, 2008.

ZAVITSANOS, K.; NUNES, A. M.; MALANDRINOS, G.; HADJILIADIS, N. Copper effective binding with 32–62 and 94–125 peptide fragments of histone H2B. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 105:102–110, 2011.