



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

**THIAGO SANTOS SABINO**

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM NaCl NA  
OSMORREGULAÇÃO E RESPOSTA DE ESTRESSE DO  
PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS***

---

Londrina  
2011

THIAGO SANTOS SABINO

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM NaCl NA  
OSMORREGULAÇÃO E RESPOSTA DE ESTRESSE DO  
PEIXE *PROCHILODUS LINEATUS***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

**Orientadora:** Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina  
2011

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

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

S116e Sabino, Thiago Santos.

Efeitos do tratamento com NaCl na osmorregulação e resposta de estresse do peixe  
*Prochilodus lineatus* / Thiago Santos Sabino. – Londrina, 2011.  
vi, 63 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

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 de água doce – Teses. 4. Regulação osmótica – Teses. 5. *Prochilodus lineatus* – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. 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 597.554.1

## **Dedicatória**

A minha amada esposa Denise, pela metade da minha alma e carne que correspondente a ela. O seu surgimento em meu caminho mudou para o plural tudo o que se referia a minha antiga mortalidade.

A minha mentora e amiga Professora Lígia Pascual Domingues, que me lecionou nos anos do ensino médio e colaborou para o desenvolvimento do meu senso crítico, ético e moral. Ela é a mais fiel personificação da palavra “Professor”, pois faz jus a todos os conceitos e significados desta palavra. Posso dizer que ela me ajudou a determinar os caminhos por mim tomados até então.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Majestoso Criador do Céu e da Terra, Deus Pai, que fez a mim, aos meus e a tudo o que estudo. Agradeço ao Deus Filho, Jesus Cristo, meu Senhor, meu Rei, minha Vida, meu Tudo, que para minha libertação entregou Sua própria Vida. Agradeço ao Deus Espírito Santo, que é a Fonte de todas as Forças naturais e não naturais que existem; fonte das minhas forças.

Agradeço a minha fascinante amada esposa Denise, companheira, amiga, namorada, amante, parceira de batalhas e guerras contra as adversidades mortais, presente da Trindade, Bênção confiada a mim aqui na Terra, sendo, junto com meus Pais, tudo o que mais amo aqui.

Agradeço aos meus Pais, meus Anjos terrenos, que me deram amor, caráter, oportunidades e rumo. Para sempre os levarei em meu coração, junto com todas as outras coisas boas que estão enraizadas a ele.

Agradeço a uma importante presença em toda minha carreira universitária, Vivian Nogueira Marques Cervantes, que me acompanhou nos quatro anos de formação em todas as atividades acadêmicas. Com ela e através dela aprendi a escrever, pensar e deduzir cientificamente o pouco que eu sei.

Agradeço a mais uma importante presença que me acompanhou durante todo o mestrado, em toda sua dimensão, seja cursando as disciplinas, realizando os experimentos, participando de eventos ou apenas prestando companheirismo, Rafaela Araújo Vicentini. Sua amizade me ajudou a seguir em frente durante os períodos de tribulações, e com certeza está entre os bons frutos adquiridos no mestrado.

Agradeço a minha ilustríssima Orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, e faço questão de dispensar aqui, ao se referir a ela, as formalidades qualificadoras de sua brilhante carreira de professora e pesquisadora, pois ela não foi somente minha professora, doutora, orientadora e coordenadora, mas foi também minha mentora e acolhedora nos momentos de dificuldades, fossem eles de qualquer natureza. Então “Minha Chefe” é o termo que quero utilizar sempre que me referir a esta maravilhosa pessoa que fez parte da minha vida, e ao utilizar este termo quero expressar carinho, respeito e admiração por esta incrível pessoa,

que levarei sempre em meu coração por toda vida e estarei sempre de prontidão para lhe atender em qualquer situação a que ela me recorrer.

Agradeço a minha mestre pessoal, Andréa Martini Ribeiro, que me ensinou tudo que sei hoje com relação à metodologia prática das técnicas laboratoriais utilizada na realização de todo este trabalho.

Agradeço a minha amiga e companheira Cássia Regina Bruno Nascimento, que junto com a Rafaela, me incentivou a seguir em frente e me alegrou nos bons momentos e nos momentos de tensão.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Dra Silvia Ponzoni pelo seu amável companheirismo e pelas sugestões dadas a tudo que envolveu minha formação. Tenho profundo respeito, admiração e carinho por esta maravilhosa pessoa.

Agradeço a Daniela G. Borin, secretária do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, que durante o mestrado esteve de prontidão para nos atender em tudo que estivesse em seu alcance, sempre com carisma e companheirismo.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro, que muito ajudou no momento mais necessário.

Agradeço ao Programa de Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, que me concedeu a oportunidade de integrar sua primeira turma de mestrandos.

Agradeço aos funcionários da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, que sempre se dispuseram para nos fornecer os peixes utilizados nos experimentos. A estes trabalhadores prezo todo meu respeito e admiração.

Agradeço a todos os colegas de laboratório e de mestrado, e professores que participaram da minha formação e ajudaram a desenvolver todo o trabalho, seja nas práticas laboratoriais ou em qualquer outro procedimento vinculado ao mestrado.

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina na qual me graduei e obtive maturidade, tanto academicamente quanto humanamente.

Finalizo estes agradecimentos retomando a pessoa citada na dedicatória, minha professora e mentora Lígia Pascual Domingues, que com a autoridade que lhe foi outorgada, e acredito eu que tal autoridade lhe foi concedida não só humanamente, mas também divinamente, me influenciou para os conceitos

éticos e morais que hoje determinam parte de meus pensamentos e de minha conduta. Não somente me ensinou, mas também me educou e me formou cidadão com suas aulas ministradas tão competentemente e com seu exemplo de ser humano ético e moral. Obrigado, professora Lígia! Por mais que hoje nós tenhamos formação para nos tratarmos como “colegas”, pois ambos somos professores, você sempre será minha professora. Considere esta dissertação não apenas como fruto de meu trabalho, mas também como fruto de seu trabalho, pois você também é minha formadora e minha formação reflete meus formadores. Se Deus não tivesse colocado você em meu caminho para me formar e me educar, talvez eu tivesse trilhado caminhos tortuosos. Que Deus lhe abençoe em tudo que tocar sempre. Amém.

SABINO, T. S. **Efeitos do tratamento com NaCl na osmorregulação e resposta de estresse do peixe *Prochilodus lineatus***. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

O cloreto de sódio (NaCl) é amplamente utilizado como atenuante do efeito estressor do manejo e transporte de peixes de água doce e também como tratamento profilático no combate a ectoparasitos. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos do sal na osmorregulação resposta de estresse destes peixes. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar se o NaCl interfere na osmorregulação de *Prochilodus lineatus* e se atua como atenuante do efeito estressor. Os experimentos foram divididos em duas etapas: experimento de exposição ao NaCl e experimento de estresse agudo. Para os experimentos de exposição ao NaCl, juvenis de *P. lineatus* foram expostos à água, contendo 1, 5 ou 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, ou apenas à água desclorada. Após 6 ou 24h, os peixes foram anestesiados para a coleta de sangue e mortos para a retirada das brânquias e rim. As atividades das enzimas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase de brânquias e rim e da anidrase carbônica branquial foram avaliadas. Do sangue total foram analisados o número de eritrócitos, hematócrito e conteúdo de hemoglobina, e do plasma foram analisadas as concentrações de iônicas de sódio, potássio, cloreto, glicose e a osmolaridade. Para o experimento de estresse agudo, animais previamente expostos a 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl por 24 horas ou apenas à água desclorada foram submetidos ao estresse, por hipóxia e confinamento, com a utilização de uma pequena rede, através da qual ficaram suspensos fora da água por 3 minutos. Após o estresse os peixes foram divididos em 3 grupos distintos ( $t_1$ ,  $t_3$  e  $t_6$ ) e transferidos para aquários diferentes, contendo apenas água desclorada. Os peixes do grupo  $t_1$  foram amostrados 1 hora após o estresse, do grupo  $t_3$  foram amostrados 3 horas após o estresse e do grupo  $t_6$  foram amostrados 6 horas após o estresse. Um grupo de peixes, denominado de  $t_0$  foi amostrado imediatamente após o estresse. A amostragem consistiu em retirar o sangue para as análises hematológicas e de indicadores de estresse, no caso glicose e cortisol. Para o experimento de exposição ao NaCl não foram encontradas diferenças significativas entre os peixes expostos às diferentes concentrações de NaCl e os expostos somente a água desclorada em nenhum parâmetro iônico ou hematológico para ambos os tempos experimentais. A atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase branquial aumentou significativamente nos animais expostos à 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl por 24h com relação aos demais. A atividade da anidrase carbônica diminuiu significativamente nos animais expostos a 1 e 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl por 6 horas com relação aos demais, e aumentou significativamente nos peixes expostos a 10 g.L<sup>-1</sup> por 24h com relação aos outros grupos. Os resultados dos experimentos de estresse agudo mostraram que o cortisol aumentou significativamente em  $t_1$  e  $t_3$  com relação aos demais tempos experimentais ( $t_0$  e  $t_6$ ) nos peixes estressados, com e sem exposição prévia ao NaCl. Ao comparar estes dois grupos, nos mesmos tempos experimentais, verificou-se que tanto o cortisol, como a glicemia, foram significativamente menores em  $t_1$  e  $t_3$  nos peixes previamente expostos ao NaCl. A glicose plasmática também aumentou significativamente em  $t_1$  e  $t_3$  com relação aos demais tempos experimentais nos peixes estressados, sem exposição prévia ao NaCl. Nos peixes previamente expostos ao sal a glicemia em  $t_1$  foi significativamente maior que  $t_0$  e  $t_3$ . Esses

resultados indicam que o NaCl não interfere nos parâmetros hematológicos e iônicos de *P. lineatus* em qualquer concentração testada, tanto em 6 quanto em 24h de exposição, indicando assim que o peixe mantém inalterado o equilíbrio hidro-eletrolítico. Porém, a exposição de 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, durante 24h, promove alterações na atividade das enzimas relacionadas a osmorregulação, podendo perturbar a homeostase do animal. Em exposições mais longas os resultados também mostraram que a exposição de *P. lineatus* a 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl garante uma atenuação no efeito estressor sem prejudicar os processos de osmorregulação.

**Palavras-Chave:** Anidrase carbônica. Cortisol. Glicemia. Íons plasmáticos. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. Piscicultura.

SABINO, T. S. **Effects of the treatment with NaCl on the stress response and osmoregulation of the fish *Prochilodus lineatus***. 2011. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

### ABSTRACT

Sodium chloride (NaCl) is widely used to mitigate the effects of the stress of management and transport of freshwater fish as well as a prophylactic treatment to combat ectoparasites. However, little is known about the effects of the salt on stress response and on the osmoregulation of freshwater fish. Thus, the purpose of this study was to determine whether NaCl interferes with osmoregulation of *Prochilodus lineatus* and if really acts as an attenuating of the stress. The experiments were divided into two parts: experiments of NaCl exposure and experiments of acute stress. In the experiments of salt exposure juveniles of *P. lineatus* were exposed to water containing 1, 5 or 10 g L<sup>-1</sup>NaCl, or only to dechlorinated water. After 6 or 24 h, fish were anesthetized to collect blood and killed for the removal of the gills and kidney. The activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase in gills and kidney and the activity of carbonic anhydrase in the gill were determined. Blood samples were used for the determination of the number of erythrocytes, hematocrit and hemoglobin content and the plasma were used for the analysis of sodium, potassium, chloride and glucose concentrations, and the osmolarity. In the experiment of acute stress, animals previously exposed to 5 g L<sup>-1</sup>of NaCl for 24 hours or previously exposed only to dechlorinated water were subjected to stress, by hypoxia and confinement, with the use of a small net, through which fish was suspended above the water for 3 minutes. After the stress the fish were divided into 3 groups ( $t_1$ ,  $t_3$  and  $t_6$ ) and transferred to different tanks containing dechlorinated water only. The fish of  $t_1$  group were sampled 1 hour after stress, of  $t_3$  group were sampled 3 hours after stress and of  $t_6$  group were sampled 6 hours after stress. A group of fish named  $t_0$  was sampled immediately after stress. Sampling consisted of the removal of blood for the hematological analysis and the determination of the stress indicators: cortisol and glucose. In the experiments of salt exposure no significant differences were observed between fish exposed to different concentrations of NaCl and those exposed only to dechlorinated water in any ion or hematological parameter, in both experimental periods. However, a significant increase was observed in the activity of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATPase in fish exposed to 10 g L<sup>-1</sup>of NaCl for 24 h in comparison with the other groups. The carbonic anhydrase activity decreased significantly in animals exposed to 1 and 5 g L<sup>-1</sup>NaCl for 6 hours and increased significantly in fish exposed to 10 g L<sup>-1</sup> for 24 when compared to other groups. The results showed that acute stress significantly increased cortisol in  $t_1$  and  $t_3$  with respect to other experimental times ( $t_0$  and  $t_6$ ) both in fish previously exposed to NaCl or only to water. When comparing these two groups, in the same experimental times, it was found that both cortisol and blood glucose were significantly lower at  $t_1$  and  $t_3$  in fish previously exposed to NaCl. Plasma glucose also significantly increased at  $t_1$  and  $t_3$  with respect to the other experimental periods in fish submitted to stressed but not previously exposed to NaCl. In those fish previously exposed to salt in the blood glucose was significantly higher than  $t_1$   $t_0$  and  $t_3$ . These results indicate that the treatment with NaCl does not interfere with hematological and ionic parameters of *P. lineatus* at any concentration tested, both after 6 and 24 hours of exposure, indicating that the fish

can keep its water and ion balance. However, the exposure to  $10 \text{ g L}^{-1}$  NaCl for 24 hours, lead to changes in the activity of the enzymes related to osmoregulation and may disrupt the homeostasis of the animal in longer exposures. The results also showed that exposure of *P. lineatus* to  $5 \text{ g L}^{-1}$  NaCl provides an attenuation on the effects of the stress without harming the processes of osmoregulation.

**Keywords:** Carbonic anhydrase. Blood glucose. Cortisol.  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Plasma ions. Pisciculture.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Hiperregulação em teleósteos dulcícolas.....	18
<b>Figura 2</b> - Esquema básico de uma célula de cloreto.....	19
<b>Figura 3</b> - Esquema das células de cloreto e suas subdivisões em $\alpha$ e $\beta$ , representando as principais vias de transporte iônico.....	21
<b>Figura 4</b> - Representação simplificada de uma lamela.....	22
<b>Figura 5</b> - Estrutura e função do rim de um teleósteo dulcícola.....	23
<b>Figura 6</b> - Quadro resumindo as fases do estresse em peixes e suas caracterizações. ....	27
<b>Figura 7</b> - Juvenil de <i>Prochilodus lineatus</i> .....	28
<b>Figura 8</b> - Foto de um peixe sendo estressado. ....	35
<b>Figura 9</b> - Concentração plasmática dos íons $\text{Na}^+$ , $\text{Cl}^-$ e $\text{K}^+$ de <i>Prochilodus</i> <i>lineatus</i> expostos a 1, 5 ou 10 g.L <sup>-1</sup> NaCl ou somente a água desclorada nos tempos 6 ou 24h.....	39
<b>Figura 10</b> - Concentração de glicose plasmática em <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a 1, 5 ou 10 g.L <sup>-1</sup> NaCl ou somente a água desclorada nos tempos 6h ou 24h .....	40
<b>Figura 11</b> - Atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase de brânquia e rim em <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a 1, 5 ou 10 g.L <sup>-1</sup> NaCl ou somente a água desclorada nos tempos 6 ou 24h.....	41
<b>Figura 12</b> - Atividade da enzima Anidrase Carbônica de brânquia em <i>Prochilodus lineatus</i> expostos a 1, 5 ou 10 g.L <sup>-1</sup> NaCl ou somente a água desclorada nos tempos 6 ou 24h.....	42
<b>Figura 13</b> - Níveis plasmáticos de cortisol em <i>Prochilodus lineatus</i> amostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 ou 6 horas do estresse, sem exposição prévia a 5 g.L <sup>-1</sup> NaCl ou com a exposição a prévia. ....	45
<b>Figura 14</b> - Níveis plasmáticos de glicose em <i>Prochilodus lineatus</i> amostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 e 6 horas do estresse, sem exposição prévia a 5 g.L <sup>-1</sup> NaCl ou com a exposição a prévia.....	46
<b>Figura 15</b> - Parâmetros hematológicos de <i>Prochilodus lineatus</i> a amostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 e 6 horas do estresse, sem exposição prévia a 5 g.L <sup>-1</sup> de NaCl ou com a exposição prévia ao sal. ....	47

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Osmolaridade e concentrações de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup> dos diferentes meios experimentais utilizados (1, 5 e 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl) e média da osmolaridade e das concentrações iônicas do plasma de *Prochilodus lineatus* após as exposições ao NaCl (1, 5 e 10 g.L<sup>-1</sup>) nos tempos 6 e 24h.....40
- Tabela 2** - Dados hematológicos de *Prochilodus lineatus* expostos a 1, 5 ou 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl ou somente a água desclorada nos tempos 6 ou 24h .....43
- Tabela 3** - Índices hematimétricos de *Prochilodus lineatus* expostos a 1, 5 ou 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl ou somente a água desclorada nos tempos 6 ou 24h .....43
- Tabela 4** - Índices hematimétricos de *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente (t<sub>0</sub>) ou após 1, 3 e 6 horas do estresse, sem exposição prévia a 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl ou com a exposição prévia ao sal.....48

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 A PISCICULTURA.....	14
1.2 OSMORREGULAÇÃO EM PEIXES DE ÁGUA DOCE .....	16
1.3 RESPOSTA DE ESTRESSE EM PEIXES.....	24
1.4 O <i>PROCHILODUS LINEATUS</i> .....	27
<b>2 OBJETIVOS GERAIS .....</b>	<b>29</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 MODELO EXPERIMENTAL E ACLIMATAÇÃO .....	30
3.2 EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO AO NaCl .....	30
3.2.1 Amostragem.....	31
3.2.2 Análises Hematológicas .....	31
3.2.3 Análises plasmáticas .....	32
3.2.4 Atividade enzimática em brânquias e rim.....	33
3.3 EXPERIMENTOS DE ESTRESSE AGUDO.....	35
3.3.1 Análises hematológicas.....	36
3.3.2 Análises de indicadores de estresse .....	36
3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 EXPERIMENTO DE EXPOSIÇÃO AO NaCl .....	38
4.1.1 Análisesplasmáticas .....	38
4.1.2Atividade da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase .....	41
4.1.3 Atividade da Anidrase Carbônica .....	42
4.1.4 Análises hematológicas.....	42
4.2 EXPERIMENTO DE ESTRESSE .....	44
4.2.1 Parâmetros de estresse: cortisol e glicemia.....	44
4.2.2Parâmetros hematológicos.....	46

<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A PISCICULTURA

Na década de 1970, a prática de piscicultura foi incluída nas atividades comerciais relacionadas à produção de alimento humano (OLIVEIRA, 2009). Nesta mesma década, estudos sobre o estresse na fisiologia de peixes tornaram-se mais freqüentes. Foram caracterizados os conceitos de estresse primário e secundário em peixes (MAZEAUD; MAZEAUD; DONALDSON, 1977), relacionou-se a suscetibilidade a doenças com o estresse causado por fatores ambientais (SNIESZKO, 1974), identificou-se a elevação de glicemia como indicador de estresse (HATTINGH, 1977), entre outros dados de grande relevância. Com a intensificação da prática de piscicultura esses estudos tornaram-se mais necessários, pois o estresse é potencializado com as técnicas de manejo que envolvem manipulação, alimentação, a qualidade da água, interações biológicas, transporte, densidade de estocagem e outros fatores que podem variar de acordo com os critérios de cada produtor.

No sul do Brasil, os primeiros registros da prática de piscicultura foram em 1942, quando o limnologista Hermann Kleerekoper realizou estudos de reprodução com o peixe rei (*Odontesthes* sp.) na Lagoa dos Quadros, com o objetivo de repovoamento da lagoa (POLI; GRUMANN; BORGHETTI, 2000). Durante a década de 1970 até o início de 1980 a prática de piscicultura se instalou definitivamente na região sul, impulsionada pelo desenvolvimento que ocorria em todo o país. Inicialmente, vários fatores colaboram para o sucesso no crescimento da prática. Os alevinos eram criados em grandes quantidades e produzidos em estações públicas; a disponibilidade de terra era ampla, podendo-se construir estações vastas e com crédito abundante; não havia grandes preocupações com os aspectos ambientais, os recursos hídricos pareciam infinitos e eram utilizados deliberadamente. Hoje, mediante a competitividade do mercado em vários setores, seja alimentício ou científico, a prática de aquicultura encontra adversidades, pois o crédito é caro e seletivo, dificultando a aquisição de terra e meios de produção. As exigências ambientais são mais rígidas e há leis em vigor que prezam a sustentabilidade e estabelecem regras e critérios para a utilização da terra, para os meios de produção e para a utilização dos recursos hídricos, pois sua finitude está

bem estabelecida. Mesmo mediante todas essas adversidades, na década de 2000 os registros de desenvolvimento na aquicultura foram maiores do que nas décadas anteriores (POLI; GRUMANN; BORGHETTI, 2000). Além de ser utilizada na alimentação humana, a aqüicultura, em especial a piscicultura, também é empregada no lazer em pesque-e-pague e atende grande demanda nos experimentos de pesquisas científicas.

Como qualquer atividade agropecuária, a prática de piscicultura exige conhecimento técnico e científico para sua manutenção, visando garantir a qualidade da produção e obter melhor custo benefício. A saúde dos peixes é o objeto principal de toda a atenção voltada aos meios de produção. Isso refletirá tanto no retorno imediato que o produtor terá no momento da comercialização dos animais, pois peixes doentes ou mal cultivados são inviáveis para qualquer tipo de atividade, bem como refletirá no retorno potencial das gerações seguintes, já que a saúde das fêmeas determina a produção e a qualidade dos ovócitos.

O ambiente aquático dulcícola é muito instável, principalmente no que diz respeito aos fatores abióticos. Essa instabilidade combinada com as adversidades bióticas que o peixe enfrenta o submete a um estresse natural. Tudo isso somado ao estresse de manejo em pisciculturas pode ocasionar um estresse crônico e comprometer o sistema imune do peixe, tornando-o susceptível a inúmeras parasitoses (GARCIA et al., 2007; SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2009). Dentre elas, uma muito comum é a *ictiofitiriose*, conhecida popularmente como “doença dos pontos brancos”, provocada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multijiliis* (POKORNY; RUGGIERI, 1976; DICKERSON; CLARK, 1998; NIGRELLI; GARCIA et al., 2007; SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2009). Este protozoário fica encistado no substrato de fundo em uma das fases de seu ciclo biológico e pode ser encontrado em toda a superfície do peixe entre a derme e a epiderme, causando hiperplasia nas células. Também pode ser encontrado nas brânquias, ocasionando problemas respiratórios (NIGRELLI; POKORNY; RUGGIERI, 1976).

O sal NaCl é bastante utilizado para minimizar o estresse nos peixes provocado pelo manejo, transporte e estocagem que ocorrem em piscicultura (BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006; SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2009). O sal reduz o gradiente osmótico entre os fluidos internos do peixe e o meio externo (GOMES et al., 2006a; GARCIA et al., 2007), o que implica em menor gasto energético para manutenção do equilíbrio osmótico. O sal também aumenta a

produção de muco e reduz a agitação dos peixes no local de estocagem (MARCHIORO; BALDISSEROTTO, 1999; GOMES et al., 2003; GOMES et al., 2006a; GARCIA et al., 2007). Isso tudo facilita o transporte destes animais, diminuindo o índice de mortalidade decorrente dos procedimentos estressantes. Há estudos que comprovam que o sal exerce um efeito supressor na liberação do cortisol do tambaqui (*Colossoma macropomun*), (GOMES et al., 2003) e matrinxã (*Bricon cephalus*), (CARNEIRO; URBINATI, 2001).

O NaCl também é utilizado como tratamento no combate a parasitoses como a *ictiofitiriose* (CAMARGO; POUHEY; VAZ, 2006; GARCIA et al., 2007) e outros protozoários, como os do gênero *Dactylovirus* e *Gyrodactylus*, microcrustáceos e fungos (ERGENS, 1962), uma vez que altera a osmolaridade da água, à qual tais microorganismos estão adaptados.

Porém, a utilização do NaCl como profilaxia é de certo modo indiscriminada. Concentrações de até 30 g.L<sup>-1</sup> de água chegam a ser usadas em peixes dulcícolas (BRANDÃO, 2004), o que pode ser altíssima (85% da concentração marinha) para determinadas espécies, levando-se em consideração que peixes de água doce estão naturalmente adaptados a águas com baixas concentrações de íons. Em alguns peixes isso pode acarretar um grande desequilíbrio osmótico (GOMES et al., 1999; GOMES et al., 2006a; GOMES et al., 2006b; SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2009), não se sabendo ao certo se esses animais são capazes de hiporregular eficientemente grandes gradientes osmóticos. Além disso, é vago o conhecimento sobre o uso do NaCl como atenuante do efeito estressor do manejo e transporte destes animais.

## 1.2 OSMORREGULAÇÃO EM PEIXES DE ÁGUA DOCE

Os peixes vivem em ambientes que geralmente possuem osmolaridade diferente do seu plasma sanguíneo (BEADLE, 1943; CAMARGO; POUHEY; VAZ, 2006; EVANS, 2008). A água doce possui concentrações de sais muito variáveis, que se dão em função do tipo de solo em que ela se encontra. A osmolaridade da água doce normalmente varia entre 0,1 a mais de 10 mOsm.L<sup>-1</sup>.H<sub>2</sub>O (EVANS, 2008) .

Já a água marinha possui em torno de 35 g de sal por litro de água e sua osmolaridade é em torno de 1000 mOsm. L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>O (EVANS, 2008). A origem

de toda esta salinidade se dá pela dissolução dos sais das rochas da superfície terrestre e de seu transporte para os oceanos através dos rios. Os processos vulcânicos que ocorrem no assoalho oceânico também colaboram para o aumento da salinidade (TESSLER; MAHIQUES, 2000).

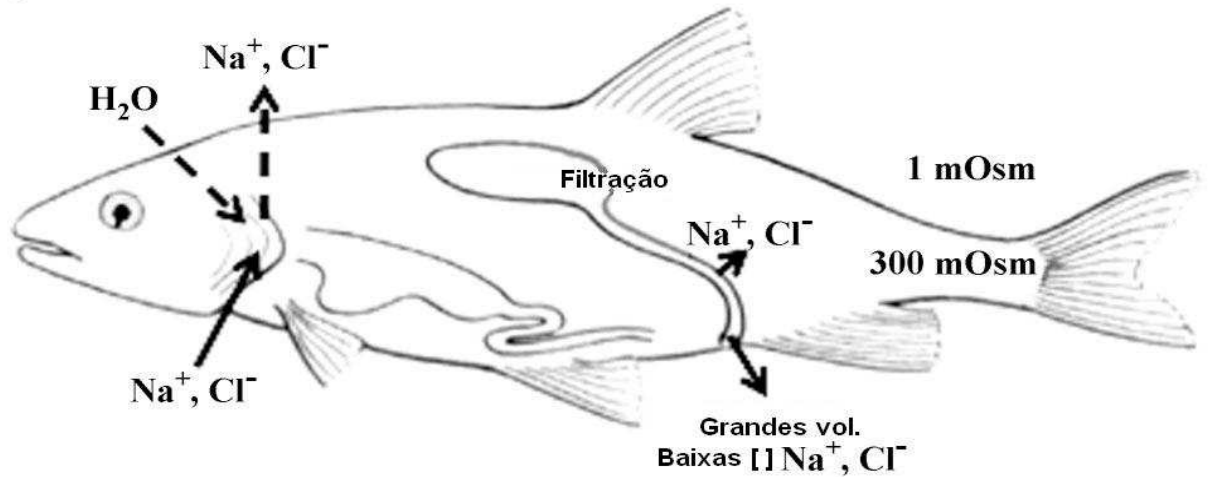
Os animais que não controlam a osmolaridade de seus fluidos e acompanham a variação osmótica do meio são chamados *osmoconformadores*. Os invertebrados marinhos geralmente se enquadram nesta situação. Por outro lado, os animais que gastam energia para manter um equilíbrio entre a osmolaridade de seu fluido interno e o meio são *osmoreguladores*. Todos os teleósteos são osmorreguladores (EVANS, 2008).

A principal adversidade que os peixes de água doce encontram no que diz respeito à osmorregulação é o fato de serem hiperosmóticos com relação ao meio (BEADLE, 1943; CAMARGO; POUHEY; VAZ, 2006; EVANS, 2008). A água segue o gradiente osmótico e tende a entrar no peixe para diluir seu conteúdo interno de sais. Da mesma forma, nas brânquias e nos rins, os íons tendem a sair por difusão (BEADLE, 1943; BALDISSEROTTO, 1999; CAMARGO; POUHEY; VAZ, 2006; EVANS, 2008; MARCHIORO).

Para se manter em equilíbrio osmótico, o peixe dulcícola realiza hiperregulação (BEADLE, 1943; CAMARGO; POUHEY; VAZ, 2006; EVANS, 2008). Neste processo o peixe realiza uma captação iônica ativa, principalmente através do epitélio branquial e uma excreção com grandes volumes de urina diluída através do rim (Figura 1).

**Figura 1** - Esquema resumindo a hiperregulação em teleósteos dulcícolas. A absorção iônica se dá principalmente pelas brânquias. Embora o rim também colabore na absorção, sua principal função é produzir grandes volumes de urina diluída. As setas pontilhadas representam transporte passivo; as setas sólidas, transporte ativo.  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  estão representando todos os íons que escapam passivamente.

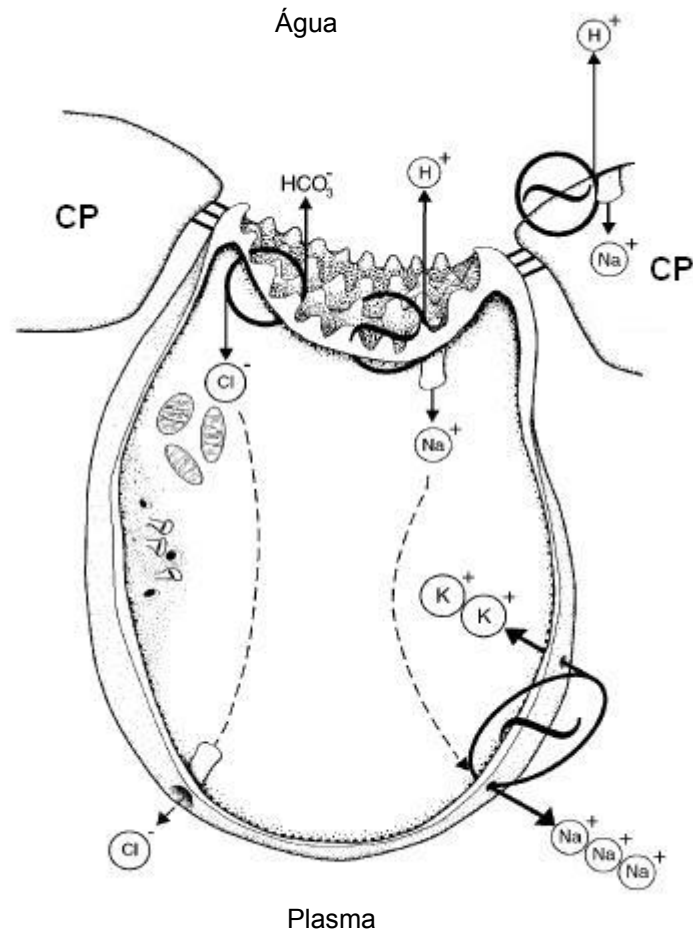
### Água doce



**Fonte:** Adaptado de Evans, 2008.

Para a captação ativa de íons, o peixe conta com um tipo de célula especial presente no epitélio branquial, as *células de cloreto*. Estas células possuem uma superfície apical ampla com numerosas microvilosidades (MCCORMICK, 2001) e uma série de vias de transporte iônico, repletas de canais, trocadores e ATPases para promover o equilíbrio osmótico necessário à homeostase (Figura 2).

**Figura 2** - Esquema de uma célula de cloreto ilustrando as microvilosidades e algumas vias de transporte iônico. CP = Células Pavimentosas



**Fonte:** McCormick, 2001.

Na porção apical desta célula, que fica voltada para o meio externo (água doce), existem trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  e  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  responsáveis por capturar íons de  $\text{Na}^+$  da água e levá-los ao interior da célula, trocando-os por íons de  $\text{H}^+$  e  $\text{NH}_4^+$ , que serão excretados (Figura 3). Existem também na membrana apical canais de  $\text{Na}^+$ , por onde o  $\text{Na}^+$  do ambiente entra por difusão (BALDISSEROTTO, 2002; EVANS, 2010). Existem vários elementos responsáveis por criar um gradiente de concentração favorável a entrada de  $\text{Na}^+$ . A enzima  $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPase é um destes elementos e está localizada na membrana basolateral da célula de cloreto. Esta enzima utiliza a energia oriunda da fosforilação de ATP para mover os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  contra seus gradientes de concentração. Ela retira do interior da célula e lança no plasma 3 íons  $\text{Na}^+$ , e retira 2 íons  $\text{K}^+$  plasmáticos e os lança no interior celular. O  $\text{K}^+$

acumulado na célula tende a escapar por canais de  $K^+$  (BALDISSEROTTO, 2002). Também existe na membrana apical uma enzima extrusora de prótons, a  $H^+$ -ATPase, que também utiliza energia metabólica para retirar íons  $H^+$ , criando um gradiente eletroquímico favorável a entrada de  $Na^+$  (HWANG, 2009). Há indícios que nas células do epitélio branquial também há co-transportadores de  $Na^+/Cl^-$  e  $Na^+/HCO_3^-$  na membrana basolateral, que retiram do interior da célula e movem para o plasma um íon de  $Na^+$  juntamente com um íon  $HCO_3^-$  ou  $Cl^-$ , respectivamente.

Os íons  $Cl^-$  também são obtidos a partir de um trocador que se localiza na membrana apical da célula de cloreto, o  $Cl^-/HCO_3^-$ , que capta o  $Cl^-$  em troca de  $HCO_3^-$ . Na região basolateral da célula de cloreto há canais de escape de  $Cl^-$ , para que este não se acumule no interior da célula (BALDISSEROTTO, 2002; EVANS, 2008).

O íon  $Ca^{++}$ , embora não tenha participação na osmorregulação do animal, é utilizado para o desenvolvimento embrionário, eclosão e crescimento dos peixes. Este entra nas células de cloreto passivamente através de um canal de  $Ca^{++}$ . Uma  $Ca^{++}$ -ATPase e um trocador  $Ca^{++}/Na^+$ , localizados na membrana basolateral, transportam este  $Ca^{++}$  para o plasma, garantindo que se mantenha sempre um gradiente adequado de  $Ca^{++}$  na célula de cloreto para que o mesmo continue entrando (BALDISSEROTTO, 2002).

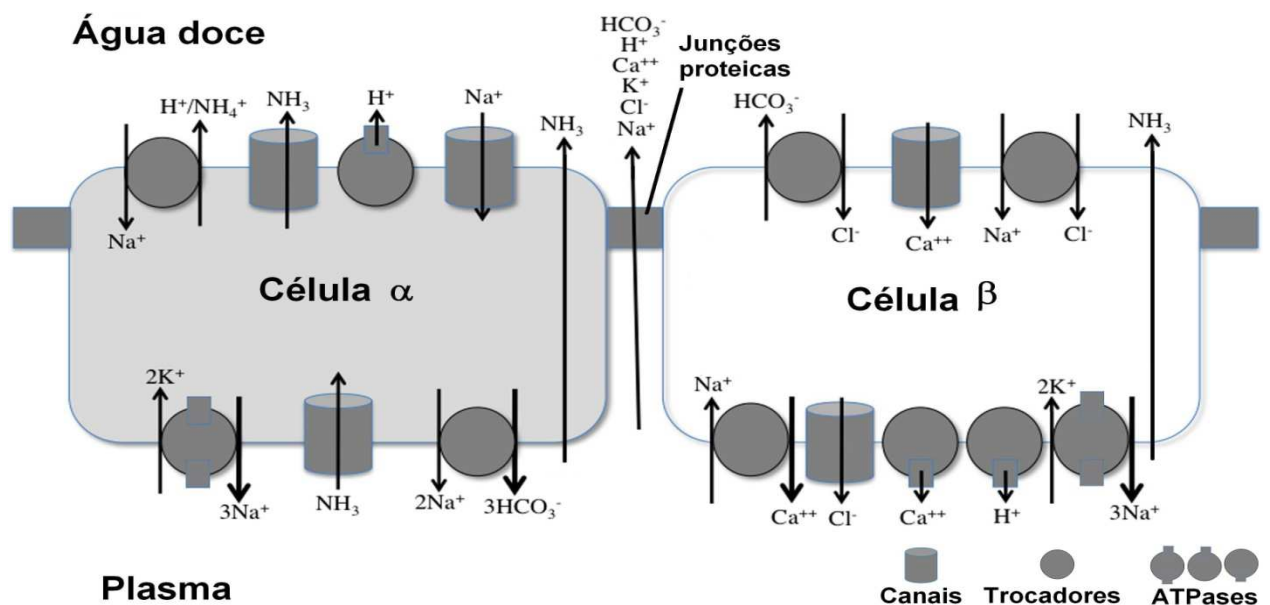
Mediante todo esse sistema de transporte, é fácil perceber que as células de cloreto além de promover a absorção de íons colaboram para a manutenção do equilíbrio ácido-base. Pois como já foi mencionado, na sua membrana apical existem trocadores  $Na^+/H^+$ ,  $Na^+/NH_4^+$ ,  $Cl^-/HCO_3^-$ ,  $H^+$ -ATPase, e na membrana basolateral co-transportadores  $Na^+/HCO_3^-$ , além de  $H^+$ -ATPases que podem ser ativadas durante uma acidose celular (EVANS, 2008). O  $NH_3$  e o íon  $NH_4^+$  são originados do metabolismo de proteínas e bases nitrogenadas. Como o  $NH_3$  é uma pequena molécula gasosa e neutra, atravessa as membranas biológicas livremente, porém há estudos mostrando que o transporte de  $NH_3$  através do epitélio branquial pode envolver transportadores (HUANG; PENG, 2005; WEIHRAUCH *et al.*, 2009; WRIGHT; WOOD, 2009). O íon  $NH_4^+$ , que possui carga positiva, sempre precisará do auxílio de transportadores para atravessar as membranas. Ele também pode competir com o  $K^+$  para ser transportado através dos canais de  $K^+$  (IP; CHEW, 2010). O  $H^+$  e o  $HCO_3^-$  são formados a partir da dissociação do  $H_2CO_3$ , formado a

partir do  $\text{CO}_2$  eliminado da respiração combinado com a água, por intermédio da enzima Anidrase Carbônica (principalmente plasmática), que catalisa a hidratação do  $\text{CO}_2$  (BALDISSEROTTO, 2002; EVANS, 2008). Esta enzima pode estar solúvel no citosol ou associada à membrana plasmática (CONLEY; MALLATT, 1988).

Em alguns peixes já foram descritos dois tipos de células de cloreto, a célula  $\alpha$ , que excreta ácidos, e a célula  $\beta$ , que excreta base (Figura 3). As células  $\alpha$  possuem em sua membrana apical os trocadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$  e a  $\text{H}^+$ -ATPase, e em sua membrana basolateral o trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  e o co-transportador  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ . Já as células  $\beta$  possuem na membrana apical o trocador  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  e na membrana basolateral a  $\text{H}^+$ -ATPase. Ambas as células possuem  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase na membrana basolateral e os demais canais e transportadores necessários para a manutenção osmótica (EVANS, 2002; EVANS 2010). Os elementos das células  $\alpha$  e  $\beta$  podem estar presentes em um mesmo tipo de célula de cloreto e ainda são poucas espécies de peixes que tiveram estudos das células de cloreto com este caráter  $\alpha$  e  $\beta$ .

Muitos íons, como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{H}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  e  $\text{H}^+$  escapam do peixe de forma passiva através das junções celulares que há entre as células do epitélio branquial. Estas junções são junções protéicas, e dentre os vários tipos, as mais citadas na literatura são as junções oclusivas ou *tight junctions*.

**Figura 3** - Esquema das células de cloreto e suas subdivisões em  $\alpha$  e  $\beta$ , representando as principais vias de transporte iônico.

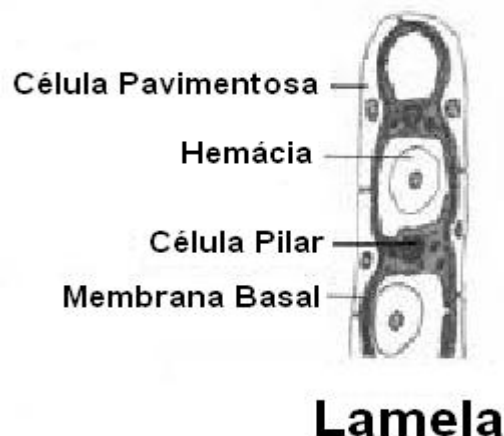


Fonte: Adaptado de Evans, 2010.

Outros tipos celulares, além das células de cloreto, compõem o epitélio branquial. As *células pavimentosas* são as predominantes no epitélio branquial, pois são elas as maiores responsáveis pelas trocas gasosas. Elas fazem contato quase que diretamente (separadas apenas por uma lâmina basal) com as *células pilares*, que estão organizadas como um canal por onde irão passar as células sanguíneas que realizarão as trocas gasosas e metabólicas (Figura 4). Há estudos que constataram a presença de canais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$ -ATPase na membrana apical das células pavimentosas de tilápia de Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) (HIROI *et al.*, 1998; WILSON *et al.*, 2000), podendo assim, estas células estarem relacionadas de alguma forma com o controle osmorregulatório.

Também compõem o epitélio branquial as *células mucosas*, responsáveis pela produção de muco rico em glicoproteínas para a proteção do epitélio (SABÓIA-MORAES *et al.*, 1996), e os *corpúsculos gustativos*, que possuem receptores químicos relacionados a detecção de alimento (EIRAS-STOFELLA; CHARVET-ALMEIDA, 1998). Todas estas células, inclusive as células de cloreto, são encontradas em menor número em comparação com as células pavimentosas.

**Figura 4** - Representação simplificada de uma lamela, ilustrando seus principais componentes.

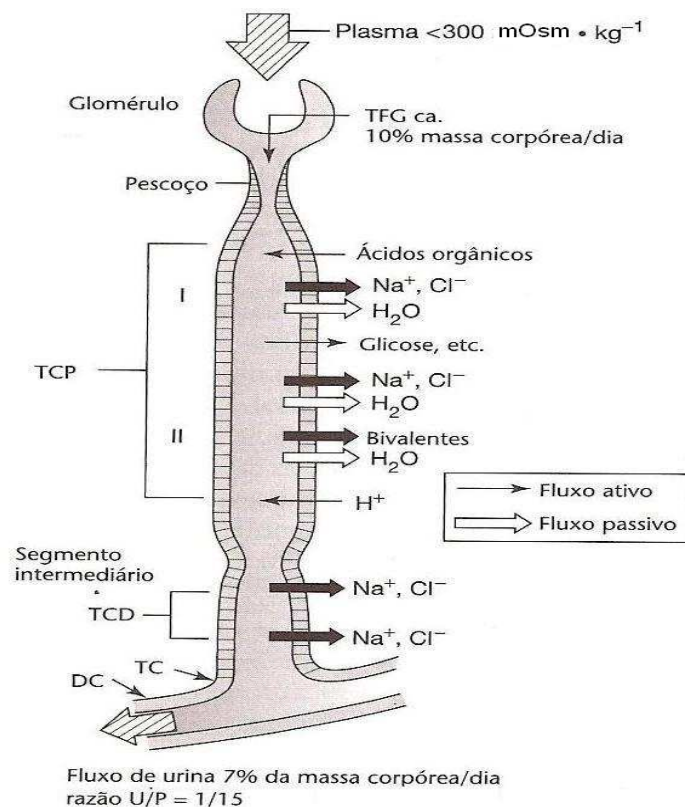


**Fonte:** Adaptado de Ramos, 2008.

Embora o rim não tenha um papel relevante na captação de íons em teleósteos dulcícolas, ele exerce uma função extremamente importante na produção de grande quantidade de urina diluída, graças à reabsorção de íons monovalentes

do filtrado (Figura 5). Os teleósteos dulcícolas não bebem água, pois a água doce já tende a entrar facilmente em seu organismo via brânquias (principalmente) e tegumento, seguindo seu gradiente osmótico. Beber água só aumentaria ainda mais a quantidade de água a ser excretada pelos rins. Os glomérulos atuam continuamente na produção de um ultrafiltrado, que é isosmótico em relação ao sangue. À medida que o ultrafiltrado passa ao longo dos túbulos proximais, os íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e íons bivalentes são reabsorvidos ativamente, e a glicose e inclusive a água são reabsorvidas passivamente. É também neste segmento que são adicionados os dejetos nitrogenados e ácidos orgânicos para a excreção. O próximo segmento, o túbulo distal, é impermeável a água. Então apenas os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são reabsorvidos e a urina torna-se hiposmótica em relação ao sangue.

**Figura 5** - Estrutura e função do rim de um teleósteo dulcícola. TFG é a taxa de filtração glomerular, ou seja, a taxa em que é formado o ultrafiltrado. O glomérulo de um peixe dulcícola filtra o equivalente a 10% da massa corpórea do animal por dia. TCP é túbulo convoluto proximal (também chamado de túbulo proximal nos peixes). Ele é funcionalmente dividido em dois segmentos (I e II), entre os quais varia a substância que é reabsorvida. No segmento I e no TCD (túbulo convoluto distal) são reabsorvidos ativamente os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . TC e DC são túbulo coletor e ducto coletor, respectivamente. O fluxo final de urina que chega ao ducto coletor é 7% da massa corpórea do peixe por dia. U/P é a razão da concentração ultrafiltrado-plasma, que mede a capacidade de concentração do néfron.



Fonte: Adaptado de Pough, Janis e Heiser, 2003.

### 1.3 RESPOSTA DE ESTRESSE EM PEIXES

Em seu habitat natural, os peixes enfrentam inúmeras condições adversas que os levam a desencadear respostas na tentativa de restabelecer a homeostase. Estas adversidades incluem desde aspectos físico-químicos, como a instabilidade da água doce no caso dos dulcícolas (oxigenação, pH e temperatura), até condições bióticas, como competidores naturais, conflito entre os dominantes de um cardume e fuga de predadores (WEDEMEYER, 1996). Em ambientes de piscicultura os peixes ainda se deparam com todos os procedimentos estressantes do manejo, transporte e acomodação (GOMES et al., 2003; BRANDÃO; GOMES; CHAGAS, 2006; GOMES, 2007; SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2009).

O efeito dos estressores, além de perturbar o equilíbrio homeostático do animal, desencadeia uma série de reações fisiológicas de caráter compensatório, na tentativa de habilitar o animal a superar a condição estressante. Desse modo, a resposta ao estresse é adaptativa (BARTON, 2002; GOMES, 2007). Porém, se submetido a estresse agudo e contínuo, a resposta torna-se disfuncional e compromete sua saúde de forma abrangente (BARTON, 2002; LIMA et al., 2006). As respostas fisiológicas ao estresse são divididas em primária, secundária e terciária (BARTON, 2002), (Figura 6).

A resposta primária envolve mudanças neuroendócrinas desencadeadas imediatamente após a exposição ao agente estressor. Os órgãos sensoriais detectam os estímulos estressantes e iniciam a ativação de dois eixos neuroendócrinos (WENDEELAR BONGA, 1997): o eixo hipotálamo-simpático-células cromafins (eixo HSC), em que os estímulos são levados dos órgãos sensoriais para o hipotálamo, que por sua vez estimula à liberação de catecolaminas pelas células cromafins, localizadas, na maioria dos teleósteos, no tecido renal; e o eixo hipotálamo hipófise-interrenal (eixo HPI), em que o hipotálamo estimula a liberação do hormônio liberador de corticotropina, que promove a liberação da corticotropina no sangue. A corticotropina estimula a liberação de corticosteróides, principalmente o cortisol, pelas células interrenais (CARNEIRO, 2001). Elevação do nível de cortisol plasmático já foi detectada após manejo por rede em trutas arco-íris *Oncorhynchus mykiss* (BARRY, OCHIAI, MALISON, 1995).

Esta resposta endócrina inicial estimulará vários ajustes metabólicos, que marcarão o ponto de início das respostas secundárias. Estas são

caracterizadas como fase de resistência e tentativa de adaptação. As catecolaminas e os hormônios corticosteróides estimularão a ocorrência de alterações fisiológicas e bioquímicas. As catecolaminas promovem o aumento dos níveis de glicose no sangue a partir da degradação do glicogênio hepático (MAZEAUD; MAZEAUD; DONALDSON, 1977; THOMAS, 1990). O aumento da glicemia durante o estresse já foi detectado em vários teleósteos (BARTON; IWAMA, 1991), inclusive durante operações de transporte (CARMICHAEL et al., 1984). Os corticosteróides, principalmente o cortisol, segundo Vijayan e Moon (1992), favorecem a mobilização da glicose, pois ele estimula o catabolismo protéico e a gliconeogênese. Conseqüentemente, como resposta a ação do cortisol, acaba ocorrendo a diminuição da proteína muscular.

Alterações hematológicas também caracterizam as respostas secundárias. O estresse causa hemoconcentração ou hemodiluição em muitas espécies de teleósteos, o que altera os valores de hematócritos e outros parâmetros hematológicos (McDONALD; MILLIGAN, 1997).

Outros distúrbios causados pelo estresse, que também qualificam as respostas secundárias são os osmorregulatórios. Estes desequilibram o balanço hidromineral, que a partir variações osmo-iônicas podem diminuir a osmolaridade plasmática dos peixes dulcícolas (McDONALD e MILLIGAN, 1997). Segundo Cech et al. (1996), altos níveis de adrenalina induzem o aumento da permeabilidade do epitélio branquial à água.

Pode-se ainda listar uma série de alterações ocasionadas pela ação das catecolaminas e corticosteróides resultantes das respostas secundárias: aumento dos batimentos cardíacos e taxa cardiorrespiratória (CARNEIRO, 2001); mobilização das reservas lipídicas; alteração das taxas de reconversão de neurotransmissores cerebrais; alteração das taxas de circulação de outros hormônios, como da hipófise e tireóide (PICKERING, 1993).

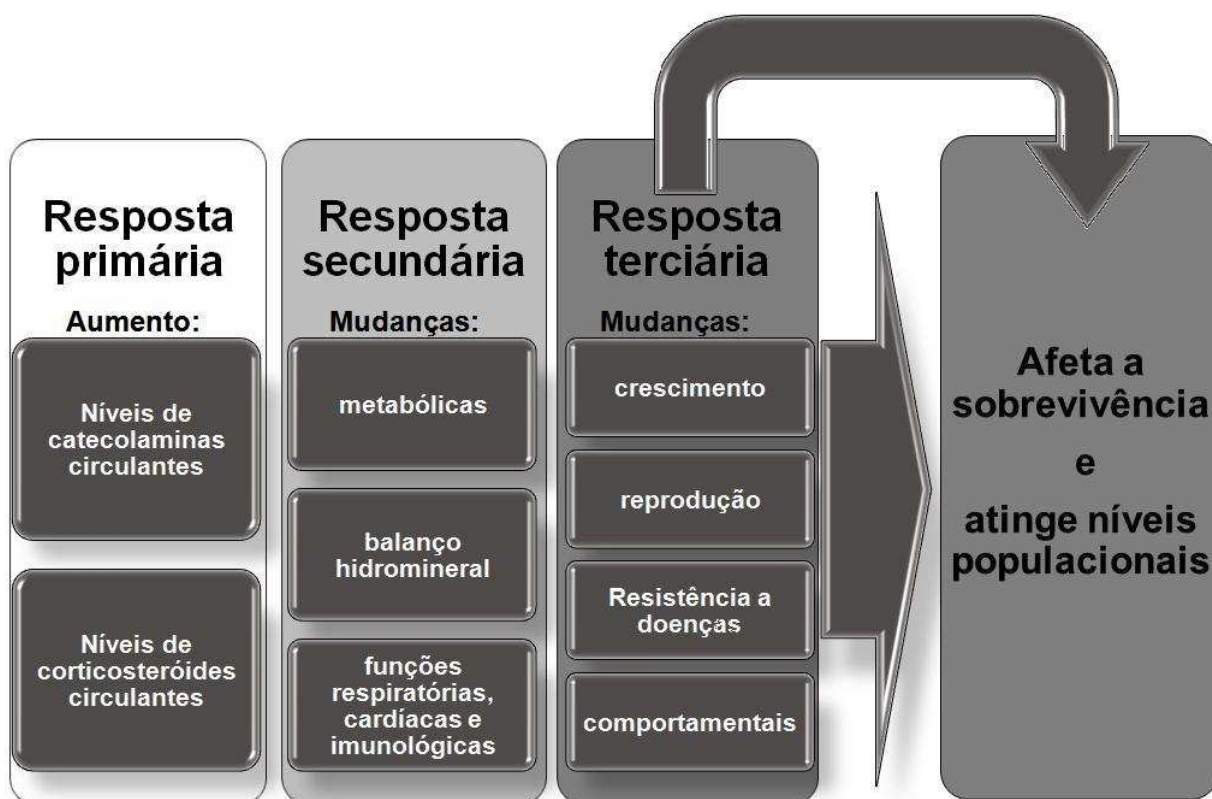
Se estímulos estressantes persistirem, se elevarem sua intensidade, e o estresse se tornar crônico, o organismo segue para uma fase de exaustão que passa a interferir no seu sistema imune. Quando chega neste ponto, o peixe está desenvolvendo uma resposta terciária ao estresse (CARNEIRO, 2001). O baixo número de hemácias ocasionado pela persistência das respostas secundárias diminui a eficiência do peixe para resistir a doenças e agentes infecciosos.

A taxa de crescimento é afetada na resposta terciária. O hormônio de crescimento (GH) aumenta o apetite e a eficiência na metabolização do alimento. Em experimentos com truta arco-íris (PICKERING, 1993), em 24 horas de confinamento o peixe apresentou diminuição no nível de GH plasmático. Segundo Wendeelar Bonga (1997), o cortisol é um supressor de crescimento. Ele pode estar relacionado com a inibição do GH na hipófise em situações de estresse crônico.

As respostas secundárias também atuam sob caráter reprodutivo. Lima *et al.* (2006), afirmam que o estresse de manejo pode atrasar ou adiantar o período de reprodução da truta arco-íris e que na tilápia (*Oreochromis niloticus*) a reprodução é cessada completamente. Também já foi observada inibição da ovulação e atresia após captura e confinamento no bagre *Ictalurus punctatus* (SMALL, 2004). Wendeelar Bonga (1997), afirma que o cortisol retarda ou cessa o processo reprodutivo. Foi constatado que em truta arco-íris sob condições de confinamento (PICKERING, 1993), ocorre diminuição dos níveis de testosterona e 11-ketosterona nos machos. O cortisol atua na hipófise, inibindo a secreção de gonadotropina, e atua na gônada, diminuindo a produção de esteróides. Nas fêmeas, o cortisol age no fígado, reduzindo o número de receptores hepáticos para o estradiol.

Os danos causados pelas respostas terciárias afetam a sobrevivência do animal e passam a ser manifestados em níveis populacionais. Nesta fase sua capacidade de adaptação está comprometida, e por este motivo a resposta terciária é considerada não adaptativa (COSTA, 1998).

**Figura 6** - Quadro resumindo as fases do estresse em peixes e suas caracterizações. A resposta terciária leva a uma circunstância mais nociva, pois ao se redirecionar do indivíduo para a população, pode comprometer a existência mesma na dada região.



Mediante a todas as adversidades que situações de estresse podem gerar, fica evidente que o transporte e o manejo são procedimentos que podem se tornar nocivos aos peixes devido ao estresse intenso que é desencadeado, podendo até levá-los a morte (CAMARGO; POUHEY; VAZ, 2006; GOMES et al., 2003).

#### 1.4 O PROCHILODUS LINEATUS

O *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), popularmente chamado de curimba (Figura 7), é um peixe neotropical da família Prochilodontidae, ordem Characiformes (CASTRO; VARI, 2003) que ocorre muito nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, endêmico das bacias do rio Paraná e Paraguai (FUGI; HAHN; AGOSTINHO, 1996; REVALDAVES; RENESTO; MACHADO, 1997). Possui características que o torna bastante viável para o cultivo em piscicultura, como seu hábito alimentar detritívoro, ingerindo detritos orgânicos, partículas de lodo, diatomáceas e sedimentos inorgânicos (FUGI; HAHN; AGOSTINHO, 1996). Isso lhe

confere importância na cadeia trófica, já que colabora com a ciclagem dos nutrientes oriundos de material em decomposição (WINEMILLER; JEPSEN, 1998).

**Figura 7** - Juvenil de *Prochilodus lineatus*



Possui também tolerância a variações de temperatura (BARRINUEVO; FERNANDES, 1995) e de pH (TAKASUSUKI; ARAUJO; FERNANDES, 2004). Assim, o custo de sua produção é baixo e o torna atrativo para o cultivo, sendo muito aplicado na alimentação humana. Possui elevada taxa de crescimento (GALDIOLI et al., 2002) e seu tamanho pode chegar a 80 cm e seu peso até 7 kg (CASTRO; VARI, 2003). Em seu habitat natural, esses peixes vivem em grandes cardumes e realizam longas migrações reprodutivas, porém não realizam desova natural em cativeiros, mas mesmo assim não apresentam problemas com relação à produção de gametas, o que torna viável a desova pela indução hormonal (ITUASSÚ et al., 2005).

## 2 OBJETIVOS GERAIS

Verificar se o NaCl interfere na osmorregulação de juvenis do peixe *Prochilodus lineatus* e também se atua como atenuante de efeito estressor causado pelo manejo deste peixe.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de exposição aguda (6 e 24 horas) ao NaCl com juvenis de *P. Lineatus* sob as concentrações de 1, 5 e 10 g.L<sup>-1</sup>;
- Verificar se a exposição aguda ao NaCl promove desequilíbrio osmo-iônico e alteração na glicemia em *P. Lineatus*, analisando a osmolaridade plasmática e concentrações plasmáticas de glicose e dos íons Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>;
- Verificar se a exposição aguda ao NaCl produz alterações hematológicas em *P. lineatus*, analisando o hematócrito, conteúdo de hemoglobina plasmática, contagem do número de hemácias e calculando os índices hematimétricos;
- Verificar se a exposição aguda ao NaCl promove alteração nas enzimas relacionadas a osmorregulação (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e anidrase carbônica ) em *P. lineatus*;
- Realizar testes de estresse agudo com juvenis de *P. lineatus* previamente expostos a 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl;
- Determinar os níveis plasmáticos dos indicadores de estresse glicose e cortisol e verificar se o NaCl atenuou o efeito estressor;
- Verificar se o estresse agudo causou alterações nos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos, e se o NaCl atuou como atenuante do efeito estressor.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MODELO EXPERIMENTAL E ACLIMATAÇÃO

Os experimentos foram realizados na sala de bioensaios do Laboratório de Ecofisiologia Animal, da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Foram utilizados juvenis do peixe *Prochilodus lineatus*, fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Os peixes foram transportados em sacos plásticos e acomodados em tanques de 300 litros, onde permaneceram por 5 dias para aclimatação antes do início aos experimentos. Foi utilizado um total de 98 peixes, com  $13,9 \pm 0,8$  cm e peso  $20,6 \pm 0,9$  g (média  $\pm$  erro padrão). Os experimentos foram realizados em aquários de vidro de 100 litros contendo 80 litros de água desclorada, com aeração constante e um fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro. O pH variou entre 6,73 e 6,97, a temperatura da água entre 22,6 e 24,7 °C, a condutividade entre 100 e 116  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  e o oxigênio dissolvido entre 7,9 e 8,2  $\text{mg}\cdot\text{O}_2\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 3.2 EXPERIMENTOS DE EXPOSIÇÃO AO NaCl

Foram utilizados dois tempos experimentais, 6 e 24 horas. Para cada tempo experimental foi utilizado um aquário contendo os peixes do grupo controle expostos apenas água desclorada, e 3 aquários dos grupos experimentais, onde foram adicionados água desclorada e as seguintes concentrações de NaCl (FMaia®): 1, 5 e 10  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Estas concentrações foram arbitrariamente definidas. Para garantir a total dissolução do sal, foram aguardadas 24 horas após a aplicação do sal antes de dar início ao experimento. Em cada aquário foram colocados 7 animais, mantendo-se uma proporção de 1,75 g de peixe por L de água.

Os parâmetros físicos e químicos da água de todos os grupos foram medidos antes e depois de cada experimento. A condutividade elétrica, o pH, o oxigênio dissolvido e a temperatura da água foram medidos com a utilização de analisador multiparâmetros de água (HANNA, Modelo HI 9828.). Após as 24 horas, sete peixes foram introduzidos em cada aquário, onde ficaram expostos aos meios experimentais durante os tempos amostrais para posterior amostragem.

### 3.2.1 Amostragem

A amostragem ocorreu sempre às 12h00. Os peixes foram coletados dos aquários com pequenas redes e imediatamente introduzidos em uma solução de benzocaína de  $0,32 \text{ mg.L}^{-1}$ . Depois de anestesiado, quando se observava a perda dos movimentos, o sangue do animal foi retirado pela veia caudal, com seringas plásticas de 1 mL previamente heparinizadas e o animal foi imediatamente sacrificado com secção medular. Alíquotas de sangue ( $5 \mu\text{L}$ ) foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo solução de tampão formol-citrato (3,8 g de citrato de sódio; 2,0 ml de formol 40% e água milli-Q q.s.p. 100 ml) para posterior contagem do número de hemácias. Uma pequena parte do sangue foi utilizada para preencher capilares de hematócrito para a determinação do mesmo. O restante do sangue foi conservado na geladeira para a dosagem da concentração de hemoglobina plasmática, que foi realizada no mesmo dia.

As brânquias e o rim foram retirados e transferidos para microtubos contendo tampões específicos para análise das enzimas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica. Foram conservados em ultrafreezer a  $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2 Análises Hematológicas

#### **Hematócrito**

Para determinação do hematócrito, imediatamente após a amostragem, alíquotas de sangue foram transferidas para microcapilares heparinizados e centrifugadas por 5 minutos em centrífuga de microhematócrito. A leitura foi feita utilizando-se uma cartela padronizada para hematócrito. O hematócrito foi feito logo após a amostragem para se evitar a coagulação do sangue, que além de deixar a amostra heterogênea, impede o preenchimento do microcapilar.

#### **Conteúdo de hemoglobina**

A determinação do conteúdo de hemoglobina foi realizada logo após a coleta do sangue, antes que aumentasse a lise das hemácias. O princípio do

método utilizado consiste em que o Fe (II) do heme da hemoglobina (oxihemoglobina e carboxihemoglobina) é oxidado para o estado férrico pelo ferricianeto, formando hemiglobina, que se combina com o cianeto ionizado para produzir cianeto de hemiglobina, que foi medido em espectrofotômetro a 540 nm.

### **Número de hemácias**

Para contagem de hemácias, uma amostragem do sangue total foi conservada em tampão formol-citrato por até 4 dias. O número de eritrócitos da solução contendo o sangue foi contabilizado em uma câmara de Neubauer.

### **3.2.3 Análises Plasmáticas**

Após as análises hematológicas, o sangue total foi centrifugado a 2.000 g por 10 minutos e o plasma foi coletado para determinação das concentrações de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ .

### **Osmolaridade**

A osmolaridade foi medida em osmômetro de congelamento (Osmomat® 030 – Gonotec). As amostras foram lidas em microtubos próprios para o aparelho. Este procedimento não consome a amostra, portanto ela foi reaproveitada para as demais análises.

### **Determinação de $\text{Cl}^-$**

A determinação da concentração de cloreto foi feita utilizando-se kit comercial (Labtest®) adaptado para leitora de microplacas, e as leituras foram feitas em espectrofotômetro, em 490 nm. O método utilizado se baseia na reação do íon cloreto com o tiocianato de mercúrio, formando cloreto mercúrio e íons tiocianato, que reagem com os íons férricos, formando tiocianato férrico, de cor amarela, proporcional à concentração de cloreto na amostra. Os resultados foram expressos em mM.

### **Determinação de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>**

Para determinação dos íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> foi utilizado um fotômetro de chama (Analizer 900). A concentração de cada íon foi determinada a partir de uma curva padrão, construída a partir de uma solução estoque de NaCl e KCl, ambos a 100 mM. As concentrações de NaCl utilizadas para a construção da curva para o íon Na<sup>+</sup> foram 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM. As concentrações de KCl utilizadas para a construção da curva para o íon K<sup>+</sup> foram 0,0125, 0,025, 0,050, 0,075 e 0,100 mM. Os resultados foram expressos em mM

### **Determinação de proteína em brânquia e rim**

A determinação de proteínas em brânquia e rim foi realizada segundo o método descrito por Bradford (1976), utilizando-se como padrão albumina de soro bovino (1 mg.mL<sup>-1</sup>). A leitura foi feita a 595 nm em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi expressa em mg.mL<sup>-1</sup>.

### **Concentração de glicose**

A concentração de glicose foi determinada através do método da *glicose oxidase* (GOD), utilizando-se kit comercial Labtest®. A GOD catalisa a oxidação da glicose para ácido glicônico e peróxido de hidrogênio. Por meio de uma reação oxidativa de acoplamento catalisada pela peroxidase (POD), o peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, formando um complexo de cor avermelhada (quinoneimina). Absorbância foi medida em 500 nm e é diretamente proporcional à concentração de glicose na amostra.

#### **3.2.4 Atividade Enzimática em Brânquias e Rim**

Para se verificar a atividade das enzimas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e anidrase carbônica, os órgãos foram homogeneizados (10x peso do órgão) com o tampão SEI (sacarose 0,3M; EDTA 0,0001M; imidazol 0,03M) ou com o tampão específico para anidrase carbônica (manitol 0,225M; sacarose 0,075M; tris base 0,01M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01M), respectivamente. Para ambas as enzimas, o homogeneizado foi

centrifugado a 7.500 g, por 15 minutos, a 4C° e o sobrenadante foi utilizado para as análises.

### **Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (NKA)**

O método utilizado para a determinação da atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase foi desenvolvido por Quabius *et al.* (1997), e adaptado para leitora de microplaca por Nolan (2000). Após a homogeneização, as amostras foram incubadas sob a ausência de luz em um tampão contendo ATP 0,003M e KCl 0,013M ou ATP 0,003M e Ouabaína 0,025M, por 30 minutos em microplaca. Durante a incubação ocorre a formação de Pi (fosfato inorgânico) pela enzima ao consumir o ATP durante sua atividade. O KCl estimula a atividade da enzima e a ouabaína a inibe. Após a incubação o ensaio é interrompido com TCA (Ácido Tricloroacético) 8,6% e um reagente de cor (molibdato de amônia 0,092M, FeSO<sub>4</sub> 0,003M e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,006M) confere a coloração proporcional a concentração de Pi formado. Uma solução de fosfato 0,006M foi utilizada como padrão. A leitura foi realizada em leitora de microplaca em 620 nm. A atividade da enzima foi expressa em mMPi.mg.h<sup>-1</sup> por miligrama de proteína (mg.mL<sup>-1</sup>).

### **Anidrase carbônica (AC)**

Para a avaliação da enzima anidrase carbônica foi utilizado o método descrito por Vitale *et al.* (1999). A amostra homogeneizada foi introduzida numa solução de água saturada com CO<sub>2</sub>. Para a produção desta solução, gás CO<sub>2</sub> de cilindro foi borbulhado em água deionizada por 15 minutos. A enzima anidrase carbônica catalisa a reação reversível de CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O, formando H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. O H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em solução se dissocia naturalmente em H<sup>+</sup> + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. O H<sup>+</sup> liberado promove a diminuição do pH da solução, que foi registrado com o auxílio de um medidor de pH a cada 4 segundos ao longo de 20 segundos para cada amostra.

Para a determinação da atividade da enzima, uma reta de regressão foi construída com os valores de pH, sendo o pH a variável dependente e o tempo a variável independente, para cada amostra. A declividade da reta corresponde à taxa catalisada para as amostras e à taxa não catalisada para o branco. Como o branco teve várias leituras, a taxa não catalisada é a média das declividades obtidas.

### 3.3 EXPERIMENTOS DE ESTRESSE AGUDO

Esta parte dos experimentos os animais foram expostos a concentração de  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl por 24 horas antes de serem submetidos ao estresse. Esta concentração foi definida com base nos resultados obtidos nos experimentos de exposição ao NaCl, que demonstraram maior eficácia. A metodologia de exposição (aquários, água e animais) para ambas as etapas foram feitas como descrito anteriormente (item 3.2).

Após a exposição ao NaCl, os animais foram submetidos a um estresse por hipóxia e confinamento, que consistiu em retirar os animais da água com a utilização de uma pequena rede e deixá-los suspensos fora da água nesta mesma rede por 3 minutos (Figura 7), esse tempo foi definido com base no trabalho de Martins *et al.* (2000). Após o estresse os peixes foram divididos em 3 grupos distintos ( $t_1$ ,  $t_3$  e  $t_6$ ) e transferidos para aquários diferentes, contendo apenas água desclorada. Os peixes do grupo  $t_1$  foram amostrados 1 hora após o estresse, do grupo  $t_3$  foram amostrados 3 horas após o estresse e do grupo  $t_6$  foram amostrados 6 horas após o estresse. Um grupo de peixes, denominado de  $t_0$  foi amostrado imediatamente após o estresse. A amostragem consistiu em retirar o sangue para as análises hematológicas e de indicadores de estresse, no caso glicose e cortisol.

**Figura 8** - Foto de um peixe sendo estressado.



### 3.3.1 Análises Hematológicas

As análises hematológicas foram as mesmas feitas nos experimentos de exposição ao NaCl já citadas anteriormente, ou seja, hematócrito, determinação de hemoglobina e contagem do número de hemácias.

### 3.3.2 Análises de indicadores de estresse

Após as análises hematológicas, da mesma forma que os experimentos de exposição ao NaCl, o sangue total foi centrifugado a 2.000 g por 10 minutos. O plasma foi coletado para determinação da concentração plasmática de dois indicadores de estresse: a glicose e o cortisol.

#### **Concentração de glicose**

A concentração de glicose foi determinada da mesma forma que nos experimentos de exposição ao NaCl, ou seja, pelo método da *glicose oxidase* (GOD), utilizando-se kit comercial Labtest®.

#### **Concentração de cortisol**

Para a determinação da concentração do cortisol plasmático foi utilizado um kit de imunoenensaio (Cortisol AccubindMicrowells® MonobindInc), em microplacas do próprio kit. As leituras foram feitas em leitora de microplaca em 450 e 620 nm. Foram usados dois comprimentos de onda para a correção de possíveis imperfeições nos poços da microplaca. O princípio do método segue o processo típico de ligação competitiva. A competição ocorre entre um antígeno não marcado, que encontra-se presente nos padrões e amostras, e um antígeno marcado com enzima por um número limitado de sítios de ligação de anticorpo na microplaca que acompanha o kit. Os materiais não ligados são removidos por um procedimento de lavagem. A quantidade de cortisol marcado ligada ao anticorpo é inversamente proporcional a concentração de cortisol não marcado.

### 3.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foram calculados, para todos os resultados, a média e o erro padrão. Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos e tempos experimentais foram comparados com a utilização do teste estatístico ANOVA e teste t, realizado com a utilização do software Sigma Plot 11.0. Foram considerados significativos os valores de  $P \leq 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

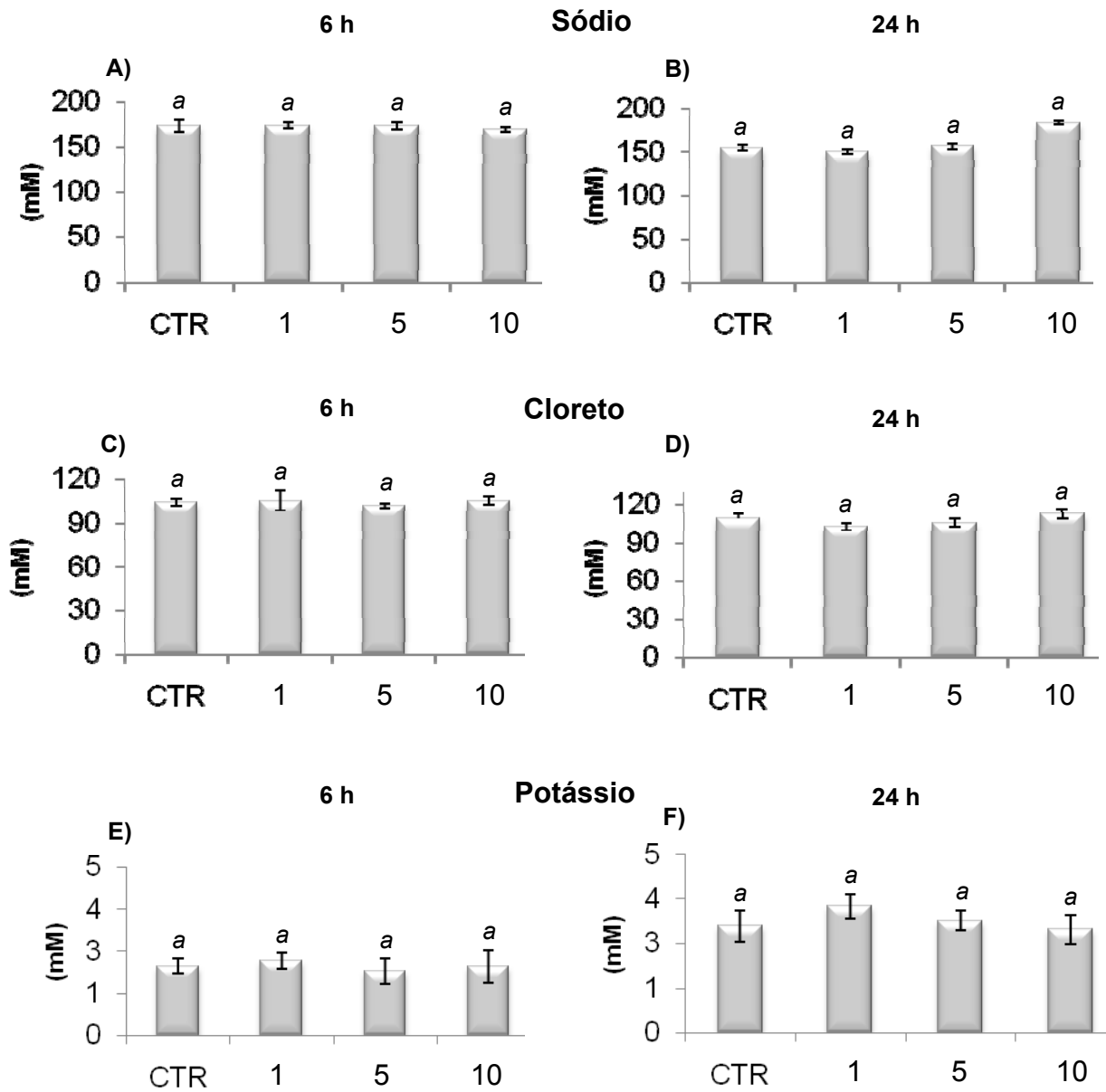
Para melhor visualização dos resultados (média  $\pm$  E.P.), estes foram organizados em dois grupos principais: experimento de exposição ao NaCl e experimento de estresse. Em cada grupo estão listados os respectivos resultados dos parâmetros analisados segundo os tempos experimentais.

### 4.1 EXPERIMENTO DE EXPOSIÇÃO AO NaCl

#### 4.1.1 Análises Plasmáticas

As concentrações plasmáticas dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  não variaram significativamente entre os grupos expostos às diferentes concentrações de NaCl (1, 5 ou 10  $\text{g.L}^{-1}$ ) e o respectivo grupo controle (CTR), exposto somente à água desclorada (CTR), tanto para o tempo 6 quanto 24 horas (Figura 8). Os dois tempos experimentais também foram comparados entre si com teste t e não foram constatadas diferenças significativas. Devido a problemas no equipamento, a osmolaridade nas amostras dos animais submetidos ao tratamento com sal não foram analisadas. Foi possível analisar apenas a osmolaridade dos animais do grupo controle. Na Tabela 1 estão apresentados os valores de osmolaridade e das concentrações de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  dos diferentes meios experimentais utilizados (1, 5 e 10  $\text{g.L}^{-1}$  de NaCl) e da água desclorada, assim como a osmolaridade e a médias das concentrações iônicas do plasma de *Prochilodus lineatus* após as exposições ao NaCl (1, 5 e 10  $\text{g.L}^{-1}$ ) ou apenas à água desclorada, nos tempos 6 e 24h. Vale lembrar aqui que “água desclorada” significa “livre do gás cloro”, ou seja,  $\text{Cl}_2$ , através de aeração ou filtro de cloro.

**Figura 9** - Concentração plasmática dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  de *Prochilodus lineatus* expostos a 1, 5 ou 10  $\text{g.L}^{-1}$  de NaCl ou somente a água desclorada (CTR) nos tempos 6 ou 24 h. As barras indicam as médias e as linhas verticais o E.P (n de 6 a 7). Letras iguais representam ausência de diferença significativa entre os resultados obtidos para um mesmo tempo experimental.



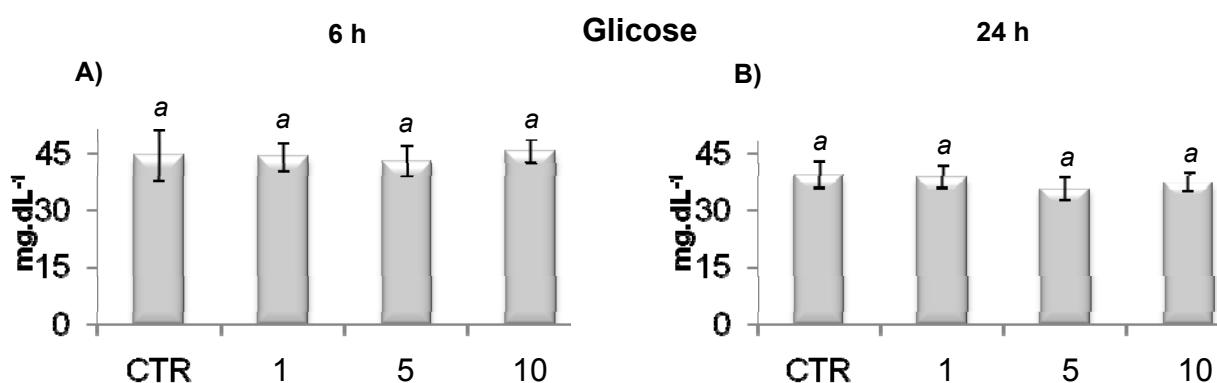
**Tabela 1** - Osmolaridade e concentrações de Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> e K<sup>+</sup> dos diferentes meios experimentais utilizados (1, 5 e 10 g.L<sup>-1</sup>NaCl) e média da osmolaridade e das concentrações iônicas do plasma de *Prochilodus lineatus* após as exposições ao NaCl (1, 5 e 10 g.L<sup>-1</sup>) nos tempos 6 e 24h.

Exposição	Osmolaridade (mOsm)	Na <sup>+</sup> (mM)	Cl <sup>-</sup> (mM)	K <sup>+</sup> (mM)
Água desclorada	2	<1	<1	<1
Água + 1 g.L <sup>-1</sup> NaCl	34	15	16	<1
Água + 5 g.L <sup>-1</sup> NaCl	171	85	87	<1
Água + 10 g.L <sup>-1</sup> NaCl	342	172	169	<1
Plasma do Peixe (CTR)	343,21 ± 4,63	166,2 ± 2,1	106,1 ± 1,1	2,7 ± 0,1

Os resultados dos íons plasmáticos representam média ± EP.

Também não foram encontradas diferenças significativas na concentração de glicose plasmática entre os grupos expostos ao NaCl e o grupo CTR, em ambos os tempos experimentais (Figura 9). A média da concentração de glicose nos grupos do tempo 6h foi 44,3 ± 1,2 mg.dL<sup>-1</sup> e no tempo 24h de 38,0 ± 0,8 mg.dL<sup>-1</sup>.

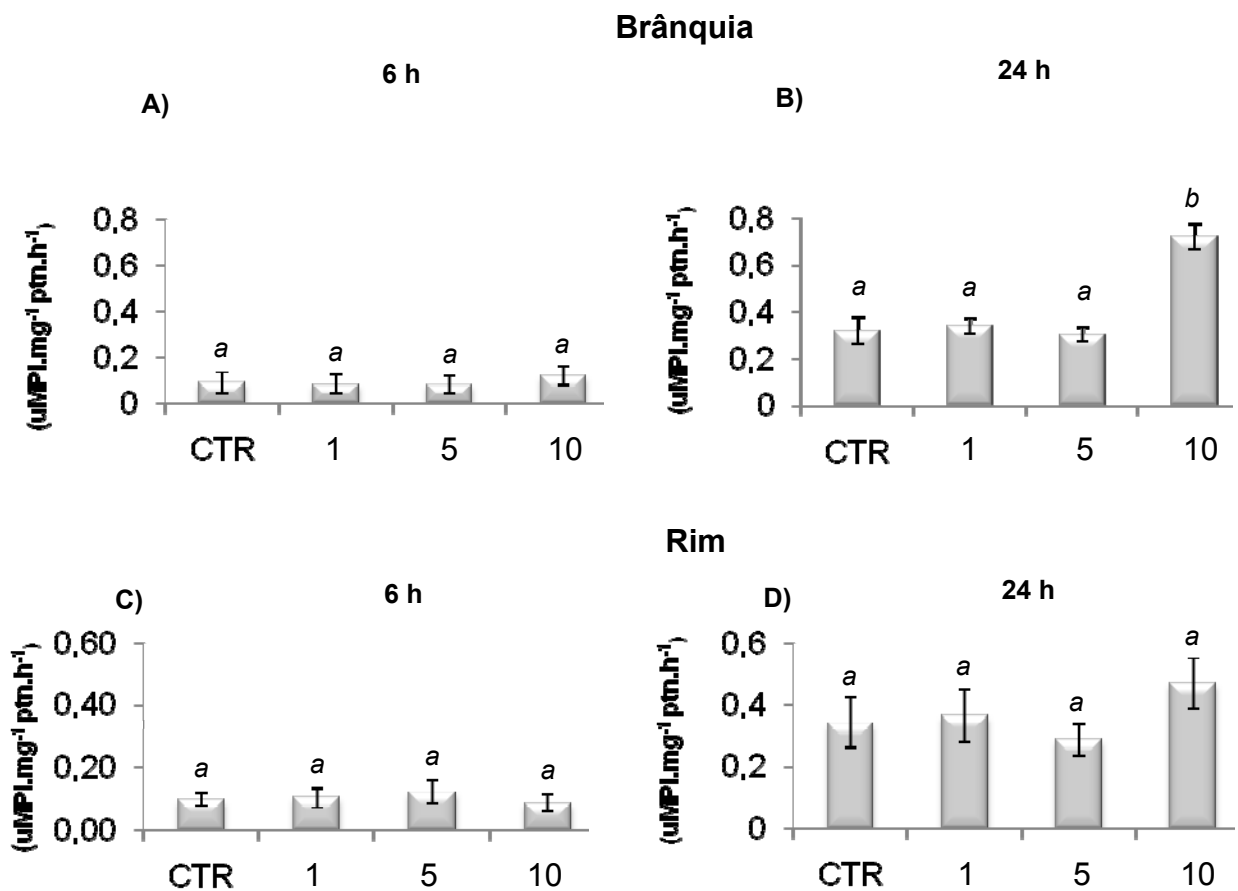
**Figura 10** - Concentração de glicose plasmática em *Prochilodus lineatus* expostos a 1, 5 ou 10 g.L<sup>-1</sup>NaCl ou somente a água desclorada (CTR) nos tempos 6h (A) ou 24h (B). As barras indicam as médias e as linhas verticais o E.P (n de 6 a 7). Letras iguais representam ausência de diferença significativa entre os resultados obtidos para um mesmo tempo experimental (P > 0,05).



#### 4.1.2 Atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase

A enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase da brânquia apresentou um aumento significativo de 50% na sua atividade nos peixes expostos a 10 g.L<sup>-1</sup>NaCl por 24h ( $0,72 \pm 0,05$  uMPI.mg<sup>-1</sup> ptn.h<sup>-1</sup>) em relação aos demais grupos expostos ao NaCl e ao grupo CTR (Figura 10B). Nas demais concentrações testadas e em ambos os tempos experimentais não houve alteração. Na Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase de rim (Figura 10C-D) também não foram constatadas alterações em todas as concentrações testadas e em ambos os tempos experimentais.

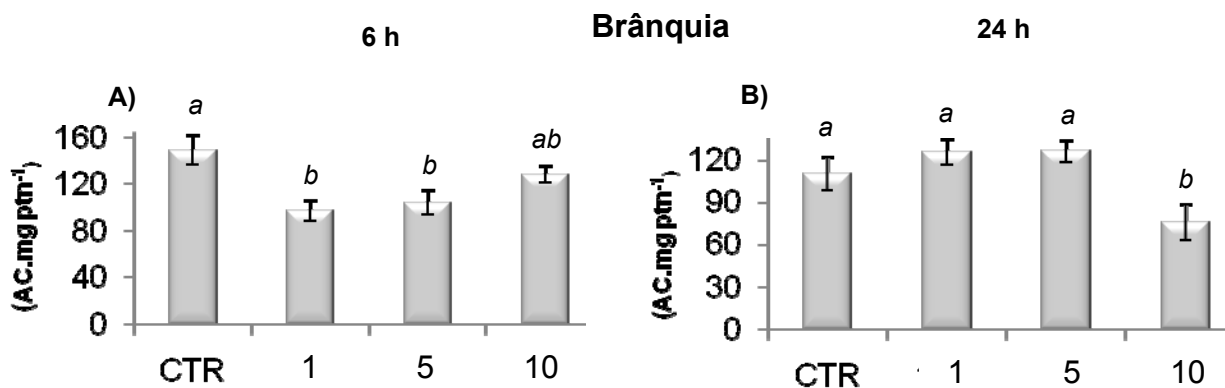
**Figura 11** - Atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase de brânquia e rim em *Prochilodus lineatus* expostos a 1, 5 ou 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl ou somente a água desclorada (CTR) nos tempos 6 ou 24h. As barras indicam as médias e as linhas verticais o E.P (n de 4 a 7). Letras iguais representam ausência de diferença significativa entre os resultados obtidos para um mesmo tempo experimental ( $P > 0,05$ ) e letras diferentes representam grupos significativamente diferentes, em um mesmo tempo de exposição ( $P < 0,05$ ).



#### 4.1.3 Atividade da Anidrase Carbônica

Dentre os grupos experimentais do tempo de 6 horas, os peixes expostos a 1 e 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl apresentaram diminuição significativa na atividade da anidrase carbônica de brânquia (97,3 ± 8,5 e 104,3 ± 24,8 AC.mg ptn<sup>-1</sup>) com relação ao grupo CTR (149,5 ± 12,8 e AC.mg ptn<sup>-1</sup>). Já os animais expostos a 10g.L<sup>-1</sup> de NaCl retomaram a atividade da enzima (128,5 ± 7,1 e AC.mg ptn<sup>-1</sup>) e não foram significativamente diferentes dos grupos CTR, 1 e 5 g.L<sup>-1</sup>NaCl (Figura 11A). Dentre os grupos do tempo de 24 horas, apenas os animais expostos a 10 g.L<sup>-1</sup> de NaCl apresentaram uma redução significativa na atividade da enzima com relação aos demais (Figura 11B).

**Figura 12** - Atividade da enzima Anidrase Carbônica de brânquia em *Prochilodus lineatus* expostos a 1, 5 ou 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl ou somente a água desclorada (CTR) nos tempos 6 ou 24h. As barras indicam as médias e as linhas verticais o E.P (n de 5 a 7). Barras com diferentes letras representam grupos significativamente diferentes (B). Letras iguais representam ausência de diferença significativa entre os resultados obtidos para um mesmo tempo experimental (P > 0,05) e letras diferentes representam grupos significativamente diferentes, em um mesmo tempo de exposição (P < 0,05).



#### 4.1.4 Análises Hematológicas

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados de hematócrito (Htc), número de hemácias (RBC) e conteúdo de hemoglobina (Hb) obtidos para os peixes dos grupos controle e aqueles expostos às diferentes concentrações de NaCl, nos tempos experimentais 6 e 24h. Para todos os parâmetros sanguíneos analisados, entre as três concentrações de NaCl e o grupo controle não foram observadas variações significativas, em nenhum dos tempos experimentais.

**Tabela 2** - Dados hematológicos de *Prochilodus lineatus* expostos a 1, 5 ou 10 g.L<sup>-1</sup>NaCl ou somente a água desclorada (CTR) nos tempos 6 ou 24h. RBC: número de hemácias; Htc: hematócrito;Hb: hemoglobina

	6h			24h		
	RBC (nº cel. 10 <sup>6</sup> )	Htc (%)	Hb (g.dL <sup>-1</sup> )	RBC (nº cel. 10 <sup>6</sup> )	Htc (%)	Hb (g.dL <sup>-1</sup> )
CTR	2,46±0,17	38,80±1,32	9,85±0,82	1,93 ± 0,16	32,86 ± 2,02	8,40 ± 0,26
1g.L <sup>-1</sup>	2,06±0,26	30,40±1,44	8,99±0,56	1,94± 0,16	32,83 ± 1,49	8,80 ± 0,21
5g.L <sup>-1</sup>	2,66±0,28	36,57±1,09	11,07±0,26	1,88± 0,12	31,20 ± 2,03	9,62 ± 0,65
10 g.L <sup>-1</sup>	2,38±0,13	35,00±1,21	11,01±0,57	1,88± 0,15	28,67 ± 1,80	10,06 ± 0,17

Os valores representam média± EP (n de 5 a 7).

Para os índices hematimétricos também não houve diferença significativa em nenhum dos dados obtidos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Índices hematimétricos de *Prochilodus lineatus* expostos a 1, 5 ou 10 g.L<sup>-1</sup>NaCl ou somente a água desclorada (CTR) nos tempos 6 ou 24h. VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM concentração de hemoglobina corpuscular média.

	6h			24h		
	VCM (µm <sup>3</sup> )	HCM (pg.cel <sup>-1</sup> )	CHCM (%)	VCM (µm <sup>3</sup> )	HCM (pg.cel <sup>-1</sup> )	CHCM (%)
CTR	176,24±9,6	35,97±6,65	21,88±6,79	159,784±78	21,44±1,64	13,02±1,05
1g.L <sup>-1</sup>	150,11±15,47	46,22±5,04	29,74±2,82	161,53±15,4711,03	23,66±2,9	13,40±1,14
5g.L <sup>-1</sup>	134,16±13,16	44,81±5,37	30,35±0,65	167,94±7,97	26,34±4,89	16,80±02,41
10 g.L <sup>-1</sup>	150,29±11,60	47,290±3,52	32,17±2,72	153,43±1,80	25,43±1,63	16,91±1,61

Os resultados são média± EP (n de 4 a 7).

## 4.2 EXPERIMENTO DE ESTRESSE

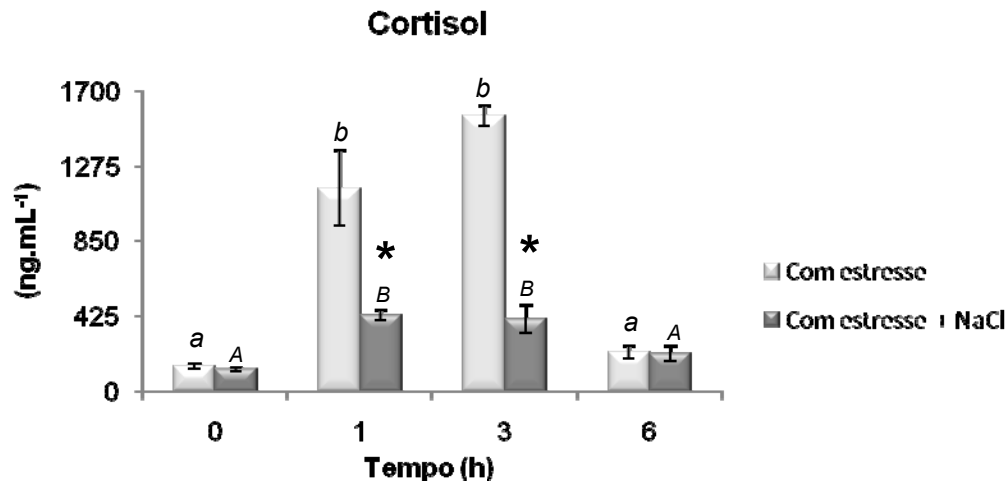
### 4.2.1 Parâmetros de Estresse: Cortisol e Glicemia

Os animais estressados, sem exposição prévia ao NaCl (5 g.L<sup>-1</sup>) apresentaram uma variação nos níveis de cortisol ao longo dos tempos experimentais. Os peixes amostrados nos tempos  $t_1$  e  $t_3$  (1 e 3 horas após o estresse) tiveram o nível de cortisol aumentado ( $t_1$ : 1147,9 ± 212,3 e  $t_3$ : 1556,0 ± 58,8 ng.mL<sup>-1</sup>) com relação aos amostrados imediatamente após o estresse ( $t_0$ : 142,4 ± 16,4 ng.mL<sup>-1</sup>). Os peixes amostrados 6 horas após o estresse ( $t_6$ ) retornaram ao nível basal (222,9 ± 34,9 ng.mL<sup>-1</sup>) e a concentração de cortisol nesses peixes foi significativamente menor que  $t_1$  e  $t_3$ , mas não diferente de  $t_0$  (Figura 12).

Os peixes que passaram pela exposição prévia ao NaCl (5 g.L<sup>-1</sup>) apresentaram um padrão de variação de cortisol semelhante aos que não foram expostos ao sal, porém com uma amplitude menor. Neste grupo, o nível de cortisol plasmático dos peixes amostrados em  $t_0$  (125,9 ± 9,4 ng.mL<sup>-1</sup>) foi significativamente menor que em  $t_1$  (431,2 ± 27,4 ng.mL<sup>-1</sup>) e  $t_3$  (409,7 ± 78,2 ng.mL<sup>-1</sup>), e os animais do tempo  $t_6$  apresentaram redução quando comparados aos  $t_3$  e  $t_6$  (212,8 ± 42,2 ng.mL<sup>-1</sup>) e não mostraram diferença significativa com relação a  $t_0$  (Figura 12).

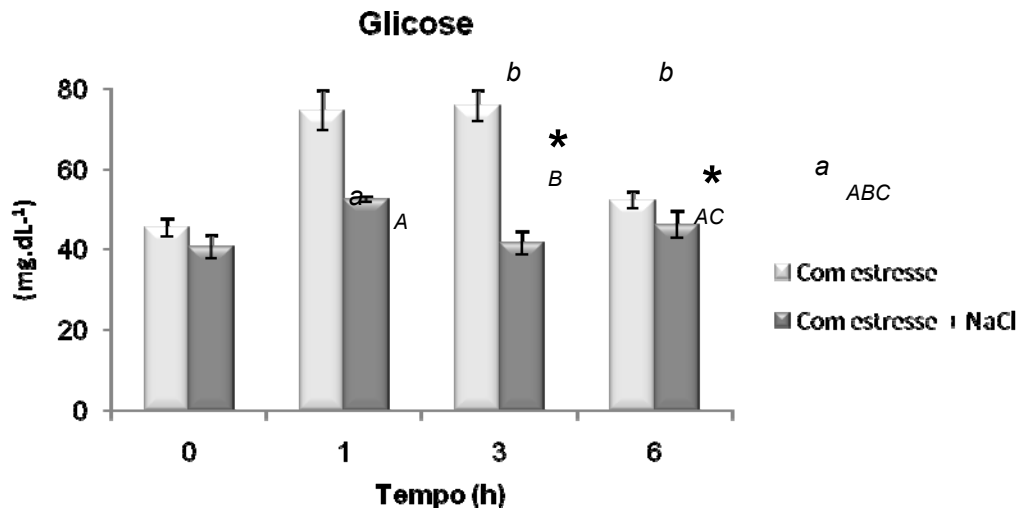
Apesar de ambos os grupos (com e sem exposição prévia ao NaCl) apresentarem o mesmo padrão de variação no nível de cortisol plasmático, quando comparados um ao outro, nos mesmos tempos experimentais, surgiram diferenças expressivas. Os animais amostrados após 1 h e 3 h do estresse ( $t_1$  e  $t_3$ ) apresentaram diferenças significativas entre os dois tipos de exposição, sendo que os peixes que não foram previamente expostos ao NaCl 5 g.L<sup>-1</sup> tiveram níveis de cortisol significativamente maiores que aqueles previamente expostos ao sal (Figura 12).

**Figura 13** - Concentração plasmática de cortisol em *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 e 6 horas do estresse, sem exposição prévia a  $5 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaCl}$  (com estresse) ou com a exposição a prévia (com estresse + NaCl). As barras indicam as médias e as linhas verticais o E.P (n de 4 a 7). \* indica diferença significativa entre os animais expostos previamente ao NaCl e não expostos ( $P \leq 0,05$ ). Barras com diferentes letras representam grupos significativamente diferentes. Letras minúsculas referem-se ao grupo submetido ao estresse, mas sem exposição prévia ao NaCl; letras maiúsculas referem-se ao grupo submetido ao estresse e expostos previamente ao NaCl.



A concentração de glicose plasmática seguiu o mesmo padrão do cortisol. Os peixes submetidos ao estresse, porém sem a exposição prévia ao sal apresentaram aumento significativo da glicemia em  $t_1$  ( $74,5 \pm 4,8 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) e  $t_3$  ( $75,8 \pm 3,9 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) em relação ao  $t_0$  ( $45,4 \pm 2,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) e  $t_6$  ( $46,2 \pm 3,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ ). Nos peixes expostos previamente ao NaCl, os animais amostrados no  $t_1$  ( $52,4 \pm 0,6 \text{ mg.dL}^{-1}$ ) tiveram concentração de glicose significativamente maiores que  $t_0$  ( $40,6 \pm 3,0 \text{ mg.dL}^{-1}$ ). A glicose dos peixes de  $t_3$  apresentou-se menor com relação a  $t_1$  ( $41,5 \pm 2,8 \text{ mg.dL}^{-1}$ ). Nos animais de  $t_6$  a glicose não variou com relação a nenhum grupo ( $46,2 \pm 3,3 \text{ mg.dL}^{-1}$ ). Quando a glicemia dos peixes expostos e não expostos previamente ao sal foram comparadas entre si, nos mesmos tempos experimentais, verificou-se que os animais expostos ao sal apresentaram glicose plasmática significativamente menor que aqueles não expostos previamente ao NaCl, após 1 h ( $t_1$ ) e 3 h ( $t_3$ ) do evento estressor, assim como o ocorrido com o cortisol (Figura 13).

**Figura 14** - Níveis plasmáticos de glicose em *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 e 6 horas do estresse, sem exposição prévia a  $5 \text{ g.L}^{-1} \text{NaCl}$  (com estresse) ou com a exposição a prévia (com estresse + NaCl). As barras indicam as médias e as linhas verticais o E.P (n de 4 a 7). \* indica diferença significativa entre os animais expostos previamente ao NaCl e não expostos ( $P < 0,05$ ). Barras com diferentes letras representam grupos significativamente diferentes. Letras minúsculas referem-se ao grupo submetido ao estresse, mas sem exposição prévia ao NaCl; letras maiúsculas referem-se ao grupo submetido ao estresse e expostos previamente ao NaCl.



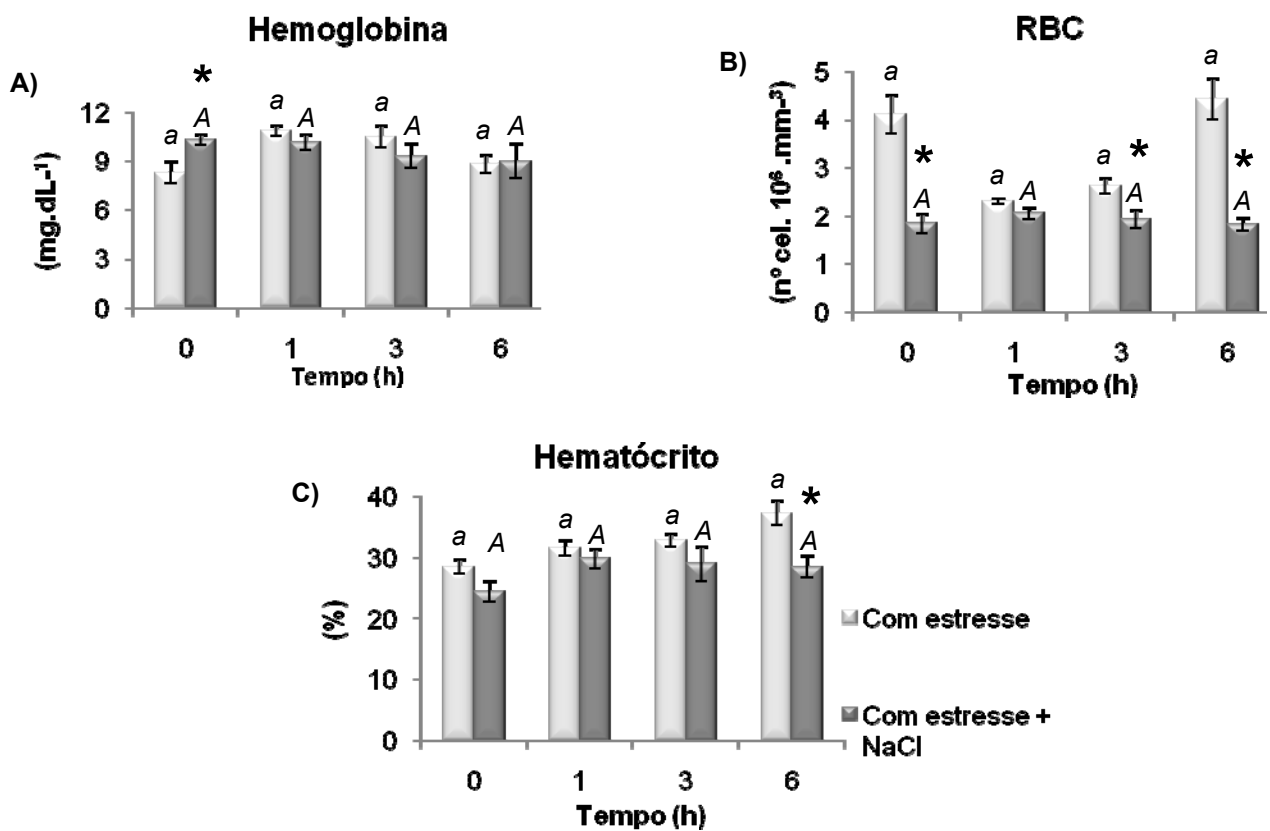
#### 4.2.2 Parâmetros Hematológicos

Em nenhum dos parâmetros hematológicos analisados ocorreram diferenças significativas entre os diferentes tempos experimentais, tanto para os peixes sem exposição prévia ao NaCl quanto para os que foram previamente expostos ao sal. Porém ao se comparar estes dois grupos, nos mesmos tempos experimentais ocorreram diferenças significativas. Imediatamente após o estresse ( $t_0$ ) o conteúdo de hemoglobina foi significativamente maior nos peixes expostos previamente ao NaCl ( $10,3 \pm 0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) em relação aos peixes não expostos ao sal ( $8,3 \pm 0,7 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), (Figura 14A).

Quanto ao número de hemácias (RBC), os animais expostos previamente ao NaCl apresentaram valores de RBC significativamente menores nos tempos  $t_0$ ,  $t_3$  e  $t_6$  ( $1,8 \pm 0,2$ ,  $1,9 \pm 0,2$  e  $1,8 \pm 0,1 \text{ n}^\circ \text{ cel. } 10^6 \text{ .mm}^{-3}$ ) quando comparados com os peixes submetidos ao estresse, mas sem exposição prévia ao sal ( $t_0$ :  $4,1 \pm 0,4$ ,  $t_3$ :  $2,6 \pm 0,2$ ,  $t_6$ :  $4,4 \pm 0,4 \text{ n}^\circ \text{ cel. } 10^6 \text{ .mm}^{-3}$ ), (Figura 14B). Para o hematócrito, os peixes sem expostos ao NaCl tiveram redução significativa ( $28,5 \pm$

1,8 %) no  $t_6$ , em relação aos peixes que não foram expostos ao NaCl ( $37,33 \pm 2,0$  %), (Figura 14C).

**Figura 15** - Parâmetros hematológicos de *Prochilodus lineatus* a mostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 e 6 horas do estresse, sem exposição prévia a  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl (com estresse) ou com a exposição prévia ao sal (com estresse + NaCl). As barras indicam as médias e as linhas verticais o E.P (n de 4 a 7). \* indica diferença significativa entre os animais expostos previamente ao NaCl e aqueles não expostos ( $P < 0,05$ ). RBC: número de hemácias. Letras minúsculas referem-se ao grupo submetido ao estresse, mas sem exposição prévia ao NaCl; letras maiúsculas referem-se ao grupo submetido ao estresse e expostos previamente ao NaCl.



Os índices hematimétricos calculados para os peixes estressados sem exposição prévia ao NaCl apresentaram variações ao longo dos tempos experimentais (Tabela 4). O volume corpuscular médio (VCM) aumentou progressivamente do  $t_0$  ao  $t_3$  e em  $t_6$  retomou ao volume basal, não tendo variado com relação a  $t_0$ . A hemoglobina corpuscular média (HCM) apresentou um padrão semelhante ao do VCM, porém sua redução se iniciou em  $t_3$ . Em  $t_6$  o HCM já estava significativamente menor que  $t_1$  e  $t_3$ , e sem diferença significativa de  $t_0$ . A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) também teve um aumento

significativo em  $t_1$  e não apresentou diferença de  $t_3$ . Em  $t_6$  reduziu significativamente com relação a  $t_1$  e  $t_3$ , e não foi significativamente diferente de  $t_0$ .

Para os peixes previamente expostos ao NaCl, não houve variação significativa ao longo dos tempos experimentais para todos os índices hematimétricos. Porém quando comparados os animais não expostos ao NaCl com os previamente expostos, entre os mesmos tempos experimentais, cada índice apresenta diferenças. O VCM nos animais expostos foi significativamente maior nos tempos  $t_0$ ,  $t_1$  e  $t_6$ . O HCM e o CHCM dos não expostos foram significativamente maiores em  $t_0$  e  $t_6$  (Tabela 4).

**Tabela 4** - Índices hematimétricos de *Prochilodus lineatus* amostrados imediatamente ( $t_0$ ) ou após 1, 3 e 6 horas do estresse, sem exposição prévia a 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl (com estresse) ou com a exposição prévia ao sal (com estresse + NaCl). \* indica diferença significativa entre os animais expostos previamente ao NaCl e aqueles não expostos ( $P < 0,05$ ). Letras minúsculas referem-se ao grupo submetido ao estresse, mas sem exposição prévia ao NaCl; letras maiúsculas referem-se ao grupo submetido ao estresse e expostos previamente ao NaCl. VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM concentração de hemoglobina corpuscular média

	com estresse				com estresse + NaCl			
	$t_0$	$t_1$	$t_3$	$t_6$	$t_1$	$t_3$	$t_6$	$t_6$
VCM ( $\mu\text{m}^3$ )	74,7±8, <b>7a</b>	138,5±3, <b>6b</b>	128,7±9, <b>0bc</b>	95,5±5, <b>7a</b>	142,0±1, <b>9,1A*</b>	160,7± <b>4,8*</b>	161,8± <b>28,A</b>	160,4±2 <b>3,1A*</b>
HCM ( $\text{pg.cel}^{-1}$ )	20,26± <b>2,8a</b>	46,8±0,4 <b>b</b>	37,3±2,9 <b>c</b>	22,0±0, <b>7a</b>	59,7±7,1 <b>A*</b>	44,1±3, <b>3A</b>	51,6±7, <b>9A</b>	53,1±6,5 <b>A*</b>
CHCM (%)	27,4±2, <b>7a</b>	34,56±1, <b>24b</b>	30,7±1,1 <b>ab</b>	23,8±1, <b>4ac</b>	43,0±2,9 <b>A*</b>	35,5±2, <b>1A</b>	32,9±5, <b>3A</b>	31,5±3,2 <b>A*</b>

Os resultados são média ± EP (n de 4 a 7).

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados das análises dos íons plasmáticos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{K}^+$  não revelaram diferenças significativas entre as diferentes exposições ao NaCl nos dois tempos experimentais, indicando que o *Prochilodus lineatus* pode tolerar altas variações na osmolaridade do meio sem perder a eficiência na osmorregulação. Como mostraram os dados da Tabela 1, quando exposto a  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl, este peixe encontra-se praticamente isosmótico com relação ao meio.

Em experimentos de exposição ao NaCl por 1 hora feitos com *Rhamdia quelen* (jundiá), Souza-Bastos e Freire (2009) observaram que a concentração de sódio plasmático foi mantida em 140 mM quando os peixes foram expostos a 5 ou  $15 \text{ g.L}^{-1}$  ou somente a água. A concentração de sódio no plasma só aumentou significativamente após exposição a  $25 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl (180 mM). Um padrão semelhante ocorreu para o cloreto plasmático, cuja concentração plasmática encontrada foi de 115 mM, tanto nos animais expostos somente a água como nos expostos a  $5 \text{ g.L}^{-1}$  NaCl. Para os jundiás o cloreto aumentou significativamente para 133 mM em  $15 \text{ g.L}^{-1}$  e 194 mM em  $25 \text{ g.L}^{-1}$ . O potássio manteve-se estável nos peixes expostos somente a água, 5 ou  $15 \text{ g.L}^{-1}$ , mas nos peixes expostos a  $25 \text{ g.L}^{-1}$  aumentou para 7,9 mM. Ao comparar estes resultados com os obtidos com *P. lineatus* parece que são necessárias concentrações acima de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  NaCl para que ocorra aumento na concentração iônica plasmática, e em *P. lineatus* a concentração máxima de NaCl utilizada nos experimentos ( $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) não foi suficiente para detectar essas alterações.

Em matrinxã (*Brycon cephalus*), com o qual foi realizado experimento de exposição a concentrações menores de NaCl (1, 3 e  $6 \text{ g.L}^{-1}$ ), porém com a adição de estresse por transporte (CARNEIRO; URBINATI, 2001), os peixes expostos ao NaCl durante o transporte não apresentaram variações na concentração plasmática os íons sódio e cloreto, mesmo aqueles expostos ao NaCl por 96 horas. Isso mostra que o matrinxã também mantém suas concentrações iônicas estáveis mediante alteração da osmolaridade do meio, corroborando com os dados encontrados em *P. lineatus* no presente trabalho.

Este comportamento de manter a concentração iônica plasmática estável, observado em peixes de água doce expostos a diferentes concentrações de NaCl, é facilmente concebível, uma vez que está havendo redução de gradiente

osmótico, e não um aumento. As concentrações usadas no presente trabalho, assim como as menores concentrações usadas por Souza-Bastos e Freire (2009) não ultrapassam a osmolaridade plasmática dos peixes de água doce, que é mantida em torno de 300 mOsm.L<sup>-1</sup>. Nas exposições em que não houve alteração nas concentrações iônicas, o plasma do peixe estava próximo de ser isosmótico ao meio experimental, situação na qual não se espera verificar grandes alterações nas concentrações iônicas, pois não há um grande gradiente osmótico exercendo forças para os ganhos ou perdas difusivas. Porém, em situações em que a osmolaridade do meio experimental ultrapassa os 300 mOsm.L<sup>-1</sup> o peixe passa a ser hiposmótico com relação ao meio, deparando-se com um gradiente que irá estimular a perda de água e ganho de íons do meio.

A glicemia normal observada em *P. lineatus* nos experimentos de exposição ao NaCl também foi observada em exemplares de *R. quelen* expostos até a 15 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, por 1 hora (SOUZA-BASTOS; FREIRE, 2009), entretanto no grupo exposto a 25 mg.dL<sup>-1</sup> a glicemia aumentou significativamente. Segundo os autores, este aumento de glicemia em *R. quelen*, na maior concentração testada, deve estar associada ao aumento do metabolismo, que promoveria a produção de glicose a partir da degradação do glicogênio hepático. Esse aumento na glicemia não foi observado em *P. lineatus* possivelmente devido à concentração experimental máxima usada (10 g.L<sup>-1</sup> NaCl) não ter sido suficiente para causar o aumento do metabolismo, uma vez que isso ocorreu no *R. quelen* somente em 25 g.L<sup>-1</sup> NaCl.

Em *P. lineatus* foi observada aumento na atividade da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase após em 24h de exposição à maior concentração de exposição de NaCl testada (10 g.L<sup>-1</sup>). Em *R. quelen* já foi verificado que a exposição ao NaCl aumenta a produção de muco nas brânquias (MARCHIORO; BALDISSEROTTO, 1999) e segundo Wurts, (1995), o muco impermeabiliza a brânquia para entrada de íons. Em *P. Lineatus* exposto à 10 g.L<sup>-1</sup> NaCl, a produção de muco foi visivelmente aumentada (isso foi observado no momento da extração e limpeza das brânquias na amostragem), tornando o epitélio branquial impermeável aos íons. Isso justificaria o aumento da atividade desta enzima somente em 24h, pois 6h pode não ter sido suficiente para formar quantidade de muco capaz de interferir na tomada de íons através do epitélio branquial. Esta situação também justificaria a manutenção da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inalterada no rim, para todas as exposições e tempos experimentais.

A diminuição da atividade da enzima anidrase carbônica, observada nos animais expostos a 1 ou 5 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, durante 6h, deve-se possivelmente à redução do gradiente osmótico. Como já mencionado anteriormente, a enzima anidrase carbônica das brânquias está envolvida com a osmorregulação, com a excreção de CO<sub>2</sub> e com a regulação ácido-base, através da reação reversível de hidratação do CO<sub>2</sub>, o que resulta em íons de hidrogênio (H<sup>+</sup>) e bicarbonato (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), (RANDALL; BRAUNER, 1998; HENRY; SWENSON, 2000; HENRY et al., 2003; SENDER et al., 1999). Nos peixes de água doce, essa enzima possui grande relevância para a osmorregulação, pois fornece para as células branquiais os íons HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>eH<sup>+</sup>, que são trocados respectivamente por Cl<sup>-</sup>ou Na<sup>+</sup>, ou transportados ativamente para fora da célula através da HATPase (H<sup>+</sup>), permitindo assim a absorção de íons (BALDISSEROTTO, 2002; EVANS, 2008). Desse modo, mediante uma diminuição no gradiente osmótico, espera-se uma menor atividade da enzima, explicando assim a redução da AC após 6 h de exposição ao NaCl.

Os resultados obtidos após exposição por 24 horas de *P. lineatus* a maior concentração de NaCl (10 g.L<sup>-1</sup>) revelaram uma diminuição na atividade da anidrase carbônica. Neste caso, após esse período de 24 horas, a possível formação de muco pode ter impermeabilizado a brânquia e prejudicado as trocas gasosas. A diminuição da entrada de O<sub>2</sub> no organismo acarreta a redução na produção de CO<sub>2</sub>, o que levaria a diminuição da atividade da anidrase carbônica, pois um de seus substratos está em escassez. Porém, os resultados da contagem do número de hemácias (RBC) e conteúdo de hemoglobina plasmática não indicam uma possível hipóxia tecidual nos peixes expostos a em 10 g.L<sup>-1</sup>, pois não houve aumento significativo com relação a nenhum grupo. Entretanto, em condições de estresse por hipóxia pode haver uma resposta compensatória na afinidade da hemoglobina pelo O<sub>2</sub> (NIKINMAA, 1983). Tetens e Teten (1981) verificaram o aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio em truta arco-íris aclimatada a baixas tensões de O<sub>2</sub>. O mesmo foi verificado por Weber e Lykkeboe (1978), em carpa aclimatada à hipóxia. Uma possível hipóxia gerada pelo excesso de muco talvez esteja ocorrendo em *P. lineatus*, que apesar de não ter sido refletida nos dados hematológicos, pode ter sido compensada no aumento da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio.

Ao se comparar os resultados da enzima Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase com aqueles obtidos para a anidrase carbônica em *P. lineatus*, observa-se que a

anidrase carbônica foi mais sensível que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas condições testadas, pois apresentou variação na sua atividade desde uma exposição à mais baixa concentração de NaCl ( $1 \text{ g.L}^{-1}$ ) e em somente 6 horas, enquanto que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase só apresentou variação 24 horas após a exposição à  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl. Os estímulos para a elevação da atividade destas enzimas podem ser diferentes.

Como descrito nos resultados, não houve alteração em nenhum parâmetro hematológico de *P. lineatus*, em nenhuma das exposições, nos dois tempos experimentais testados. O mesmo ocorreu em *R. quelen* (CAMARGO; POUHEY; VAZ, 2006) expostos a 0, 2, 4, 6 ou  $8 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl, durante 15 e 30 dias. Mesmo o fato de *R. quelen* ter sido exposto ao NaCl por muito mais tempo que o *P. lineatus* no presente trabalho, os dados hematológicos de ambas as espécies foram muito próximos. O conteúdo de hemoglobina de *P. lineatus* ficou entre os valores médios de 8,99 e  $11,07 \text{ g.dL}^{-1}$ , enquanto o de *R. quelen* variou entre 9,1 e  $11,3 \text{ g.dL}^{-1}$ . O número médio de hemácias de *P. lineatus* ficou entre 1,88 e  $2,46 \times 10^6 \text{ cel.}$  e em *R. quelen* essa variação ficou entre 2,2 e  $2,70 \times 10^6 \text{ cel.}$ . O valor médio de hematócrito em *P. lineatus* ficou entre 28,67 e 38,80 e em *R. quelen* entre 31,0 e 37,7. Estas comparações sugerem que mesmo em duas espécies de peixes dulcícolas, de tamanho e peso diferentes, já que os exemplares de *R. quelen* tinham comprimento médio de 20,4 cm e peso médio de 137,3 g, a exposição ao NaCl, por um longo período de tempo, não interfere na hematologia do animal. Isso pode se repetir em outras espécies de peixes dulcícolas, porém mais trabalhos sobre os efeitos do sal em parâmetros hematológicos de outras espécies neotropicais são necessários para se avaliar essa resposta.

Nos experimentos de estresse, o cortisol e a glicose seguiram o mesmo padrão e o estresse promoveu uma resposta em ambos os indicadores de estresse que foi atenuada com a exposição prévia de  $5 \text{ g.L}^{-1}$ . Tanto para o cortisol, como para a glicemia, os animais sem a prévia exposição ao sal e que foram imediatamente amostrados após o estresse, apresentaram níveis de cortisol e glicemia significativamente menores que os amostrados 1 e 3 horas depois do estresse, voltando aos níveis iniciais ao final das 6 h de exposição. Essa baixa concentração plasmática inicial deve-se ao fato de ainda não ter dado tempo do cortisol e da glicose serem liberados na corrente sanguínea. Os animais amostrados 6 horas após o estresse, já haviam entrado em equilíbrio com a concentração salina e os efeitos do estresse nas concentrações de cortisol e glicose já haviam

desaparecido. Nos animais expostos previamente ao NaCl, apesar de também apresentarem variação significativa entre os tempos experimentais que seguiram o mesmo padrão dos peixes não expostos, os níveis plasmáticos de cortisol e glicose foram menores, com relação aos animais não expostos. Isso mostra que a presença do NaCl atenua o efeito do agente estressor.

Em um estudo realizado com *Colossoma macropomum* (GOMES et al., 2006b), o popular tambaqui, os peixes foram submetidos a alta densidade durante um transporte de 10 horas de duração, sem qualquer tratamento com NaCl. Os peixes amostrados imediatamente após o transporte demonstraram níveis altos de glicose e cortisol plasmáticos, com relação aos peixes não transportados. Os que foram amostrados 24 ou 96 horas após o transporte não mostraram diferenças significativas com relação aos não transportados, possivelmente devido à readaptação e desaparecimento do efeito estressor 24 horas depois do estresse. Em outro experimento com *Colossoma macropomum*, realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores (GOMES et al., 2003), os peixes foram expostos a diferentes concentrações de NaCl (0, 2, 5 ou 8 g.L<sup>-1</sup>) e transportados em alta densidade por 3 horas. Todos os animais amostrados 96 horas após o transporte não apresentaram diferenças significativas com relação ao controle. Estes resultados coincidem com o padrão ocorrido em *P. lineatus*, pois mesmo para os peixes não previamente tratados com NaCl o cortisol tende a retornar para os níveis basais naturalmente no decorrer do tempo, porém quando expostos a determinadas concentrações de NaCl essa elevação nem chega a ocorrer.

Em *Brycon cephalus* (CARNEIRO; URBINATI, 2001), o cortisol apresentou o mesmo comportamento observado nas outras espécies de peixes. Neste estudo, os peixes foram expostos a 0, 1, 3 ou 6 g.L<sup>-1</sup> de NaCl e transportados em tanques por 4 horas. Para os níveis plasmáticos de cortisol, somente os peixes expostos a 0 ou 1 g.L<sup>-1</sup> NaCl, e amostrados imediatamente após o transporte, foram significativamente maiores que os não transportados. Para a glicemia, os peixes amostrados imediatamente e 24 horas após o transporte, e expostos a 0, 1 ou 3 g.L<sup>-1</sup> de NaCl, ainda mantiveram alto o nível de glicose com relação aos não transportados. Todos os peixes amostrados 96 horas depois e todos aqueles expostos a 6 g.L<sup>-1</sup> de NaCl não apresentaram diferenças significativas com relação aos não transportados. Estes dados também reforçam que ao decorrer do tempo o cortisol tende a voltar para seus níveis basais, e que o NaCl atenua o efeito do

agente estressor, assim como observado em *P. lineatus*.

Também em alguns parâmetros hematológicos de *P. lineatus* o efeito estressor foi claramente atenuado com a exposição ao NaCl. A elevação do número de hemácias dos peixes não expostos previamente ao NaCl, comparados com os expostos, é um comportamento típico de resposta adrenérgica. A ativação adrenérgica resulta em respostas secundárias de estresse principalmente sobre a osmorregulação, circulação e respiração e metabolismo dos peixes (MAZEAUD; MAZEAUD, 1981). A elevação dos níveis de catecolaminas circulantes favorece o aumento da tomada de oxigênio nas brânquias, pois tem como efeito o aumento da ventilação branquial, aumento do fluxo sanguíneo nas lamelas secundárias, aumento na capacidade de difusão do oxigênio do meio aquático para o sangue e aumento na capacidade de transporte do oxigênio pelo sangue, como aumento do número de hemácias e aumento do conteúdo de hemoglobina (RANDALL; PERRY, 1992). Essa resposta adrenérgica pode ser desencadeada por uma situação de hipóxia, em que o peixe precisará de todos os recursos fisiológicos que garantem a tomada de oxigênio. Nos peixes previamente expostos ao NaCl não houve nenhuma mudança significativa nos parâmetros hematológicos, com relação aos não expostos, podendo isso indicar que o NaCl também poderia estar atenuando a resposta de estresse adrenérgica.

Nos peixes estressados, sem exposição prévia ao NaCl, deve ter ocorrido contração esplênica para a liberação de hemácias na corrente sanguínea. Isso justificaria os resultados obtidos com o volume corpuscular médio, que apresentou-se diminuído nos peixes que não foram expostos ao NaCl. Como novas células sanguíneas foram recrutadas do baço, estas possivelmente ainda estão imaturas, com pequeno volume, e conferindo assim a diminuição do VCM nos peixes sem exposição prévia ao NaCl. Como o NaCl atenuou o efeito estressor nos peixes, seu RBC apresentou-se normal (mais baixo que nos animais não expostos ao NaCl) e seu VCM mais alto.

Os dados do hematócrito também complementam a relação do RBC com o VCM, pois nos animais não expostos ao NaCl, e amostrados 6 horas depois do estresse, o hematócrito está significativamente maior que nos peixes previamente expostos. Isso ocorreu porque, apesar de estarem com um menor volume celular, as hemácias estão em maior número, o que conferiu maior porcentagem de células vermelhas visualizadas no capilar para hematócrito.

Observa-se também que os valores de HCM e CHCM, nos animais estressados sem exposição prévia ao NaCl, mantém o mesmo padrão do VCM, sendo baixos imediatamente após o estresse e passando a aumentar ao longo dos tempos experimentais. Val, Menezes e Wood (1998), também observaram diminuição no CHCM de hemácias de tambaqui (*Colossoma macropomom*) e de jaraqui (*Semaprochilodus insignis*) encubadas com adrenalina. Isso, somado ao fato desses índices hematimétricos em *P. lineatus* não serem alterado com relação aos peixes expostos ao NaCl, reforça a idéia de que a diminuição de tais índices são devido a resposta adrenérgica e que o NaCl pode estar atenuando esta via.

Esses resultados como um todo comprovam que o NaCl pode atenuar o efeito estressor do manejo. Porém para cada espécie é necessário uma concentração adequada. Não há informações na literatura sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos nessa atuação do NaCl como atenuante do efeito estressor. O que se sabe de fato é que realizando um ajuste de gradiente entre o peixe e o ambiente haverá a diminuição da pressão osmótica e do esforço osmorregulatório. Wurts (1995), afirma que a perda excessiva de sais pode causar espasmos musculares e falhas no batimento cardíaco dos peixes. Mas a adição de NaCl na água pode minimizar as perdas de íons do sangue, durante um estresse de transporte, devido à diminuição do gradiente osmótico entre plasma e o ambiente, reduzindo o custo energético dos processos osmorregulatórios. Ao que parece, a atuação do NaCl está diretamente associada com a manutenção osmo-iônica, que a partir da monitoração pelos baroceptrores e osmoceptores, desencadeará respostas que levarão a ajustes fisiológicos. Não há evidências e nem hipóteses na literatura de que o NaCl atua diretamente em alguma via endócrina nos peixes.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados mostram que *P. lineatus* é uma espécie que, se tratando da manutenção osmo-iônica, possui grande tolerância a variações de salinidade. Banhos de 6 horas, com qualquer uma das concentrações de NaCl testadas, podem ser utilizados sem causar prejuízos significativos ao seu processo de osmorregulação. Porém, quando exposto a  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl, durante 24h, ocorre interferência na atividade das enzimas relacionadas a osmorregulação ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica), podendo perturbar a homeostase do animal a longo prazo. Destas enzimas, a anidrase carbônica é mais sensível a variação de sal do que a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

A atuação do NaCl como atenuante do efeito estressor no *P. lineatus* foi claramente demonstrada nos resultados do experimento de estresse agudo, e possivelmente atenua tanto respostas do eixo HPI quanto do eixo HSC. Em *P. lineatus*,  $5 \text{ g.L}^{-1}$  de NaCl garante essa atenuação e aparentemente não prejudica os processos de osmorregulação.

Ao confrontar os dados obtidos em todo este trabalho com os dados publicados na literatura, pode-se inferir que os peixes de água doce, pelo menos os mais utilizados em atividades de aqüicultura, são osmoticamente tolerantes a variação de salinidade, porque para todas as espécies comparadas com *P. lineatus*, cujos experimentos realizados foram semelhantes ao deste trabalho, apresentaram resultados parecidos, mantendo ao menos o mesmo padrão encontrado no *P. lineatus*.

## REFERÊNCIAS

- BALDISSEROTTO, B. Osmorregulação. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002. p. 73-106.
- BARRINUEVO, W. R., FERNANDES, M. N. Critical thermal maxima and minima for curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner) of two different sizes. **Aquaculture Research**, v. 26, p. 447–450, 1995.
- BARRY, T.; OCHIAI, M.; MALISON, J. In vitro effects of ACTH on interregional corticosteroidogenesis during early larval development in rainbow trout. **General and Comparative Endocrinology**, v. 99, p. 328-387, 1995.
- BARTON, B. A. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integrative and Comparative Biology**, North Carolina, v. 42, p. 517-525, 2002.
- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Annual Review of Fish Diseases**, New York, v. 42, p. 517-525, 1991.
- BEADLE, L. C. Osmotic regulation and the faunas of inland waters. **Biological Reviews**, v. 18, p. 172-183, 1943.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRANDÃO, D. A. Profilaxia e doenças. In: BALDISSEROTTO, B., RADÜNZ, J. N. **Criação de Jundiá**, Santa Maria: Ed. UFSM, 2004. p.161–189.
- BRANDÃO, F. R.; GOMES, L. C.; CHAGAS, E. C. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*) durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 349-356, 2006.
- CAMARGO, S. G. O; POUHEY, J. L. O. F.; VAZ, B. S. Efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos do jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824). **Revista Brasileira de Agrociências**, v. 12, p. 453-460, 2006.
- CARMICHAEL, G. J.; TOMASSO, J. R.; SIMCO, B. A.; DAVIS, K. B. Confinement and Water Quality-Induced Stress in Largemouth Bass. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 113, p. 767-777, 1984.
- CARNEIRO, P. C. F. **Estresse provocado pelo transporte e respostas fisiológicas do matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei: Characidae)**. 2001. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- CARNEIRO, P. C. F.; URBINATI, E. C. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. **Aquaculture Research**, v. 32, p. 298-307, 2001.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). In: REIS, S. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**, Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 65-70.

CECH, J. J. R.; BARTHOLOW, S. S.; YOUNG, P. S.; HOPKINS, T. E. Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological responses to recovery environment. **Transactions of the American Fish Society**, v. 125, p. 308-320, 1996.

CONLEY, D. M., MALLATT, J. Histochemical localization of Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase and carbonic anhydrase activity in gills of 17 fish species. **Canadian Journal of Zoology**, v. 66, p. 2398-2405, 1988.

COSTA, A. B. Ictiopatologia e manejo sanitário em piscicultura intensiva. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE PEIXES, 2, 1998, Piracicaba. **Anais...**Piracicaba, 1998. p.73-96.

DICKERSON, H; CLARK, T. *Ichthyophthirius multifiliis*: a model of cutaneous infection and immunity in fishes. **Immunological Reviews**, v.166, p. 377-384, 1998.

EIRAS-STOFELLA, D. R.; CHARVET-ALMEIDA, P. Ultrastructure (SEM) of the gills of *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Teleostei). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 15, p. 279-287, 1998.

ERGANS, R. Direct Control Measures for Some Ectoparasites of Fish. **The Progressive Fish-Culturist**, v.24, p133-134, 1962.

EVANS, D.H. A brief history of the study of fish osmoregulation: the central role of the Mt. Desert Island Biological Laboratory. **Frontiers in Physiology - Aquatic Physiology**, v. 1, artigo 13, 2010.

EVANS, D. H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 295, p 704-713, 2008.

FUGI, R.; HAHN, N. S.; AGOSTINHO, A. A. Feeding of five species of bottom feeding fish of the Paraná River (PR, MS, Brasil). **Environmental Biology of Fishes**, v. 46, p. 297-307, 1996.

GALDIOLI, E. M.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, V. R. B.; FARIA, A. C. E. A. Substituição da proteína do farelo de soja pela proteína do farelo de canola em rações para alevinos de curimatá (*Prochilodus lineatus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 552-559, 2002.

GARCIA, L. O.; BECKER, A. G.; BECKER, C. E.; BALDISSEROTTO, B. Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, Fingerlings. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 38, p. 1-11, 2007.

GOMES, L. C. Physiological responses of pirarucu (*Arapaima gigas*) to acute handling stress. **Acta Amazonica**, v. 37, p. 629-634, 2007.

- GOMES, L. C.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; ROUBACH, R. Transportation of juvenile tambaqui (*Colossoma macropomum*) in a closed system. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 493-502, 2006b.
- GOMES, L. C.; ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; ROUBACH, R.; URBINATI, E. C. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, p. 283-290, 2003.
- GOMES, L. C.; BALDISSEROTTO, B.; CHAGAS, E. C.; ROUBACH, R.; BRINN, R. P.; COPPATI, C. E. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. **Aquaculture**, v. 256, p. 521-528, 2006a.
- GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; CHIPPARI-GOMES, A. R.; BALDISSEROTTO, B. Effect of salt in the water for transport on survival and on Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> body levels of silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, v.9, p.1-9, 1999.
- HATTINGH, J. Blood sugar as an indicator of stress in the freshwater fish, *Labeo capensis* (Smith). **Journal of Fish Biology**, v.10, p.191-195, 1977.
- HENRY, R.P., GEHRICH, S., WEIHRAUCH, D., TOWLE, D. W. Salinity-mediated carbonicanhydrase induction in the gills of the euryhaline crab, *Carcinus maenas*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 136A, p .243–258, 2003.
- HENRY, R. P., SWENSON, E.R. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. **Respiration Physiology**, v. 121, p. 1–12, 2000.
- HIROI, J. T.; KANEKO, K.; UCHIDA, S.; HASEGAWA, S; TANAKA, M. Immunolocalization of vacuolar - Type H1-ATPase in the yolk - sac membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) larvae. **Zoological Science**, v. 15, p. 447–453, 1998.
- HUANG, C. H.; PENG, J. Evolutionary conservation and diversification of Rh family genes and proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 15512–15517, 2005.
- HWANG, P. P. Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*). **Journal of Experimental Biology**, v. 212, p. 1745–1752. 2009.
- IP, Y. K.; CHEW, S. F. Ammonia production, excretion, toxicity, and defense in fish: a review. **Frontiers in Physiology - Aquatic Physiology**, v. 1, artigo 134, out. 2010.
- ITUASSÚ, D. R.; CAVERO, B. A. S.; FONSECA, F. A. L.; BORDINHON, A. M. Cultivo de curimatã (*Prochilodus spp*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, Santa Maria: UFSM, 2005. p.67-80.
- IWAMA, G. W.; PICKERING, A. D. SUMPTER, J. D.; SCHRECK, C. B. **Fish stress and health in aquaculture**, Cambridge: University Press. 1997, p.119-144.

LIMA, L. C.; RIBEIRO, L. P.; LEITE, R. C.; MELO, D. C. Estresse em peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 113-117, 2006.

MARCHIORO, M. I.; BALDISSEROTTO, B. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. **Ciência Rural**, v. 29, p. 315-318, 1999.

MARTINS, M. L.; MORAES, F. R.; MORAES, J. R. E.; MALHEIROS, E. B. Falha na resposta do cortisol ao estresse por captura e por carragenina em *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887 (Osteichthyes: Characidae). **Acta Scientiarum**, v.22, p.545-552, 2000.

MAZEAUD, M. M.; MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A. D. **Stress and Fish**, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 1981. p. 49-75.

MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p. 201-212, 1977.

MCCORMICK, S. D. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. **American Zoologist**, v. 41, p. 781-794. 2001

McDONALD, G.; MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. In: NIGRELLI, R.F; POKORNY, K.S; RUGGIERI, G.D. Notes on *Ichthyophthirius multifiliis*, a Ciliate Parasitic on Fresh-Water Fishes, with Some Remarks on Possible Physiological Races and Species. **Transactions of the American Microscopical Society**, v. 95, p. 907-613, 1976.

NIKINMAA, M. Adrenergic regulation of haemoglobin oxygen affinity in rainbow trout red cells. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 152, p. 67-72, 1983

NOLAN, D. T. **Skin response of fish to stressors**. 2000. Ph. D Thesis. Catholic University of Nijmegen, Holand.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aquicultura no brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, p. 71-89, 2009.

PICKERING, A. D. Growth and stress in fish production. **Aquaculture**, v. 111, p. 51-63, 1993.

POLI, C. R.; GRUMANN, A; BORGHETTI, J. R. Situação atual da aquicultura na região sul. In: VALENTI, W. C.; POLI, C. R.; PEREIRA, J. A.; BORGHETTI, J. R. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**, Brasília: CNPq/MCT, 2000. 399p.

POUGH, F. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. In:\_\_\_\_\_. **A vida dos vertebrados**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 101.

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**, v. 108, p. 472-482, 1997.

RAMOS, C. A. **Caracterização morfofuncional das brânquias de *Arapaima gigas*, durante a transição da respiração aquática para a respiração aérea.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade federal de São Carlos, São Carlos.

RANDALL, D. J., BRAUNER, C. Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119A, p. 3-8, 1998.

RANDALL, D. J.; PERRY, S. F. Catecholamines. In: HOAR, W. S.; RANDALL, D. J.; FARRELL, A. P. **Fish physiology**, San Diego: Academic Press, 1992. p. 255-300.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, 1997.

SABÓIA-MORAES, S. M. T.; HERNANDES-BLAZQUEZ, F. J.; MOTA, D. L.; BITTENCOURT, A.M. Mucous cell types in the branchial epithelium of the euryhaline fish *Poecilia vivipara*. **Journal Fish Biology**, v. 49, p. 545-548, 1996.

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**, v. 47, p. 43-50, 1999.

SMALL, B. C. Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. **Journal of Fish Biology**, v. 64, p. 589-596, 2004.

SNIESZKO, S. F. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases of fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 6, p. 197-208, 1974.

SOUZA-BASTOS, L. R.; FREIRE, C. A. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. **Aquaculture**, v.289, p.167-174, 2009.

TAKASUSUKI, J., ARAUJO, M. R. R., FERNANDES, M. N. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Bulletin Environmental Contamination Toxicology**, v. 72, p. 1075-1082, 2004.

TESSLER, M. G.; MAHIQUES, M. M. Processos oceânicos e a fisiografia dos fundos marinhos. In: TEIXEIRA, W.; TOLEDO, M. C. M; FAIRCHILD, T. R.; TAIOLI, F. **Decifrando a terra**, São Paulo: Oficina de Textos, 2000. p. 261-284.

TETENS, V.; TETEN, G. Blood respiratory properties of rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Responses to hypoxia acclimation and anoxic incubation of blood in vitro. **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v.145, p.117-125, 1981.

THOMAS, P. Molecular and biochemical response of fish to stressors and their

potential use in environmental monitoring. In: ADAMS, S.M. **Biological Indicators of Stress in Fish**, Bethesda: American Fisheries Society, 1990. p. 9-28.

VAL, A. L.; MENEZES, G. C.; WOOD, C. M. Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 52, p. 83-90, 1998.

VIJAYAN, M. M.; MOON, T. W. Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 49, p. 2260-2266, 1992.

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 Physiology**, v. 122, p. 121-129, 1999.

WEBER, R. E.; LYKKEBOE, G. Respiratory adaptations in carp blood influences of hypoxia, red cell organic phosphates, divalent cations and CO<sub>2</sub> on hemoglobin-oxygen affinity. **Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology, Sensory, Neural, and Behavioral Physiology**, v. 128, p.127-137, 1978.

WEDEMEYER, G. A. Biological interactions. In: \_\_\_\_\_. **Physiology of fish in intensive culture systems**. New York: Chapman & Hall, 1996. p. 166-201.

WEIHRAUCH, D.; WILKIE, M. P.; WALSH, P. J. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans. **Journal of Experimental Biology**. v. 212, p. 1716-1730, 2009.

WENDEELAR BONGA, S. E. W. The stress response in fish. **Physiological Reviews**, v. 77, p. 591-625, 1997.

WILSON, J. M.; P. LAURENT, B. L.; TUFTS, D. J.; BENOS, M.; DONOWITZ, A. W.; VOGL, D. J.; RANDALL, D. J. NaCl uptake by the branchial epithelium in freshwater teleost fish: An immunological approach to ion-transport protein localization. **Journal of Experimental Biology**, v. 203, p. 2279-2296, 2000.

WINEMILLER, K. O.; JEPSEN, D. B. Effects of seasonality and fish movement on tropical river foodwebs. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 267-296, 1998.

WRIGHT, P. A.; WOOD, C. M. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. **Journal of Experimental Biology**. v. 212, p. 2303-2312, 2009.

WURTS, W. A. Using salt to reduce handling stress in channel catfish. **World Aquaculture**, v. 26, p. 80-81, 1995.