

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Luciana Rodrigues de Souza Bastos

**Fisiologia de teleósteos expostos a contaminação e
alterações nas concentrações de amônia, sal e oxigênio**

CURITIBA

2011

Luciana Rodrigues de Souza Bastos

**Fisiologia de teleósteos expostos a contaminação e alterações
nas concentrações de amônia, sal e oxigênio**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Zoologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a Carolina Arruda de Oliveira Freire (UFPR).

Colaboradores:

Prof^a. Dr^a Marisa Fernandes de Castilho (Laboratório de Estudos de Estresse Animal, Depto. Fisiologia - UFPR)

Prof. Dr. Jonathan Mark Wilson (Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental, Universidade do Porto-Portugal).

CURITIBA

2011

Souza-Bastos, Luciana Rodrigues de.

Fisiologia de teleósteos expostos a contaminação e alterações nas concentrações de amônia, sal e oxigênio/ Luciana Rodrigues de Souza Bastos – Curitiba, 2011

300 folhas (9 coloridas)

Orientador (a): Carolina Arruda de Oliveira Freire

Tese (Doutorado em Zoologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

1. Amônia; 2. Salinidade; 3. Teleósteos; 4. Xenobióticos; 5. Osmorregulação.
I. Título.

CDD 635.9

CDU 631.811.98


Termo de aprovação

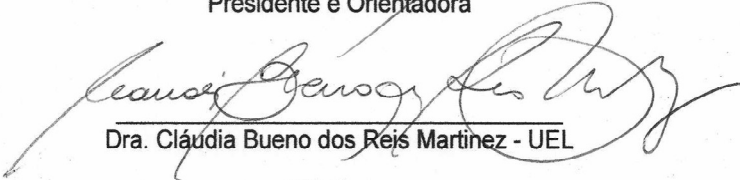
Fisiologia de teleósteos expostos a contaminação e alterações nas concentrações de amônia, sal e oxigênio.


Por


Luciana Rodrigues de Souza Bastos

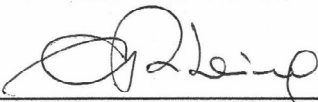
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire - UFPR
Presidente e Orientadora


Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez - UEL


Dr. Bernardo Baldisserotto - UFSM


Dra. Viviane Produçimo - UFPR


Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro - UFPR

Curitiba, 18 de fevereiro de 2011.

Epígrafe

“Sucesso, reconhecimento, fama e glória... muitos de nós lutamos por motivos assim,

Mas não se constrói um bom nome da noite para o dia.

É preciso trabalhar muito, ainda que haja tropeços e quedas, é preciso superar os obstáculos.

É preciso ter motivação, perseverar e insistir... A vida é uma sucessão de batalhas.

Emprego, família, amigos: Todos nós temos um status atual e temos também expectativas em relação ao futuro,

No entanto, as reviravoltas do destino nos surpreendem.

Nem sempre dá para se fazer só o que gostamos.

Mas aquele que gosta do que faz, e sente orgulho em fazer o melhor,

a cada dia vai mais longe.

Há momentos de calma... E há momentos agitados, decisivos,

em que a boa intenção não basta.

É quando a vida nos cobra coragem, arrojo, criatividade e um inabalável espírito de luta.

A verdade, é que os problemas e os reveses, ocorrem com maior frequência do que gostaríamos.

Os tempos mudam. Surgem desafios e novos objetivos.

Os guerreiros olham nos olhos do futuro, sem medo e sem arrogância,

Mas com confiança de quem está pronto para o combate.

Viver é também estar preparado para as situações difíceis.

O modo como encaramos as dificuldades é que faz a diferença.

Às vezes nos perguntamos: Como enfrentar as mudanças radicais que se apresentam diante de nós?

Como atuar num novo cenário, onde coisas que fazíamos tão bem precisam ser reaprendidas?

Como lutar sem deixar para trás valores fundamentais? E mais,

Como saber a medida exata a ser tomada no momento certo?

O incrível é que justamente diante de situações adversas, muitos redescobrem o que têm de melhor.

A ética, a amizade, a capacidade de criar novas estratégias fundamentadas na experiência, o talento para promover alianças positivas, o espírito de liderança, a consciência da força que reside no verdadeiro trabalho em equipe.

Tudo isso aflora quando as circunstâncias exigem, quando se sabe que existe um objetivo maior a ser alcançado.

Claro que não é fácil abandonar hábitos, costumes... Não é fácil adaptar-se aos novos meios, ou usar recursos aos quais não estávamos familiarizados.

Mas todo guerreiro sabe que pessimismo e insegurança, nessa hora só atrapalham.

Ainda que a ameaça venha de vários lados, com agilidade, força e determinação, podemos alcançar o resultado.

A combinação de energia e inteligência, assim como o equilíbrio entre a razão e a emoção é fundamental para o sucesso.

É uma sensação extremamente agradável chegar ao fim de uma etapa com consciência de dever cumprido,

E obter a consagração, o respeito de todos, o reconhecimento dos colegas, a admiração das pessoas que amamos... Ouvir o próprio nome com orgulho.

Aquele orgulho de quem viu nos obstáculos a oportunidade de crescer.

Orgulho de quem soube enfrentar as turbulências da vida e vencer...

Orgulho de ser um vencedor que não abriu mão dos seus valores fundamentais.”

Texto do filme *O Gladiador*

Agradecimentos

Agradeço a Prof^a Dr^a Carolina Arruda de Oliveira Freire pela excelente orientação, por todo o apoio, dedicação, exemplo, compreensão, carinho e por ser o exemplo profissional que desejo seguir. Faltam palavras para agradecer por todas as oportunidades a mim concedidas e por tudo o que fizeste a mim e a minha família. Nestes 6 anos de convivência, construímos uma sólida aliança profissional, mas também recebi a honra de sua amizade, da qual muito me orgulho. Hoje, formamos uma grande família, pois a tenho como uma segunda mãe.

A Prof^a Dr^a Marisa Fernandes de Castilho, com quem desenvolvi dois capítulos desta tese. Seus ensinamentos serão muito válidos em minha vida profissional. Muito obrigado por tudo.

Ao Prof. Dr. Jonathan Mark Wilson pela imensurável oportunidade de conviver por um breve, mas, indescritível período em seu laboratório em Portugal. Por todos os ensinamentos, os quais serão muito úteis a minha vida profissional, e que de algum modo contribuíram muito para o aprendizado em minha vida pessoal. Agradeço ainda pela paciência em me ensinar as coisas no laboratório e nos momentos de dificuldade de comunicação.

A Prof^a Dr^a Viviane Prodocimo, para mim Vivi, pela amizade, pelo carinho, pela prestatividade de sempre. Sei que ganhei uma grande amiga durante minha estada no laboratório. Saiba que uma amiga é uma irmã que a gente escolhe, te escolhi! E ao Pedro, meu mais novo sobrinho.

Aos Profs. Drs. Vinicius Abilhoa e Jean Ricardo Simões Vitule por todo o auxílio nas análises estatísticas, pela disponibilidade e amizade de sempre.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Falanghe Carneiro pela confiança, pela oportunidade de conhecer o mundo da aqüicultura e pela colaboração no desenvolvimento desta tese.

Ao Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pelo fornecimento dos peixes (*Rhamdia quelen*) utilizados nesta tese. Em especial ao Peter, pela colaboração em tudo que foi necessário.

A Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR) pela permissão de uso das áreas dos reservatórios para pesquisa. Em especial à Ana Cristina do Rego Barros, Bióloga do Centro de Educação Ambiental Mananciais da Serra, por toda a atenção e disponibilidade.

Ao Instituto Ambiental do Paraná (IAP) pelo fornecimento dos dados físico-químicos necessários à interpretação dos resultados dos capítulos relacionados ao Rio Iguaçu. Em especial à Leda pela atenção, disponibilidade, colaboração e simpatia.

Ao Instituto de Tecnologia para o Desenvolvimento (LACTEC), em especial à Tânia Lucia Graff de Miranda, pelo fornecimento de dados físico-químicos do Alto Rio Iguaçu, imprescindíveis a dois dos capítulos desta tese.

Ao SIMEPAR pelo fornecimento dos dados de pluviosidade importantíssimos para essa tese.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR, em especial à técnica Rosângela pelo grande auxílio nas medições de EDS.

A Prof^a Dr^a Helena Cristina Silva de Assis e sua aluna Izonete Cristina Guiloski (“Cris”) pelo ensinamento e colaboração nas análises de lipoperoxidação.

A Dr^a Ivonete Aparecida dos Santos e a Prof^a Dr^a Sônia Grötzner pelo auxílio na preparação dos materiais para microscopia. E também Sr. Herculano Salviano dos Reis Filho (“Nino”) que me ajudou, e muito, na coloração com Schiff.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando Duboc, pelo fornecimento de referências bibliográficas, pelas sugestões e discussões, mesmo que a distância, muito úteis aos capítulos que envolveram aspectos comportamentais.

Ao Prof. Dr. Roberto Reis pelo fornecimento de referências bibliográficas utilizadas no Capítulo 5 desta tese.

Ao Prof. Dr. José Monserrat pelos conselhos sobre a determinação da anidrase carbônica.

Ao Prof. Dr. Emygdio L. A. Monteiro Filho por toda a disponibilidade na discussão dos dados dos capítulos comportamentais, pelas sugestões, pela motivação de sempre.

À Pós-Graduação em Zoologia, e a todos os professores que tive oportunidade de conviver, meus sinceros agradecimentos pela oportunidade! À Vera Maria Adélio (secretária) pela dedicação e prestatividade.

Ao DAAD pelo fornecimento de equipamentos ao Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação.

Ao CNPq, que através do edital CT-Hidro, concedeu a bolsa de estudo para o desenvolvimento da tese no Brasil, e também pelo fornecimento da bolsa para o doutorado sanduíche em Portugal.

As minhas amigas portuguesas, Odete Gonçalves, Inês Páscoa, Inês Coelho e Ana Filipa Gonçalves, por me receberem com muito carinho no laboratório e por fazerem os dias serem agradáveis e me ajudarem em muitos aspectos profissionais e pessoais.

A Marina, Laura, Juan Antonio, Belen e Leila meus grandes amigos e companheiros de morada em Portugal, com os quais dividi muitas alegrias e tristezas. Vocês foram muito especiais e importantes nesta etapa da minha vida. Adoro vocês.

Aos colegas de laboratório com os quais tive oportunidade de conviver, mesmo que por um curto período de tempo: Enelise M. Amado, Aline Klôh, Renata C. Sinzker, Ivonete A. dos Santos, Anieli C. Maraschi, Sílvia M. Gutierrez, Lígia Strey, Giovanna C. Catellano, Marcos Paulo T. da Veiga, Hugo U. Batista, Fátima Juliane Ceron, Natascha Wosnick.

A banca, composta pelas Profas. Dras. Claudia Bueno dos Reis Martinez e Viviane Prodocimo e pelos Profs. Drs. Bernardo Baldisserotto e Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro, por aceitarem o convite, por disponibilizarem seu tempo para a leitura da tese e pelas contribuições feitas para o melhoramento da mesma.

Aos meus pais Jayr Rodrigues de Souza e Maria Luiza Maximiano Rodrigues de Souza, os grandes amores da minha vida. Obrigado por serem a razão e a alegria da minha vida! Vocês são pessoas maravilhosas, meus grandes mestres. Jamais poderei recompensar a dedicação, o carinho, o amor que vocês sempre me deram. Sem vocês eu nada seria. Se eu e meus irmãos chegamos onde estamos é graças a vocês. Mãe, em especial a senhora, meu exemplo de luta e de dedicação. Contigo aprendi que sempre temos mais força para superar as dificuldades do que imaginamos. Amo muito vocês de todo meu coração!

Ao meu marido, Leonardo Pussieldi Bastos, meu Léo, meu coração, amor, companheiro, amigo, cúmplice. Te amo tanto! Você é muito importante na minha vida. Obrigado por ser essa pessoa maravilhosa, por me completar, por tolerar minha ausência em vários momentos. Sua compreensão e seu amor foram muito importantes em toda essa caminhada. Obrigado por participar efetivamente desta tese, por me ensinar muitas coisas, por contribuir com todo o seu conhecimento. Por todos esses, e diversos outros motivos, essa tese também é sua.

Aos meus irmãos Cristiano Rodrigues de Souza, Maria Tereza Rodrigues de Souza e Gustavo Rodrigues de Souza por estarem sempre ao meu lado. Vocês são grandes companheiros, leais, fiéis, verdadeiros amigos. Vocês me fortalecem e me estimulam a ir além. Obrigado mesmo, amo vocês.

Agradeço a toda a minha família, Silmara e José Cesar (tios), Carolina (prima), Agenor (cunhado), India Nara (sogra), Rafaela (afilhada), pelos maravilhosos momentos vividos juntos, pelas alegrias, por fazerem parte da minha vida.

Às minhas pequenas Tica e Aiko, as melhores cachorras do mundo, minhas companheiras e que me alegram a cada dia! Também a Lucy, companheira de coleta e laboratório em Portugal.

E por fim, não por ser menos importante, mas sim por ser a pessoa mais especial a quem dedico esta tese: A minha avó Josefina Gomes Dias. Obrigado por ter me criado, por todos os momentos maravilhosos que vivemos juntas, por ter sido muito presente em minha vida (em nossas vidas). Por ter sido uma pessoa forte, que jamais reclamou da vida, mesmo em seus momentos de dificuldade. Minha vózinha guerreira, meu amor pela senhora é intenso independente de onde estejas hoje. Eu tenho certeza que me perdoou pela minha ausência, que ouvi minhas palavras de carinho, minhas orações e que sorri quando digo que te amo. Então sorria... EU TE AMO! Saudades eternas, imensa!

Dedicatória

À todas as pessoas da minha família,
Em especial à minha amada avó, Josefina Gomes Dias.

Onde estiver estará em meu coração, te amo.

Sumário

Epígrafe	iv
Agradecimentos	vi
Dedicatória	x
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas	xx
Lista de abreviações, siglas e símbolos	xxii
Resumo Geral.....	1
General Abstract	3
Introdução Geral	5
<i>Rhamdia quelen</i> : o modelo para estudo em água doce	14
<i>Lipophrys pholis</i> : o modelo para estudo dos efeitos da amônia em peixe anfíbio de entre-marés.....	18
Objetivos Gerais	21
Capítulo I: Avaliação da qualidade da água da Bacia do Rio Iguaçu, Alto Rio Iguaçu, através da exposição <i>in situ</i> de <i>Rhamdia quelen</i>	22
Resumo.....	24
Abstract	25
1. Introdução	26
2. Objetivos	29
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Caracterização dos Pontos Amostrados.....	30
3.2. Desenho Experimental	34
3.3. Obtenção e Processamento das Amostras	35
3.4. Análise das Amostras	36
3.4.1 Dosagem Sanguínea	36
3.4.2. Dosagens Plasmáticas	37
3.4.3. Dosagens em tecidos.....	38
3.5 Análises Estatísticas.....	41
4. Resultados	42

Mortalidade.....	42
Comparação entre os peixes do Ponto referência nas condições com e sem gaiolas.....	42
Determinação do Hematócrito, Osmolalidade e Concentrações iônicas (Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺ e Mg ²⁺) do plasma	43
Determinação do Teor Hídrico e da Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica	47
Determinação dos Marcadores de Estresse (Cortisol e Glicose Plasmáticos) e Lipoperoxidação no Fígado	50
5. Discussão	53
6. Conclusão	65
7. Referências Bibliográficas	66
Capítulo II: Poluição e comunicação química em jundiás (<i>Rhamdia quelen</i> Quoy & Gaimard, 1824) expostos a águas da Bacia do Alto Rio Iguaçu, Paraná	74
Resumo.....	76
Abstract	78
1. Introdução	80
2. Objetivos	83
3. Materiais e Métodos	84
3.1 Animais: Coleta e manutenção em laboratório	84
3.2 Coleta das águas e exposição dos peixes às águas em laboratório	84
3.3. Desenho experimental e obtenção de dados comportamentais e amostras biológicas	87
3.4. Análise das Amostras	89
3.4.1. Análises Comportamentais	89
3.4.2 Dosagem em sangue	90
3.4.3. Dosagens Plasmáticas	90
3.4.4 Dosagens em Tecido.....	91
3.5 Análise Estatística.....	93
4. Resultados	94
4.1 Micro-análise para identificação de elementos químicos no tecido branquial	95
4.2 Análises comportamentais.....	98
4.3 Dosagens sanguíneas e plasmáticas.....	100

4.4 Dosagens em tecido	103
5. Discussão	105
6. Conclusão	116
7. Referências Bibliográficas	117
Capítulo III: Identificação de células <i>club</i> na pele de jundiás (<i>Rhamdia quelen</i> , Siluriformes) e avaliação comportamental e fisiológica dos efeitos da administração do seu extrato (substância de alarme).....	123
Resumo.....	125
Abstract	126
1. Introdução	127
2. Objetivos	130
3. Material e Métodos.....	131
3.1 Coleta e manutenção dos animais em laboratório	131
3.2 Identificação das células de alarme por microscopia de luz.....	131
3.3 Obtenção do homogeneizado de pele - substância de alarme.....	132
3.4 Exposição dos animais a substância de alarme (extrato de pele).....	132
3.5 Análise dos efeitos da administração do extrato de pele	133
3.5.1 Análises Comportamentais	133
3.5.2 Análises Fisiológicas	133
3.6 Análise Estatística.....	134
4. Resultados	135
4.1 Descrição das células de alarme na epiderme de jundiá	135
4.2 Respostas Comportamentais	136
4.3. Respostas Fisiológicas	137
5. Discussão	138
6. Conclusão	142
7. Referências Bibliográficas	143
Capítulo IV: O acúmulo de amônia na água e seus efeitos sobre a fisiologia do jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	146
Resumo.....	148

Abstract	149
1. Introdução	150
2. Objetivo	153
3. Materiais e Métodos	154
3.1. Obtenção dos animais e manutenção em laboratório.....	154
3.2. Experimentação e obtenção de material biológico	154
3.3. Análise das Amostras	157
3.3.1 Análise no sangue.....	157
3.3.2 Análises no plasma	157
3.3.3 Análises nos tecidos	158
3.4. Estatística	159
4. Resultados	160
4.1. Hematócrito	160
4.2. Análises Plasmáticas.....	160
4.3. Teor Hídrico Tecidual	161
4.4. Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica	163
5. Discussão	165
6. Conclusão	173
7. Referências Bibliográficas	174
Capítulo V: A utilização de sal em cultivo do bagre neotropical de água doce <i>Rhamdia quelen</i>	179
Resumo.....	181
Abstract	183
1. Introdução	185
2. Materiais e Métodos	188
2.1. Animais e manutenção em laboratório.....	188
2.2. Experimentos com animal inteiro e coleta de amostras de sangue e tecidos.....	188
2.3. Dosagens plasmáticas	190
2.4. Dosagens em tecidos.....	191

2.4.1. Teor hídrico muscular e branquial	191
2.4.2. Atividade Específica da Anidrase carbônica	191
2.5. Músculo isolado: avaliação in vitro da capacidade de regulação da quantidade de água.....	192
2.6. Estatística	193
3. Resultados	195
3.1. Observações comportamentais	195
3.2. Dosagens Plasmáticas	195
3.3. Dosagens em tecidos.....	196
Teor Hídrico Muscular e Branquial.....	196
3.4. Músculo Isolado: Avaliação da capacidade regulatória da quantidade de água	198
3.5. Atividade específica da anidrase carbônica	200
4. Discussão	201
5. Conclusão	207
6. Referências Bibliográficas	208
Capítulo VI: Mecanismos de excreção de amônia no peixe de entre-marés <i>Lipophrys pholis</i> diante de exposição ao ar, à água doce e ao aumento da amônia.....	215
Resumo.....	217
Abstract	219
1. Introdução	220
2. Objetivos	222
3. Material e Métodos.....	223
3.1 Obtenção dos animais e manutenção em laboratório.....	223
3.2 Experimentação	223
3.2.1 Experimento de exposição ao ar	223
3.2.2 Experimento de exposição à água doce e ao aumento de concentração de amônia na água (1 mM NH ₄ Cl).....	224
3.2.3 Experimento de injeção de cloreto de sódio (NaCl 0,3 M) e bicarbonato de amônio (NH ₄ HCO ₃ 0,3 M)	225
3.3 Obtenção de material biológico.....	226

3.4 Análise das amostras.....	226
3.4.1 Dosagens na água.....	226
3.4.2 Dosagens em tecidos.....	227
3.5 Análises Estatísticas.....	230
4. Resultados	232
4.1 Experimento de exposição ao ar.....	232
4.2 Experimento de exposição à água doce e aumento de concentração de amônia na água (1mM NH ₄ Cl)	233
4.3 Experimento de injeção de cloreto de sódio (NaCl 0,3M) e bicarbonato de amônio (NH ₄ HCO ₃ 0,3M)	235
4.4 Imunocitoquímica	243
5. Discussão	244
6. Conclusão	254
7. Referências Bibliográficas	255
Conclusões Gerais	259
Referências Bibliográficas	262

Lista de Figuras

Introdução Geral

Figura 1. Representação esquemática dos níveis de respostas ao estresse e dos parâmetros (biomarcadores) avaliados nesta Tese.....	14
Figura 2. Fotografia de espécime de <i>Rhamdia quelen</i> (Quoy and Gaimard, 1824).....	15
Figura 3. Figura representativa dos parâmetros avaliados no sangue e plasma; brânquias, fígado, rim e músculo de <i>Rhamdia quelen</i>	17
Figura 4. Fotografia de espécime de <i>Lipophrys pholis</i> (Linnaeus, 1758).....	18
Figura 5. Figura representativa dos parâmetros avaliados nas brânquias, pele abdominal e músculo de <i>Lipophrys pholis</i>	20

Capítulo I

Figura 6. Mapa da localização dos pontos amostrados na Bacia do Alto Rio Iguaçu, que abrange Curitiba e sua Região Metropolitana.	34
Figura 7. Dosagens em sangue e plasma de <i>Rhamdia quelen</i> expostos <i>in situ</i> aos pontos ao longo da Bacia do Alto Rio Iguaçu.....	46
Figura 8. Dosagens em tecidos de <i>Rhamdia quelen</i> expostos <i>in situ</i> aos pontos ao longo da Bacia do Alto Rio Iguaçu.....	49
Figura 9. Dosagens em plasma e tecido de <i>Rhamdia quelen</i> expostos <i>in situ</i> aos pontos ao longo da Bacia do Alto Rio Iguaçu.....	52

Capítulo II

Figura 10. Mapa da localização dos cinco pontos amostrados na Bacia do Alto Rio Iguaçu, que abrange Curitiba e sua Região Metropolitana.	87
Figura 11. Modelo esquemático do aquário utilizado para análise comportamental de <i>Rhamdia quelen</i>	89
Figura 12. Imagem representativa da brânquia <i>in natura</i> e obtida por microscopia eletrônica de varredura.....	92
Figura 13. Exemplos de representação gráfica dos resultados obtidos através da análise de Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS).....	97

Figura 14. Respostas comportamentais: Dispersão (A e B) e Tempo de locomoção (C e D) de <i>Rhamdia quelen</i> , após aclimação de 7 dias, em condições laboratoriais, às águas dos pontos amostrados na Bacia do Alto Rio Iguaçu.....	99
Figura 15. Dosagens de cortisol e glicose no plasma de <i>Rhamdia quelen</i> após aclimação de 7 dias, em condições laboratoriais, às águas dos pontos amostrados na Bacia do Alto Rio Iguaçu	100
Figura 16. Dosagens de Hematócrito (%);Osmolalidade (mOsm/kgH ₂ O) e Concentrações dos íons sódio, cloreto, magnésio e potássio (mM) no plasma de <i>Rhamdia quelen</i> após aclimação de 7 dias, em condições laboratoriais, às águas dos pontos amostrados na Bacia do Alto Rio Iguaçu	102
Figura 17. Dosagens de Teor hídrico branquial e muscular (%);Atividade específica da enzima anidrase carbônica branquial e renal (/mg proteína) e, Peroxidação Lipídica no fígado (nmol/mg proteína) de <i>Rhamdia quelen</i> após aclimação de 7 dias, em condições laboratoriais, a águas dos pontos amostrados na Bacia do Alto Rio Iguaçu.....	104

Capítulo III

Figura 18. Epiderme de <i>Rhamdia quelen</i> por microscopia de luz (PAS-H).....	135
Figura 19. Respostas comportamentais: Tempo de locomoção (A) e Dispersão (B) de <i>Rhamdia quelen</i> após adição do extrato de pele de co-específicos.....	136

Capítulo IV

Figura 20. Atividade específica da enzima Anidrase Carbônica (AC) branquial (A) e renal (B) de <i>Rhamdia quelen</i> submetidos a condição controle e as concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0 mg/L de NH ₄ Cl por 5 e 24 h.	164
--	-----

Capítulo V

Figura 21. Concentrações plasmáticas e quantidade de água tecidual em <i>Rhamdia quelen</i> , em condição controle em água doce ou quando submetidos por 1h a 5; 15 ou 25 g/L de NaCl	197
Figura 22. Curso temporal de mudança no peso úmido (%) de fragmentos musculares de <i>Rhamdia quelen</i> submetidos <i>in vitro</i> , por 120 min, às condições controle ou meio hiperosmótico.....	199

Figura 23. Atividade específica da anidrase carbônica branquial e renal (/mg proteína) de *Rhamdia quelen* em condições controle em água doce ou quando submetidos por 1h a salinidades de 5; 15 ou 25 g/L de NaCl.. 200

Capítulo VI

Figura 24. Taxa de excreção de amônia ($\mu\text{mol/kg/h}$) dos peixes *Lipophrys pholis* durante a pré-exposição (PRE EXP) e exposição ao ar (EXP AR); à água doce (EXP AD); à 1mM de NH_4Cl na água (EXP NH_3); e injetados com amônia (INJ NH_3). 237

Figura 25. Atividade específica da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias e pele abdominal dos peixes *Lipophrys pholis* submetidos as condições: controle (CT AM); expostos ao ar (EXP AR); expostos à água doce (EXP AD); expostos à 1mM de NH_4Cl na água (EXP NH_3) e, injetados com amônia (INJ NH_3). 238

Figura 26. Representação gráfica da intensidade das bandas e imagem representativa das bandas de proteínas de transporte de amônia e íons em brânquia e pele dos peixes *Lipophrys pholis* expostos a condição controle (CT AM) e ao ar (EXP AR).. 240

Figura 27. Representação gráfica da intensidade das bandas e imagem representativa das bandas de proteínas de transporte em brânquia e pele dos peixes *Lipophrys pholis* expostos a condição controle (CT AM), à água doce (EXP AD) e ao aumento das concentrações de amônia na água através da adição de 1mM de NH_4Cl (EXP NH_3).. 241

Figura 28. Representação gráfica da intensidade das bandas e imagem representativa das bandas de proteínas de transporte em brânquia e pele dos peixes *Lipophrys pholis* controles, injetados com cloreto de sódio (INJ NaCl), e experimentais injetados com bicarbonato de amônio (INJ NH_3). 242

Figura 29. Imagem representativa da dupla localização imunofluorescente dos canais de cloreto (CFTR) & $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NKA – αR1), e das proteínas Rhesus (RhCG1) & $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NKA – α5) em brânquia e pele dos peixes *Lipophrys pholis*. 243

Lista de Tabelas

Capítulo I

Tabela 1. Dados analisados em sangue, plasma e tecidos de *Rhamdia quelen* submetidos ao ponto controle fora (=sem) ou dentro (=com) das gaiolas. 43

Capítulo II

Tabela 2. Dados de temperatura (°C), saturação de oxigênio (%) e pH da água dos aquários controle e experimentais durante experimentos de laboratório 94

Tabela 3. Identificação dos elementos químicos detectados por meio de Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS), por microscopia eletrônica de varredura, em brânquias de *Rhamdia quelen* expostos por 7 dias, em condições laboratoriais, a águas dos pontos obtidos da Bacia do Alto Rio Iguaçu. 96

Capítulo III

Tabela 4. Dosagens plasmáticas realizadas em *Rhamdia quelen* controle e expostos às concentrações de 2%, 5% e 10% de extrato de pele de co-específicos. 137

Capítulo IV

Tabela 5. Temperatura (Temp., °C), pH, concentração total de amônia (TAN; mg/L), e fração de amônia não ionizada (NH₃; mg/l) medidos na água de cada aquário controle ou experimental (adição de 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/L de NH₄Cl) no início e ao final de cada período experimental de 5 ou 24h. 156

Tabela 6. Resultados em sangue e plasma de espécimes de *R. quelen* submetidos ao aumento das concentrações de amônia na água por períodos de 5 e 24 h. 162

Capítulo V

Tabela 7. Íons, osmolalidade, e pH medido em amostras individuais de águas controle e experimentais preparadas. 190

Tabela 8. Composição das salinas controle e experimentais hiper-osmóticas usadas nos experimentos *in vitro* com os fragmentos musculares isolados de *Rhamdia quelen*. 193

Capítulo VI

Tabela 9. Valores de pH nas águas coletadas em cada um dos experimentos: de exposição ao ar, a água doce (AD) e a amônia (NH_3), ou injetados (INJ) com NaCl ou amônia (NH_4HCO_3)... 225

Tabela 10. Peso (g), Teor hídrico muscular (%), Concentração muscular dos íons sódio e potássio ($\mu\text{m/g}$) de peixes *Lipophrys pholis* diante das condições experimentais. 239

Lista de abreviações, siglas e símbolos

AC – enzima anidrase carbônica

AAC – atividade específica da enzima anidrase carbônica

ACTH – hormônio adrenocorticotrófico

Al – alumínio

APS – (*ammonium persulfate*) persulfato de amônio

Au – ouro

BAR - Barigui

BHT – butil hidróxitolueno

BOGA – Biotério de Organismo Aquáticos

BSA – (*bovine serum albumin*) albumina de soro bovino

C – carbono

Ca - cálcio

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CFTR – canais de cloreto

CIIMAR – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental

Cl⁻ - cloreto

CL – concentração letal

CO₂ – gás carbônico

Ref – Referência

Cr – cromo

CT AM – controle em água do mar

Cu – cobre

DAPI - 4',6-Diamidino-2-phenylindole

DBO – demanda bioquímica de oxigênio

DQO – demanda química de oxigênio

DTT - Ditioneitol

EDS – espectroscopia por dispersão de energia

EDTA – (*ethylenediamine tetraacetic acid*) ácido etilenodiamino tetra- acético

ERO – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

EXP AD – exposição à água doce

EXP AR – exposição ao ar

EXP NH₃ – exposição à amônia

FeSO₄.NH₄ – sulfato ferroso amoniacal

FOX – (*ferrous oxidation/xilenol Orange*) método para determinação de peroxidação lipídica

Gua - Guajuvira

H⁺ - íon hidrogênio ou próton

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HCO₃⁻ - bicarbonato

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

IAP – Instituto Ambiental do Paraná

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INJ NaCl – injetados com cloreto de sódio

INJ NH₃ – injetados com amônia (bicarbonato de amônio)

K⁺ - potássio

KCl – cloreto de potássio

K_{eq} – coeficiente de equivalência

KOH – hidróxido de potássio

LACTEC – Instituto para Desenvolvimento do Meio Ambiente

LAPEP – Laboratório de Pesquisa e Piscicultura

LPO – lipoperoxidação ou peroxidação lipídica

Mg²⁺ - magnésio

MgCl₂ – cloreto de magnésio

MIR - Miringuava

N - nitrogênio

Na⁺ - sódio

NaCl – cloreto de sódio

NaOCl – hipoclorito de sódio

Nb – nióbio

NGS - (*normal goat serum*) soro normal de cabra

NH₃ – fração de amônia não ionizada

NH₄⁺ - fração de amônia ionizada

NH₄Cl – cloreto de amônio

NH₄HCO₃ – bicarbonato de amônio

NHE – trocadores sódio/próton (Na⁺/H⁺)

NHE2 (R15) e NHE3 (R18) – subunidades dos trocadores Na⁺/H⁺

Ni - níquel

NKA – Na⁺ - K⁺ - ATPase

NKA α1 e NKA α5 – subunidades da bomba Na⁺ - K⁺ - ATPase

NKCC – co-transportador Na⁺ - K⁺ - 2Cl⁻

•NO – óxido nítrico

•NO₂ – dióxido de nitrogênio

NO₂⁻ - nitrito

NO₃⁻ - nitrato

O - oxigênio

O₂ – gás oxigênio

O₂^{•-} - ânion superóxido

OD – oxigênio dissolvido

•OH – radical hidroxila

ONOO⁻ - peróxinitrito

P – fósforo

PAS-H – ácido periódico Schiff + hematoxilina

PBa – parque Barigui de Curitiba

PBS - (*phosphate buffered saline*) tampão fosfato

PCNA – (*proliferating cell nuclear antigen*) antígeno de proliferação celular

pH – potencial hidrogeniônico

PIR – Represa do Piraquara I

PRE EXP – pré-exposição

PUC – Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Rh – glicoproteínas Rhesus

RhAG e RhCG2 – subunidades de glicoproteínas Rhesus

Rlr – reservatório do Iraí

RMi – rio Miringuava

RPa – reservatório do Passaúna

RPi 1 – reservatório do Piraquara I

RPi 2 – reservatório do Piraquara II

SA – substância de alarme

Sb – antimônio

SDS-PAGE – (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) gel de eletroforese de policrilamida com sódio-dodecil sulfato

SEI – Sacarose + EDTA + Imidazol

Si - silício

TAN – fração total de amônia

TBARS – (*thiobarbituric acid reactive substances*) substância reativa de ácido tiobarbitúrico

TC – taxa de reação catalisada

Temp – temperatura

Ti - titânio

TNC – taxa de reação não catalisada

TPBS – tampão fosfato

TTBS – tampão fosfato + Tween 20

UFPR – Universidade Federal do Paraná

W – tungstênio

Y - ítrio

Zan – Zaniolo

Zoo – parque Zoológico de Curitiba

Zn - zinco

Zr - zircônio

Resumo Geral

A influência da contaminação ambiental resultante do intenso crescimento industrial e demográfico e também de contaminantes naturais e fatores abióticos sobre a biota aquática tem sido alvo de pesquisas em diversas partes do Brasil e do mundo. Porém, tais pesquisas nem sempre são focadas em espécies nativas. Diante desta constatação, nesta Tese buscou-se identificar a influência desses fatores sobre as respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas de duas espécies de peixes: uma dulcícola, nativa, de grande interesse econômico e comercial (*Rhamdia quelen*), e outra de entre-marés (*Lipophrys pholis*) com hábitos e ecologia bastante peculiares. *R. quelen* foi testado através da utilização de gaiolas e exposição *in situ* à contaminação existente na Bacia do Alto Rio Iguaçu, caracterizada por diferentes níveis de impacto antrópico. Adicionalmente, estes peixes tiveram suas respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas verificadas, em laboratório, às águas dessa região. *R. quelen* foi ainda avaliado quanto a presença de células de alarme em sua epiderme, e percepção da substância de alarme de co-específicos sobre seu comportamento, e também em relação aos efeitos isolados da amônia e do sal sobre sua fisiologia. *R. quelen* mostrou-se como uma espécie bastante tolerante à exposição de contaminantes naturais e xenobióticos e alterações em fatores abióticos. A exposição *in situ* à mistura complexa de contaminantes existente na Bacia do Alto Rio Iguaçu, manifestou nestes peixes prejuízos em sua homeostasia osmótica, principalmente nos pontos da grande Curitiba e a jusante dessa região, onde inclusive constatou-se mortalidade. A exposição, em laboratório, a essa contaminação permitiu a identificação de metais em todos os pontos avaliados, independentemente do gradiente de contaminação esperado entre os pontos. De forma associada à presença desses elementos, os peixes manifestaram alterações na percepção e reação à substância de alarme de seus co-específicos e, como verificado no estudo *in situ*, alterações em sua homeostasia. Os efeitos foram mais significativos na coleta de verão, indicando grande influência da

sazonalidade sobre a dinâmica dos contaminantes e respostas desses organismos. Quando testados com relação ao aumento das concentrações de amônia total na água, até 2,0 mg/L, *R. quelen* mostrou-se relativamente resistente, apresentando apenas desequilíbrio ácido-básico, caracterizado pela inibição da enzima anidrase carbônica branquial e renal de forma concentração - e tempo - dependente. Durante a exposição por 1 h ao aumento na concentração de sal na água (25 g/L de NaCl), peixes desta espécie apresentaram perturbação da homeostase extracelular. Porém, mesmo diante deste intenso estresse osmótico, os mesmos demonstraram grande resistência e capacidade de regulação da água do seu tecido muscular, a qual provavelmente está relacionada com sua história evolutiva. O peixe marinho de entre-marés *L. pholis* foi avaliado em relação aos mecanismos de transporte e excreção de amônia e íons, quando exposto por 24 horas a desafios fisiológicos de exposição ao ar, à água doce e aumento na concentração de amônia interna e externa. Este blenídeo, de hábito anfíbio, apresentou grande capacidade de manutenção dos fluxos de excreção de amônia, das concentrações iônicas nos tecidos e de regulação de volume celular diante dos desafios impostos. Dentre todos os desafios, a submissão à água doce foi a condição mais desafiadora à sua homeostasia. A pele desses peixes apresentou extrema importância nos processos de excreção de amônia, especialmente quando expostos ao ar e ao aumento na concentração de amônia interna. Adicionalmente, não houve ativação ou aumento na expressão de proteínas de transporte de íons ou de amônia nas brânquias ou pele. Estes tecidos, provavelmente já apresentam alta expressão e atividade dessas proteínas, devido a instabilidade natural do seu habitat. De modo geral, ambas as espécies mostraram-se excelentes modelos de estudo. Apesar da utilização de enfoques variados e de espécies de hábitos bastante distintos, foi possível contribuir para o conhecimento da fisiologia das respostas de estresse à presença de contaminantes ou alterações em fatores abióticos na água.

General Abstract

The influence of environmental contamination resulting from intensive industrial and demographic growth, as well as natural contaminants and abiotic factors on the aquatic biota has been the subject of research in various parts of Brazil and the world. However, such research is not always focused on native species. Given this finding, this Thesis sought to identify the influence of these factors on behavioral responses, physiological and biochemical characteristics of two species of fish: a freshwater, native, with high economic and commercial interest (*Rhamdia quelen*), and another, an intertidal fish (*Lipophrys pholis*) which presents peculiar habits and ecology. *R. quelen* was tested by using cages and exposure *in situ* to contamination existing in the Upper Iguaçu River, characterized by different levels of human impact. Additionally, these fish had their behavioral responses, physiological and biochemical changes observed in the laboratory to the waters of this region. *R. quelen* was further evaluated for the presence of alarm cells in its epidermis, and perception of the alarm substance by conspecifics. It was also studied for the separate effects of ammonia and salt on their physiology. *R. quelen* was very tolerant to exposure to xenobiotics and natural contaminants and changes in abiotic factors. The *in situ* exposure to a complex mixture of contaminants existing in the Upper Iguaçu River resulted in loss of their osmotic homeostasis, especially inside the city of Curitiba and downstream of this region, where even mortality was recorded. The fish showed changes in perception and reaction to alarm substance of their conspecifics, and as observed in the *in situ* study, it also displayed changes in its homeostasis. Effects were more significant in Summer, indicating strong influence of seasonality on the dynamics of contaminants and responses of these organisms. When tested with respect to increased concentrations of total ammonia in water, up to 2.0 mg/L for 24 hours, *R. quelen* was relatively resistant, showing only acid-base imbalance, characterized by inhibiting the enzyme carbonic anhydrase gill and kidney in a dose - and time – dependent manner. During

the exposure for 1 h to increased concentrations of salt in water (25 g/L NaCl), this species of fish showed disturbance of extracellular homeostasis. But even before this intense osmotic stress, they showed great resilience and ability to regulate the water from muscle tissue, which is probably related to their evolutionary history. The intertidal fish *L. pholis* was evaluated with respect to the mechanisms of transport and excretion of ammonia and ions when exposed to physiological challenges (24 hours) of exposure to air, fresh water or increased internal or external concentrations of ammonia. This blenny of amphibious habit displayed great capacity to maintain the ammonia excretion rates, ion concentrations in its tissues, and regulation of cell volume upon the challenges offered. Among all the challenges, the exposure to freshwater was the most challenging to the homeostasis of these animals. The skin of these fish was extremely important in the processes of ammonia excretion, especially when exposed to air and the increase in internal ammonia concentration. Additionally, the outstanding maintenance of homeostasis observed in this teleost occurred without activation or upregulation of protein expression (transport of ions or ammonia), which probably already have high expression and activity levels, due to their unstable habitat. In general, both species were excellent models of study. Despite the use of different approaches, and the difference in habits, both species could contribute to the knowledge of the physiology of the stress response of teleosts to contaminants or changes in abiotic factors in the water.

Introdução Geral

A poluição ambiental, sobretudo em ambientes aquáticos, tem crescido juntamente com o aumento da industrialização e do crescimento demográfico, os quais têm levado a alterações físicas, químicas e biológicas nesses ambientes (e.g. Evans 1987; Stien et al., 1998; Pacheco e Santos, 2001; Winkaler et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Abilhoa e Boscardin, 2004; Sofia et al., 2006; Camargo e Martinez, 2007; Monserrat et al., 2007; Silva e Martinez, 2007; Fontainhas-Fernandes et al., 2008; Magalhães e Ferrão Filho, 2008; Becker et al., 2009). A descarga desses contaminantes pode ser direta, pela deposição de efluentes domésticos, agrícolas, industriais, ou indireta, quando os contaminantes que atingem a atmosfera retornam à água por meio de processos hidrológicos e atmosféricos (revisado em van der Oost, et al., 2003; Portz et al., 2006). Assim, além de uma variedade de compostos químicos, o ambiente aquático tem acumulado grande quantidade de matéria orgânica, que juntos são responsáveis pela redução na qualidade da água (van der Oost, et al., 2003; Pereira e Mercante, 2005).

Acúmulo de matéria orgânica com conseqüente interferência sobre a qualidade da água também é bastante comum em sistemas artificiais; em especial, em cultivos intensivos de peixes (Pereira e Mercante, 2005; Portz et al., 2006). A atividade de aqüicultura é considerada como uma fonte significativa de poluição e degradação da qualidade da água (revisado em Pereira e Mercante, 2005). Em tanques de criação, alterações na temperatura e na decomposição aeróbia ou anaeróbia da matéria orgânica levam, diretamente, a modificações no pH, nas concentrações de oxigênio e gás carbônico, mas principalmente nas concentrações dos compostos nitrogenados, com destaque para a amônia. Essas alterações, embora comuns, geram impactos significativos, tornando-se os principais obstáculos para a manutenção da vida aquática nesses ambientes (Pereira e Mercante, 2005; Portz et al., 2006).

Os peixes são os vertebrados mais diversos e abundantes na Terra (Nelson, 2006), e são totalmente dependentes da qualidade da água para sua sobrevivência. Estão cada vez mais sujeitos a águas contaminadas ou de baixa qualidade, nos mais variados habitats (de água doce, marinho e estuarino) em que se distribuem (e.g. Evans, 1987; Evans et al., 2005; Silva e Martinez, 2007). Devido a esta exposição, abundância, diversidade e ao vasto conhecimento das respostas fisiológicas e bioquímicas desses organismos, os mesmos têm sido cada vez mais utilizados como bioindicadores em estudo de avaliação dos efeitos decorrentes da contaminação e da alteração na qualidade da água. Essa relevância se torna ainda maior pelo fato dos peixes interagirem em diversos níveis tróficos da cadeia biológica, apresentando, assim, grande importância ecológica. (e.g. Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; Fleeger et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Alquezar et al., 2006; Portz et al., 2006; Silva e Martinez, 2007). A exposição a um contaminante (natural ou xenobiótico) ou a mistura complexa dos mesmos, ou ainda a alterações nos parâmetros físico-químicos da água, causam respostas de estresse em peixes (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Estresse é definido como perturbação da homeostase (equilíbrio) interna pela exposição a um estressor químico, físico ou biológico (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Portz, et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). As respostas de estresse são divididas em basicamente três níveis: primário, secundário e terciário. As respostas primárias envolvem a ativação cerebral, a qual resulta na liberação de hormônios (catecolaminas e corticosteróides). As respostas secundárias são decorrentes da ação desses hormônios sobre o organismo, e envolvem ativação metabólica, aumento do débito cardíaco e do consumo de oxigênio, da mobilização de substratos energéticos e perturbação do equilíbrio hidromineral. As respostas terciárias, por sua vez, envolvem não somente o organismo, mas também podem ser extrapoladas as suas populações e comunidades, tendo como principais

manifestações inibição do crescimento, alterações reprodutivas, nas respostas imunes e comportamentais (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost et al., 2003; Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Adicionalmente, diante da exposição a estressores e da perturbação da homeostase, os animais podem apresentar alterações em vários níveis de organização biológica. Essas alterações detectáveis são chamadas de biomarcadores e são utilizadas para indicar exposição, efeitos e/ou susceptibilidade de um organismo a um determinado estressor. Os biomarcadores são classificados em moleculares, genéticos, bioquímicos, fisiológicos, comportamentais ou estruturais, e são quantificados em tecidos e fluidos corpóreos do organismo (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Portz, et al., 2006; Monserrat et al., 2007; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Os biomarcadores fornecem informações biológicas que permitem extrapolações para as populações e comunidades dos ecossistemas, o que seria impossível com base apenas em análises químicas da água (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

A exposição de peixes a estressores únicos ou a grupos de estressores em combinação tem início com o contato do animal com o meio, o qual ocorre de forma mais intensa através das brânquias, por sua grande área e necessariamente maior permeabilidade, por causa das trocas gasosas. A maior parte dos estressores afeta a estrutura branquial. As brânquias podem ser morfológica e fisiologicamente afetadas por alterações em fatores abióticos da água, bem como por uma variedade de poluentes ambientais (e.g. Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Evans et al., 2005; Camargo e Martinez, 2007; Fontainhas-Fernandes, et al., 2008). Alterações morfológicas são os efeitos primários, e bastante comuns, gerados neste tecido. A partir desses efeitos, a ocorrência de alterações fisiológicas é subsequente. Dentre as alterações morfo-fisiológicas que podem ocorrer no epitélio branquial estão, por exemplo: síntese ou destruição de componentes moleculares do

sistema de transporte, variações na morfologia e no número de células de cloreto, lesões (hiperplasia, fusão lamelar, hipertrofia, etc.), as quais resultam em prejuízos em processos vitais de balanço hidromineral, trocas gasosas, equilíbrio ácido-básico e excreção de produtos nitrogenados. Essas mudanças nas brânquias são comuns a peixes de água doce e salgada (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Randall et al., 1999; Cerqueira e Fernandes, 2002; Evans et al., 2005; van der Oost et al., 2003; Camargo e Martinez, 2007; Fontaínhas-Fernandes, et al., 2008).

As brânquias têm papel central nos processos de perturbação da homeostase iônica e osmótica (estresse osmótico), respondendo diretamente a qualquer alteração na água circundante (e.g. Evans, 1987; Randall et al., 1999; Martinez et al., 2004; Evans et al., 2005; Camargo e Martinez, 2007; Fontaínhas-Fernandes, et al., 2008). Por serem estruturas altamente vascularizadas, as brânquias são a principal superfície de contato entre o peixe e o meio (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Evans et al., 2005). Assim, alterações na estrutura e nos processos fisiológicos deste tecido, devido a seu íntimo contato com o ambiente e os fluidos corpóreos, afetam rapidamente outros órgãos, prejudicando o funcionamento de todo o organismo (revisado em Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Evans et al., 2005).

Avaliação ultra-estrutural das brânquias constitui marcador específico de estresse, bastante utilizado, e que caracteriza a exposição a estressores (Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; Cerqueira e Fernandes, 2002; Silva e Martinez, 2007). Por exemplo, a exposição a metais, alterações de pH, ou aumento na concentração de amônia levam a aneurismas, fusão de lamelas branquiais, hipersecreção de muco, aumentos nos processos de apoptose, necrose, dilatação dos espaços intracelulares, etc. (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez, 2004; Camargo e Martinez, 2007). Diante de alterações morfológicas nas células branquiais, perturbações ou

desafios para a homeostasia osmo-iônica são inevitáveis. Conseqüentemente, como uma cascata, ocorrem alterações em parâmetros sanguíneos (e.g. hematócrito) e plasmáticos (osmolalidade, íons) além de alterações nos níveis plasmáticos de cortisol e glicose, os quais podem ou não ter relação com alterações na morfologia branquial (e.g. Roche e Bogé, 1996; Wendelaar Bonga, 1997; Stien et al., 1998; Winkaler et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Camargo e Martinez, 2006; Portz et al., 2006). Estes parâmetros são bastante sensíveis e muito utilizados como marcadores de estresse porque são os primeiros efeitos gerados pelos estressores sobre os peixes (e.g. Roche e Bogé, 1996; Wendelaar Bonga, 1997; Stien et al., 1998; Winkaler et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Camargo e Martinez, 2006; Portz et al., 2006).

Elevação no cortisol plasmático é um indicador clássico utilizado para a detecção de fatores estressantes em peixes (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost, 2003; Portz et al., 2006). Alterações nas concentrações de cortisol ocorrem rapidamente em peixes expostos a diferentes tratamentos: manipulação, alterações de salinidade, pH e temperatura da água, exposição a metais, poluentes orgânicos, risco de predação (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost et al., 2003; Portz et al., 2006). O cortisol é um hormônio com diversas funções nos peixes, as quais incluem: osmorregulação, metabolismo, respostas do sistema imunológico, reprodução, crescimento (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost et al., 2003). Órgãos como as brânquias, intestino, rim e fígado são importantes alvos para o cortisol em peixes, pois estão envolvidos em duas principais funções deste hormônio: manutenção do equilíbrio hidromineral e do metabolismo energético (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999). Entre suas ações, o cortisol causa aumento na permeabilidade iônica do intestino e esôfago, aumento na atividade da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nas brânquias, intestino e rim, e estímulo para a diferenciação das células de cloreto nas brânquias, entre

outras (Madsen, 1990; Veillette et al., 1995; Mommsen et al., 1999; Pacheco e Santos, 2001; Cerqueira e Fernandes, 2002; Laiz-Carrión et al., 2002; Evans et al., 2005; Mancera e McCormick, 2007). Aumento no cortisol plasmático promove a gliconeogênese, devido ao aumento da atividade metabólica e necessidade de disponibilização da reserva energética, a qual conseqüentemente gera maior disponibilidade de glicose no sangue (hiperglicemia). A determinação da glicose plasmática juntamente com o cortisol é considerada como uma das principais formas de determinação de estresse em peixes (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1997; van der Oost et al., 2003; Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Os rins, juntamente com as brânquias, são essenciais aos processos osmorregulatórios em teleósteos marinhos e de água doce (Evans, 1993; Martinez et al., 2004; Katoh et al., 2006; Silva e Martinez, 2007). Devido esse órgão ser altamente irrigado, o mesmo é um dos primeiros a ser afetado pela ação de diversos compostos tóxicos, os quais causam alterações em sua estrutura e funcionamento (e.g. Evans, 1987; Camargo e Martinez, 2007; Silva e Martinez, 2007). Da mesma forma, como já mencionado para as brânquias, alterações nos rins prejudicam o transporte de íons. Neste caso, basicamente de íons divalentes, especialmente de Mg^{2+} , o principal íon excretado e transportado pelos rins (Beyenbach et al., 1993; 1997; Randall et al., 1999; Prodocimo e Freire, 2001). Mau funcionamento dos rins prejudica também a reabsorção de compostos como cloreto de sódio (NaCl), açúcares e aminoácidos (Cliff et al., 1986; Freire et al., 1995; Jobling, 1995) e também o transporte ativo secundário de cloreto, o qual é dependente dos gradientes de sódio gerados pela $Na^+-K^+-ATPase$ (Beyenbach, 1995). Substâncias ou situações que afetam os rins prejudicam ainda a excreção de produtos nitrogenados e ácidos orgânicos (Cliff et al., 1986; Jobling, 1995), além da manutenção do equilíbrio ácido-básico (e.g. ArasHisar et al., 2004; Souza-Bastos e Freire, 2009).

Estressores muitas vezes afetam a homeostasia por terem efeito direto sobre determinadas enzimas atuantes na manutenção da homeostasia. Uma dessas enzimas é a anidrase carbônica (AC). Diferentemente de outras proteínas relacionadas com o transporte iônico que se mostram tecido ou espécie - específica, a anidrase carbônica tem sido encontrada em diferentes organelas celulares e tecidos, desde os grupos mais basais como as cianobactérias unicelulares até mamíferos (revisado em Henry, 1996). Em peixes a AC é considerada uma enzima multifuncional com diversos papéis fisiológicos, tais como: trocas gasosas, íon e osmorregulação, excreção de restos nitrogenados (amônia) e equilíbrio ácido-base. Esses processos são intimamente relacionados e dependentes da reação reversível de hidratação do CO₂, responsável pelo processo de formação de bicarbonato e hidrogênio (HCO₃⁻ e H⁺), reação catalisada pela AC (revisado em Henry, 1996; Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000; Henry e Swenson, 2000; Monserrat et al., 2007). Esta enzima está presente tanto no epitélio branquial quanto no renal (e.g., Henry, 1996; Georgalis et al., 2006; Perry e Gilmour, 2006). A inibição da AC pode retratar os efeitos ambientais, sendo considerado um bom marcador para detectar efeitos da exposição aos poluentes químicos em organismos aquáticos (ArasHisar et al., 2004; Monserrat et al., 2007; Souza-Bastos e Freire, 2011). Apesar disso, poucos estudos utilizam esta enzima como biomarcador em peixes. Já foi caracterizado que as sulfonamidas como: acetazolamida, metazolamida, etoxizolamida e diclorofenamida (Maren e Sanyal, 1983; Supuran et al., 2003; Innocenti et al., 2004); amônia e uréia (ArasHisar et al., 2004); metais como prata, cobre, zinco (Skaggs e Henry, 2002) e cádmio (Lionetto et al., 1998); ânions inorgânicos como: cianeto, cianato, tiocianato, azida e sulfureto de hidrogênio (Maren e Sanyal, 1983; Innocenti et al., 2004) inibem a atividade desta enzima em peixes em ambos os tecidos (branquial e renal). Em especial, a atividade da AC branquial mostrou-se sensível à exposição crônica de peixes estuarinos a hidrocarbonetos de petróleo (Souza-Bastos

e Freire, 2011) e no jundiá, a aumentos de salinidade (Souza-Bastos e Freire, 2009), corroborando assim sua relevância como biomarcador.

Além da detecção de alterações no líquido extracelular e na atividade de enzimas responsáveis pela homeostasia, a detecção de danos oxidativos também contribui para a compreensão dos efeitos de estressores ambientais (Lima e Abdalla, 2001; Wilhelm Filho et al., 2001, Zikic et al., 2001; Dorval et al., 2003; Pandey et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Gül et al., 2004; Almeida et al., 2005; Ferreira et al., 2005; Monserrat et al., 2007). Desbalanço oxidativo (ou estresse oxidativo) é gerado por radicais livres, também chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO), como por exemplo: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), ou por espécies reativas de nitrogênio (ERN), como por exemplo: peroxinitrito ($ONOO^-$), óxido nítrico ($^{\bullet}NO$) e o radical dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$), os quais podem levar a processos de peroxidação de lipídios. A lipoperoxidação (LPO) consiste em um efeito citotóxico primário causado por radicais livres, os quais geram oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, presentes nas membranas biológicas (Lima et al., 2001; Pandey et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Gül et al., 2004; Hermes-Lima, 2004; Monserrat et al., 2007). A LPO pode causar inúmeros danos às células e suas funções e até mesmo ocasionar morte celular (Lima e Abdalla, 2001; Wilhelm Filho et al., 2001, Dorval et al., 2003; Hermes-Lima, 2004). O fígado é o órgão mais comumente afetado por diferentes tipos de contaminantes, por sua importância central no processo de detoxificação de compostos químicos em peixes. Esse processo ocorre através de mecanismos de seqüestro, transporte e excreção de contaminantes (e.g. van der Oost et al., 2003; Gül et al., 2004; Alquezar et al., 2006; Camargo e Martinez, 2007). É, portanto, o órgão mais freqüentemente avaliado quanto a aumentos na peroxidação de seus lipídios (Gül et al., 2004).

Por fim, alterações comportamentais que ocorrem em um organismo quando exposto a um estressor ajudam a interpretar as alterações fisiológicas e bioquímicas (revisado em

Fleeger et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006; Lürling e Scheffer, 2007; Monserrat et al., 2007; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Diversas fontes de estresse, tais como alterações na temperatura, salinidade, oxigênio dissolvido, concentração de compostos nitrogenados, de elementos químicos, poluentes, manipulação dos animais, densidade dos animais em tanques, entre outros, são capazes de alterar o padrão comportamental de um peixe (revisado em Fleeger et al., 2003; Portz et al., 2006). Alterações comportamentais podem, por exemplo, ser observadas na escolha de habitat, captura de presas ou fuga de predadores (revisado em Fleeger et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Assim, analisar em conjunto as respostas comportamentais e fisiológicas de um organismo a um determinado estressor permite relacionar os efeitos causados sobre o organismo com as suas conseqüências ecológicas (revisado em Fleeger et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Lürling e Scheffer, 2007; Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Uma avaliação de respostas de estresse torna-se satisfatória quando os 3 níveis de resposta a estressores são considerados (van der Oost et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Picado et al., 2007; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Para isso, nesta Tese, foram escolhidos alguns biomarcadores que buscam, basicamente, identificar alterações fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (desta forma, abrangendo os 3 níveis de respostas ao estresse), decorrentes da exposição de teleósteos a estressores naturais e xenobióticos (Figura 1).

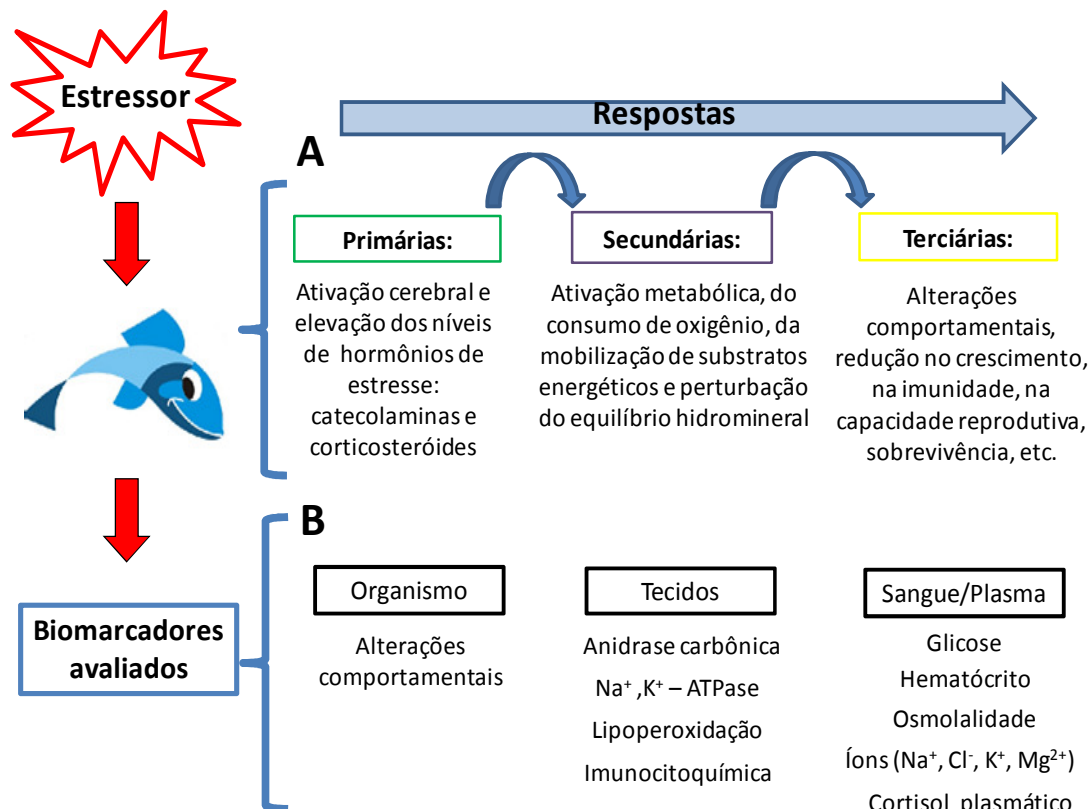


Figura 1. (A) Representação esquemática dos níveis de respostas ao estresse, classificadas em Primárias, Secundárias ou Terciárias e (B) Parâmetros (biomarcadores) avaliados nesta Tese. Esquema confeccionado com base nas revisões realizadas por Wendelaar Bonga (1997), van der Oost et al. (2003) e Portz et al. (2006).

***Rhamdia quelen*: o modelo para estudo em água doce**

Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard 1824) é popularmente chamado de jundiá, e pertence à ordem Siluriformes, família Heptapteridae (Figura 2). É um teleósteo dulcícola, nativo, endêmico da América do Sul (Gomes et al., 2000; Barcellos et al., 2004b; Borges et al., 2004). Distribui-se desde o sudeste do México até a região sul da Argentina (Bockmann e Guazzeli, 2003). Em ambiente natural essa espécie é geralmente encontrada em águas calmas, turvas, profundas, com fundo rochoso, de areia ou lama. Habita, geralmente, locais próximo a margem ou vegetação, onde se escondem entre troncos e pedras (Gomes et al., 2000; Silva et al., 2003; Baldisserotto e Radünz Neto, 2004; Schulz e Leuchtenberger, 2006). É uma espécie de hábito noturno, com acentuada aversão a luz, dotada de três pares de barbilhões os quais provavelmente são utilizados na percepção química e do ambiente (Gomes et al., 2000;

Baldisserotto e Radünz Neto, 2004; Schultz e Leuchtenberger, 2006). Apresenta porte médio, atinge cerca de 50 cm de comprimento e pode chegar a 3 kg (Barcellos et al., 2004a,b). Atinge sua maturidade sexual no primeiro ano de vida (Borges et al., 2005), apresentando desova parcelada com dois picos reprodutivos por ano, no verão e na primavera. Não apresenta cuidado parental (Borges et al., 2005).



Figura 2. Fotografia de espécime de *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824) utilizado como modelo para o estudo dos efeitos de contaminantes naturais e xenobióticos e de alterações nos fatores abióticos da água em ambiente de água doce. Barra de escala = 4 cm.

Essa espécie tem despertado grande interesse econômico e comercial. Sua produção no Brasil atingiu um total de 547 toneladas em 2004, o que representa apenas 0,2% do total da produção nacional em aqüicultura (Boscardin, 2008). Devido a isso, essa espécie é considerada a espécie nativa mais adaptada e de maior representatividade em cultivo intensivo (Gomes et al., 2000; Camargo et al., 2006). O crescimento de sua utilização em viveiros de piscicultura está principalmente no sul do Brasil (e.g. Barcellos et al., 2001; Golombieski et al., 2003; Barcellos et al., 2004a,b; Carneiro et al., 2005; Crestani et al., 2006; Schulz e Leuchtenberger, 2006; Crestani et al., 2007; Cattaneo et al. 2008; Miron et al., 2008; Souza-Bastos e Freire, 2009). Dentre os diversos motivos apontados para esse interesse estão: 1) a sua fácil adaptação e desenvolvimento em habitats variados, com bom desenvolvimento em qualquer região com clima subtropical ou temperado (Behr et al., 1999; Zaions e Baldisserotto, 2000; Barcellos et al., 2004a,b; Lermen et al., 2004; Borges et al., 2005; Miron et al., 2005; Carneiro

et al., 2005), 2) seu hábito alimentar onívoro e grande adaptabilidade a dietas (Behr et al., 1999; Gomes et al., 2000; Zaions e Baldisserotto, 2000; Carneiro e Mikos, 2005, Schultz e Leuchtenberger, 2006), 3) a facilidade no seu manejo e criação (Behr et al., 1999; Zaions e Baldisserotto, 2000; Camargo et al., 2006), 4) altas taxas de fertilização e crescimento (Gomes et al., 2000; Borges et al., 2005; Barcellos et al., 2006), 5) boa aceitação de sua carne devido a ausência de espinhos intramusculares e sabor diferenciado (Carneiro e Mikos, 2005; Camargo et al., 2006), 6) sua utilização em prática de pesca esportiva (Carneiro et al., 2002; Carneiro et al., 2005; Baldisserotto e Radünz Neto, 2004), e principalmente o reconhecimento da espécie como alternativa ao cultivo de espécies exóticas (Schultz e Leuchtenberger, 2006).

Com o crescimento da utilização desta espécie em cultivos, tem crescido também o interesse dos pesquisadores das mais diversas áreas. A maioria das pesquisas realizadas com esta espécie está relacionada ao processo de criação, por exemplo: 1) reprodução e desenvolvimento (Borges et al., 2005; Barcellos et al., 2006), 2) influência da composição da dieta na saúde e crescimento (Meyer e Fracalossi, 2004; Camargo et al., 2005; Carneiro e Mikos, 2005; Becker et al., 2006); 3) estresse de transporte, manipulação e captura (Barcellos et al., 2001; Barcellos et al., 2004a, b; Barcellos et al., 2006; Golombieski et al., 2003); 4) densidade de cultivo (Barcellos et al., 2004b); 5) tratamentos para parasitoses (Carneiro et al., 2005; Garcia et al., 2007), 6) comportamento e preferência de habitat (Schultz e Leuchtenberger, 2006; Kochhann et al., 2009). Além disso, existem estudos sobre os efeitos de variações abióticas sobre a espécie, a saber: 1) temperatura (Golombieski et al., 2003; Piedras et al., 2004; Lermen et al., 2004; Lermen et al., 2005); 2) pH (Zaions e Baldisserotto, 2000; Ferreira et al., 2001; Copatti et al., 2005); 3) salinidade (Marchioro e Baldisserotto; 1999; Camargo et al., 2006; Vargas e Bessonart, 2007; Souza-Bastos e Freire, 2009); 4) oxigênio dissolvido (Braun et al., 2006); 5) luminosidade (Behr et al., 1999). Estes estudos buscam a redução de práticas potencialmente estressantes e não rentáveis para o cultivo, utilizando as

informações obtidas como modelo para o melhoramento da prática para esta e outras espécies. A espécie também tem sido muito utilizada em estudos de efeitos de contaminantes aquáticos em laboratório (Miron et al., 2005; Crestani et al., 2006; 2007; Gluszczak et al., 2007; Cericato et al., 2008; Melo et al., 2008; Cericato et al., 2009; Kochhann et al., 2009). Porém, apesar de ser uma espécie nativa, de grande importância econômica e ecológica, e de ser encontrada em diversos rios da região sul, a mesma tem sido pouco utilizada em estudos de toxicidade *in situ* (Becker et al., 2009).

Esta espécie foi utilizada como modelos nos Capítulos 1, 2, 3, 4 e 5, analisando-se sua resposta a fatores estressantes, conforme o esquema da Figura abaixo (Figura 3). Nesta Tese o jundiá foi estudado através de ampla gama de enfoques: desde a avaliação das suas respostas quando colocado em gaiolas em ambiente natural com diferentes níveis de impacto antrópico (Capítulo 1), passando pela análise do efeito das águas de ambientes impactados sobre seu comportamento em laboratório (Capítulo 2), e a participação de substância de alarme de sua pele sobre seu comportamento (Capítulo 3), até estudos dos efeitos isolados da amônia e do sal na água sobre sua fisiologia (Capítulos 4 e 5, respectivamente).

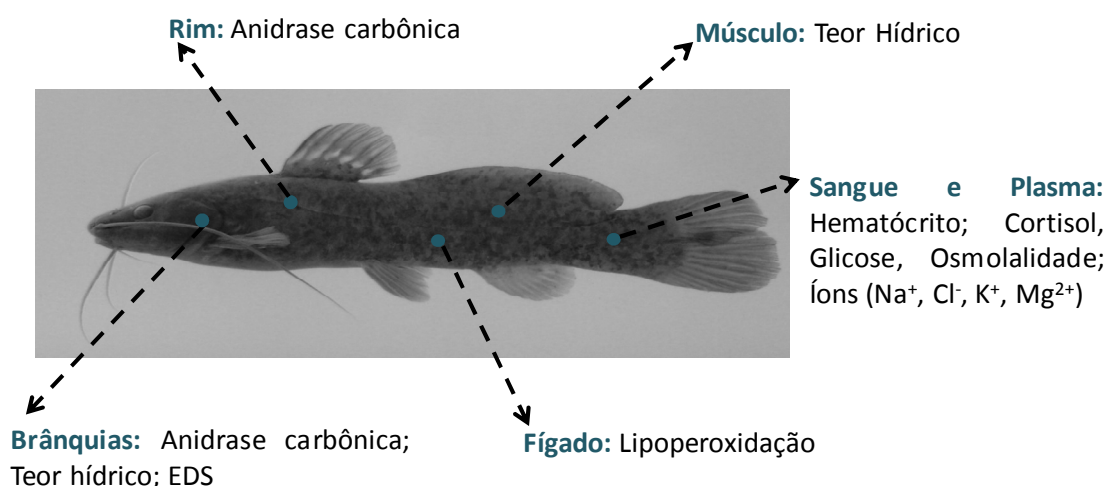


Figura 3. Figura representativa dos parâmetros avaliados no sangue e plasma; brânquias, fígado, rim e músculo de *Rhamdia quelen*, durante os capítulos 1, 2, 3, 4 e 5. EDS = espectroscopia por dispersão de energia.

***Lipophrys pholis*: o modelo para estudo dos efeitos da amônia em peixe anfíbio de entre-marés**

O peixe *Lipophrys pholis* (Linnaeus, 1758), pertencente à subordem Blennioidei, família Blenniidae (Figura 4) (Graham, 1997), é um teleósteo marinho, residente em regiões de entre-marés. A fase de mobilidade da espécie se dá somente durante o período de recrutamento larval, após este período restringem sua área de vida para os costões rochosos onde comumente colonizam fendas (Davenport e Sayer, 1986; Graham, 1997). Estes peixes possuem ampla distribuição geográfica, em regiões litorâneas de zonas tropicais e temperadas. São encontrados da Mauritânia a Noruega, incluindo os Açores e o Mediterrâneo; são bastante abundantes e de fácil amostragem (Davenport e Sayer, 1986; Stefanni et al., 2006; Lima et al., 2008; Ferreira et al., 2009).

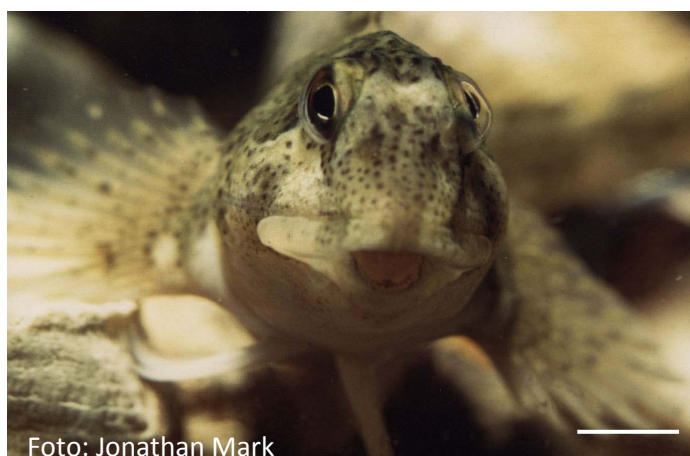


Figura 4. Fotografia de espécime de *Lipophrys pholis* (Linnaeus, 1758) utilizado como modelo para o estudo dos efeitos da amônia em situações de desafio fisiológico em ambiente de entre-marés. Barra de escala = 2 cm.

Estes blenídeos apresentam comportamento parental e de defesa territorial (Graham, 1997). Esta espécie é muito importante no que diz respeito à dinâmica de regiões entre-marés dos ecossistemas europeus (Francisco et al., 2006; Lima et al., 2008; Ferreira et al., 2009). Apresenta grande capacidade de regulação osmótica, sendo caracterizada como espécie bastante eurihalina, o que seria mesmo esperado por causa do seu habitat, marinho de entre-

marés (House, 1963). São peixes de comportamento diurno, que descansam durante a noite expostos ao ar (Davenport e Sayer, 1986; Graham, 1997). São considerados peixes anfíbios por apresentarem respiração aérea durante os períodos de emersão, principalmente ao longo dos ciclos de maré (Laming et al., 1982; Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987). *L. pholis* pode sobreviver emerso em um ambiente de alta umidade por até 5 dias (Davenport e Sayer, 1986; Graham, 1997), período em que mantém a excreção de produtos nitrogenados (Davenport e Sayer, 1986; Graham, 1997). Estudos indicam a pele como a principal “válvula de escape” na ausência da função branquial, devido sua alta vascularização (Davenport e Sayer, 1986; Graham, 1997; Sayer, 2005; Saha e Ratha, 2007). Para absorção de O₂, descobriu-se que blenídeos também tem a capacidade de “engolir” o ar, mantendo-o no esôfago, onde existem numerosos capilares próximos à superfície desse órgão (Graham, 1997). Por conta destas características peculiares, sua ecologia e comportamento têm sido freqüentemente estudados (Francisco et al., 2006; Lima et al., 2008; Ferreira et al., 2009). Adicionalmente estes peixes têm sido ainda considerados como bons representantes das condições ambientais locais. Por serem residentes, ficam expostos aos poluentes, sendo por este motivo apontados, também, como espécie sentinela em estudos de toxicologia (Lima et al., 2008; Solé et al., 2008; Ferreira et al., 2009). No Capítulo 6 avaliamos o efeito da amônia sobre esta espécie, quando exposta a desafios fisiológicos como: exposição ao ar, redução de salinidade e aumento nas concentrações de amônia externa e interna, conforme esquema a seguir (Figura 5).

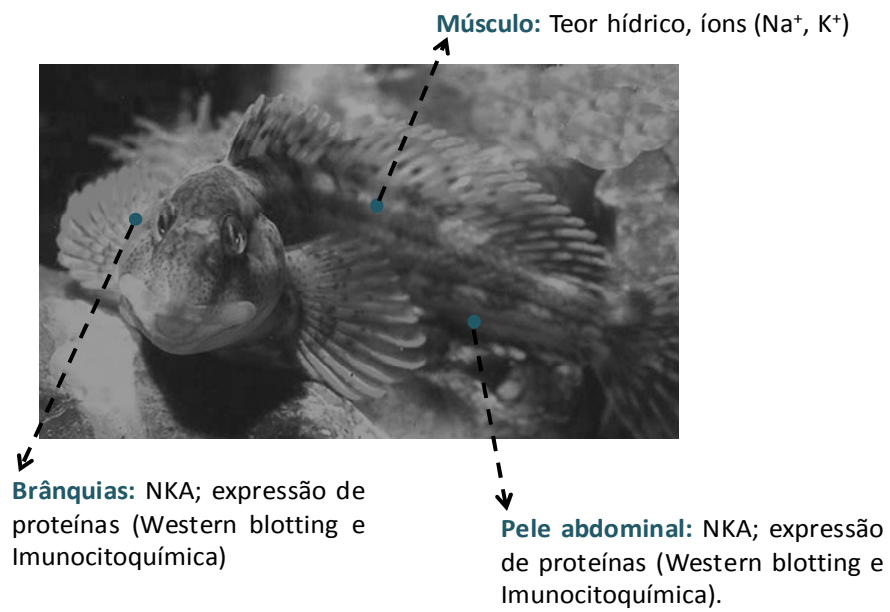


Figura 5. Figura representativa dos parâmetros avaliados nas brânquias, pele abdominal e músculo de *Lipophrys pholis*, durante o capítulo 6. NKA = atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase.

Objetivos Gerais

- Avaliar os efeitos de componentes tóxicos naturais ou xenobióticos, resultantes do crescimento urbano e industrial sobre a fisiologia de uma espécie de teleósteo de água doce de interesse comercial para aqüicultura, através de estudos *in situ* (Capítulo 1);
- Avaliar os efeitos desses contaminantes sobre as respostas comportamentais dessa espécie (Capítulo 2), relacionando através das respostas encontradas os possíveis impactos ecológicos dessa contaminação; bem como verificar a capacidade de interação intra e inter-específica de *R. quelen* (Capítulo 3);
- Avaliar a influência de elementos naturais, como salinidade e aumento da concentração de compostos nitrogenados sobre a fisiologia de espécies de teleósteos de água doce (Capítulos 4 e 5) e de água salgada (Capítulo 6), através de testes em laboratório.

Capítulo I: Avaliação da qualidade da água da Bacia do Rio
Iguaçu, Alto Rio Iguaçu, através da exposição *in situ* de *Rhamdia*
quelen

Sumário

Resumo.....	24
Abstract	25
1. Introdução	26
2. Objetivos	29
3. Materiais e Métodos	30
3.1. Caracterização dos Pontos Amostrados.....	30
3.2. Desenho Experimental	34
3.3. Obtenção e Processamento das Amostras	35
3.4. Análise das Amostras	36
3.4.1 Dosagem Sanguínea	36
3.4.2. Dosagens Plasmáticas	37
3.4.3. Dosagens em tecidos.....	38
3.5 Análises Estatísticas.....	41
4. Resultados	42
Mortalidade.....	42
Comparação entre os peixes do Ponto referência nas condições com e sem gaiolas.....	42
Determinação do Hematócrito, Osmolalidade e Concentrações iônicas (Na ⁺ , Cl ⁻ , K ⁺ e Mg ²⁺) do plasma	43
Determinação do Teor Hídrico e da Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica	47
Determinação dos Marcadores de Estresse (Cortisol e Glicose Plasmáticos) e Lipoperoxidação no Fígado	50
5. Discussão	53
6. Conclusão	65
7. Referências Bibliográficas	66

Resumo

Aumento do crescimento industrial, urbano e agrícola com conseqüente poluição e impactos sobre ecossistemas aquáticos são focos de pesquisa em todo o mundo. Apesar disso, ainda são raros os estudos que avaliam os impactos dessa contaminação por meio de estudos in situ, utilizando espécies nativas, e principalmente considerando a influência da sazonalidade sobre a dinâmica dos poluentes e respostas dos organismos. Devido a isso, este estudo teve como objetivo avaliar a qualidade da água da Bacia do Alto Rio Iguaçu, principal mantenedora do abastecimento público de Curitiba e sua Região Metropolitana, através da determinação de alterações fisiológicas e bioquímicas do bagre nativo, *Rhamdia quelen*. Para isso, foram determinados 10 pontos ao longo dessa bacia, correspondentes às regiões a montante, a jusante além da grande Curitiba, escolhidos com base em um gradiente de contaminação, onde os animais foram expostos in situ, por 7 dias, nas estações de verão e inverno. A mistura complexa de contaminantes existente nessa bacia hidrográfica gerou mortalidade, além de distúrbios íon-osmorregulatórios e respiratórios nos jundiás. Esses distúrbios foram caracterizados pela redução da osmolalidade e concentração iônica, aumento nos níveis de hematócrito, do teor hídrico branquial e da atividade da enzima anidrase carbônica branquial e renal, assim como dos níveis de cortisol e glicose no plasma. Através desses resultados corroborou-se a existência de um gradiente de contaminação entre os pontos avaliados, com impactos mais significativos nos peixes expostos às regiões da Grande Curitiba e a sua jusante. Adicionalmente, verificou-se grande influência da sazonalidade sobre as respostas dos organismos. Assim, a espécie e os parâmetros avaliados, podem satisfatoriamente serem utilizados na avaliação de ambientes que apresentem contaminação por misturas complexas de contaminantes.

Abstract

Increase in industrial growth, urban and agricultural pollution, with consequent impacts on aquatic ecosystems are a focus of research worldwide. Nevertheless, there are few studies assessing the impacts of this contamination through in situ studies, using native species, especially considering the influence of seasonality on the dynamics of pollutants and responses of organisms. Because of this, this study aimed to evaluate the water quality of the basin of the Upper Iguaçu River, the main sponsor of the public supply of Curitiba and its Metropolitan area, through the determination of physiological and biochemical alterations of catfish native *Rhamdia quelen*. For this, 10 points were determined along the basin, corresponding to the regions upstream, downstream and beyond the large Curitiba, chosen based on a gradient of contamination, where the animals were exposed in situ, for 7 days, in Summer and Winter. The complex mixture of contaminants exist in this hydrografic basin generated mortality, while ion-osmoregulatory and respiratory disturbances in the catfishes. These disorders are characterized by reduction of osmolality and ionic concentration, increased hematocrit levels, gill water content and branquial and renal activity of the enzyme carbonic anhydrase, as well as the levels of cortisol and glucose in plasma. Through these results confirmed the existence of a gradient of contamination between the points evaluated, with more significant impacts on fish exposed to the Greater Curitiba and its downstream. Additionally, there was great influence of seasonality on the responses of organisms. Thus, the species and the parameters can be satisfactorily used to evaluate contamination environments with complex mixtures of contaminants.

1. Introdução

Descargas de poluentes com conseqüente redução da diversidade biológica são os principais problemas encontrados em ecossistemas aquáticos de todo o mundo. Esses problemas estão se tornando cada vez maiores devido ao contínuo crescimento urbano, industrial e agrícola (Pacheco e Santos, 2001; van der Oost et al., 2003; Abilhoa e Boscardin, 2004; Sofia et al., 2006; Camargo e Martinez, 2007; Silva e Martinez, 2007; Fontainhas-Fernandes et al., 2008; Becker et al., 2009). O impacto dessa contaminação sobre a biota aquática tem sido avaliado cada vez mais por testes de toxicidade através de estudos de campo, por meio de peixes obtidos de locais contaminados (e.g. Winkaler et al., 2001; Camargo e Martinez, 2006; Sofia et al., 2006; Camargo e Martinez, 2007; Silva e Martinez, 2007; Becker et al., 2009). Porém, apesar de existirem inúmeros estudos de avaliação dos impactos de determinados contaminantes em ambientes aquático, poucos são aqueles focados em avaliações *in situ* (e.g. Soimasuo et al., 1995; Stien et al., 1998; Pacheco e Santos, 2001; Camargo e Martinez, 2006; 2007; Becker et al., 2009). Em especial, são raras as avaliações de ecossistemas tropicais que utilizem espécies nativas (Camargo e Martinez, 2006; 2007; Becker et al., 2009). Estudos *in situ* permitem a caracterização dos efeitos tóxicos aos organismos de maneira realista e direta, fornecendo informações precisas que dificilmente seriam identificadas em laboratório. Por exemplo, pode-se citar a influência das características ambientais e sazonais e da real magnitude e tempo de exposição ao agente tóxico sobre as respostas dos animais (Soimasuo et al., 1995; Camargo e Martinez, 2006; 2007; revisado em van der Oost et al., 2003; Oikari, 2006; Magalhães e Ferrão-Filho, 2008). Adicionalmente, estudos *in situ* demonstram não somente a fase inicial da resposta biológica, comumente identificada em laboratório, mas também os mecanismos adaptativos e compensatórios, apresentando assim maior relevância ecológica (Soimasuo et al., 1995; Camargo e Martinez, 2006; revisado em Oikari, 2006; Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

Avaliações toxicológicas são caracterizadas pela observação de respostas fisiológicas, bioquímicas, histológicas, comportamentais, alterações na reprodução e desenvolvimento (Stien et al., 1998; Winkaler et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Martinez et al., 2004; Gül et al., 2004; Almeida et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006; 2007; Silva e Martinez, 2007). Estas observações, aliadas à avaliação da qualidade da água e do uso de gaiolas para a submissão de organismos às reais condições do ambiente (revisado em Oikari, 2006; Magalhães e Ferrão-Filho, 2008), são essenciais para determinação dos efeitos da contaminação gerada por efluentes urbanos e industriais, os quais representam, em geral, uma mistura complexa de compostos (Winkaler et al., 2001; Pacheco e Santos, 2001; Pandey et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Ferreira et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006; 2007; Magalhães e Ferrão-Filho, 2008).

A bacia do Rio Iguaçu possui 72 mil km² de extensão, e tem aproximadamente 79% de sua área de drenagem dentro do estado do Paraná (Maack, 1981; Abilhoa e Boscardin, 2004). Neste estado ela é dividida em trechos: Alto, Médio e Baixo Iguaçu (Ingenito et al., 2004). A bacia do Alto Rio Iguaçu, apesar de não ter seus limites formalmente delimitados, compreende o primeiro planalto paranaense (Maack, 1981; Abilhoa e Boscardin, 2004; Ingenito et al., 2004; Abilhoa, 2005). Possui 9 mil km², onde encontram-se os mananciais responsáveis por aproximadamente 62% da água utilizada no abastecimento público de Curitiba e Região Metropolitana (Andreoli et al., 1999; Abilhoa e Boscardin, 2004). O trecho do Alto Rio Iguaçu detém cerca de 60% da população que compõe a região metropolitana de Curitiba (Abilhoa e Boscardin, 2004), a qual é composta por 26 municípios, com um número aproximado de 3,2 milhões de habitantes (IBGE, 2007). Em função da grande urbanização, do ainda intenso crescimento demográfico e industrial de Curitiba e sua região metropolitana, o Rio Iguaçu é considerado o segundo rio mais poluído do Brasil (IBGE, 2008). O Alto Rio Iguaçu possui originalmente um baixo número de espécies de peixes (em torno de 47), quando comparado

com os outros rios que compõem a bacia do rio Paraná (Abilhoa e Boscardin, 2004; Ingenito et al., 2004; Abilhoa, 2005). Apesar da baixa diversidade, detém cerca de 50% das espécies de peixes registradas para toda a Bacia do Rio Iguaçu, onde as ordens dominantes são Characiformes e Siluriformes (Ingenito et al., 2004). Porém, por causa da contaminação e da alteração ambiental nesta região, a mesma já apresenta redução na abundância de sua fauna. Esta condição, aliada ao alto grau de endemismo (aproximadamente 80%) da fauna de peixes do Rio Iguaçu, leva a aumento no risco de extinção de espécies (Abilhoa e Boscardin, 2004; Ingenito et al., 2004), haja vista que o número de espécies ameaçadas nesta região já é significativo (Abilhoa e Duboc, 2004).

A espécie *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) pertence à ordem Siluriformes (família Heptapteridae) é uma espécie nativa de ampla distribuição geográfica neotropical, desde o sudeste do México até a região sul da Argentina (Bockmann e Guazzelli, 2003). No Brasil, esta espécie despertou maior interesse econômico e comercial na região sul do país, onde tem sido intensamente utilizada em viveiros de piscicultura (e.g. Barcellos et al., 2001; 2004; Crestani et al., 2006; 2007). Por ser uma espécie nativa e de grande importância econômica, a mesma tem sido utilizada em vários estudos de efeitos de contaminantes aquáticos (e.g. Crestani et al., 2006; 2007; Cericato et al., 2008; 2009; Becker et al., 2009), porém, são raros os estudos realizados com esta espécie para avaliação de impactos ambientais *in situ* (e.g. Becker et al., 2009).

Estudar *in situ* as alterações apresentadas por espécies nativas diante da contaminação ambiental de ecossistemas tropicais é de suma importância para a compreensão dos efeitos da contaminação para essas espécies nessas regiões. Adicionalmente, apesar da Bacia do Alto Rio Iguaçu ser a principal mantenedora do abastecimento público da cidade de Curitiba e região metropolitana, nenhum estudo ecotoxicológico, até o presente momento, foi desenvolvido nesta região.

2. Objetivos

- Avaliar o impacto antrópico sobre a Bacia do Alto Rio Iguaçu utilizando como bioindicador a espécie *Rhamdia quelen*;
- Inferir sobre os principais efeitos da contaminação desta área sobre esta espécie e comunidade ictiológica local.

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização dos Pontos Amostrados

Foram escolhidos dez pontos de amostragem na Bacia do Alto Rio Iguaçu, que abrange Curitiba e sua Região Metropolitana, os quais incluíam os três reservatórios de abastecimento público e os principais rios formadores da Bacia. Os pontos foram escolhidos com base em uma possível escala crescente de contaminação e impacto antrópico, e divididos em três regiões: Montante da Grande Curitiba, Grande Curitiba e Jusante da Grande Curitiba (Figura 6). Foram considerados como ambientes degradados aqueles que além de fontes de contaminação apresentavam problemas de deterioração ou alteração das condições ambientais.

Pontos à Montante da Região Metropolitana de Curitiba:

Ponto 1 – Reservatório do Piraquara I (RPI 1): Também chamado de **Piraquara I**, é apontado como o ponto de menor contaminação, por se tratar de um reservatório para abastecimento público e estar localizado próximo as cabeceiras de seus rios formadores, em área de pouquíssima ocupação e atividade antrópica (Andreoli et al., 1999). Porém, este reservatório já foi classificado como moderadamente degradado (IAP, 2004).

Ponto 2 – Rio Piraquara (RPI 2): Hoje constitui a Represa do **Piraquara II**. Durante o período de colocação e retirada das gaiolas ainda estava em construção. Apresenta características lólicas, com bom volume e qualidade da água em conseqüência da proximidade com o reservatório Piraquara I. Esta região ainda pouco ocupada se caracteriza pela presença de algumas chácaras e haras (Andreoli et al., 1999). Essa região foi considerada como pouco degradada (IAP, 2005).

Ponto 3 – Reservatório do Iraí (RIr): É o principal manancial (reservatório para abastecimento público de Curitiba e Região Metropolitana), localizado entre cinco municípios da região metropolitana de Curitiba (Pinhais, Piraquara, Quatro Barras, Colombo, Campina Grande do

Sul). Trata-se de um reservatório novo, de profundidade média (apenas 6 metros), e que durante sua construção teve grande quantidade de matéria orgânica inundada. Por este motivo apresenta ampla proliferação de algas tóxicas em determinadas épocas do ano. Devido à sua localização, muito próximo das principais cidades da região metropolitana de Curitiba, essa região possui grande impacto da urbanização, caracterizado pelo lançamento de esgotos domésticos, industriais, de fertilizantes agrícolas, incluindo os efluentes de produção de suínos. Esse impacto soma-se a degradação gerada por atividades de mineração, que ocorre na cabeceira do rio Currealinho, um dos formadores do Iraí; pela atividade industrial que ocorre na bacia do Capivari e também pela intensa exploração agrícola, em específico da Colônia Faria, a qual apesar de não fazer uso intensivo de agrotóxicos, contribui juntamente com as outras atividades para o impacto significativo na região (Andreoli et al., 1999). A classificação deste reservatório é de moderadamente a criticamente degradado, com possível mortalidade de peixes em determinados períodos do ano (IAP, 2004).

Pontos na Região Metropolitana de Curitiba:

Ponto 4 – Piscicultura (Referência-Gaiolas, Ref): O tanque de criação do LAPEP foi escolhido como um dos pontos de amostragem por ser o local onde os peixes foram adquiridos. Neste ponto os peixes foram amostrados diretamente do tanque de criação (sem gaiola) e também após serem submetidos às gaiolas por uma semana, recebendo assim o mesmo tratamento dos peixes colocados nos outros 10 pontos.

Ponto 5 – Reservatório do Passaúna (RPa): É um reservatório que apresenta uma profundidade média razoável. Dos três reservatórios, este apresenta a maior transparência da água. Eventualmente, apresenta proliferação de algas tóxicas devido ao aporte de matéria orgânica resultante do aumento da ocupação urbana das cidades de Curitiba e Campo Largo. Adicionalmente, a cidade de Campo Largo possui intensa atividade industrial e agrícola, cujo

principal produto cultivado é a batata (Andreoli et al., 1999). Sua classificação com relação a qualidade da sua água é moderadamente degradado (IAP, 2004).

Ponto 6 – Rio Miringuava (RMi): É localizado no município de São José dos Pinhais. Apresenta boa condição de preservação, mas já apresenta características decorrentes da pressão antrópica, em especial do desmatamento e atividade agrícola e de extração de areia. A principal colônia agrícola ao redor deste rio, a Colônia Muricy, desenvolve agricultura convencional com o uso intensivo de agrotóxicos. Adicionalmente, na região mais a jusante, apresenta grande ocupação urbana, a qual é reflexo da expansão da cidade de São José dos Pinhais e de várias indústrias de grande porte neste município (Andreoli et al., 1999). A classificação estabelecida para este rio entre os anos de 1992 a 2005 foi de medianamente a pouco poluída (IAP, 2005).

Ponto 7 – Zaniolo (Zan): É um complexo de cavas de extração de areia abandonado, localizado às margens do Rio Iguaçu, no município de São José dos Pinhais, em uma área antigamente ocupada por uma madeireira.

Ponto 8 – Parque Zoológico de Curitiba (Zoo): Este ponto é localizado dentro do Parque Municipal de Curitiba (Zoológico), marginal ao leito do rio Iguaçu. Essa região é composta por lagos oriundos de escavações de extração de areia (complexo de cavas semelhante ao do ponto Zaniolo). É um local cercado por ocupações irregulares que deposita grande carga de efluentes domésticos e da criação de animais diretamente na água do rio. Esse ponto sofre ainda com a descarga de efluentes provenientes de uma grande oficina mecânica ferroviária à sua montante. A água do rio Iguaçu que abastece estas cavas, segundo o órgão ambiental responsável, foi considerada entre os anos de 1992 a 2005 como poluída (IAP, 2005). Além disso, por se tratarem de cavas (escavações), o fluxo de água é bastante baixo, com renovação de água apenas em período de intensa chuva.

Ponto 9 – Rio Barigui (PBa): É localizado dentro do lago formado pelo represamento do rio em um parque da cidade de Curitiba (Parque Barigui). Este lago foi criado com a finalidade de controle de cheias e decantação dos sólidos suspensos. Hoje é uma região muito contaminada por efluentes domésticos (esgoto), por efluentes de uma fábrica de papel à montante, e por chorume proveniente de um cemitério às margens do Rio Barigui. Essa região foi classificada como criticamente degradada a muito poluída (IAP, 2004; 2005).

Ponto à Jusante da Região Metropolitana de Curitiba

Ponto 10 – Rio Guajuvira (Gua): Este ponto está localizado no Rio Iguaçu no município de Araucária, à jusante de sua região urbana e industrial. Além disso, esta região recebe todo o efluente da cidade de Curitiba. Apresenta, desta forma, baixos índices de oxigênio dissolvido e grande contaminação por material orgânico e inorgânico. Sua classificação entre os anos de 1992 a 2005 variou entre muito poluído e poluído (IAP, 2005).

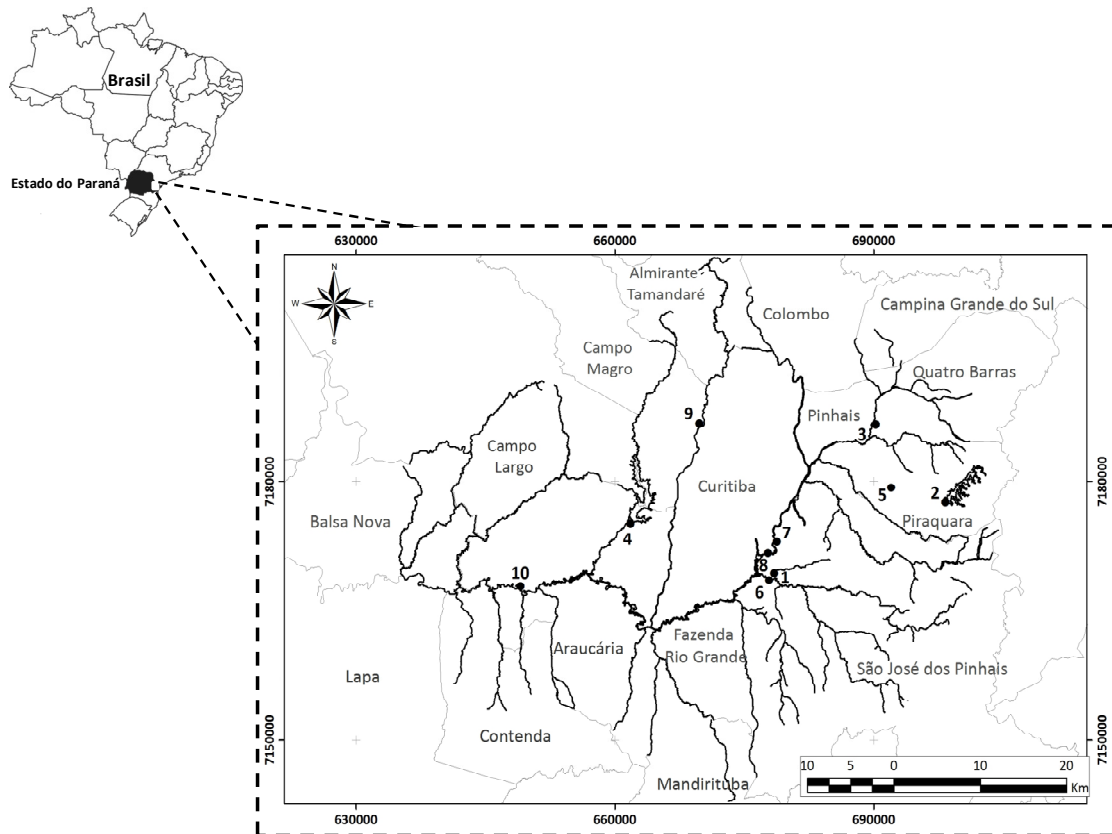


Figura 6. Mapa do Brasil com a localização do Estado do Paraná (em preto), e em destaque a Bacia do Alto Rio Iguaçu, que abrange Curitiba e sua Região Metropolitana. Os círculos pretos com números ao lado correspondem aos dez pontos amostrados, de acordo com um gradiente de contaminação: 1 – Represa do Piraquara I (RPI 1); 2 – Rio Piraquara (hoje Represa do Piraquara II, RPI 2); 3 – Reservatório do Iraí (Rir); 4 – Referência (Ref); 5 – Reservatório do Passaúna (RPa); 6 – Rio Miringuava (RMI); 7 – Zaniolo (Zan); 8 – Zoológico (Zoo); 9 – Rio Barigui (PBA); 10 – Guajuvira (Gua).

3.2. Desenho Experimental

Os juvenis de jundiás ($19,6 \pm 0,3$ cm; $64,9 \pm 1,9$ g, $n=220$) utilizados neste estudo foram obtidos dos tanques de criação do Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LAPEP, PUC-PR), localizado no município de São José dos Pinhais, Paraná, nos meses de fevereiro, março e julho de 2007. Estes peixes foram divididos em grupos de 10 peixes, para serem distribuídos por 10 pontos ao longo da bacia do Alto Rio Iguaçu, nas estações de verão e de inverno. A distribuição das gaiolas nos pontos foi realizada ao longo de 5 dias, ou seja, dois pontos por dia. Não ocorreu mortalidade nem sinais aparentes

de estresse (como por exemplo: alteração no padrão de natação, na respiração e na coloração da pele) durante o transporte. Cada ponto recebeu 1 gaiola (125 L) de estrutura metálica revestida com tela plástica de malha 0,5X0,5 cm, a qual permitia o fluxo de água para dentro das gaiolas. As gaiolas foram mantidas nos pontos pelo período de uma semana. Adicionalmente, um grupo de 10 jundiás foi também mantido em tanque de criação no LAPEP, como grupo referência, porém sem gaiolas, em ambas as estações.

A colocação e retirada das gaiolas ocorreram sempre no período da manhã. Vários parâmetros abióticos foram medidos nos pontos de coleta, tanto no momento de colocação das gaiolas quanto no momento de sua retirada: temperatura e umidade relativa do ar, temperatura, pH, oxigênio dissolvido e transparência da água (Apêndice 1). Além destas variáveis, foram obtidos do Instituto Ambiental do Paraná (IAP) e do Instituto para o Desenvolvimento do Meio Ambiente (LACTEC) dados de parâmetros físico-químicos: condutividade, alcalinidade total, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), fósforo total, nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-), nitrogênio amoniacal e kjeldhal, clorofila a; e do SIMEPAR dados de pluviosidade, de cada um dos pontos em ambas as coletas (Apêndice 1). Ao final do período de exposição de uma semana, os animais foram retirados das gaiolas, transferidos para baldes identificados (50 L) com água do local e aeração constante, até serem levados ao Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da PUC, onde foram processados, com tempo de transporte variando entre 10-60 min, de acordo com a distância do ponto. É válido ressaltar que os animais do ponto referência também foram transportados (~15 min) dentro da piscicultura, evitando assim que seus níveis basais de estresse fossem inferiores ao padrão de todos os outros pontos avaliados, por causa do transporte.

3.3. Obtenção e Processamento das Amostras

No Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da PUC, os animais foram individualmente anestesiados (total ausência de reações a estímulos de toque) com benzocaína (80mg/L, ~ 2

minutos). Em seguida, os animais foram medidos (comprimento total), pesados (peso total) e tiveram sangue retirado por punção da veia caudal através de seringas de insulina heparinizadas. Esse sangue foi acondicionado em tubo *ependorf*, de onde uma pequena porção foi coletada através de tubos capilares heparinizados para a determinação do hematócrito. O restante do sangue foi centrifugado (5 min, 3.000 xg, temperatura ambiente) para a obtenção do plasma, que foi congelado em freezer -20°C até a utilização nos ensaios plasmáticos (osmolalidade, íons, glicose, cortisol). Imediatamente, os peixes foram mortos por secção medular e tiveram suas cavidades abdominais abertas para a retirada de tecidos (brânquias, rins, fígado e músculo). As amostras de tecidos foram acondicionados em ultra-freezer (-80°C), até a realização das análises de determinação do teor hídrico (brânquias e músculo), atividade específica da enzima anidrase carbônica (brânquias e rins) e lipoperoxidação (fígado). Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 241 emitido em 09 de Agosto de 2007).

3.4. Análise das Amostras

3.4.1 Dosagem Sanguínea

Hematócrito

A determinação do hematócrito (%) foi realizada utilizando-se o método de micro-hematócrito em tubo capilar heparinado de 75 mm, selado em uma das extremidades e centrifugado por 10 minutos a 3.000 xg, em centrífuga de hematócrito (PRESVAC CMH-28). A leitura foi realizada com auxílio de escala de hematócrito.

3.4.2. Dosagens Plasmáticas

Osmolalidade

A osmolalidade plasmática foi determinada em amostras sem diluição lidas no micro-osmômetro de pressão de vapor (Wescor® 5520 VAPRO).

Íons

A determinação dos íons cloreto (Cl^-) e magnésio (Mg^{2+}) foi realizada em amostras de plasma sem diluição. Esses íons foram determinados através de kits colorimétricos comerciais (Labtest®) com leitura de absorvância em 470 e 505 nm, respectivamente, em espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech). Os íons Cl^- , ao reagirem com o tiocianato de mercúrio na presença de nitrato férrico, produzem tiocinato férrico de coloração laranja proporcional à quantidade de íons cloreto da amostra. Os íons Mg^{2+} reagem em meio alcalino com magon sulfonado, de coloração azul, resultando em um complexo de coloração rosada proporcional à concentração total de íons magnésio na amostra. Os íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram determinados em amostras de plasma diluídas (1:100) em água ultra-pura (Mili-Q) através de fotômetro de chama (CELM FC – 180).

Cortisol

O cortisol foi determinado em plasma sem diluição através de kits comerciais (Human Diagnostics Worldwide®). Este método permite a quantificação do cortisol em microplacas de ELISA através da interação competitiva entre o cortisol e o conjugado cortisol-enzima por um número limitado de anticorpos (de coelho) anti-cortisol imobilizados no fundo dos poços. Tanto os padrões calibradores de concentrações conhecidas de cortisol (0 - 800ng/mL) quanto as amostras foram pipetados, em triplicata, no fundo dos poços da placa. Em seguida foram adicionados 200 μl da solução do conjugado cortisol-enzima. A placa foi então incubada por 1 h. Após incubação a placa foi lavada 3 vezes com uma solução de lavagem específica (Tampão

TRIS 3 M, Tween 20 0,2%, pH 7,3) para a remoção do conjugado não ligado. A placa foi então invertida e batida contra um papel absorvente para a remoção total do líquido remanescente. Imediatamente, no escuro, 100 µl da solução do substrato foram adicionados (3,3',5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) 0,26 g/L, assim como o tampão acetato de sódio 50mM, o peróxido de hidrogênio 0,015%, e DMSO <5%, pH 3,5-4,0. A placa foi novamente incubada por 15 min, e apresentou ao final do período uma coloração azul. Em seguida adicionou-se a solução de parada (ácido sulfúrico 0,5M), que bloqueou a reação e alterou a coloração das amostras para amarelo. A intensidade da cor amarela é inversamente proporcional à quantidade de cortisol da amostra: quanto mais cortisol na amostra, menor ligação do cortisol conjugado com a enzima aos anticorpos da placa, portanto menor formação de cor. A leitura de absorbância foi realizada imediatamente a 450 nm, usando comprimento de onda de referência de 630 nm (ELISA Tecan R. Chisto Infinite M200). A concentração desconhecida das amostras é interpolada através da curva padrão gerada pela utilização dos padrões calibradores.

Glicose

A concentração de glicose foi obtida através de kit comercial colorimétrico (Labtest®) em amostras de plasma sem diluição com leitura de absorbância a 505 nm (espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech). Com a oxidação da glicose, através da ação da glicose oxidase, forma-se o peróxido de hidrogênio que ao reagir com 4-aminoantipirina e fenol forma a antipirilquinonimina de coloração vermelha proporcional à concentração de glicose da amostra.

3.4.3. Dosagens em tecidos

Teor Hídrico

A porcentagem de água foi determinada em brânquias (0,1006±0,002g; n=204) e músculos (0,1030±0,002g, n=204). Ambos os tecidos foram descongelados, pesados (peso

úmido) em tubos *ependorf* em balança analítica (Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1 mg, Brasil). Em seguida os tecidos foram transferidos para desidratação em estufa (BIOPAR S22ST) a 60°C por 24 h. Após este período os tecidos foram novamente pesados (peso seco) e a perda de água foi demonstrada pela porcentagem do peso inicial da amostra (peso úmido).

Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica (AC)

A atividade específica da enzima anidrase carbônica branquial e renal foi determinada com base no protocolo estabelecido por Henry (1991) e descrito por Vitale et al. (1999). Os tecidos foram pesados ($0,1098 \pm 0,004$ g e $0,1823 \pm 0,002$ g, respectivamente; $n=204$ para ambos os tecidos), homogeneizados a 10%P/V (peso/volume) em tampão fosfato 10 mM, pH 7,4. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado a aproximadamente 2000xg (5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi separado em alíquotas para a dosagem da concentração da proteína total e para a quantificação da atividade da enzima. Quantificou-se a atividade da enzima através da adição do sobrenadante do homogeneizado tecidual e de água destilada saturada com CO₂ em um meio de reação contendo manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), pH 7,4. A reação resulta na queda do pH, a qual foi monitorada por 20 segundos (pHmetro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW®), com leituras a cada 4 segundos. Com base nestas leituras foi desenvolvida uma reta de regressão linear do pH em relação ao tempo que determina taxa da reação catalizada (TC) pela enzima no homogeneizado tecidual. O mesmo procedimento é realizado para a determinação do branco, ou seja, da taxa de reação não catalizada (TNC), porém com a adição do tampão sem o homogeneizado tecidual. A determinação do branco foi realizada em 6 réplicas, com duas leituras antes do início, no meio e ao fim do grupo de amostras. A reação ocorreu a $\pm 2,5^\circ\text{C}$. O cálculo da atividade da anidrase carbônica (AAC) foi realizado com base nas descrições de Burnett et al. (1981) e Vitale et al. (1999), através da fórmula: $\text{AAC} = [\text{TC}/(\text{TNC} - 1)]/\text{mg de proteína total}$.

Liperoxidação (LPO-método FOX)

O ensaio de liperoxidação foi determinado em placas de ELISA segundo o descrito por Jiang et al. (1992). As amostras de fígado foram pesadas ($0,1234 \pm 0,003$ g, $n=204$) e homogeneizadas (diluição 1:10; peso:volume) em metanol 30%. Em seguida as amostras foram centrifugadas (4°C) por 30 min a $10.000 \times g$. O sobrenadante foi novamente diluído em metanol 30% (1:2; volume/volume) e centrifugado por 10 min (4°C) a $1.000 \times g$. A $30 \mu\text{l}$ da amostra foram adicionados $270 \mu\text{l}$ do meio de reação [Xilenol laranja (1mM), diluído em ácido sulfúrico, H_2SO_4 (25 mM), Butyl Hidroxitolueno, BHT (4 mM), sulfato ferroso amoniacal, $\text{FeSO}_4 \cdot \text{NH}_4$ (250 mM) e metanol grau HPLC 90% (90% do volume final)]. A placa foi então coberta e incubada no escuro por 30 min em temperatura ambiente. Para a determinação do branco utilizou-se apenas o metanol 30%. Quatro réplicas de cada amostra foram lidas a 560 nm (ELISA ELX 800 Auto Reader da Meridian Diagnostics Inc). Este método (FOX = *Ferrous Oxidation/ Xylenol Orange Method*) baseia-se na produção de hidroperóxidos lipídicos (produtos primários da oxidação lipídica), através da rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxidos sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} o qual reage com laranja de xilenol (fonte de absorção de luz) na presença do estabilizador butil hidroxitolueno (BHT).

Quantificação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados teciduais (brânquias, rins e fígado), utilizados para os ensaios de atividade específica da enzima anidrase carbônica e de liperoxidação foi determinada segundo o protocolo descrito por Bradford (1976). Esse método baseia-se na ligação das proteínas, contidas no homogeneizado tecidual, ao reagente *Coomassie Brilliant Blue G-250* (Bio-Rad Protein Assay da Bio-Rad Laboratories®), o qual passa a apresentar coloração azul proporcional à quantidade de proteínas da amostra. As amostras foram determinadas em quadruplicatas em microplacas lidas a 595 nm (ELISA Tecan R.Chisto Infinite M200).

3.5 Análises Estatísticas

A análise estatística dos dados foi realizada através da análise de variância de duas vias, Two-way ANOVA. Os dois fatores foram 1) local, os dez pontos de distribuição das gaiolas, e 2) as estações de coleta, verão ou inverno, e seguiu-se o teste *post hoc* de Tukey para localização das diferenças. Adicionalmente, foi empregado test-t de Student para a comparação entre os peixes colocados no ponto referência, nas condições com e sem gaiolas, em ambas as estações. Para dados que não apresentaram normalidade (ou homogeneidade de variâncias) foram utilizados os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, os quais correspondem aos testes não paramétricos para as análises de variância de duas vias (Two-way anova) e para o test-t de Student, respectivamente (SigmaStat 2.3®). Os dados foram apresentados através da média \pm erro padrão da média. Para todos os resultados, o nível de significância considerado foi menor que 0,05 ($P < 0,05$).

4. Resultados

Mortalidade

Houve mortalidade apenas nos pontos Rio Barigui e Guajuvira, a qual foi de 60 e 100% dos espécimes de *R. quelen* colocados nas gaiolas no ponto Barigui (PBa) nas coletas de verão e inverno, respectivamente, e mortalidade de 100% no ponto Guajuvira (Gua) em ambas as coletas.

Comparação entre os peixes do Ponto referência nas condições com e sem gaiolas

A colocação dos peixes em gaiolas não interferiu sobre os parâmetros avaliados nos jundiás. Houve apenas diferenças entre os peixes dos pontos referência sem e com gaiolas nas determinações de peroxidação lipídica e anidrase carbônica renal no verão, e na determinação da anidrase carbônica branquial, concentração de cloreto e magnésio plasmático no inverno (Tabela 1).

Tabela 1. Dados analisados em sangue, plasma e tecidos de *Rhamdia quelen* submetidos ao ponto referência fora (=sem) ou dentro (=com) das gaiolas.

Parâmetros analisados	Ponto Referência			
	Sem gaiolas		Com gaiolas	
	Verão	Inverno	Verão	Inverno
Hematócrito (%)	31±0,5	29±1,3	32±1,4	25±1,7
Osmolalidade Plasmática (mOsm/kgH ₂ O)	269±1,7	284±4,8	266±3,6	281±4,2
Sódio Plasmático (mM)	119±2,7	144±1,1	122±4,8	145±1,3
Cloreto Plasmático (mM)	112±2,8	104±4,2*	114±3,1	128±3,3
Magnésio Plasmático (mM)	1,07±0,07	1,02±0,04	1,10±0,04	0,90±0,03*
Potássio Plasmático (mM)	3,6±0,3	2,7±0,1	3,0±0,4	2,8±0,1
Cortisol Plasmático (ng/mL)	200±14,6	164±19,3	260±30,1	158±14,3
Glicose Plasmática (mg/dL)	107±10,7	48±2,5	129±9,2	46±7,2
Teor Hídrico Branquial (%)	83±0,3	82±0,3	83±0,2	82±0,2
Teor Hídrico Muscular (%)	78±1,8	79±0,3	79±0,5	79±0,3
Anidrase Carbônica Branquial (/mg proteína)	12,5±1,5	5,7±0,2*	14±0,6	7,9±0,4
Anidrase Carbônica Renal (/mg proteína)	10,5±1,0*	3,9±0,4*	13,4±0,5	5,8±0,3
Lipoperoxidação Hepática (mg/mL)	1,91±0,4	3,25±0,6	3,19±0,3*	3,89±0,5

Dados apresentados em média ± erro padrão da média. Asteriscos (*) correspondem às diferenças entre os peixes referência expostos sem gaiolas e com gaiolas em uma mesma estação (verão ou inverno).

Determinação do Hematócrito, Osmolalidade e Concentrações iônicas (Na⁺, Cl⁻, K⁺ e Mg²⁺) do plasma

Hematócrito

O hematócrito de *R. quelen* submetidos ao ponto Zoológico (Zoo, 24%) foi menor que nos peixes dos pontos Rio Piraquara (RPI 2), Reservatório do Iraí (RIR), Referência (Ref), Miringuava (RMI) e Zaniolo (Zan) 31-33% no verão. No inverno, os peixes dos pontos Reservatório do Passaúna (RPA) e Zan (23 e 24%, respectivamente) apresentaram menores

valores que os peixes dos pontos Reservatório de Piraquara I (RPI 1) e RPI 2 (31 e 30%, respectivamente). Os peixes do ponto RPa tiveram ainda menor porcentagem de hematócrito que os peixes do ponto RMI (29%). Adicionalmente, a porcentagem de hematócrito dos peixes dos pontos Rlr, Ref, RPa, RMI, e Zan, que variou entre 23-29% no inverno, foram menores que nos peixes destes mesmos pontos no verão (28-33%) (Figura 7 A).

Osmolalidade

A osmolalidade plasmática dos jundiás submetidos aos pontos RPI 1 e RPI 2 (255 mOsm/kgH₂O em ambos) foi menor que nos peixes do ponto Zan (275 mOsm/kgH₂O) no verão. Adicionalmente, a osmolalidade plasmática dos peixes dos pontos RPI 1; RPI 2; Rlr; Ref; RPa e Zoo, que variou entre 255-266 mOsm/kgH₂O no verão, foram menores que nos peixes destes mesmos pontos no inverno (271- 284 mOsm/kgH₂O) (Figura 7 B).

Sódio

A concentração de sódio plasmático de *R. quelen* submetidos aos pontos Ref, RMI, Zan e Zoo (119-123 mM) foram menores que nos peixes dos pontos RPI 2 e Rlr (135-136 mM, respectivamente) no verão. Os peixes do ponto Zoo tiveram ainda menor concentração plasmática de sódio que os peixes do RPa (132 mM). Adicionalmente, a concentração de sódio plasmático dos peixes dos pontos RPI 1; Rlr; Ref; RPa; RMI; Zan e Zoo, que variou entre 119-135 mM no verão, foram menores que nos peixes destes mesmos pontos no inverno (137 - 148 mM) (Figura 7 C).

Cloreto

A concentração de cloreto plasmático de *R. quelen* submetidos aos pontos RMI (80 mM) foram menores que nos peixes submetidos aos pontos RPI 1, RPI 2, Rlr, Ref, RPa, Zan e Zoo (101-114 mM) no verão. No inverno, os peixes dos pontos RPI 1, RMI e Zan (116-120 mM) apresentaram menores concentrações de cloreto no plasma que os peixes do ponto Rlr (135

mM). Adicionalmente, a concentração de cloreto plasmático dos peixes dos pontos RPi 1; RPi 2; Rlr, Ref; RPa; RMi; Zan e Zoo, que variou entre 80 - 114 mM no verão, foram menores que nos peixes destes mesmos pontos no inverno (116 - 135 mM) (Figura 7 D).

Magnésio

A concentração de magnésio plasmático de *R. quelen* submetidos ao ponto RMi (0,85 mM) e Zoo (0,74 mM) foram menores que nos peixes dos pontos RPi 2, Rlr, Ref, e RPa (1,08-1,13 mM) no verão. Os peixes do ponto Zan (0,92 mM) tiveram menores concentrações plasmáticas de magnésio que os peixes do ponto Rlr, e os peixes do ponto Zoo também tiveram menores concentrações que os peixes do ponto RPi 1 (1,01 mM) nesta mesma estação. Adicionalmente, a concentração de magnésio plasmático dos peixes dos pontos RPi 2, Rlr, Ref, RPa, que variou entre 0,86 - 0,96 mM no inverno foram menores que nos peixes destes mesmos pontos no verão (1,08 - 1,13 mM) (Figura 7 E).

Potássio

A concentração de potássio plasmático de *R. quelen* submetidos ao ponto RPi 2 (2,4 mM) foi menor que nos peixes dos pontos RPi 1 e Zoo (3,4 e 3,3 mM, respectivamente) no verão. No inverno a concentração plasmática de potássio dos peixes do ponto RPi 1 (2,6 mM) foi menor que nos peixes dos pontos RMi e Zoo (3,4 e 3,5 mM, respectivamente). Adicionalmente, a concentração plasmática de potássio obtida dos peixes do ponto RPi 1 no inverno foi menor que nos peixes deste mesmo ponto no verão, enquanto que os peixes dos pontos RMi e RPi 2 tiveram menores valores de potássio no verão (2,7 e 2,4 mM) que no inverno (3,4 e 3,0 mM, respectivamente) (Figura 7 E).

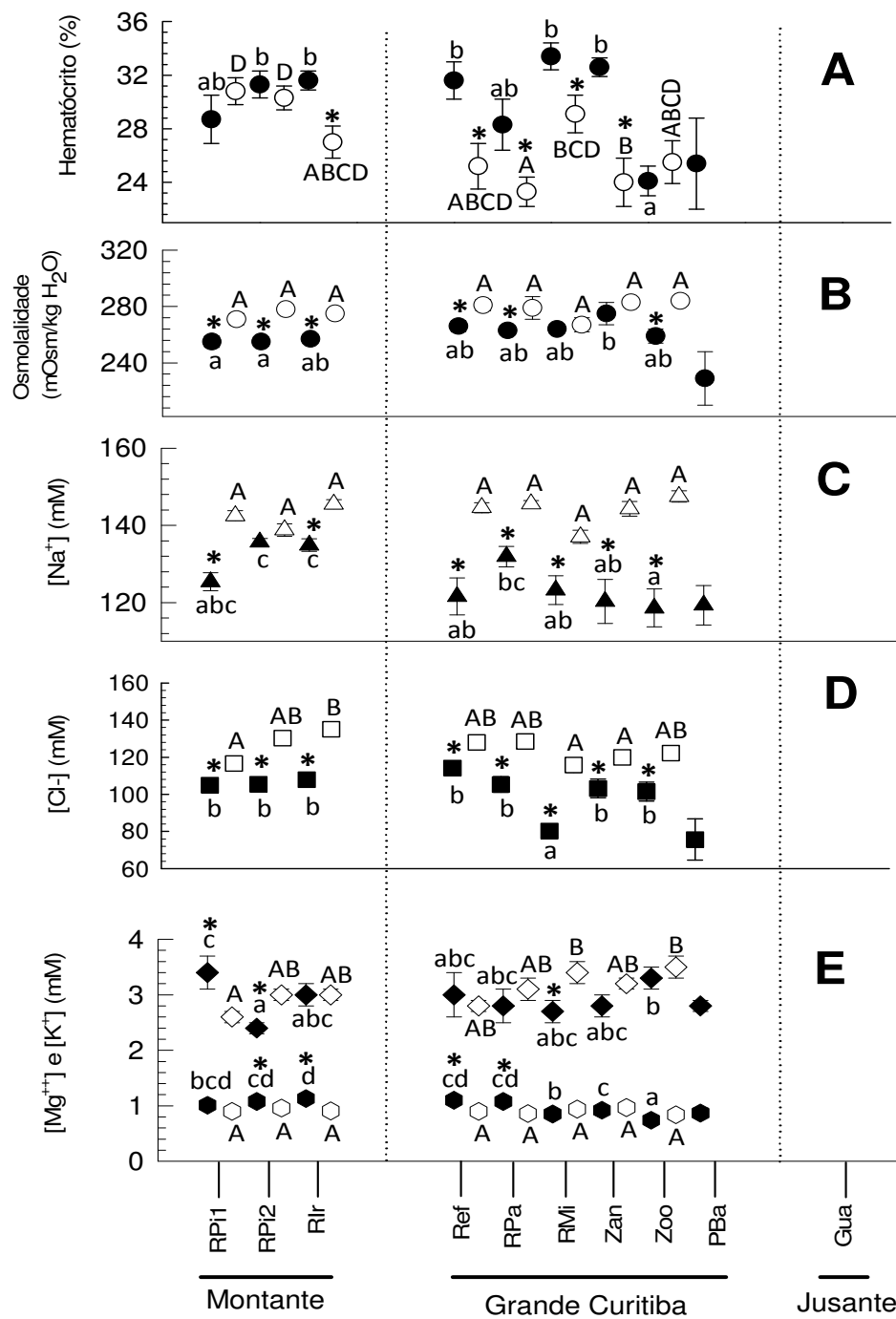


Figura 7. Dosagens em sangue e plasma de *Rhamdia quelen* expostos *in situ* durante o verão (símbolos em preto) e inverno (símbolos em branco) aos pontos ao longo da Bacia do Alto Rio Iguaçu os quais compreendem as regiões a montante e jusante além da grande Curitiba. A: Hematócrito (círculo); B: Osmolalidade plasmática (círculo); C: Concentração plasmática do íon Na⁺ (triângulo), D: Concentração plasmática do íon Cl⁻ (quadrado); e E: Concentrações plasmáticas dos íons Mg²⁺ (hexágono) e K⁺ (losango). Letras minúsculas e maiúsculas indicam a presença de diferenças estatísticas entre os pontos amostrados durante as coletas de verão e inverno, respectivamente. Letras diferentes indicam presença de diferenças estatísticas entre os pontos em cada estação. Asterisco (*) corresponde à presença de diferença estatística de um mesmo ponto entre as estações de verão e inverno. Dados apresentados em média ± erro padrão da média (P<0,05). A ausência de dados verificada nos peixes dos pontos PBa e Gua se deve ao fato da ocorrência de mortalidade. Os valores do PBa no verão apesar de estarem plotados não foram incluídos na estatística devido o baixo “n” (4) dada ocorrência de 60% de mortalidade.

Determinação do Teor Hídrico e da Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica

Teor Hídrico Branquial e Muscular

O percentagem de hidratação branquial e muscular em *R. quelen* não diferiu entre os pontos na coleta de verão. No inverno, apenas o teor hídrico branquial dos peixes do ponto Rlr e Zoo (83 e 82%, respectivamente) foi maior que nos peixes do ponto Zan (81%). Adicionalmente, o teor hídrico branquial dos peixes dos pontos RPi 1, RPi 2, Ref, RPa, RMI e Zan, ambos com 83% no verão, foram maiores que o teor hídrico destes mesmos pontos (81-82%) no inverno (Figura 8 A e B).

Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica Branquial

A atividade específica da enzima anidrase carbônica branquial (AC) em *R. quelen* submetidos aos pontos RPi 2, Zan e Zoo (4,6-11,9 /mg proteína) foram menores que nos peixes dos pontos RPi 1 e Ref (14 e 14,1 /mg proteína, respectivamente) no verão. Os peixes do ponto RPi 2 (4,6 /mg proteína) tiveram, ainda, menor atividade enzimática que os peixes dos pontos Rlr, RPa, RMI, Zan e Zoo (9,9 - 12,7 /mg proteína) nesta mesma estação. No inverno, a atividade da AC branquial dos peixes dos pontos RPi 1, RPi 2, Rlr, Ref e RPa (5,2-8,8 /mg proteína) foram menores que nos peixes dos pontos RMI e Zoo (13,6 /mg proteína, em ambos). Os peixes do ponto Zan (9,8 /mg proteína) tiveram menor atividade da AC que os peixes do ponto RMI, assim como os peixes do ponto RPa (5,2 /mg proteína) tiveram menor atividade desta enzima que os peixes dos pontos RPi 1, RPi 2, Rlr, Ref e Zan (7,9-9,8 /mg proteína). Adicionalmente, a atividade desta enzima nas brânquias dos peixes dos pontos RPi 1, Rlr, Ref e RPa no inverno (5,2-8,8 /mg proteína) foi menor que nos peixes destes mesmos no verão (11-14,1 /mg proteína), enquanto que os peixes dos pontos RPi 2 e Zoo (4,6 e 11,1 /mg proteína, respectivamente) no verão tiveram menor atividade que os peixes destes mesmos pontos no inverno (8,7 e 13,6 /mg proteína, respectivamente) (Figura 8 C).

Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica Renal

A atividade específica da enzima anidrase carbônica renal de *R. quelen* submetidos aos pontos RPi 2, Rlr, RPa e Zan (4,7-10,1 /mg proteína) foi menor que nos peixes dos pontos RPi 1, RMi e Zoo (13,8-16,7 /mg proteína) no verão. Os peixes do ponto Ref (13,4 /mg proteína) também tiveram menor atividade da AC renal que os peixes do ponto RMI. Os peixes dos pontos RPi 2, RPa e Zan (4,7-9,8 /mg proteína) por sua vez, tiveram menor atividade desta enzima que os peixes do ponto Ref, assim como os peixes do ponto RPi 2 tiveram menor atividade que os peixes dos pontos Rlr, RPa e Zan ainda no verão. Adicionalmente, os peixes dos pontos RPi 1, Rlr, Ref, RMI, Zan e Zoo no inverno (5,1-7,1/mg proteína) tiveram menor atividade desta enzima que os peixes destes mesmos pontos no verão (9,8-16,7 /mg proteína) (Figura 8 D).

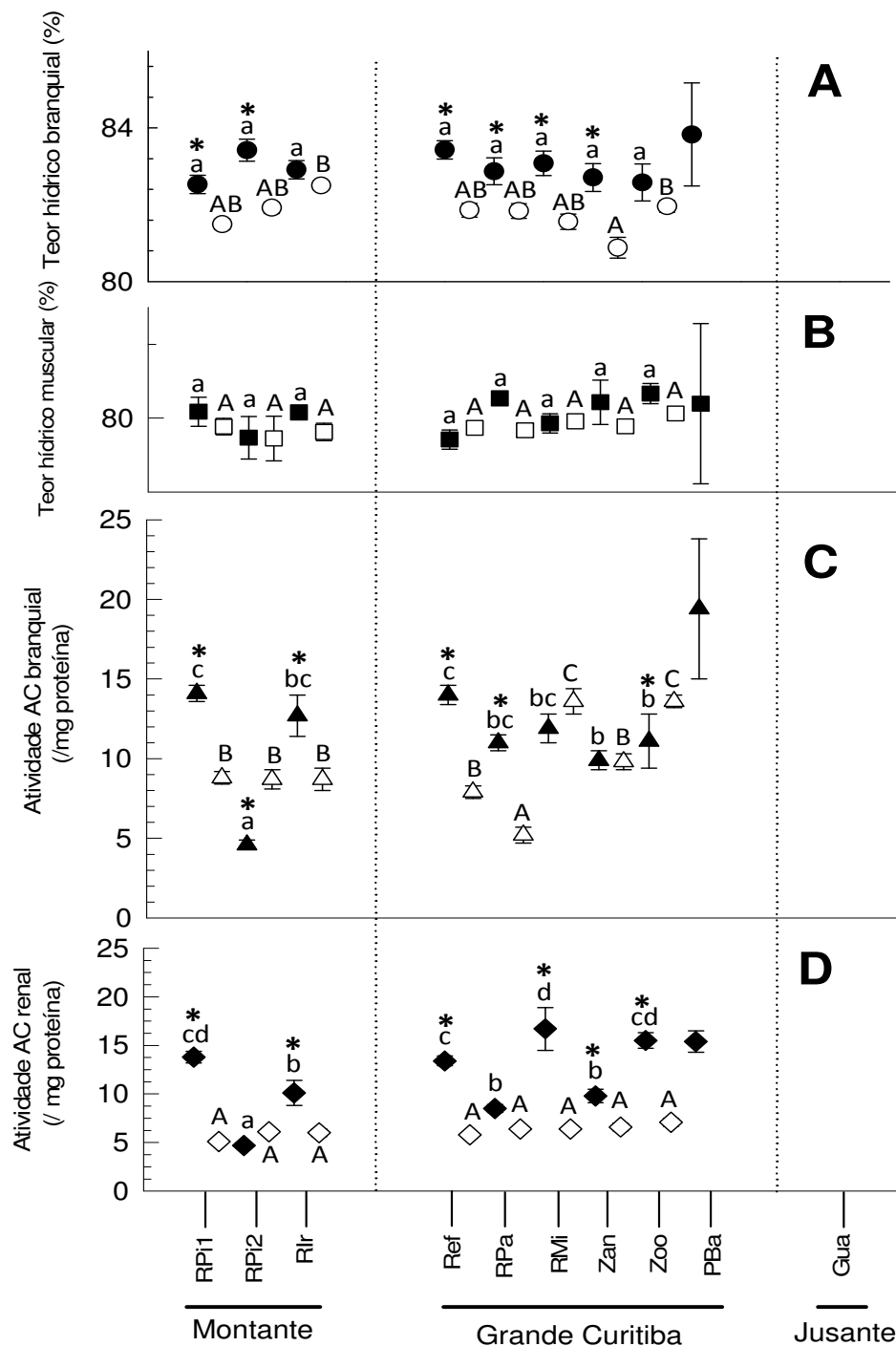


Figura 8. Dosagens em tecidos de *Rhamdia quelen* expostos *in situ* durante o verão (símbolos em preto) e inverno (símbolos em branco) aos pontos ao longo da Bacia do Alto Rio Iguaçu os quais compreendem as regiões a montante, jusante, além da grande Curitiba. A: Teor de hidratação branquial (círculo); B: Teor de hidratação muscular (quadrado); C: Atividade específica da Enzima Anidrase Carbônica Branquial (triângulo); D: Atividade específica da Enzima Anidrase Carbônica Renal (losango). Letras minúsculas e maiúsculas indicam a presença de diferenças estatísticas entre os pontos amostrados durante as coletas de verão e inverno, respectivamente. Letras diferentes indicam presença de diferenças estatísticas entre os pontos em cada estação. Asterisco (*) corresponde à presença de diferença estatística de um mesmo ponto entre as estações de verão e inverno. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média ($P < 0,05$). A ausência de dados verificada nos peixes dos pontos PBa e Gua se deve ao fato da ocorrência de mortalidade. Os valores do PBa no verão apesar de estarem plotados não foram incluídos na estatística devido o baixo "n" (4) dada ocorrência de 60% de mortalidade.

Determinação dos Marcadores de Estresse (Cortisol e Glicose Plasmáticos) e Lipoperoxidação no Fígado

Cortisol

A concentração de cortisol plasmático de *R. quelen* submetidos aos pontos Ref (260 ng/mL) foi maior que nos peixes dos pontos RPi 1, RPi 2, Rlr, Zan e Zoo (81-170 ng/mL) no verão. Os peixes dos pontos RPa (216 ng/mL) também tiveram maior concentração de cortisol plasmático que os peixes dos pontos RPi 1 e Rlr (112 e 81 ng/mL, respectivamente). Os peixes dos pontos RPi 2, Rmi, Zan e Zoo (155-182 ng/mL) tiveram ainda maior concentração de cortisol que os peixes do ponto Rlr, ainda no verão. No inverno, os peixes dos pontos Ref, RPi 1 e RPi 2 (157-204 ng/mL) tiveram maiores concentrações de cortisol plasmático que os peixes dos pontos Rlr, Zan e Zoo (75-86 ng/mL). Os peixes do ponto RPi 1 (204 ng/mL) tiveram ainda maiores concentrações de cortisol que os peixes do ponto RPa (110 ng/mL), assim como os peixes do Rmi (152 ng/mL) em relação aos peixes do ponto Zoo (75 ng/mL). Adicionalmente, a concentração de cortisol plasmático dos peixes dos pontos Ref, RPa, Zan e Zoo, que variou entre 155-260 ng/mL no verão, foram maiores que nos peixes destes mesmos pontos no inverno. Os peixes do ponto RPi 1 tiveram maior concentração de cortisol no inverno que no verão (204-112 ng/mL, respectivamente) (Figura 9 A).

Glicose

A concentração de glicose plasmática de *R. quelen* submetidos aos pontos Ref (129 mg/dL) e RPa (91 mg/dL) foram maiores que nos peixes dos pontos RPi 1, RPi 2, Rlr e Zoo (53-58 mg/dL) no verão. Os peixes do ponto Ref tiveram ainda maior concentração de glicose plasmática que os peixes dos pontos Rmi e Zan (66 e 73 mg/dL, respectivamente). No inverno, os peixes do ponto RPi 1 (78 mg/dL) tiveram maiores concentrações de glicose plasmática que os peixes dos pontos Ref, RPa, Zan e Zoo (46-53 mg/dL). Adicionalmente, a concentração de

glicose plasmática dos peixes dos pontos Ref, RPa e Zan, que variou entre 73-129 mg/dL, foram maiores no verão que nos peixes destes mesmos pontos no inverno (46-53 mg/dL). Já os peixes do ponto RPi 1 apresentaram maiores concentrações de glicose no inverno em relação ao verão (58-78 mg/dL, respectivamente) (Figura 9 B).

Lipoperoxidação

A peroxidação lipídica (LPO) em fígado de *R. quelen* submetidos ao ponto RPi 1 (5,8 nmol/mg proteína) foi maior que nos peixes do ponto Ref, Zan e Zoo (3,2-3,7 nmol/mg proteína) no verão. Adicionalmente, a LPO dos peixes dos pontos RPi 1 no verão foi maior que nos peixes deste mesmo ponto no inverno (5,8-4,1 nmol/mg proteína, respectivamente) (Figura 9 C).

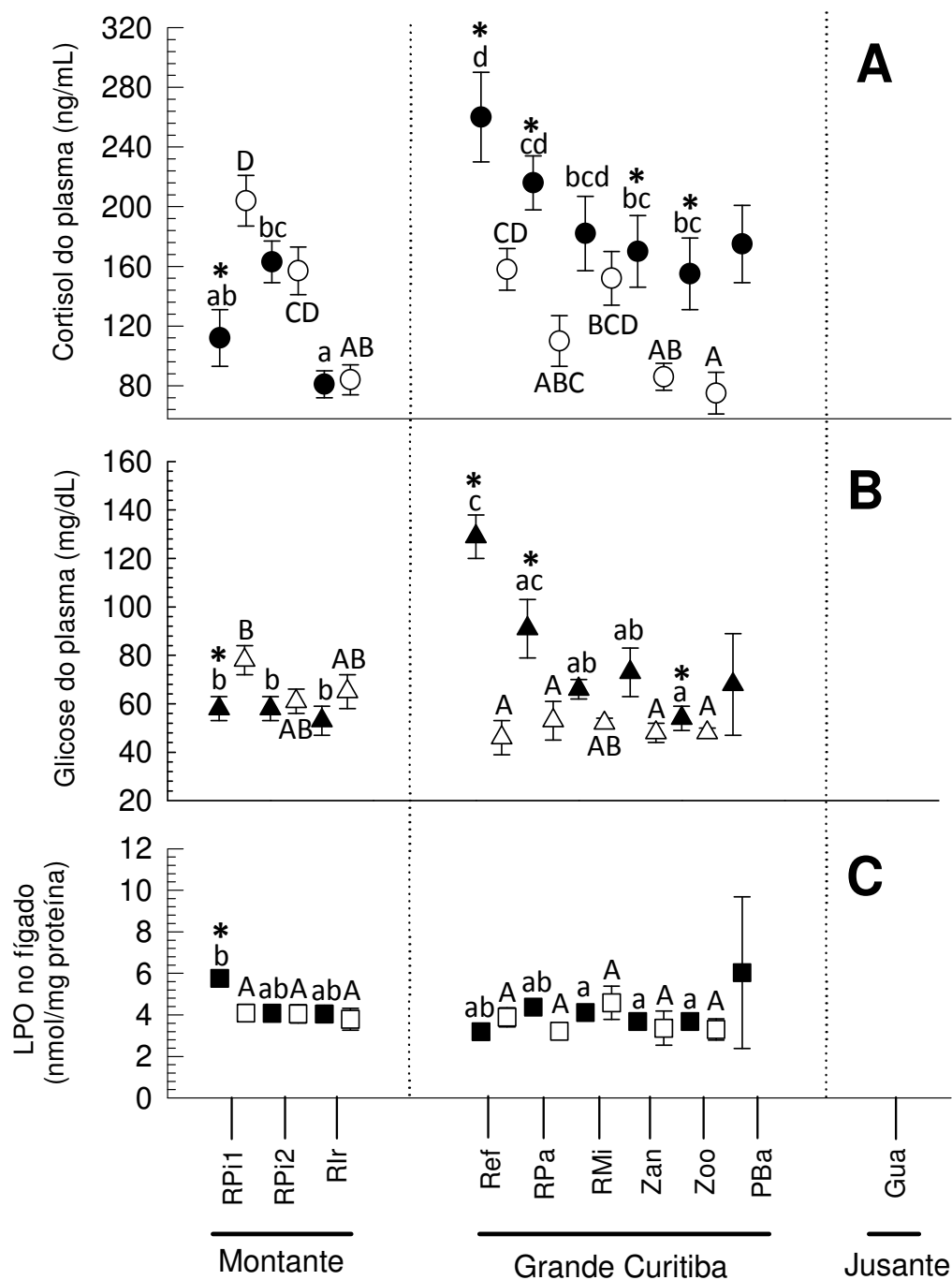


Figura 9. Dosagens em plasma e tecido de *Rhamdia quelen* expostos *in situ* durante o verão (símbolos em preto) e inverno (símbolos em branco) aos pontos ao longo da Bacia do Alto Rio Iguaçu os quais compreendem as regiões a montante e jusante, além da grande Curitiba. A: Concentração de cortisol plasmático (círculo); B: Concentração de glicose plasmática (triângulo) e C: Lipoperoxidação do fígado (quadrado). Letras minúsculas e maiúsculas indicam a presença de diferenças estatísticas entre os pontos amostrados durante as coletas de verão e inverno, respectivamente. Letras diferentes indicam presença de diferenças estatísticas entre os pontos em cada estação. Asterisco (*) corresponde à presença de diferença estatística de um mesmo ponto entre as estações de verão e inverno. Dados apresentados em média \pm erro padrão da média ($P < 0,05$). A ausência de dados verificada nos peixes dos pontos PBa e Gua se deve ao fato da ocorrência de mortalidade. Os valores do PBa no verão apesar de estarem plotados não foram incluídos na estatística devido o baixo "n" (4) dada ocorrência de 60% de mortalidade.

5. Discussão

O impacto do crescimento demográfico, industrial e agrícola sobre o ambiente aquático não é uma realidade apenas do Rio Iguaçu. Os efeitos da contaminação por efluentes resultantes das atividades antrópicas sobre o ambiente aquático de forma geral tem sido alvo de numerosas investigações (e.g. Santos e Pacheco, 1996; Stien et al., 1998; Pacheco e Santos, 2001; Ferreira et al., 2005; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). Isto é especialmente verdade para ambientes de água doce, tanto no Brasil (Wilhelm Filho et al., 2001; Winkaler et al., 2001; Almeida et al., 2005; Pompeu et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006; Sofia et al., 2006; Camargo e Martinez, 2007; Silva e Martinez, 2007; Becker et al., 2009), quanto em outros países (Soimasuo et al., 1995; Hontela et al., 1997; Pandey et al., 2003; Gül et al., 2004; Parvez et al., 2006; Fontainhas-Fernandes et al., 2008). Apesar da existência de inúmeros estudos de avaliação de impactos de contaminantes nestes ambientes, ainda existem muitas lacunas como a existência de poucas as avaliações realizadas com exposições controladas *in situ* (e.g. Soimasuo et al., 1995; Stien et al., 1998; Camargo e Martinez, 2006; 2007; Becker et al., 2009) em ambientes tropicais e, principalmente que utilizem espécies nativas (e.g. Camargo e Martinez, 2006; 2007; Becker et al., 2009). Adicionalmente, poucos são os estudos que levem em consideração a influência da sazonalidade sobre as respostas manifestadas pelos peixes (e.g. Camargo e Martinez, 2006; 2007). Neste estudo nós procuramos preencher essas lacunas ao avaliarmos as alterações fisiológicas e bioquímicas de *Rhamdia quelen*, uma espécie nativa de água doce e de grande interesse comercial do Sul do Brasil, exposta *in situ*, no verão e no inverno, às águas de dez pontos com diferentes níveis de contaminação da bacia do Alto Rio Iguaçu.

Nesta avaliação levamos em consideração as variações nos parâmetros físico-químicos dos locais avaliados, os quais são essenciais na avaliação da qualidade da água (Pandey et al., 2003; Pompeu et al., 2005; Sofia et al., 2006; Camargo e Martinez, 2006; 2007). A

determinação desses parâmetros juntamente com as alterações manifestadas pelos organismos diante da exposição à contaminação é fundamental para caracterização dos impactos da contaminação sobre a biota de um local (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Em nosso estudo, tanto os dados obtidos no momento da coleta quanto os fornecidos por agências ambientais (Apêndice 1), indicam que a qualidade da água dos rios que compõe a bacia do Alto Rio Iguaçu vai sendo reduzida conforme a aproximação de regiões mais urbanizadas, como esperado. Mais especificamente, a região da grande Curitiba e, principalmente, a região à jusante da grande Curitiba foram as regiões que apresentaram menor qualidade nas suas águas. Alguns desses pontos já vinham sendo classificados como poluídos, ou até mesmo muito poluídos como no caso dos pontos Rio Barigui e Guajuvira (IAP, 2005). Nesses pontos houve, inclusive, 60 e 100% de mortalidade na coleta de verão, respectivamente e 100% em ambos os pontos na coleta de inverno. Todas as regiões avaliadas possuem pontos que recebem efluentes de diversas fontes de atividade antrópica (urbano, industrial, agrícola), e a contaminação encontrada nesses rios é deste modo, caracterizada por uma mistura complexa de contaminantes. A constante descarga de matéria orgânica nos pontos é corroborada pela alta condutividade, a qual tem sido utilizada como indicador de baixa qualidade da água (e.g. IAP, 2005; Camargo e Martinez, 2006; Sofia et al., 2006; Camargo e Martinez, 2007). Adicionalmente, é importante ressaltar que o regime dos corpos de água está intimamente relacionado às influências sazonais, que afetam, por exemplo, a deposição de matéria orgânica e elementos químicos nos sedimentos, fluxos de matéria orgânica, níveis de oxigênio dissolvido (Pompeu et al., 2005; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Além disso, no ambiente aquático os poluentes sofrem diferentes transformações, como diluição, ou concentração, fotodegradação, resultando em interações de antagonismo e sinergismo (Wendelaar Bonga, 1997; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Assim, durante a estação do verão, que é a estação mais quente e com maior índice de

pluviosidade, a matéria orgânica acaba sendo ressuspendida, reduzindo o oxigênio dissolvido e a transparência da água, aumentando os níveis de gás carbônico, compostos de nitrogênio e fósforo (Pompeu et al., 2005), exatamente como foi verificado nos locais investigados neste estudo (Apêndice 1).

Além dessas variações nos parâmetros abióticos, em áreas poluídas a exposição dos peixes a poluentes desencadeia desequilíbrio em sua homeostasia, o que resulta em manifestações de respostas sub-letais de estresse (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Portz, et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Respostas fisiológicas são excelentes ferramentas de avaliação da qualidade ambiental, e são bastante utilizadas como marcadores de estresse, pois representam um dos primeiros efeitos dos estressores sobre os peixes (e.g. Roche e Bogé, 1996; Wendelaar Bonga, 1997; Stien et al., 1998; Winkaler et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Camargo e Martinez, 2006; Portz et al., 2006). Prejuízos nas funções fisiológicas têm início a partir do contato do animal com a contaminação, principalmente através das brânquias (e.g. Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Evans et al., 2005; Parvez et al., 2006; Camargo e Martinez, 2007; Fontainhas-Fernandes, et al., 2008). Como as brânquias correspondem à interface entre o animal e o meio, as mesmas estão envolvidas em diversas funções essenciais, como osmorregulação, respiração, excreção de produtos nitrogenados e regulação ácido-básica (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Evans et al., 2005), fazendo com que a exposição a contaminantes leve a desequilíbrios nestas funções.

A ocorrência de distúrbios osmorregulatórios e respiratórios, por exemplo, são causados pela exposição a um ou mais fatores de estresse, sejam eles agudos ou crônicos, naturais ou xenobióticos, e podem ser identificados através de determinações hematológicas e plasmáticas (e.g. Roche e Bogé, 1996; Winkaler et al., 2001; Barcellos et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006; Crestani et al., 2006; Portz et al., 2006; Prodocimo et al., 2008). Espécimes de

R. quelen quando expostos aos pontos da grande Curitiba e a jusante dessa região apresentaram redução na osmolalidade e nas concentrações iônicas plasmáticas, na coleta de verão em relação a coleta de inverno, presumivelmente por redução na capacidade de absorção ativa de sais pelas brânquias (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; Rogers et al., 2003; Martinez et al., 2004; Almeida et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006). Adicionalmente, situações de estresse geram aumento na taxa metabólica dos peixes, especialmente em estações mais quentes (Wilhelm Filho et al., 2001; Camargo e Martinez, 2006; 2007; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). Com taxas metabólicas elevadas, aumenta também a sensibilidade do organismo, facilitando a incorporação de contaminantes, por exemplo por aumento na permeabilidade branquial (e.g. Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). Além de afetar a permeabilidade branquial, xenobióticos podem especificamente competir e inibir mecanismos de transporte de sal. Por exemplo, são citados inúmeras situações de inibição da H⁺-ATPase apical, da Na⁺-K⁺-ATPase (NKA) basolateral, e da anidrase carbônica (AC) (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; Cerqueira e Fernandes, 2002; Rogers et al., 2003; Martinez et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006; Parvez et al., 2006). A inibição da atividade da enzima NKA, por exemplo, foi apontada como uma das principais causas dos prejuízos hidro-eletrolíticos em *Oncorhynchus mykiss* expostos a chumbo (Rogers et al., 2003); em *Channa punctata* expostos a efluentes de fábricas de papel (Parvez et al., 2006); em *Prochilodus scrofa* expostos a cobre (Cerqueira e Fernandes, 2002).

Prejuízos na absorção de íons podem levar a alterações plasmáticas e aumentos no volume celular das hemácias, resultando em aumento no hematócrito, assim como foi evidenciado em *R. quelen* expostos aos pontos da grande Curitiba, durante a coleta de verão. Esse aumento de hematócrito pode representar apenas inchaço das células sanguíneas, por

retenção de água, mas pode também ter relação com distúrbios respiratórios, sendo interpretado como uma resposta compensatória para aumentar a capacidade de transporte de O₂ e assim manter o processo de trocas gasosas (Wendelaar Bonga, 1997; Cerqueira e Fernandes, 2002; Prodocimo et al., 2008). Estes distúrbios respiratórios são comumente relatados em peixes intoxicados por metais, como foi verificado em peixes da espécie *Dicentrarchus labrax* expostos a cromo, cobre e zinco (Roche e Bogé, 1996), *Prochilodus scrofa* expostos a cobre (Cerqueira e Fernandes, 2002), *Oncorhynchus mykiss* expostos tanto de forma isolada quanto associada a cobre e zinco (Bagdonas e Vosyliene, 2006). Contudo, os peixes expostos ao ponto Zoológico neste estudo *in situ* apresentaram redução no hematócrito no verão. Casos de redução nos níveis desse parâmetro também foram relacionados com a exposição a metais, como nos peixes *Carassius auratus gibelio* intoxicados por cádmio (Zikic et al., 2001), ou ainda em peixes *Dicentrarchus labrax* intoxicados por compostos orgânicos (Roche e Bogé, 1996) e em *R. quelen* expostos a herbicidas (Crestani et al., 2006). A redução no hematócrito pode estar relacionada ao quadro de anemia (Roche e Bogé, 1996; Zikic et al., 2001; Crestani et al., 2006) causada por destruição nos eritrócitos ou redução nos níveis de ferro no sangue (Zikic et al., 2001). No entanto, cabe ressaltar que alterações significativas nos níveis de potássio plasmático durante a estação de verão não foram observadas, para corroborar ruptura de células sanguíneas (Rogers et al., 2003). As concentrações de magnésio plasmáticas foram maiores nos peixes expostos aos pontos RPi 2 e RiR; Ref e RPa, pertencentes a montante e grande Curitiba, respectivamente, durante a coleta de verão, em relação aos pontos mais poluídos da Grande Curitiba, o Zoológico e o Parque Barigui. A manutenção das concentrações de Mg²⁺ é importante na conservação das funções celulares e enzimáticas; prejuízos na sua retenção renal em peixes de água doce de fato tendem a comprometer a manutenção da integridade da membrana celular e a estabilização da permeabilidade branquial (Rogers et al., 2003; Parvez et al., 2006). Ainda como uma

conseqüência do desequilíbrio na homeostasia plasmática, compatível com o aumento no hematócrito, houve aumento no teor hídrico branquial em vários pontos no verão. Essa alteração no teor hídrico (1,2 – 2,4%) pode indicar limitações na regulação de volume das células branquiais (e.g. Lang et al., 1998; Leguen e Prunet, 2001).

Ativação da atividade da enzima anidrase carbônica (AC) branquial e renal durante o verão também foi observada. Diversos poluentes naturais e xenobióticos como, por exemplo, amônia (ArasHisar et al., 2004); metais como chumbo (Martinez et al., 2004); cobre e zinco (Cerqueira e Fernandes, 2002), geram em peixes um quadro de desequilíbrio respiratório, que resulta em acidose metabólica (Henry et al., 1988; 1995; Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000; Perry e Gilmour, 2006; Georgalis et al., 2006a,b). Essa ativação da AC em vários tecidos em quadros de desequilíbrio respiratório colabora para a prevenção da acidose (revisado em Henry, 1996; Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000; Henry e Swenson, 2000). A ativação da AC pode, inclusive, estar relacionada com o aumento no hematócrito, já que o processo de manutenção do equilíbrio respiratório e ácido-básico tem início no sangue, com a participação da AC dos eritrócitos. Assim, no sangue, o CO_2 é rapidamente transformado em HCO_3^- e H^+ . Os íons HCO_3^- são trocados por Cl^- com o plasma, através dos trocadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ presentes na membrana da hemácia, enquanto o H^+ é tamponado pela hemoglobina para ser transportado até as brânquias, onde é liberado para o ambiente (e.g. Henry, 1996; Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000; Henry e Swenson, 2000). Adicionalmente, o HCO_3^- excedente é transportado pelo sangue e ao atingir as brânquias o mesmo é desidratado (ácido carbônico), através da atividade da AC, para que ocorra a eliminação do CO_2 por difusão (e.g. Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000). Os rins, por possuírem duas isoformas de AC (citoplasmática e membrana associada), ambas envolvidas na secreção renal ácida e na reabsorção de HCO_3^- , possuem importante papel no auxílio das brânquias na compensação metabólica (Georgalis et al., 2006b). Portanto, durante os processos de correção da acidose

respiratória, com a ativação da enzima AC, as moléculas de CO_2 são constantemente hidratadas aumentando os níveis de HCO_3^- e H^+ no plasma, assim os H^+ podem ser excretados para o ambiente (principalmente através de trocas entre H^+/Na^+), enquanto o HCO_3^- é mantido no sangue como um tampão contra a queda de pH. Deste modo a ativação desta enzima, além de garantir a manutenção dos processos respiratórios e do pH sistêmico, garante por mecanismos de ajuste entre as taxas de excreção ácido-básicas nas brânquias, a captação iônica através da participação de trocadores sódio/prótons (Na^+/H^+ e/ou Na^+/H^+ -ATPase) e cloreto/bicarbonato ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) (e.g. Henry et al., 1988; Henry et al., 1995; Georgalis et al., 2006a; Perry e Gilmour, 2006).

A perturbação na homeostase foi acompanhada de elevados níveis de cortisol plasmático nos indivíduos de *R. quelen* expostos aos pontos analisados. Cortisol é o principal corticosteróide em peixes. O aumento nos níveis desse hormônio no plasma é uma das principais formas de identificação de estresse (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost, 2003; Portz et al., 2006). Exposição a diversos fatores causadores de estresse, tanto físicos quanto químicos, levam à elevação do cortisol plasmático. Dentre os fatores físicos podem-se citar alterações na salinidade, temperatura, manipulação e transporte dos animais (e.g. Roche e Bogé, 1996; Mommsen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 1997; Barcellos et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006). Dentre os químicos, a exposição à contaminação por efluentes resultantes de ações antrópicas (e.g. Hontela et al., 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; Camargo e Martinez, 2006), por exemplo a metais (e.g. Roche e Bogé, 1996; Wendelaar Bonga, 1997), e agrotóxicos (e.g. Wendelaar Bonga, 1997; Cericato et al., 2008; 2009). Neste estudo, a manutenção dos peixes em gaiolas para a realização dos experimentos *in situ* poderia ser mais um fator de estresse e, conseqüentemente, contribuir para o aumento nos níveis de cortisol plasmático. Contudo, isso não ocorreu. Peixes do ponto referência foram amostrados após a permanência

de uma semana na água dos tanques de Piscicultura do LAPEP, dentro ou fora das gaiolas. Apesar dos valores de cortisol plasmático medidos nesses indivíduos, em ambas as condições, terem sido superiores aos valores considerados normais para teleósteos (0-50 ng/mL; Wendelaar Bonga, 1997), especificamente para *R. quelen* (~ 30 ng/mL; Barcellos et al., 2001; 2004), não houve diferença entre os tratamentos (Tabela 1). A utilização de gaiolas, sem fatores adicionais de estresse, também não acarretou respostas de estresse em peixes da espécie *Coregonus lavaretus* (Soimasuo et al., 1995). Mesmo que a colocação em gaiolas resultasse em situação de estresse, gerando pico de cortisol plasmático, seria esperado que este retornasse aos seus níveis basais após ~2 dias, como já evidenciado em estudos anteriores realizados com outras espécies (Wendelaar Bonga, 1997; Camargo e Martinez, 2006; Oikari, 2006). Porém, é provável que os altos níveis de cortisol plasmático (81 – 260 ng/mL) evidenciados nos peixes amostrados após 7 dias nas gaiolas, representem, não somente a exposição às águas com diferentes níveis de contaminação, especialmente durante a estação do verão, mas também o estresse do transporte e manipulação a que todos os grupos, inclusive referência, foram submetidos. Adicionalmente, durante a estação de verão, cuja variação na temperatura da água foi de 22,7 a 27,1 °C, houve uma resposta de estresse muito mais pronunciada nos indivíduos de *R. quelen*, talvez pelo fato da temperatura ser um dos fatores abióticos que exerce maior influência sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas dos animais (Stien et al., 1998). Porém, diferentemente desse padrão evidenciado no verão, os peixes expostos ao ponto RPi 1 apresentaram valores de cortisol maiores no inverno. Resultados similares já haviam sido encontrados em peixes da espécie *Prochilodus lineatus* expostos *in situ* a rios contaminados por diferentes efluentes urbanos (Camargo e Martinez, 2006). Aumento nos níveis de cortisol no inverno está relacionado, provavelmente, com a necessidade de manutenção das taxas metabólicas dos peixes mesmo em condições mais frias, onde a tendência seria a redução do metabolismo.

Ainda com relação ao aumento nos níveis de cortisol, verificado nos peixes da grande Curitiba, esse padrão de resposta além de indicar estresse diante da exposição a condições desfavoráveis pode estar relacionado com os distúrbios osmorregulatórios identificados nestes peixes, já que o cortisol é um hormônio de grande importância para a manutenção do equilíbrio hidromineral (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost, 2003; Evans et al., 2005). Além disso, o aumento nas concentrações de cortisol no sangue promove a gliconeogênese, devido ao aumento da atividade metabólica e necessidade de disponibilização da reserva energética. A mobilização das reservas gera maior disponibilidade de glicose no sangue (hiperglicemia), considerada como uma resposta secundária de estresse necessária a manutenção ou busca da homeostase (Wendelaar Bonga, 1997; Almeida et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006). A determinação do cortisol e da glicose no plasma é considerada com uma das principais formas de determinação de estresse em peixes (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost et al., 2003; Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Aumento nos níveis de cortisol seguido de hiperglicemia também foi identificado em *Dicentrarchus labrax* expostos a manipulação, aumento de temperatura, redução de salinidade (Roche e Bogé, 1996); em *Prochilodus lineatus* expostos *in situ* a contaminantes resultantes de efluentes urbanos, industriais e agrícolas (Camargo e Martinez, 2006); em *Anguilla anguilla* expostas a efluente tratado de fábricas de celulose (Santos e Pacheco, 1996). Deste modo, o aumento nos níveis de cortisol e glicose identificados em *R. quelen* diante da exposição a diferentes níveis de contaminação durante a estação de verão pode ter sido um mecanismo adaptativo que permite ao organismo reverter o quadro de desequilíbrio na homeostase, através da hipersecreção de corticosteróides, seguido da ativação metabólica, aumento do débito cardíaco e do consumo de oxigênio, da mobilização de substratos energéticos e perturbação no equilíbrio hidromineral (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost et al.,

2003; Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008), exatamente como evidenciado neste estudo.

Mas, além da evidência clara de elevação dos níveis de cortisol e glicose identificados especialmente durante o verão, verificou-se padrão de redução do cortisol e da glicose ao longo do gradiente de aumento na poluição, dentro do grupo dos pontos amostrados na Grande Curitiba. Ou seja, conforme foi aumentando o impacto antropogênico sobre as águas foi reduzindo o nível de ambos os parâmetros (Figura 9). Este resultado nos permite inferir sobre uma possível perturbação endócrina, comumente causada pela exposição a poluentes ambientais, os quais têm a capacidade de suprimir a resposta do cortisol (Santos e Pacheco, 1996; Hontela et al., 1997; Wendelaar Bonga, 1997; Pacheco e Santos, 2001; Dorval et al., 2003; Cericato et al., 2008; 2009). Essa exposição à contaminação leva a hiperatividade e conseqüentemente ao esgotamento do sistema endócrino, assim como foi verificado em enguias (*Anguilla anguilla*) expostas a efluentes tratados de fábricas de celulose (Santos e Pacheco, 1996) e a produtos de petróleo (Pacheco e Santos, 2001), em *Esox lucius* e *Perca flavescens* expostos a efluentes de fábricas de papel (Hontela et al., 1997) e em *R. quelen* expostos a agrotóxicos, mais especificamente ao paration metílico de nome comercial Folidol 600 (Cericato et al., 2008). A explicação fisiológica mais provável para esta interrupção na resposta é a ocorrência da inibição da secreção de cortisol pelo tecido inter-renal, devido à redução na capacidade de resposta desse tecido ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Dorval et al., 2003; Cericato et al., 2008; 2009). Estudos sugerem que esta situação pode estar sendo causada pelo estresse oxidativo nas células inter-renais (Cericato et al., 2008; 2009), assim como foi identificado em *Oncorhynchus mykiss* quando expostos a pesticidas (Dorval et al., 2003), possibilidade que não pode ser descartada neste estudo, já que agroquímicos fazem parte dos elementos descartados em muitos dos rios analisados.

O processo de peroxidação lipídica também tem sido muito utilizado como biomarcador de efeito a xenobióticos. Muitas evidências indicam que a exposição aos mais variados tipos de poluentes tem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($^{\bullet}OH$), que são responsáveis pelo processo chamado de estresse oxidativo, que tem como uma de suas conseqüências a peroxidação dos lipídios (Lima e Abdalla, 2001; Wilhelm Filho et al., 2001, Zikic et al., 2001; Dorval et al., 2003; Pandey et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Gül et al., 2004; Almeida et al., 2005; Ferreira et al., 2005). A lipoperoxidação é um efeito citotóxico primário, desencadeado pela interação dos radicais livres com os ácidos graxos das membranas biológicas (Lima e Abdalla, 2001; Pandey et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Gül et al., 2004). A ocorrência desse processo é muito maior no fígado, que é o principal local de detoxificação de xenobióticos (e.g. van der Oost et al., 2003; Gül et al., 2004; Camargo e Martinez, 2007) e, conseqüentemente de máxima geração de radicais livres (Gül et al., 2004). A lipoperoxidação pode causar inúmeros danos às células e suas funções e até mesmo ocasionar morte celular (Lima e Abdalla, 2001; Wilhelm Filho et al., 2001, Dorval et al., 2003). Aumento na peroxidação no fígado foi encontrado em carás (*Geophagus brasiliensis*) diante da exposição a poluentes químicos (Wilhelm Filho et al., 2001), assim como em várias espécies da família Cyprinidae coletados de locais contaminados por esgoto urbano e efluentes agrícolas na Turquia (Gül et al., 2004), em *Platichthys flesus* obtidos de locais contaminados por metais e por compostos orgânicos (Ferreira et al., 2005) e, em espécimes de *R. quelen* expostos a herbicidas (Crestani et al., 2007). Em nosso estudo, houve aumento na peroxidação lipídica nos peixes expostos a água do ponto RPi 1 em relação aos pontos RMi, Zan e Zoo durante a coleta de verão. Esse ponto é o que apresenta menor impacto antrópico (Andreoli et al., 1999). Porém, o estresse oxidativo também pode ser influenciado pelo aumento na taxa metabólica (Wilhelm Filho et al., 2001; Gül et al., 2004; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010); por

alterações na estrutura branquial, ou ainda, pelo aumento na temperatura (Wilhelm Filho et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Ferreira et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006). Nessas situações os peixes aumentam não só a taxa metabólica, mas também a taxa de ventilação branquial, o que facilita o aumento da absorção de O₂. No entanto, esses processos fazem com que os peixes se deparem com um aumento no desequilíbrio entre produção e remoção de fatores oxidantes (radicais livres) (Dorval et al., 2003; Gül et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006). Deste modo, o estresse oxidativo contribui para a ocorrência de alterações fisiológicas nos peixes (Pandey et al., 2003) e, como a peroxidação lipídica pode ocorrer mesmo em situações de hipóxia (Gül et al., 2004), a ocorrência desse processo, devido ao aumento na taxa metabólica, pode ter contribuído para os distúrbios osmorregulatórios identificados nos peixes desse ponto, principalmente pela capacidade que esse processo tem de alterar o fluxo iônico e a permeabilidade das membranas biológicas (Lima e Abdalla, 2001). Em suma, não houve distinção ou padrão claro em termos de LPO nos peixes mantidos nos diversos pontos amostrados, nas duas estações. Este biomarcador não evidenciou diferenças entre os pontos, mostrando serem todos pelo menos parcialmente impactados.

6. Conclusão

- A exposição *in situ*, de uma espécie nativa (*R. quelen*) às diferentes fontes de contaminação da Bacia do Alto Rio Iguaçu, gerou alterações fisiológicas e bioquímicas capazes de limitar o organismo em realizar plenamente suas funções no ambiente;
- Essas alterações podem, satisfatoriamente, serem utilizadas como biomarcadores de contaminação em ambientes que apresentem misturas complexas de contaminantes;
- Do mesmo modo, a espécie *R. quelen* mostrou-se um excelente bioindicador das condições ambientais dessa região, e por ser uma espécie nativa, corrobora os possíveis impactos da contaminação sobre a comunidade ictiológica local;
- A sazonalidade exerceu grande influência sobre a dinâmica dos poluentes dessa região, bem como sobre as respostas dos peixes;
- Corroborou-se a existência de um gradiente de contaminação na região, com impactos mais evidentes na região da Grande Curitiba e a Jusante da Grande Curitiba.

7. Referências Bibliográficas

Abilhoa, V., Boscardin, C.R., 2004. A ictiofauna do alto curso do Rio Iguaçu na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná: perspectivas para sua conservação. *Sanare – Revista Técnica da Sanepar* 22: 58-65.

Abilhoa, V., Duboc, L.F., 2004. Peixes. In: Mikich, S.B., Bérnils, R.S. (Eds), Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná. 764p.

Abilhoa, V., 2005. Ictiofauna. In: Andreoli, C.V., e Carneiro, C. (Eds). *Gestão Integrada de Mananciais de Abastecimento Eutrofizados*. Ed. Gráf. Capital Ltda, Curitiba-PR, 500p.

Almeida, J.S., Meletti, P.C., Martinez, C.B.R., 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140: 356 – 363.

Andreoli, C.V., Dalarmi, O., Lara, A.I., Andreoli, F.N., 1999. Os Mananciais de Abastecimento do Sistema Integrado da Região Metropolitana de Curitiba. *SANARE – Revista Técnica da Sanepar* 12.

ArasHisar, S., Hisar, O., Yanik,T., Aras, S.M., 2004. Inhibitory effects of ammonia and urea on Gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17: 125-128.

Bagdonas, E., Vosyliene, M.Z., 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologija* 1: 8–13.

Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Itzéz, I. Krieger, M.H., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac. Res.* 32: 121-123.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Souza, C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.A., Terra, S., 2004. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* 237: 229-236.

Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldisserotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1734 – 1739.

Bockmann, F.A., Guazzelli, G.M., 2003. Heptapteridae (Heptapterides). In: R.E. Reis, S.O., Kullander, C.J., Ferraris Jr. (Eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre. Ed. PUCRS, Brasil. p. 406 – 431.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248–254.

Burnett, L.E., Woodson, P.B.J., Rietow, M.G., Vilicich, V.C., 1981. Crab gill intra-epithelial carbonic anhydrase plays a major role in haemolymph CO₂ and chloride ion regulation. *J. Exp. Biol.* 92, 243–254.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21: 61–69.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in na urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5(3):327-336.

Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Finco, J., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Anziliero, D., Barcellos, L.J.G., 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol.* 148: 281-286.

Cericato, L., Neto, J.G.M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Marqueze, A., Barcellos, L.J.G., 2009. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol.* 149: 363-367.

Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52: 83-91.

Crafford, D., Avenant-Oldewage, A., 2010. Bioaccumulation of non-essential trace metals in tissues and organs of *Clarias gariepinus* (sharp-tooth catfish) from the Vaal River system – strontium, aluminium, lead and nickel. *Water SA* 36(5): 621-640.

Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Lazzari, R., Duarte, M.F., Morsch, V.M., Pippi, A.L., Vieira, V.P., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 48–55.

Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67: 2305-2311.

Dorval, J., Leblond, V.S., Hontela, A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquat. Toxicol.* 63: 229 – 241.

Evans, D.H., 1987. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health Perspectives.* 71: 47-58.

Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97–177.

Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M.A., 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicol.* 71: 39–48.

Fontainhas-Fernandes, A., Luzio, A. Garcia-Santos, S., Carrola, J., Monteiro, S., 2008. Gill histopathological alterations in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to treated sewage water. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 5: 1057 – 1063.

Geers, C., Gros, G., 2000. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol. Rev.* 80: 681-707.

Georgalis, T., Perry, S.F., Gilmour, K.M., 2006a. The role of branchial carbonic anhydrase in acid-base regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 209: 518-530.

Georgalis, T., Gilmour, K.M., Yorston, J., Perry, S.F., 2006b. Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid-base balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291: F407-F421

Gül, S., Belge-Kurutas, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* 30: 605– 609.

Henry, R.P., Smatresk, N.J., Cameron, J.N., 1988. The distribution of branchial carbonic anhydrase and the effects of gill and erythrocyte carbonic anhydrase inhibition in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. *J. Exp. Biol.* 134: 201-218.

Henry, R.P., 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase in vitro: the electrometric delta pH and pH stat assays. In: Dodgson, S.J., Tashian, R.E., Gros, G., Carter, N.D. (Eds.): *The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics*. Plenum Press, New York, pp. 119–126.

Henry, R.P., Boutilier, R.G., Tufts, B.L., 1995. Effects of carbonic anhydrase inhibition on the acid base status in lamprey and trout. *Resp. Physiol.* 99: 241-248.

Henry, R.P., 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 523-538.

Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate as exchange organs. *Resp. Physiol.* 121: 1-12.

Hontela, A., Daniel, C., Rasmussen, J.B., 1997. Structural and functional impairment of the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish exposed to bleached kraft mill effluent in the St. Maurice River, Québec. *Ecotoxicology* 6: 1–12

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. 2004. Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do Estado do Paraná, no período de 1999 a 2004. Curitiba/PR. 74p.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. 2005. Monitoramento da qualidade das águas dos rios da região metropolitana de Curitiba, no período de 1992 a 2005. Curitiba/PR. 79p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2007. Contagem da população brasileira, Rio de Janeiro, Brasil. 311p.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2008. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Rio de Janeiro, Brasil, n.5. 479p.

Ingenito, L.F.S., Duboc, L.F., Abilhoa, V., 2004. Contribuição ao conhecimento da ictiofauna da Bacia do alto Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Arg. Ciên. Vet. UNIPAR. 7: 23 - 36.

Jiang Z.Y., Hunt J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylene orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. Anal. Biochem. 202: 384-389.

Lang, F., Busch, G.L., Ritter, M., Völkl, H., Waldegger, S., Gulbins, E., Häussinger, D., 1998. Functional significance of cell volume regulatory mechanisms. Physiol. Rev. 78: 247–306.

Leguen, I., Prunet, P., 2001. In vitro effect of various xenobiotics on trout gill cell volume regulation after hypotonic shock. Aquat.Toxicol. 53: 201–214.

Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Rev. Bras. Ciênc. Farmac. 37: 293-303.

Maack, R., 1981. Geografia física do estado do Paraná. 2 ed. Rio de Janeiro: Jose Olympio: Curitiba: Secretaria da Cultura e do esporte do Estado do Paraná. 442p.

Magalhães, D.P., Ferrão Filho, A.S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. Oecol. Bras. 12 (3): 355-381.

Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatu*. Braz. J. Biol., 64: 797-807.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish. 9: 211–268.

Oikari, A., 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. Aquat. Toxicol. 78: 370-381.

Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. Ecotoxicol. Environ. Saf. 49: 64-75.

Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total. Environ.* 309: 105 – 115.

Parvez, S., Sayeed, I., Raisuddin, S., 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 62-66.

Perry S.F., Gilmour, K.M., 2006. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 154: 199-215.

Pompeu, P.S., Alves, C.B.M., Callisto, M., 2005. The effects of urbanization on biodiversity and water quality in the Rio das Velhas Basin, Brazil. *Am. Fish. Soc. Symp.* 47: 11-22.

Portz, D.E., Woodley, C.M., Cech Jr, J.J., 2006. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 16: 125-170.

Prodocimo, V., Souza, C.F., Pessini, C., Fernandes, L.C., Freire, C.A., 2008. Metabolic substrates are not mobilized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon short-term salinity reduction. *Neotrop. Ichthyol.* 6(4):613-620.

Randall, D.J.; Brauner, C., 1998. Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A: 3-8.

Roche, H., Bogé, G., 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Mar. Environ. Res.* 41: 27-43.

Rogers, J.T., Richards, J.G., Wood, C.M., 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 64: 215 – 234.

Santos, M.A., Pacheco, M., 1996. *Anguilla anguilla* L. stress biomarkers recovery in clean water and secondary-treated pulp mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35: 96 – 100.

Silva, A.G., Martinez, C.B.R., 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23: 185-192.

Sofia, S.H., Silva, C.R.M., Galindo, B.A., Almeida, F.S., Sodr  L.M.K., Martinez C.B.R., 2006. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia* 553: 245–254.

Soimasuo, R., Jokinen, I., Kukkonen, J., Pet nen, T., Ristola, T., Oikari, A., 1995. Biomarker responses along a pollution gradient: Effects of pulp and paper mill effluents on caged whitefish. *Aquat. Toxicol.* 31: 329 – 345.

Stien, X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Rom o, M., Lafaurie, M., 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environ. Poll.* 99: 339 – 345.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57–149.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 122 C, 121–129.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.

Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (6): 719-726.

Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R., 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum* 23: 507-514.

Zikic, R.V., Stajn, A.S., Pavlovic, S.Z., Ognjanovic, B.I., Saicic, Z.S., 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of Goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol. Res.* 50: 105 – 111.

Apêndice 1. Média de dados de temperatura e umidade relativa do ar; temperatura, pH, saturação de oxigênio, oxigênio dissolvido e transparência da água obtidos no momento de colocação e retirada das gaiolas em cada um dos pontos amostrados. Média de dados de condutividade, alcalinidade, DBO, DQO, fósforo, nitrito, nitrato, nitrogênio amoniacal, nitrogênio kjedahal (nitrogênio total) e clorofila A fornecidos pelo IAP e LACTEC, e dados de pluviosidade fornecidos pelo SIMEPAR nos períodos de experimentação em ambas as estações de verão e inverno.

Pontos	Estação	Temp amb	Temp H ₂ O	pH	Sat. O ₂	OD	Transp.	Umid.	Pluv. dia	Pluv. 48h	Cond.	Alcal.	DBO	DQO	Fósf.	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	N Amon.	N total.	Clor. A
Ref	Verão	27,3	26,2	6,75	47,05	3,87	30	55,0	8,4	0,0	126	ND	6,0	27,0	0,157	0,018	0,470	0,032	0,420	ND
	Inverno	18,1	15,0	7,14	95,45	8,89	41	53,5	0,0	2,4	126	ND	6,0	27,0	0,158	0,018	0,470	0,033	0,440	ND
RPi 1	Verão	24,2	25,9	7,23	115,50	9,43	100	58,0	10,6	2,4	22	9,1	2,0	15,5	0,022	0,004	0,100	0,114	0,300	1,48
	Inverno	10,5	15,1	6,48	123,90	12,16	150	55,5	0,0	2,4	24	6,4	2,1	10,8	0,012	0,002	0,093	0,119	0,510	3,06
Rlr	Verão	24,1	26,0	7,76	103,45	8,39	63	54,5	10,6	2,4	61	20,5	3,4	26,3	0,031	0,002	0,034	0,068	0,833	13,63
	Inverno	12,3	15,7	6,99	90,35	8,82	77	55,0	0,0	2,4	66	19,3	3,0	31,0	0,036	0,002	0,020	0,030	0,885	19,16
RPa	Verão	27,6	27,1	8,65	108,65	8,60	150	55,0	27,7	2,4	128	54,5	2,0	10,5	0,041	0,006	0,065	0,124	0,215	2,38
	Inverno	18,1	17,4	8,37	93,15	13,80	150	47,5	0,0	2,4	122	54,4	2,0	4,8	0,004	0,012	0,300	0,086	0,195	3,20
RPi 2	Verão	24,5	22,7	6,83	93,05	8,02	63	55,5	10,6	2,4	42	ND	2,0	8,6	0,039	ND	ND	0,460	0,300	ND
	Inverno	11,6	12,0	6,77	84,60	8,77	150	58,0	0,0	2,4	29	ND	2,0	12,0	0,008	ND	ND	0,400	0,026	ND
RMi	Verão	27,2	23,9	6,52	64,30	5,47	33	55,0	8,4	0,0	75	3,4	12,4	12,0	0,031	0,660	0,245	1,280	109,500	90,50
	Inverno	18,9	14,0	6,70	69,15	6,71	140	66,0	6,7	0,0	77	2,1	12,0	17,9	0,035	0,570	0,150	0,630	83,000	67,00
Zan	Verão	22,7	24,8	7,41	82,80	6,89	90	56,5	2,4	2,8	94	ND	2,0	16,0	0,019	0,003	0,050	0,045	0,321	ND
	Inverno	15,8	15,7	6,87	98,20	10,42	130	66,5	2,4	13,4	94	ND	2,0	17,0	0,019	0,003	0,050	0,045	0,321	ND
Zoo	Verão	23,4	25,0	7,15	78,80	6,27	57,5	56,5	2,4	2,8	77	22,0	36,0	8,0	0,081	0,004	0,020	0,070	1,500	10,15
	Inverno	18,0	15,4	6,96	95,85	9,20	100	70,5	2,4	13,4	73	18,8	4,0	43,0	0,120	0,007	0,530	0,050	1,600	70,71
PBa	Verão	25,2	24,8	8,54	124,65	7,60	40	57,5	2,8	24,0	240	106,0	6,0	23,0	0,220	0,128	0,610	0,550	2,200	24,27
	Inverno	20,0	16,4	5,93	79,70	10,14	40	63,5	13,4	0,0	295	128,6	20,0	32,0	0,260	0,169	0,910	0,710	3,040	84,94
Gua	Verão	24,0	24,7	7,00	30,40	2,51	30	60,0	27,7	2,4	232	60,8	11,0	27,5	0,540	0,042	0,550	4,100	7,900	ND
	Inverno	16,8	14,2	6,34	9,00	0,92	40	54,5	0,0	2,4	171	52,6	12,0	30,0	0,410	0,054	0,260	2,550	6,350	ND

Dados de temperatura ambiente (Temp. amb., °C); temperatura da água (Temp. H₂O, °C); pH; saturação de oxigênio (Sat. O₂, %); oxigênio dissolvido (OD, mg/L); Transparência (Transp., cm); Umidade ambiente (Umid., %); Pluviosidade no dia (Pluv. dia, mm); Pluviosidade 48h antes (Pluv. 48h, mm); Condutividade (Cond., microS); Alcalinidade Total (Alcal., CaCO₃/mg l); Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO, mg/L O₂); Demanda Química de Oxigênio (DQO, mg/L); Fósforo total (Fosf., mg/L); Nitrito (NO₂⁻, mg/L); Nitrato (NO₃⁻, mg/L); Nitrogênio amoniacal (N Amon., mg/L); Nitrogênio kjedahal (N total; mg/L); Clorofila a (Clor. A, mg/m₃). Os valores medidos no momento da colocação e retirada das gaiolas não diferiram por mais de 7,4%.

Capítulo II: Poluição e comunicação química em jundiás
(*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824) expostos a águas da
Bacia do Alto Rio Iguaçu, Paraná

Sumário

Resumo.....	76
Abstract	78
1. Introdução	80
2. Objetivos	83
3. Materiais e Métodos	84
3.1 Animais: Coleta e manutenção em laboratório	84
3.2 Coleta das águas e exposição dos peixes às águas em laboratório	84
3.3. Desenho experimental e obtenção de dados comportamentais e amostras biológicas.	87
3.4. Análise das Amostras	89
3.4.1. Análises Comportamentais	89
3.4.2 Dosagem em sangue	90
3.4.3. Dosagens Plasmáticas	90
3.4.4 Dosagens em Tecido.....	91
3.5 Análise Estatística.....	93
4. Resultados	94
4.1 Micro-análise para identificação de elementos químicos no tecido branquial	95
4.2 Análises comportamentais.....	98
4.3 Dosagens sanguíneas e plasmáticas.....	100
4.4 Dosagens em tecido	103
5. Discussão	105
6. Conclusão	116
7. Referências Bibliográficas	117

Resumo

A alteração na qualidade da água em decorrência da deposição de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos tem levado à redução das condições adequadas para o desenvolvimento e sobrevivência dos peixes em ambientes aquáticos, especialmente de água doce. Essa condição não é diferente para a Bacia do Alto Rio Iguaçu, Paraná, Brasil. Exposição à contaminação afeta a saúde dos peixes e prejudica a interação do animal com o ambiente. Para verificar o impacto da contaminação presente na água dos rios que compõe a Bacia do Alto Rio Iguaçu foram escolhidos cinco pontos dessa região (Referência; Represa do Piraquara I; Rio Miringuava; Zoológico e Rio Barigui), baseados em um gradiente de contaminação. Indivíduos do bagre nativo, *Rhamdia quelen*, foram expostos por 7 dias, em condições laboratoriais, a água desses pontos durante as estações de verão e inverno, e avaliados em relação a alterações comportamentais (locomotora e de percepção química), fisiológicas (hematócrito, osmolalidade, íons, cortisol, glicose, teor hídrico) e bioquímicas (atividade da enzima anidrase carbônica branquial e renal, e lipoperoxidação), além de terem o tecido branquial avaliado quanto a presença de elementos químicos através de microscopia eletrônica de varredura (e EDS: espectroscopia de dispersão de energia dos elementos). Micro-análises para detecção de elementos químicos identificaram diferentes metais (Al, Cs, Cu, Nb, Ni, Sb, Si, Ti, W, Y, Zr) nas brânquias dos peixes de todos os locais avaliados, indicando influência antrópica em todas as regiões. Compatível com a presença desses elementos houve redução na percepção química e capacidade de reação à substância de alarme de seus co-específicos e de forma associada redução na osmolalidade, íons e glicose no plasma, aumento nos níveis de cortisol plasmáticos e no teor hídrico branquial, e ativação da atividade da enzima anidrase carbônica branquial e renal especialmente na coleta de verão, indicando influência da sazonalidade sobre as respostas dos peixes aos contaminantes. Devido ao fato do verão ser a estação mais quente e com maior índice pluviométrico, ocorre maior

disponibilidade dos elementos químicos na água. Essa disponibilidade associada ao aumento no metabolismo dos peixes facilita a absorção dos contaminantes o que pode ter gerado os efeitos tóxicos identificados nesta espécie, principalmente nos peixes do ponto Zoológico, os quais se mostraram mais vulneráveis à contaminação presente nessa região.

Abstract

The change in water quality due to the deposition of various organic and inorganic compounds has led to the reduction of suitable conditions for the development and survival of fish in aquatic environments, especially in freshwater. This condition is no different for the Upper Iguaçu River, Paraná, Brazil. Exposure to pollution affects the health of fish and affect the animal's interaction with the environment. To check the impact of contamination in the water of the rivers that make up the Upper Iguaçu River Basin five points in that region were chosen (Reference; Represa do Piraquara I; Rio Miringuava; Zoológico and Rio Barigui), based on an expected gradient of contamination. Individuals of a native catfish, *Rhamdia quelen*, were exposed for 7 days under laboratory conditions, to the water from these points during the summer and winter, and assessed for behavioral changes (locomotor and chemical perception), physiological (hematocrit, osmolality ions, cortisol, glucose, water content) and biochemical parameters (activity of the enzyme carbonic anhydrase branchial and renal, and lipid peroxidation). Gill tissue was evaluated for the presence of chemical elements by scanning electron microscopy (EDS). Micro-analysis for the detection of chemical elements identified different metals (Al, Cs, Cu, Nb, Ni, Sb, Si, Ti, W, Y, Zr) in the gills of fish from all sites measured, indicating human influence in all regions. Compatible with the presence of these elements, there was a reduction in chemical perception and ability to respond to the alarm substance of their conspecifics, and there was an associated reduction in osmolality, ions and glucose in plasma, increased levels of plasma cortisol and gill water content, and activation of the branchial and renal enzyme carbonic anhydrase. Changes were detected especially in summer, indicating the influence of seasonality on the responses of fish to contaminants. Because summer is the hottest season and with greater rainfall, there is greater availability of chemical elements in water. This availability, associated with an increase in fish metabolism,

facilitates the absorption of contaminants that may have caused the toxic effects identified in this species, especially in the fish of the Zoológico.

1. Introdução

A qualidade da água é um dos fatores mais importantes para o bem estar dos peixes, seja em cultivo ou em ambiente natural. Porém, a contaminação ambiental por uma série de compostos orgânicos e inorgânicos tem alterado o ambiente aquático e, conseqüentemente, as condições adequadas para o desenvolvimento e sobrevivência dos peixes (revisado em Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006; Lüring e Scheffer, 2007). Exposições mesmo que a baixas concentrações e por curto prazo a contaminantes ambientais podem afetar significativamente a dinâmica das comunidades ictiológicas (revisado em Fleeger et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006). A incapacidade de interação do animal com o ambiente tem sido apontada como o efeito mais preocupante em estudos ambientais na última década (revisado em Fleeger et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Essa falta de interatividade pode ser resultado de estresse, cujas respostas podem ser identificadas através de alterações em vários níveis da organização biológica, por exemplo, molecular, fisiológico, bioquímico ou comportamental. Estas alterações são detectadas em tecidos, fluidos corpóreos ou no organismo inteiro, sob efeito da exposição a fatores naturais ou fatores antrópicos como a exposição à xenobióticos (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Recentemente, as respostas comportamentais passaram a ser bastante utilizadas em estudos de estresse em peixes, por representarem a interação entre as respostas fisiológicas do animal e o meio em que ele vive. Essas respostas servem satisfatoriamente como indicadoras de alterações subletais, as quais permitem uma melhor compreensão dos efeitos da poluição sobre o animal, antecipando estimativas de efeitos subseqüentes sobre as populações de peixes de locais impactados (revisado em Fleeger et al., 2003; van der Oost et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Lüring e Scheffer, 2007; Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Uma das mais importantes respostas comportamentais em peixes de fundo, de águas turvas ou de hábito noturno é a resposta a estímulos olfativos, por quimiorrecepção. É a forma de comunicação mais rápida e de longo alcance para estes peixes, em ambientes que não favorecem sinais visuais e auditivos (Wudkevich et al., 1997; Kristensen e Closs, 2004; Giaquinto e Volpato, 2005; Carreau-Green et al., 2008). Este sentido permite aos peixes interagirem com outras espécies e com seus co-específicos (revisado em Smith, 1992; Scott e Sloman, 2004; Lüring e Scheffer, 2007). Alterações neste padrão de resposta causadas pela exposição a poluentes, que interfiram sobre a recepção ou transmissão dos estímulos químicos causam sérias implicações sobre a dinâmica das populações e suas comunidades. A incapacidade de interação comportamental diante de modificações no ambiente resulta em mortalidade (revisado em Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006; Lüring e Scheffer, 2007). Uma das formas de comunicação química mais estudada nos últimos anos se relaciona com o comportamento desencadeado pelo rompimento de células especializadas na pele dos peixes, chamadas de células de alarme, ou células *club* (e.g. Wisenden e Smith, 1997; 1998; Kristensen e Closs, 2004; Carreau-Green et al., 2008). Estas células são encontradas na epiderme dos peixes que compõe a superordem Ostariophysi e quando rompidas liberam uma substância de alarme composta por uma base púrica 3 (N)-óxido de hipoxantina, capaz de desencadear respostas de alarme e estresse em peixes (revisado em Smith, 1992). Porém, apesar do grande número de estudos realizados sobre estas células, poucos são aqueles que incluem espécies neotropicais e que avaliam a influência da presença de compostos químicos na água, sobre a percepção desta substância (e.g. Kochhann et al., 2009).

Bagres da espécie *Rhamdia quelen*, popularmente conhecidos como jundiás, pertencentes a superordem Ostariophysi, ordem Siluriformes, família Heptapteridae, são nativos e possuem distribuição neotropical, desde o sudeste do México até a região sul da Argentina (e.g. Bockmann e Guazzeli, 2003; Barcellos et al., 2004a,b; Borges et al., 2004). Essa

espécie tem despertado grande interesse econômico e comercial (e.g. Barcellos et al., 2001; 2004a; Crestani et al., 2007), e conseqüentemente muitos são os estudos, inclusive de efeitos de contaminantes, que utilizam a mesma (e.g. Crestani et al., 2006; 2007; Becker et al., 2009). Apesar disso, poucas são as avaliações realizadas com esta espécie em ambiente natural (e.g. Becker et al., 2009), e que avaliem a influência de contaminantes sobre a percepção química desses animais (e.g. Kochhann et al., 2009). Adicionalmente, são inexistentes os estudos que consideram o efeito das misturas complexas de contaminantes sobre a quimiorrecepção de substâncias de alarme, e sinais paralelos de estresse fisiológico.

A bacia do Alto Rio Iguaçu detém os principais rios formadores dos mananciais de abastecimento público de Curitiba e região metropolitana. O crescimento desordenado em ocupação urbana, industrial e de agricultura dessas regiões gerou redução da qualidade das águas de muitos dos rios formadores dessa bacia (Andreoli et al., 1999; Abilhoa e Boscardin, 2004). Ambientes aquáticos de regiões antropizadas recebem diariamente descargas de efluentes, os quais introduzem nesses ambientes uma grande variedade de compostos químicos orgânicos e inorgânicos. A exposição a essas substâncias gera efeitos ecotoxicológicos sobre os sistemas naturais, principalmente quando se trata de misturas complexas de contaminantes (e.g. Winkaler et al., 2001; Camargo e Martinez, 2006; 2007; Silva e Martinez, 2007), de modo que para a compreensão adequada desses efeitos é necessário avaliar, de forma integrada, respostas metabólicas e comportamentais dos peixes.

2. Objetivos

- Avaliar em laboratório as respostas comportamentais (locomotora e de exploração ambiental) de espécimes de *R. quelen* expostos à águas potencialmente contaminadas por efluentes domésticos, agrícolas e industriais provenientes do Alto Rio Iguaçu;
- Avaliar o impacto desta contaminação sobre a percepção química de substância de alarme de seus co-específicos;
- Identificar no tecido branquial, por meio de micro-análises, elementos químicos que sejam potencialmente prejudiciais a homeostasia desta espécie;
- Relacionar as respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas destes animais com a presença de contaminantes na água, estimando o impacto dessa contaminação em longo prazo sobre a comunidade ictiológica local.

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais: Coleta e manutenção em laboratório

Neste estudo sessenta juvenis ($47,7 \pm 1,8$ g e $18,7 \pm 3,2$ cm) e dois adultos (87 ± 3 g e $33 \pm 2,7$ cm) de jundiás foram obtidos do tanque de criação do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LAPEP, PUC-PR, $25^{\circ}35'S$, $49^{\circ}13'W$) no município de São José dos Pinhais, região metropolitana de Curitiba. Os peixes foram transportados até o Laboratório de Estudos em Estresse Animal do Departamento de Fisiologia, na Universidade Federal do Paraná (UFPR) por aproximadamente 45 minutos, em água do tanque de criação e sob aeração constante. No laboratório, os peixes foram colocados no tanque de aclimatação (~250 L) contendo água declorada, sob aeração e filtração biológica constante, fotoperíodo 12h claro: 12h escuro, e temperatura de $20 \pm 2^{\circ}C$, por um período de 7 dias. A colocação dos animais no aquário de aclimatação respeitou a densidade estabelecida por Barcellos et al. (2004 a,b), que é de ~75 peixes/250L. Os animais receberam diariamente uma quantidade total de 20 g de ração comercial (extrusada, Supra, 32% de proteína). Após 30 minutos a ração que restava era imediatamente retirada do tanque. Em seguida as paredes internas e os filtros biológicos do tanque eram limpos para a retirada de qualquer resíduo. Não houve mortalidade no período de aclimatação em laboratório.

3.2 Coleta das águas e exposição dos peixes às águas em laboratório

Foram determinados cinco pontos de coleta de água ao longo da bacia do Alto Rio Iguaçu, conforme histórico da contaminação na região. Os pontos escolhidos foram: (1) Referência (água do tanque de criação); (2) Represa do Piraquara I; (3) Rio Miringuava; (4) Zoológico; e (5) Rio Barigui (Figura 10). O ponto Referência (REF) é o local de onde foram obtidos os peixes, tanques de criação de uma piscicultura particular, os quais são escavados na terra, cheios com água proveniente de poços artesianos e mantidos a céu aberto. A região

onde se localiza esta piscicultura, apesar de ser uma região já urbanizada, apresenta atividade antrópica pouco intensa. A represa do Piraquara I (PIR) é uma das principais represas para abastecimento público de Curitiba e região metropolitana. Esse reservatório foi considerado como moderadamente degradado (IAP, 2004). Apesar disso, a água dessa região é considerada uma das mais limpas, já que está localizada próxima à cabeceira de seus rios formadores, em uma região de pouca ocupação e atividade antrópica (Andreoli et al., 1999). O rio Miringuava (MIR), por sua vez, pertence a uma área considerada como contaminada. A região onde se localiza este rio apresenta intensa atividade humana, sendo caracterizado por desmatamento e intensa atividade de extração de areia. A água dessa região recebe constantemente descargas de efluentes provenientes da agricultura, pois ao longo deste rio existem colônias em que a prática da agricultura convencional é praticada com uso intensivo de agrotóxicos. Adicionalmente, a região mais à jusante deste rio possui várias indústrias de grande porte (Andreoli et al., 1999). O ponto Zoológico (ZOO) é localizado dentro de um parque municipal da cidade de Curitiba. Esta região se caracteriza pela presença de um complexo de cavas de extração de areia abandonado, marginais ao leito do rio Iguaçu, cercado por ocupações irregulares. Estes corpos d'água recebem diariamente grande carga de efluentes domésticos e da criação de animais. Este ponto sofre ainda com a descarga de efluentes provenientes de uma grande oficina mecânica ferroviária a montante. A água do rio Iguaçu que abastece estas cavas, segundo o órgão ambiental responsável, foi considerada entre os anos de 1992 a 2005 como poluída (IAP, 2005). Além disso, essa região possui baixo fluxo de água, a qual é renovada apenas em períodos de intensa chuva. O ponto no rio Barigui (BAR) também é localizado dentro de um parque municipal da cidade de Curitiba. Este ponto é o mais contaminado, pois o mesmo recebe descargas diretas de efluentes urbanos (esgoto), além de haver indícios do aporte de efluentes de uma fábrica de papel a montante, e de chorume

proveniente de um cemitério às margens do seu leito. Essa região foi classificada pelo órgão ambiental do Estado como criticamente degradada a muito poluída (IAP, 2004; 2005).

Desses pontos foram coletados 90 litros de água em galões plásticos (30 L). Esses galões foram levados até o laboratório na UFPR, onde a água foi filtrada com peneiras de 200 μm , para a retirada de resíduos, partículas e possíveis parasitas. Em seguida, a água foi distribuída nos aquários previamente identificados com o nome de cada um dos pontos: 3 aquários para cada ponto, cada aquário com 30 litros de água. Os aquários recebiam aeração e permaneciam tampados com filme plástico por 24h. Após esse período, foram medidos o oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água do aquário (Tabela 2) e os peixes, que já estavam aclimatados a condições laboratoriais, foram então distribuídos, individualmente, pelos aquários experimentais. Os peixes permaneceram por 7 dias nessas águas até o início do protocolo experimental. Vinte e quatro horas antes do início do experimento os peixes foram privados de alimentação. Esse procedimento foi repetido duas vezes, de forma independente, no verão e no inverno, totalizando 6 peixes para cada ponto/água em cada uma das estações. Ao final do período experimental foi novamente medido o oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água do aquário (Tabela 2).

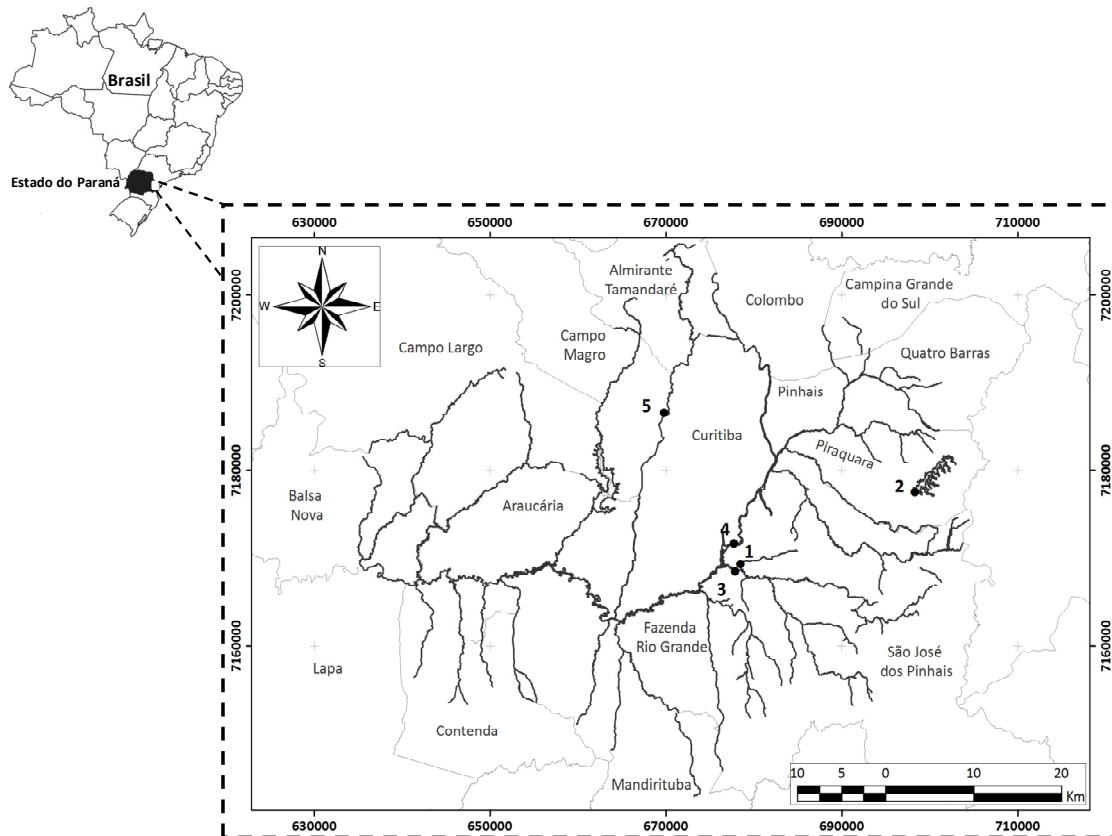


Figura 10. Mapa do Brasil com a localização do Estado do Paraná (em preto), e em destaque a Bacia do Alto Rio Iguaçu, que abrange Curitiba e sua região metropolitana. Os círculos pretos com números ao lado correspondem aos cinco pontos amostrados: 1 – Referência (REF); 2 – Represa do Piraquara I (PIR); 3 – Rio Miringuava (MIR); 4 – Zoológico (ZOO); 5 – Rio Barigui (BAR).

3.3. Desenho experimental e obtenção de dados comportamentais e amostras biológicas

A determinação da atividade locomotora e de exploração do ambiente ocorreu através de filmagem individual dos aquários de cada uma das condições experimentais por 30 minutos. Para isso, os aquários foram previamente divididos em quadrados (7 cm de lado, chamados de quadrantes) em sua parede frontal, de modo a permitir a identificação do local do aquário ocupado pelo peixe em eixos “x-horizontal” e “y-vertical” (Figura 11). No seu eixo horizontal o aquário tinha 7 quadrados (total 49 cm), e no seu eixo vertical, 2 quadrados (total 14 cm). Os primeiros 15 minutos de filmagem serviram para determinação da resposta comportamental do animal à água de cada um dos locais, sem a substância de alarme. Durante o tempo em que transcorria esta filmagem, preparou-se o homogeneizado tecidual, para

extração da substância de alarme, a partir de células de alarme (células club) presentes em fragmentos de pele retirados de dois indivíduos adultos de jundiá. Esses indivíduos foram anestesiados com benzocaína (80 mg/L; ~ 2 min) e em seguida mortos por secção medular. Os fragmentos de pele, juntamente com uma pequena porção muscular (~6 g), foram retirados de ambos os lados do corpo destes peixes e em seguida macerados em 60 mL de água ultra-pura, em cadinho de porcelana através de um pistilo, resultando em uma solução de concentração 10%. Essa solução foi filtrada, diluída (1:2) com água ultra-pura, para uma concentração final de 5%. Essa solução foi utilizada imediatamente após o preparo através da aplicação de 2 mL da mesma sobre a pedra do aerador, posicionado no lado direito do aquário, com o auxílio de um pipetador (Figura 11). Este procedimento visou garantir imediata dispersão do extrato. Após a introdução da substância de alarme, os peixes foram filmados por mais 15 minutos, os quais serviram para a determinação da influência da qualidade da água sobre a percepção química dos jundiás.

Após o período total de filmagem (30 min), os peixes expostos às águas da bacia do Alto Rio Iguaçu e a substância de alarme de co-específicos foram anestesiados em benzocaína (80 mg/L; ~ 2 min) e tiveram sangue retirado por punção da veia caudal, através de seringas de insulina heparinizadas (Liquemine® - heparina sódica). Uma pequena alíquota serviu para a determinação do hematócrito, e o restante foi imediatamente centrifugado para a obtenção do plasma. O plasma foi congelado a -20°C até a realização das dosagens de osmolalidade, íons (cloreto, sódio, magnésio, potássio), glicose e cortisol. Em seguida os peixes foram mortos por secção medular com auxílio de um bisturi para serem dissecados e terem seus tecidos (brânquias, rins, fígado e músculo) retirados. O maior arco branquial do lado direito foi retirado de três peixes de cada grupo (5 grupos), para posterior detecção de elementos químicos impregnados no tecido (n = 15 no verão e 15 no inverno). O maior arco branquial do lado esquerdo de todos os peixes (n total = 60) foi separado para a determinação do teor

hídrico do tecido. A hidratação tecidual foi também quantificada em fragmento muscular (músculo axial, lado esquerdo). O restante dos arcos branquiais, de ambos os lados, foram congelados a -80°C para posterior determinação da atividade específica da enzima anidrase carbônica. O rim e o fígado foram removidos de cada animal e congelados a -80°C para posterior determinação da atividade específica da anidrase carbônica (rim) e da peroxidação lipídica (fígado). Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 241 emitido em 9 de Agosto de 2007).

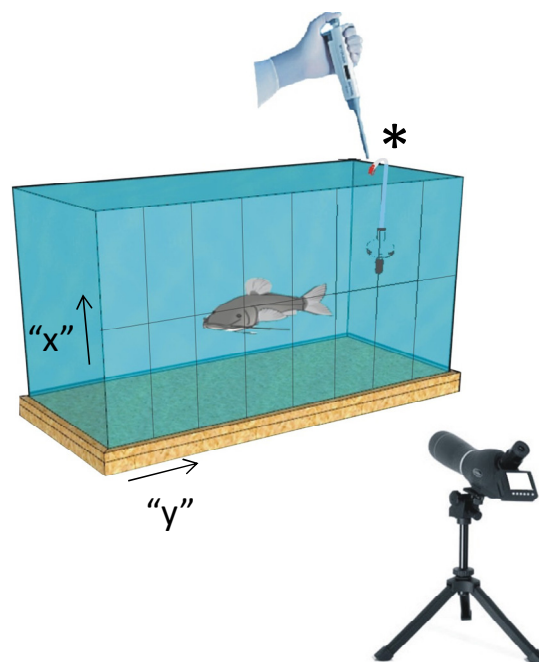


Figura 11 – Modelo esquemático do aquário utilizado para análise comportamental de *Rhamdia quelen*, com indicações dos eixos de avaliação da atividade locomotora (setas, “x” e “y”) e o ponto de aeração e colocação da substância de alarme (*).

3.4. Análise das Amostras

3.4.1. Análises Comportamentais

Para a análise das respostas comportamentais, seguiu-se o protocolo descrito por Jordão e Volpato (2000). As fitas de vídeo (VHS) com as filmagens foram assistidas e a localização de cada um dos peixes nos quadrantes dos aquários foi anotada (dados de

ocupação) a cada 30 segundos ao longo do tempo total de filmagem (30 min). O quadrante ocupado significava onde estava a cabeça do animal, pois eles eram maiores do que os quadrados desenhados. Os dados foram tabulados com relação aos eixos “x” e “y” desenhados nos aquários, quantificando assim o espaço ocupado pelo peixe durante o tempo de observação. Com a média ponderada de ocupação dos peixes nos quadrantes destes eixos (coordenadas baricêntricas), calculou-se a dispersão espacial (em cm), que corresponde ao raio de ocupação do animal no aquário. Também foi quantificado o tempo em que o peixe estava se locomovendo dentro do aquário (em segundos), em ambos os períodos de filmagem, sem e com substância de alarme, o qual corresponde à atividade locomotora de cada peixe.

3.4.2 Dosagem em sangue

Hematócrito

O hematócrito foi determinado através de capilares heparinizados (Perfecta LTDA), centrifugados a $\sim 3.000 \times g$ por 10 minutos (Micro centrífuga Presvac CMH 28), com leitura da porcentagem em volume ocupada pelas hemácias realizada através de escala de hematócrito.

3.4.3. Dosagens Plasmáticas

Osmolalidade e Íons

A osmolalidade foi determinada em amostras de plasma sem diluição, através do micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor® 5520 VAPRO. Os íons cloreto (Cl^-) e magnésio (Mg^{2+}) foram determinados, através de kits colorimétricos comerciais (Labtest®), em amostras plasmáticas sem diluição lidas em espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech), com leituras de absorbância 470 e 505 nm, respectivamente. Os íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram determinados através da leitura em fotômetro de chama (CELM FC – 180), em amostras de plasma diluídas (1:100) em água Mili-Q.

Glicose

A glicose plasmática foi determinada em amostras sem diluição através de kit comercial colorimétrico (Labtest®) com leitura de absorvância a 505 nm (espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech).

Cortisol

O cortisol plasmático foi determinado em amostras sem diluição através de kits comerciais (Human Diagnostics Worldwide®), com leituras de absorvância a 450 nm e com comprimento de onda de referência de 630 nm (ELISA Tecan R.Chisto Infinite M200).

3.4.4 Dosagens em Tecido

Espectroscopia por Dispersão de Energia (EDS)- Microscopia eletrônica de varredura

Três peixes de cada grupo, em ambas as estações, tiveram três arcos branquiais do seu lado direito (n=15) retirados e acondicionados em frascos contendo o fixador glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2, por 16 horas em temperatura ambiente. Após a fixação as brânquias foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M (3 vezes, 10 min cada) e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (15 min, no escuro e em temperatura ambiente). Em seguida, as brânquias foram novamente lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M (como descrito acima) e foram desidratadas em série alcoólica 50%, 70%, 90% e 100% (15 min em cada solução). As amostras foram então submetidas ao ponto crítico (Critical Point Drier Bal-Tech CPD-030) utilizando CO₂ como líquido de transição até a secagem completa do tecido. Em seguida o material foi coberto por uma fina camada de ouro (Au) (SCD-030 Balzers Union FL9496), observadas em microscópio eletrônico de varredura (Jeol, JSM – 6360LV Scanning Electron Microscope), com distância de trabalho de 10 mm e voltagem de 15 kV. A análise do material foi feita por meio do software Noran System Six para a detecção e identificação de elementos químicos. Foram captadas

informações da presença de elementos químicos em 10 campos aleatórios, em cada brânquia analisada (Figura 12).

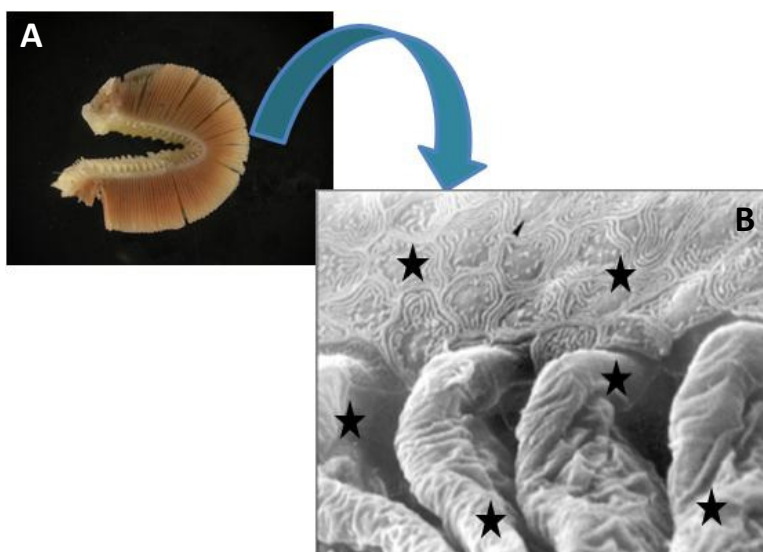


Figura 12 – Imagem representativa da brânquia *in natura* (A) e obtida por microscopia eletrônica de varredura após fixação, ponto crítico e metalização (B). Estrelas correspondem a alguns dos campos de detecção de elementos químicos no tecido branquial.

Teor hídrico branquial e muscular

A porcentagem de água foi determinada em amostras de brânquia ($0,1190 \pm 0,01g$; $n=60$) e músculo ($0,1450 \pm 0,01g$; $n=60$). Ambos os tecidos foram descongelados e pesados (peso úmido) em balança analítica (Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1mg, Brasil) e, em seguida, desidratados a $60^{\circ}C$ por 24h (estufa BIOPAR S22ST). Ao final do período os tecidos foram novamente pesados e a perda de peso (=água) foi expressa em relação ao peso úmido inicial da amostra, como porcentagem.

Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica (AC)

A atividade específica da enzima anidrase carbônica foi determinada em amostras de brânquia ($0,0980 \pm 0,003g$; $n=60$) e rim ($0,1431 \pm 0,005g$, $n=60$) de *Rhamdia quelen* através do método descrito por Vitale et al. (1999), baseado em Henry (1991) e Burnett et al. (1981). A

atividade da anidrase carbônica (AAC) foi expressa como: $AAC = [TC/(TNC - 1)]/mg$ de proteína total.

Liperoxidação (LPO - método FOX)

O ensaio de liperoxidação foi realizado em amostras de fígado ($0,1197 \pm 0,001g$, $n=60$) através do método de FOX, seguindo o protocolo descrito por Jiang et al. (1992), com leitura de absorbância das amostras a 560 nm (ELISA ELX 800 Auto Reader da Meridian Diagnostics Inc).

Quantificação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados teciduais (brânquias, rins e fígado) utilizada para a quantificação da atividade específica da enzima anidrase carbônica e de liperoxidação foi determinada segundo o protocolo descrito por Bradford (1976), com leitura de absorbância feita a 595 nm (ELISA Tecan R.Chisto Infinite M200).

3.5 Análise Estatística

A análise estatística dos dados abióticos da água e das respostas fisiológicas dos animais foi realizada através de análise de variância de duas vias (pontos amostrados X estações do ano). A ANOVA foi seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, para localização das diferenças. Para as respostas comportamentais foi utilizada análise de variância de duas vias para medidas repetidas; fator 1: pontos amostrados (como descrito acima); fator 2: antes e depois da colocação da substância de alarme. Sendo que nestas condições foram realizadas ANOVAs separadas para as estações do verão e do inverno. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* SigmaStat 2.3®. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Para todos os resultados, o nível de significância considerado foi de 0,05.

4. Resultados

Os dados abióticos (temperatura, saturação de oxigênio e pH) obtidos das águas em cada uma das estações de coleta estão apresentados na Tabela 2. Não houve diferença entre os pontos, para todas as variáveis analisadas, em uma mesma estação de coleta (verão ou inverno). Houve diferença em um mesmo ponto, entre os valores de verão e inverno. A temperatura da água foi sempre $\sim 11^{\circ}\text{C}$ superior no verão, para todos os pontos ($P < 0,001$). Houve maiores valores de saturação de oxigênio na água no inverno do que no verão, nos pontos REF, PIR e BAR ($P < 0,001$).

Tabela 2. Dados de temperatura (TEMP), saturação de oxigênio (O_2) e pH da água dos aquários referência e experimentais, obtidos nas estações de verão e inverno.

Pontos	Estação	Temp ($^{\circ}\text{C}$)	O_2 (%)	pH
Referência	Verão	25,3 \pm 0,3*	89,3 \pm 1,0*	7,5 \pm 0,4
	Inverno	13,5 \pm 0,2	101,6 \pm 1,8	7,4 \pm 0,4
Piraquara	Verão	25,0 \pm 0,2*	90,8 \pm 0,9*	7,8 \pm 0,3
	Inverno	13,8 \pm 0,2	99,0 \pm 2,7	6,9 \pm 0,2
Miringuava	Verão	25,3 \pm 0,3*	89,8 \pm 1,2	7,4 \pm 0,3
	Inverno	13,7 \pm 0,2	94,4 \pm 1,6	7,2 \pm 0,2
Zoológico	Verão	25,4 \pm 0,2*	88,8 \pm 1,5	7,7 \pm 0,4
	Inverno	13,6 \pm 0,2	92,7 \pm 2,6	7,5 \pm 0,4
Barigui	Verão	24,9 \pm 0,2*	86,7 \pm 2,3*	8,0 \pm 0,4
	Inverno	13,6 \pm 0,2	96,2 \pm 2,9	8,0 \pm 0,5

Dados apresentados como média \pm erro padrão da média. Asteriscos correspondem a diferenças entre os valores de verão e inverno para um mesmo ponto de coleta.

4.1 Micro-análise para identificação de elementos químicos no tecido branquial

Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS) – Microscopia eletrônica de varredura

A detecção de elementos químicos através de espectroscopia por dispersão de energia em microscópio eletrônico de varredura identificou 19 elementos químicos impregnados nos tecidos branquiais de *Rhamdia quelen*, expostos tanto à água referência quanto às águas experimentais. O número de elementos detectados em pelo menos um dos campos observados em pelo menos um jundiá passou de 8 nos peixes expostos a água do ponto REF para 16 nos peixes expostos a água do ponto ZOO, o qual apresentou o maior número de elementos detectados. Adicionalmente, a soma total entre as ocorrências de elementos detectados em todos os pontos avaliados no verão (134) foi maior que no inverno (113) (Tabela 3). Os elementos C, O, Ca, Na, K, Mg, N são considerados constitutivos. Contudo, mesmo nas brânquias dos peixes expostos a água do ponto REF foram detectados, em pelo menos um peixe, elementos como: alumínio, cobre, níquel e tungstênio. Nos peixes expostos à água do ponto PIR foram identificados: alumínio, cobre, ítrio, titânio e tungstênio. Os peixes expostos à água do ponto MIR apresentaram em suas brânquias: cobre, titânio, alumínio, ítrio, zircônio e níquel. Nos peixes expostos à água do ZOO, o qual apresentou maior número de elementos, foi registrada a presença de níquel, tungstênio, cério, fósforo, nióbio, cobre, ítrio, alumínio, antimônio, titânio e silício. Já os peixes do ponto BAR apresentaram apenas níquel, alumínio, fósforo e tungstênio (Tabela 3; Figura 13 A-E).

Tabela 3. Ocorrência dos elementos químicos detectados por meio de Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS), por microscopia eletrônica de varredura com distância de trabalho de 10 mm, em brânquias de *Rhamdia quelen* expostos por 7 dias, em condições laboratoriais, a águas dos pontos Referência (REF); Represa do Piraquara I (PIR), Rio Miringuava (MIR), Zoológico (ZOO) e Rio Barigui (BAR) nas estações de verão/inverno.

Elementos químicos detectados																			
	Al	C	Ca	Cs	Cu	K	Mg	N	Na	Nb	Ni	O	P	Sb	Si	Ti	W	Y	Zr
REF	0/1	5/5	-	-	5/5	-	1/0	1/1	-	-	1/1	2/1	-	-	-	-	1/0	-	-
PIR	2/2	5/4	4/2	-	4/4	-	-	3/2	3/3	-	4/1	2/2	-	-	-	2/1	1/2	1/4	-
MIR	5/1	5/5	1/1	-	5/5	1/0	-	2/0	0/3	-	3/2	4/2	-	-	-	2/2	-	4/1	1/0
ZOO	3/3	5/4	5/2	2/1	5/4	-	-	0/1	2/2	1/1	3/4	3/2	1/1	1/0	0/1	0/1	1/1	1/0	-
BAR	1/1	5/5	3/3	-	-	-	-	1/1	4/3	-	5/3	1/0	2/5	-	-	-	2/0	-	-

Número de campos analisados nas brânquias em que apareceram os elementos: alumínio (Al), carbono, (C), cálcio (Ca), cobre (Cu), potássio (K), magnésio (Mg), nitrogênio (N), sódio (Na), nióbio (Nb), níquel (Ni), oxigênio (O), fósforo (P), antimônio (Sb), silício (Si), titânio (Ti), tungstênio (W), ítrio (Y), zircônio (Zr) no tecido branquial de *R. quelen*. O número de brânquias analisadas por grupo foi 3, em ambas as estações de coleta. “-” = elementos não encontrados durante a análise. O valor à esquerda da barra representa o número de ocorrências no verão, e o valor à direita representa o número de ocorrências no inverno.

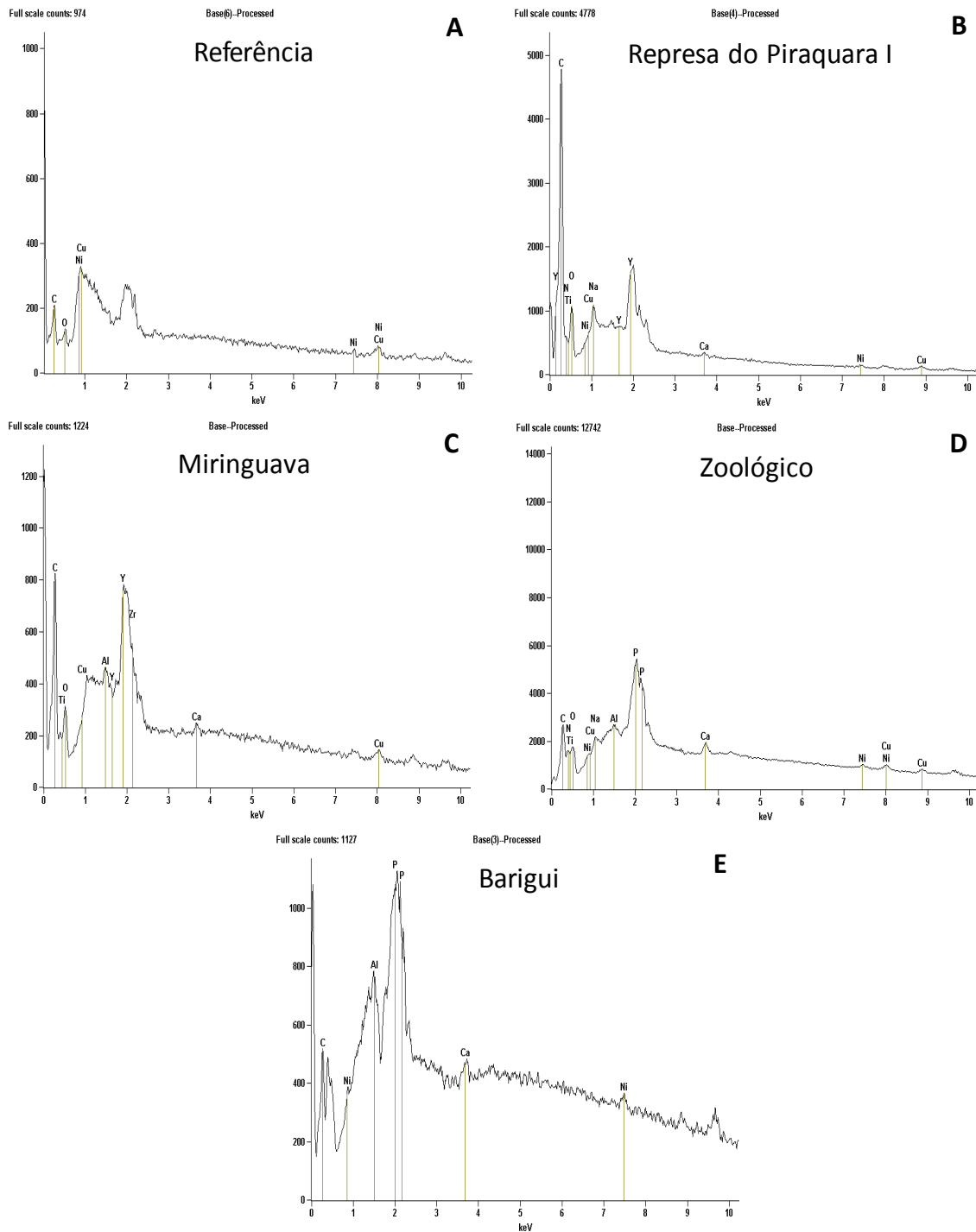


Figura 13. Exemplos de representação gráfica dos resultados obtidos através da análise de Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS), realizada por microscopia eletrônica de varredura com distância de trabalho de 10 mm, em brânquias de *Rhamdia quelen* após exposição de 7 dias, em condições laboratoriais, a águas dos pontos (A) Referência (REF; n=6, 3 no verão e 3 no inverno); (B) Represa do Piraquara I (PIR; n=6), (C) Rio Miringuava (MIR; n=6), (D) Zoológico (ZOO; n=6) e (E) Rio Barigui (BAR; n=6).

4.2 Análises comportamentais

Não houve diferença na dispersão e no tempo de locomoção de *Rhamdia quelen* expostos às águas dos cinco pontos antes da colocação da substância de alarme de co-específicos nas coletas de verão e de inverno. Após a colocação da substância de alarme houve aumento na dispersão dos peixes expostos à água do ponto REF ($P=0,012$) e BAR ($P=0,016$) na coleta de verão (Figura 14 A e B). Adicionalmente, houve redução na dispersão dos peixes submetidos às águas dos pontos PIR ($P=0,013$) e ZOO ($P=0,026$) em relação aos peixes do ponto REF nesta mesma estação. Os peixes expostos à água do ponto REF aumentaram, seu tempo de locomoção ($P=0,022$), enquanto que os peixes expostos à água do ponto BAR demonstraram maior tempo de locomoção do que os peixes expostos às águas dos pontos PIR ($P=0,046$) e ZOO ($P=0,021$), após a colocação da substância de alarme, na coleta de verão. A colocação da substância de alarme gerou redução no tempo de locomoção apenas nos peixes expostos a água do ponto ZOO ($P=0,017$) na coleta de inverno (Figura 14 C e D).

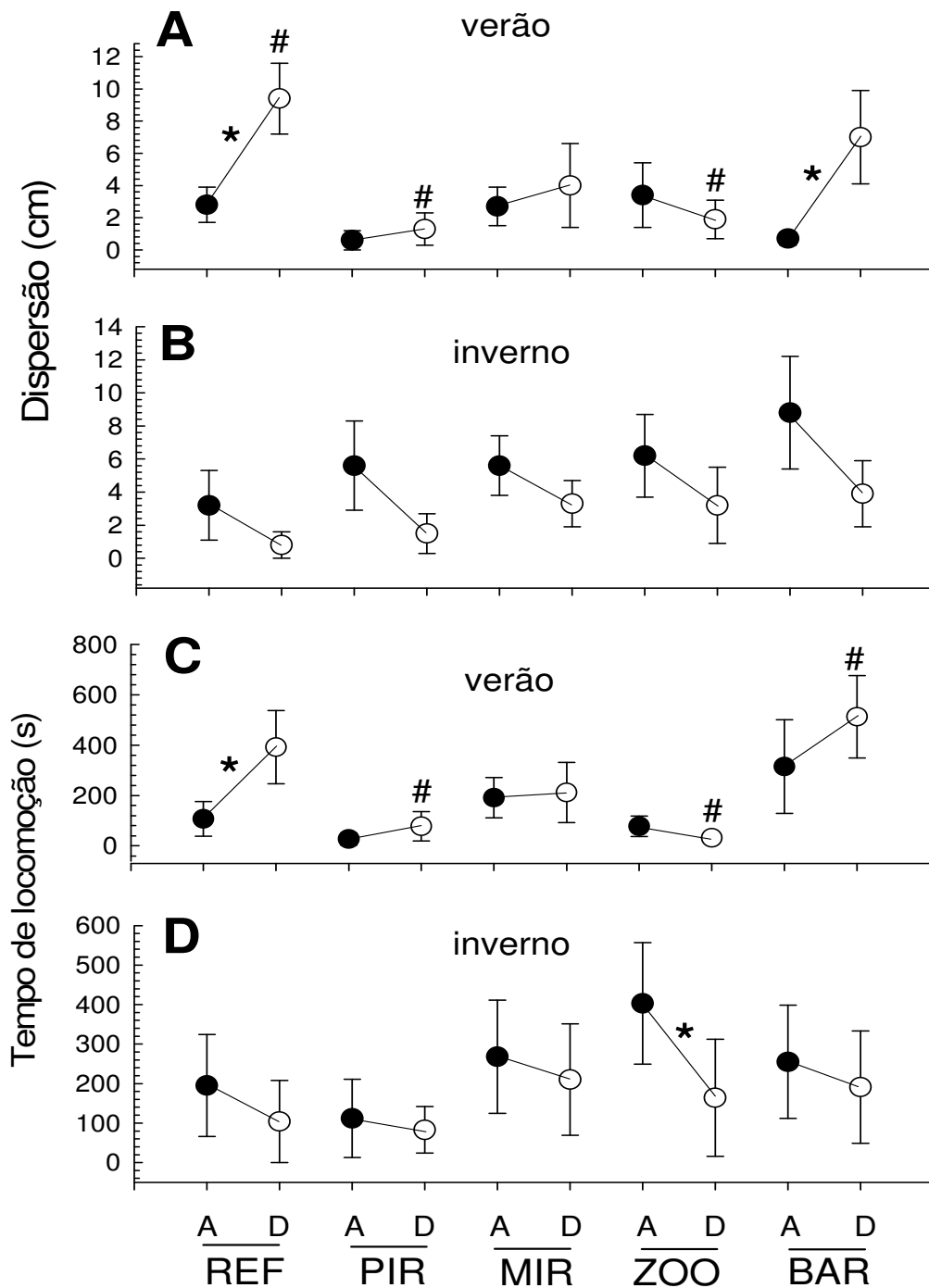


Figura 14. Respostas comportamentais: Dispersão (A e B) e Tempo de locomoção (C e D) de *Rhamdia quelen* expostos às águas dos pontos Referência (REF; n=6); Represa do Piraquara I (PIR; n=6), Rio Miringuava (MIR; n=6), Zoológico (ZOO; n=6) e Rio Barigui (BAR; n=6) antes (símbolos pretos) e depois (símbolos brancos) da colocação da substância de alarme de co-específicos durante as estações de verão e inverno. * representa diferenças entre um mesmo ponto antes e depois da colocação do extrato de pele de co-específicos. # representa diferenças entre os pontos, em uma mesma estação de coleta, depois da colocação da substância de alarme de co-específicos. Dados apresentados em médias \pm erro padrão da média.

4.3 Dosagens sanguíneas e plasmáticas

Cortisol e Glicose

A concentração de cortisol plasmático de *Rhamdia quelen* foi maior nos peixes do ponto ZOO em relação aos peixes do ponto PIR na estação de inverno. A concentração de glicose plasmática de *R. quelen* não variou entre os diferentes pontos, em uma mesma estação. Comparando-se as coletas para um mesmo ponto, houve aumento da concentração de cortisol plasmático nos peixes dos pontos BAR no verão em relação ao inverno, e também de glicose plasmática nos peixes dos pontos REF, MIR e ZOO (Figura 15).

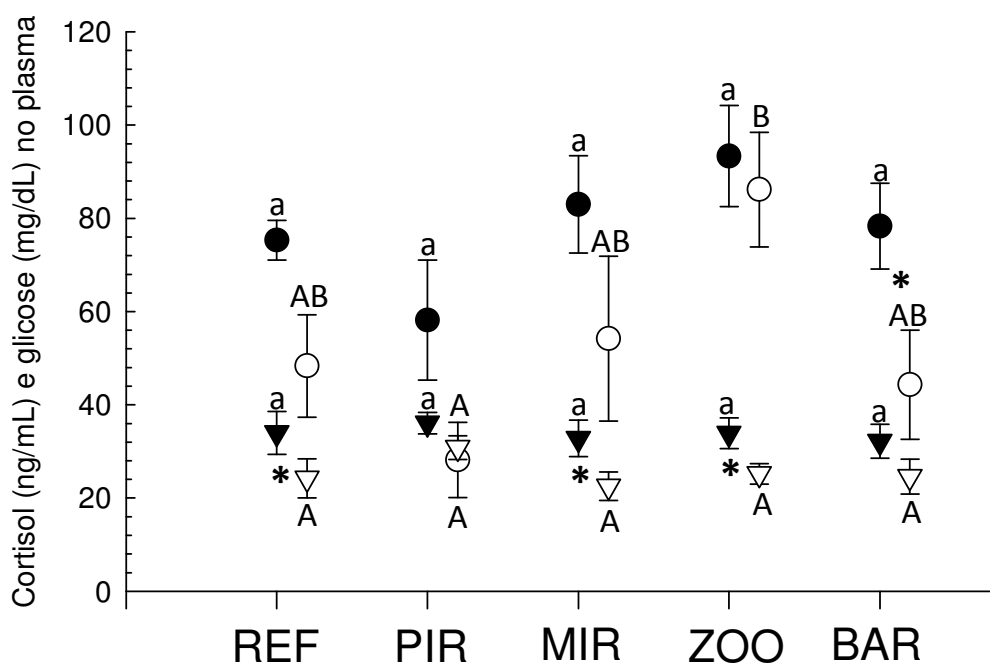


Figura 15. Dosagens de cortisol (círculos) e glicose (triângulos invertidos) no plasma de *Rhamdia quelen* após aclimação de 7 dias, em condições laboratoriais, às águas do ponto Referência (REF; n=6); Represa do Piraquara I (PIR; n=6), Rio Miringuava (MIR; n=6), Zoológico (ZOO; n=6) e Rio Barigui (BAR; n=6) durante as estações de verão (símbolos pretos) e inverno (símbolos brancos). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes indicam a presença de diferenças estatísticas entre os pontos amostrados durante as coletas de verão e inverno, respectivamente. Asterisco (*) corresponde à presença de diferença estatística em um mesmo ponto, entre as estações de verão e inverno.

Hematócrito

O hematócrito de *Rhamdia quelen* não variou entre os diferentes pontos, em uma mesma estação. Comparando-se as coletas para um mesmo ponto, houve redução do hematócrito nos peixes do ponto ZOO na coleta de inverno em relação à de verão (Figura 16 A).

Osmolalidade, Sódio e Cloreto

A osmolalidade e a concentração de cloreto no plasma de *Rhamdia quelen* não variaram entre os diferentes pontos, em uma mesma estação. Contudo, houve menor concentração de sódio no plasma dos peixes do ponto ZOO em relação aos valores obtidos para os peixes dos pontos REF e PIR, na coleta de verão. Comparando-se as coletas para um mesmo ponto, os valores de osmolalidade do plasma dos jundiás da coleta de verão foram inferiores aos valores da coleta de inverno nos pontos REF, ZOO e BAR. O mesmo ocorreu para o cloreto nos pontos PIR, MIR, ZOO e BAR. O sódio plasmático foi inferior no verão em relação ao inverno nos peixes submetidos à água do ZOO, enquanto o oposto ocorreu no ponto PIR (Figura 16 B).

Magnésio e Potássio

As concentrações plasmáticas dos íons magnésio e potássio de *Rhamdia quelen* não variaram entre os diferentes pontos, em uma mesma estação. Comparando-se as coletas para um mesmo ponto, os valores de concentração de potássio plasmático nos peixes expostos às águas dos pontos REF, PIR e BAR foram menores na coleta de inverno em relação à coleta de verão (Figura 16 C).

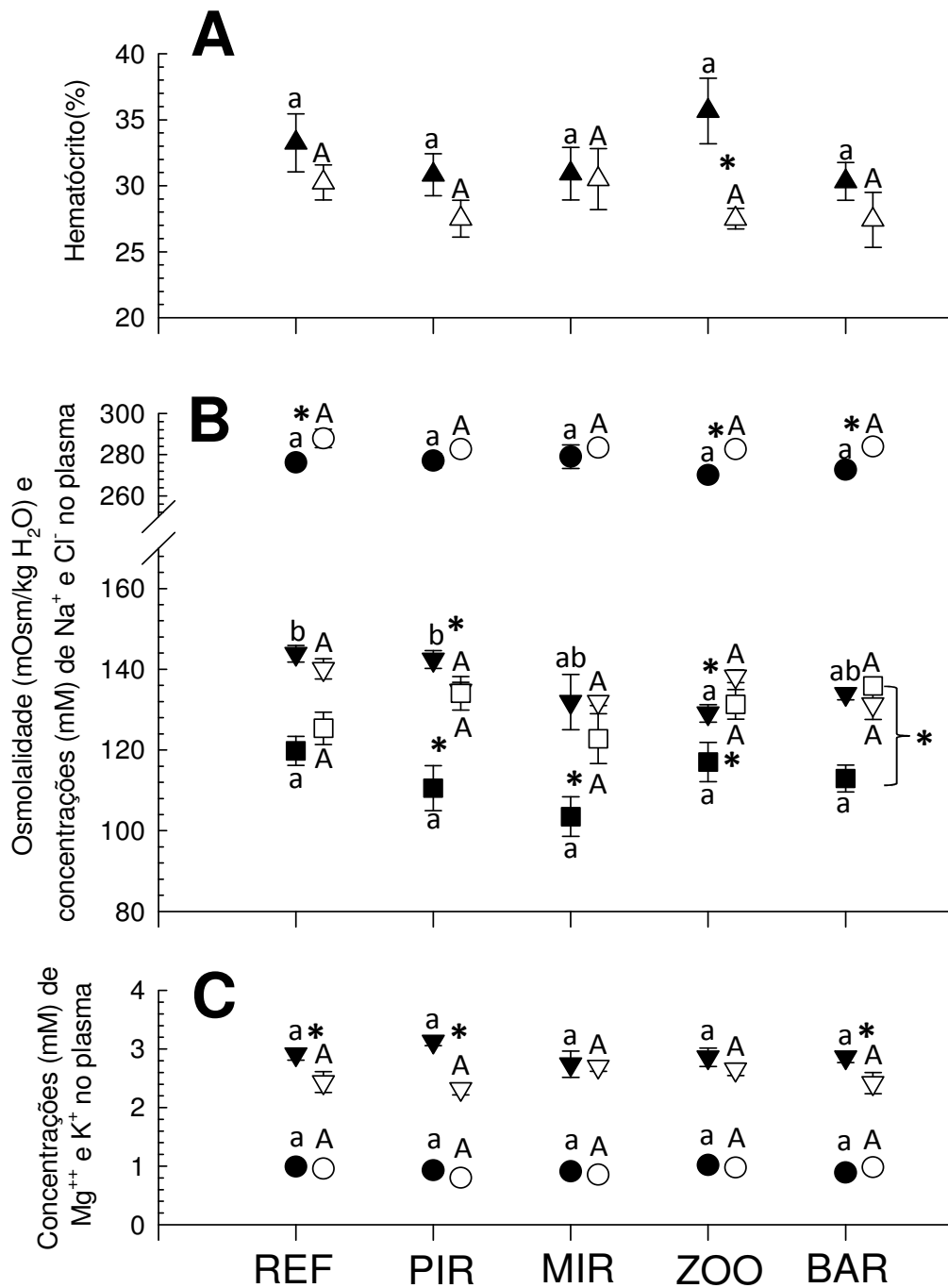


Figura 16. Dosagens de (A) Hematócrito (triângulos); (B) Osmolalidade (círculos) e concentrações dos íons sódio (triângulos invertidos) e cloreto (quadrados) no plasma e, (C) Concentrações dos íons magnésio (círculos) e potássio (triângulos invertidos) no plasma de *Rhamdia quelen* após aclimatação de 7 dias, em condições laboratoriais, às águas do ponto Referência (REF; n=6); Represa do Piraquara I (PIR; n=6), Rio Miringuava (MIR; n=6), Zoológico (ZOO; n=6) e Rio Barigui (BAR; n=6) durante as estações de verão (símbolos pretos) e inverno (símbolos brancos). Letras minúsculas e maiúsculas indicam a presença de diferenças estatísticas entre os pontos amostrados durante as coletas de verão e inverno, respectivamente. Letras diferentes indicam presença de diferenças estatísticas entre os pontos em cada estação. Asterisco (*) corresponde à presença de diferença estatística de um mesmo ponto entre as estações de verão e inverno.

4.4 Dosagens em tecido

Teor Hídrico Branquial e Muscular

O teor hídrico muscular foi mantido constante em todas as condições testadas. O teor hídrico branquial de *Rhamdia quelen*, no verão, foi menor nos peixes do ponto MIR em relação aos peixes dos pontos REF e PIR. A porcentagem de água nas brânquias dos peixes dos pontos PIR e ZOO no inverno foi menor do que o respectivo valor na coleta de verão (Figura 17 A).

Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica Branquial e Renal

A atividade específica da enzima anidrase carbônica branquial e renal não variou, entre os peixes expostos às diferentes águas testadas aqui, dentro da mesma estação do ano. Comparando-se as coletas para um mesmo ponto, houve redução da atividade enzimática branquial nos peixes expostos às águas dos pontos REF, PIR, MIR e ZOO; e também da atividade enzimática renal nos peixes expostos às águas dos pontos REF, PIR e BAR na coleta de inverno em relação à de verão (Figura 17 B e C).

Peroxidação Lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica em fígado de *Rhamdia quelen* variou entre os diferentes pontos somente na coleta de verão, onde houve maior índice de lipoperoxidação no fígado dos peixes submetidos à água dos pontos REF e PIR em relação aos peixes do ponto BAR. Comparando-se verão e inverno em um mesmo ponto, houve maior índice de lipoperoxidação nos peixes dos pontos PIR e MIR na coleta de verão do que na coleta de inverno (Figura 17 D).

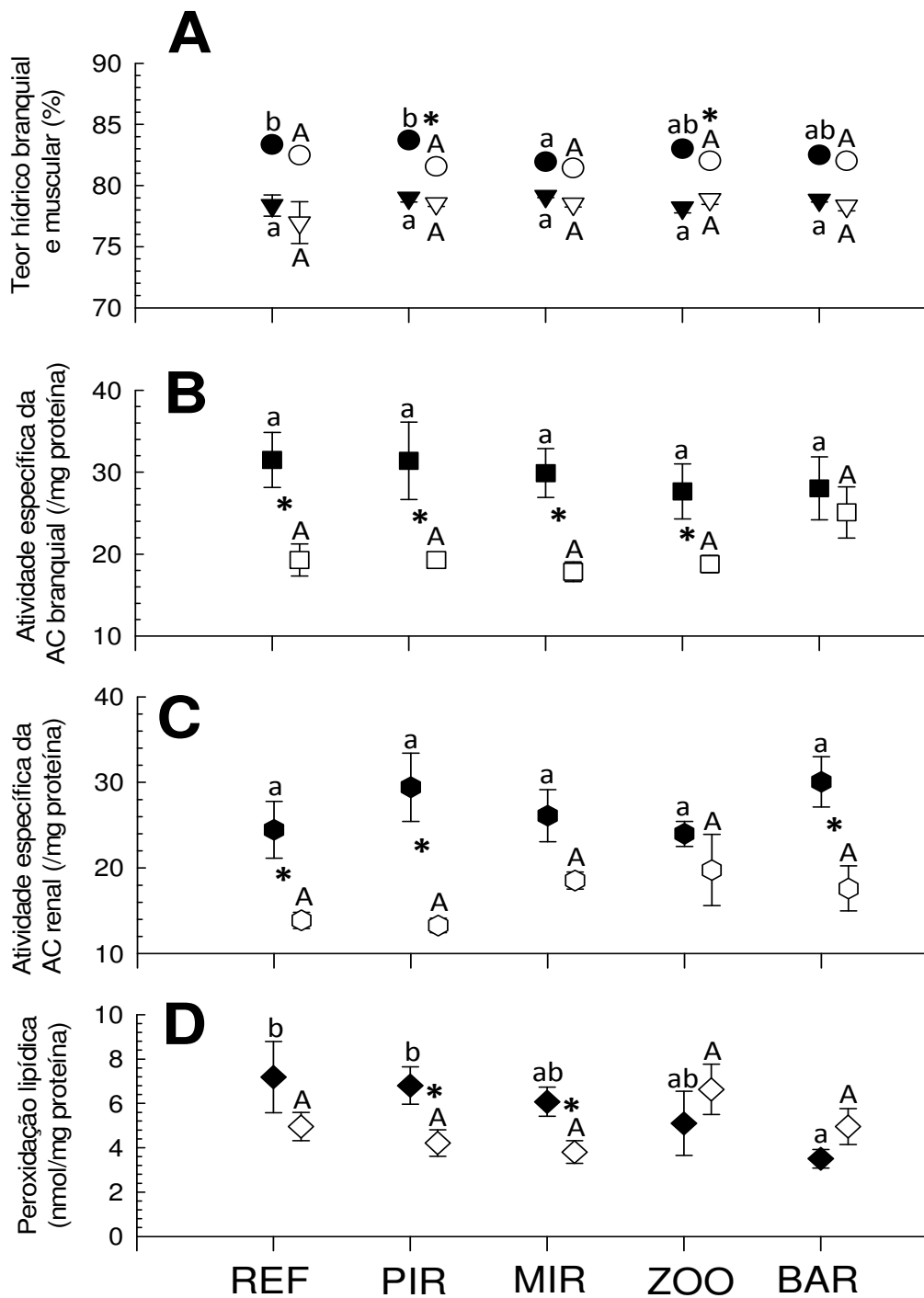


Figura 17. Dosagens de (A) Teor hídrico branquial (círculos) e muscular (triângulos invertidos); (B) Atividade específica da enzima anidrase carbônica branquial (quadrados); (C) Atividade específica da enzima anidrase carbônica renal (hexágono) e, (D) Peroxidação Lipídica no fígado (losango) de *Rhamdia quelen* após aclimação de 7 dias, em condições laboratoriais, a águas do ponto Referência (REF; n=6); Represa do Piraquara I (PIR; n=6), Rio Miringuava (MIR; n=6), Zoológico (ZOO; n=6) e Rio Barigui (BAR; n=6) durante as estações de verão (símbolos pretos) e inverno (símbolos brancos). Letras minúsculas e maiúsculas indicam a presença de diferenças estatísticas entre os pontos amostrados durante as coletas de verão e inverno, respectivamente. Letras diferentes indicam presença de diferenças estatísticas entre os pontos em cada estação. Asterisco (*) corresponde a diferença estatística em um mesmo ponto entre as estações de verão e inverno.

5. Discussão

Ambientes aquáticos próximos a grandes centros urbanos recebem descargas de efluentes resultantes de diversas atividades humanas, as quais são caracterizadas por uma mistura complexa de contaminantes (e.g. Winkaler et al., 2001; Camargo e Martinez, 2006; 2007; Silva e Martinez, 2007). Avaliar o impacto dessa contaminação sobre a biota local é de extrema importância para caracterizar melhor os seus efeitos reais, resultantes da interação entre esses poluentes. A análise se torna mais complexa, mas proporciona inúmeras vantagens em relação à simples quantificação de variáveis abióticas da água (Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Deste modo, conhecer o comportamento e a biologia de uma determinada espécie de peixe frente às variações ambientais naturais ou decorrentes da ação antrópica é fundamental para a conservação tanto do ambiente quanto das espécies.

Neste estudo, espécimes de *Rhamdia quelen* foram expostos, no verão e no inverno, em condições de laboratório a águas de cinco pontos da bacia do Alto Rio Iguaçu, escolhidas com base em um possível gradiente de contaminação. Os jundiás expostos às águas destes cinco locais apresentaram respostas muito parecidas, o que de imediato causa surpresa, dada a expectativa de gradiente de contaminação entre os pontos. Porém, a análise de espectroscopia por dispersão de energia (EDS) realizada nas brânquias dos peixes de todos os pontos identificou em todos eles a presença de metais. O mesmo padrão que identificamos, Crafford e Avenant-Oldewage (2010) verificaram em tecidos (brânquias, fígado e pele) de bagres da espécie *Clarias gariepinus* coletados de duas regiões: uma barragem de intensa atividade antrópica e, uma represa de pouca atividade antrópica, havendo diferença apenas entre a concentração de metais em cada tecido nos locais avaliados. Porém, apesar da ocorrência de metais em todos os pontos avaliados neste estudo, o ponto ZOO foi que apresentou o maior e mais variado número de elementos, dentre os quais alguns de

características bastante tóxicas, como o céσιο, por exemplo. Adicionalmente, peixes deste ponto e do ponto BAR foram os únicos que tiveram o elemento fósforo identificado em suas brânquias, o que pode estar relacionado ao grande despejo de efluente urbano nesses locais. Alguns metais encontrados são constituintes naturais dos ambientes aquáticos. O cobre e o zinco, por exemplo, são essenciais para a vida em baixas concentrações, sendo inclusive cofatores de muitas enzimas em peixes (Bagdonas e Vosyliene, 2006; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). Porém, quando associados a outros fatores como temperatura, salinidade, pH, interações com outros metais ou sólidos suspensos, o acúmulo e a toxicidade desses metais sobre a biota aquática muda. Inclusive, situações de sinergismo e antagonismo têm sido registrados (Wendelaar Bonga, 1997; Fleeger et al., 2003; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). Assim, a identificação destes elementos em animais aquáticos torna-se uma excelente ferramenta na avaliação dos diversos efeitos negativos sobre a homeostasia e comportamento de muitas espécies animais (Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). A identificação de metais mesmo em pontos rodeados por pouca urbanização é a confirmação de que o impacto das atividades humanas atinge o ambiente aquático seja de forma direta, através da descarga de efluentes domésticos, agrícolas, industriais, ou indireta quando os contaminantes que atingem a atmosfera retornam à água por meio de processos hidrológicos e atmosféricos (revisado em van der Oost, et al., 2003; Portz et al., 2006). Essa contaminação, além de alterar as características físicas e químicas desses ambientes, tem alterado de forma significativa as características biológicas do sistema aquático (Evans 1987; van der Oost et al., 2003; Sandahl et al., 2007; Silva e Martinez, 2007; Magalhães e Ferrão Filho, 2008; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). A presença destes metais (aqui relatados de forma qualitativa) e potencialmente de diversos outros contaminantes não quantificados aqui, e cujos valores não são disponibilizados pelas agências ambientais, aliada às temperaturas mais elevadas e

maiores índices pluviométricos, comuns na estação do verão, levou a óbvio efeito sazonal sobre os parâmetros avaliados nos jundiás neste estudo.

Alterações comportamentais são as primeiras respostas de defesa manifestadas pelos organismos diante de uma situação de estresse (Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Ao ser exposto a uma perturbação, a defesa comportamental do organismo é caracterizada por uma resposta de fuga, a qual é vista como uma resposta de antecipação às mudanças ambientais subseqüentes, e tem como objetivo minimizar a probabilidade de morte, ou ainda reduzir o custo metabólico despendido na manutenção da homeostasia fisiológica (Wingfield, 2003; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Alterações comportamentais são também esperadas diante do estresse químico da exposição a águas contaminadas. Assim, estas alterações comportamentais são excelentes ferramentas de identificação de toxicidade (Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006; Lüring e Scheffer, 2007; Sandahl et al., 2007; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Os dois estímulos foram testados aqui: os peixes expostos às águas dos cinco pontos da bacia do Alto Rio Iguaçu, e à exposição a estas águas juntamente com a substância de alarme (SA) de co-específicos. Não houve diferença no padrão de comportamento (tempo de locomoção ou dispersão) de *Rhamdia quelen* em relação às diferentes águas testadas em ambas as estações, verão e inverno. Porém, após a introdução da SA na água, exemplares de *R. quelen* dos pontos REF aumentaram sua área de ocupação (dispersão) e tempo de locomoção, enquanto peixes do ponto BAR aumentaram a dispersão e tempo de locomoção, em relação aos peixes expostos às águas dos pontos PIR e ZOO no verão. Adicionalmente, os peixes expostos à água REF e BAR apresentaram maior ocupação da área do aquário em relação aos peixes destes mesmos pontos na coleta de inverno. Apesar da existência de metais em todos os pontos analisados, é provável que os elementos existentes nos pontos PIR e ZOO tenham prejudicado de forma significativa a percepção química dos peixes nessas regiões. A soma de fatores como a

ocorrência de elementos químicos, interação entre esses elementos e alterações em parâmetros abióticos da água podem ter contribuído para a ausência de percepção da SA de co-específicos nestes peixes.

Esse prejuízo sobre a quimiorrecepção foi ainda mais evidente nos peixes expostos à água proveniente do ponto ZOO. Esses peixes aparentemente perderam a capacidade de responder a substância de alarme de seus co-específicos, especialmente na coleta de verão. Nesta estação, além de apresentarem redução na mobilidade (dispersão) em relação aos peixes do ponto REF, os mesmos reduziram o tempo de locomoção em relação aos peixes do ponto BAR e aos peixes amostrados neste mesmo ponto (ZOO) no inverno. Essa aparente redução na percepção pode ser reflexo da realocação de energia, comum em peixes estressados durante a busca pelo reajuste das suas atividades biológicas (Wendelaar Bonga, 1997). Porém, é mais provável que essa reação esteja relacionada com os níveis de contaminantes existentes nessa região, os quais, devido à alta temperatura, estavam provavelmente mais concentrados e assim prejudicaram a capacidade de percepção e reação aos estímulos externos nesses peixes. Poluentes químicos causam sérios prejuízos à percepção da substância de alarme, causando interferências sobre a recepção e/ou transmissão dos estímulos químicos (revisado em Fleeger et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006; Lürling e Scheffer, 2007; Sandahl et al., 2007). Espécimes de *R. quelen* quando expostos a cádmio também apresentaram prejuízos em suas respostas comportamentais, sendo incapazes de responder a substância de alarme de co-específicos (Kochhann et al., 2009). Do mesmo modo, juvenis de salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) apresentaram redução na sensibilidade olfativa e na capacidade de responder ao estímulo gerado pela adição de substância de alarme de co-específicos quando expostos a cobre (Sandahl et al., 2007). A exposição a metais, por si só, acarreta alteração comportamental em peixes (Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006; Sandahl et al., 2007; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010).

Adicionalmente, diante de variações ambientais, como temperatura, os efeitos dos elementos tóxicos tornam-se mais severos. Nestas situações podem ocorrer alterações na sensibilidade olfativa e capacidade de percepção do organismo, prejudicando ainda mais seu comportamento diante dos poluentes (Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Deste modo, como a comunicação inter e intra-específica está intimamente relacionada à vida dos peixes (Scott e Sloman, 2004; Lüring e Scheffer, 2007; Kochhann et al., 2009), qualquer alteração ou incapacidade na interação comportamental, em ambiente natural, resulta em mortalidade, gerando sérias implicações, a médio e longo prazo, sobre a dinâmica das populações e comunidades (revisado em Fleeger et al., 2003; Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006; Lüring e Scheffer, 2007).

Acompanhando as alterações comportamentais, respostas fisiológicas também foram observadas, como uma tentativa do organismo em manter a homeostasia (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; Scott e Sloman, 2004; Portz et al., 2006). Aumento na secreção de cortisol é uma das principais respostas primárias de estresse em peixes (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost et al., 2003; Portz et al., 2006). Apesar de não encontrarmos diferenças entre os níveis de cortisol plasmático obtidos de *R. quelen* nos grupos avaliados, os valores de cortisol variaram entre os pontos de 58 para 93 ng/mL na estação de verão estando acima dos valores determinados para teleósteos não estressados (5-50 ng/mL; revisado em Wendelaar Bonga, 1997), especialmente quando se trata desta espécie (~ 30 ng/mL; Barcellos et al., 2001; 2004a). Além disso, valores mais elevados de cortisol são normalmente encontrados no inverno, como ativador metabólico em baixas temperaturas (e.g., Mommsen et al., 1999; Camargo e Martinez, 2006). Contudo, isso não ocorreu, especialmente nos peixes expostos à água do ponto BAR, que apresentaram valores significativamente maiores no verão do que no inverno, provavelmente devido a associação das altas temperaturas e baixa qualidade da água. Em

contrapartida, os peixes expostos à água do ponto ZOO mantiveram alta concentração de cortisol no plasma, diferindo somente dos peixes expostos a água do ponto PIR, provavelmente pela presença de diferentes metais nesta água, os quais em associação pioram sensivelmente as respostas nos organismos, mesmo no inverno. Assim, apesar da ausência de diferença nos níveis de cortisol plasmático entre os pontos, os altos valores identificados podem estar relacionados ao estresse da exposição aos contaminantes existentes nas águas de todos os pontos avaliados.

As respostas secundárias, subseqüentes a ação hormonal sobre o sistema biológico são caracterizadas pela ativação metabólica, aumento do débito cardíaco e do consumo de oxigênio, da mobilização de substratos energéticos e perturbação no equilíbrio hidromineral (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost et al., 2003; Portz et al., 2006; Magalhães e Ferrão Filho, 2008). Apesar da elevada concentração de cortisol no plasma, os níveis de glicose plasmática de *R. quelen* (32-33 mg/dL) estavam abaixo dos valores considerados normais para peixes desta espécie (43-78 mg/dL; Borges et al., 2004), mesmo no verão, em que o aumento na taxa metabólica leva a maior mobilização energética (Camargo e Martinez, 2006). Porém, em sua revisão, Scott e Sloman (2004) indicam que vários tipos de contaminantes alteram os níveis de substratos metabólicos, como a glicose. Além disso, altos níveis de cortisol e baixos níveis de glicose no plasma já foram encontrados em peixes intoxicados com difenóis (Roche e Bogé, 1996). Lambaris (*Astyanax sp*) obtidos de locais cronicamente contaminados por efluentes urbanos também apresentaram hipoglicemia (Winkaler et al., 2001). Compostos químicos podem inibir enzimas envolvidas no metabolismo (Scott e Sloman, 2004), ou inibir a secreção de catecolaminas, levando a hipoglicemia (Roche e Bogé, 1996). Ou ainda, a exposição crônica à contaminação pode causar depleção no glicogênio ou até mesmo perda de glicose na urina (Winkaler et al., 2001). Apesar dos baixos valores de glicemia obtidos nos jundiás testados no verão, para os peixes dos pontos REF, MIR

e ZOO, estas concentrações de glicose foram maiores do que nos peixes obtidos destes mesmos pontos no inverno (23-25 mg/dL). Os dados de glicemia verificados neste estudo indicam prejuízo no metabolismo energético nesta espécie, provavelmente pela exposição a metais e demais poluentes existentes nas águas das regiões avaliadas.

A brânquia é a superfície direta de contato do peixe com o meio, e a exposição a poluentes ambientais faz com que as mesmas funcionem, inclusive, como um local de absorção de contaminantes (Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Winkaler et al., 2001; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez et al., 2004; Evans et al., 2005; Camargo e Martinez, 2006; Parvez et al., 2006; Camargo e Martinez, 2007; Crafford e Avenant-Oldewage, 2010). Metais, assim como outros poluentes ambientais, são bastante estudados pela capacidade que os mesmos têm de afetar as brânquias (revisado em Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Evans et al., 2005). A exposição à xenobióticos leva a prejuízos na absorção de íons, por exemplo por aumento na permeabilidade branquial (e.g. Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006). O aumento da permeabilidade branquial pode ser a causa da incapacidade de absorção de sais ou do ganho excessivo de água (revisado em Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Evans et al., 2005), que resultou na redução na osmolalidade e/ou da concentração de Cl^- no plasma, como foi verificado nos peixes expostos às águas de todos os pontos analisados. Adicionalmente, poluentes, especialmente metais, podem inibir enzimas branquiais envolvidas na absorção de íons, como por exemplo, a $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase, reduzindo a concentração de sódio no plasma (e.g. Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; Cerqueira e Fernandes, 2002; Martinez et al., 2004; Camargo e Martinez, 2006; Parvez et al., 2006). Redução na concentração de sódio foi verificada nos peixes do ponto ZOO quando comparados aos peixes do ponto REF e PIR. Os peixes do ponto PIR, inclusive, apresentaram elevadas concentrações de sódio no plasma na coleta de verão quando comparados aos indivíduos amostrados neste mesmo ponto no

inverno. Esse aumento na concentração de sódio registrado neste ponto pode estar relacionado à elevada concentração de cortisol plasmático apresentados por estes peixes no verão (58 ng/mL), já que este hormônio tem grande importância para a manutenção do equilíbrio hidromineral (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; van der Oost, 2003; Evans et al., 2005). Este hormônio aumenta a atividade e expressão da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, garantindo os níveis de sódio plasmático (e.g. Mommsen et al., 1999; Cerqueira e Fernandes, 2002; Laiz-Carrión et al., 2002; Evans et al., 2005; Mancera e McCormick, 2007). Peixes dos pontos PIR e ZOO apresentaram, ainda, aumento no teor hídrico branquial (compatível com a redução na osmolalidade plasmática), enquanto peixes expostos a água do MIR apresentaram redução neste parâmetro.

Alterações na hidratação das hemácias por modificação na osmolalidade do extracelular resultariam potencialmente em modificação no hematócrito. Em nosso estudo, os peixes expostos a água do ponto ZOO apresentaram maior porcentagem de hematócrito. Aumento nos níveis de hematócrito é uma resposta típica de estresse ocasionada por intoxicação por metais, assim como verificado por trutas (*Oncorhynchus mykiss*) quando expostos a cobre (Cu) e zinco (Zn) e a mistura desses elementos (Bagdonas e Vosyliene, 2006). Peixes da espécie *Dicentrarchus labrax* também apresentaram aumento na porcentagem de hematócrito quando intoxicados por metais (Cr, Cu, Zn) (Roche e Bogé, 1996). Do mesmo modo, peixes da espécie *Prochilodus scrofa* também apresentaram aumento na porcentagem de hematócrito quando expostos a Cu por 96 h (Cerqueira e Fernandes, 2002). Esse aumento é apontado como uma medida para aumentar a capacidade de transporte de O_2 e permitir a continuidade no processo de trocas gasosas (Cerqueira e Fernandes, 2002).

Uma das conseqüências da contaminação sobre o epitélio branquial é, justamente, prejuízos nas trocas gasosas, já que lesões neste epitélio podem ocorrer e aumentar a distância entre a água e o sangue (e.g. Winkaler et al., 2001; Camargo e Martinez, 2007). Além

disso, a interação entre agentes tóxicos e fatores naturais gera efeitos de estresse mais severos ao organismo (Magalhães e Ferrão Filho, 2008) podendo desencadear, inclusive desequilíbrio ácido-básico (e.g. Evans, 1987; Wendelaar Bonga, 1997; van der Oost et al., 2003; Evans et al., 2005). A anidrase carbônica (AC) é uma enzima abundantemente presente nas brânquias dos peixes e, de extrema importância para processos respiratórios e de equilíbrio ácido-básico. Esses processos são dependentes da reação reversível de hidratação do CO_2 , realizada por essa enzima, a qual produz e fornece prótons (H^+) e bicarbonato (HCO_3^-) utilizados por trocadores de cátions e ânions (Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000; Evans et al., 2005; Perry e Gilmour, 2006). Peixes dos pontos MIR e ZOO apresentaram aumento da atividade da enzima anidrase carbônica (AC) branquial, provavelmente porque a exposição a contaminação levou ao aumento nas taxas metabólicas e no consumo de oxigênio, assim como verificado em peixes da espécie *Geophagus brasiliensis* (Wilhelm Filho et al., 2001). Adicionalmente, no verão onde a temperatura da água fica mais elevada, os contaminantes presentes na água ficam suspensos e conseqüentemente levam a redução nos níveis de oxigênio e aumento nos níveis de gás carbônico (Pompeu et al., 2005). Essa situação pode ter ativado a enzima anidrase carbônica (AC) branquial e renal nos pontos REF e PIR, pontos que inclusive, apresentaram baixos índices de saturação de oxigênio durante o verão. Adicionalmente, como os tecidos analisados não foram perfundidos, a ativação identificada reflete, em parte, a atividade enzimática nas hemácias (revisado em Henry e Swenson, 2000).

A eliminação adequada de CO_2 é essencial para a manutenção da homeostase, visto que dela depende a adequada absorção de O_2 , e também o equilíbrio ácido-básico e iônico dos fluidos corporais (Burggren et al., 1991; Geers e Gros, 2000). A AC está diretamente envolvida nos processos de excreção de CO_2 e regulação ácido-base (revisado em Henry, 1996; Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000; Henry e Swenson, 2000). Ou seja, para que o CO_2 seja eliminado do organismo, o mesmo é inicialmente convertido em HCO_3^- nas hemácias, forma

em que é transportado pelo sangue (Burggren et al., 1991; Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000; Henry e Swenson, 2000). Quando atinge a superfície respiratória (brânquias) ocorre a desidratação do HCO_3^- , para que o CO_2 seja eliminado do organismo por difusão (Burggren et al., 1991; Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000). A ativação da AC branquial, deste modo, acelera o processo de desidratação do HCO_3^- aumentando, significativamente, a eliminação de CO_2 e absorção de O_2 através das brânquias. Intimamente relacionado a este processo, está o mecanismo de regulação ácido-básico. Esse mecanismo, inicialmente, ocorre pela transferência direta de equivalentes ácido-básicos entre o animal e o ambiente externo, primariamente através das brânquias (Evans et al., 2005; Perry e Gilmour, 2006; Randall e Tsui, 2006). Mas, o rim também participa do controle do pH metabólico, devido à sua grande capacidade de reter HCO_3^- e eliminar urina ácida (Georgalis et al., 2006). Assim, a ativação desta enzima nos rins está relacionada com a manutenção do pH fisiológico, compensando o excesso de CO_2 produzido pelo aumento no metabolismo resultante da intoxicação e altas temperaturas.

Além do aumento na produção de CO_2 , a exposição a contaminação gerou desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (também chamados de radicais livres) e sua eliminação através dos sistemas antioxidantes, causando um processo chamado de estresse oxidativo (Wilhelm Filho et al., 2001; van der Oost et al., 2003; Camargo e Martinez, 2006). Uma das conseqüências do desequilíbrio de óxido-redução é a peroxidação lipídica (ou lipoperoxidação, LPO). A lipoperoxidação corresponde a um evento citotóxico primário, que desencadeia uma série de alterações celulares, resultantes da interação entre os radicais livres e os ácidos graxos poliinsaturados das membranas biológicas (revisado em Lima e Abdalla, 2001; van der Oost et al., 2003). Muitos contaminantes ambientais apresentam efeitos tóxicos capazes de desencadear estresse oxidativo. Adicionalmente, alterações nos níveis de oxigênio e temperatura no ambiente aquático podem influenciar este processo (van der Oost et al.,

2003). A exposição a poluentes químicos fez com que peixes da espécie *G. brasiliensis* apresentassem elevados níveis de TBARS (uma das formas de quantificar peroxidação lipídica) (Wilhelm Filho et al., 2001), assim como foi verificado em espécimes de *Rhamdia quelen* expostos a herbicidas (Crestani et al., 2007) e em várias espécies de peixes da família Cyprinidae obtidos de locais contaminados por esgoto urbano e efluentes agrícolas (Gül et al., 2004). Como nos estudos citados, foi também aqui verificado aumento nos níveis de LPO nos peixes expostos as águas dos pontos REF e PIR em relação aos peixes do ponto BAR no verão. Este resultado pode estar relacionado ao fato do ponto BAR apresentar um menor número de metais do que os outros pontos, corroborando a informação de que o maior foco de poluição nesta região seja proveniente da deposição de efluentes urbanos (esgoto). Além disso, altos níveis de LPO foram encontrados nos peixes da represa do PIR e MIR obtidos na coleta de verão quando comparados aos indivíduos expostos a água destes mesmos pontos no inverno, situação que pode ser explicada pelo aumento na temperatura da água durante o verão, e consequentemente maior disponibilização dos contaminantes devido ao aumento metabólico e redução nos níveis de oxigênio.

6. Conclusão

- A contaminação existente nas águas dos pontos avaliados neste estudo têm a capacidade de alterar o comportamento dos peixes e, de forma associada, suas respostas fisiológicas e bioquímicas de *R. quelen*;
- A sazonalidade exerceu grande influência sobre as respostas dos peixes em todos os grupos avaliados;
- Todos os pontos avaliados apresentam influência antrópica, caracterizada pela presença de metais, porém, apesar de existir um gradiente de contaminação e influência antrópica nessas regiões, estes fatores não foram claramente identificados neste estudo;
- Dentre os pontos avaliados, o ponto ZOO parece ser o mais impactado, pois os peixes expostos à água dessa região apresentaram alterações comportamentais e metabólicas mais evidentes;
- É válido ressaltar que nossas análises, apesar de utilizar amostras de água coletadas em campo, são referências pontuais do sistema. Em ambiente natural, esses efeitos são potencializados pela interação entre a constante descarga de contaminantes e variações sazonais. Assim, os efeitos sub-letais aqui identificados podem, na natureza, levar a mortalidade dos peixes, o que em médio ou longo prazo, alteraria a dinâmica populacional e da comunidade ictiológica local.

7. Referências Bibliográficas

Abilhoa, V., Boscardin, C.R., 2004. A ictiofauna do alto curso do Rio Iguaçu na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná: perspectivas para sua conservação. *Sanare – Revista Técnica da Sanepar* 22: 58-65.

Andreoli, C.V., Dalarmi, O., Lara, A.I., Andreoli, F.N., 1999. Os Mananciais de Abastecimento do Sistema Integrado da Região Metropolitana de Curitiba. *SANARE – Revista Técnica da Sanepar* 12.

Bagdonas, E., Vosyliene, M.Z., 2006. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biologija* 1: 8–13.

Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Itzéz, I. Krieger, M.H., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac. Res.* 32: 121-123.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Fioreze, I., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Baldissera, R.K., Bruschi, A., Ritter, F., 2004a. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture* 232: 383–394.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Souza, C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.A., Terra, S., 2004b. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard *Pimelodidae*) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* 237: 229-236.

Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldisserotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1734 – 1739.

Bockmann, F.A., Guazzelli, G.M., 2003. Heptapteridae (Heptapterides). In: R.E. Reis; S.O. Kullander; C.J. Ferraris Jr. (Eds). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre. Ed. PUCRS, Brasil. p. 406 – 431.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiol. Biochem.* 30: 21-25.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Burggren, W., McMahon, B., Powers, D., 1991. Respiratory functions of blood In: Prosser, C.L. (Ed.), *Environmental and metabolic animal physiology: Comparative Animal Physiology*, Wiley-Liss, Fourth edition, pp. 437-508.

Burnett, L.E., Woodson, P.B.J., Rietow, M.G., Vilicich, V.C., 1981. Crab gill intra-epithelial carbonic anhydrase plays a major role in haemolymph CO₂ and chloride ion regulation. *J. Exp. Biol.* 92, 243–254.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21: 61–69.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5(3):327-336.

Carreau-Green, N.D., Mirza, R.S., Martínez, M.L., Pyle, G.G., 2008. The ontogeny of chemically mediated antipredator responses of fathead minnows *Pimephales promelas*. *J. Fish Biol.* 73: 2390-2401.

Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52: 83-91.

Crafford, D., Avenant-Oldewage, A., 2010. Bioaccumulation of non-essential trace metals in tissues and organs of *Clarias gariepinus* (Sharptooth catfish) from the Vaal River system – strontium, aluminium, lead and nickel. *Water SA* 36(5): 621-640.

Crestani, M., Menezes, C., Glusczak, L., Miron, D.S., Lazzari, R., Duarte, M.F., Morsch, V.M., Pippi, A.L., Vieira, V.P., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 48–55.

Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67: 2305-2311.

Evans, D.H., 1987. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health Perspectives*. 71: 47-58.

Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97–177.

Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317: 207-233.

Geers, C., Gros, G., 2000. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol. Rev.* 80: 681-707.

Georgalis, T., Gilmour, K.M., Yorston, J., Perry, S.F., 2006. Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid-base balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291: F407-F421.

Giaquinto, P.C., Volpato, G.L., 2005. Chemical cues related to conspecific size in pintado catfish, *Pseudoplatystoma coruscans*. *Acta Ethol.* 8: 65-69.

Gül, S., Belge-Kurutas, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* 30: 605– 609.

Henry, R.P., 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase in vitro: the electrometric delta pH and pH stat assays. In: Dodgson, S.J., Tashian, R.E., Gros, G., Carter, N.D. (Eds.): *The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics*. Plenum Press, New York, pp. 119–126.

Henry, R.P., 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 523-538.

Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate as exchange organs. *Resp. Physiol.* 121: 1-12.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. 2004. Monitoramento da qualidade das águas dos reservatórios do Estado do Paraná, no período de 1999 a 2004. Curitiba/PR. 74p.

IAP – Instituto Ambiental do Paraná. 2005. Monitoramento da qualidade das águas dos rios da região metropolitana de Curitiba, no período de 1992 a 2005. Curitiba/PR. 79p.

Jiang Z.Y., Hunt J.V., Wolff, S.P., 1992. Ferrous ion oxidation in the presence of xylene orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal. Biochem.* 202: 384-389.

Jordão, L.C., Volpato, G.L., 2000. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. *Behaviour* 137: 681-690.

Kochhann, D., Benaduce, A.P.S., Copatti, C.E., Lorenzatto, K.R., Mesko, M.F., Flores, E.M.M., Dressler, V.L., Baldisserotto, B., 2009. Protective effect of high alkalinity against the deleterious effects of chronic waterborne cadmium exposure on the detection of alarm cues by juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 770-775.

Kristensen, E.A., Closs, G.P., 2004. Anti-predator response of naïve and experienced common bully to chemical alarm cues. *J. Fish Biol.* 64: 643-652.

Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Míguez, J.M., Soengas, J.L., Mancera, J.M., 2002. Energy metabolism in fish tissue related to osmoregulation and cortisol action. *Fish Physiol. Biochem.* 27: 179-188.

Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Ciênc. Farmac.* 37: 293-303.

Lürling, M., Scheffer, M., 2007. Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends Ecol. Evol.* 22: 374-379.

Magalhães, D.P., Ferrão Filho, A.S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* 12 (3): 355-381.

Mancera, J.M., McCormick, S.D., 2007. Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol in teleost osmoregulation. In: B. Baldisserotto; J.M. Mancera; B.G. Kapoor (Eds). *Fish Osmoregulation*. Science Publishers, Enfield, pp 497-515.

Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V, Zaia, D.A.M., 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Braz. J. Biol., 64(4): 797-807.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish. 9: 211–268.

Parvez, S., Sayeed, I., Raisuddin, S., 2006. Decreased gill ATPase activities in the freshwater fish *Channa punctata* (Bloch) exposed to a diluted paper mill effluent. Ecotoxicol. Environ. Saf. 65: 62-66.

Perry S.F., Gilmour, K.M., 2006. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. Resp. Physiol. Neurobiol. 154: 199-215.

Pompeu, P.S., Alves, C.B.M., Callisto, M., 2005. The effects of urbanization on biodiversity and water quality in the Rio das Velhas Basin, Brazil. Am. Fish. Soc. Symp. 47: 11-22.

Portz, D.E., Woodley, C.M., Cech Jr, J.J., 2006. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. Rev. Fish Biol. Fish. 16: 125-170.

Randall, D.J.; Brauner, C., 1998. Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. 119A: 3-8.

Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2006. Tribute to R.G. Boutilier: Acid-base transfer across fish gills. J. Exp. Biol. 209: 1179-1184.

Roche, H., Bogé, G., 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. Mar. Environ. Res. 41: 27-43.

Sandahl, J.F., Baldwin, D.H., Jenkins, J.J., Scholz, N.L., 2007. A sensory system at the interface between urban stormwater runoff and salmon survival. Environ. Sci. Technol. 41: 2998-3004.

Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. Aquat. Toxicol. 68: 369-392.

Silva, A.G., Martinez, C.B.R., 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23: 185-192.

Smith, R.J.F., 1992. Alarm signals in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 2: 33-63.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57-149.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 122 C, 121-129.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.

Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (6): 719-726.

Wingfield, J.C., 2003. Control of behavioral strategies for capricious environments. *Anim. Behav.* 66: 807-816.

Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R., 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum* 23: 507-514.

Wisenden, B.D., Smith, R.J.F., 1997. The effect of physical condition and shoalmate familiarity on proliferation of alarm substance cells in the epidermis of fathead minnows. *J. Fish Biol.* 50: 799-808.

Wisenden, B.D., Smith, R.J.F., 1998. A re-evaluation of the effect of shoalmate familiarity on the proliferation of alarm substance cells in ostariophysan fishes. *J. Fish Biol.* 53: 841-846.

Wudkevich, K., Wisenden, B.D., Chivers, D.P., Smith, R.J.F., 1997. Reactions of *Gammarus lacustris* to chemical stimuli from natural predators and injured conspecifics. *J. Chem. Ecol.* 23: 1163-1173.

Capítulo III: Identificação de células *club* na pele de jundiás
(*Rhamdia quelen*, Siluriformes) e avaliação comportamental e
fisiológica dos efeitos da administração do seu extrato
(substância de alarme)

Sumário

Resumo.....	125
Abstract	126
1. Introdução	127
2. Objetivos	130
3. Material e Métodos.....	131
3.1 Coleta e manutenção dos animais em laboratório	131
3.2 Identificação das células de alarme por microscopia de luz.....	131
3.3 Obtenção do homogeneizado de pele - substância de alarme.....	132
3.4 Exposição dos animais a substância de alarme (extrato de pele).....	132
3.5 Análise dos efeitos da administração do extrato de pele	133
3.5.1 Análises Comportamentais	133
3.5.2 Análises Fisiológicas	133
3.6 Análise Estatística.....	134
4. Resultados	135
4.1 Descrição das células de alarme na epiderme de jundiá	135
4.2 Respostas Comportamentais	136
4.3. Respostas Fisiológicas	137
5. Discussão	138
6. Conclusão	142
7. Referências Bibliográficas	143

Resumo

Em ambientes aquáticos que não favorecem sinais visuais e auditivos a comunicação química é bastante utilizada, visto que sinais químicos são facilmente dispersados, percebidos e permanecem por longo período na água. Peixes da superordem Ostariophysi são conhecidos por possuírem células epidérmicas especializadas chamadas células de alarme (ou células *club*), responsáveis pela liberação da substância de alarme quando a pele é danificada. Essa substância de alarme constituída por uma base púrica 3 (N)-óxido de hipoxantina desencadeia respostas comportamentais anti-predatórias, as quais mostram-se espécie-específicas. Adicionalmente, estas respostas apresentam-se em todo um grupo ou de forma individual, variando desde busca por refúgio a imobilização. A detecção dessa substância além de desencadear respostas comportamentais pode desencadear respostas de estresse. Neste estudo, o jundiá (*Rhamdia quelen*), uma espécie nativa de alto interesse comercial, foi avaliado com relação à presença e ação da substância de alarme. Peixes dessa espécie apresentaram grande número dessas células, posicionadas no meio do epitélio estratificado, as quais são grandes, arredondadas e sem ductos de conexão ao exterior. Ao serem expostos a homogêneos de pele de co-específicos nas concentrações 2, 5 e 10% por 15 minutos, cerca de 30% dos indivíduos de cada grupo respondeu a presença dessa substância com imobilização. Setenta por cento dos indivíduos expostos a solução de concentração 2% manifestaram respostas de fuga, caracterizadas por escape rápido e busca por refúgio. Apesar disso, não houve nenhuma manifestação de respostas de estresse em *R. quelen*, mesmo quando expostos a solução mais concentrada. Esses resultados indicam que quando se trata de estímulos químicos, as respostas fisiológicas e comportamentais não necessariamente ocorrem juntas. Adicionalmente, as respostas apresentadas mostraram-se dependentes da variação interespecífica e da concentração utilizada, sendo necessários estudos futuros para a melhor caracterização das respostas comportamentais e de estresse em *R. quelen*.

Abstract

In aquatic environments that do not favor visual and auditory signals, chemical communication is widely used. Chemical signals are easily disturbed, perceived and remain for long periods in water. Fishes of the superorder Ostariophysi are known to possess specialized epidermal cells called cells of alarm (or *club* cells), responsible for releasing the alarm when the skin is damaged. This alarm substance, consisting of a purine base 3 (N)-oxide hypoxanthine, triggers anti-predatory behavioral responses, which is show to be species-specific. Additionally, these responses are presented in a whole group or individually, ranging from seeking refuge to complete immobilization. The detection of this substance, in addition to triggering behavioral responses, may cause stress responses. In this study, silver catfish (*Rhamdia quelen*), a native species of high commercial interest, was evaluated for the presence and action of its alarm substance. A large number of these club cells, have been observed in the skin of *R. quelen*, positioned in the middle of the epithelium. Cells are large, rounded and without any duct connecting to the outside. When exposed to homogenates of skin of a conspecific at concentrations 2, 5 and 10% for 15 minutes, about 30% of subjects in each group responded to the presence of this substance with immobilization. Seventy percent of fishes exposed to solution concentration of 2% manifested escape responses, characterized by fast escape and seek of refuge. Nevertheless, there was no expression of stress response in *R. quelen*, even when exposed to more concentrated solutions of skin homogenates. These results indicate that when it comes to chemical stimuli, the physiological and behavioral responses do not necessarily occur together. Additionally, the answers given were dependent on the interspecific variation and concentration used; future studies are needed to better characterize the behavioral responses to stress and *R. quelen*.

1. Introdução

A comunicação química é muito utilizada em ambiente aquático, principalmente em animais de hábito noturno ou em ambientes escuros, turvos e/ou com muita vegetação, os quais não favorecem a utilização de sinais visuais e auditivos (Wisenden et al., 1997; Wudkevich et al., 1997; Kristensen e Closs, 2004; Giaquinto e Volpato, 2005; Carreau-Green et al., 2008). Sinais químicos são facilmente dispersados, percebidos e permanecem por longo período na água (Wudkevich et al., 1997; Kristensen e Closs, 2004; Giaquinto e Volpato, 2005; Carreau-Green et al., 2008), o que os torna mediadores de muitas respostas fisiológicas e comportamentais relacionadas à identificação de co-específicos, localização de alimento e identificação de risco de predação (Smith, 1992; Wisenden e Smith, 1997; Wudkevich et al., 1997; Wisenden e Smith, 1998; Kristensen e Closs, 2004; Cordi et al., 2005; Lüring e Scheffer, 2007; Carreau-Green et al., 2008).

Comportamentos anti-predatórios são espécie-específicos e caracterizam-se por respostas de todo um grupo ou individuais (e.g. Smith, 1992; Wisenden e Smith, 1998; Guerra et al., 2006; Duboc, 2007). Essas respostas, que são muito difundidas entre os animais de hábitos sociais, são manifestadas de inúmeras formas e podem envolver a busca por refúgio, fugas rápidas seguida de redução da atividade natatória, agrupamento, congelamento ou ainda nado errático (Smith, 1992; Wisenden e Smith, 1998; Ide et al., 2003; Cordi et al., 2005; Duboc, 2007; van de Nieuwegiessen et al., 2009). Porém, a expressão do comportamento anti-predatório está relacionado à população, variabilidade individual, diferentes pressões ambientais, capacidade de aprendizado e transferência de informação entre gerações, e também à capacidade de identificar diferentes concentrações do sinalizador, as quais permitem à presa distinguir o grau da ameaça de predação (Wisenden et al., 1997; Ide et al., 2003; van de Nieuwegiessen, et al., 2008).

Peixes da superordem Ostariophysi compreendem cerca de 65% de todas as espécies de peixes de água doce do mundo (Nelson, 2006) e são conhecidos por possuírem células epidérmicas especializadas chamadas células de alarme. Essas células contêm substância de alarme, constituída por uma base púrica 3(N)-óxido de hipoxantina, e que é liberada somente quando a pele é danificada (Smith, 1992; Chapman e Johnson, 1997; Wisenden e Smith, 1997; Wisenden e Smith, 1998; Wisenden e Thiel, 2002; Ide et al., 2003; Kristensen e Closs, 2004; Duboc, 2007; Carreau-Green et al., 2008). Essas células são grandes, redondas e de modo geral localizam-se próximas à superfície da epiderme, não possuindo dutos de conexão ao exterior (Chapman e Johnson, 1997; Wisenden e Thiel, 2002; Ide et al., 2003; Guerra et al., 2006; Carreau-Green et al., 2008).

O papel da percepção da substância de alarme em desencadear respostas de estresse nos animais não é claramente elucidado. Embora alguns estudos tenham demonstrado que peixes expostos a essas substâncias desencadeiam respostas típicas de estresse como aumento na concentração de cortisol plasmático, aumento na taxa metabólica e na taxa de ventilação branquial (Rehnberg et al., 1987; Smith 1992; Sunardi et al., 2007), outros autores não têm encontrado nenhuma resposta significativa (Ide et al., 2003; Toa et al., 2004). Considerando que a substância de alarme exerce um papel de comunicar um perigo iminente aos co-específicos e que o papel biológico das respostas de estresse é permitir ao animal responder à situação desfavorável do ambiente (neste caso a presença do predador), é lícito considerarmos que, caso essa resposta típica de estresse ocorra, ela se manifeste muito rapidamente, favorecendo a fuga rápida do animal. Outra possibilidade é que a deflagração das respostas rápidas, necessárias à fuga dos animais dessa condição de perigo iminente, não se constituem num aumento significativo de demanda metabólica e, portanto, não sejam acompanhados das respostas clássicas à condição de estresse. Neste estudo monitoramos indicadores fisiológicos e comportamentais de estresse comumente descritos na literatura em

jundiás expostos agudamente a extrato de pele de seus co-específicos, potencialmente contendo substâncias de alarme.

Embora a presença de células *club* seja tipicamente descrita para os Siluriformes, não há registro na literatura da caracterização dessas células na espécie estudada aqui, o jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824). Esta espécie pertence a superordem Ostariophysi, ordem Siluriformes, família Heptapteridae, é uma espécie de bagre nativa, de distribuição neotropical, endêmica da América do Sul, de alto interesse comercial e amplamente utilizada em piscicultura (Gomes et al., 2000; Baldisserotto e Radünz Neto, 2004; Schulz e Leuchtenberger, 2006). Essa espécie habita locais fundos, de águas calmas com fundo de areia ou lama e possui habito noturno (Gomes et al., 2000; Baldisserotto e Radünz Neto, 2004; Schulz e Leuchtenberger, 2006).

2. Objetivos

- Identificar e descrever as células de alarme na pele *R. quelen*;
- Determinar as respostas comportamentais dessa espécie diante da exposição à três diferentes concentrações da substância de alarme de co-específicos;
- Verificar se a exposição a estas concentrações de substância de alarme de co-específicos constituem um fator de estresse para esses animais.

3. Material e Métodos

3.1 Coleta e manutenção dos animais em laboratório

Foram utilizados 46 exemplares de jundiá, *Rhamdia quelen*, sendo 44 juvenis (47,89±2,9g e 17,3±0,3cm) e 2 adultos (88,1±3,1g e 32,5±2,5cm), obtidos do Laboratório de Pesquisa e Piscicultura da PUC - Paraná (LAPEP, PUC-PR, 25°35'S, 49°13'W), São José dos Pinhais. Os peixes foram transportados (~45 min) com aeração constante, até o Laboratório de Estudos em Estresse Animal do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná. Os peixes foram aclimatados em um tanque de 250 litros com água decolorada, aeração constante, filtro biológico, fotoperíodo de 12:12h e temperatura de 20±2°C por 7 dias. Os peixes foram alimentados diariamente (às 8h da manhã), com ~ 20g de ração comercial do tipo extrusada (Supra, 32% de proteína). Após cerca de 20-30 min o alimento que sobrava no aquário estoque era retirado imediatamente. Com 24 horas de antecedência aos experimentos os animais foram privados da alimentação.

3.2 Identificação das células de alarme por microscopia de luz

Para verificar histologicamente a presença de células *club* (células de alarme) na pele do jundiá, quatro juvenis (41,47±1,9 g) foram sacrificados e tiveram 4 fragmentos de pele retirados (n total = 8) e fixados em alfac por 16h. Após o período de fixação, os tecidos foram lavados duas vezes com álcool 70%. Em seguida, foram desidratados por bateria alcoólica, diafanizados, incluídos em Paraplast regular (Sigma P3558®) e emblocados. Os blocos com os tecidos foram trimados, e em seguida seccionados (5 µm) e corados com ácido periódico de Schiff e contra-corados com hematoxilina (PAS-H). As lâminas foram observadas em microscópio de luz (Leica DMLS2) com captura de imagem (LeicaXXC300FX e Leica application V3.1.0.).

3.3 Obtenção do homogeneizado de pele - substância de alarme

Dois jundiás adultos foram anestesiados com benzocaína (80 mg/L, ~2 minutos) e sacrificados por secção medular para a retirada de dois fragmentos de pele com uma pequena porção muscular, de ambos os lados do corpo, os quais totalizaram 20g. O tecido foi homogeneizado em 200 ml de água deionizada ultra-pura e filtrada, resultando uma solução (extrato de pele) de concentração 10% (solução estoque). Para o preparo do extrato de concentrações finais 5% e 2% utilizou-se 20 ml da solução estoque diluída em 20 e 60 ml de água deionizada, respectivamente. As soluções foram utilizadas imediatamente após o preparo.

3.4 Exposição dos animais a substância de alarme (extrato de pele)

Quarenta juvenis de *Rhamdia quelen* foram colocados em aquários de 20 litros, e subdivididos em 4 grupos experimentais (n=10 cada): (1) controle (C - $49,7 \pm 4,0g$), sem adição de substância de alarme (extrato de pele de co-específicos); (2) com extrato de pele na concentração 2% (SA 2% - $46,5 \pm 1,8g$); (3) 5% (SA 5% - $49,2 \pm 2,7g$), e (4) 10% (SA 10% - $46,2 \pm 3,1g$). Um volume de extrato de pele de 2 ml foi depositado sobre a saída de ar do aerador, posicionado no lado direito do aquário, com o auxílio de um pipetador, o que garantia dispersão do extrato. Imediatamente após a colocação da substância de alarme, os aquários foram filmados por 15 minutos. Em seguida os peixes foram anestesiados, pesados (peso total) e tiveram uma amostra de sangue retirada por punção da veia caudal. Essas amostras de sangue foram centrifugadas por 5 minutos (~3.000 rpm, temperatura ambiente) e em seguida armazenadas em freezer -20 °C para utilização posterior. Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética e experimentação animal da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 241 de 09 de Agosto de 2007).

3.5 Análise dos efeitos da administração do extrato de pele

3.5.1 Análises Comportamentais

Para o registro de área ocupada pelo animal no aquário, seguiu-se o método descrito por Jordão e Volpato (2000). Cada aquário teve sua parte frontal dividida em 14 quadrantes (7x7cm), os quais serviram para a marcação da posição dos peixes nos eixos “x” e “y”, dados estes utilizados na determinação da capacidade de deslocamento e dispersão dos peixes no plano cartesiano (Figura 11, capítulo II). Durante a análise dos vídeos, a cada 15 segundos, ao longo do período de filmagem (15 minutos), era registrada a posição dos peixes nos quadrantes do aquário (dados de ocupação). Estes dados foram plotados em eixo “x” e “y” para o cálculo da posição dos peixes nestes eixos (baricentro). A média dos peixes na posição “x” e a média dos peixes na posição “y” formam as coordenadas baricêntricas. Com base nestas coordenadas, calcula-se a dispersão, que corresponde ao raio de ocupação de área do animal (possível indicador de território). Esses dados são determinados através da média das distâncias entre cada posição e o respectivo baricentro. Também foi registrado o tempo de locomoção do peixe em relação ao tempo total de filmagem.

3.5.2 Análises Fisiológicas

A osmolalidade do plasma foi determinada em amostras sem diluição, através do micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor® 5520 VAPRO. Os íons sódio (Na^+) e potássio (K^+) foram determinados em amostras de plasma diluídas 1:100 em água Mili-Q, através da leitura em fotômetro de chama (CELM FC – 180). Os íons cloreto (Cl^-) e magnésio (Mg^{2+}) foram determinados em amostras de plasma sem diluição através de kits colorimétricos comerciais (Labtest®), com leitura em espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, com leituras de absorvância de 470 e 505 nm, respectivamente. A glicose plasmática foi determinada em amostras sem diluição através de kit comercial colorimétrico (Labtest®)

com leitura de absorvância a 505 nm (espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech) e o cortisol plasmático foi determinado segundo método enzimático descrito por Munro e Stabenfeldt (1984).

3.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados comportamentais foi realizada através do teste de Mann-Whitney (teste-t não pareado para dados fora da normalidade) para os animais que não apresentaram imobilização, enquanto que os dados fisiológicos foram comparados através de teste-t de Student (teste-t não pareado para dados normais). Em ambas as situações o objetivo foi comparar os três grupos experimentais em relação ao grupo controle (Software Sigma-Stat 2.3[®]). O nível de significância considerado foi de 0,05% ($P < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Descrição das células de alarme na epiderme de jundiá

As células de alarme de *R. quelen* foram localizadas no meio do epitélio estratificado da epiderme. As células aparecem em grande número, são arredondadas, com dois núcleos centralizados e unidos. Não foram visualizados ductos de conexão ao exterior (Figura 18).

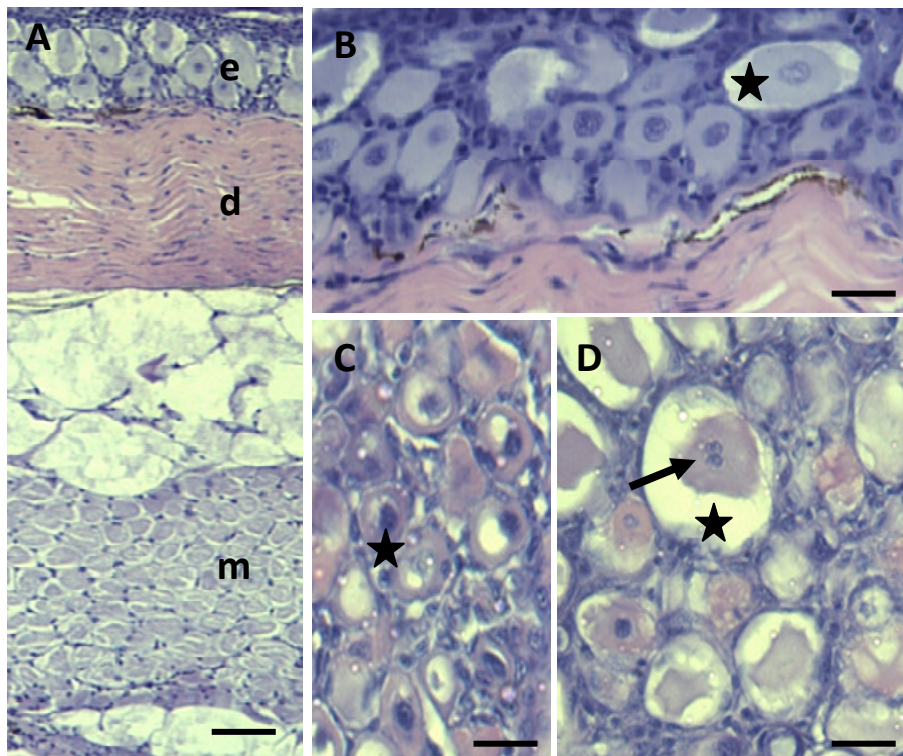


Figura 18. Epiderme de *Rhamdia quelen* por microscopia de luz (PAS-H). (A) – Imagem geral mostrando as camadas de epiderme (e), derme (d) e músculo esquelético (m), barra de escala 25 μm ; (B, C) – células de alarme na epiderme (estrela), barra de escala 10 μm ; (D) – célula de alarme, com a seta indicando a presença de dois núcleos, barra de escala 10 μm .

4.2 Respostas Comportamentais

Ambos os grupos avaliados (controle e experimentais) apresentaram indivíduos que permaneceram imóveis durante o período de filmagem. Essa imobilização variou entre 20-40% do total de cada grupo avaliado, ou seja 2-4 indivíduos dentre 10. Dos peixes que não apresentaram imobilização, apenas os submetidos à concentração de 2% aumentaram o tempo de locomoção em relação aos controles (Figura 19 A). Não houve alteração na dispersão (distribuição espacial) dos peixes submetidos às diferentes concentrações de substância de alarme em relação ao grupo controle (Figura 19 B).

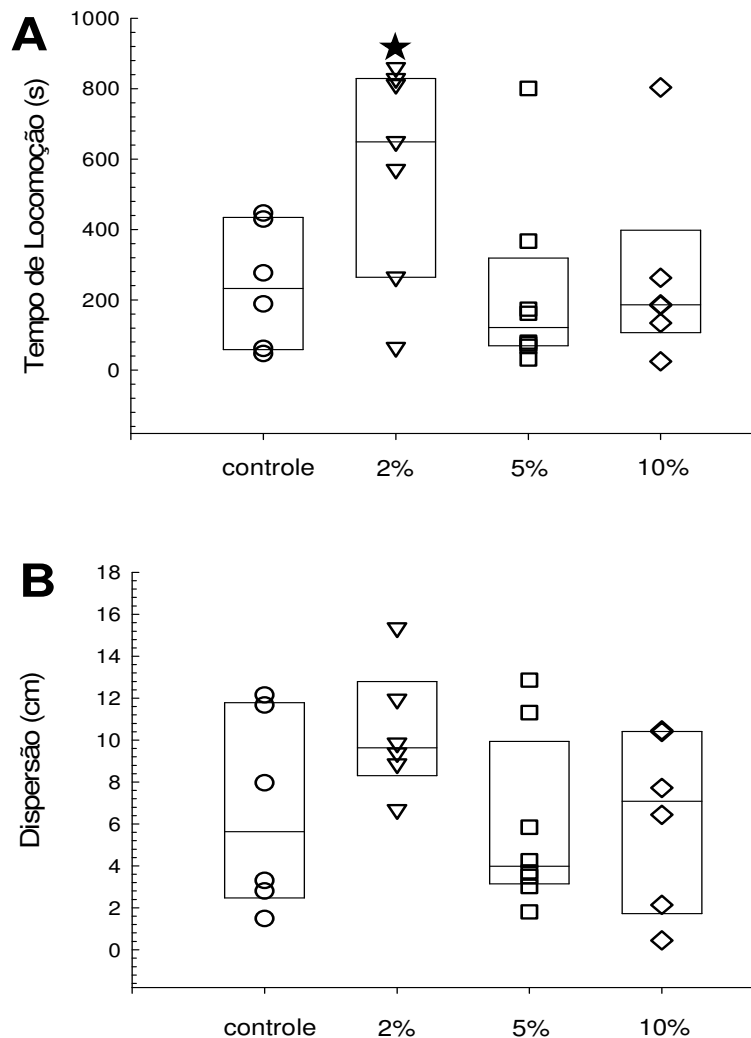


Figura 19. Respostas comportamentais, individuais (símbolos) e mediana, manifestadas por *Rhamdia quelen* após adição do extrato de pele de co-específicos nas concentrações controle (0%, círculo); 2% (triângulo); 5% (quadrado) e 10% (losango). (A) Tempo de locomoção individual (segundos) e (B) Dispersão individual (cm). Estrela representa a ocorrência de diferença estatística em relação ao grupo controle (n=6-8). Não foram incluídos os animais que permaneceram imóveis.

4.3. Respostas Fisiológicas

Os parâmetros plasmáticos analisados (osmolalidade, íons, glicose, cortisol) não apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle e todos os experimentais (Tabela 4).

Tabela 4. Dosagens plasmáticas realizadas em *Rhamdia quelen* controle e expostos às concentrações de 2%, 5% e 10% de extrato de pele de co-específicos.

Parâmetros	Controle	2%	5%	10%
Osmolalidade (mOsm/kgH ₂ O)	280±5,7	277±3,4	280±5,2	284±5,5
Cloreto (mM)	124±2,4	126±1,9	123±1,8	125±2,5
Sódio (mM)	150±1,7	146±1,8	144±1,9	145±1,3
Magnésio (mM)	1,02±0,05	1,05±0,03	1,00±0,06	1,05±0,02
Potássio (mM)	3,6±0,3	3,8±0,3	3,4±0,2	3,8±0,2
Glicose (mg/dL)	43±6,1	39±3,6	41±5,9	42±6,9
Cortisol (ng/mL)	59±12,2	58±8,7	68±15,5	70±11,7

Não foi detectada nenhuma diferença estatística entre os grupos, por teste t de Student. Dados apresentados em média ± erro padrão da média, n= 9-10.

5. Discussão

Todos os peixes da ordem Siluriformes possuem células de alarme em sua epiderme, porém as famílias Aspredinidae e Loricaridae, apesar de apresentarem estas células, não respondem à substância de alarme (Pfeiffer, 1977; Smith, 2000). Em *Rhamdia quelen* encontramos também estas células, que são grandes, arredondadas e numerosas, e correspondem às características morfológicas já descritas para outras espécies da mesma ordem Siluriformes, como por exemplo *Pimphales promelas*, *Brycon cephalus*, *Gobiomorphus cotidianus* (Wisenden e Thiel 2002; Ide et al., 2003; Kristensen e Closs, 2004; Carreau-Green et al., 2008). As células de alarme (=club) da pele de *R. quelen* são muito similares às descritas para outros bagres como: *Ictalurus punctatus*, *Arius felis*, *Clarias gariepinus* (Chapman e Johnson, 1997; Smith, 2000; Guerra et al., 2006). Posicionam-se no meio do epitélio estratificado, corroborando a necessidade de lesão do epitélio para a liberação da substância de alarme (Smith, 1992; Wisenden e Thiel 2002; Ide et al., 2003; Kristensen e Closs, 2004; van de Nieuwegiessen et al., 2009).

Além de detectar por histologia as células club, produtoras da substância de alarme, buscou-se neste trabalho testar o efeito da aplicação de extrato de pele de jundiás adultos sobre o comportamento e fisiologia de juvenis da mesma espécie. Para confirmar a presença e atuação da substância de alarme, o extrato foi testado em 3 concentrações (2, 5 e 10%), para uma varredura da melhor condição de preparo do homogenizado para detecção dos seus efeitos. Não se buscou aqui identificar relação de dose-resposta, por se tratar de extrato bruto. Indivíduos submetidos ao extrato de pele na concentração de 2% aumentaram sua atividade locomotora, porém não aumentaram sua área de ocupação no aquário. Estudos anteriores com bagres *Arius felis* (Smith, 2000), *Pseudoplatystoma coruscans* (Giaquinto e Volpato, 2005) e *Clarias gariepinus* (van de Nieuwegiessen et al., 2009) também identificaram aumento da atividade natatória diante da exposição a extratos de pele de co-específicos. A resposta

apresentada por *R. quelen* pode ser interpretada como uma resposta bifásica. Este tipo de resposta corresponde a uma manifestação comportamental onde o peixe apresenta um escape rápido, e em seguida adota posição estacionária indicando a busca por refúgio (Ide et al., 2003; Cordi et al., 2005). Como as respostas de alarme são espécie-específicas (Smith, 1992; Wisenden e Smith, 1998; Kristensen e Closs, 2004; Guerra et al., 2006; Duboc, 2007), esta resposta apresentada por *R. quelen* pode ser associada ao seu hábito demersal em águas turvas, e facilitaria que eles se escondessem de predadores (Ide et al., 2003; Kristensen e Closs, 2004; Cordi et al., 2005).

Adicionalmente, é provável que as repostas apresentadas por *R. quelen* tenham relação com a concentração da substância de alarme. Quando submetidos concentrações maiores do extrato (substância de alarme), os indivíduos de *R. quelen* não apresentaram resposta de fuga. De fato, as respostas diante da exposição a substância de alarme de co-específicos podem variar de fuga rápida a imobilização (Wisenden e Smith, 1998; Ide et al., 2003; Cordi et al., 2005; Duboc, 2007; van de Nieuwegiessen et al., 2009). Além disso, como a substância de alarme é facilmente identificada, até mesmo em baixas concentrações (Wisenden e Thiel 2002), é a capacidade de percepção e a susceptibilidade de cada indivíduo que determina a intensidade da resposta (Ide et al., 2003). Nossos resultados também demonstram grande variabilidade individual à exposição à substância de alarme de co-específicos. Tal variabilidade e natureza das variáveis comportamentais levou à utilização de estatística não paramétrica para confrontar os resultados dos animais que receberam o extrato aos animais controles que não foram expostos ao extrato de pele. Resultados similares foram apresentados por bagres africanos (*Clarias gariepinus*) (van de Nieuwegiessen et al., 2008). A variabilidade intra-específica é influenciada por uma série de características biológicas (Ide et al., 2003; van de Nieuwegiessen, et al., 2008), fazendo com que as diferenças nas respostas comportamentais reflitam diferentes estratégias de defesa de cada um dos indivíduos e, isso pode ser mais

significativo que a média das respostas apresentadas pelo grupo (van de Nieuwegiessen, et al., 2008).

Estudos sugerem que as respostas de alarme são potencialmente estressantes, visto que são manifestadas em situação de perigo (Smith, 1992; Ide et al., 2003; Toa et al., 2004; Sunardi et al., 2007). Diante de situações de estresse, o organismo desencadeia uma série de respostas fisiológicas para a manutenção da homeostase (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; Portz et al., 2006). Parâmetros plasmáticos podem ser utilizados como indicadores de estresse porque são facilmente alterados em condições agudas ou crônicas (revisado em Portz et al., 2006). Estudos aplicados a aquicultura indicam que o cortisol e a glicose plasmática aumentam após 15 minutos de exposição a um fator de estresse, causando em seguida alterações na homeostase osmótica (osmolalidade e íons) dos peixes, as quais podem permanecer por longo período de tempo (revisado em Portz et al., 2006). Quinze minutos também foram suficientes para que espécimes de *Semotilus margarita* apresentassem aumento nos níveis de cortisol após exposição à substância de alarme de co-específicos (Rehnberg et al., 1987). Em nosso estudo, a exposição por 15 minutos às concentrações de extrato de pele/substância de alarme testadas, não desencadeou alteração fisiológica que indicasse estresse em *Rhamdia quelen*. Em estudo com *Brycon cephalus*, Ide e colaboradores (2003) também registraram ausência de respostas fisiológicas de estresse em peixes expostos a substância de alarme de co-específicos, contrariando o encontrado por Toa et al. (2004) em estudo realizado com trutas (*Oncorhynchus mykiss*), e Sunardi et al. (2007) em estudo com peixes da espécie *Pseudorasbora parva*, onde houve pronunciado aumento nos níveis de cortisol e da taxa metabólica. Nossos resultados demonstram que respostas de estresse, sejam elas comportamentais ou fisiológicas, são muito variáveis entre as espécies. Dependem de uma série de fatores, dentre eles a intensidade do estímulo, a capacidade de percepção e a susceptibilidade do animal. Porém, a variabilidade individual aliada às

necessidades ambientais parecem ser os fatores chave na determinação da manifestação de uma determinada resposta.

6. Conclusão

- *Rhamdia quelen* possui células de alarme, reconhece e responde a substância de alarme de co-específicos, e provavelmente utiliza este artifício como um mecanismo de defesa diante do risco de predação;
- Fatores como intensidade e tempo do estímulo além da capacidade de percepção e susceptibilidade do animal parecem ser determinantes em estudos dessa natureza;
- Além disso, a variabilidade individual aliada às necessidades ambientais parecem ser os fatores chave na manifestação de uma determinada resposta nesta espécie;
- As concentrações de substância de alarme utilizadas, apesar de desencadear uma resposta comportamental não desencadearam respostas de estresse, mostrando que respostas comportamentais e fisiológicas a estímulos químicos não necessariamente ocorrem juntas;
- Estudos futuros são necessários para testar a substância de alarme em outras concentrações, mais baixas e mais altas do que as testadas aqui, para melhor caracterização de uma curva dose-resposta, e conclusão sobre a ativação de estresse fisiológico concomitante com o comportamento de alerta.

7. Referências Bibliográficas

Baldisserotto, B., Radünz Neto, J., 2004. Criação de Jundiá. Santa Maria. Editora UFSM, 232p.

Carreau-Green, N.D., Mirza, R.S., Martínez, M.L., Pyle, G.G., 2008. The ontogeny of chemically mediated antipredator responses of fathead minnows *Pimephales promelas*. J. Fish Biol. 73: 2390-2401.

Chapman, G.B., Johnson, E.G., 1997. An electron microscope study of intrusions into alarm substance cells of the channel catfish. J. Fish Biol. 51: 503-514.

Cordi, V., Ortubay, S., Lozada, M., 2005. Visual cues during the alarm reaction of *Gymnocharacinus bergi* (Pisces, Characidae). J. Appl. Ichthyol. 21: 487-491.

Duboc, L.F., 2007. Análise comparativa a aspectos ecológicos da reação de alarme em duas espécies de *Mimagoniates* (Ostariophysi, Characidae, Glandulocaudinae). Rev. Bras. Zoo. 24: 1163-1185.

Giaquinto, P.C., Volpato, G.L., 2005. Chemical cues related to conspecific size in pintado catfish, *Pseudoplatystoma coruscans*. Acta Ethol. 8: 65-69.

Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000. Biologia de Jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). Ciência Rural. Santa Maria 30, 179-185.

Guerra, R.R., Santos, N.P., Cecarelli, P., Mangetti, A.J., Silva, J.R.M.C., Hernandez-Blazquez, F.J., 2006. Stratum adiposum, a especial structure of the african catfish skin (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822). Anat. Histol. Embryol. 35: 144-146.

Ide, L.M., Urbinati, E.C., Hoffmann, A., 2003. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to coespecific skin extract in *Brycon cephalus*. J. Fish Biol. 63: 332-343.

Jordão, L.C., Volpato, G.L., 2000. Chemical transfer of warning information in non-injured fish. Behaviour 137: 681-690.

Kristensen, E.A., Closs, G.P., 2004. Anti-predator response of naïve and experienced common bully to chemical alarm cues. J. Fish Biol. 64: 643-652.

Lüring, M., Scheffer, M., 2007. Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. Trends Ecol. Evol. 22: 374-379.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9: 211–268.

Munro, C.J., Stabenfeldt, G.S., 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol.* 101, 41–49.

Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, Inc. 4th ed.

Pfeiffer, W., 1977. The distribution of fright reaction and alarm substance cells in fishes *Copeia* 4: 653-665.

Portz, D.E., Woodley, C.M., Cech Jr, J.J., 2006. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 16: 125-170.

Rehnberg, B.G., Smith, R.J.F., Sloley, B.D., 1987. The reaction of pearl dace (Pisces, Cyprinidae) to alarm substance: time-course of behaviour, brain amines, and stress physiology. *Can. J. Zool.* 65: 2916-2921.

Schulz, U.H., Leuchtenberger, C., 2006. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz. J. Biol.* 66A, 565–574.

Smith, R.J.F., 1992. Alarm signals in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 2: 33-63.

Smith, M.E., 2000. Alarm response of *Aurios felis* to chemical stimuli from injured conspecifics. *J. Chem. Ecol.* 26: 1635-1646.

Sunardi, Takashi, A., Manatunge, J., 2007. Physiological responses of topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva*, to predator cues and variation of current velocity. *Aquat. Ecol.* 41: 111-118.

Toa, D.G., Afonso, L.O.B., Iwama, G.K., 2004. Stress response of juvenile rainbow trout (*Orcorhynchus mykiss*) to chemical cues released from stressed conspecifics. *Fish Physiol. Biochem.* 30: 103-108.

van de Nieuwegiessen, P.G., Schrama, J.W., Verreth, J.A.J., 2008. A note on alarm cues in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell: Indications for opposing behavioural strategies. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 113: 270-275.

van de Nieuwegiessen, P.G., Zhao, H., Verreth, J.A.J., Schrama, J.W., 2009. Chemical alarm cues in juvenile African catfish, *Clarias gariepinus* Burchell: A potential stressor in aquaculture? *Aquac.* 286: 95-99.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.

Wisenden, B.D., Smith, R.J.F., 1997. The effect of physical condition and shoalmate familiarity on proliferation of alarm substance cells in the epidermis of fathead minnows. *J. Fish Biol.* 50: 799-808.

Wisenden, B.D., Chivers, D.P., Smith, R.J.F., 1997. Learned recognition of predation risk by *Enallagma* damselfly larvae (Odonata, Zygoptera) on the basis of chemical cues. *J. Chem. Ecol.* 23: 137-151.

Wisenden, B.D., Smith, R.J.F., 1998. A re-evaluation of the effect of shoalmate familiarity on the proliferation of alarm substance cells in ostariophysan fishes. *J. Fish Biol.* 53: 841-846.

Wisenden, B.D., Thiel, T.A., 2002. Field verification of predator attraction to minnow alarm substance. *J. Chem. Ecol.* 28: 433-438.

Wudkevich, K., Wisenden, B.D., Chivers, D.P., Smith, R.J.F., 1997. Reactions of *Gammarus lacustris* to chemical stimuli from natural predators and injured conspecifics. *J. Chem. Ecol.* 23: 1163-1173.

Capítulo IV: O acúmulo de amônia na água e seus efeitos sobre a fisiologia do jundiá (*Rhamdia quelen*)

Sumário

Resumo.....	148
Abstract	149
1. Introdução	150
2. Objetivo	153
3. Materiais e Métodos	154
3.1. Obtenção dos animais e manutenção em laboratório.....	154
3.2. Experimentação e obtenção de material biológico	154
3.3. Análise das Amostras	157
3.3.1 Análise no sangue.....	157
3.3.2 Análises no plasma	157
3.3.3 Análises nos tecidos	158
3.4. Estatística	159
4. Resultados	160
4.1. Hematócrito	160
4.2. Análises Plasmáticas.....	160
4.3. Teor Hídrico Tecidual	161
4.4. Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica	163
5. Discussão	165
6. Conclusão	173
7. Referências Bibliográficas	174

Resumo

Em teleósteos, a amônia é o principal resíduo nitrogenado de excreção metabólica. O acúmulo desse composto na água tem efeito tóxico, por sua alta reatividade e caráter básico forte. Alterações na homeostasia, decorrentes de prejuízos na regulação osmo-iônica, excreção, trocas gasosas e equilíbrio ácido-básico estão dentro dos efeitos comumente gerados pela amônia em excesso. A manutenção da concentração de amônia e, conseqüentemente, da qualidade da água é muito importante em sistemas intensivos de cultivo e durante o transporte dos peixes. O jundiá (*Rhamdia quelen*), um bagre nativo sul-americano, uma das espécies mais promissoras em sistemas intensivos de criação no sul do Brasil, e considerado como alternativa para o cultivo de espécies exóticas. No presente estudo *R. quelen* foi exposto por 5 e 24 h a adição de amônia total na água (0,5; 1,0; e 2,0 mg/L). Ao final de cada período experimental foram determinados o hematócrito, amônia, osmolalidade, Na⁺, Cl⁻, K⁺, glicose e cortisol no plasma; teor hídrico branquial e muscular e atividade específica da enzima anidrase carbônica branquial e renal. *R. quelen* mostrou-se relativamente resistente ao aumento das concentrações de amônia na água, demonstrando ausência de resposta de estresse e alterações osmoregulatórias em todos os tratamentos. Porém, houve clara inibição da enzima anidrase carbônica branquial e renal, com potencial prejuízo da regulação ácido-básica e respiratória, com maiores efeitos após 24 h de exposição às diferentes concentrações. Assim, a despeito de sua relativa resistência a aumento de amônia, o que é uma característica positiva para peixes de cultivo, alertamos que quanto maior o tempo de exposição e concentração, maiores serão os efeitos sobre os jundiás, especialmente se associados a outras variáveis comumente encontradas em sistema intensivo de criação e transporte.

Abstract

In teleosts, ammonia is the main nitrogen-containing residue. When it accumulates in the water, it is toxic, as it is a highly reactive molecule, of strong alkaline character. Excess ammonia leads to homeostasis disturbances, as a result of its primary action on osmoionic regulation, excretion, gas exchange and acid-base regulation processes. It is very relevant to keep low ammonia levels in intensive culture units, and also during fish transportation. The jundiá (*Rhamdia quelen*) is a native South American catfish. It is one of the most promising species for intensive culture systems in Southern Brazil, and is considered a good alternative for culture of exotic species. In the present study *R. quelen* was exposed for 5 and 24 h to total ammonia added to the water (0.5, 1.0, and 2.0 mg/L). At the end of each experimental period, blood hematocrit, ammonia, osmolality, Na⁺, Cl⁻, K⁺, glucose and cortisol were assayed in the plasma. Branchial and muscle hydration levels and branchial and renal specific activities of the carbonic anhydrase were also determined. *R. quelen* is relatively resistant to the increases in waterborne ammonia, it has not shown responses typical of stress and osmoregulatory disturbance. However, there was inhibition of the enzyme carbonic anhydrase, both in gills and kidneys, with potential to harm several functions, such as acid-base regulation and respiration, with greater effects after 24 h of exposure to the different ammonia concentrations. Thus, although being resistant to the increase in ammonia, which is a positive trait for a cultured fish, care should be taken to the increase in ammonia levels and time of exposure of the jundiás, as the deleterious effects will certainly increase.

1. Introdução

A amônia é facilmente encontrada no ambiente aquático, pois é proveniente de processos metabólicos de plantas e animais, da decomposição de organismos e restos orgânicos, da degradação de adubos, da emissão industrial e também da atividade vulcânica (revisado em Wilkie, 1997; Saha e Ratha, 1998; Randall e Tsui, 2002; Wilkie, 2002). Em teleósteos, a amônia é o principal resíduo nitrogenado de excreção metabólica, derivado da degradação de proteínas e ácidos nucleicos (revisado em Wilkie, 1997; Saha e Ratha, 1998; Wilkie, 2002; Evans et al., 2005). A maior parte da amônia produzida é eliminada através do epitélio branquial, por difusão passiva da forma não ionizada (NH_3) no caso de peixes de água doce (revisado em Wilkie, 1997; 2002; Evans et al., 2005).

A manutenção da concentração de amônia e, conseqüentemente, da qualidade da água é muito importante em sistemas intensivos de cultivo (Hargreaves e Kucuk, 2001; Pereira e Mercante, 2005; Pinto et al., 2007; Carneiro et al., 2009a). A concentração de amônia em tanques de piscicultura é bastante variável e de difícil controle, pois é dependente da densidade e da taxa metabólica dos animais, da condição/manutenção de higiene dos tanques de criação e principalmente do tipo de alimentação administrada, que quando não consumida totalmente, acaba tornando-se o principal fator gerador de amônia na água (Person-Le Ruyet et al., 1997; Hargreaves e Kucuk, 2001; Pereira e Mercante, 2005; Liu et al., 2008; Miron et al., 2008).

O acúmulo deste composto na água tem efeito tóxico para a maioria dos teleósteos (Shaffi, 1980; Tomasso et al., 1980; Person-Le Ruyet et al., 1997; Wilkie 1997; Saha e Ratha, 1998; Hargreaves e Kucuk, 2001; Randall e Tsui, 2002; ArasHisar et al., 2004; Pinto et al., 2007; Liu et al., 2008; Miron et al., 2008). Peixes expostos ao aumento das concentrações de amônia na água apresentam dificuldade na eliminação desse metabólito do organismo, devido à diminuição no gradiente de concentração entre o sangue e a água, provocando desequilíbrio

em sua homeostasia (Hargreaves e Kucuk, 2001; Wilkie, 1997; 2002;). Esses efeitos podem ser potencializados se houver a associação de outros fatores de estresse, como pH, temperatura, salinidade, transporte, densidade. Peixes previamente estressados sofrem efeitos mais drásticos na exposição à amônia (Person-Le Ruyet et al., 1997; Saha e Ratha, 1998; Randall e Tsui, 2002; Miron et al., 2008).

Níveis internos tóxicos são prejudiciais ao crescimento e sobrevivência dos peixes (Shaffi, 1980; Person-Le Ruyet et al., 1997; Wilkie 1997; Saha e Ratha, 1998; Hargreaves e Kucuk, 2001; ArasHisar et al., 2004; Pereira e Mercante, 2005; Pinto et al., 2007; Miron et al., 2008). Os efeitos deste acúmulo interno de amônia têm sido vastamente estudados (revisado em Saha e Ratha, 1998; Randall e Tsui, 2002; Walsh et al., 2007) e são caracterizados, por exemplo por: prejuízo no funcionamento do sistema nervoso através da disfunção no fluxo sanguíneo e metabolismo de aminoácidos no cérebro; influência da amônia sobre os receptores NMDA levando à elevação do influxo de Ca^{2+} e Na^+ , podendo desencadear morte celular; redução da capacidade de transporte de oxigênio pela hemoglobina; hiperatividade; convulsões e até mesmo morte (Tomasso et al., 1980; Wilkie, 1997; Saha e Ratha, 1998; Frances et al., 2000; Hargreaves e Kucuk, 2001; Randall e Tsui, 2002; Wilkie, 2002; ArasHisar et al., 2004; Walsh et al., 2007). Estudo aponta ainda, que este composto tem a capacidade de inibir a atividade da enzima anidrase carbônica (AC), prejudicando desta forma processos vitais como osmorregulação, trocas gasosas, excreção e do equilíbrio ácido-base (ArasHisar et al., 2004).

O bagre sul-americano, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824; Heptapteridae), popularmente conhecido como jundiá, é um peixe nativo de ampla distribuição no continente, e que tem sido considerado uma das espécies mais promissoras em sistemas intensivos de criação, principalmente no sul do Brasil (Barcellos et al., 2001; 2004a,b; Schulz e Leuchtenberger, 2006; Miron et al., 2008; Carneiro et al., 2009a,b; Souza-Bastos e Freire,

2009). Essa espécie é bastante resistente, possui boa taxa de fertilização e desenvolvimento, excelente aceitação comercial (Barcellos et al., 2001; 2004b; Golombieski et al., 2003; Carneiro et al., 2009a,b; Souza-Bastos e Freire, 2009), e tem sido apontada para a substituição no cultivo de espécies exóticas (Schulz e Leuchtenberger, 2006). Estudos recentes sobre o efeito da amônia para esta espécie têm sido realizados. Os mais recentes foram desenvolvidos por Miron et al. (2008) e Carneiro et al. (2009b) os quais determinaram a CL_{50-96h} para *R. quelen*. O primeiro grupo de autores determinou que os níveis de tóxicos de amônia não ionizada (NH_3) são 0,44; 1,45 a 2,09 mg/L em pH 6,0; 7,5 e 8,2 respectivamente, enquanto que o segundo grupo de autores determinou que a NH_3 CL_{50-96h} é de 1,9 mg/L em pH 8,0. Adicionalmente, estudos indicam que a associação da amônia a variações de pH, temperatura, aumento de densidade de animais, e do tempo de transporte podem potencializar os efeitos deste composto (e.g., Golombieski et al., 2003; Miron et al., 2008; Carneiro et al., 2009a). Alega-se, contudo, que sais como o cloreto de sódio e sulfato de cálcio são capazes de mitigar os efeitos de estresse causados pela amônia (Carneiro et al., 2009b) em *R. quelen*.

2. Objetivo

- Determinar, através de respostas fisiológicas e bioquímicas, os efeitos da exposição de *Rhamdia quelen* ao aumento das concentrações de amônia total na água, levando em consideração apenas o efeito da amônia *per se* (de forma isolada) em sistemas fechados, descartando a exposição dos peixes a fatores adicionais de estresse (aumento de densidade, transporte, alteração de pH e temperatura da água).

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção dos animais e manutenção em laboratório

Os sessenta e quatro juvenis de jundiá, *Rhamdia quelen*, utilizados neste estudo (57,7±1,6 g e 18,9±0,2 cm, média ± erro padrão) foram obtidos dos tanques de criação do Laboratório de Pesquisa em Piscicultura da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (LAPEP, PUC-PR, 25°35'S, 49°13'W) em São José dos Pinhais, Paraná. Os peixes foram transportados até o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação da Universidade Federal do Paraná, em água do tanque de criação e sob aeração constante por aproximadamente 40 min. No destino, os peixes foram divididos em dois grupos e colocados em dois aquários estoque de ~250 litros de água deionizada, com aeração constante, filtração biológica, fotoperíodo natural de aproximadamente 12 h claro: 12 h escuro, temperatura de 20±2 °C. A densidade em cada aquário foi mantida abaixo da estabelecida por Barcellos et al. (2004a,b) que é de ~75 peixes/250L. Cada aquário estoque recebeu o total de 15 ml (0,0675 g/ml) de cloridrato acriflavina (Aqualife Labcon®) e 5 g de sal comum (NaCl) para tratamento de parasitas. Esta concentração de sal é inócua para a homeostasia osmótica dos jundiás (Souza-Bastos e Freire, 2009). Ao longo de uma semana, através da substituição diária de ~ 50% da água do aquário, toda a medicação foi retirada e a água substituída por água deionizada. Os peixes foram aclimatados por um total de 21 dias, com alimentação diária no período da manhã (ração comercial 32 % proteína). Após 40 minutos do fornecimento de alimento, a ração não consumida era retirada e os aquários tinham suas paredes e filtros limpos. Não houve mortalidade no período de aclimação.

3.2. Experimentação e obtenção de material biológico

Após o período de aclimação, os peixes foram divididos em 8 grupos: Controle (sem adição de NH₄Cl), 0,5 mg/L; 1,0 mg/L e 2,0 mg/L de NH₄Cl (valor de amônia total), por 5 e 24 h.

Foram montados 32 aquários de 20 litros cada, onde cada condição experimental possuía 4 réplicas com dois peixes por réplica (n=8). Os aquários foram montados com ~20 horas de antecedência em relação ao momento de introdução dos peixes, de modo a garantir que a água estivesse totalmente dechlorada e durante todo o período a aeração foi mantida constante. Os peixes deixaram de ser alimentados 24 h antes de serem colocados nos aquários experimentais. Durante o experimento, os aquários permaneceram tampados, aerados, e tiveram dados de temperatura, pH, e concentração de amônia total (Boyd e Tucker, 1992) determinados na água tanto no início quanto no final de cada período experimental, ou seja, após 5 ou 24 h (Tabela 5). A fração de amônia não ionizada foi calculada com base na fórmula sugerida por Liu et al. (2008), a qual utiliza o coeficiente de equivalência (K_{eq}) determinado por Emerson et al. (1975). Ao término de cada período experimental (5 ou 24 h), os peixes foram anestesiados individualmente com benzocaína (80 mg/L, ~ 2 minutos) até total ausência de reações a estímulos de toque. Em seguida os animais foram medidos (comprimento total), pesados (peso total) e tiveram amostras de sangue retiradas por punção da veia caudal através de seringas de insulina heparinizadas (Parinex[®], heparina sódica). Uma amostra de sangue foi coletada com tubos capilares heparinizados para a determinação do hematócrito. O restante do sangue foi imediatamente centrifugado por 5 minutos (~3000 xg) à temperatura ambiente. O plasma obtido foi mantido em freezer a -20°C até a realização das dosagens de amônia plasmática, osmolalidade, íons, glicose e cortisol. Em seguida os peixes foram mortos por secção medular e os tecidos (brânquias, rins e músculos) foram dissecados. O teor hídrico foi medido no maior arco branquial (lado direito) e em fragmento de músculo axial (lado direito). Os demais arcos branquiais (de ambos os lados) e o rim inteiro foram armazenados a -80°C para a determinação da atividade específica da enzima anidrase carbônica. Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná (certificado n° 241 emitido em 9 de Agosto de 2007).

Tabela 5. Temperatura (Temp., °C), pH, concentração total de amônia (TAN; mg/L), e fração de amônia não ionizada (NH₃; mg/l) medidos na água de cada aquário controle ou experimental (adição de 0,5, 1,0 ou 2,0 mg/L de NH₄Cl) no início (após a colocação dos animais, T₀), e ao final de cada período experimental (5 ou 24h).

Condições Experimentais												
Concentração de NH ₄ Cl												
	Controle			0,5 mg/L			1,0 mg/L			2,0 mg/L		
	T ₀	5h	24h	T ₀	5h	24h	T ₀	5h	24h	T ₀	5h	24h
Temp (°C)	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1	18±0,1
pH	7,3±0,16	7,3±0,07	7,4±0,04	7,3±0,10	7,2±0,10	7,4±0,03	7,3±0,08	7,2±0,09	7,4±0,08	7,3±0,05	7,2±0,04	7,3±0,01
TAN (mg/L)	2,0±0,1	15,8±0,3	28,9±0,7	3,9±0,2	18,4±0,3	30,0±0,5	4,8±0,4	22,6±0,6	37,8±0,7	7,1±0,2	23,4±0,5	41,1±1,0
NH₃ (mg/L)	0,014±0,1	0,107±0,3	0,247±0,7	0,027±0,2	0,099±0,3	0,256±0,5	0,033±0,4	0,122±0,6	0,333±0,7	0,048±0,2	0,127±0,5	0,280±1,0

Os dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

3.3. Análise das Amostras

3.3.1 Análise no sangue

Hematócrito

O sangue coletado em tubos capilares heparinizados (Perfecta LTDA) foi centrifugado a 3000 xg por 10 min (Micro centrífuga Presvac CMH 28), e a porcentagem em volume ocupado pelas hemácias foi lida através de uma escala de hematócrito.

3.3.2 Análises no plasma

Amônia

A concentração de amônia foi determinada em amostras sem diluição de acordo com o protocolo estabelecido por Verdouw et al. (1978), com leitura de absorbância a 650nm em espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech).

Osmolalidade

A osmolalidade foi determinada em amostras de plasma sem diluição, através do micro-osmômetro de pressão de vapor (Wescor® VAPRO 5520).

Íons

A dosagem das concentrações de Cl⁻ foi realizada em amostras sem diluição através de kits comerciais colorimétricos (Labtest®) com leitura de absorbância a 470 nm em espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech). Os íons Na⁺ e K⁺ foram determinados em amostras diluídas em água Milli-Q (1:100), por fotometria de chama (CELM FC – 180).

Glicose

A concentração de glicose foi determinada através de kits comerciais (Labtest®) de determinação colorimétrica, em amostras sem diluição, com leitura de absorvância a 505 nm (espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech).

Cortisol

O cortisol plasmático foi determinado em amostras sem diluição através de kits comerciais (Human Diagnostics Worldwide®), com leituras de absorvância a 450 nm e com comprimento de onda de referência de 630 nm (ELISA Tecan R.Chisto Infinite M200).

3.3.3 Análises nos tecidos

Teor hídrico branquial e muscular

A porcentagem de água foi determinada em brânquias ($1,19 \pm 0,01$ g; n= 64) e músculos ($1,45 \pm 0,01$ g; n=64). Ambos os tecidos foram descongelados e pesados (peso úmido) em tubos *epENDORF* em balança analítica (Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1mg, Brasil). Em seguida as amostras foram colocadas em estufa (BIOPAR S22ST) para o processo de desidratação por 24 h a 60°C. Após este período as amostras foram pesadas novamente (peso seco) e a perda da água foi demonstrada pela porcentagem do peso inicial da amostra (peso úmido).

Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica (AC)

As amostras de tecidos das brânquias ($0,0980 \pm 0,003$ g, n=64) e rins ($0,1431 \pm 0,005$ g, n=64) tiveram a atividade específica da enzima anidrase carbônica determinadas com base no método descrito por Vitale et al. (1999), o qual é baseado em Henry (1991). O cálculo da atividade da anidrase carbônica (AAC) foi realizado com base nas descrições de Burnett et al. (1981) e Vitale et al.(1999) através da fórmula: $AAC = [TC/(TNC - 1)]/mg$ de proteína total.

Quantificação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados teciduais foi determinada segundo o protocolo descrito por Bradford (1976), com leitura de absorbância feita a 595 nm (ELISA Tecan R.Chisto Infinite M200).

3.4. Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância de duas vias, two-way ANOVA (concentração de amônia total X tempo de exposição), seguido pelo teste *post hoc* de Tukey, para localização das diferenças. Todas as análises foram realizadas através do software SigmaStat 2.3®. Os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Para todos os resultados, o nível de significância considerado foi de 0,05.

4. Resultados

4.1. Hematócrito

O volume de hemácias (%) de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 24-29 %, não apresentando alterações diante dos tratamentos realizados (Tabela 6)

4.2. Análises Plasmáticas

A concentração de amônia plasmática total de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 3,75-5,86 mg/L, não apresentando alterações diante dos tratamentos realizados. A osmolalidade plasmática de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 247-271 mOsm/kgH₂O. Porém, houve aumento na osmolalidade plasmática dos jundiás submetidos à adição de 2,0 mg/L de amônia após 24 h de exposição, quando comparados aos indivíduos submetidos à mesma condição por 5 h. A concentração de cloreto plasmático de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 106-117 mM, não apresentando alterações diante dos tratamentos realizados. A concentração de sódio plasmático de *Rhamdia quelen* manteve-se 125-137 mM. Porém, houve redução da concentração de sódio plasmático dos jundiás submetidos à condição controle após 24 h, quando comparados aos indivíduos submetidos à mesma condição por 5 h. A concentração de potássio plasmático de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 2,5-3,0 mM, não apresentando alterações diante dos tratamentos realizados. A concentração de glicose plasmática de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 33-82 mg/dL. Porém, houve redução na concentração de glicose plasmática dos jundiás submetidos a adição de 0,5 mg/L de amônia por 24 h, quando comparados aos indivíduos submetidos à mesma condição por 5 h. A concentração de cortisol plasmático de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 61-139 ng/mL, não apresentando alterações diante dos tratamentos realizados (Tabela 6).

4.3. Teor Hídrico Tecidual

A porcentagem de água nas brânquias de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 82-83 %, não apresentando alterações diante dos tratamentos realizados. A porcentagem de água no músculo de *Rhamdia quelen* manteve-se entre 76-78 %, não apresentando alterações diante dos tratamentos realizados (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados em sangue e plasma de espécimes de *R. quelen* submetidos ao aumento das concentrações de amônia total na água por períodos de 5 e 24 h.

Parâmetros	Condições Experimentais							
	Controle		0.5 mg/L		1.0 mg/L		2.0 mg/L	
	5h	24h	5h	24h	5h	24h	5h	24h
Hematócrito (%)	26±3.4 ^a	27±4.1 ^A	25±3.0 ^a	28±1.9 ^A	29±2.1 ^a	24±2.4 ^A	24±2.1 ^a	25±2.8 ^A
Amônia total (mg/L)	5.57±0.55 ^a	5.54±0.90 ^A	5.86±1.67 ^a	4.77±0.62 ^A	4.37±0.36 ^a	5.28±0.87 ^A	5.33±0.71 ^a	3.75±0.48 ^A
Osmolalidade (mOsm/kgH ₂ O)	247±6.3 ^a	253±6.4 ^A	257±5.2 ^a	264±4.4 ^A	261±7.6 ^a	265±3.7 ^A	253±6.4 ^a	271±4.8 ^{A*}
Cloreto (mM)	108±3.2 ^a	106±4.4 ^A	109±2.8 ^a	116±1.9 ^A	117±2.4 ^a	116±4.9 ^A	109±2.2 ^a	109±3.6 ^A
Sódio (mM)	137±2.2 ^a	125±4.0 ^{A*}	129±2.5 ^a	133±2.0 ^A	134±2.2 ^a	131±2.6 ^A	131±2.7 ^a	131±1.0 ^A
Potássio (mM)	2.5±0.2 ^a	2.7±0.1 ^A	2.6±0.2 ^a	2.7±0.1 ^A	2.7±0.2 ^a	3.0±0.2 ^A	3.0±0.2 ^a	2.8±0.2 ^A
Glicose (mg/dL)	82±16 ^a	68±27 ^A	70±11 ^a	33±5 ^{A*}	43±3 ^a	50±11 ^A	58±13 ^a	63±22 ^A
Cortisol (ng/mL)	98±29 ^a	134±42 ^A	139±42 ^a	61±14 ^A	110±41 ^a	77±16 ^A	119±27 ^a	115±21 ^A
Teor hídrico branquial (%)	83±0.5 ^a	83±0.4 ^A	83±0.4 ^a	82±0.3 ^A	83±0.2 ^a	82±0.2 ^A	83±0.3 ^a	82±0.2 ^A
Teor hídrico muscular (%)	77±0.3 ^a	76±0.8 ^A	76±0.8 ^a	76±0.7 ^A	77±0.8 ^a	78±0.4 ^A	77±0.8 ^a	77±0.6 ^A

Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos controle e experimentais após 5 h de exposição; letras maiúsculas diferentes indicam diferenças estatísticas entre os grupos controle e experimentais após 24 h de exposição. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre os tempos (5 e 24 h) para uma mesma condição, controle ou experimental.

4.4. Atividade Específica da Enzima Anidrase Carbônica

Branquial

Houve redução da atividade específica da enzima anidrase carbônica (AC) branquial nos jundiás submetidos à concentração de 0,5 mg/L de amônia na água em relação aos valores medidos nos jundiás submetidos a condição controle e a concentração de 2,0 mg/L de amônia em 5 h de experimentação. Adicionalmente, houve redução na atividade desta mesma enzima nos peixes submetidos às concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mg/L de amônia na água, em relação aos peixes da condição controle. Em ambos os grupos controle e experimentais houve redução da atividade da AC branquial após 24 h de experimentação ($P < 0,001$) (Figura 20 A).

Renal

Houve redução da atividade específica da enzima AC renal dos jundiás expostos a concentração de 2,0 mg/L de amônia na água em relação aos peixes submetidos a condição controle. Em ambos os grupos controle e experimentais houve redução da atividade da AC renal após 24 h de experimentação ($P < 0,001$) (Figura 20 B).

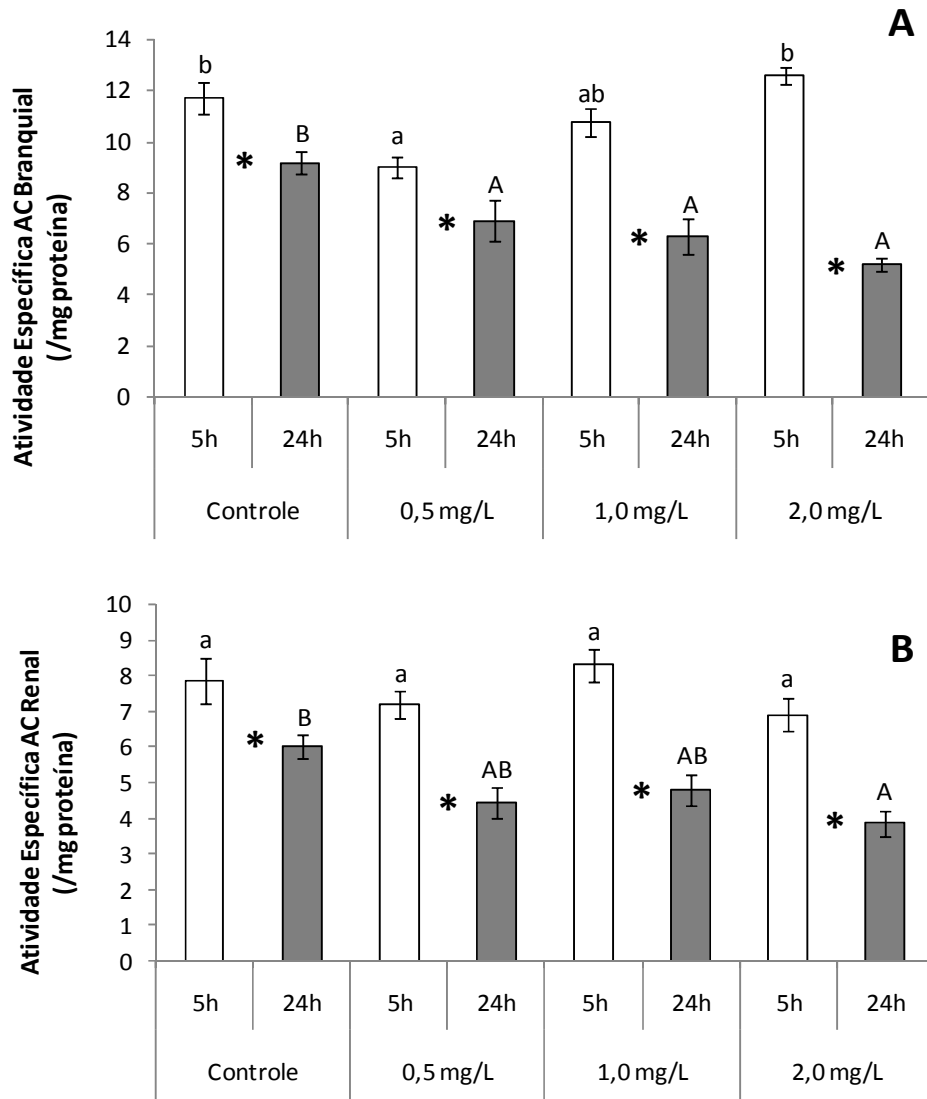


Figura 20. Atividade específica da enzima Anidrase Carbônica (AC) Branquial (A) e Renal (B) de *Rhamdia quelen* submetidos a condição controle (n=8) e as concentrações de 0,5 (n=8); 1,0 (n=8) e 2,0 (n=7-8) mg/L de NH_4Cl por 5 e 24 h. Letras minúsculas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, após 5 h de exposição; letras maiúsculas indicam diferenças estatísticas entre os diferentes tratamentos, após 24 h de exposição. Grupos com letras em comum não são significativamente diferentes. Asteriscos (*) indicam diferença estatística entre os tempos (5 e 24 h) para uma mesma condição.

5. Discussão

A exposição à amônia é um dos principais fatores de estresse em sistemas intensivos de cultivo e procedimentos de transporte dos peixes (Person-Le Ruyet et al., 1997; Hargreaves e Kucuk, 2001; ArasHisar et al., 2004; Pereira e Mercante, 2005; Pinto et al., 2007; Carneiro et al., 2009a,b). A exposição a este composto, básico e altamente reativo, resulta em desordens histológicas, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais em peixes (Shaffi, 1980; Tomasso et al., 1980; Wilkie, 1997; Saha e Ratha, 1998; Frances et al., 2000; Hargreaves e Kucuk, 2001; Wilkie, 2002; ArasHisar et al., 2004; Das et al., 2006; Pinto et al., 2007; Liu et al., 2008; Miron et al., 2008). Prejuízos fisiológicos causados pela amônia têm sido relatados, tais como: elevação nos níveis de hematócrito no sangue, de amônia, cortisol e glicose no plasma (Wendelaar Bonga, 1997; Das et al., 2006; Dobsikova et al., 2006; Pinto et al., 2007; Carneiro et al., 2009a). Adicionalmente, desordens na capacidade de regulação osmo-iônica, trocas gasosas e ácido-básica também foram observadas (Shaffi, 1980; Wendelaar Bonga, 1997; Frances et al., 2000; Hargreaves e Kucuk; 2001; Wilkie, 2002; ArasHisar et al., 2004). Assim, a análise destes parâmetros permite avaliar o estresse causado pela exposição à amônia (revisado em Wendelaar Bonga, 1997), e também as estratégias utilizadas no processo de detoxificação (e.g. Pinto et al., 2007). Apesar, de em alguns casos, a exposição à amônia ser letal para peixes (e.g. Hargreaves e Kucuk, 2001; Saha e Ratha, 1998; Randall e Tsui, 2002; Liu et al., 2008), *R. quelen* mostrou-se relativamente resistente pois, além de não apresentar morbidade ou mortalidade, não apresentou muitas alterações fisiológicas esperadas diante das concentrações testadas de amônia.

A porcentagem de hematócrito manteve-se estável entre 24-29 %, e não foi afetada pela amônia. Exposição de carpas (*Cyprinus carpio*) em transporte por longas distâncias com conseqüente aumento de amônia na água (1,19-13 mg/L) e no plasma (~5,11-6,18 mg/L, conversão realizada com base no peso molecular da $\text{NH}_3 = 17,03$) levou a elevação nos níveis de

hematócrito (32-36 %) (Dobsikova et al., 2006). Nossos resultados estão dentro da normalidade para *R. quelen* (Borges et al., 2004), e indicam ausência de estresse, assim como já havia sido relatado em indivíduos desta mesma espécie após transporte por 4 h em sistemas fechados, com diferentes densidades e conseqüente aumento de amônia na água até 0,13 mg/L (Carneiro et al., 2009a) e também após submissão a aumento da concentração de amônia na água (0,4 mg/L de NH₃) associado ou não a adição de cloreto de sódio e/ou sulfato de cálcio (Carneiro et al., 2009b). Espécimes de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*) também não tiveram alteração na porcentagem de hematócrito no sangue após exposição por 12 h a 25 mg/L de amônia total (Tomasso et al., 1980). O aumento nas concentrações de amônia na água não gerou alteração na concentração de amônia total no plasma de espécimes de *R. quelen* mantidos em aquários fechados por 5 e 24 h, a qual manteve-se entre 3,75-5,86 mg/L. Quando expostos a aumento das concentrações de amônia na água, peixes apresentam dificuldades na excreção desse composto, devido diferença de concentração, e acabam retendo o mesmo no organismo (revisado em Wilkie, 1997; Saha e Ratha, 1998; Randall e Tsui, 2002; Wilkie, 2002). Exposição de *R. quelen* a transporte em sistemas fechados, com diferentes densidades (75-350 g/L) por 4 h causou aumento nas concentrações de amônia de 0,45 para 0,99 mg/L de amônia total, respectivamente (Carneiro et al., 2009a). Carpas (*C. carpio*) também apresentaram aumento na concentração de amônia plasmática, a qual passou de ~5,11 para 7,66 mg/L (conversão realizada com base no peso molecular da NH₃=17,03) após 12 h de transporte em sistemas fechados (Dobsikova et al., 2006).

A exposição dos jundiás à amônia aqui também não causou elevação dos valores de cortisol plasmático, que variaram entre 61 e 139 ng/mL. O cortisol plasmático de carpas, *C. carpio* (201,6-213,3 ng/mL), também não foi afetado pelo aumento nas concentrações de amônia na água e no plasma (Dobsikova et al., 2006). Adicionalmente, os valores de cortisol plasmático determinados em nosso estudo foram mais altos do que valores basais já

determinados para *R. quelen* (~ 30 ng/mL; Barcellos et al., 2001; 2004a,b). Entretanto, outros estudos realizados com esta espécie também apresentaram grandes variações nos valores de cortisol, como por exemplo, em situações de manipulação e confinamento (30-300 ng/mL; Barcellos et al., 2001; 2004a), transporte (60-175 ng/mL; Carneiro et al., 2009a) e salinidade (146-178 ng/mL; Souza-Bastos e Freire, 2009). O cortisol representa uma resposta primária de estresse (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999) e a elevação em sua concentração plasmática sofre influência de uma série de fatores, como: procedimentos de criação, captura e manipulação, fatores naturais, bem como das diferenças existentes entre os ensaios aplicados para sua determinação (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; Liu et al., 2008). Além disso, a variação endógena diária e sazonal de cortisol, muito comum em peixes, faz com que os valores basais freqüentemente se aproximem dos valores encontrados para peixes estressados (revisado em Wendelaar Bonga, 1997). Assim, nossos resultados podem refletir o estresse da manipulação dos peixes e da manutenção dos mesmos em sistemas fechados, como já identificado em outros estudos (Barcellos et al., 2001; 2004a,b; Carneiro et al., 2009a,b; Souza-Bastos e Freire, 2009). Estes dados de cortisol também parecem refletir forte variação intra-específica, claramente demonstrada pelo erro padrão dentro de cada grupo. Seguindo o mesmo padrão apresentado para o cortisol, a glicose plasmática variou entre 33 e 82 mg/dL. Contudo, essa variabilidade é compatível com dados anteriores para a espécie: 43-78 mg/dL (Borges et al., 2004). A única alteração significativa verificada na glicemia foi a sua redução no plasma dos peixes expostos por 24 h à concentração de 0,5 mg/L de amônia. A exposição a elevadas concentrações de amônia desencadeia aumento da taxa metabólica e conseqüente hiperglicemia (Wendelaar Bonga, 1997; Dobsikova et al., 2006; Pinto et al., 2007; Carneiro et al., 2009a) e não hipoglicemia como foi verificado para *R. quelen*, com a menor concentração testada aqui, tampouco foi observada hiperglicemia diante da exposição às maiores concentrações de amônia.

A osmolalidade plasmática aumentou nos espécimes de *R. quelen* expostos a adição de 2,0 mg/L de amônia após 24h. A exposição a amônia gera perda de íons e ganho de água nos peixes de água doce, e ganho de íons e perda de água em peixes de água salgada, devido a inibição na capacidade de trocas iônicas em ambos. Apesar disso, foi observada redução da osmolalidade plasmática (328,6-310,6 mOsm/L) em peixes marinhos (*Scophthalmus maximus*) cronicamente expostos a elevadas concentrações de amônia ambiental (Person-Le Ruyet et al., 1997), demonstrando influência desse composto sobre a osmorregulação de peixes. Esses efeitos podem ser potencializados devido às brânquias dos peixes constituírem a superfície direta de contato do peixe com o ambiente (Shaffi, 1980; Wendelaar Bonga, 1997; ArasHisar et al., 2004; Evans et al., 2005; Das et al., 2006), e que ao serem expostas ao aumento das concentrações de amônia podem apresentar lesões como necroses, hiperplasias e edemas (Shaffi, 1980; Wilkie, 1997; Saha e Ratha, 1998; Frances et al., 2000; Wilkie, 2002; Miron et al., 2008). Estudos com perca prata (*Bidyanus bidyanus*) mostram que a amônia reduziu a capacidade de difusão da brânquia, através da redução da sua área de superfície e da redução na capacidade de trocas gasosas (Frances et al., 2000). Lesões ou redução na área de superfície branquial prejudicam diretamente processos vitais de respiração, equilíbrio ácido básico, osmorregulação e excreção de produtos nitrogenados, processos que são intimamente relacionados (revisado em Wendelaar Bonga, 1997; Wilkie, 1997; 2002; Evans et al., 2005; Perry e Gilmour, 2006; Randall e Tsui, 2006). Em nosso estudo, apesar de não realizarmos nenhum ensaio histológico para a identificação de possíveis danos no tecido branquial, identificamos aumento nas concentrações de amônia na água em ambos os grupos testados após 24 h de experimentação. O aumento dos níveis ambientais desse composto causou inclusive redução na concentração dos níveis de sódio nos peixes controle. Porém, os íons cloreto e o potássio mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie (Borges et al., 2004). Manutenção nas concentrações de cloreto já haviam sido verificadas em *R. quelen* expostos ao

aumento nas concentrações ambientais de amônia, a qual passou de 0,034 para 0,14 mg/L (Carneiro et al., 2009a), bem como após a exposição ao aumento de amônia na água estando ou não associada a mitigadores como cloreto de sódio e/ou sulfato de cálcio (Carneiro et al., 2009b). Outro bagre, *I. punctatus*, também manteve a concentração desse íon em exposição de 12 h a 25 mg/L TAN (Tomasso et al., 1980). Diferentemente, carpas quando expostas a altas concentrações de amônia na água e plasma apresentam redução na concentração de cloreto plasmático (~106-101 mmol/L; Dobsikova et al., 2006). Adicionalmente, não houve nenhuma alteração no teor hídrico muscular, corroborando grande capacidade de regulação da hidratação tecidual deste tecido em *R. quelen* (Souza-Bastos e Freire, 2009).

A atividade da enzima anidrase carbônica (AC) determinada nas brânquias e rins de *R. quelen* foi o parâmetro mais sensível avaliado neste estudo, mostrando-se claramente inibida em relação ao aumento da concentração de amônia e tempo de exposição testados ($r^2 = 0,99$). Esta enzima é presente em ambos os tecidos analisados (e.g., Henry, 1996; Georgalis et al., 2006b; Perry e Gilmour, 2006) e está envolvida nos processos vitais de osmorregulação, excreção de CO₂ e regulação ácido-base através da reação reversível de hidratação do CO₂ que resulta nos íons hidrogênio (H⁺) e bicarbonato (HCO₃⁻) (revisado em Henry, 1996; Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000; Henry e Swenson, 2000). Como a brânquia é responsável por 90% da excreção de amônia em peixes de água doce (revisado em Wilkie, 1997; 2002; Evans et al., 2005), o excesso desse composto na água pode interferir de maneira direta nos processos fisiológicos deste tecido, reduzindo a taxa de excreção da amônia interna (Wilkie, 1997; 2002) ou prejudicando o sistema de tamponamento dos tecidos (Shaffi, 1980; Hargreaves e Kucuk, 2001; ArasHisar et al., 2004) através da retenção de CO₂ no sangue e redução na capacidade da hemoglobina em transportar oxigênio (Tomasso et al., 1980). Alterações nos níveis de O₂ e CO₂ no sangue é um dos principais efeitos associados à toxicidade da amônia (Shaffi, 1980; Hargreaves e Kucuk, 2001; Wilkie, 1997). Nos rins, a

intoxicação por amônia sobrecarrega o tecido causando danos internos e externos (Shaffi, 1980; Tomasso et al., 1980) e conseqüentemente sua inibição, fazendo decrescer a capacidade do animal em reabsorver o bicarbonato, podendo desencadear acidose metabólica (ArasHisar et al., 2004). Adicionalmente, como os tecidos analisados não foram perfundidos, essa inibição reflete, em parte, a inatividade dessa enzima no sangue, mais especificamente nas hemácias (revisado em Henry e Swenson, 2000).

Exposição de trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) a 5,4 mg/L de amônia resultou em inibição imediata da AC (ArasHisar et al., 2004). A amônia tem a capacidade de atravessar a membrana celular (e.g., Randall e Tsui, 2002; ArasHisar et al., 2004) e interagir com o íon zinco presente no sítio ativo da AC causando sua inibição (ArasHisar et al., 2004). Inibição da AC tem interferência direta sobre a capacidade de excreção do CO₂ em peixes de água doce. Essa interferência impede o processo de hidratação do CO₂ implicando em prejuízos no equilíbrio ácido-básico e respiração, processos dependentes da reação realizada por esta enzima (e.g., Henry, 1996; ArasHisar et al., 2004; Georgalis et al., 2006a,b). O equilíbrio ácido-básico em peixes é dependente do equilíbrio entre as moléculas de CO₂/HCO₃⁻ (Randall e Tsui, 2006). Nossa hipótese é que com a inibição desta enzima inicialmente no sangue, mais especificamente nas hemácias, a transformação do CO₂ em HCO₃⁻ e H⁺ estava inviabilizada, levando a redução do pH sanguíneo e da capacidade de trocas gasosas (revisado em Henry, 1996; Randall e Brauner, 1998; Geers e Gros, 2000; Henry e Swenson, 2000). Adicionalmente, o processo de compensação metabólica, que ocorre através das brânquias (90%) e dos rins (10%) (Henry, 1996; Evans et al., 2005; Georgalis et al., 2006b; Perry e Gilmour, 2006; Randall e Tsui, 2006) e, que também são pH dependentes também foram prejudicados, ou seja, na ausência de íons H⁺ e HCO₃⁻, resultantes da hidratação do CO₂ o rim não pode reter HCO₃⁻, reduzindo a taxa de acidificação da urina (Georgalis et al., 2006b; Perry e Gilmour, 2006).

A inibição da AC nas brânquias impede a desidratação do HCO_3^- , para que o CO_2 seja eliminado do organismo por difusão, resultando na redução ou até mesmo paralisação na eliminação de CO_2 (revisado em Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000; Perry e Gilmour, 2006), que ao ficar retido no organismo gera acidose metabólica. Quadro de acidose metabólica já havia sido verificado em peixes expostos a amônia (Shaffi, 1980; Hargreaves e Kucuk, 2001; ArasHisar et al., 2004). Quadro de acidose gerado através da inibição da AC no sangue e em seguida em brânquias e rins também acontece em peixes injetados com acetazolamida e benzolamida, inibidores da AC (e.g., Henry et al., 1988; 1995; Georgalis et al., 2006a,b). Devido ao fato de não termos determinado os níveis de O_2 e CO_2 na água, tampouco no sangue de *R. quelen*, os únicos argumentos que podemos utilizar para corroborar nossa suposição são: o aumento nas concentrações de amônia na água ao longo do tempo, e a manutenção nos índices de pH, pois era esperado que com a excreção de CO_2 ocorresse a redução nos índices de pH da água (Emerson et al., 1975; Golombieski et al., 2003; Randall e Tsui, 2006; Carneiro et al., 2009a) e isso não ocorreu.

Os efeitos sobre a fisiologia dos peixes não atingiu níveis mais deletérios (ou até mesmo morte) porque o tempo de exposição experimental foi curto e, além disso, houve manutenção nos níveis de pH, temperatura da água, garantindo o equilíbrio entre as concentrações de NH_4^+ e NH_3 . Aumento na temperatura da água gera aumento no metabolismo e maiores prejuízos decorrente da acidose metabólica (Henry et al., 1988; 1995). Adicionalmente, aumento no pH e na temperatura da água leva a conversão dos íons amônio em amônia não ionizada, que é altamente tóxica para organismos aquáticos (Emerson et al., 1975; Randall e Tsui, 2002; Carneiro et al., 2009a,b). Deste modo, houve predomínio da forma ionizada (NH_4^+) e conseqüentemente menor toxicidade sobre os peixes (Emerson et al., 1975; Person-Le Ruyet et al., 1997; Saha e Ratha, 1998; Randall e Tsui, 2002; ArasHisar et al., 2004; Evans et al., 2005; Pereira e Mercante, 2005; Pinto et al., 2007; Carneiro et al., 2009a,b). A

toxicidade da amônia para *I. punctatus* é totalmente dependente do pH e temperatura da água (Tomasso et al., 1980; Hargreaves e Kucuk, 2001). O mesmo foi verificado para *R. quelen* que apresenta menor tolerância diante do aumento nos índices de pH e conseqüente aumento nos níveis de amônia não ionizada (Miron et al., 2008). As respostas aqui apresentadas por indivíduos de *R. quelen* corroboraram essa íntima relação da amônia com o pH e com a temperatura da água. Em nosso estudo, a temperatura da água dos aquários foi totalmente controlada ($18\pm 0,1^{\circ}\text{C}$) através de ar-condicionado e o pH, apesar de não ter sido ajustado com soluções alcalina ou ácida durante o experimento, manteve-se entre 7,2-7,4 não apresentando diferenças significativas entre as condições ($P= 0,857$) estando, inclusive, dentro da faixa considerada ótima para peixes de água doce (6,4-8,4; Pereira e Mercante, 2005; Dobsikova et al., 2006).

6. Conclusão

- Apesar de *R. quelen* se mostrar relativamente resistente ao aumento das concentrações de amônia na água, a ausência de alterações em determinados parâmetros de estresse (e.g. cortisol e glicose) não é indicativo de manutenção da homeostase;
- Houve clara perturbação do equilíbrio ácido-básico destes peixes, evidenciado pela inibição da atividade da enzima anidrase carbônica branquial e renal, mesmo em concentrações de amônia menores as já utilizadas em estudos anteriores;
- Os efeitos mais drásticos da amônia parecem estar intimamente relacionados com o pH e temperatura da água, porém, mesmo de forma isolada a amônia desencadeou alterações, as quais podem ser letais, em maior tempo de exposição e concentração, e principalmente se associados a essas variáveis comumente encontradas em sistema intensivo de criação e transporte.

7. Referências Bibliográficas

ArasHisar, S., Hisar, O., Yanik,T., Aras, S.M., 2004. Inhibitory effects of ammonia and urea on gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Pharmacol. 17: 125-128.

Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Itzéz, I. Krieger, M.H., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. Aquac. Res. 32: 121-123.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Souza, C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.A., Terra, S., 2004a. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. Aquaculture 237: 229-236.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Fioreze, I., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Baldissera, R.K., Bruschi, A., Ritter, F., 2004b. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. Aquaculture 232: 383–394.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). Fish Physiol. Biochem. 30: 21-25.

Boyd, C.E., Tucker, C.S., 1992. Water quality and pond soil analyses for aquaculture. Auburn, Auburn University, 183p.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248–254.

Burnett, L.E., Woodson, P.B.J., Rietow, M.G., Vilicich, V.C., 1981. Crab gill intra-epithelial carbonic anhydrase plays a major role in haemolymph CO₂ and chloride ion regulation. J. Exp. Biol. 92: 243–254.

Carneiro, P.C.F., Kaiseler, P.H.S., Swarofsky, E.A.C., Baldisserotto, B., 2009a. Transport of jundiá *Rhamdia quelen* juveniles at different loading densities: water quality and blood parameters. Neotrop. Ichthyol. 7 (2): 283-288.

Carneiro, P.C.F., Swarofsky, E.A.C., Souza, D.P.E., Ramos, T.M., Baglioli, B., Baldisserotto, B., 2009b. Ammonia-, sodium chloride-, and calcium sulfate-induced changes in the stress responses of jundiá, *Rhamdia quelen*, juveniles. J. World. Aquac. Soc. 40: 810-817.

Das, P.C., Ayyappan, S., Jena, J.K., 2006. Hematological changes in the three Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to acidic and alkaline water pH. Aquaculture 256: 80-87.

Dobsikova, R., Svobodova, Z., Blahova, J., Modra, H., Velisek, J., 2006. Stress response to long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L.). Acta Vet. Brno. 75: 437-448.

Emerson, K., Russo, R.C., Lund, R.E., Thurston, R.V., 1975. Aqueous ammonia equilibrium calculations: Effect of pH and temperature. J. Fish. Res. Board Can. 32: 2379-2383.

Evans, D.H; Piermarini, P.M; Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85: 97–177.

Frances, J., Nowak, B.F., Allan, G.L., 2000. Effects of ammonia on juvenile silver perch (*Bidyanus bidyanus*). Aquaculture 183: 95-103.

Geers, C., Gros, G., 2000. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. Physiol. Rev. 80: 681-707.

Georgalis, T., Perry, S.F., Gilmour, K.M., 2006a. The role of branchial carbonic anhydrase in acid-base regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol. 209: 518-530.

Georgalis, T., Gilmour, K.M., Yorston, J., Perry, S.F., 2006b. Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid-base balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 291: F407-F421.

Golombieski, J.I., Silva, L.V.F., Baldisserotto, B., Silva, J.H.S., 2003. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperature. Aquaculture 216: 95-102.

Hargreaves, J.A., Kucuk, S., 2001. Effects of diel un-ionized ammonia fluctuation on juvenile hybrid striped bass, channel catfish, and blue tilapia. Aquaculture 195: 163-181.

Henry, R.P., Smatresk, N.J., Cameron, J.N., 1988. The distribution of branchial carbonic anhydrase and the effects of gill and erythrocyte carbonic anhydrase inhibition in the channel catfish *Ictalurus punctatus*. J. Exp. Biol. 134: 201-218.

Henry, R.P., 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase in vitro: the electrometric delta pH and pH stat assays. In: Dodgson, S.J., Tashian, R.E., Gros, G., Carter, N.D. (Eds.): The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics. Plenum Press, New York, pp. 119–126.

Henry, R.P., Boutilier, R.G., Tufts, B.L., 1995. Effects of carbonic anhydrase inhibition on the acid base status in lamprey and trout. Resp. Physiol. 99: 241-248.

Henry, R.P., 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. Annu. Rev. Physiol. 58: 523-538.

Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate as exchange organs. Resp. Physiol. 121: 1-12.

Liu, H., Xie, S., Zhu, X., Lei, W., Han, D., Yang, Y., 2008. Effects of dietary ascorbic acid supplementation on the growth performance, immune and stress response in juvenile *Leiocassis longirostris* Günther exposed to ammonia. Aquac. Res. 39: 1628-1638.

Miron, D.S., Moraes, B., Becker, A.G., Crestani, M., Spanevello, R., Loro, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). Aquaculture 277: 192-196.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish. 9: 211–268.

Pereira, L.P.F., Mercante, C.T.J., 2005. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água, uma revisão. B. Inst. Pesca 31: 81-88.

Person-Le Ruyet, J., Galland, R., Le Roux, A., Chartois, H., 1997. Chronic ammonia toxicity in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Aquaculture 154: 155-171.

Perry S.F., Gilmour, K.M., 2006. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. Resp. Physiol. Neurobiol. 154: 199-215.

Pinto, W., Aragão, C., Soares, F., Dinis, M.T., Conceição, L.E.C., 2007. Growth, stress response and free amino acid levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) chronically exposed to exogenous ammonia. *Aquac. Res.* 38: 1198-1204.

Randall, D.J.; Brauner, C., 1998. Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A: 3-8.

Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Mar. Poll. Bull.* 45: 17-23.

Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2006. Tribute to R.G. Boutilier: Acid-base transfer across fish gills. *J. Exp. Biol.* 209: 1179-1184.

Saha, N., Ratha, B.K., 1998. Ureogenesis in Indian air-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints. *Comp. Biochem. Physiol.* 120A: 195-208.

Schulz, U.H., Leuchtenberger, C., 2006. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz. J. Biol.* 66A: 565-574.

Shaffi, S.A., 1980. Ammonia toxicity: metabolic disorder in nine freshwater teleosts. *Toxicol. Lett.* 6: 349-356.

Souza-Bastos L.R., Freire, C.A., 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 289: 167-174.

Tomasso, J.R., Goudie, C.A., Simco, B.A., Davis, K.B., 1980. Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109: 229-234.

Verdouw, H., van Echteld, C.J.A., Dekkers, E.M.J., 1978. Ammonia determination based on indophenols formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12: 399-402.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 122 C: 121-129.

Walsh, P.J., Veauvy, C.M., McDonald, M.D., Pamentier, M.E., Buck, L.T., Wilkie, M.P., 2007. Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke and hepatic encephalopathy. *Comp. Biochem. Physiol.* 147A: 332-343.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.

Wilkie, M.P., 1997. Mechanism of ammonia excretion across fish gills. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A: 39-50.

Wilkie, M.P., 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: Present understanding and future research challenges. *J. Exp. Zool.* 293: 284-301.

Capítulo V: A utilização de sal em cultivo do bagre neotropical de
água doce *Rhamdia quelen*¹

¹ Artigo publicado na revista Aquaculture 289: 167-174, Souza-Bastos e Freire, 2009.

Sumário

Resumo.....	181
Abstract	183
1. Introdução	185
2. Materiais e Métodos	188
2.1. Animais e manutenção em laboratório.....	188
2.2. Experimentos com animal inteiro e coleta de amostras de sangue e tecidos.....	188
2.3. Dosagens plasmáticas	190
2.4. Dosagens em tecidos.....	191
2.4.1. Teor hídrico muscular e branquial	191
2.4.2. Atividade Específica da Anidrase carbônica.....	191
2.5. Músculo isolado: avaliação in vitro da capacidade de regulação da quantidade de água ..	192
.....	192
2.6. Estatística	193
3. Resultados	195
3.1. Observações comportamentais	195
3.2. Dosagens Plasmáticas	195
3.3. Dosagens em tecidos.....	196
Teor Hídrico Muscular e Branquial.....	196
3.4. Músculo Isolado: Avaliação da capacidade regulatória da quantidade de água	198
3.5. Atividade específica da anidrase carbônica	200
4. Discussão	201
5. Conclusão	207
6. Referências Bibliográficas	208

Resumo

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um Siluriforme nativo da América do Sul, intensivamente cultivado no sul do Brasil, e que tem sido cada vez mais considerado como um potencial substituto para a cultura de espécies exóticas. Diante deste interesse tem sido constante o estudo de métodos que permitam reduzir infestações por parasitas, comuns nesta espécie. O uso de cloreto de sódio (NaCl) é uma destas práticas. Contudo, muito pouco é conhecido sobre os efeitos do NaCl sobre a homeostase osmótica desta e de outras espécies tropicais de água doce comercialmente relevantes. Este estudo objetivou avaliar os efeitos da adição de sal NaCl (5, 15 ou 25 g/L) na água por 1h, na osmorregulação, e capacidade de regulação hídrica dos tecidos musculares do jundiá. Em adição, fragmentos musculares foram submetidos *in vitro* a salinas isosmótica (controle, animal em água doce) e hiper-osmótica (120, 150 e 180% do controle), para avaliação da sua capacidade em controlar sua quantidade de água. Algumas alterações foram observadas, quando os peixes submetidos a 25 g/L foram comparados aos controles em água doce: os íons plasmáticos e a osmolalidade aumentaram, passando de 260 ± 5 para 419 ± 12 mOsm/kg H₂O; a glicose plasmática aumentou de 47,8 para 92,8 mg/dL e a quantidade de água muscular reduziu de 80 para 76,7%; os níveis de cortisol plasmático permaneceram inalterados (~ 150 ng/mL). A atividade da anidrase carbônica branquial aumentou em 25 g/L, provavelmente como uma resposta a acidose metabólica desenvolvida após severa alteração de salinidade. Os experimentos *in vitro* indicaram alta capacidade de regulação da quantidade de água, mesmo quando os músculos foram expostos a 80% de aumento da osmolalidade. Exposição dos jundiás por 1h em 25 g/L foi altamente nociva para sua homeostase osmótica, afetando inclusive funções sensoriais e motoras (observadas pela perda das funções dos barbilhões e nado alterado). Contudo, o elevado grau de eurihalinidade, apresentado em ambos *in vivo* e *in vitro*, por estes siluriformes de água doce é coerente com sua ocasional presença em águas estuarinas diluídas e com seu posicionamento nesta família

dentro de um grupo relacionado com os Siluriformes de água salgada. Assim, a quantidade de sal razoável (15 g/L), por um período de tempo intermediário (1 h), pode ser empregada contra os parasitas do jundiá, sendo ao mesmo tempo inofensivo para os jundiás e para os humanos que consomem sua carne.

Abstract

The jundiá (*Rhamdia quelen*) is a Siluriform native to South America, intensely cultivated in Southern Brazil, and which has been increasingly considered as a potential substitute for the culture of exotic species. Due to this interest, there is a constant need of methods to reduce parasite infestations common to the species. The use of sodium chloride (NaCl) is one of such practices. However, not much is known about the effects of NaCl on the osmotic homeostasis of this and other commercially relevant tropical freshwater species. This study thus aimed at evaluating the effect of adding NaCl (5, 15, or 25 g/L) to the water for 1 h, on the osmoregulation, and capacity for muscle tissue water regulation of the jundiá. In addition, muscle slices were subjected *in vitro* to isosmotic (control, animal in fresh water) and hyperosmotic (120, 150, and 180% of control) salines, for evaluation of their capacity to control their water content. Some changes have been observed, when fishes submitted to 25g/L were compared to freshwater controls: plasma ions and osmolality increased, the last from 260 ± 5 to 419 ± 12 mOsm/kg H₂O; plasma glucose increased from 47.8 to 92.8 mg/dL, and muscle water content decreased from 80 to 76.7%; plasma cortisol levels remained unchanged (~150 ng/mL). Branchial carbonic anhydrase activity also increased in 25 g/L, probably as a response to the metabolic acidosis that develops upon severe saline challenges. *In vitro* experiments indicated a high capacity for water content regulation, even when muscle slices were exposed to an 80% increase in osmolality. Exposure of jundiás for 1 h to 25g/L was indeed harmful to their osmotic homeostasis, also affecting sensory and motor functions (observed as loss of barbel function, and swim impairment). However, the high degree of euryhalinity shown both *in vivo* and *in vitro* by this freshwater siluriform is coherent with its occasional presence in dilute estuarine waters and to the positioning of its family within a group of seawater-related Siluriforms. Thus, a reasonable amount of salt (15 g/L) for an intermediate time period (1 h)

could be employed against parasites of the jundiá, while still being harmless to both the jundiás and humans that consume its flesh.

1. Introdução

O jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) é um bagre neotropical (Siluriformes) nativo da América do Sul, que ocorre desde o sul do México até a Argentina. Trata-se de uma espécie nativa com grande potencial para a aqüicultura, e que tem sido cultivada nos estados do sul do Brasil (Gomes et al., 2000; Carneiro et al., 2002, 2005; Tavares-Dias et al., 2002; Golombieski et al., 2003; Barcellos et al., 2004; Schultz e Leuchtenberger, 2006). A produção desta espécie no Brasil atingiu um total de 547 toneladas em 2004, o que representa apenas 0,2% do total da produção nacional em aqüicultura (Boscardin, 2008). Tem sido cada vez mais reconhecida como uma alternativa viável para a substituição gradual da cultura de espécies exóticas como a tilápia do Nilo, bagre de canal ou a carpa comum (Schultz e Leuchtenberger, 2006). Esta espécie apresenta: 1) bom desenvolvimento em regiões de climas temperados e subtropicais, 2) altas taxas de fertilização e crescimento, 3) hábito alimentar onívoro, e 4) excelente aceitação comercial, tanto para consumo humano quanto para a prática de pesca esportiva (Marchioro e Baldisserotto, 1999; Gomes et al., 2000; Carneiro et al., 2002, 2005; Tavares-Dias et al., 2002; Golombieski et al., 2003; Barcellos et al., 2004; Camargo et al., 2006; Schultz e Leuchtenberger, 2006; Garcia et al., 2007).

Em virtude do crescente interesse por esta espécie, é constante a busca de técnicas para minimizar situações de estresse que eventualmente surjam durante o processo de criação. A utilização de sal (cloreto de sódio) em aqüicultura, tanto para jundiá (Marchioro e Baldisserotto, 1999; Brandão, 2004; Carneiro et al., 2005; Camargo et al., 2006; Garcia et al., 2007) quanto para outras espécies de peixes de água doce (Selosse e Rowland, 1990; Francis-Floyd, 1995; Tsuzuki et al., 2001; Luz e Portella, 2002; Gomes et al., 2003; Klein et al., 2004; Gomes et al., 2006; Carneiro et al., 2007) tem sido uma destas práticas. A adição de sal reduz o gradiente osmótico existente entre o fluido interno dos peixes e a água externa, estimula a produção de muco, reduz a agitação dos peixes nos tanques, aparentemente exercendo um

efeito anestésico, reduzindo assim o estresse do transporte de alevinos e adultos (Francis-Floyd, 1995; Marchioro e Baldisserotto, 1999; Tsuzuki et al., 2001; Luz e Portella, 2002; Gomes et al., 2003; Camargo et al., 2006; Gomes et al., 2006; Garcia et al., 2007). Além disso, possui efeito profilático (anti-séptico) e é bastante eficaz no tratamento da ictiofitiríase (“Ichthyophthiriasis”), ou seja, na eliminação do ictioparasita *Ichthyophthirius multifiliis* (Selosse e Rowland, 1990; Francis-Floyd, 1995; Marchioro e Baldisserotto, 1999; Brandão, 2004; Klein et al., 2004; Carneiro et al., 2005; Camargo et al., 2006; Garcia et al., 2007).

I. multifiliis é um grande protozoário ciliado, e um dos mais comuns e relevantes patógenos que afligem peixes de água doce. A infestação branquial pelo estágio de trofante deste parasita compromete a osmorregulação e as trocas gasosas. Os tratamentos mais comuns empregados contra este patógeno em peixes de água doce incluem a utilização de permanganato de potássio, sulfato de cobre, formalina, verde malaquita, aumento da temperatura e cloreto de sódio (Selosse e Rowland, 1990; Ewing et al., 1994; Buchmann e Bresciani, 1997; Brandão, 2004; Klein et al., 2004; Carneiro et al., 2005; Garcia et al., 2007). Destes tratamentos, o aumento da temperatura e adição de sal são, certamente, os únicos tratamentos não prejudiciais à saúde humana.

Estudos prévios sobre a tolerância do jundiá, tanto alevinos quanto adultos, a diferentes concentrações de cloreto de sódio sugerem que, para banhos rápidos (15 segundos) uma alta concentração de 30 g/L pode ser utilizada (Brandão, 2004). Contudo, para banhos prolongados (30 a 60 minutos), é necessário reduzir a quantidade de sal para 10-25 g/L (Brandão, 2004; Carneiro et al., 2005); para a exposição crônica de duas semanas, a concentração de sal proposta é de apenas 4-5 g/L (Garcia et al., 2007), e menos ainda (1-4 g/L) para aplicações por tempo indeterminado (Marchioro e Baldisserotto, 1999; Brandão, 2004). Porém, tem sido relatado que mesmo uma pequena quantidade de sal (1-3 g/L) pode levar a mortalidade de alevinos de jundiá (Golombieski, 2004). Assim, este estudo tem por objetivo

verificar as respostas fisiológicas de adultos de jundiá em diferentes concentrações de cloreto de sódio (5, 15 e 25 g/L) por um intermediário (porém, tecnicamente mais conveniente) período de tempo (1 hora), devido as controvérsias existentes nos dados disponíveis para essa espécie e principalmente, pela escassez de informação fisiológica para esta espécie em particular e para outras espécies de água doce cultivadas em geral.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais e manutenção em laboratório

Os oitenta e seis espécimes de *Rhamdia quelen* ($37,7 \pm 2,3$ g e $15,8 \pm 0,5$ cm) foram todos obtidos de pisciculturas, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR, 25°35'S, 49°13'W) e da "Fazenda Girassol" (26°09'S, 48°52'W), no estado de Santa Catarina, entre junho de 2007 e abril de 2008. Os peixes foram transportados (por 45 a 90 minutos) em água doce do local sob aeração ou com 100% de oxigênio introduzido em sacos plásticos, até chegar ao laboratório, no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba. Eles foram aclimatados em condições laboratoriais em tanques de 250 litros contendo água decolorada, aeração constante, filtragem biológica, e foto período de 12 horas claro: 12 horas escuro por 4-7 dias. Não houve nenhum registro de mortalidade durante o período de aclimação. Os peixes foram alimentados diariamente, sempre no período da manhã, com uma quantidade total de ~ 20 gramas de ração comercial disponível para esta espécie (extrusada, Supra, 32% de proteína). A ração que restava (após ~ 20-30 minutos) era imediatamente retirada do tanque. Os jundiás foram mantidos no tanque estoque em uma quantidade máxima de 26 peixes (~ 16 cm de comprimento) em 250 litros, bem abaixo da densidade considerada limite para indivíduos de tamanho semelhante desta espécie (Barcellos et al., 2004) de ~ 75 peixes/250 litros. A temperatura do tanque foi mantida em $20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante todo o período de aclimação. Todos os peixes controle e experimentais não foram alimentados nas últimas 24 horas que antecederam as amostragens.

2.2. Experimentos com animal inteiro e coleta de amostras de sangue e tecidos

Aquários (20 litros) contendo água com sal (NaCl, sal grosso moído, comumente utilizado para aquicultura de jundiá) nas concentrações de 5, 15 ou 25 g/L foram preparados aproximadamente 50 horas antes da colocação dos peixes. Cada aquário recebia inicialmente

água da torneira e permaneciam em aeração por ~36 horas para a retirada do cloro. Após este período o NaCl foi adicionado, completamente dissolvido por agitação, e a salinidade da água foi medida (salinômetro refratômetro Shibuya S28), apresentando respectivamente 5, 15 e 25‰. Depois de uma noite de aeração, a salinidade foi novamente verificada (nunca houve qualquer correção necessária). Osmolalidade, íons e pH destas águas são apresentados na Tabela 7. Somente 1 único peixe foi colocado em cada aquário. Este procedimento foi repetido 17 vezes, independentemente, para as salinidades de 5 e 15 g/L, e 18 vezes para a salinidade de 25 g/L. Cada peixe foi então observado por 1 hora, e os seguintes aspectos foram observados: cor da pele, função do barbilhão e padrão de natação. Após esta hora de exposição e observação, os peixes foram anestesiados usando benzocaína (80mg/L). Após completa anestesia, amostras de sangue foram obtidas por punção da veia caudal usando seringas de insulina heparinizadas (Liquemine® - heparina sódica), e foram imediatamente centrifugadas por 5 minutos (~3000xg, temperatura ambiente). O plasma obtido foi congelado a -20 °C até a realização das dosagens de íons, osmolalidade, cortisol e glicose. Em seguida, os peixes foram rapidamente mortos por deslocamento cervical através de um bisturi, e foram dissecados para a retirada de tecidos (brânquias, rins e músculos). Todos os arcos branquiais foram removidos. O maior arco (cada lado) foi removido e os filamentos branquiais foram separados para a determinação do teor hídrico do tecido, e os arcos remanescentes foram guardados para a determinação da atividade específica da enzima anidrase carbônica. Um fragmento muscular (músculo axial, lado direito) foi dissecado para determinação da hidratação tecidual, e os rins inteiros foram retirados e utilizados no ensaio da enzima anidrase carbônica. Os tecidos foram imediatamente armazenados a -80° C. Indivíduos controle (n=18) foram amostrados diretamente do tanque de aclimação (água doce); peixes controles foram manuseados para anestesia, sangue e tecidos foram amostrados exatamente como nos peixes experimentais. Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética e

experimentação animal da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 241 emitido em 09 de Agosto de 2007).

Tabela 7. Íons, osmolalidade, e pH medido em amostras individuais de águas controle e experimentais preparadas.

Água	[Na ⁺] (mM)	[Cl ⁻] (mM)	[K ⁺] (mM)	[Mg ²⁺] (mM)	Osmolalidade (mOsm/kgH ₂ O)	pH
0 g/L (controle)	0	0.13	0	0.009	23	7.63
NaCl 5 g/L	94	99	0	0.07	190	7.12
NaCl 15 g/L	250	224	0	0.12	466	6.94
NaCl 25 g/L	381	311	0	0.24	771	6.74

2.3. Dosagens plasmáticas

Os íons cloreto (Cl⁻) e magnésio (Mg²⁺) foram determinados usando métodos colorimétricos (kits comerciais Labtest®, Brasil), em amostras de plasma sem diluição (espectrofotômetro ULTROSPEC 2100 pro – Amersham Pharmacia Biotech, Suécia). Os íons Cl⁻ reagem com o tiocianato de mercúrio na presença de nitrato férrico formando tiocianato férrico, com leitura de absorbância a 470 nm. Os íons Mg²⁺ reagem com o magon sulfonado em meio alcalino, formando um complexo de cor rósea que é proporcional à quantidade total de íons magnésio da amostra, com leitura de absorbância a 505 nm. Os íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) foram determinados em amostras plasmáticas diluídas (1:100, água ultra-pura) por fotometria de chama (CELM FC – 180, Brasil). Osmolalidade do plasma foi determinada em amostras sem diluição (micro-osmômetro de pressão de vapor Wescor® VAPRO 5520, USA). O cortisol plasmático foi determinado de acordo com o método de Munro e Stabenfelt (1984). O anticorpo policlonal R-4866 produzido pela Universidade de Davis na Califórnia foi diluído (1:8500) em solução de cobertura (pH 9.6). Amostras foram apropriadamente diluídas (1:32 ou 1:64) em tampão fosfato (pH 7.0), mantendo-se dentro da faixa de leitura da curva padrão ($r^2 =$

0.9754). O conjugado (*cortisol-horseradish peroxidase*) foi diluído 1:20.000. Amostras foram sempre dosadas em triplicatas em microplacas de 96 poços, e foram lidas a 405 nm (Elisa Sunrise Tecan Deutschland GmbH, Alemanha). Os níveis de glicose plasmática foram determinados através de um método colorimétrico, utilizando também um kit comercial disponível (Labtest®), em amostras sem diluição, com leitura de absorbância a 505 nm. O método enzimático emprega uma aliada reação da glicose oxidase e peroxidase.

2.4. Dosagens em tecidos

2.4.1. Teor hídrico muscular e branquial

Para a determinação do teor hídrico, os tecidos foram descongelados e pesados (brânquias $0,1085 \pm 0,0126$ g, músculos $0,2302 \pm 0,0242$ g, $n=70$ para ambos os tecidos) - peso úmido, em tubos pré-pesados e fechados (Balança Bioprecisa FA2104 N, precisão 0,1mg, Brasil), e em seguida foram secas em estufa por 24 horas a 60 °C. Os tecidos secos foram pesados novamente (peso seco), e a perda de peso (água) foi expressa como porcentagem do peso úmido inicial da amostra.

2.4.2. Atividade Específica da Anidrase carbônica

Para o ensaio da atividade da enzima anidrase carbônica (AC), amostras de tecidos (brânquias e rins) foram descongeladas, pesadas (brânquias $0,1321 \pm 0,0022$ g, rins $0,1737 \pm 0,0037$ g, $n=78$ para ambos os tecidos) e homogeneizadas a 10% (peso/volume em g/mL) com tampão fosfato 10 mM, pH 7,4. O homogeneizado foi então centrifugado ($\sim 2000 \times g$ por 5 minutos, temperatura ambiente), e o sobrenadante foi aliqüotado para as dosagens de proteína total e da atividade específica da enzima. A atividade da anidrase carbônica foi determinada pelo método descrito por Vitale *et al.* (1999), baseado em Henry (1991). A atividade foi quantificada através da reação do meio contendo manitol (225 mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10 mM), em pH 7,4. A 7,5 ml desta solução foram adicionados 50µl do

homogeneizado tecidual e 1 ml de água destilada, gelada (2,5°C) e saturada com CO₂. Imediatamente após a adição da água saturada com gás carbônico a redução do pH (inoLAB pH meter Level 1, WTW®) foi monitorada durante 20 segundos, com leitura do valor de pH a cada 4 segundos. A inclinação da reta de regressão linear (pH em relação ao tempo, com dados de 4 a 20 segundos) para cada amostra, representa a taxa da reação catalisada (TC) pela enzima anidrase carbônica presente na amostra. O r² da regressão linear utilizado para obter a taxa de catálise foi sempre superior a 0,98. A taxa de reação não catalisada (TNC) foi considerada a inclinação da reta de regressão obtida na ausência de homogeneizado de amostra, e foi sempre determinada em quadruplicatas, a cada sessão de amostras processadas. A atividade específica da anidrase carbônica (AAC) foi calculada através da fórmula: $AAC = [(TC/TNC) - 1]/mg$ de proteína total na amostra (Burnett et al., 1981; Vitale et al., 1999).

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados teciduais foi determinada de acordo com Bradford (1976). Esse método é baseado na mudança de coloração do reagente Coomassie Brilliant Blue G-250, do vermelho para o azul, ao ligar-se a proteínas. As dosagens foram realizadas em triplicatas para cada amostra, em micro-placas, utilizando o reagente Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories®) com absorbâncias lidas a 620 nm (Elisa Sunrise Tecan Deutschland GmbH, Alemanha).

2.5. Músculo isolado: avaliação in vitro da capacidade de regulação da quantidade de água

Dezesseis peixes foram retirados diretamente do tanque de aclimatação; foram anestesiados e sacrificados, como descrito acima. Três fragmentos musculares (musculatura axial, lado direito) de cada um dos peixes (0,2141±0,0099g, n=40), que foram transferidos para um béquer contendo 10 mL de salina controle, com osmolalidade similar a osmolalidade do plasma de jundiá em água doce (Tabela 8). Um dos três fragmentos musculares permanecia na salina controle durante todo o experimento, e os outros dois eram posteriormente transferidos para béqueres contendo salinas experimentais, hiperosmóticas ao plasma de

jundiás de água doce (Tabela 8). As salinas hiperosmóticas representaram um aumento na osmolalidade extracelular de 20 (n=8), 50 (n=8) e 80% (n=8), em relação aos valores controle (Tabela 8). No início do experimento, o fragmento de músculo era seco por contato com o papel filtro, de forma sistemática, dos dois lados (por ~3-4 segundos) e era então pesado e transferido para um béquer (tempo zero) contendo uma das salinas, controle ou experimental (~10 ml, em temperatura ambiente), de acordo com Freire et al. (2008). A cada 15 minutos, cada fragmento muscular era novamente seco e pesado, até completar 120 minutos de exposição na salina controle ou experimental.

Tabela 8. Composição das salinas controle e experimentais hiper-osmóticas usadas nos experimentos *in vitro* com os fragmentos musculares isolados de *Rhamdia quelen*.

Salinas controle ou experimentais				
Sais (mM)	Controle	120%	150%	180%
NaCl	130	169	208	247
KCl	3	3	3	3
MgCl ₂	1	1	1	1
CaCl ₂	2	2	2	2
Osmolalidade medida	274	337	409	487
(mOsm/kg H ₂ O)				

Componentes adicionais, de concentrações constantes em todas as salinas: glicose (5 mM), NaHCO₃ (2 mM), HEPES ácido (5 mM) e glicina (5 mM), pH 7,6 (de acordo com Freire et al., 2008)

2.6. Estatística

Os dados são apresentados através das médias \pm erro padrão da média. Os resultados do plasma (concentrações de íons, osmolalidade, cortisol e glicose) e dos tecidos (teor hídrico muscular e branquial e atividade da anidrase carbônica branquial e renal) foram comparados utilizando-se análise de variância de uma via, one-way ANOVA: o fator salinidade, com 4 níveis: controle em água doce, e salinidades 5, 15 e 25 g/L, e foi seguido pelo teste *post hoc* de Tukey,

para localização das diferenças. Os grupos de resultados da atividade da enzima anidrase carbônica branquial e renal, para a mesma salinidade, foram adicionalmente comparados entre eles através de teste-t de Student não pareado. Os resultados do experimento *in vitro* (peso úmido do tecido muscular) como porcentagem do peso inicial foram analisados através da análise de variância de uma via para medidas repetidas. O fator tempo, teve 9 níveis: 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, e 120 minutos, para cada condição controle ou experimental. Para cada um dos 4 tempos (excluindo o tempo zero), controle e cada grupo experimental foram comparados através do teste-t de Student pareado. Para dados que não apresentaram normalidade (ou homogeneidade de variâncias) foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para todas as análises, o nível de significância considerado foi de 0,05.

3. Resultados

3.1. Observações comportamentais

No tanque estoque, todos os indivíduos sempre apresentavam a pele com coloração clara, rosada, por causa da cor clara do próprio tanque. Os peixes que foram transferidos para os aquários com 5 g/L de sal mudavam sua cor de pele para cinza, a coloração normal da espécie. Eles não apresentavam nenhuma alteração comportamental em relação aos peixes controles em água doce, mantendo o padrão de natação e de utilização do barbilhão. A pele de 50% dos indivíduos expostos a 15 g/L de NaCl permaneceu rosada no aquário experimental. Os peixes permaneceram a maior parte do tempo parados no fundo do aquário, com agitação ocasional. A função dos barbilhões manteve-se normal. Todos os jundiás expostos a 25 g/L de NaCl mantiveram a pele rosada, e após aproximadamente 15 minutos apresentaram perda da função dos barbilhões (debatendo-se contra a parede do aquário) e clara alteração no padrão de natação. Os peixes permaneciam a maior parte do tempo inerte nos aquários, mas as tentativas de movimentação eram marcadas por um nado com o corpo na posição vertical.

3.2. Dosagens Plasmáticas

O sódio plasmático de *R. quelen* manteve-se em aproximadamente 140 mM, tanto nos peixes controle mantidos em água doce como peixes nos expostos a 5 ou 15 g/L, aumentando somente no grupo exposto a 25 g/L (181 ± 15 mM) (Figura 21 A). O mesmo padrão foi observado para o cloreto plasmático, com aproximadamente 115 mM de cloreto nos peixes controle e nos expostos a 5 g/L. O cloreto plasmático aumentou nos peixes expostos a 15 g/L (133 ± 4 mM), com maior aumento observado nos jundiás expostos a 25 g/L (194 ± 3 mM). Neste tratamento de maior concentração salina, foi observado que a concentração de cloreto passou a ser maior que a concentração de sódio, ou seja, houve uma forte redução na diferença entre os íons (Figura 21 A). A concentração de potássio no plasma de *R. quelen* permaneceu estável

nos peixes controle, e nos mantidos em 5 e 15 g/L: 4,1-3,1 mM; em 25 g/L houve aumento na concentração de potássio plasmático para $7,9\pm 2$ mM (Figura 21 A). O magnésio plasmático de *R. quelen* apresentou-se extremamente estável, variando entre 1,02 e 1,12 mM nos controles, e nos peixes expostos a 5 e 15 g/L. Porém, em 25 g/L o magnésio plasmático dos jundiás ($1,56\pm 0,18$ mM) foi maior que os valores medidos nos controles em água doce (Figura 21 A).

A osmolalidade plasmática de *R. quelen* foi de 260 mOsm/kgH₂O tanto nos controles quanto nos expostos a 5 g/L. Houve um aumento na osmolalidade dos peixes expostos a 15 g/L (293 ± 8 mOsm/kgH₂O), e um aumento ainda maior nos peixes expostos a 25 g/L: 420 ± 12 mOsm/kgH₂O. Este aumento observado na osmolalidade plasmática dos jundiás expostos a 25 g/L representa um aumento de 62 % em relação aos controles em água doce e aos expostos a 5 g/L (Figura 21 B). O cortisol plasmático de *R. quelen* variou entre 146 ng/ml nos controles e 178 ng/mL nos peixes expostos a 25 g/L. Contudo, não houve nenhuma diferença entre os grupos controles e os experimentais (Figura 21 B). A glicose plasmática de *R. quelen* também permaneceu estável, variando entre 47,8 e 64,1 mg/dL nos peixes controle e nos expostos a 5 e 15 g/L. Nos peixes expostos a 25 g/L (78,2 mg/dL), a glicemia foi maior que nos peixes controles e nos expostos a 15 g/L (Figura 21 B).

3.3. Dosagens em tecidos

Teor Hídrico Muscular e Branquial

A porcentagem de água do músculo de *Rhamdia quelen*, de ~80%, manteve-se bastante estável em todos os grupos, inclusive no grupo de peixes expostos a 15 g/L. A redução em relação aos controles foi notada somente nos peixes expostos 25 g/L: $76,8\pm 0,36\%$ (Figura 21 C). Em contraste, nas brânquias o grau de hidratação manteve-se em ~78-79%, para todos os grupos (Figura 21 C).

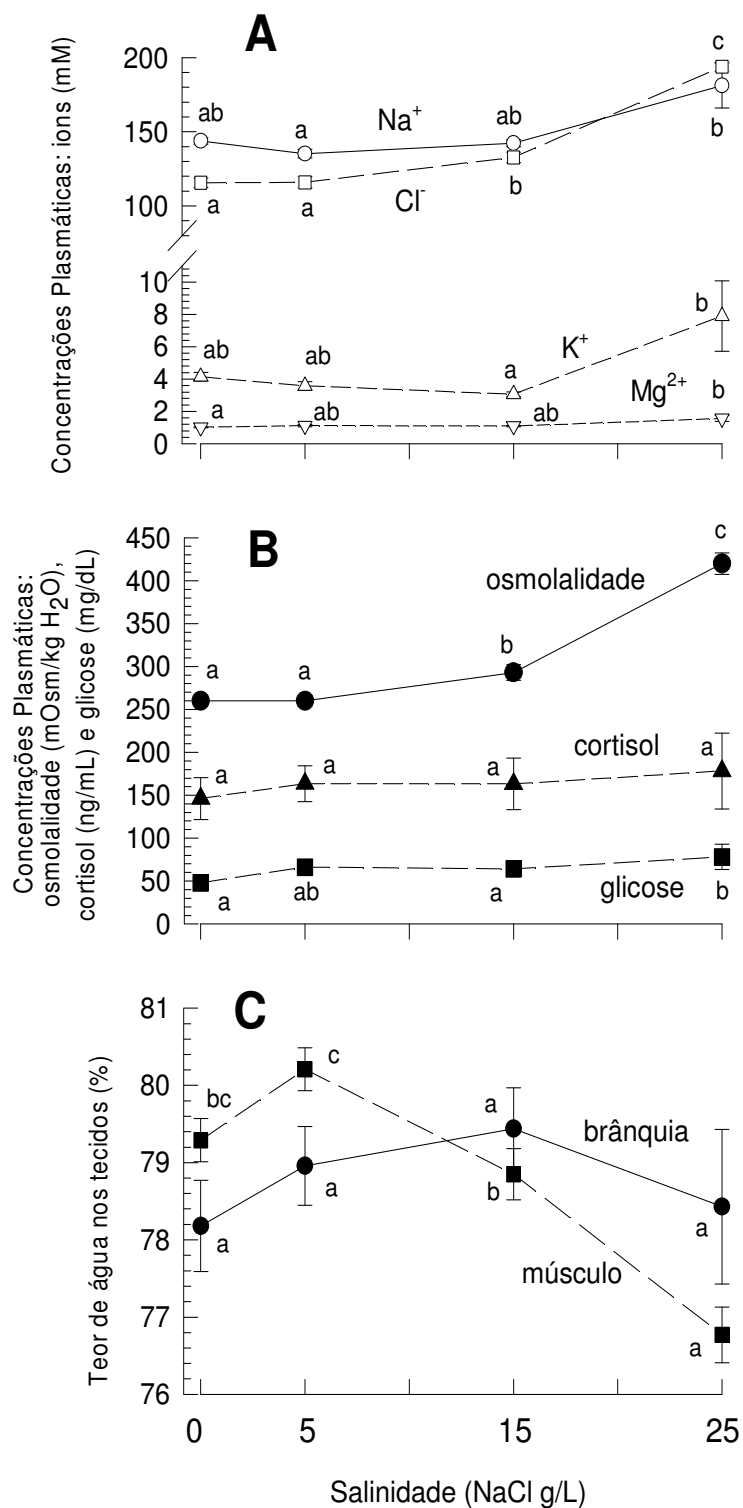


Figura 21. Concentrações plasmáticas e quantidade de água tecidual em *Rhamdia quelen*, em condição controle em água doce (0 g de NaCl/L, n=10-26 para as diferentes análises) ou quando submetidos por 1h a 5 (n=10-17), 15 (n=10-16) ou 25 g/L de NaCl (n=5-13). A: Concentrações plasmáticas dos íons Na⁺, Cl⁻, K⁺, e Mg²⁺ (mM); B: Concentrações plasmática de osmolalidade (mOsm/kgH₂O), cortisol (ng/mL) e glicose (mg/dL); C: Quantidade de água no músculo e brânquia (%). Dentro da mesma linha/parâmetro, símbolos que possuem a mesma letra representam grupos que não são significativamente diferentes. Quando barras de erros não são visíveis, elas são menores que o tamanho dos símbolos.

3.4. Músculo Isolado: Avaliação da capacidade regulatória da quantidade de água

O peso dos fragmentos musculares na salina controle (osmolalidade 274 mOsm/kg H₂O, Tabela 8) não se manteve estável durante as duas horas de observação, atingindo ~104% do seu peso inicial após 75-120 min (Figura 22). Os fragmentos musculares submetidos às salinas hiper-osmóticas mostraram capacidade de retornar aos seus níveis iniciais de hidratação após inicialmente perderem água (ou seja, peso). Em salina hiper-osmótica de 120% (337 mOsm/kg H₂O), uma pequena oscilação foi notada (99,9 a 101,1%), mas com estabilidade até o final do experimento, com alguns valores abaixo dos controles pesados no mesmo tempo (Figura 22 A). Em salina de 150% (409 mOsm/kg H₂O), não houve redução no nível de hidratação ao longo do tempo, mas os valores (95,9 a 99,9%) foram sempre inferiores aos medidos nos controles, exceto para 105 min (Figura 22 B). Na salina mais concentrada (180%, 487 mOsm/kg H₂O) a hidratação muscular medida em 15 min foi a menor (96,9%), mas foi seguido por um aumento ao longo do experimento: 98,8 a 102,6%, atingindo valores similares aos respectivos controles na fase final do experimento (90 e 105 minutos) (Figura 22 C).

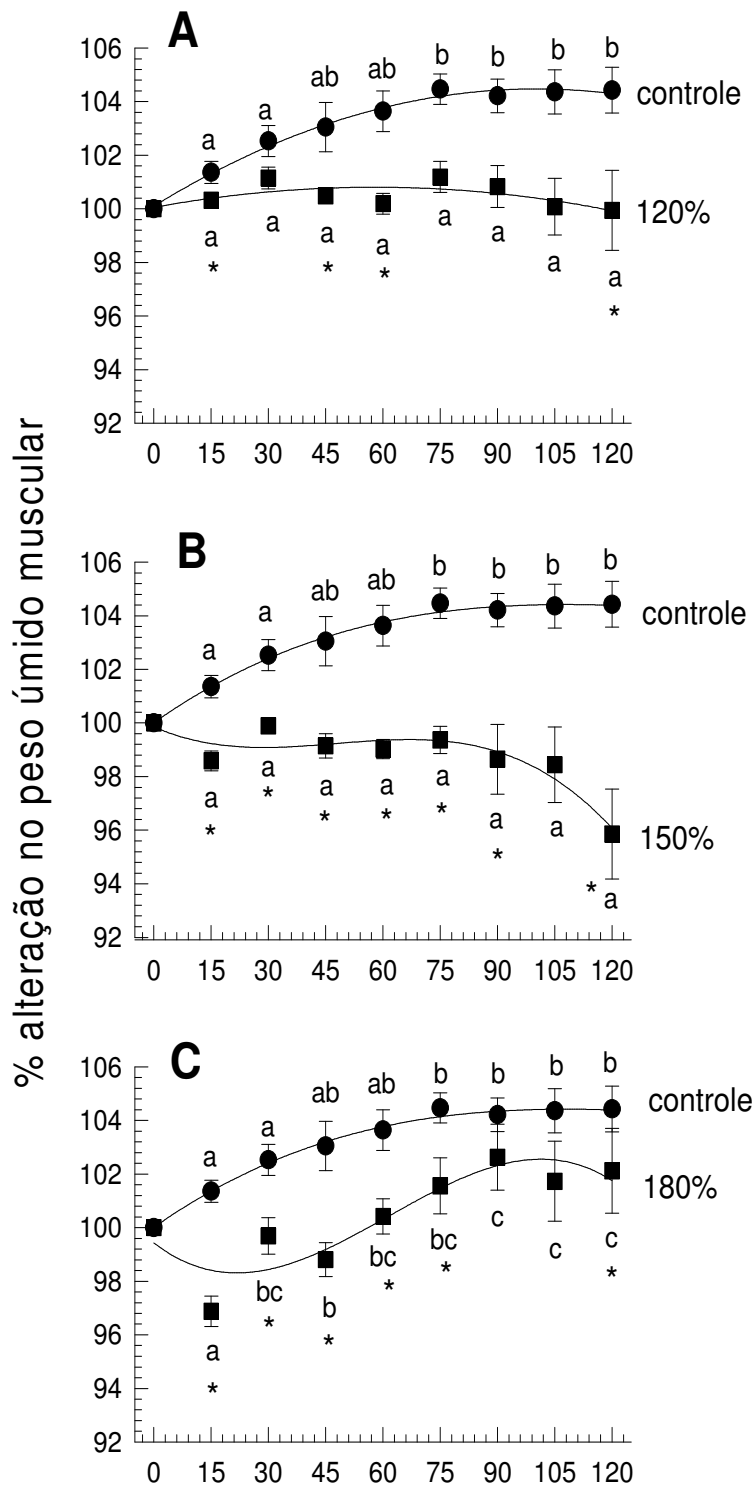


Figura 22. Curso temporal de mudança (%) no peso úmido de fragmentos musculares de *Rhamdia quelen* submetidos *in vitro*, por 120 min, para as condições controle (n=16) ou meio hiper-osmótico (n=8). A: Peso úmido do músculo no controle e em salina 120%; B: no controle e na salina 150%; C: no controle e na salina 180%. O mesmo controle foi repetido em A, B e C. Dentro da mesma linha, símbolos que tiverem a mesma letra representam grupos que não são significativamente diferentes. Quando as barras de erros não estiver visível, elas são menores que o tamanho do símbolo.

3.5. Atividade específica da anidrase carbônica

A atividade específica da enzima anidrase carbônica brânquial dos jundiás aumentou nos peixes expostos a 25 g/L de NaCl: $33,8 \pm 3,1$ /mg de proteína, quando comparada com os demais grupos (15,2 a 20,1 /mg de proteína) (Figura 23). A atividade renal permaneceu inalterada em todos os tratamentos: 21,8 a 28,2 /mg de proteína (Figura 23).

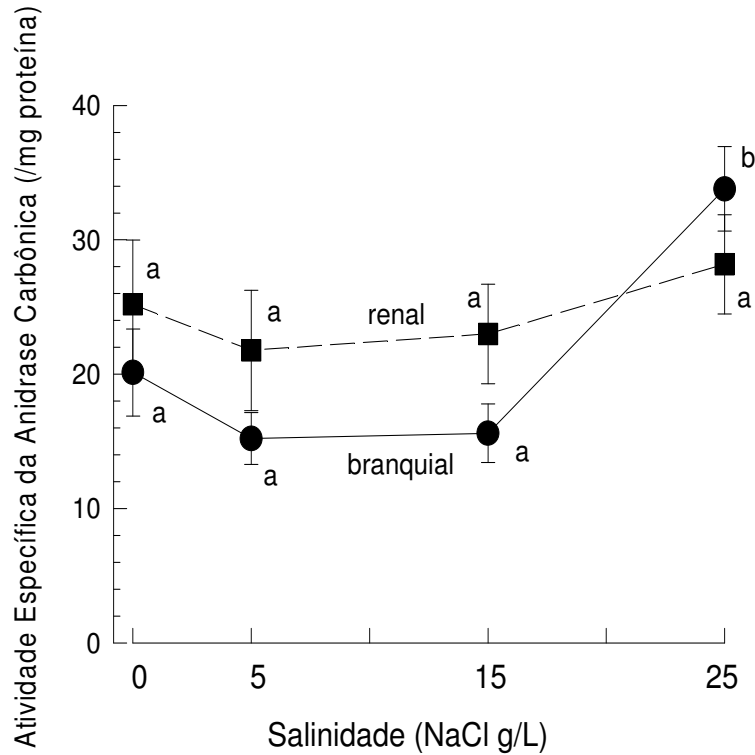


Figura 23. Atividade específica da anidrase carbônica branquial e renal (/mg proteína) de *Rhamdia quelen* em condições controle em água doce (0 g NaCl/L) ou quando submetidos por 1h a salinidades de 5, 15 ou 25 g/L de NaCl. Dentro de um mesmo tecido, símbolos que tiverem a mesma letra representam grupos que não são significativamente diferentes.

4. Discussão

A adição de sal (NaCl) na água em cultivos de peixes de água doce é considerada um redutor de estresse e agente anti-séptico. Entretanto, para peixes de água doce, o sal na água representa um desafio à sua homeostasia osmótica. Peixes dulcícolas possuem seus fluidos corpóreos hiper-osmóticos (osmolalidade de 260-330 mOsm/kgH₂O) em relação ao meio em que vivem. Nesta situação há ganho passivo de água e perda de íons e, portanto, gasto de energia metabólica para absorver íons através das brânquias e para reabsorver íons do filtrado glomerular, eliminando urina diluída. Quando peixes dulcícolas são transferidos para água salina, eles necessariamente sofrem uma perturbação do seu estado homeostático estacionário normalmente sustentado em água doce (revisado em Evans, 1993; Bone et al. 1995; Jobling, 1995; Evans et al., 2005). No protocolo experimental utilizado neste estudo, a exposição dos jundiás a 25 g/L de sal comum (NaCl) utilizado em práticas de aquicultura, prejudicou de forma irrecuperável a homeostasia osmo-iônica, e suas respostas demonstraram estresse osmótico e não adaptação às mudanças impostas (e.g. Martínez-Álvarez et al., 2002; Sampaio e Bianchini, 2002). Além disso, aumento das concentrações plasmáticas, morbidade e evidências de falência do sistema nervoso (alteração na cor da pele, perda da função do barbilhão e alteração no padrão de natação) também foram observados. Adicionalmente, houve redução no teor de hidratação muscular. No entanto, apesar de todas estas mudanças, não houve qualquer alteração no teor hídrico do tecido branquial. Mesmo assim, o resultado observado *in vivo* no tecido muscular de jundiás indica sua notável capacidade de regular seu teor hídrico, mesmo diante de ~62% de aumento na osmolalidade plasmática quando os peixes foram expostos por 1 hora a 25 g/L de sal.

Estes resultados *in vivo* são corroborados pelos resultados observados pela exposição do tecido muscular isolado às salinas hiper-osmóticas (*in vitro*), representando desafio hiper-osmótico direto ao tecido. Para os três níveis de desafio hiper-osmótico imposto ao tecido,

depois de certa queda inicial no peso (15 min.), houve sempre tendência de recuperação do peso original (ou seja, do teor de hidratação), até o final do experimento, principalmente nos fragmentos musculares expostos a salina 180% (Figura 22 C). Nos primeiros 60 min de experimento, a resposta do músculo do jundiá foi a mesma que a apresentada pelo fragmento muscular isolado de outro Siluriformes, *Corydoras ehrhardti*, submetido a uma alteração hiper-osmótica de 50% (salina 150%) de acordo com os mesmos procedimentos experimentais utilizados neste estudo (Freire et al., 2008). Contudo na segunda hora de exposição (de 60 a 120 min) o padrão de estabilidade apresentada pelos fragmentos musculares do jundiá foi muito diferente da acentuada perda de volume muscular (= perda de água, que atingiu quase 10% da perda de peso em relação ao peso inicial) observada no músculo de *C. ehrhardti* (Freire et al., 2008). Nota-se que o aumento no peso (hidratação) observados nos fragmentos musculares de *Rhamdia quelen* submetidos a salina controle foi totalmente inesperada e completamente diferente do comportamento apresentado pelos fragmentos musculares de todas as outras 9 espécies submetidos as salinas controle deste mesmo protocolo (Freire et al., 2008). A primeira hipótese para explicar este aumento de peso pode ser por consequência da absorção de aminoácidos (glicina da salina). Mas o padrão do controle foi exatamente o mesmo quando os fragmentos musculares de *R. quelen* foram submetidos a salina controle sem glicina (n=8) (osmolalidade de 263 mOsm/kg H₂O, resultados não mostrados). Assim, parece que o tecido muscular do jundiá absorve espontaneamente água e solutos. Neste caso, os controles foram totalmente reprodutíveis e consistentes, e as respostas diante das alterações hiper-osmóticas foram muito claras. É evidente que o tecido muscular de *R. quelen* é muito efetivo na absorção de soluto e no aumento regulatório de volume.

A capacidade de regular o teor de hidratação, demonstrado pelo tecido muscular de *R. quelen*, mesmo diante de desafio osmótico de tamanha magnitude (~60% *in vivo* e 80% *in vitro*), não deixa de ser surpreendente, neste teleósteo de água doce. O jundiá pertence à

ordem Siluriformes, de origem primária e longa história evolutiva em água doce (Ostariophysi) (Nelson 2006; Froese e Pauly, 2008; Vergara et al., 2008). Contudo, esta ordem teve ampla radiação, provavelmente no final do Cretáceo (Vergara et al., 2008) e é de fato essencialmente de água doce. Porém existem 2 famílias de bagres marinhos: Plotosidae e Ariidae. A família Heptapteridae, do *Rhamdia quelen*, foi agrupada com estas famílias de siluriformes marinhos após análise filogenética (Reis, 1998; Shimabukuro-Dias et al., 2004; Nelson 2006; Froese e Pauly, 2008; Vergara et al., 2008). Entretanto, outra espécie do gênero *Rhamdia* (*R. guatemalensis*: Jiménez e Cooke, 2001) e até mesmo *R. quelen* são encontradas em ambientes estuarinos (Loebmann e Vieira, 2006; Milani e Fontoura, 2007; Vargas e Bessonart, 2007; Vitule, 2007). A salinidade destes ambientes estuarinos onde espécimes de *Rhamdia quelen* foram encontrados era de 5-6‰, atingindo até 13‰, em estuários de rios dos estados do Paraná e Rio Grande do Sul, sul do Brasil, da mesma região do país das populações de *R. quelen* utilizadas neste estudo (Schiller, 2004; Loebmann e Vieira, 2006; Milani e Fontoura, 2007; Vitule, 2007). A faixa de ocorrência de *R. quelen* nestes habitats é assim compatível com a boa capacidade de regulação de volume tecidual diante de desafios hiper-osmóticos, o que nos permite considerar o grupo submetido a 5 g/L como controles adicionais. O grupo dos peixes submetidos *in vivo* ao tratamento com 5 g de NaCl/L não apresentou nenhuma diferença em relação ao grupo controle em água doce, em todos os parâmetros avaliados, incluindo observações comportamentais. Do mesmo modo, os resultados observados previamente para outro Siluriformes dulcícola, o *Corydoras ehrhardti*, também é compatível com a distribuição dos membros de sua família, Callichthyidae. A família Callichthyidae constitui um grupo monofilético exclusivamente de água doce, com 177 espécies divididas entre 8 gêneros, ocupando todas as principais bacias hidrográficas da região neotropical (Shimabukuro-Dias et al., 2004). Filogeneticamente, esta família situa-se distante do outro grupo de Siluriformes que inclui a família Heptapteridae do *Rhamdia quelen*, e as famílias

Plotosidae e Ariidae, dos bagres marinhos (Reis, 1998; Shimabukuro-Dias et al., 2004; Nelson 2006; Froese e Pauly, 2008; Vergara et al., 2008). A relativa eurihalidade de *Rhamdia quelen* é, portanto, não apenas compatível com sua área de distribuição, mas também com a filogenia dentro dos Siluriformes.

A enzima anidrase carbônica (AC) das brânquias de animais aquáticos está envolvida com osmorregulação, excreção de CO₂ e regulação ácido-base através da reação reversível de hidratação do gás carbônico que resulta nos íons hidrogênio (H⁺) e bicarbonato (HCO₃⁻); AC pode estar solúvel no citosol ou associada à membrana plasmática (Conley e Mallatt, 1988; Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000; Henry et al., 2003; Georgalis et al., 2006a,b; Perry e Gilmour, 2006). Em peixes de água doce, a AC é muito importante para osmorregulação por suprir as células branquiais com HCO₃⁻ e H⁺, que são respectivamente trocados por Cl⁻ e Na⁺, ou ainda bombeados (H⁺) pela H⁺-ATPase vacuolar apical, permitindo assim a absorção ativa de sal (Conley e Mallatt, 1988; Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000; Kirschner, 2004; Evans et al., 2005; Perry e Gilmour, 2006; Evans, 2008). A ativação desta enzima observada nas brânquias dos jundiás expostos a 25 g/L de sal dificilmente estaria relacionada com seu papel na hiper-regulação do plasma, uma vez que o animal está diante de excesso de sal externo, com influxo difusivo passivo de sal através do epitélio branquial e da pele (Evans, 1993; Jobling, 1995; Reubush e Heath, 1997; Evans et al., 2005; Prodocimo et al., 2007).

Situações estressantes, tais como quando animais de água doce são submetidos a um aumento na salinidade externa além da sua capacidade osmorregulatória (aqui, 1h em 25 g/L para o jundiá), evocam diversas perturbações metabólicas: ocorre aumento do metabolismo (e.g. Martínez-Álvarez et al., 2002; Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Soengas et al., 2007), da produção de CO₂ (Perry e Gilmour, 2006), do cortisol plasmático (Redding e Schreck, 1983; Reubush e Heath, 1997; Mommsen et al., 1999; Tsuzuki et al., 2001; Martínez-Álvarez et al.,

2002; Barreto e Volpato, 2006; Hosoya et al., 2007), e da liberação de glicose devido degradação do glicogênio (Redding e Schreck, 1983; Reubush e Heath, 1997; Barcellos et al., 2001; Martínez-Álvarez et al., 2002; Gomes et al., 2003; Sangiao-Alvarellos et al., 2003; Barreto e Volpato, 2006; Gomes et al., 2006). A maior produção de CO₂ gera acidose metabólica (Perry e Gilmour, 2006), dada a baixa capacidade de tamponamento do sistema bicarbonato em peixes (revisão em Evans et al., 2005). Na verdade, o aumento do CO₂ sanguíneo resultante do aumento no metabolismo é potencialmente reforçado pela provável redução na permeabilidade branquial para minimizar a entrada de sal (por exemplo, devido a produção de muco, e.g., Gomes et al., 2003; Gomes et al., 2006; Garcia et al., 2007), desencadeando uma demanda maior sobre a função desta enzima (presente nas hemácias e nas brânquias) na regulação ácido-básica (Henry e Swenson, 2000). Embora não foram realizadas medidas diretas de avaliação do equilíbrio ácido-básico dos jundiás, este status de acidose metabólica pode ser indiretamente inferido. Um aumento proporcionalmente maior de Cl⁻ do que de Na⁺ plasmático (Truchot, 1992; Jensen et al., 1998) foi observado nos jundiás submetidos ao aumento de salinidade. A razão Na⁺/Cl⁻ foi de 1.21±0.03 em água doce, não sendo diferente em 5 g/L (1.18±0.03) (P=0.53, teste t de Student, em comparação aos controles em água doce), caindo para 1.10±0.04 em 15 g/L (P=0.045), e diminuindo ainda mais em 25 g/L, para um valor abaixo da unidade: 0.92±0.07 (P= 0.0009). Em teleósteos de ambientes e latitudes variáveis, a concentração plasmática de Na⁺ é superior à de Cl⁻ (revisão em Freire e Prodocimo, 2007), compatível com a indicação de acidose pela elevação relativa do Cl⁻ plasmático (Jensen et al., 1998). Aumentos da salinidade e do suprimento de CO₂ declaradamente levam ao aumento da atividade da anidrase carbônica (Henry e Swenson, 2000), compatível com nossos resultados. Além disso, a injeção do inibidor da anidrase carbônica (e.g., acetazolamida) leva a desequilíbrio ácido-básico (Randall e Brauner, 1998; Henry e Swenson, 2000; Georgalis et al., 2006a). Deve-se fazer a ressalva de que, as brânquias dos jundiás não foram perfundidas aqui,

a atividade AC medida no homogeneizado branquial pode refletir, mesmo que parcialmente, a atividade da AC das hemácias. Em particular, esta associação entre desafio osmótico extremo e desequilíbrio ácido-básico em peixes de água doce foi demonstrada também em trutas (Maxime et al., 1991) ou ainda em outros animais aquáticos como o caranguejo chinês *Eriocheir sinensis* (Truchot, 1992).

Confirmando o padrão geral de perturbação da homeostase em jundiás expostos por 1h a 25 g/L de sal, houve aumento da glicose plasmática (Laiz-Carrión et al., 2002; Martínez-Álvarez et al., 2002; Sangiao-Alvarellos et al., 2003). No entanto, o cortisol plasmático manteve inalterado em todos os tratamentos. Aumento da salinidade normalmente resulta no aumento do cortisol plasmático em peixes de água doce (Redding e Schreck, 1983; Reubush e Heath, 1997; Mommsen et al., 1999; Tsuzuki et al., 2001; Martínez-Álvarez et al., 2002). Além disso, o aumento nos níveis de cortisol é fortemente associado ao estresse da manipulação (e.g., Barcellos et al., 2001; 2004). Como os níveis basais para esta espécie são ~ 30ng/mL (Barcellos et al., 2001; 2004), os valores apresentados neste estudo provavelmente indiquem estresse da manipulação, independentemente da presença de sal. Na verdade, dependendo do tipo e da duração do estresse, e da espécie, a resposta de aumento nos níveis de cortisol e glicose plasmática é bastante variável (e.g., Hosoya et al., 2007). Além disso, o aumento nos níveis de cortisol é considerado como uma resposta primária de estresse, seguido pelo aumento da glicose plasmática (resposta secundária) e distúrbios osmorregulatórios (Redding e Schreck, 1983; Reubush e Heath, 1997; Mommsen et al., 1999; Tsuzuki et al., 2001; Martínez-Álvarez et al., 2002), de acordo com os nossos resultados.

5. Conclusão

Espécimes de *Rhamdia quelen*, quando submetidos por 1h a 25 g/L de sal (NaCl), apresentam redução da homeostase extracelular, com aumento da osmolalidade e das concentrações iônicas, aumento na glicose plasmática e ativação da enzima anidrase carbônica branquial, revelando uma clara resposta de estresse, embora sem aumento do cortisol plasmático. Porém, mesmo diante deste intenso estresse osmótico, os peixes demonstraram grande capacidade de regulação da água do seu tecido muscular. Assim, a fim de remover o parasita *I. multifiliis*, para um tratamento com duração de 1h, NaCl deve ser usado em uma concentração máxima de 15 g/L. Esta quantidade de sal não afetou significativamente a homeostase osmótica e ácido-básica dos jundiás, como foi verificado utilizando 25 g/L. Este estudo destaca a necessidade de investigar o efeito do sal sobre a homeostase osmótica de outras espécies de peixes de água doce cultivadas.

6. Referências Bibliográficas

Barcellos, L.J.G., Woehl, V.W., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Ittzés, I., Krieger, M.H., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac. Res.* 32, 121–123.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Fioreze, I., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Baldissera, R.K., Bruschi, A., Ritter, F., 2004. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture* 232, 383–394.

Barreto, R.E., Volpato, G.L., 2006. Stress responses of the fish Nile Tilapia subjected to electroshock and social stressors. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39, 1605–1612.

Bone, Q., Marshall, N.B., Blaxter, J.H.S., 1995. Osmoregulation and ion balance. Tertiary level biology. *Biology of Fishes*, 2nd ed. Chapman & Hall, London. 332 pp.

Boscardin, N.R., 2008. A produção aquícola brasileira. In: Ostrensky, A., Borghetti, J.R., Soto, D. (Eds.), *Aquíicultura no Brasil: O Desafio é Crescer*. Editora Brasília, Brasília, pp. 27–72.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem* 72, 248–254.

Brandão, D.A., 2004. Profilaxia e doenças. In: Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. (Eds.), *Criação de Jundiá*. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 161–189.

Buchmann, K., Bresciani, J., 1997. Parasitic infections in pnd-reared rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Denmark. *Dis. Aquat. Org.* 28, 125–138.

Burnett, L.E., Woodson, P.B.J., Rietow, M.G., Vilicich, V.C., 1981. Crab gill intra-epithelial carbonic anhydrase plays a major role in haemolymph CO₂ and chloride ion regulation. *J. Exp. Biol.* 92, 243–254.

Camargo, S.G.O., Pouey, J.L.O.F., Vaz, B.S., 2006. Efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos do jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824). *Rev. Bras. Agrocienc.* 12, 453–460.

Carneiro, P.C.F., Bendhack, F., Mikos, J.D., Schorer, M., Oliveira-Filho, P.C.R., 2002. Jundiá, um grande peixe para a região sul. *Panor. Aqüic.* 12, 41–46.

Carneiro, P.C.F., Schorer, M., Mikos, J.D., 2005. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). Pesq. Agropec. Bras. 40, 99–102.

Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., Bendhack, F., 2007. Osmoregulation and fish transportation. In: Baldisserotto, B., Mancera, J.M., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Osmoregulation. Science Publishers, Enfield, pp. 235–248.

Conley, D.M., Mallatt, J., 1988. Histochemical localization of Na⁺-K⁺-ATPase and carbonic anhydrase activity in gills of 17 fish species. Can. J. Zool. 66, 2398–2405.

Evans, D.H., 1993. The Physiology of Fishes. CRC Press, Boca Raton. 592 pp.

Evans, D.H., 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. Am. J. Physiol. 295, R704–R713.

Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid–base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85, 97–177.

Ewing, M.S., Black, M.C., Blazer, V.S., Kocan, K.M., 1994. Plasma chloride and gill epithelial response of channel catfish to infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. J. Aquat. Animal Health. 6, 187–196.

Francis-Floyd, R., 1995. The use of salt in aquaculture. University of Florida, Cooperative Extension service. Fact Sheet VM 86, 1-3. retrieved from <http://edis.ifas.ufl.edu/vm007> on August 2008.

Freire, C.A., Prodocimo, V., 2007. Special challenges to teleost fish osmoregulation in environmentally extreme or unstable habitats. In: Baldisserotto, B., Mancera, J.M., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Osmoregulation. Science Publishers, Enfield, pp. 249–276.

Freire, C.A., Amado, E.M., Souza, L.R., Veiga, M.P.T., Vitule, J.R.S., Souza, M.M., Prodocimo, V., 2008. Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. Comp. Biochem. Physiol. 149A, 435–446.

Froese, R., Pauly, D., 2008. FishBase. World Wide Web electronic publication. Retrieved from <http://www.fishbase.org> on August 2008.

Garcia, L.O., Becker, A.G., Copatti, C.E., Baldisserotto, B., Radünz Neto, J., 2007. Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. J. World Aquac. Soc. 38, 1–11.

Georgalis, T., Perry, S.F., Gilmour, K.M., 2006a. The role of branchial carbonic anhydrase in acid–base regulation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Exp. Biol. 209, 518–530.

Georgalis, T., Gilmour, K.M., Yorston, J., Perry, S.F., 2006b. Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid–base balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 291, F407–F421.

Golombieski, J.I., 2004. Transporte de peixes. In: Baldisserotto, B., Radünz Neto, J. (Eds.), Criação de Jundiá. Editora UFSM, Santa Maria, pp. 191–199.

Golombieski, J.I., Silva, L.V.F., Baldisserotto, B., da Silva, J.H.S., 2003. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. Aquaculture 216, 95–102.

Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000. Biologia de jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). Ciencia Rural 30, 179–185.

Gomes, L.C., Araujo-Lima, C.A.R.M., Roubach, R., Urbinatti, E.C., 2003. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. Pesqui. Agropecu. Bras. 38, 283–290.

Gomes, L.C., Chagas, E.C., Brinn, R.P., Roubach, R., Copatti, C.E., Baldisserotto, B., 2006. Use of salt during transportation of air breathing pirarucu juveniles (*Arapaima gigas*) in plastic bags. Aquaculture 256, 521–528.

Henry, R.P., 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase in vitro: the electrometric delta pH and pH stat assays. In: Dodgson, S.J., Tashian, R.E., Gros, G., Carter, N.D. (Eds.): The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics. Plenum Press, New York, pp. 119–126.

Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate gas exchange organs. Resp. Physiol. 121, 1–12.

Henry, R.P., Gehrich, S., Weihrauch, D., Towle, D.W., 2003. Salinity-mediated carbonic anhydrase induction in the gills of the euryhaline crab, *Carcinus maenas*. Comp. Biochem. Physiol 136A, 243–258.

Hosoya, S., Johnson, S.C., Iwama, G.K., Gamperl, A.K., Afonso, L.O.B., 2007. Changes in free and total plasma cortisol levels in juvenile haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) exposed to long-term handling stress. Comp. Biochem. Physiol. 146A, 78–86.

Jiménez, M., Cooke, R., 2001. Pesca precolombina en un Estuario Neotropical: el caso de Cerro Juan Díaz (Bahía de Parita, Costa del Pacífico de Panamá). Notic. Antropol. Arqueol., pp. 1–32.

Jensen, M.K., Madsen, S.S., Kristiansen, K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺K⁺-ATPase in the gills of European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax* (L). J. Exp. Zool. 282, 290–300.

Jobling, M., 1995. Osmotic and ionic regulation —water and salt balance. Environmental Biology of Fishes. Chapman & Hall, London. 455 pp.

Kirschner, L.B., 2004. The mechanism of sodium chloride uptake in hyperregulating aquatic animals. J. Exp. Biol. 207, 1439–1452.

Klein, S., Feiden, A., Boscolo, W.R., Reidel, A., Signor, A., Signor, A.A., 2004. Utilização de produtos químicos no controle de *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet (1876) em alevinos de surubim do Iguacu *Steindachneridion sp.*, Garavello (1991). Ciênc. Agrárias. 25, 51–58.

Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Martín Del Río, M.P., Míguez, J.M., Soengas, J.L., Mancera, J.M., 2002. Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action. Fish Physiol. Biochem. 27, 179–188.

Loebmann, D., Vieira, J.P., 2006. O impacto da pesca do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis* (Perez-Farfante) (Decapoda, Penaeidae) nas assembléias de peixes e siris do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul, Brasil. Rev. Bras. Zool. 23, 1016–1028.

Luz, R.K., Portella, M.C., 2002. Larvicultura de trairão (*Hoplias lacerdae*) em água doce e água salinizada. Rev. Bras. Zootec. 2, 829–834.

Marchioro, M.I., Baldisserotto, B., 1999. Sobrevivência de alevinos de Jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. Ciência Rural 29, 315–318.

Martínez-Álvarez, R.M., Hidalgo, M.C., Domezain, A., Morales, A.E., García-Gallego, M., Sanz, A., 2002. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity. *J. Exp. Biol.* 205, 3699–3706.

Maxime, V., Pennee, J.P., Peyraud, C., 1991. Effects of direct transfer from freshwater to seawater on respiratory and circulatory variables and acid–base status in rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 161, 557–568.

Milani, P.C.C., Fontoura, N.F., 2007. Diagnóstico da pesca artesanal na Lagoa do Casamento, sistema nordeste da Laguna dos Patos: Uma proposta de manejo. *Biociências* 15, 82–125.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268.

Munro, C.J., Stabenfeldt, G.S., 1984. Development of a microtitre plate enzyme immunoassay for the determination of progesterone. *J. Endocrinol.* 101, 41–49.

Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*, 4th ed. Wiley, New York. 601 pp.

Perry, S.F., Gilmour, K.M., 2006. Acid–base balance and CO₂ excretion in fish: unanswered questions and emerging models. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 154, 199–205.

Prodocimo, V., Galvez, F., Freire, C.A., Wood, C.M., 2007. Unidirectional Na⁺ and Ca²⁺ fluxes in two euryhaline teleost fishes, *Fundulus heteroclitus* and *Oncorhynchus mykiss*, acutely submitted to a progressive salinity increase. *J. Comp. Physiol.* 177, 519–528.

Randall, D.J., Brauner, C., 1998. Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A, 3–8.

Redding, J.M., Schreck, C.B., 1983. Influence of ambient salinity on osmoregulation and cortisol concentration in yearling coho salmon during stress. *Trans. Am. Fish. Soc.* 112, 800–807.

Reis, R.E., 1998. Anatomy and phylogenetic analysis of the neotropical callichthyid catfishes (Ostariophysi, Siluriformes). *Zool. J. Linn. Soc.* 124, 105–168.

Reubush, K.J., Heath, A.G., 1997. Effects of recovery water salinity on secondary stress responses of hybrid striped bass fingerlings. *Prog. Fish-Cult.* 59, 188–197.

Sampaio, L.A., Bianchini, A., 2002. Salinity effects on osmoregulation and growth of the euryhaline flounder *Paralichthys orbignyanus*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 269, 187–196.

Sangiao-Avarelllos, S., Laiz-Carrión, R., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Miguez, J.M., Mancera, J.M., Soengas, J.L., 2003. Acclimation of *S. aurata* to various salinities alters energy metabolism of osmoregulatory and nonosmoregulatory organs. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 285, R897–R907.

Schiller, R.V., 2004. Influência de alterações morfológicas sobre a hidrodinâmica do estuário da Lagoa dos Patos. Monografia. Fundação Universidade do Rio Grande, Rio Grande, Brasil. 84pp.

Schulz, U.H., Leuchtenberger, C., 2006. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). Braz. J. Biol. 66A, 565–574.

Selosse, P.M., Rowland, S.J., 1990. Use of common salt to treat Ichthyophthiriasis in Australian Warmwater fishes. Prog. Fish-Cult. 52, 124–127.

Shimabukuro-Dias, C.K., Oliveira, C., Reis, R.E., Foresti, F., 2004. Molecular phylogeny of the armored catfish family Callichthyidae (Ostariophysi, Siluriformes). Mol. Phylogen. Evol. 32, 152–163.

Soengas, J.L., Sangiao-Alvarelllos, S., Laiz-Carrión, R., Mancera, J.M., 2007. Energy metabolism and osmotic acclimation in teleost fish. In: Baldisserotto, B., Mancera, J.M., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Osmoregulation. Science Publishers, Enfield, pp. 277–307.

Tavares-Dias, M., Melo, J.F.B., Moraes, G., Moraes, F.R., 2002. Características hematológicas de teleósteos brasileiros. IV. Variáveis do jundiá *Rhamdia quelen* (Pimelodidae). Ciência Rural 32, 693–698.

Truchot, J.P., 1992. Acid–base changes on transfer between sea- and freshwater in the Chinese crab, *Eriocheir sinensis*. Resp. Physiol. 87, 419–427.

Tsuzuki, M.Y., Ogawa, K., Strüssmann, C.A., Maita, M., Takashima, F., 2001. Physiological response during stress and subsequent recovery at different salinities in adult pejerrey *Odontesthes bonariensis*. Aquaculture 200, 349–362.

Vargas, R., Bessonart, M., 2007. Lipid body composition of black catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae), of two populations adapted to different environmental conditions. Bol. Inst. Pesca 33, 105–111.

Vergara, J., de las Azpelicueta, M., Garcia, G., 2008. Phylogeography of the neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriforme: Pimelodidae) from rio de la Plata basin, South America, and conservation remarks. Neotrop. Ichthyol. 6, 75–85.

Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. 122 C, 121–129.

Vitule, J.R.S., 2007. Distribuição, abundância e estrutura populacional de peixes introduzidos no Rio Guaraguaçu, Paranaguá, Paraná, Brasil. Tese de doutorado, Departamento de Zoologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. 161 pp.

Capítulo VI: Mecanismos de excreção de amônia no peixe de entre-marés *Lipophrys pholis* diante de exposição ao ar, à água doce e ao aumento da amônia

Sumário

Resumo.....	217
Abstract	219
1. Introdução	220
2. Objetivos	222
3. Material e Métodos.....	223
3.1 Obtenção dos animais e manutenção em laboratório.....	223
3.2 Experimentação	223
3.2.1 Experimento de exposição ao ar	223
3.2.2 Experimento de exposição à água doce e ao aumento de concentração de amônia na água (1 mM NH ₄ Cl).....	224
3.2.3 Experimento de injeção de cloreto de sódio (NaCl 0,3 M) e bicarbonato de amônio (NH ₄ HCO ₃ 0,3 M)	225
3.3 Obtenção de material biológico.....	226
3.4 Análise das amostras.....	226
3.4.1 Dosagens na água.....	226
3.4.2 Dosagens em tecidos.....	227
3.5 Análises Estatísticas.....	230
4. Resultados	232
4.1 Experimento de exposição ao ar	232
4.2 Experimento de exposição à água doce e aumento de concentração de amônia na água (1mM NH ₄ Cl)	233
4.3 Experimento de injeção de cloreto de sódio (NaCl 0,3M) e bicarbonato de amônio (NH ₄ HCO ₃ 0,3M)	235
4.4 Imunocitoquímica	243
5. Discussão	244
6. Conclusão	254
7. Referências Bibliográficas	255

Resumo

Peixes de regiões entre-marés suportam alterações ambientais rápidas na salinidade, oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água em função dos ciclos de marés. Alguns destes peixes de entre-marés possuem hábito anfíbio, se expondo habitual e voluntariamente ao ar, podendo permanecer por horas, ou até mesmo dias nestas condições. O blenídeo *Lipophrys (=Blennius) pholis* é uma dessas espécies. Porém, a maioria destes teleósteos são amoniotélicos, podendo apresentar comprometimento na excreção de amônia quando emersos. Diante das lacunas existentes sobre mecanismos de excreção de amônia em peixes anfíbios, este estudo teve por objetivo investigar possíveis mecanismos de excreção de nitrogênio e efeitos sobre o transporte de íons neste peixe, através de suas brânquias e pele. Os desafios impostos foram exposição ao ar, à água doce e ao aumento das concentrações de amônia na água (1 mM NH_4Cl) e no sangue (NH_4HCO_3 0,3 M) por um período superior ao dos ciclos de marés (24 h). *L. pholis* apresentou grande capacidade na manutenção dos fluxos de excreção de amônia, de regulação da hidratação tecidual, e de manutenção das concentrações iônicas nos tecidos diante da exposição a desafios fisiológicos. Dentre todos os desafios a que estes peixes foram expostos a exposição à água doce foi a condição mais desafiadora para *L. pholis*. A pele foi de extrema importância nos processos de excreção de amônia nestes peixes, especialmente quando expostos ao ar e ao aumento na concentração de amônia interna. Esta estabilidade nos parâmetros avaliados ocorreu basicamente sem ativação e aumento na expressão de proteínas de transporte de íons ou de amônia (NHE2R15, NHE3R18, RhAG, RhCG2, NKCC, PCNA, NKA, AC). Tal situação pode ter relação com o fato destes peixes anfíbios serem residentes de regiões de entre-marés, e serem expostos constantemente a desafios fisiológicos. Supõe-se assim que já possuam alta taxa de expressão e atividade da NKA (constitutivas), e de demais proteínas envolvidas na eliminação da amônia, o suficiente para

não ocorrer aumento de sua expressão (“up-regulation”) diante dos desafios fisiológicos a que foi submetido neste estudo.

Abstract

Intertidal fish endure fast environmental fluctuations in water salinity, dissolved oxygen, pH and water temperature, as function of tidal cycles. Some intertidal fish display amphibious habit, exposing themselves frequently and voluntarily to the air, there remaining for hours, or even days, uncovered by water. The blennid *Lipophrys (=Blennius) pholis* is one of these species. However, most of these fishes are ammonotelic, possibly facing difficulties in getting rid of metabolic ammonia when exposed to the air. Given the blanks still remaining about the mechanisms of ammonia excretion in amphibious fishes, the goal of this study was to investigate nitrogen excretion in this fish, and the relationship between nitrogen excretion and ion regulation/transport through its gills and skin. Treatments offered were air exposure, exposure to fresh water, and to increases in ammonia in the water (1 mM NH_4Cl) and in the blood (NH_4HCO_3 0.3 M) for a period longer than the duration of the tidal cycles, 24 h. *L. pholis* displayed great capacity to maintain its 1) ammonia excretion rates, 2) tissue hydration, 3) tissue ionic concentrations, after facing those physiological challenges. Among all the conditions, exposure to fresh water was the hardest one for *L. pholis*. The skin was shown to be extremely relevant for ammonia excretion in this fish, especially when exposed to the air or to increased internal ammonia. This stability in the measured parameters occurred without massive activation or increased expression of ion and ammonia transport proteins (NHE2R15, NHE3R18, RhAG, RhCG2, NKCC, PCNA, NKA, AC). This is probably related to their adaptation to the variable intertidal habitat, being constantly exposed to intense environmental variation. They thus display high constitutive expression and activity rates of the NKA, and other proteins involved in ammonia elimination, high enough not to require upregulation upon the stresses offered here.

1. Introdução

Peixes de regiões entre-marés suportam alterações ambientais rápidas na salinidade, oxigênio dissolvido, pH e temperatura da água em função dos ciclos de marés (e.g. Bridges, 1988; Martin, 1995; Sayer, 2005). Adicionalmente, algumas ordens desses peixes possuem representantes com hábito anfíbio, que se expõem habitual e voluntariamente ao ar podendo permanecer por horas, ou até mesmo dias nestas condições (Graham, 1973; Martin, 1995; Graham, 1997; Sayer, 2005). Este hábito se desenvolveu e permanece em várias espécies da família Blenniidae (Ordem Perciformes, Sub-ordem Blennioidei) (Graham, 1973; 1997).

O blenídeo *Lipophrys (=Blennius) pholis* (Linnaeus, 1758) habita fendas rochosas ou poças de entre-marés e é capaz de tolerar até 5 dias de emersão em ambiente de alta umidade (Davenport e Vahl, 1979; Davenport e Sayer, 1986; Martin 1995; Graham, 1997). São muito abundantes e de ampla distribuição geográfica, sendo encontrados da Mauritânia à Noruega, incluindo os Açores e o Mediterrâneo (Davenport e Sayer, 1986; Stefanni et al., 2006; Lima et al., 2008; Ferreira et al., 2009). A fase de mobilidade da espécie se resume ao período de recrutamento larval; após este período ficam restritos ao costão rochoso colonizado. Por esta característica, são considerados bons representantes das condições ambientais locais e, portanto úteis como sentinelas em estudos ecotoxicológicos (e.g. Lima et al., 2008; Solé et al., 2008; Ferreira et al., 2009).

A excreção de compostos nitrogenados é fortemente dependente do ambiente do animal. Como são primariamente aquáticos, os peixes teleósteos são essencialmente amoniotélicos, ou seja, têm a amônia como principal produto metabólico nitrogenado (Randall e Wright, 1987; Saha e Ratha, 1998; Wilkie, 2002; Evans et al., 2005; Sayer, 2005; Weihrauch et al., 2009). A amônia é o produto de excreção de nitrogênio de obtenção mais rápida e menos custosa metabolicamente. Sendo prontamente liberada para a água, não se torna tóxica para o

próprio organismo (Randall e Wright, 1987; Wilkie, 1997; Saha e Ratha, 1998; Randall e Tsui, 2002; Wilkie, 2002; Evans et al., 2005; Sayer, 2005; Weihrauch et al., 2009). Cerca de 80-90% da amônia produzida é excretada pelas brânquias dos peixes (Randall e Wright, 1987; Wilkie, 1997; 2002; Evans et al., 2005; Weihrauch et al., 2009; Wright e Wood, 2009). A amônia pode ser excretada sob ambas as formas (NH_3 e NH_4^+) e de várias maneiras: 1) difusão de NH_3 , 2) difusão de NH_4^+ , 3) troca apical de $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, 4) troca apical H^+/NH_4^+ , 5) substituição do NH_4^+ por K^+ através de co-transportadores basolaterais como a $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ e/ou $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$, e através das recém-descobertas glicoproteínas Rhesus (Rh) (Wilkie, 1997; Randall e Tsui, 2002; Wilkie, 2002; Randall e Ip, 2006; Weihrauch et al., 2009; Wright e Wood, 2009). Peixes anfíbios, quando emersos, podem apresentar comprometimento na excreção de amônia, e passar a converter a amônia em outros compostos nitrogenados menos tóxicos, como uréia ou glutamina, os quais podem ser excretados ou estocados (e.g. Gordon et al., 1978; Ramaswamy e Gopalakrishna Reddy, 1983; Saha e Ratha, 1998; Randall e Tsui, 2002; Sayer, 2005; Randall e Ip, 2006).

2. Objetivos

- Investigar os mecanismos de excreção de compostos nitrogenados em *Lipophrys pholis*;
- Inferir sobre a relação desses processos com o transporte de íons nesta espécie diante da exposição ao ar, à água doce e ao aumento das concentrações de amônia na água e no sangue.

3. Material e Métodos

3.1 Obtenção dos animais e manutenção em laboratório

Os peixes de entre-marés, *Lipophrys pholis*, foram coletados nos costões rochosos da praia de Matosinhos na cidade do Porto em Portugal, através de puçás ou por coleta manual, nos meses de março e abril de 2010. Os peixes foram transportados até o Centro de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR) em galões de 30 litros, com água do local de coleta, por aproximadamente 20 minutos. No CIIMAR, os peixes foram levados ao Biotério de Organismos Aquáticos (BOGA) onde foram mantidos em tanque de 1000L de água salgada (33‰) com aeração e filtragem biológica constante. As temperaturas do ambiente e da água eram mantidas em 16°C através de ar condicionado. O tanque de aclimação tinha 50% do seu volume de água substituído semanalmente. Os animais foram alimentados em dias alternados com mexilhões (*Mytilus edulis*). Porém, 24h antes do início da exposição dos peixes às condições experimentais os mesmo deixaram de ser alimentados.

3.2 Experimentação

3.2.1 Experimento de exposição ao ar

Este experimento foi realizado segundo o protocolo descrito em Davenport e Sayer (1986), modificado. Os peixes utilizados neste experimento foram retirados do aquário estoque e colocados em um aquário de 30 L, 24 h antes do início dos procedimentos. Esses peixes foram então pesados e distribuídos individualmente em doze aquários de 1 L com água salgada e aeração constante, onde permaneceram por mais 24 h. Ao final destas 24 h, correspondente ao período de pré-exposição ao experimento (PRE EXP), foram coletados 2 ml de água de cada um dos aquários para determinação do pH e concentração de amônia (Tabela 9). Em seguida, os aquários dos peixes controles (CT AM, n=6) tiveram a água substituída e os peixes experimentais (EXP AR, n=6) foram transferidos aos recipientes, onde foram expostos

ao ar. Imediatamente após esta troca de água houve nova coleta de água correspondente ao início do experimento. Amostras de água foram novamente obtidas após 6h e ao final do período experimental de 24h, somente para os peixes controle. Os peixes expostos ao ar, por estarem privados de água, foram lavados (50 mL de água salgada) ao final do período experimental, para determinação do pH e da amônia na água do banho, que removeu o muco secretado pela pele dos peixes. Adicionalmente, ao longo de todo o período experimental, capilares acoplados ao recipiente onde os peixes foram expostos ao ar coletavam a amônia eliminada para o ar. O ar contendo a amônia volatilizada passava por um recipiente contendo KOH 0,1N para remover o CO₂, e em seguida o ar era retido em 15 ml de solução ácida (HCl 0,1N). Determinaram-se em seguida o pH e as concentrações de amônia desta solução ácida (Tabela 9).

3.2.2 Experimento de exposição à água doce e ao aumento de concentração de amônia na água (1 mM NH₄Cl)

Os peixes submetidos a esta etapa experimental foram tratados da mesma forma que os peixes utilizados no experimento anterior, permanecendo até o final do período de pré-exposição em aquários individuais de 1 L (24 h em água do mar). Ao final da pré-exposição às águas dos aquários foram substituídas pela água correspondente a cada um dos três grupos: 1 L de água do mar (33‰, controles CT AM, n=6), 1 L de água doce (0‰, EXP AD, n=5), ou 1 L de água do mar + 1 ml de NH₄Cl (1 mM, EXP NH₃, n=6). Adicionalmente, montou-se um aquário, sem nenhum peixe, contendo apenas 1 L de água do mar + 1 ml de NH₄Cl (1 mM). Este aquário serviu como controle da concentração de amônia na água ao longo do experimento. Essa fase experimental também teve 24 h de duração. Todos os aquários das referidas condições tiveram suas águas coletadas (2 ml) ao final do período de pré-exposição, no início do experimento, após 6 h de exposição e ao final do experimento (24 h), para a determinação do pH e concentração de amônia (Tabela 9).

3.2.3 Experimento de injeção de cloreto de sódio (NaCl 0,3 M) e bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃ 0,3 M)

Os peixes utilizados neste experimento receberam o mesmo tratamento de pré-exposição descrito anteriormente. Após a pré-exposição, os peixes foram anestesiados individualmente com MS 222 (Aquapharm, UK, 1:10.000) para que os grupos controle e experimental pudessem receber, através de injeção abdominal, as soluções de NaCl 0,3 M (INJ NaCl, n=5) ou NH₄HCO₃ 0,3 M (INJ NH₃, n=6), respectivamente. A dose administrada foi de 5 µl da respectiva solução por grama de peso. Em seguida cada peixe era devolvido ao seu respectivo aquário, que tinha a água substituída neste intervalo de ausência do peixe. Da mesma forma que nos experimentos anteriores, essa fase experimental teve duração de 24 h. Porém, o início do tempo experimental foi contado após a constatação de plena recuperação dos peixes da anestesia, que levava em torno de 10 minutos. Todos os aquários das referidas condições também tiveram alíquotas de suas águas coletadas (2 ml), em quatro momentos: 1) ao final do período de pré-exposição, 2) no início do experimento de exposição, 3) após 6 h e 4) ao final da exposição (após 24 h) às condições experimentais. Os valores de pH e concentração de amônia foram determinados nestas amostras (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de pH nas águas coletadas em cada um dos experimentos: de exposição ao ar, a água doce (AD) e a amônia (NH₃), ou injetados (INJ) com NaCl ou amônia (NH₄HCO₃). PRE-EXP = valores pré-exposição; CT = controles. Dados apresentados em média ± erro padrão da média.

Valores de pH medidos nas águas dos experimentos							
	Exposição ao ar		Exposição a AD e NH ₃			Injeção NH ₃	
	CT	AR	CT	AD	NH ₃	CT (NaCl)	INJ NH ₄ HCO ₃
PRE-EXP	8,02±0,01	8,04±0,01	7,89±0,003	7,91±0,003	7,92±0,004	7,84±0,04	7,86±0,02
EXP/Banho	8,03±0,01	7,72±0,05	7,90±0,02	7,78±0,02	7,85±0,03	7,85±0,03	7,85±0,02
Ácido	-	1,00±0,003	-	-	-	-	-

3.3 Obtenção de material biológico

Todos os experimentos supracitados seguiram os mesmos procedimentos de obtenção de amostras biológicas. Para a execução dos procedimentos de retirada de tecidos os peixes foram inicialmente anestesiados (MS 222 Aquapharm, UK, 1:10.000,) até total ausência de reação a estímulos, e pesados (Tabela 10). Em seguida os animais foram mortos por secção medular seguida da retirada dos arcos branquiais, músculo e pele da região ventral. Os tecidos foram acondicionados em tubos *ependorf* e imediatamente congelados em nitrogênio líquido, para posterior transferência para freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram até a realização dos ensaios experimentais. Os arcos branquiais do lado esquerdo, e um fragmento de pele ventral foram utilizados para determinação da concentração de proteínas totais, para a determinação da atividade específica da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NKA), e para a expressão de proteínas através do método de *western blotting*. Procurou-se detectar a expressão das seguintes proteínas: glicoproteínas Rhesus (RhAG e CG2), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (αR1), anidrase carbônica (AC), co-transportador $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-$ (NKCC), trocadores sódio/próton (NHE2 e NHE3), antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e Actina. Adicionalmente os arcos branquiais do lado direito foram fixados em tampão paraformaldeído/fosfato 3% por 24h para análise por imunocitoquímica. O músculo foi utilizado para a determinação do teor hídrico, e em seguida dissolvido, através da adição de ácido nítrico concentrado, para a determinação das concentrações dos íons Na^+ e K^+ .

3.4 Análise das amostras

3.4.1 Dosagens na água

Amônia

A concentração de amônia foi determinada de acordo com o protocolo estabelecido por Verdouw et al. (1978). A leitura das amostras foi realizada a 650nm (PowerWave 340, Bio-

Tek) imediatamente após o período de incubação de 1 h no escuro e em temperatura ambiente.

Uréia

A concentração de uréia foi determinada em amostras sem diluição através de kits comerciais colorimétricos (Spinreact®). A leitura das amostras foi realizada a 550 nm (PowerWave 340, Bio-Tek) após incubação das mesmas em 37° por 15 minutos. O método consiste na reação da uréia com o-oftalaldeído formando um complexo de coloração amarela, cuja intensidade é proporcional à concentração de uréia da amostra.

3.4.2 Dosagens em tecidos

Atividade específica da enzima Na⁺-K⁺-ATPase

O sobrenadante de homogeneizados de brânquias e pele foram utilizados para a determinação da atividade específica da enzima Na⁺-K⁺-ATPase, segundo o protocolo estabelecido por McCormick e Bern (1989) e McCormick (1993).

Teor Hídrico

A porcentagem de água foi determinada em fragmentos musculares (0,22 ± 0,01 g; n= 40). O tecido foi pesado (peso úmido) em pequenos frascos de vidro em balança analítica (Mettler Toledo AB204, precisão 0,0001g). Em seguida as amostras foram colocadas em estufa (Memmert, Concessus S.A, Lisboa, Portugal) para desidratação por um período de 192 h a 60 °C, até total estabilização do peso seco das amostras. A perda de água foi quantificada pela porcentagem do peso inicial da amostra (peso úmido).

Dosagens de íons

Os íons sódio e potássio foram determinados em músculo, que após desidratação e utilização na determinação de teor hídrico, foram dissolvidos em 1 ml de ácido nítrico

concentrado. Após completa dissolução, os íons foram quantificados através de fotômetro de chama (Jenway, UK) e cloridômetro (Corning 925) em amostras diluídas 50 e 100X, respectivamente.

Análises da expressão de proteínas de transporte de amônia e de íons – Western Blotting

A presença das proteínas de transporte de amônia e íons foi investigada através da técnica de *Western Blotting*, nas brânquias e na pele ventral de *L. pholis*, nas diversas condições experimentais. Inicialmente foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, com sulfato de sódio-dodecil (SDS-PAGE). Após a homogeneização dos tecidos em tampão SEI (Sacarose, EDTA, Tampão Imidazol; Ultrasonic Processor VC 130, Sonic e Materials Inc.), as amostras foram centrifugadas (5 min, 13.000 rpm, temperatura ambiente). Em seguida 250 µl dos sobrenadantes dos homogeneizados teciduais foram separados em tubos *ependorf* e receberam a adição de 250 µl do reagente de Lämmli (0,125M Tris-HCl, 20% glicerol, 4% SDS, 0,01% azul de bromofenol). As amostras foram então aquecidas por 15 min a 70 °C em banho maria (Block heater, Stuart Scientific). As amostras foram diluídas em tampão SEI + Lämmli + DTT (Ditiotreitol), de modo a apresentar 1 µg/µl de proteínas. Uma alíquota destas amostras contendo 20 (brânquias) e 40 µg (pele) de proteína total foi submetida ao gel de empilhamento (acrilamida 10%) em tampão Tris + SDS (Sódio dodecil sulfato; pH 8,8), seguido do gel de separação (acrilamida 10%) em Tris + SDS (pH 6,8). Para o procedimento de corrida (1 h em tampão Tris-Glicina + SDS, pH 9,2) utilizou-se voltagem constante de 150V (BioRad MiniProtean III system). Imediatamente após a corrida realizou-se o procedimento de transferência dos peptídeos contidos no gel para a membrana PVDF (Amersham Hybond™-P, GE Healthcare, 1 h em tampão Tris-Glicina+SDS) em voltagem constante de 100 V (Hoefer EPS 2A200). Após a transferência, as membranas foram colocadas em estufa (Memmert, Concessus S.A, Lisboa, Portugal) por 1 h a 37 °C, de modo que ao final deste período as membranas pudessem ser cortadas mantendo apenas a dimensão referente

aos marcadores de peso molecular e as proteínas. Estas membranas foram incubadas em tampão TTBS com leite Molico[®] Nestlé, por 1 h, para o bloqueio dos sítios não específicos. Em seguida, as membranas foram imediatamente incubadas com anticorpos primários diluídos em 1%BSA/TTBS/0,05% azida de sódio: anti-Rhesus proteins (CG2 e AG, 1:500), anti-Na,K-ATPase (α R1, 1:500), anti-NKCC (co-transportador Na^+ , K^+ , 2Cl^-) (T4, 1:500), anti-AC (anidrase carbônica) (1:500 para pele e 1:5000 para brânquias), anti-NHE2R15 e NHE3R18 (trocador sódio/próton) (1:500), anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular; 1:500) e anti-actina (1:500, usada como proteína referência), *overnight* em temperatura ambiente. Após lavagem (5, 10 e 15 min) em tampão TTBS, incubou-se o material com o anticorpo secundário *goat anti-mouse* (para anticorpos primários monoclonais feitos em camundongos) e *goat anti-rabbit* (para anticorpos primários feitos em coelhos) diluídos (1:50000) em tampão TTBS por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se novamente à lavagem das membranas em TTBS. As bandas imuno-reativas foram detectadas por quimioluminescência (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore), com software de análise de imagens (FujiFilm LAS 4000mini; MultiGauge, FujiFilm). A expressão das proteínas foi quantificada e analisada pela intensidade das bandas (SigmaScan Pro 5).

Análise de imunocitoquímica

Para o ensaio de imunocitoquímica seguiu-se o protocolo descrito por Wilson et al. (2007). O arco branquial (lado direito) foi removido e fixado em paraformaldeído 3% em tampão fosfato (PBS) pH 7,4, por 24 h. O material foi, então, incluído em parafina, seccionado (5 μm) e colocado em lâminas de vidro revestidas com solução de persulfato de amônio (APS). As lâminas foram desparafinizadas e pré-tratadas com anidrido citracônico (*citraconic anhydride*) (0,05%) por 30 min. Em seguida as lâminas foram bloqueadas com NGS (*normal goat serum*) + BSA 1% (*bovine serum albumin*) em PBS 5% (*phosphate buffered saline*) por 20 minutos em temperatura ambiente em câmara úmida. Logo depois, as lâminas foram incubadas com

anticorpo primário anti-Rhesus proteins (ZFRhCG1-740, diluição 1:200) e anti-Na⁺,K⁺-ATPase (α 5, diluição 1:100) e, com anti-CFTR (canais de cloreto; 1:200) e anti-Na⁺,K⁺-ATPase (α R1, diluição 1:500) em câmara úmida *overnight* a 4° C. Os anticorpos foram diluídos em tampão 1%BSA/TPBS (0,05% Tween-20/Tampão Fosfato). Após incubação o material foi lavado em tampão TPBS por 5, 10 e 15 min e então incubados com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Alexa Fluor 568) ou de coelho (Alexa Fluor 488, Invitrogen Molecular Probes, Barcelona, Espanha) diluídos (1:500) em 1%BSA/TPBS, por 1 h a 37 °C em câmara úmida. Em seguida as lâminas foram lavadas com TPBS, por 5 min, incubadas por 10 min em DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole, diluídos em TPBS) para a coloração do núcleo, e novamente lavadas em tampão TPBS por 15 min. As lâminas foram observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Leica DM6000B, Alemanha).

Quantificação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais dos homogeneizados teciduais foi determinada segundo o protocolo descrito por Bradford (1976), através de determinações realizadas em triplicatas, em microplacas lidas a 600 nm (Powerwave 340, Bio-Tek).

3.5 Análises Estatísticas

Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média. O teste-t de *Student* foi utilizado para comparação entre dois grupos: taxa de excreção de amônia, teor hídrico muscular e a concentração muscular dos íons sódio e potássio, valores após o tratamento experimental *versus* seus respectivos controles (pré-exposição, não pareado). Foi também utilizado teste-t para comparar brânquias e pele, quanto à expressão de proteínas de transporte e íons (western blotting). Análise de variância de duas vias foi utilizada para avaliar o peso dos peixes nas diversas condições experimentais (medidas repetidas: *Two-way RM*

Anova) e para avaliar o efeito dos tratamentos sobre a atividade específica da enzima Na⁺-K⁺-ATPase (NKA). Para todas as análises o nível de significância foi de 95%.

4. Resultados

4.1 Experimento de exposição ao ar

Taxa de excreção de amônia

Não houve alteração na taxa de excreção de amônia nos peixes *Lipophrys pholis*, em ambos os grupos controle (CT AM) e expostos ao ar (EXP AR), após período experimental de 24 h (Figura 24 A).

Determinação da atividade específica da enzima Na⁺-K⁺-ATPase

Houve aumento da atividade da enzima Na⁺-K⁺-ATPase nas brânquias de *L. pholis* expostos ao ar (EXP AR; 6,2 ± 0,2 μmol/mg/h) em relação aos peixes controle (CT AM; 5,0 ± 0,1 μmol/mg/h), porém não houve nenhuma alteração na resposta enzimática da pele de ambos os grupos testados. Adicionalmente, houve maior atividade enzimática no tecido branquial de ambos os grupos CT AM (5,0 ± 0,1 μmol/mg/h) e EXP AR (6,2 ± 0,2 μmol/mg/h) quando comparada à pele em ambas as condições (1,3 ± 0,2 e 1,2 ± 0,2 μmol/mg/h, respectivamente) (Figura 25 A).

Determinação da diferença entre o peso dos peixes

Não houve diferença no peso dos peixes *L. pholis* submetidos às condições controle e expostos ao ar. Porém, houve redução no peso dos peixes expostos ao ar de 9,54±1,5g para 8,40±1,5g após período experimental de 24h (Tabela 10).

Determinação do Teor hídrico muscular

A porcentagem de água no músculo de *L. pholis* manteve-se em ~80%, não diferindo entre as condições controle e expostos ao ar (Tabela 10).

Determinação iônica (sódio e potássio) em músculo

As concentrações dos íons sódio ($15,3 \pm 1,9$ e $16,7 \pm 2,0$ $\mu\text{m/g}$) e potássio ($51,7 \pm 6,3$ e $58 \pm 5,8$ $\mu\text{m/g}$) no músculo de *L. pholis* não diferiram entre os grupos controle e expostos ao ar, respectivamente (Tabela 10).

Expressão de proteínas de transporte de amônia e íons

Não houve diferença na expressão de proteínas de transporte de amônia e íons, nas brânquias e pele de *L. pholis*, entre os peixes controle e os expostos ao ar (Figura 26).

4.2 Experimento de exposição à água doce e aumento de concentração de amônia na água (1mM NH₄Cl)

Taxa de excreção de amônia

Houve redução da taxa de excreção de amônia tanto nos peixes controle (CT AM, 33‰) quanto nos peixes expostos à água doce (EXP AD, 0‰). A redução da taxa de excreção de amônia foi de 44% nos peixes *L. pholis* controles após 24h (CT AM, 517 ± 33 $\mu\text{mol/kg/h}$) em relação aos peixes controle pré-expostos ao experimento (PRE EXP; 926 ± 93 $\mu\text{mol/kg/h}$). A redução da taxa de excreção de amônia nos peixes expostos por 24h em água doce (EXP AD, 85 ± 15 $\mu\text{mol/kg/h}$) foi de 83% em relação aos peixes pré-expostos a água doce (PRE EXP; 499 ± 20 $\mu\text{mol/kg/h}$). Os peixes expostos ao aumento da concentração de amônia na água (1mM NH₄Cl, EXP NH₃) não apresentaram alteração da taxa de excreção de amônia (Figura 24 B).

Determinação da atividade específica da enzima Na⁺-K⁺-ATPase

Não houve alteração na atividade da enzima Na⁺-K⁺-ATPase nas brânquias de *L. pholis* submetidos a água doce (EXP AD, $3,4 \pm 0,8$ $\mu\text{mol/mg/h}$) e 1mM de NH₄Cl (INJ NH₃, $3,8 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/mg/h}$) em relação ao grupo controle (CT AM, $3,7 \pm 0,5$ $\mu\text{mol/mg/h}$). Porém, houve redução da atividade da enzima Na⁺-K⁺-ATPase na pele dos peixes EXP AD ($0,3 \pm 0,03$

$\mu\text{mol/mg/h}$) quando comparado aos CT AM ($0,6 \pm 0,09 \mu\text{mol/mg/h}$). Adicionalmente, houve maior atividade enzimática no tecido branquial dos peixes na condição CT AM ($3,7 \pm 0,5 \mu\text{mol/mg/h}$), EXP AD ($3,4 \pm 0,8 \mu\text{mol/mg/h}$) e EXP NH_3 ($3,8 \pm 0,5 \mu\text{mol/mg/h}$) quando comparada à pele, em ambas as condições ($0,6 \pm 0,09$; $0,3 \pm 0,03$ e $0,4 \pm 0,14 \mu\text{mol/mg/h}$, respectivamente) (Figura 25 B).

Determinação da diferença entre o peso dos peixes

Houve diferença no peso dos peixes *L. pholis* expostos a de 1 mM de NH_4Cl (EXP NH_3 ; $4,21 \pm 0,5 - 4,22 \pm 0,5$ g) em relação aos peixes da condição controle (CT AM; $3,04 \pm 0,4 - 3,00 \pm 0,4$ g). Adicionalmente, os peixes expostos a água doce (EXP AD) tiveram aumento de peso, passando de $3,30 \pm 0,07$ para $3,73 \pm 0,1$ g após 24 h de experimento (Tabela 10).

Determinação do Teor hídrico muscular

A porcentagem de água do músculo de *L. pholis* submetidos a água doce ($84,7 \pm 0,5\%$) foi maior que a porcentagem de água no músculo dos peixes controle ($81,6 \pm 0,4\%$). Não houve alteração no teor hídrico muscular entre os peixes controles e os expostos a 1mM NH_4Cl na água (Tabela 10).

Determinação Iônica (sódio e potássio) em músculo

A concentração do íon sódio no músculo de *L. pholis* submetidos a água doce (EXP AD; $9,5 \pm 0,3 \mu\text{m/g}$) foi menor que a concentração deste íon nos peixes controle (CT AM; $16,4 \pm 2,2 \mu\text{m/g}$), enquanto que os peixes submetidos a 1mM NH_4Cl na água (EXP NH_3 ; $15,8 \pm 1,6 \mu\text{m/g}$) não diferiram dos controles. A concentração do íon potássio variou entre 38,1- 41,5 $\mu\text{m/g}$, mas não diferiu entre os grupos analisados (Tabela 10).

Expressão de proteínas de transporte de amônia e íons

Não houve diferença na expressão de proteínas de transporte de íons e amônia, nas brânquias e pele de *L. pholis*, entre os peixes controle e os expostos a água doce e a 1 mM

NH₄Cl. Porém, na pele de *L. pholis*, não houve a expressão da proteína de transporte de íons Na⁺-K⁺-2Cl⁻ (NKCC) em ambos os grupos controle e expostos a água doce e a 1 mM NH₄Cl (Figura 27).

4.3 Experimento de injeção de cloreto de sódio (NaCl 0,3M) e bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃ 0,3M)

Taxa de excreção de amônia

Não houve alteração na taxa de excreção de amônia nos peixes *Lipophrys pholis*, em ambos os peixes injetados com NaCl (INJ NaCl, controle) e injetados com NH₄HCO₃ (INJ NH₃) após período experimental de 24h (Figura 24 C).

Determinação da atividade específica da enzima Na⁺-K⁺-ATPase

Não houve alteração na atividade da enzima Na⁺-K⁺-ATPase nas brânquias *L. pholis* controles injetados com 0,3M de NaCl (INJ NaCl, 3,2±0,6 μmol/mg/h) e os peixes experimentais injetados com 0,3 M de NH₄HCO₃ (INJ NH₃, 3,4±0,2 μmol/mg/h). Porém, houve aumento da atividade enzimática na pele dos peixes INJ NH₃ (1,5 ± 0,1 μmol/mg/h) em relação aos INJ NaCl (0,7 ± 0,3 μmol/mg/h). Adicionalmente, ambos os grupos tiveram a atividade enzimática branquial maior que a atividade enzimática na pele (Figura 25 C).

Determinação da diferença entre o peso dos peixes

Não houve alteração no peso de *L. pholis* injetados com 0,3M de NaCl, nem nos peixes injetados com 0,3 M de NH₄HCO₃ (Tabela 10).

Determinação do Teor hídrico muscular

A porcentagem de água no músculo de *L. pholis* manteve-se em ~80% não diferindo entre a condição controle (NaCl 0,3M) e experimental (NH₄HCO₃ 0,3M) (Tabela 10).

Determinação iônica (sódio e potássio) em músculo

A concentração dos íons sódio e potássio não diferiram entre os grupos analisados (Tabela 10).

Expressão de proteínas de transporte de amônia e íons

Não houve diferença na expressão de proteínas de transporte de íons e amônia na brânquia de *L. pholis* expostos a este experimento. Porém, houve aumento da expressão da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (NKA) e da anidrase carbônica (CA) na pele de *L. pholis* injetados com NH_4HCO_3 (0,3 M) em relação aos peixes controles (injetados com NaCl 0,3 M) (Figura 28).

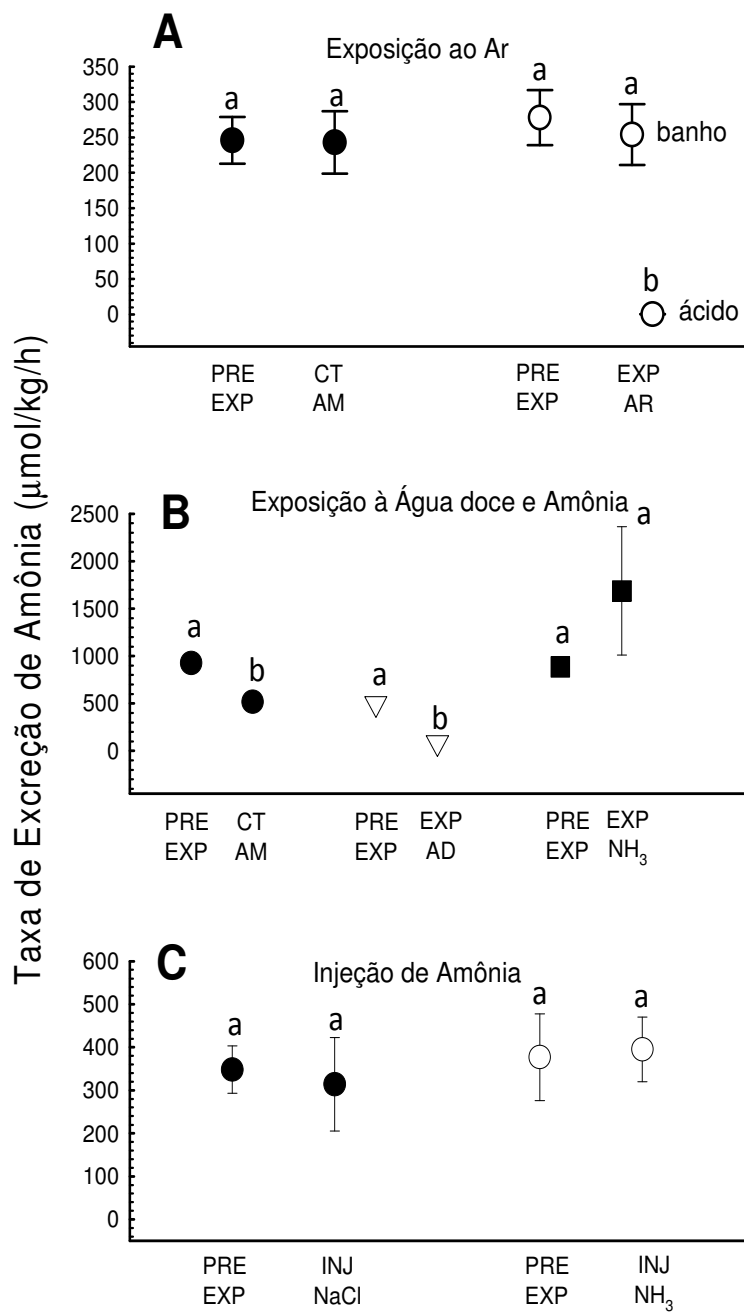


Figura 24. Taxa de excreção de amônia dos peixes *Lipophrys pholis* durante a pré-exposição (PRE EXP; 24h antes do experimento) e exposição a cada experimento: A - Experimento de exposição às condições controle (CT AM, círculo preto) e ao ar (EXP AR círculos transparentes); B - Experimento de exposição às condições controle (CT AM, círculo preto); água doce (EXP AD; triângulos invertidos) e a 1mM de NH₄Cl na água (EXP NH₃, quadrados pretos); C – Experimento de injeção em animais controle (INJ NaCl, círculos pretos) e injetados com amônia (INJ NH₃; círculos transparentes). Letras diferentes indicam diferença significativa entre a pré-exposição e exposição de cada um dos grupos controle e experimental. Dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

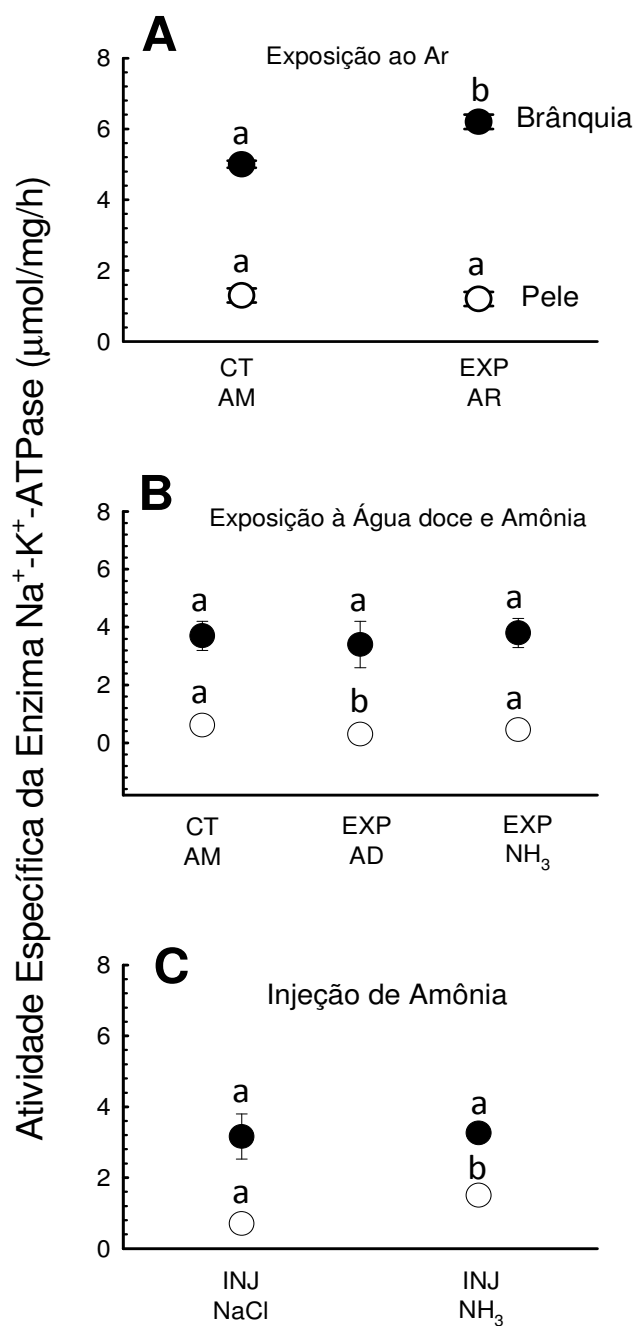


Figura 25. Atividade específica da enzima $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ em brânquias (círculos pretos) e pele abdominal (círculos transparentes) dos peixes *Lipophrys pholis* submetidos às condições: A - Experimento de exposição às condições controle (CT AM) e ao ar (EXP AR); B - Experimento de exposição às condições controle (CT AM); água doce (EXP AD) e a 1mM de NH_4Cl na água (EXP NH_3); C - Experimento de injeção em animais controle (INJ NaCl) e injetados com amônia (INJ NH_3). Letras diferentes indicam diferença significativa entre a pré-exposição e exposição de cada um dos grupos controle e experimental. Dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

Tabela 10. Peso (g), Teor hídrico muscular (%), Concentração muscular dos íons sódio e potássio ($\mu\text{m/g}$) de peixes *Lipophrys pholis* diante das condições experimentais.

Experimentos Realizados								
		Exposição ao ar		Exposição a AD e NH_3			Injeção NH_3	
		CT	AR	CT	AD	NH_3	CT (NaCl)	INJ (NH_4HCO_3)
Peso (g)	Antes	9,11 \pm 0,8a	9,54 \pm 1,5a	3,04 \pm 0,4a	3,30 \pm 0,07a	4,21 \pm 0,5b	21,46 \pm 5,5a	28,47 \pm 6,5a
	Depois	9,09 \pm 0,8a	8,40 \pm 1,5a*	3,00 \pm 0,4a	3,73 \pm 0,1a*	4,22 \pm 0,5b	21,40 \pm 5,4a	28,44 \pm 6,5a
Teor Hídrico (%)		80,4 \pm 0,4a	79,5 \pm 0,2a	81,6 \pm 0,4a	84,7 \pm 0,5b	82,1 \pm 0,4a	80,5 \pm 0,9a	79,8 \pm 0,6a
Sódio ($\mu\text{m/g}$)		15,3 \pm 1,9a	16,7 \pm 2,0a	16,4 \pm 2,2b	9,5 \pm 0,3a	15,8 \pm 1,6b	27,2 \pm 3,0a	31,4 \pm 2,5a
Potássio ($\mu\text{m/g}$)		51,7 \pm 6,3a	58 \pm 5,8a	40,7 \pm 5,8a	38,1 \pm 1,4a	41,5 \pm 6,9a	85,1 \pm 9,9a	103,2 \pm 10,9a

Asteriscos correspondem a alteração no peso dos peixes de uma mesma condição experimental após 24h

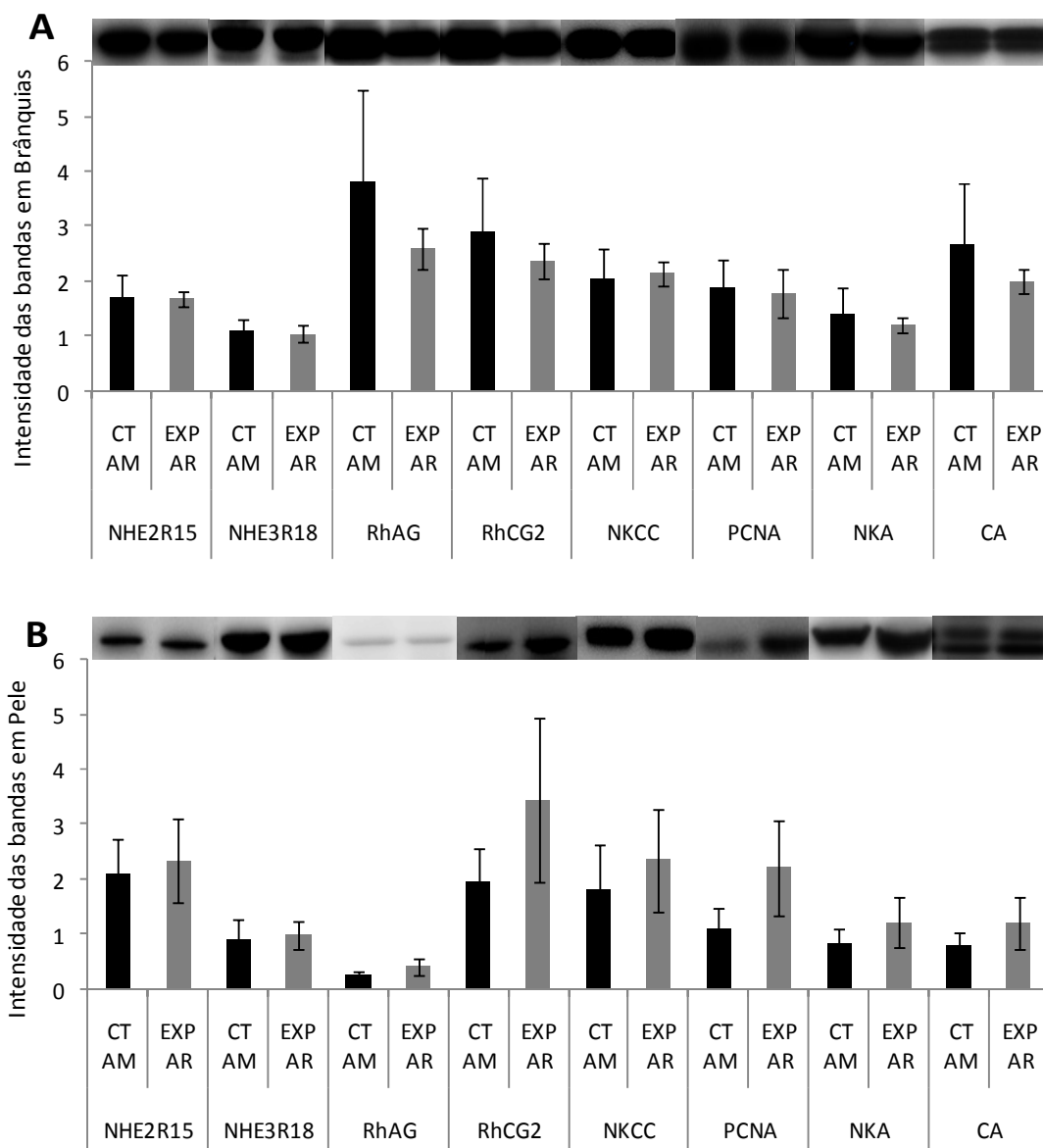


Figura 26. Representação gráfica da intensidade das bandas (unidade arbitrária) e imagem representativa das bandas de proteínas de transporte em brânquia (A) e pele (B) dos peixes *Lipophrys pholis* expostos a condição controle (CT AM, colunas pretas) e ao ar (EXP AR, colunas cinzas). Colunas representam a intensidade das bandas do transportador Na^+/H^+ (NHE2R15 e NHE3R18), das proteínas Rhesus (RhAG, RhCG2), do transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC), do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e anidrase carbônica (CA) obtidas através da técnica de *Western blotting*, após submissão ao período experimental de 24h. As bandas sobrepostas ao gráfico são apenas imagens representativas de cada um dos marcadores utilizados. Actina foi usada como proteína de referência. Dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

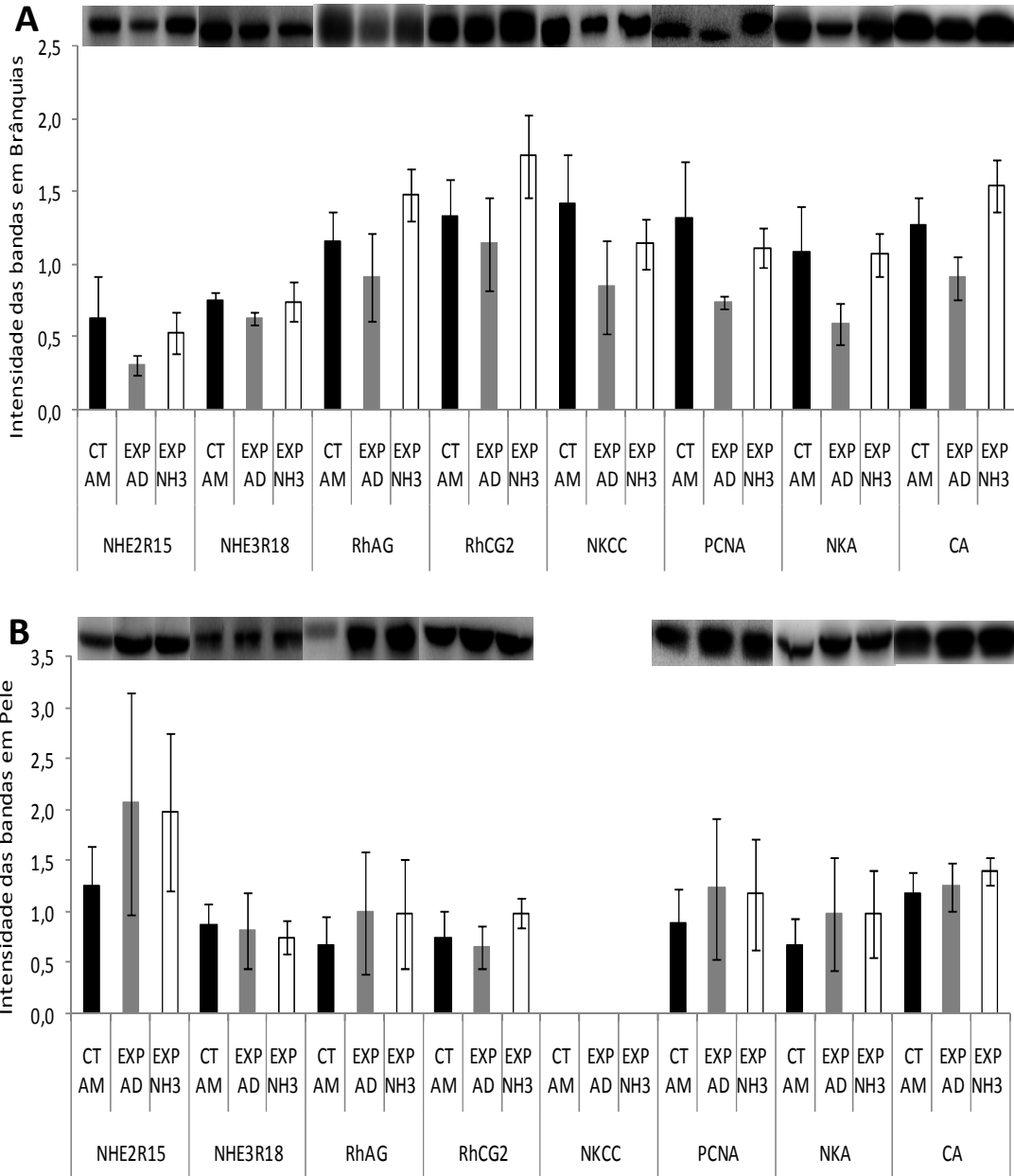


Figura 27. Representação gráfica da intensidade das bandas (unidade arbitrária) e imagem representativa das bandas de proteínas de transporte em brânquia (A) e pele (B) dos peixes *Lipophrys pholis* expostos a condição controle (CT AM, colunas pretas), à água doce (EXP AD, colunas cinzas) e ao aumento das concentrações de amônia na água através da adição de 1mM de NH_4Cl (EXP NH_3 , colunas brancas). Colunas representam a intensidade das bandas do transportador Na^+/H^+ (NHE2R15 e NHE3R18), das proteínas Rhesus (RhAG, RhCG2), do transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ (NKCC), do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), das enzimas $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ (NKA) e anidrase carbônica (CA) obtidas através da técnica de *Western blotting*, após submissão ao período experimental de 24h. As bandas sobrepostas ao gráfico são apenas imagens representativas de cada um dos marcadores utilizados. Actina foi usada como proteína de referência. Dados são apresentados em média \pm erro padrão da média.

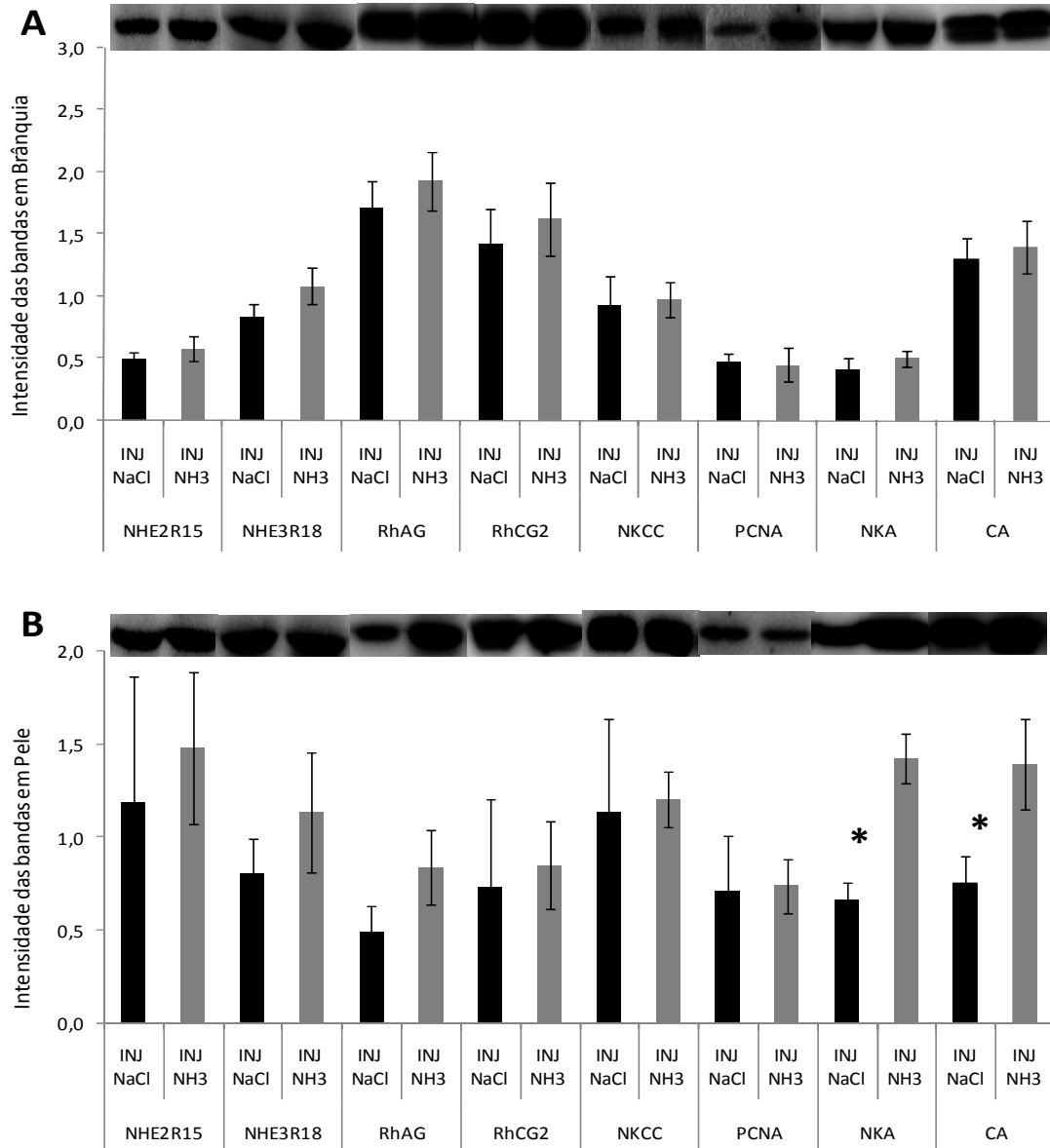


Figura 28. Representação gráfica da intensidade das bandas (unidade arbitrária) e imagem representativa das bandas de proteínas de transporte em brânquia (A) e pele (B) dos peixes *Lipophrys pholis* controles, injetados com cloreto de sódio (INJ NaCl, colunas pretas), e experimentais injetados com bicarbonato de amônia (INJ NH₃, colunas cinzas). Colunas representam a intensidade das bandas do transportador Na⁺/H⁺ (NHE2R15 e NHE3R18), das proteínas Rhesus (RhAG, RhCG2), do transportador Na⁺/K⁺/2Cl⁻ (NKCC), do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), das enzimas Na⁺-K⁺-ATPase (NKA) e anidrase carbônica (CA) obtidas através da técnica de *Western blotting*, após submissão ao período experimental de 24h. As bandas sobrepostas ao gráfico são apenas imagens representativas de cada um dos marcadores utilizados. Actina foi usada como proteína de referência. Dados são apresentados em média ± erro padrão da média.

4.4 Imunocitoquímica

Em todos os grupos analisados houve a detecção por dupla imuno-marcação dos transportadores [CFTR + NKA (α R1)] e [RhCG1 + NKA (α 5)]. Os canais de cloreto (CFTR) e as proteínas Rhesus (RhCG1) foram localizados na região apical, enquanto a localização da Na^+ - K^+ -ATPase (NKA; α R1 e α 5) foi confirmada para a região mais basal das células de cloreto (ou células ricas em mitocôndrias), células estas localizadas na região inter-lamelar das brânquias (Figura 29 A-H). Adicionalmente, as duplas marcações foram detectadas na pele abdominal (epiderme) dos exemplares de *L. pholis* (Figura 29 I-P).

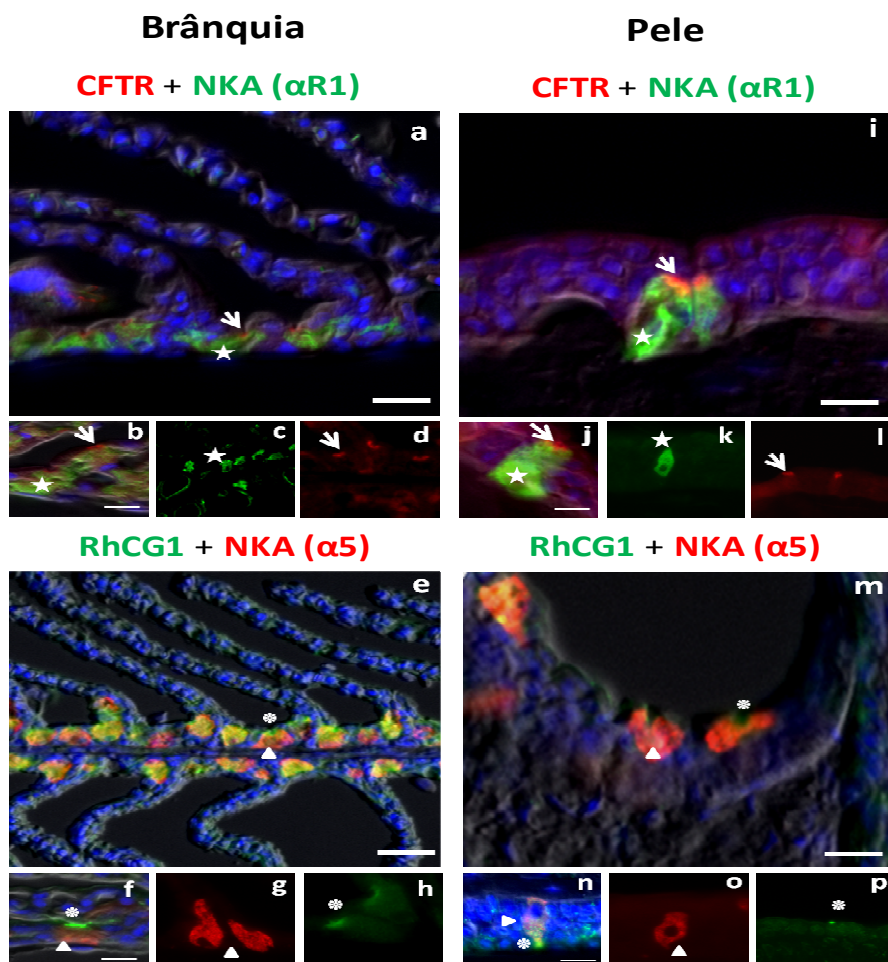


Figura 29. Imagem representativa da dupla localização imunofluorescente dos canais de cloreto (CFTR; setas) & Na^+ - K^+ -ATPase (NKA – α R1; estrela) em brânquias (a, b, c e d) e em pele (i, j, k e l) e das proteínas Rhesus (RhCG1, asteriscos) & Na^+ - K^+ -ATPase (NKA – α 5; triângulo) em brânquia (e, f, g e h) e em pele (m, n, o e p) dos peixes *Lipophrys pholis*. Núcleos são indicados em azul (DAPI). Barra de escala = 50 μm para brânquia e 25 μm para pele e imagens magnificadas.

5. Discussão

Lipophrys (= Blennius) pholis é um peixe anfíbio, residente em costões rochosos de regiões intertidais onde ocupa fendas e poças de marés, ficando exposto diariamente às flutuações ambientais resultantes dos ciclos de maré (Davenport e Vahl, 1979; Laming et al., 1982; Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987a,b). Durante estes eventos (que têm duração média de 4 horas) os mesmos estão sujeitos a exposição ao ar, a alterações de salinidade através da diluição da água contida nas poças e fendas (em decorrência de chuvas), ao aumento das concentrações de amônia na água e conseqüentemente aumento nas concentrações de amônia interna. *L. pholis* apresenta adaptações anatômicas, fisiológicas e comportamentais que lhe permite sobreviver a estas condições (Laming, et al., 1982; Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987 a,b; Graham, 1997, Sayer, 2005). Porém, não se sabe como este peixe lida com a excreção de produtos nitrogenados diante destas situações tão freqüentes de desafio fisiológico.

Ao testarmos a capacidade fisiológica de *L. pholis* diante de cada uma dessas situações desafiadoras, por um período bastante superior ao dos ciclos de maré (24 h), verificamos grande capacidade de manutenção nos fluxos de excreção de amônia, de regulação de volume celular, e de manutenção das concentrações iônicas nos tecidos. Esta manutenção notável da homeostasia neste teleósteo ocorreu sem ativação da expressão de proteínas de transporte de íons ou de amônia.

A taxa de excreção de amônia em *L. pholis* foi mantida durante os experimentos de exposição ao ar. A manutenção na taxa de excreção de amônia em *L. pholis* não é nenhuma surpresa. Estudos anteriores já apontavam grande capacidade de regulação nos fluxos de amônia nesta espécie. *L. pholis* mantém este resíduo nitrogenado como o principal produto de excreção quando exposto ao ar (Davenport e Sayer, 1986; Davenport e Sayer, 1987b; Graham, 1997). Para teleósteos de respiração aérea, apesar de a amônia ser o principal resíduo

nitrogenado, é comum a substituição da excreção desse composto por outros resíduos metabólicos, especialmente diante de situações de estresse como a emersão (Saha e Ratha, 1998). Diferentemente do que ocorre com *L. pholis*, espécies de respiração aérea como *Anabas scandens* e *Channa gachua* convertem amônia em uréia após emersão de 5 e 10h (Ramaswamy e Gopalakrishna Reddy, 1983), e *Heteropneustes fossilis* após 24 h (Saha e Ratha, 1998), ou como em outra espécie de peixe anfíbio, *Periophthalmus cantonensis*, que realiza estocagem de resíduos nitrogenados na forma de uréia quando emersos para excretá-los após retorno a água (Gordon et al., 1978), ou ainda como outros peixes (e.g. *Bostrichthys sinensis* e *Oxyeleotris marmoratus*) pode ocorrer a conversão da amônia em glutamina (revisado em Randall e Tsui, 2002). Verificou-se que quando emersos os exemplares de *L. pholis* permanecem imóveis e com a boca aberta. Outros estudos verificaram este comportamento (Laming et al., 1982; Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987a), bem como identificaram a redução da ventilação branquial, movimentos operculares e dos batimentos cardíacos nesta espécie (Laming et al., 1982; Sayer e Davenport, 1987a). Conforme o tempo de emersão aumenta, ocorre aumento nas taxas de ventilação branquial e batimentos cardíacos (Laming et al., 1982) e também da secreção de muco pelas brânquias e pela pele, de modo a reduzir a dessecação e elevar sua capacidade de troca com o ambiente (Laming et al., 1982; Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987b).

L. pholis não estoca resíduos nitrogenados (Davenport e Sayer, 1986), a estocagem destes compostos tornaria o organismo ainda mais susceptível as condições ambientais adversas (revisado em Randall e Tsui, 2002; Evans et al., 2005) como por exemplo, o estresse decorrente da exposição aérea. Nesta espécie a pele de toda a superfície do corpo foi apontada como a segunda via de excreção de produtos nitrogenados (Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987a), devido à maior superfície de troca e vascularização deste tecido em situações de emersão (Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987a) e

prejuízo das funções branquiais nestas situações (revisado em Sayer, 2005; Randall e Ip, 2006). Em *L. pholis* apenas 50% da excreção de resíduos metabólicos é realizada pela brânquia, a outra metade é responsabilidade da pele (47%) juntamente com os rins e intestino (3%) (Sayer e Davenport, 1987a). A retenção de amônia na água do banho (= resíduo do muco da pele dos peixes) juntamente com os baixos índices de amônia detectados na solução ácida (0,1%), a qual corresponderia à amônia excretada pela brânquia, corroboram esta afirmação: *L. pholis* continua excretando amônia quando emerso, pela pele.

A amônia é presente no organismo na forma de NH_4^+ , apenas uma pequena porção assume a forma de NH_3 (revisado em Evans et al., 2005; Randall e Ip, 2006). Em situações de emersão, *L. pholis* excreta a amônia na forma ionizada (NH_4^+) principalmente por difusão através da pele (Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987a). Esse mecanismo estaria sendo facilitado pela composição neutra/levemente ácida da secreção mucosa que reveste brânquias e pele nestas situações (Davenport e Sayer, 1986; Sayer e Davenport, 1987a). Quando o pH é neutro ou ácido predomina a forma ionizada, aumentando a proporção de excreção de NH_4^+ pelos peixes (revisado em Randall e Ip, 2006). Nestas condições de emersão, o aumento da atividade da $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ nos permite sugerir participação branquial na excreção de amônia, o que pode se relacionar com o hábito de ficar com a boca aberta (volatilização). Salvo algumas exceções, alguns caracóis, caranguejos e isópodes terrestres têm a capacidade de excretar amônia por volatilização (revisado em Wright, 1995; Saha e Ratha, 1998). No caso de *L. pholis*, a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ auxiliaria neste processo captando íons NH_4^+ no lugar dos íons K^+ [$\text{Na}^+\text{-K}^+$ (NH_4^+)-ATPase], devido à similaridade na densidade e no raio de hidratação destes cátions. A atividade aumentada da [$\text{Na}^+\text{-K}^+$ (NH_4^+)-ATPase] reduziria a concentração intracelular de sódio, aumentando seu gradiente eletroquímico para seu influxo por exemplo, pelos trocadores Na^+/H^+ (NHE) na membrana apical. Estes trocadores irão por sua vez secretar NH_4^+ no lugar de H^+ (revisado em Randall e Wright, 1987; Wilkie, 1997; 2002;

Evans et al., 2005; Randall e Ip, 2006). Estudos com outra espécie de respiração aérea, o *mudskipper* gigante *Periophthalmodon schlosseri*, demonstram que quando expostos ao ar os mesmos não têm as brânquias totalmente envolvidas nos processos de trocas gasosas e excreção de amônia (revisado em Wilkie, 2002). A participação das brânquias na excreção de amônia nestes peixes também se dá ativamente, por intermédio da ativação dos trocadores Na^+/H^+ e da bomba NKA, os quais foram localizados em altos níveis de expressão nas membranas apical e basolateral das células de cloreto, respectivamente (Wilson et al., 2000), e que quando inibidos por amilorida e oubainá prejudicam a taxa de excreção de amônia nesta espécie (Randall et al., 1999). Em *L. pholis* tal hipótese é corroborada pela ausência de redução nas taxas de excreção de amônia bem como pela ativação da enzima NKA nas brânquias neste experimento de exposição ao ar. Apesar disso, não houve aumento na expressão dos trocadores NHE, provavelmente devido à maior porção de NH_4^+ estar sendo excretado pela pele, ou possivelmente pelo curto tempo de exposição ao ar.

L. pholis apresentou 10% de perda de peso corporal, após 24 h de emersão. Essa perda de água pode ser explicada pela produção de muco, necessária para a manutenção da excreção de amônia, mas principalmente pela desidratação causada pela exposição ao ar (Sayer, 2005). Perda de peso de mesma magnitude (~9%) já havia sido observada em *L. pholis* após 24 h de emersão (Davenport e Sayer, 1986). Esta perda de peso é bem inferior à porcentagem considerada letal para a espécie (20-23%; Davenport e Sayer, 1986). Adicionalmente, os peixes não apresentaram redução nos níveis de água e íons no músculo, ou seja, mantiveram a hidratação tecidual. Capacidade na manutenção da hidratação tecidual também foi verificada em outra espécie de peixe anfíbio (*H. fossilis*) após emersão de 24 h (Saha e Ratha, 1998). Diferentemente da resistência apresentada por *L. pholis*, outra espécie de peixe anfíbio, *Periophthalmus cantonensis*, mesmo quando imóveis e na sombra, perdem cerca de 6% de água corpórea por hora (Gordon et al., 1978). É essa capacidade de resistir a

dessecação que permite a *L. pholis* tolerar até 5 dias de emersão em ambiente de alta umidade (Davenport e Vahl, 1979; Davenport e Sayer, 1986; Martin 1995; Graham, 1997). A capacidade de *P. cantonensis* limita-se a 2,5 dias (Gordon et al., 1978). Adicionalmente, não houve nenhuma alteração na expressão de proteínas de transporte de íons e amônia, demonstrando que de fato estes peixes são bastante resistentes e que apesar de ter havido aumento na atividade da NKA nas brânquias durante a exposição ao ar, não houve necessidade de aumento na expressão desta ou de outras enzimas, corroborando que esta exposição, mesmo em período superior ao de ciclos de maré não é tão prejudicial à fisiologia de *L. pholis*.

A exposição à água doce por 24 h reduziu significativamente a taxa de excreção de amônia em *L. pholis* (83% de redução). Pequena redução na produção e excreção de amônia, aliada ao aumento na produção e excreção de uréia, havia sido relatada para *L. pholis* expostos a água doce por 6 ou 24h (Sayer e Davenport, 1987b). Não foi possível detectar uréia (método colorimétrico Spinreact Urea 37, Urea o-Phthalaldehyde 37°C) na água experimental de *L. pholis* expostos à água doce. Porém, é estranho admitir a substituição da excreção de amônia por uréia, já que a excreção de uréia está relacionada à restrição hídrica (revisado em Wright, 1995), o que não é o caso em água doce. A redução na taxa de excreção de amônia por *L. pholis* em água doce se explica pela utilização do mecanismo de troca Na^+/H^+ (NH_4^+) para excretar amônia, pelas brânquias (Randall e Wright, 1987; Wilkie, 1997; Evans et al., 2005). Peixes marinhos, apesar de na maioria das vezes excretarem amônia por difusão (NH_3 e/ou NH_4^+), possuem e utilizam o trocador Na^+/H^+ (NH_4^+) para efluxo de amônia. Na ausência ou drástica redução na disponibilidade de sódio na água, esta troca fica bastante reduzida. Quando exposto à água doce a espécie de peixe *Opsanus beta* também teve a taxa de excreção de amônia reduzida, confirmando o papel (ao menos parcial) da troca com o sódio para a eliminação da amônia pelas brânquias (Randall e Wright, 1987; Wilkie, 1997; 2002).

Adicionalmente, a utilização da amilorida, inibidor do trocador sódio/próton, também levou a redução na absorção de Na^+ e na excreção de amônia nas brânquias (Wilkie 1997; Evans et al., 2005). Novamente evidenciando a participação da pele na excreção de produtos nitrogenados nesta espécie, e reforçando a ligação entre a excreção de amônia e a $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, a exposição a água doce gerou redução na excreção de amônia e na atividade desta enzima em *L. pholis*. Cabe aqui chamar a atenção para a grande variabilidade observada nas taxas de excreção de amônia, com variação de 85 a 1687 $\mu\text{mol/kg/h}$ nas taxas medidas. Este resultado seria esperado, pois a taxa de excreção de amônia é altamente variável por depender da condição de nutrição do animal e do seu ambiente (revisado em Randall e Wright, 1987). Dados de grande variabilidade na taxa de excreção de amônia e de um padrão irregular (descontínuo) como o encontrado aqui já haviam sido relatados na literatura (Davenport e Sayer, 1986), inclusive em animais em condições controle (salinidade 33). Nos animais controles foi observada variação de 0,892-3,688 $\mu\text{g N/g}$ de peixe/h. Quando expostos a água doce seus valores oscilaram entre 0,502 e 2,820 $\mu\text{g N/g}$ de peixe/h (Sayer e Davenport, 1987b). As altas taxas de excreção de amônia encontradas aqui para *L. pholis* podem estar relacionadas ao fato dos animais terem recebido alimentação até 48 h antes do experimento. De forma compatível, Davenport e Sayer (1986) reportaram baixos níveis de excreção de amônia porque os peixes utilizados ficaram em jejum por 6 dias antes de entrarem no período de experimentação. Tem-se então que admitir que a redução nas taxas de excreção de amônia observada aqui nos *L. pholis* em água doce ocorreu também com peixes controles em água do mar, podendo refletir a variabilidade normal neste parâmetro. Sendo assim, a redução em água doce de fato não foi distintamente superior à redução observada por variabilidade intra-grupo nos controles: redução de ~80% em ambas as condições. Em conclusão, novos estudos teriam que esclarecer se de fato há redução na excreção de amônia em *L. pholis* exposto a água doce.

Adicionalmente, a exposição à água doce por 24 h perturbou a homeostasia de *L. pholis*. Sendo uma espécie de peixe de entre-marés, dotada da capacidade de manter a homeostasia frente às situações de diluição comuns em seu ambiente natural (House, 1963; Davenport e Vahl, 1979), esta espécie dificilmente será exposta a água doce por mais do que 6 h (Sayer e Davenport, 1987b). De fato, foi demonstrado há décadas que estes peixes têm capacidade de deixar de excretar sal em meio hiperosmótico, passando a absorver sal em meio hiposmótico, com menos do que 5 minutos de exposição à água doce (House, 1963). Contudo, o tempo de exposição de 24 h foi excessivo, e *L. pholis* teve sua homeostasia alterada nesse período de exposição a água doce, apresentando ganho de peso (13% > 10%, perda no ar) associado à retenção de água e perda de íons Na⁺ do tecido muscular. E de novo, como na exposição ao ar, sem a indução da expressão de proteínas envolvidas com a homeostasia da amônia e dos íons, nas brânquias ou na pele. Contudo, é necessário contrastar, o desafio da exposição ao ar aqui apresentado a estes animais foi inferior (em duração) a situações que ele pode enfrentar na natureza, mas o desafio de exposição à água doce aqui apresentado foi por sua vez, superior. Em ambas as situações não houve indução de expressão de proteínas, mas na primeira situação houve manutenção de homeostasia, e na segunda situação houve perturbação da homeostasia.

Além da exposição ao ar ou à forte diluição da água do mar ou mesmo água doce da chuva, estes peixes podem ter que enfrentar aumento da concentração da amônia ambiental, em poças de maré. Nestas situações os peixes se deparam potencialmente tanto com a retenção de amônia endógena quanto com a absorção de amônia exógena, dependendo dos níveis de amônia na água e com seu metabolismo (revisado em Wilkie, 1997; Randall e Tsui, 2002; Wilkie, 2002; Sayer, 2005; Randall e Ip, 2006). A maioria dos peixes é vulnerável ao aumento de amônia ambiental (revisado em Wilkie, 1997; 2002), mas algumas espécies são tolerantes a amônia e apresentam estratégias para reduzir o acúmulo e toxicidade da amônia

(revisado em Randall e Tsui, 2002). Neste segundo caso observou-se, por exemplo, que alguns peixes podem reduzir a taxa de produção de amônia a partir do catabolismo de aminoácidos para desacelerar o acúmulo de amônia internamente (revisado em Randall e Ip, 2006). Alguns teleósteos de respiração aérea como o *Heteropneustes fossilis* optam pela conversão de amônia em uréia nestas situações (Saha e Ratha, 1998). *L. pholis*, em especial, parece ser tolerante ao aumento das concentrações externas de amônia, pois não apresentou nenhuma alteração fisiológica, tampouco redução nas taxas de excreção de amônia, quando expostos a 1 mM de NH_4Cl por 24 h. De forma ainda mais extraordinária, *P. schlosseri* também mantém a taxa de excreção de amônia mesmo quando submetidos a concentração 30 x maior de amônia: 30 mM de NH_4Cl por 24 h (Randall et al., 1999) ou ainda quando submetidos a 30 mmol/L de NH_4Cl por 6 dias (Ip et al., 2004). Alguns teleósteos, como no caso de *P. schlosseri*, quando expostos ao aumento de amônia externa são capazes de secretar amônia ativamente, contra o gradiente químico de entrada da amônia (Ip et al., 2004; Evans et al., 2005). Para isso, é necessário o envolvimento de proteínas de transporte como a NKA, NHE, NKCC, canais de K^+ (Randall et al., 1999). Excretar NH_4^+ ativamente é significativamente mais eficiente que transformar amônia em uréia ou glutamina (Ip et al., 2004). Porém, tal hipótese não parece se confirmar para *L. pholis* no experimento aqui realizado, visto que não houve nenhuma alteração na atividade da NKA (a qual aumenta nas brânquias de *P. schlosseri*) em brânquia ou na pele. Não houve também perturbação da homeostase (manutenção nos níveis de hidratação e íons no tecido muscular), ou alteração na expressão de proteínas de transporte de íons e amônia que poderiam estar envolvidos nesse processo. A manutenção nas taxas de excreção de amônia em *L. pholis* exposto a 1 mM de amônia por 24 h pode estar sendo garantida por dois processos: (1) pelo aumento no metabolismo dos peixes, o qual aumentaria a ventilação branquial e a saída direta de NH_3 , (2) pelo aumento da excreção ácida devido ao aumento na excreção de CO_2 , que levaria a aumento na saída de amônia como NH_4^+ . Níveis

elevados de amônia externa aumentam a ventilação branquial (revisado em Randall e Wright, 1987; Randall e Ip, 2006). Em geral, o fluxo de amônia é muito menor do que o fluxo de oxigênio e gás carbônico. Ao aumentar a ventilação branquial ocorre aumento na captação de oxigênio, com conseqüente aumento na remoção de amônia por meio do aumento do seu efluxo difusivo pelas brânquias (revisado em Randall e Wright, 1987; Randall e Ip, 2006). Essa elevação da ventilação branquial, inclusive, independe do pH da água (revisado em Randall e Ip, 2006). Havendo aumento na taxa metabólica, o oxigênio consumido leva a maior produção e excreção de CO₂. A enzima anidrase carbônica presente nas células mucosas de teleósteos (revisado em Randall e Wright, 1987) hidrata o CO₂, gerando HCO₃⁻ e H⁺. A camada mucosa mais ácida facilita a excreção de amônia na forma de NH₄⁺ por difusão (revisado em Randall e Wright, 1987; Wilkie, 1997). Excreção ácida é um mecanismo muito importante em situações de elevação nos níveis externos de amônia, e talvez o mais eficaz para reduzir a permeabilidade à NH₃, reduzindo sua taxa de retorno (influxo) passivo (Wilson et al., 1994; Ip et al., 2004; Randall e Ip, 2006). Esse mecanismo é adotado por *P. schlosseri* para reduzir a permeabilidade à NH₃ na superfície da pele e manter a excreção de NH₄⁺ através da brânquia (Randall et al., 1999; Ip et al., 2004; Randall e Ip, 2006). O peixe de água doce *Oncorhynchus mykiss* também manteve a taxa de excreção de amônia quando exposto por 24 h a altas concentrações de amônia externa (1 mmol/L) através desse mecanismo (Wilson et al., 1994). Em nosso experimento houve redução no pH da água, que passou de 7,92±0,004 para 7,85±0,03 após exposição dos peixes por 24 h a 1mM de NH₄Cl (P=0,002), e nos controles não houve alteração de pH da água (7,89±0,03 – 7,90±0,02; P>0,05). Essa redução no pH externo é compatível com a realização de excreção ácida por *L. pholis* submetida a aumento na amônia externa. Esse é um mecanismo comum adotado por peixes que vivem em águas estagnadas de volume finito (poças de maré ou fendas em costões rochosos), pois ter a habilidade de reduzir o pH do meio (água circundante) através da excreção ácida permite reduzir as concentrações

de NH_3 e portanto o aumento nos níveis internos de amônia e sua toxicidade sobre os peixes (revisado em Randall e Ip, 2006).

Adicionalmente, quando submetidos ao aumento das concentrações de amônia interna (injeção de bicarbonato de amônia), *L. pholis* também foi capaz de manter a taxa de excreção de amônia. Este procedimento também não alterou a excreção de amônia em dogfish, *Squalus acanthias* (revisado em Randall e Wright, 1987). Em geral, infusão de NH_4HCO_3 resulta na dissociação igualmente ácida e básica, porém, se o animal não excretar as mesmas proporções de NH_4^+ e HCO_3^- resulta no aumento do pH sanguíneo, o que corresponde a alcalose metabólica (Claiborne e Evans, 1988). Seguindo a mesma possibilidade discutida para o aumento de amônia na água, consideramos que a manutenção da taxa de excreção de amônia em peixes injetados com 0,3 M de NH_4HCO_3 também esteja ocorrendo por meio de excreção ácida, porém, neste caso através da pele. Apesar de não ter ocorrido redução nos níveis de pH da água ($7,86 \pm 0,02 - 7,85 \pm 0,02$, $p = 0,796$), neste experimento ocorreu o aumento na expressão da enzima anidrase carbônica na pele, e também aumento da atividade e expressão da NKA, também na pele, o que nos permite inferir sobre este mecanismo. A excreção de amônia estaria sendo facilitada pela produção de H^+ realizada pela anidrase carbônica, o qual é agregado ao NH_3 e excretado na forma de NH_4^+ por intermédio da NKA, mantendo assim níveis internos normais ao funcionamento do organismo (Randall e Wright, 1987; Wright, 1995).

6. Conclusão

- *Lipophrys pholis* é um peixe que demonstra notável resistência aos desafios ambientais impostos pelas regiões de entre-marés;
- Muitos teleósteos de respiração aérea que são primariamente amoniotélicos podem ser de forma facultativa ureotélicos, mas este não é o caso de *L. pholis*, o qual mantém mesmo em condições de desafios fisiológicos a excreção de amônia, inclusive apresentando altas taxas de excreção desse metabólito;
- A pele é imprescindível no processo de excreção de amônia nestes peixes;
- Como as taxas de excreção de amônia estão diretamente relacionadas a condição e alimentação do animal, as altas taxas de excreção de amônia encontradas aqui para *L. pholis* podem estar relacionadas ao fato dos animais terem recebido alimentação até 48 h antes do experimento;
- Entre todos os experimentos realizados, a exposição à água doce foi a condição mais desafiadora para *L. pholis*;
- Por ser animal anfíbio de região entre-marés, *L. pholis* já possui alta expressão e atividade da NAK (constitutivas), e de demais proteínas envolvidas na eliminação da amônia, o suficiente para não ocorrer aumento de sua expressão (“*up-regulation*”) diante dos desafios fisiológicos oferecidos.

7. Referências Bibliográficas

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

Bridges, C.R., 1988. Respiratory adaptations in intertidal fish. *Am. Zool.* 28: 79-96.

Claiborne, J.B., Evans, D.H., 1988. Ammonia and acid-base balance during high ammonia exposure in a marine teleost (*Myoxocephalus octodecimspinosus*). *J. Exp. Biol.* 140: 89-105.

Davenport, J., Sayer, M.D.J., 1986. Ammonia and urea excretion in the amphibious teleost *Blennius pholis* (L.) in sea-water and in air. *Comp. Biochem. Physiol.* 84A: 189-194.

Davenport, J., Vahl, O., 1979. Responses of the fish *Blennius pholis* to fluctuating salinities. *Mar. Ecol.* 1: 101-107.

Evans, D.H; Piermarini, P.M; Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97–177.

Ferreira, F., Santos, M.M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Lima, D., Vieira, M.N., Monteiro, N.M., 2009. Vitellogenin gene expression in the intertidal blenny *Lipophrys pholis*: A new sentinel species for estrogenic chemical pollution monitoring in the European Atlantic coast? *Comp. Biochem. Physiol.* 149: 58-64.

Gordon, M.S., Ng, W. W., Yip, A.Y., 1978. Aspects of the physiology of terrestrial life in amphibious fishes. *J. Exp. Biol.* 72: 57-75.

Graham, J.B. 1973. Terrestrial life of the amphibious fish *Mnierpes macrocephalus*. *Mar. Biol.* 23: 83-91.

Graham, J.B., 1997. Air-breathing fishes: Evolution, Diversity and Adaptation. Diversity and natural history. Academic Press, San Diego, California, USA, pp.44-46.

House, C.R. 1963. Osmotic regulation in the brackish water teleost, *Blennius pholis*. *J. Exp. Biol.* 40: 87- 104.

Ip, Y.K., Randall, D.J., Kok, T.K.T., Barzagli, C., Wright, P.A., Ballantyne, J.S., Wilson, J.M., Chew, S.F., 2004. The giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri* facilitates active NH_4^+

excretion by increasing acid excretion and decreasing NH₃ permeability in the skin. J. Exp. Biol. 207: 787-801.

Laming, P.R., Funston, C.W., Roberts, D., Armstrong, M.J., 1982. Behavioural, physiological and morphological adaptations of the shanny (*Blennius pholis*) to the intertidal habitat. J. Mar. Biol. 62: 329-338.

Lima, D., Santos, M.M., Ferreira, A.M., Micaelo, C., Reis-Henriques, M.A., 2008. The use of the shanny *Lipophrys pholis* for pollution monitoring: A new sentinel species for the northwestern European marine ecosystems. Environ. Int. 34: 94-101.

McCormick, S.D., Bern, H.A., 1989. In vitro stimulation of NaK-ATPase activity and ouabain binding by cortisol in coho salmon gill. Am. J. Physiol. 256: R707-R715.

McCormick, S.D., 1993. Methods for non-lethal gill biopsy and measurement of Na,K-ATPase activity. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 50: 656-658.

Martin, K.L.M., 1995. Time and tide wait for no fish: intertidal fishes out of water. Environ. Biol. Fishes. 44: 165-181.

Ramaswamy, M., Gopalakrishna Reddy, T., 1983. Ammonia and urea excretion in three species of air-breathing fish subjected to aerial exposure. Proc. Indian Acad. Sci. 92: 293-297.

Randall, D.J., Wright, P.A., 1987. Ammonia distribution and excretion in fish. Fish Physiol. Biochem. 3: 107-120.

Randall, D.J., Wilson, J.M., Peng, K.W., Kok, T.W.K., Kuah, S.S.L., Chew, S.F., Lam, T.J., Ip, Y.K., 1999. The mudskipper, *Periophthalmodon schlosseri*, actively transports NH₄⁺ against a concentration gradient. Am. J. Physiol. 277: R1562-R1567.

Randall, D.J., Tsui, T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. Mar. Poll. Bull. 45: 17-23.

Randall, D.J., Ip, Y.K., 2006. Ammonia as a respiratory gas in water and air-breathing fishes. Resp. Physiol. Neurobiol. 154: 216–225.

Saha, N., Ratha, B.K., 1998. Ureogenesis in indian air-breathing teleosts: adaptation to environmental constraints. Comp. Biochem. Physiol. 120 (A): 195-208.

Sayer, M.D.J., 2005. Adaptations of amphibious fish for surviving life out of water. Fish. Fisher. 6: 186-211.

Sayer, M.D.J., Davenport, J., 1987a. Ammonia and urea excretion in the amphibious teleost *Blennius pholis* exposed to fluctuating salinity and pH. *Comp. Biochem. Physiol.* 87 (A): 851-857.

Sayer, M.D.J., Davenport, J., 1987b. The relative importance of the gills to ammonia and urea excretion in five seawater and one freshwater teleost species. *J. Fish Biol.* 31: 561-570.

Solé, M., Lobera, G., Lima, D., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2008. Esterases activities and lipid peroxidation levels in muscle tissue of the shanny *Lipophrys pholis* along several sites from the Portuguese Coast. *Mar. Poll. Bull.* 56: 999-1007.

Stefanni, S., Domingues, V., Buton, N., Santos, R.S., Almada, F., Almada, V., 2006. Phylogeny of the shanny, *Lipophrys pholis*, from the NE Atlantic using mitochondrial DNA markers. *Mol. Phyl. Evol.* 39: 282-287.

Verdouw, H., van Echteld, C.J.A., Dekkers, E.M.J., 1978. Ammonia determination based on indophenols formation with sodium salicylate. *Water Res.* 12, 399-402.

Weihrauch, D., Wilkie, M.P., Walsh, P.J., 2009. Ammonia and urea transporters in gills of fish and aquatic crustaceans *J. Exp. Biol.* 212: 1716-1730.

Wilkie, M.P., 1997. Mechanism of ammonia excretion across fish gills. *Comp. Biochem. Physiol.* 118A: 39-50.

Wilkie, M.P., 2002. Ammonia excretion and urea handling by fish gills: Present understanding and future research challenges. *J. Exp. Zool.* 293:284-301.

Wilson, R.W., Wright, P.M., Munger, S., Wood, C.M., 1994. Ammonia excretion in freshwater rainbow trout (*Orcorhynchus mykiss*) and the importance of gill boundary layer acidification: Lack of evidence for $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ exchange. *J. Exp. Biol.* 191: 37-58.

Wilson, J.M., Randall, D.J., Donowitz, M., Vogl, W., Ip, A.K.Y., 2000. Immunolocalization of ion-transport proteins to branchial epithelium mitochondria-rich cells in the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*). *J. Exp. Biol.* 203: 2297-2310.

Wilson, J.M., Leitão, A., Gonçalves, A.F., Ferreira, C., Reis-Santos, P., Fonseca, A.V., Moreira-Silva, J. Antunes, J.C., Pereira-Wilson, C., Coimbra, J., 2007. Modulation of branchial ion transport protein expression by salinity in glass eels (*Anguilla anguilla* L.). *Mar. Biol.* 151: 1633-1645.

Wright, P.A., 1995. Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *J. Exp. Biol.* 198: 273-281.

Wright, P.A., Wood, C.M., 2009. A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. *J.Exp.Biol.* 212: 2303-2312.

Conclusões Gerais

- *Rhamdia quelen* mostrou-se um excelente bioindicador para avaliação de efeitos de contaminantes, sejam eles xenobióticos ou naturais;
- Durante a exposição de espécimes desta espécie, através de experimentos *in situ*, a águas de vários pontos da bacia do Alto Rio Iguaçu, contendo mistura complexa de contaminantes, houve clara influência da contaminação sobre as respostas fisiológicas e bioquímicas dos peixes;
- As alterações sub-letais identificadas nos peixes desta espécie mostraram-se potencializadas durante a estação de verão, deixando clara a influência da sazonalidade sobre a dinâmica dos poluentes e sobre as respostas desses organismos;
- Adicionalmente, quando respostas histológicas, comportamentais e fisiológicas foram avaliadas, através de estudos laboratoriais, confirmou-se a influência da sazonalidade sobre as respostas manifestadas por indivíduos desta espécie quando expostos a água contaminada existente na bacia do Alto Rio Iguaçu;
- *R. quelen* utiliza substância de alarme para comunicação entre co-específicos, e provavelmente utiliza este artifício como um mecanismo de defesa diante do risco de predação, porém esta substância não evoca respostas fisiológicas de estresse no jundiá;
- Serão necessários estudos futuros para melhor caracterização dos efeitos da substância de alarme sobre o comportamento e respostas de estresse em *R. quelen*, preferencialmente em concentrações diferentes das utilizadas neste estudo;
- Quando expostos a diferentes concentrações de amônia na água, *R. quelen* mostrou-se relativamente resistente, não manifestando respostas de estresse. Apesar disso, houve

significativa perturbação na homeostase desses peixes, caracterizada pelo desequilíbrio ácido-básico, evidenciado pela inibição da atividade da enzima anidrase carbônica branquial e renal;

- Deste modo, alertamos que quanto maior o tempo de exposição e concentração de amônia na água maiores serão os efeitos sobre os jundiás;
- Espécimes de *R. quelen*, quando submetidos por 1 h a 25 g/L de sal (NaCl), apresentam prejuízo na manutenção da homeostase extracelular, revelando uma clara resposta de estresse, embora sem aumento do cortisol plasmático. Apesar disso, os peixes demonstraram grande capacidade de regulação da água do seu tecido muscular;
- Deste modo, para a remoção de ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis*, por meio de um tratamento com duração de 1 h, o NaCl deve ser usado em uma concentração máxima de 15 g/L, já que esta quantidade de sal não afetou significativamente a homeostase osmótica e ácido-básica dos jundiás, como foi verificado utilizando 25 g/L.
- O peixe de entre-marés, o blenídio *Lipophrys pholis*, quando testado com relação à capacidade de manutenção de excreção de amônia diante da exposição a desafios fisiológicos de exposição ao ar, à água doce e ao aumento nas concentrações internas e externas de amônia, não só manteve a capacidade de excretar amônia, como apresentou altas taxas de excreção desse metabólito;
- A pele destes peixes mostrou-se imprescindível no processo de excreção de amônia nestas condições;
- Adicionalmente, esta notável capacidade do *Lipophrys pholis* em tolerar e assegurar a eliminação da amônia quando exposto ao ar, à água doce e ao aumento de amônia externa não envolveu aumento na expressão de proteínas de transporte de amônia e

íons. Por ser animal anfíbio de região entre-marés, *L. pholis* já possui alta expressão e atividade da NAK (constitutivas), e de demais proteínas envolvidas na eliminação da amônia, o suficiente para não ocorrer aumento de sua expressão (“up-regulation”) diante dos desafios fisiológicos oferecidos;

- A única exceção foi identificada na pele de *L. pholis* expostos ao aumento de amônia interna. Nesta condição houve aumento na expressão de NKA e AC na pele, provavelmente devido à necessidade de aumentar a eficácia do mecanismo de excreção ácida, necessário para a manutenção das taxas de excreção de amônia nestas condições;
- Dentre todos os desafios a que *L. pholis* foi exposto, a exposição à água doce foi a mais desafiadora. Novos estudos são necessários para uma melhor avaliação dos mecanismos de excreção de amônia para estes peixes nesta condição.
- Foi assim possível, através de enfoques variados e utilizando duas espécies de teleósteos, contribuir para o conhecimento da fisiologia das respostas de estresse à presença de contaminantes ou alterações em fatores abióticos na água.

Referências Bibliográficas

Abilhoa, V., Boscardin, C.R., 2004. A ictiofauna do alto curso do Rio Iguaçu na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná: perspectivas para sua conservação. *Sanare – Revista Técnica da Sanepar* 22: 58 – 65.

ArasHisar, S., Hisar, O., Yanik,T., Aras, S.M., 2004. Inhibitory effects of ammonia and urea on gill carbonic anhydrase enzyme activity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 17: 125 – 128.

Almeida, J.S., Meletti, P.C., Martinez, C.B.R., 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 140: 356 – 363.

Alquezar, R., Scott, J. M., David, J. B., 2006. Metal accumulation in the smooth toadfish, *Tetractenos glaber*, in estuaries around Sydney, Australia. *Environ. Poll.* 142: 123-131.

Baldisserotto, B., Radünz Neto, J., 2004. Criação de Jundiá. Santa Maria. Editora UFSM, 232p.

Barcellos, L.J.G., Woehl, V.M., Wassermann, G.F., Quevedo, R.M., Ittzés, I. Krieger, M.H., 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. *Aquac. Res.* 32: 121-123.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Fioreze, I., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Baldissera, R.K., Bruschi, A., Ritter, F., 2004a. Nursery rearing of jundiá, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard) in cages: cage type, stocking density and stress response to confinement. *Aquaculture* 232: 383–394.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Souza, C., Rodrigues, L.B., Fioreze, I., Quevedo, R.M., Cericato, L., Soso, A.B., Fagundes, M., Conrad, J., Lacerda, L.A., Terra, S., 2004b. Hematological changes in jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy and Gaimard, Pimelodidae) after acute and chronic stress caused by usual aquacultural management, with emphasis on immunosuppressive effects. *Aquaculture* 237: 229-236.

Barcellos, L.J.G., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., 2006. Previous chronic stress does not alter the cortisol response to an additional acute stressor in jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy and Gaimard) fingerlings. *Aquaculture* 253: 317-321.

Becker, A.G., Gonçalves, J.F., Garcia, L.O., Behr, E.R., Mallmann, F.J.K., Graça, D.L., Baldisserotto, B., 2006. Ions levels in the gastrointestinal tract content and plasma of four teleost with different feeding habitats. *Fish Physiol. Biochem.* 32: 105-112.

Becker, A.G., Moraes, B.S., Menezes, C.C., Loro, V.L., Santos, D.R., Reichert, J.M., Baldisserotto, B., 2009. Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish, *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72: 1734 – 1739.

Behr, E.R., Radünz Neto, J., Tronco, A.P., Fontana, A.P., 1999. Influência de diferentes níveis de luminosidade sobre o desempenho de larvas de Jundiá (*Rhamdia quelen*) (Quoy e Gaimard, 1824) (Pisces: Pimelodidae). *Acta Sci.* 21 (2):325-330.

Beyenbach, K.W., Freire, C.A., Kinne, R.K.H., Kinne-Saffran, E., 1993. Epithelial transport of magnesium in the kidney of fish. *Miner. Electrolyte Metab.* 19: 241-249.

Beyenbach, K.W., 1995. Secretory electrolyte transport in renal proximal tubules of fish. In *Cellular and Molecular Approaches to fish ionic regulation*. Academic Press, San Diego. Vol. 14 in the *Fish Physiol. Ser.*

Beyenbach, K.W., Freire, C.A., Kinne-Saffran, E., Kinne R.K.H., 1997. Transport of magnesium across renal membrane vesicles evidence for a channel? *Advances in Magnesium Research* 67: 443-450.

Bockmann, F.A., Guazzelli, G.M., 2003. Heptapteridae (Heptapterides). In: R.E. Reis, S.O., Kullander, C.J., Ferraris Jr. (Eds). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre. Ed. PUCRS, Brasil. pp. 406 – 431.

Borges, A., Scotti, L.V., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Wassermann, G.F., 2004. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). *Fish Physiol. Biochem.* 30: 21-25.

Borges, A., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Zanini, R., Amaral, F., Grillo, M.L., Oberst, E.R., Wassermann, G.F., 2005. Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiol. Biochem.* 31: 45-53.

Boscardin, N.R., 2008. A produção aquícola brasileira. In: Ostrensky, A., Borghetti, J.R., Soto, D. (Eds.), *Aqüicultura no Brasil: O Desafio é Crescer*. Editora Brasília, Brasília, pp. 27–72.

Braun, N., Lima, R.L., Moraes, B., Loro, V.L., Baldisserotto, B., 2006. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Aquac. Res.* 37: 1524 – 1531.

Camargo, S.O., Pouey, J.L., Martins, C., 2005. Parâmetros eritrocitários do jundiá (*Rhamdia quelen*) submetido à dieta com diferentes níveis de proteínas. *Ciência Rural* 35 (6): 1406 – 1411.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 21: 61–69.

Camargo, S.G.O., Pouey, J.L.O.F., Vaz, B.S., 2006. Efeito da salinidade nos parâmetros hematológicos do jundiá (*Rhamdia quelen* – Quoy & Gaimard, 1824). *Rev. Bras. Agrocienc.* 12, 453–460.

Camargo, M.M.P., Martinez, C.B.R., 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a neotropical fish caged in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5(3):327-336.

Carneiro, P.C.F., Bendhack, F., Mikos, J., Schorer, M., Baldisserotto, B., Golombieski, J.I., Silva, L.V.F., Miron, D., Esquivele, B.M., Garcia, J.R.E., 2002. Jundiá: um grande peixe para a Região Sul. *Panorama da Aqüicultura*, 12: 41-46.

Carneiro, P.D.F., Mikos, J.D., 2005. Feeding frequency and growth of silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *Ciência Rural* 35: 187 – 191.

Carneiro, P.C.F., Schorer, M., Mikos, J.D., 2005. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle do ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em jundiá (*Rhamdia quelen*). *Pesq. Agropec. Bras.* 40: 99 – 102.

Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Finco, J., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Anziliero, D., Barcellos, L.J.G., 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol.* 148: 281 – 286.

Cericato, L., Neto, J.G.M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Marqueze, A., Barcellos, L.J.G., 2009. Responsiveness of the

interrenal tissue of jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol.* 149: 363-367.

Cerqueira, C.C.C., Fernandes, M.N., 2002. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52: 83-91.

Cliff, W.H., Sawyer, D.B., Beyenbach, K.W., 1986. Renal proximal tubule of flounder II. Transepithelial Mg secretion. *Am. J. Physiol.* 250: R616-R624.

Copatti, C.E., Coldebella, I.J., Radünz - Neto, J., Garcia, L.O., Rocha, M.C., Baldisserotto, B., 2005. Effect of dietary calcium on growth and survival of silver catfish fingerlings, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae), exposed to different water pH. *Aquac. Nut.* 11: 345-350.

Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Lazzari, R., Duarte, M.F., Morsch, V.M., Pippi, A.L., Vieira, V.P., 2006. Effects of clomazone herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 65: 48–55.

Crestani, M., Menezes, C., Gluszczak, L., Miron, D.S., Spanevello, R., Silveira, A., Gonçalves, F.F., Zanella, R., Loro, V.L., 2007. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67: 2305-2311.

Davenport, J., Sayer, M.D.J., 1986. Ammonia and urea excretion in the amphibious teleost *Blennius pholis* (L.) in sea-water and in air. *Comp. Biochem. Physiol.* 84 (A): 189-194.

Dorval, J., Leblond, V.S., Hontela, A., 2003. Oxidative stress and loss of cortisol secretion in adrenocortical cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vitro to endosulfan, an organochlorine pesticide. *Aquat. Toxicol.* 63: 229 – 241.

Evans, D.H., 1987. The fish gill: Site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health Perspectives.* 71: 47-58.

Evans, D.H., 1993. The physiology of fishes. Marine Science Series. 592 pp.

Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97–177.

Ferreira, A.A., Nuñez, A.P.O., Esquivel, J.R., 2001. Influência do pH sobre ovos e larvas de jundiá, *Rhamdia quelen* (Osteichthyes, Siluriformes). *Acta Scient.* 23(2): 477-481.

Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M.A., 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicol.* 71: 39–48.

Ferreira, F., Santos, M.M., Castro, L.F.C., Reis-Henriques, M.A., Lima, D., Vieira, M.N., Monteiro, N.M., 2009. Vitellogenin gene expression in the intertidal blenny *Lipophrys pholis*: A new sentinel species for estrogenic chemical pollution monitoring in the European Atlantic coast? *Comp. Biochem. Physiol.* 149: 58-64.

Fontainhas-Fernandes, A., Luzio, A. Garcia-Santos, S., Carrola, J., Monteiro, S., 2008. Gill histopathological alterations in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to treated sewage water. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 5: 1057 – 1063.

Fleeger, J.W., Carman, K.R., Nisbet, R.M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 317: 207-233.

Francisco, S.M., Vieira, M.N., Almada, V.C., 2006. Genetic structure and historical demography of the shanny *Lipophrys pholis* in the Portuguese coast based on mitochondrial DNA analysis. *Mol. Phylogenet. Evol.* 39: 288-292.

Freire, C.A., Kinne-Saffram, E., Beyenbach, K.W., Kinne, R.K.H., 1995. Na-D-glucose cotransport in renal brush-border membrane vesicles of early teleost (*Onconhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol.* 269, 592-602.

Garcia, L.O., Becker, A.G., Copatti, C.E., Baldisserotto, B., Radünz Neto, J., 2007. Salt in the food and water as a supportive therapy for *Ichthyophthirius multifiliis* infestation on silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. *J. World Aquac. Soc.* 38, 1–11.

Geers, C., Gros, G., 2000. Carbon dioxide transport and carbonic anhydrase in blood and muscle. *Physiol. Rev.* 80: 681-707.

Georgalis, T., Gilmour, K.M., Yorston, J., Perry, S.F., 2006. Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid-base balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291: F407-F421.

Gluszczak, L., Miron, D.S., Moraes, B.S., Simões, R.R., Schetinger, M.R.C., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp. Biochem. Physiol.* 146 (C): 519-524.

Golombieski, J.I., Silva, L.V.F., Baldisserotto, B., da Silva, J.H.S., 2003. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. *Aquaculture* 216, 95–102.

Gomes, L.C., Golombieski, J.I., Gomes, A.R.C., Baldisserotto, B., 2000. Biologia de jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 30, 179–185.

Graham, J.B., 1997. Air-breathing fishes: Evolution, Diversity and Adaptation. Diversity and natural history. Academic Press, San Diego, California, USA, pp.44-46.

Gül, S., Belge-Kurutas, E., Yildiz, E., Sahan, A., Doran, F., 2004. Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* 30: 605– 609.

Henry, R.P., 1996. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu. Rev. Physiol.* 58: 523-538.

Henry, R.P., Swenson, E.R., 2000. The distribution and physiological significance of carbonic anhydrase in vertebrate as exchange organs. *Resp. Physiol.* 121: 1-12.

Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In: Storey, K.B. (Ed.), *Functional Metabolism: Regulation and Adaptation*. John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 319–368.

House, C.R., 1963. Osmotic regulation in the brackish water teleost, *Blennius pholis*. *J. Exp. Biol.* 40: 87- 104.

Innocenti, A., Zimmerman, S., Ferry, J.G., Scozzafava, A., Supuran, C.T., 2004. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the zinc and cobalt γ -class enzyme from the archaeon *Methanosarcina thermophila* with anions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters.* 14: 3327–3331.

Jobling, M., 1995. Osmotic and ionic regulation – water e salt balance. *Environmental Biology of Fishes*. Chapman & Hall, London. Fish and Fisheries, series 16.

Katoh, F., Tresguerres, M., Lee, M.K., Kaneko, T., Aida, K., Goss, G.G., 2006. Cloning of rainbow trout SLC26A1: involvement in renal sulfate secretion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 290: R1468 – R1478.

Kochhann, D., Benaduce, A.P.S., Copatti, C.E., Lorenzatto, K.R., Mesko, M.F., Flores, E.M.M., Dressler, V.L., Baldisserotto, B., 2009. Protective effect of high alkalinity against the deleterious effects of chronic waterborne cadmium exposure on the detection of alarm cues by juvenile silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 770-775.

Laiz-Carrión, R., Sangiao-Alvarellos, S., Guzmán, J.M., Martín del Río, M.P., Míguez, J.M., Soengas, J.L., Mancera, J.M., 2002. Energy metabolism in fish tissue related to osmoregulation and cortisol action. *Fish Physiol. Biochem.* 27: 179-188.

Laming, P.R., Funston, C.W., Roberts, D., Armstrong, M.J., 1982. Behavioural, physiological and morphological adaptations of the shanny (*Blennius pholis*) to the intertidal habitat. *J. Mar. Biol.* 62: 329-338.

Lermen, C.L., Lappe, R., Crestani, M.R., Vieira, V.L.P., Gioda, C.R., Schetinger, M.R.C., Baldisserotto, B., Moraes, G., Morsch, V.M., 2004. Effect of different temperature regimes on metabolic and blood parameters of silver catfish *Rhamdia quelen* *Aquaculture* 239: 497 – 507.

Lermen, C.L., Vieira, V.L.P., Schetinger, M.R.C., Lappe, R., Gioda, C.R., Crestani, M.R., Baldisserotto, B., Moraes, G., Morsch, V.M., 2005. ATP, ADP and AMP dephosphorylation in membrane fractions of *Rhamdia quelen* exposed to different temperatures. *Fish Physiol. Biochem.* 31: 295-301.

Lima, E.S., Abdalla, D.S.P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Ciênc. Farmac.* 37: 293:303.

Lima, D., Santos, M.M., Ferreira, A.M., Micaelo, C., Reis-Henriques, M.A., 2008. The use of the shanny *Lipophrys pholis* for pollution monitoring: A new sentinel species for the northwestern European marine ecosystems. *Environ. Int.* 94-101.

Lionetto, M.G., Maffia, M., Capello, M.S., Giordano, M.E., Storelli, C., Schettino, T., 1998. Effects of cadmium on carbonic anhydrase and Na⁺ - K⁺ - ATPase in ell, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. *Comp. Biochem. Physiol.* 120 A: 89-91.

Lürling, M., Scheffer, M., 2007. Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends Ecol. Evol.* 22: 374-379.

Madsen, S.S., 1990. The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 1-11.

Magalhães, D.P., Ferrão Filho, A.S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* 12 (3): 355-381.

Mancera, J.M., McCormick, S.D., 2007. Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol in teleost osmoregulation. In: B. Baldisserotto; J.M. Mancera; B.G. Kapoor (Eds). *Fish Osmoregulation*. Science Publishers, Enfield, pp 497-515.

Marchioro, M.I., Baldisserotto B., 1999. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen*, Quoy & Gaimard, 1824) à variação de salinidade da água. *Ciência Rural* 29, 315–318.

Maren, T.H., Sanyal, G., 1983. The activity of sulfomanides and anions against the carbonic anhydrase of animals, plants and bacteria. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23: 439-459.

Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M., 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatu*. *Braz. J. Biol.*, 64: 797-807.

Martinez, A.S., Cutler, C.P., Wilson, G.D., Phillips, C., Hanzon, N., Cramb, G., 2005. Regulation of expression of two aquaporin homologs in the intestine of the European eel: effects of seawater acclimation and cortisol treatment. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288: R1733-R1743.

Melo, G.C., Donatti, L., Rudniki, C.A.M., Fanta, E., 2008. Hepatic alterations in the fish *Rhamdia quelen* contaminated with Folidol 600. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71: 821-829.

Meyer, G., Fracalossi, D.M., 2004. Protein requirement of jundiá fingerlings, *Rhamdia quelen*, at two dietary energy concentrations. *Aquaculture* 240: 331–343.

Miron, D.S., Crestani, M., Shetinger, M.R., Morsch, V.M., Baldisserotto, B., Tierno, M.A., Moraes, G., Vieira, V.L.P., 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61: 398-403.

Miron, D.S., Moraes, B., Becker, A.G., Crestani, M., Spanevello, R., Loro, V.L., Baldisserotto, B., 2008. Ammonia and pH effects on some metabolic parameters and gill histology of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Heptapteridae). *Aquaculture* 277: 192-196.

Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9: 211–268.

Monserat, J.M., Martínez, P.E., Geracitano, L.A., Amado, L.L., Martins, C.M.G., Pinho, G.L.L., Chaves, I.S., Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Bianchini, A., 2007. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp. Biochem. Physiol.* 46: 221-234.

Nelson, J.S., 2006. *Fishes of the world*. John Wiley & Sons, Inc. 4thed.

Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L., to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49: 64-75.

Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez, B., Raisuddin, S., 2003. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total. Environ.* 309: 105 – 115.

Pereira, L.P.F., Mercante, C.T.J., 2005. A amônia nos sistemas de criação de peixes e seus efeitos sobre a qualidade da água, uma revisão. *B. Inst. Pesca* 31: 81-88.

Perry S.F., Gilmour, K.M., 2006. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 154: 199-215.

Picado, A., Bebianno, M.J., Costa, M.H., Ferreira, A., Vale, C., 2007. Biomarkers: a strategic tool in the assessment of environmental quality of coastal waters. *Hydrobiologia* 587: 79-87.

Piedras, S.R.N., Moraes, P.R.R., Pouey, J.L.O.F., 2004. Crescimento de juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*), de acordo com a temperatura da água. *B. Inst. Pesca* 30(2): 177 – 182.

Portz, D.E., Woodley, C.M., Cech Jr, J.J., 2006. Stress-associated impacts of short-term holding on fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.* 16: 125-170.

Prodocimo, V., Freire, C.A., 2001. Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine puffer fishes submitted to sea water dilution. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 262: 243-253.

Randall, D.J.; Brauner, C., 1998. Interactions between ion and gas transfer in freshwater teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119A: 3-8.

Randall, D.J., Burggren, W., French, K., 1999. *Fisiologia Animal: Mecanismos e Adaptações*. 4ª Edição. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, RJ. 729 pp.

Roche, H., Bogé, G., 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Mar. Environ. Res.* 41: 27-43.

Saha, N., Ratha, B.K., 2007. Functional ureogenesis and adaptation to ammonia metabolism in Indian freshwater air-breathing catfishes. *Fish Physiol. Biochem.* 33: 283-295.

Sayer, M.D.J., 2005. Adaptations of amphibious fish for surviving life out of water. *Fish. Fisher.* 6: 186-211.

Sayer, M.D.J., Davenport, J., 1987. The relative importance of the gills to ammonia and urea excretion in five seawater and one freshwater teleost species. *J. Fish Biol.* 31: 561-570.

Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behavior: integrating behavioral and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68: 369-392.

Schulz, U.H., Leuchtenberger, C., 2006. Activity patterns of South American silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Braz. J. Biol.* 66A, 565-574.

Silva, L.V.F., Golombieski, J.I., Baldisserotto, B., 2003. Incubation of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. *Aquaculture* 228: 279-287.

Silva, A.G., Martinez, C.B.R., 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23: 185-192

Skaggs, H.S.; Henry, R.P., 2002. Inhibition of carbonic anhydrase in the of two euryhaline crabs, *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 133: 605-612.

Sofia, S.H., Silva, C.R.M., Galindo, B.A., Almeida, F.S., Sodr  L.M.K., Martinez C.B.R., 2006. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. *Hydrobiologia* 553: 245–254.

Sol , M., Lobera, G., Lima, D., Reis-Henriques, M.A., Santos, M.M., 2008. Esterases activities and lipid peroxidation levels in muscle tissue of the shanny *Lipophrys pholis* along several sites from the Portuguese Coast. *Mar. Poll. Bull.* 56: 999-1007.

Souza-Bastos L.R., Freire, C.A., 2009. The handling of salt by the neotropical cultured freshwater catfish *Rhamdia quelen*. *Aquaculture* 289: 167-174.

Souza-Bastos, L.R., Freire, C.A., 2011. Osmoregulation of the resident estuarine fish *Atherinella brasiliensis* was still affected by an oil spill (Vicun  tanker, Paranagu  Bay, Brazil), 7 months after the accident. *Sci.Total Environ.* 409: 1229-1234.

Stien, X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Rom o, M., Lafaurie, M., 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environ. Poll.* 99: 339 – 345.

Stefanni, S., Domingues, V., Buton, N., Santos, R.S., Almada, F., Almada, V., 2006. Phylogeny of the shanny, *Lipophrys pholis*, from the NE Atlantic using mitochondrial DNA markers. *Mol. Phyl. Evol.* 39: 282-287.

Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., 2003. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Res. Rev.* 23: 146-189.

van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13: 57–149.

Vargas, R., Bessonart, M., 2007. Lipid body composition of black catfish, *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae), of two populations adapted to different environmental conditions. *Bol. Inst. Pesca* 33, 105–111.

Veillette, P.A., Sundell, K., Specker, J.L., 1995. Cortisol mediates the increase in intestinal fluid absorption in Atlantic Salmon during Parr-Smolt Transformation. *General and Comparative Endocrinology* 97: 250-258.

Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiol. Rev.* 77: 591-625.

Wilhelm Filho, D., Torres, M.A., Tribess, T.B., Pedrosa, R.C., Soares, C.H.L., 2001. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). Braz. J. Med. Biol. Res. 34 (6): 719-726.

Winkaler, E.U., Silva, A.G., Galindo, H.C., Martinez, C.B.R., 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. Acta Scientiarum 23: 507-514.

Zaions, M.I., Baldisserotto, B., 2000. Na⁺ and K⁺ body levels and survival of fingerlings of *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Pimelodidae) exposed to acute changes of water pH. Ciência Rural 30(6): 1041-1045.

Zikic, R.V., Stajn, A.S., Pavlovic, S.Z., Ognjanovic, B.I., Saicic, Z.S., 2001. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. Physiol. Res. 50: 105 – 111.