

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**FELIPE BRANDALISE DE ARAÚJO**

**QUALIDADE DA ÁGUA E ESTRESSE NO TRANSPORTE DE PEIXES DULCÍCOLAS  
E ESTUARINOS**

**CURITIBA**

**2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE BRANDALISE DE ARAÚJO

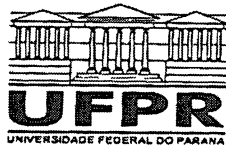
QUALIDADE DA ÁGUA E ESTRESSE NO TRANSPORTE DE PEIXES  
DULCÍCOLAS E ESTUARINOS

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de mestre em  
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Carolina Arruda  
de O. Freire

CURITIBA

2017



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Departamento de Fisiologia  
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



## PARECER

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FELIPE BRANDALISE DE ARAÚJO** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO do acadêmico.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de julho de dois mil e dezessete.

**Professora Doutora Flávia Duarte Ferraz Sampaio**  
UFPR - Membro Titular

**Professora Doutora Marisa Fernandes de Castilho**  
UFPR - Membro Titular

**Professora Doutora Carolina Arruada de Oliveira Freire**  
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

## AGRADECIMENTOS

Eu sou grato a tantas pessoas, por tantos motivos e momentos diferentes, que eu tenho certeza que vou esquecer de alguém. Mas tentarei...

Primeiramente, agradeço imensamente a minha orientadora Carolina Arruda de Oliveira Freire, que tanto me ensinou nestes anos de mestrado, sempre se preocupou com o crescimento profissional de cada orientado, com o máximo de paciência. Foi ótimo ser orientado por uma pessoa tão sábia.

Agradeço aos professores: Bruno Jacson Martinhak, por abrir espaço na sua disciplina para minha aula da prática de docência e me ajudar muito na mesma; Paulo de Tarso do Departamento de Zoologia, por sanar dúvidas pontuais em relação a teleósteos; Claudia Sallai, também pela prática de docência; Viviane Prodocimo, pelas dicas principalmente na apresentação do projeto e convivência no LFCO; Flávia Duarte Sampaio por ter me ajudado em coleta, e me ensinado a metodologia do experimento.

Muito obrigado ao João do Ceasa e Beto de Pontal do Paraná, pessoas que me auxiliaram na aquisição de espécies para o projeto. Ao Roberto Guimarães da secretaria, por me ajudar com diversos formulários e assinaturas, agilizando coisas que pareciam impossíveis e à CAPES pela bolsa.

Agora um agradecimento mais do que especial a todos meus amigos do LFCO: Isis Danniele, Natascha Wosnick, Guilherme Torres, Gustavo, Deivyson Bozza, Eloísa Pinheiro, Renata Daldin Leite, Daliana Bordin, e em especial à Giovanna Castellano (e Marcos Paulo) e à Juliane Ceron, por todos os ensinamentos nos ensaios e estatísticas. Por fim, ao Leonardo de Paula Rios, por todas as dezenas de galhos quebrados, seja em coletas, em escrita, e principalmente em conversas e convivência.

Agradeço ainda a toda a galera do Departamento de Fisiologia, principalmente ao grupo dos “Pangarés”, desde o povo de Tópicos até os “calouros”: Carlos Henrique (boa noite.), Gislaine Bonete, Thabata Caroline, Marcelo Ferrari, Amanda Bialli, Flavia Dourieux, Rebeca Buest, Helena Zanella e Bárbara Patrícia Schneider (minha melhor psicóloga).

Um abraço especial a todas as pessoas que contribuíram para minha formação, desde lá atrás, permanecendo na minha vida e auxiliando de alguma forma: Felipe Neves Ferrari (Harry) e Flavia Gulak Maia (Rush) (brothers supremos), Rafael Maschio,

Priscila Lemes Gross, Gabriel Roger Zanluca (Cueca), Ana Paula Farias, Maria Augusta Poersch, Julia Lopes (Coala), Eduardo Miguel, Yohan Sebastian, João Pedro Modric, Giuliana Taques, Heloísa Magagnin Brincas, Simone Fachin (Mony)...

Muito obrigado ao povo do futebol de toda a quinta feira/ time da bio: Bruno Koehler, Weslly Franco, Leo Amorim (brother de anos...), Fernando Souza (Pepino), Marcelo Bittencourt (joga 10), Felipe Marcelli, Bruno Bastos, Filipe dos Anjos (Batuque), Bruno Cassilha (Pato), Petrus Cuesta, Thiago Estefano, e todos os outros, valeu por me manterem menos sedentário do que eu poderia ter ficado!

Outro abraço especial para o povo do RPG: Caio Yamakawa, Mari Bourscheid, Gustavo Dias, Gustavo Stacheski (Formiguinha), Maurício Cezimbra.

Às pessoas que mesmo longe continuavam me ajudando e no meu pensamento, meus irmãos Guilherme Alves dos Passos, Henrique Araujo (Poodle) e William Ramos (Noturno).

Por fim, os agradecimentos principais: a Luiz Antônio Vilela de Araújo, Silvana Brandalise de Araújo e Isabela Brandalise de Araújo, por toda a força, presença mesmo longe, aporte financeiro, dentre outras coisas.

E à Juliana Herrera Forvile, pelos três melhores anos da minha vida.

Amo todos vocês.

*“Try to realize it's all within yourself,  
no-one else can make you change.  
And to see you're really only very small,  
and life flows on within you and without you.”*

*(George Harrison- Within You Without You, 1967)*

## RESUMO

O transporte dos peixes, seja para criação, engorda ou utilização em laboratórios e principalmente para aquarofilia é uma atividade extremamente estressante para os animais. Essa atividade representa um desafio à sua homeostase, podendo gerar danos irreversíveis aos indivíduos, levando até à morte. O presente estudo busca evidenciar a necessidade de conhecimento individual das espécies, avaliando os mecanismos ativados e envolvidos na manutenção da homeostase nesses animais. Espera-se assim auxiliar na padronização de transportes de acordo com as necessidades e peculiaridades de cada grupo, evitando a generalização de um transporte de características únicas para todas as espécies. Quatro espécies de diferentes ambientes foram escolhidas, para análise dos efeitos do transporte sobre a qualidade da água e de sua tolerância ao estresse: *Rhamdia quelen* (dulcícola); *Cyprinus carpio* (dulcícola); *Bathygobius soporator* (de poças de marés) e *Sphoeroides greeleyi* (marinho/estuarino). A instabilidade ou estabilidade do ambiente foi o parâmetro principal para a formulação da hipótese. Supõe-se que animais de ambientes instáveis (quanto a variáveis físicas e químicas) possuam mais ferramentas regulatórias e compensatórias para suportar ambientes estressantes. A hipótese formulada foi a de que os animais estuarinos e de poças de marés fossem mais resistentes ao transporte do que as espécies dulcícolas, de ambientes estáveis. Foram estipulados três tempos experimentais, além do controle (animais mantidos em aquário contendo água doce ou água do mar): 6, 24 e 72 horas. Alguns parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram analisados nos peixes: teor hídrico muscular, glicemia e atividade da enzima anidrase carbônica branquial (AAC). Além disso, parâmetros da qualidade da água de transporte também foram examinados: amônia, pH e oxigênio dissolvido (OD). Houve diferentes padrões de respostas ao estresse nas espécies, e mortalidade apenas em *S. greeleyi* (33,3%), afetando todos os indivíduos de 72 horas e os de maior comprimento em 24 horas. Pode-se dizer que essa espécie foi a que mais sofreu com os agentes estressores observados na água de transporte, e a queda no pH foi a principal característica limitante. Em *B. soporator* a condição de queda no pH também foi observada, tendo relação com a baixa disponibilidade de OD e diminuição na AAC, sugerindo a presença do Efeito Raiz e/ou do Efeito Bohr. Essa espécie apresentou a ativação de mecanismos que possibilitaram a sobrevivência e manutenção da homeostase de seus indivíduos, mesmo em condições de baixa qualidade da água. A espécie *R. quelen* foi a espécie mais tolerante ao

protocolo de transporte, mesmo sendo de ambiente estável. Por fim, *C. carpio* apresentou uma importante manutenção corpórea em face a uma elevada concentração de amônia. De forma geral, conclui-se que de fato é necessário um estudo específico do estresse envolvido no transporte de cada espécie de interesse. A estabilidade ou instabilidade do ambiente de origem não foi, aqui, fator determinante na tolerância dos animais ao estresse de transporte. Não foi possível testar espécie de ambiente marinho estável, sendo em geral animais de maiores profundidades, e de difícil acesso.

Palavras chaves: transporte, estresse, tolerância, amônia, pH, anidrase carbônica, piscicultura, ornamental.



## ABSTRACT

The transport of fish, whether for breeding, fattening or use in laboratories and especially for aquariums is an extremely stressful activity for animals. This activity represents a challenge to its homeostasis, which can lead to irreversible damage to the individuals, leading to death. The present study aims to evidence the need for individual knowledge of the species, evaluating the mechanisms activated and involved in the maintenance of homeostasis in these animals. It is hoped to help in the standardization of transport according to the needs and peculiarities of each group, avoiding the generalization of a transport of characteristics unique to all species. Four species of different environments were chosen to analyze the effects of transport on water quality and its stress tolerance: *Rhamdia quelen* (fresh water); *Cyprinus carpio* (fresh water); *Bathygobius soporator* (from tidal pools) and *Sphoeroides greeleyi* (marine / estuarine). The instability or stability of the environment was the main parameter for the formulation of the hypothesis. It is assumed that animals from unstable environments (as to physical and chemical variables) have more regulatory and compensatory tools to support stressful environments. The hypothesis formulated was that estuarine and tidal pools animals were more resistant to transport than the fresh water species, of stable environments. Three experimental times, besides the control (animals kept in aquarium containing fresh water or sea water) were stipulated: 6, 24 and 72 hours. Some physiological and biochemical parameters were analyzed in fish: muscular water content, glycemia and activity of the branchial carbonic anhydrase enzyme (CAA). In addition, transport water quality parameters were also examined: ammonia, pH and dissolved oxygen (DO). There were different patterns of stress responses in the species, and mortality in *S. greeleyi* (33.3%), affecting all individuals of 72 hours and those of greater length in 24 hours. It can be said that this species suffered the most from the stressors observed in the transport water, and the fall in pH was the main limiting characteristic. In *B. soporator* the pH fall condition was also observed, having relation with the low availability of DO and decrease in the CAA, suggesting the presence of the Root Effect. This species presented the activation of mechanisms that allowed the survival and maintenance of homeostasis of its individuals, even in conditions of poor water quality. The *R. quelen* species was the most tolerant species to the transport protocol, even though it was of a stable environment. Finally, *C. carpio* presented an important bodily maintenance in the face of a high concentration of ammonia. In general, it is concluded that in fact it is necessary a

specific study of the stress involved in the transport of each species of interest. The stability or instability of the environment of origin was not, here, a determining factor in the animals' tolerance to the transport stress. It was not possible to test species of stable marine environment, being generally animals of greater depths, and of difficult access.

Keywords: transport, stress, tolerance, ammonia, pH, carbonic anhydrase, fish farming, ornamental.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Variáveis fisiológicas em teleósteos, que podem sofrer alterações a partir de atividades estressantes, como o transporte. Em (A), observamos o modelo básico de representação das respostas fisiológicas de animais conformadores e reguladores. Utilizando como exemplo a alteração de salinidade, temos que animais conformadores não possuem a capacidade de manter o meio interno (LEC) constante à medida que o meio externo (o ambiente) sofre alterações. Assim, o meio interno varia à medida que o meio externo é alterado. Os animais reguladores possuem a capacidade de manter a homeostase do meio interno, independente das alterações ambientais. Em (B), as mudanças de temperatura e de pH em peixes são semelhantes, tanto em animais de ambientes estáveis quanto em animais de ambientes instáveis. Como estes animais não possuem ferramentas para regular para estas características, seguem tendências semelhantes a animais conformadores. Em (C) temos as respostas oxirreguladoras. Peixes regulam seu meio interno até um limite de disponibilidade de oxigênio. Após isso, com baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, passam a conformar. Por fim, em (D), peixes de ambientes estáveis não possuem capacidade de evitar a acumulação de amônia ( $\text{NH}_3$ ) na água, o que a partir de certo ponto passa a ser danoso ao organismo. Algumas espécies de peixes de ambientes instáveis, entretanto, possuem ferramentas para a síntese de uréia.....22

FIGURA 2: Espécies utilizadas nesta dissertação. Ostariophysii: *Rhamdia quelen* (A), *Cyprinus carpio* (B); Acanthopterygii: *Bathygobius soporator* (C) e *Sphoeroides greeleyi* (D).....27

FIGURA 3: Relação Peso x Comprimento em *Sphoeroides greeleyi* em 0, 6 e 24 horas. Círculos pretos indicam animais que sobreviveram ao transporte (n=18); círculos brancos indicam animais que morreram após o transporte (n=3, até 24 horas).....36

FIGURA 4: Valores de hidratação tecidual (%). Os teores hídricos das células dos indivíduos mantiveram-se numa faixa estável. Não houve diferenças significativas

entre tempos. Letras minúsculas representam diferenças entre espécies em um mesmo tempo. 6>n<9.....38

FIGURA 5: Glicemia medida nos indivíduos após a simulação de transporte. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre tempos de um mesmo grupo. Letras minúsculas indicam diferença significativas entre os grupos, em um mesmo tempo. 6>n<9.....39

FIGURA 6: Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) após a simulação de transporte individual. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tempos de uma espécie. Letras minúsculas indicam diferenças entre as espécies em um mesmo tempo. 6>n<9.....40

FIGURA 7: Amônia (NH<sub>3</sub>) encontrada na água após a simulação de transporte. Os valores de 0h representam o valor de amônia da água utilizada para o transporte, antes do início do experimento. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos em uma mesma espécie. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre espécies em um mesmo tempo. 6>n<9.....41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de OD (média + erro padrão), em mg/L, avaliados na água de transporte de *R. quelen* (n=6), *C. carpio* (n=6), *B. soporator* (n=7) e *S. greeleyi* (n=6, exceto em 24h, em que n=9). Controle= 0h. (\*) Indica diferença significativa nos valores iniciais e finais; Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos de uma mesma espécie; Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as espécies, em um mesmo tempo. (\*\*\*) Indicam a ausência de dados para o parâmetro para *S. greeleyi* em 72 horas, em que houve mortalidade total dos indivíduos, prejudicando a confiabilidade dos dados e inviabilizando a coleta das amostras.....42

TABELA 2: Valores de pH inicial e final (média + erro padrão), em mg/L, avaliados na água de transporte de *R. quelen* (n=6), *C. carpio* (n=6), *B. soporator* (n=7) e *S. greeleyi* (n=6, exceto em 24h, em que n=9). Controle= 0h. (\*) Indica diferença significativa entre os valores iniciais e finais; Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos em uma espécie; Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as espécies, em um mesmo tempo. (\*\*\*) Indicam a ausência de dados para o parâmetro para *S. greeleyi* em 72 horas, em que houve mortalidade total dos indivíduos, prejudicando a confiabilidade dos dados e inviabilizando a coleta das amostras.....43

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 PANORAMA DA PISCICULTURA.....	15
1.2 MANEJO COMO ATIVIDADE ESTRESSANTE .....	15
1.3 HOMEOSTASE E ALOSTASE.....	16
1.4 AGENTES ESTRESSORES.....	18
1.5 AMBIENTES ESTÁVEIS E INSTÁVEIS.....	20
1.6 BIOLOGIA E FILOGENIA DAS ESPÉCIES.....	22
1.6.1 <i>Rhamdia quelen</i> .....	24
1.6.2 <i>Cyprinus carpio</i> .....	25
1.6.3 <i>Bathygobius soporator</i> .....	25
1.6.4 <i>Sphoeroides greeleyi</i> .....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
2.3 HIPÓTESES.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 JUSTIFICATIVA PELA ESCOLHA DAS ESPÉCIES.....	30
3.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO.....	30
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	31
3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	32
3.5 ANÁLISES.....	33
3.5.1 TEOR HÍDRICO TECIDUAL.....	33
3.5.2 GLICEMIA.....	33
3.5.3 DOSAGEM ENZIMÁTICA: ANIDRASE CARBÔNICA.....	33
3.6 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA DE TRANSPORTE.....	34
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1 PESOS, COMPRIMENTOS E MORTALIDADE.....	36
4.2 TEOR HÍDRICO TECIDUAL.....	37
4.3 GLICEMIA.....	38

4.4 ANIDRASE CARBÔNICA.....	39
4.5 AMÔNIA, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E pH.....	40
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1 PANORAMA DA PISCICULTURA**

O ambiente aquático possibilita o desenvolvimento de diversas atividades econômicas. O Brasil possui grande potencial para a aquicultura (cultivo de espécies aquáticas), já que conta com clima favorável, disponibilidade hídrica e ocorrência de variadas espécies de interesse econômico (Brabo *et al.*, 2013). Esse interesse pode ser traduzido em necessidades para a demanda do mercado alimentício e para bens de recreação ou ornamentação. Grande parte dessas atividades requer a necessidade de transporte dos animais vivos, tais como engorda, aquariofilia ou destinação a repovoamento. O mercado ornamental brasileiro é muito produtivo, apesar de não haver estatísticas oficiais relacionadas a esse comércio. O Brasil exporta peixes ornamentais para diferentes países, sendo um dos principais fornecedores dos Estados Unidos, da Europa e do Japão. Outros mercados importantes na área ornamental são os orientais, representados por países como Filipinas, Vietnã e Sri Lanka (Wood, 2001).

Além do caráter ornamental, a aquicultura auxilia na produção de peixes para alimentação. Segundo a FAO, em 2009 o consumo global de produtos marinhos alcançou a marca de 143 milhões de toneladas. Somando esse aumento constante de consumo ao crescimento populacional mundial e à escassez no volume de pescados disponíveis nos mares, torna-se importante o investimento na aquicultura, visando suprir a demanda por este produto. O desenvolvimento da piscicultura como atividade sustentável necessita do aumento da produção atrelado à diminuição de despesas, a fim de se obter aumento no lucro (Baldiserotto, 2009), e para tal tornam-se imprescindíveis os esforços na otimização do transporte de peixes.

### **1.2 MANEJO COMO ATIVIDADE ESTRESSANTE**

O manejo e o transporte são atividades extremamente estressantes para os animais aquáticos. A exposição a agentes estressores resulta em perturbações fisiológicas, que por sua vez acarretam quebra da homeostase



(Barton & Iwama, 1991), muitas vezes gerando mortalidade. Visando a otimização na produção, busca-se melhorar nas condições do transporte de peixes (Baldisserotto, 2009).

As formas mais comuns de transporte das espécies são em sacolas plásticas (no caso de peixes ornamentais e alevinos para piscicultura, principalmente), ou em tanques (peixes para engorda ou aquários públicos) (Harmon, 2009). Para que a otimização no transporte ocorra de forma efetiva e plena para todas as espécies, é necessário levar em conta que cada animal tem suas peculiaridades, tendo em vista as variadas características biológicas e os mais diversos habitats onde os peixes podem ser encontrados.

Podemos dizer que uma atividade é estressante quando essa perturba a homeostase do animal. Homeostase, num sentido pleno, pode ser descrita como o equilíbrio dinâmico do meio interno (Wondelaar-Bonga, 1997). O meio interno, no caso dos organismos aquáticos, é composto pelo líquido intracelular (LIC) e pelo líquido extracelular (LEC), em que as células estão banhadas. O meio externo é o ambiente em que o animal está imerso. No caso dos peixes, o contato entre o meio externo e o meio interno pode ocorrer diretamente, pelas brânquias, um epitélio de troca (Hill, 2012; Willmer *et al.*, 2005).

### **1.3 HOMEOSTASE E ALOSTASE**

Os chamados agentes estressores ameaçam o equilíbrio dinâmico (homeostase) do organismo, levando a perturbações que provocam um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas, ações compensatórias, que levam o animal a superar os efeitos estressantes (Carmichael, 1984). As respostas fisiológicas ao estresse fazem com que o organismo priorize a manutenção de algumas funções em detrimento de outras, podendo representar um custo importante a outras funções, como imunocompetência, crescimento e reprodução (Barton & Iwama, 1991; Barton, 2002; Romero *et al.*, 2009).

Os teleósteos são animais reguladores para muitas características, ou seja, quando ocorre um desafio à estabilidade do organismo, mecanismos regulatórios são ativados para o retorno à condição homeostática. Os animais reguladores podem assim o ser para algumas características, como para

salinidade (osmoreguladores), porém, podem não o ser para outras, como temperatura, por exemplo.

Como contraponto à homeostase, foi proposto um modelo que integra o conceito de alostase (Sterling, 1988). Em um sentido pleno, a alostase é um processo em que o organismo busca atingir o equilíbrio em um outro estado, diferente do anterior. Segundo McEwen & Stellar (1993), alostase é “o processo do alcance da estabilidade através da mudança”. Ou seja, enquanto o conceito de homeostase retrata o funcionamento do organismo em uma condição basal, o conceito de alostase leva em conta alterações internas e externas. De acordo com a homeostase, o organismo visa o retorno ao estado inicial, enquanto na visão alostática, o organismo tende a adquirir certa flexibilidade no estado homeostático. A tendência é que o termo alostase ganhe mais força, podendo substituir o conceito de homeostase, justamente por demonstrar melhor a característica de equilíbrio dinâmico a qual os organismos estão dispostos (McEwen & Wingfield, 2010). Um exemplo aplicado na fisiologia voltada à ecologia (ecofisiologia): uma espécie de peixe vive em um ambiente estuarino em que o mar tem avançado nos últimos tempos, tornando a salinidade da região mais elevada. Continuamente essa espécie tem sofrido uma carga alostática, ou seja, perturbações que afetam a condição homeostática (o aumento na salinidade levando a um desequilíbrio osmótico). Quando ocorre essa perturbação ao equilíbrio do organismo, mecanismos de resposta ao estresse, geralmente hormonais e ligados ao metabolismo energético são ativados. O foco dessas respostas não é o retorno à condição inicial, e sim a adaptação ao novo nível (alostase) (Schreck, 2010). Quando a carga alostática sobrepõe-se à capacidade do organismo de responder aos estressores, uma condição fisiopatológica pode ocorrer. Nesse momento diz-se que está ocorrendo uma sobrecarga alostática, em que a demanda energética excede a capacidade do organismo (McEwen & Wingfield, 2003). A condição de sobrecarga alostática pode ser irreversível, levando o animal à morte.

As respostas fisiológicas de teleósteos ao estresse são divididas em respostas primária, secundária e terciária. A resposta primária envolve o aumento de produção e liberação de hormônios ligados ao metabolismo energético, como catecolaminas e cortisol, diretamente para a circulação dos

animais (Gamper & Boutilier, 1994; Iwama, 2006). A resposta secundária é uma extensão das ações hormonais de ativação de diferentes vias, levando à alteração na composição do sangue, efeitos bioquímicos diversos, como alterações de concentrações iônicas e ativação de proteínas de estresse (Vijayan *et al.*, 1994; Barton, 2002). Por fim, as respostas terciárias envolvem o animal como um todo, podendo influenciar gerações futuras (Iwama, 1998), com alterações no crescimento, resistência a doenças e capacidade metabólica ligada à sobrevivência (Haux *et al.*, 1985).

#### **1.4 AGENTES ESTRESSORES**

Dentre os principais desafios que os peixes enfrentam durante o transporte estão as variações de temperatura, acidificação da água (gerada por produtos do metabolismo do próprio peixe) (Paterson *et al.*, 2003), aumento da concentração de amônia e claro, diminuição na disponibilidade de oxigênio na água de transporte. A parte da amônia que oferece maior risco aos organismos, por ser mais tóxica, é a forma não-ionizada ( $\text{NH}_3$ ). Essa forma pode atravessar a membrana do epitélio branquial passivamente, graças a sua natureza lipofílica e ausência de carga (Benli *et al.*, 2008; Randall and Tsui, 2002). Quando a morte de um peixe é motivada por toxicidade por amônia, alguns sinais podem auxiliar o diagnóstico, como: redução de nado, aumento da respiração e aparecimento de lesões nas branquias (Benli, Köksal & Özkul 2008).

O risco de morte por hipóxia ou anóxia é o mais fácil de ser eliminado ou diminuído, através da adição de oxigênio puro à embalagem de transporte. Além disso, outras medidas podem ser adotadas: adição de tampão à água para evitar a acidificação por  $\text{CO}_2$ ; submissão dos indivíduos a jejum pré-transporte, minimizando o aumento de amônia proveniente do metabolismo; alteração da salinidade da água do transporte, minimizando assim o custo metabólico da osmorregulação (Sampaio, 2014). Porém, alterações relacionadas ao limite de tolerância ambiental podem ocasionar distúrbios osmorregulatórios, além de um aumento na concentração de ácido láctico (Steffens, 1989). Ocorre aumento de adrenalina como resposta metabólica do animal ao ambiente estressante, que irá mediar um aumento na permeabilidade das brânquias a íons e água, além de elevar as concentrações de lactato nos músculos. A alta concentração de lactato

irá aumentar a pressão osmótica intracelular, levando a uma troca de fluidos entre os compartimentos intracelular e extracelular, para restauração do equilíbrio osmótico (Milligan & Wood, 1986). Os níveis de lactato que entram no sangue são baixos quando comparados aos que ficam retidos nos músculos. Consequentemente, o gradiente transcelular osmótico causa um impacto no sangue, observado através de aumento no hematócrito (porcentagem de volume do sangue ocupada por hemácias) e proteínas plasmáticas (McDonald & Milligan, 1997).

A diminuição no pH do ambiente da água de transporte está diretamente ligada com a baixa capacidade de tamponamento dos teleósteos, por não apresentarem o tampão bicarbonato (Hill *et al.*, 2008) e com a geração de ácido pelo próprio metabolismo. Dessa forma, a queda do pH representa outro desafio importante para os peixes durante o transporte, muito difícil de ser contornado pelos piscicultores, principalmente pela possível ocorrência do Efeito Raiz e do Efeito Bohr. O Efeito Raiz é definido como a redução na capacidade de transporte de oxigênio pelas hemoglobinas do organismo. Já o Efeito Bohr difere-se do primeiro, sendo descrito como a redução na afinidade entre hemoglobina e oxigênio. Ambos efeitos ocorrem quando há queda no pH e aumento na concentração de CO<sub>2</sub> no organismo. Assim, mesmo que a oxigenação no ambiente esteja saturada, esta não irá se refletir em capacidade de absorção de O<sub>2</sub> pelo teleósteo (Pelster & Weber, 1991; Verde *et al.*, 2007; Shukla, 2009).

A relação da anidrase carbônica com o estresse de transporte pode ser explicada pelos efeitos Raiz e Bohr. Uma queda significativa de pH no sangue leva ao comprometimento da absorção de O<sub>2</sub> pelas brânquias. A AC é uma enzima que catalisa a conversão de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sup>+</sup> em CO<sub>2</sub>. Imagina-se, então que a diminuição de sua atividade no tecido branquial seja um mecanismo que eleva o aporte de O<sub>2</sub> nessas situações de baixa de pH (Rummer *et al.*, 2013).

A quantificação do cortisol plasmático é um meio de analisar a demanda energética do organismo durante a situação de estresse. O cortisol é um hormônio esteróide, e nos peixes é produzido pelas células cromafins e interrenais, localizadas no rim cefálico, em contato com as veias pós-cardinais (Gallo & Civinini, 2003). A elevação do cortisol no sangue é o indicador primário

de estresse mais amplamente utilizado em peixes. Geralmente, o cortisol plasmático eleva-se poucos minutos após a exposição ao estímulo agressor, com o retorno aos níveis basais levando até pouco mais de uma hora (Wendelaar Bonga, 1997). O cortisol liberado causa mobilização de reservas energéticas, mantendo suprimento de energia e homeostasia osmótica (George *et al.*, 2013), o que gera então a resposta secundária: estimulação da gliconeogênese e glicogenólise, para que o indivíduo possa lidar com o agente estressor (Iwama *et al.*, 2006). Logo, os níveis de glicose e glicogênio podem ser utilizados como marcadores de estresse em peixes (Sampaio & Freire, 2016). Porém, se houver a possibilidade de investimento em teste de cortisol o resultado pode ser mais confiável. Relações diretas entre aumento de cortisol e de glicemia em conjunto já foram encontradas em várias espécies de teleósteos, como em *Sphaeroides testudineus* (Cull, 2015).

## 1.5 AMBIENTES ESTÁVEIS E INSTÁVEIS

A adaptação de um animal a um ambiente está diretamente ligada à capacidade de manutenção do meio interno relativamente constante em face às variações das condições abióticas. Pode-se dizer então, que existe uma relação direta entre essas variações abióticas do ambiente e os mecanismos biológicos necessários para a sobrevivência do animal a esse ambiente. Assim, quanto mais instáveis são os ambientes, uma maior plasticidade e mecanismos mais diversos e aprimorados devem ser exibidos pelos animais habitantes (Hill, 2012; Willmer *et al.*, 2005).

Quanto aos ambientes das espécies estudadas neste trabalho, podemos dividi-los em quatro: córregos, rios perenes, poças de marés e águas costeiras/estuários. Os ambientes aquáticos considerados estáveis são aqueles que possuem pequenas variações de condições abióticas, como temperatura, salinidade e pH ao longo do espaço ou do tempo (Hill, 2012; Willmer *et al.*, 2005). Como exemplo, podemos citar os ambientes marinhos abaixo da linha de maré baixa e ambientes dulcícolas como rios e córregos. Peixes teleósteos de ambientes estáveis, em geral, em princípio possuem tolerância ambiental mais baixa. Algumas espécies, porém, ainda apresentam certa plasticidade

fisiológica, graças à ancestralidade recente em ambiente mais instável (Freire *et al.*, 2008). As espécies de ambientes estáveis utilizadas neste trabalho foram *R. quelen* e *C. carpio*.

Diferentemente da estabilidade dos mares e rios, áreas de estuário, marinhos de regiões de costões rochosos ou com formação de poças de marés possuem grande instabilidade de fatores abióticos atingindo as espécies habitantes. Nesses ambientes são encontradas as espécies denominadas “euri”, que possuem maior faixa de tolerância a mudanças ambientais, ou seja, maior plasticidade ambiental. Em contraponto à denominação “euri” diz-se que as espécies de regiões estáveis são “esteno”, com uma plasticidade ambiental diminuída (Willmer, *et al.*, 2005).

Os teleósteos são animais reguladores para salinidade, mas não o são para muitas outras características, tais como oxigênio, amônia e pH (Sampaio, 2014). Porém, espécies de ambientes instáveis conseguem tolerar mais, mesmo em respostas conformadoras. No caso da amônia, algumas espécies de ambientes estáveis possuem a capacidade de síntese da uréia, que funciona como um tipo de regulação para esse parâmetro (Hill, 2012). As espécies ditas de ambientes instáveis utilizadas neste projeto são *B. soporator* (de poça de marés) e *S. greeleyi* (estuarina).

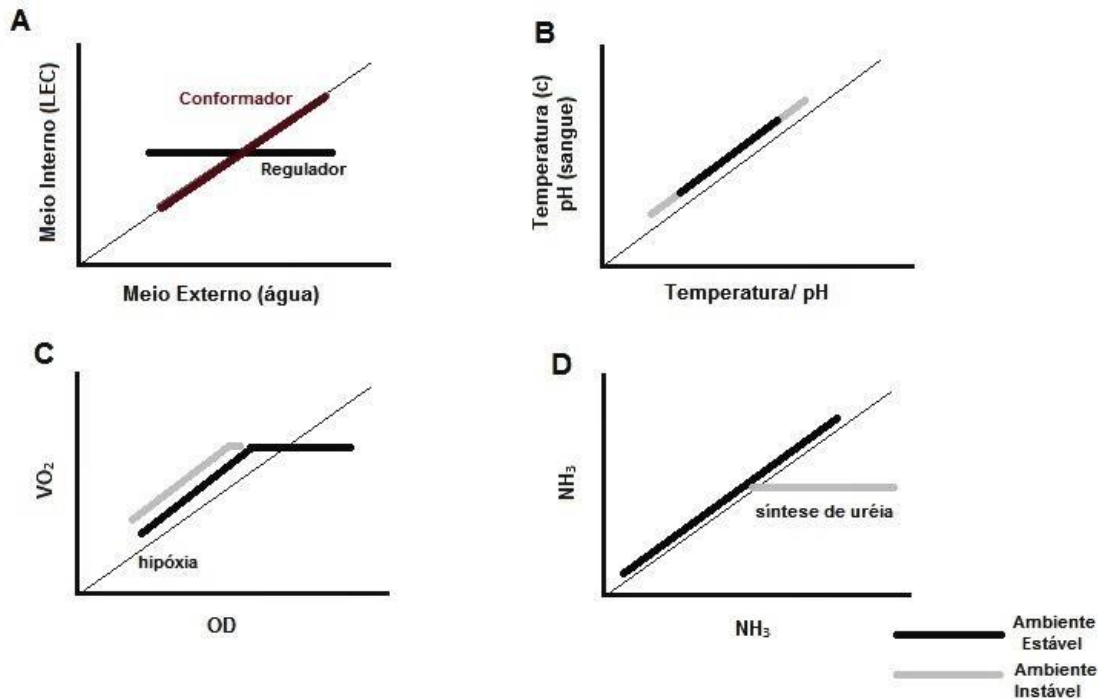


Figura 1. Variáveis fisiológicas em teleósteos, que podem sofrer alterações a partir de atividades estressantes, como o transporte. Em (A), observamos o modelo básico de representação das respostas fisiológicas de animais conformadores e reguladores. Utilizando como exemplo a alteração de salinidade, temos que animais conformadores não possuem a capacidade de manter o meio interno (LEC) constante à medida que o meio externo (o ambiente) sofre alterações. Assim, o meio interno varia à medida que o meio externo é alterado. Os animais reguladores possuem a capacidade de manter a homeostase do meio interno, independente das alterações ambientais. Em (B), as mudanças de temperatura e de pH em peixes são semelhantes, tanto em animais de ambientes estáveis quanto em animais de ambientes instáveis. Como estes animais não possuem ferramentas para regular para estas características, seguem tendências semelhantes a animais conformadores. Em (C) temos as respostas oxirreguladoras. Peixes regulam seu meio interno até um limite de disponibilidade de oxigênio. Após isso, com baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, passam a conformar. Por fim, em (D), peixes de ambientes estáveis não possuem capacidade de evitar a acumulação de amônia (NH<sub>3</sub>) na água, o que a partir de certo ponto passa a ser danoso ao organismo. Algumas espécies de peixes de ambientes instáveis, entretanto, possuem ferramentas para a síntese de uréia. Adaptado de: Sampaio, 2014.

## 1.6 BIOLOGIA E FILOGENIA DAS ESPÉCIES

A classe Actinopterygii abrange mais da metade de todas as espécies de vertebrados existentes. Os grupos pertencentes à classe Actinopterygii possuem uma grande variedade de formas, tamanhos, cores e tipos de sistemas

sensoriais, com espécies especializadas em quimiorrecepção, eletrorrecepção, dentre outras. Algumas espécies chegam a produzir luz ou eletricidade (Berra, 2001). Toda esta variedade e as peculiaridades possibilitaram aos membros desta classe habitarem diferentes regiões do planeta, até as mais inóspitas. A principal característica de Actinopterygii é a presença de nadadeiras chamadas lepidotríquias, isto é, nadadeiras em rede suportadas por raios anexadas a uma base óssea (Kardong, 2015).

Apesar da filogenia atual ser bem definida, existem diversas dificuldades na classificação basal do grupo, principalmente pela pobreza de dados fósseis, e pela disparidade no aumento de especiações durante o Devoniano (gerando muitos dados fósseis repetidos) (Friedman, 2015). Com o intuito de melhorar a qualidade de dados relacionados a grupos basais da classe, estudo recente tem levantado esforços no desenvolvimento de tecnologias de imageamento de alta qualidade, possibilitando reconstituições de fósseis mais antigos na história evolutiva de Actinopterygii (Friedman, 2015; Giles & Friedman, 2014).

O surgimento dos actinopterígeos ocorreu durante o Período Siluriano (há cerca de 420 milhões de anos), com uma explosão no número de espécies durante o Devoniano (Paleontology Database, 2017) A partir de então houve o início de um processo de irradiação, no qual os organismos se diversificam rapidamente, levando a várias especiações a partir de uma espécie ancestral. Este processo ocorre principalmente quando uma grande mudança ambiental possibilita a criação de novos nichos, com novos recursos e diferentes desafios ambientais, além de isolamento de grupos (Larsen, 2011; Schluter, 2000; Wilson, 1974). Este processo deu origem a um grupo chamado Neopterygii, que após outra radiação originou duas Infraclasses: Holostei (Neopterígeos primitivos) e Teleostei, entre os Períodos Permiano e Triássico (respectivamente há 275 e 310 milhões de anos, aproximadamente) (Near, 2012).

A infraclasse Teleostei abrange todos os peixes ósseos de nadadeiras raiadas (excetuando os representantes da Infraclasse Holostei), equivalendo a cerca de 96% de todos os peixes existentes. Mais de 32 mil espécies já foram descritas, habitando os mais diferentes ambientes aquáticos: desde mares e lagos até rios, estuários e mangues (Betancurt *et al.*, 2015). Processos naturais



como o tectonismo contribuíram para a irradiação adaptativa das espécies de Teleostei, principalmente durante o Jurássico Superior (há 163 milhões de anos) e o Mioceno (há 23 milhões de anos) (Sferco *et al.*, 2015; Albert *et al.*, 2006). Os teleósteos são divididos em duas superordens. A primeira delas, Ostariophysii, é um diverso grupo com mais de 8 mil espécies, sendo 68% habitantes de água dulcícola (Nelson, 2006). Duas espécies estudadas nesta dissertação pertencem a este grupo: *Rhamdia quelen* (Ordem Siluriformes) e *Cyprinus carpio* (Ordem Cypriniformes). A segunda superordem na qual os teleósteos são classificados é Acanthopterygii, a qual pertencem as outras duas espécies utilizadas neste projeto: *Bathygobius soporator* (Ordem Perciformes) e *Sphoeroides greeleyi* (Ordem Tetraodontiformes). Esta superordem está encaixada no clado Neoteleostei, que engloba grupos mais recentes de teleósteos, originados há aproximadamente 175 milhões de anos.

### **1.6.1 *Rhamdia quelen***

O jundiá (*Rhamdia quelen*, Siluriformes: Heptapteridae) é um bagre neotropical encontrado em pequenos córregos, lagos e rios (Garcia, 2009), habitando desde o centro da Argentina até o sul do México (Silfvergrip, 1996). Apesar de ser uma espécie pertencente a uma ordem bem estudada (principalmente na América Latina), ainda existem divergências quanto a sua filogenia. Essas divergências ocorrem por conflitos taxonômicos existentes devido à semelhança morfológica das espécies representantes da ordem Siluriformes (Perdices *et al.*, 2002). Dentre as características em comum da ordem destaca-se o corpo nu, envolto por uma espessa pele, sendo às vezes coberta por placas ósseas (Britski *et al.*, 1988). O gênero *Rhamdia* possui múltiplas linhagens evolutivas, tendo sofrido processos de diferenciação de espécies em diversas regiões do continente americano. Assim, o estudo do tempo de colonização e conseqüente taxa de dispersão do gênero torna-se uma opção instigante (Perdices *et al.* 2002). Existem atualmente 211 espécies descritas pertencentes à família Heptapteridae (Nelson, 2006). O jundiá pode ser considerado um peixe resistente quanto à variação de pH, suportando uma faixa

entre 4,0 e 8,5 (Marchioro, 1997). Além disso, é euritérmico, ou seja, suporta uma faixa relativamente alta de variação térmica: a partir de experimentos realizados por Chippari Gomes (1998), observou-se tolerância de *R. quelen* a uma faixa de 15 a 34°C.

### **1.6.2 *Cyprinus carpio***

Por ser uma das espécies mais difundidas em diversas regiões do planeta, a carpa comum, *Cyprinus carpio* (Cypriniformes: Cyprinidae) dificilmente é encontrada na sua forma selvagem. A distribuição desta espécie segue um padrão dúbio: nas regiões em que foi introduzida, é considerada invasiva (em regiões como América do Norte e Austrália). Porém, em suas áreas nativas (Ásia e leste da Europa), é tratada como vulnerável, correndo risco de extinção das linhagens selvagens pela perda de variabilidade genética após anos de pressões de seleção natural e artificial (Mondol *et al.*, 2006; Balon, 1995). Domesticada desde os tempos romanos, a carpa comum é encontrada em mais de 100 países ao redor do mundo (Balon, 1995).

Morfologicamente, as carpas apresentam uma rara diversidade de colorações, desde cinza até alaranjada, motivo pelo qual são visadas no mercado ornamental. Além disso, possuem diferentes formatos corpóreos (normalmente em forma de “torpedo”), proporções e desenvolvimento das nadadeiras (Spillman, 1961). Habitam regiões quentes e profundas de rios e lagos com grande vegetação. É uma espécie com maior atividade durante as manhãs e o crepúsculo (Scott & Crossman, 1973; Kottelat & Freyhof, 1972).

A história evolutiva de *C. carpio* é bem estruturada, havendo muitos dados disponíveis. Por ser uma espécie que há muito tempo sofre com intensa seleção artificial, muitos fenótipos resistentes a doenças e condições desfavoráveis surgiram (Hulata, 1995).

### **1.6.3 *Bathygobius soporator***

O *Bathygobius soporator* (Perciformes: Gobiidae) é um peixe marinho proveniente de regiões tropicais, com distribuição desde o leste do Atlântico

(Senegal e Angola), mares mediterrâneos, até a costa oeste do Atlântico (Estados Unidos, América Central e costa brasileira) (Floeter *et al.*, 2003; Harrison, 2003; Quignard & Tomasini, 2000). Conhecido popularmente no Brasil como amboré ou aiboré, possui grande tolerância osmótica (Darcy, 1980), podendo ser encontrado em águas marinhas e salobras, em estuários ou poças de marés (Miller, 1990).

A principal característica morfológica de *B. soporator* é a modificação da nadadeira ventral em ventosa, a qual possibilita ao peixe aderência ao substrato. Apesar de não possuir valor alimentício, é possível encontrar esta espécie no mercado ornamental ocasionalmente (IUCN Red List, 2017). O amboré não possui características migratórias, o que abre margem para estudos acerca da adaptação e resistência da espécie a ambientes diferentes do habitual.

#### **1.6.4 *Sphoeroides greeleyi***

A espécie *Sphoeroides greeleyi* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae), é um baiacu de águas marinhas e salobras. Muito comum no litoral brasileiro, é encontrado em regiões de baías junto à área de rebentação e estuários com águas de pouca profundidade (Figueiredo & Menezes, 2000). Apesar de ser reconhecidamente uma espécie de águas estuarinas, pode-se dizer que *S. greeleyi* habita regiões menos instáveis do que seu congênere *Sphoeroides testudineus*, sendo considerado, assim, menos eurihalino. Enquanto *S. testudineus* tem a capacidade de suportar águas mais diluídas, *S. greeleyi* se mantém limitado a regiões de maior salinidade (~30‰) (Prodocimo & Freire, 2001). A distribuição desta espécie é restrita à porção central das Américas, costa atlântica, numa faixa que abrange desde Honduras até o sul do Brasil (Floeter *et al.*, 2003). Habita águas rasas, normalmente permanecendo próximo aos substratos lodosos e arenosos (Schultz *et al.*, 2002). Pode ser encontrada em mercados ornamentais, porém em menor quantidade do que outras espécies da mesma família.

Os indivíduos desta espécie, assim como membros da família Tetraodontidae (baiacus) possuem a capacidade de inflar-se através da ingestão de ar ou água. Outra característica marcante de peixes desta família, que inclusive é encontrada em *S. greeleyi* (em quantidades menores), é a produção da substância neurotóxica tetrodotoxina (Bane *et al.*, 2014; Chau *et al.*, 2011; Lago, *et al.*, 2015). A tetrodotoxina age no sistema nervoso bloqueando os canais de sódio voltagem-dependente, inibindo o disparo de potenciais de ação (Bane *et al.*, 2014).



FIGURA 2. Espécies utilizadas nesta dissertação. Ostariophysi: *Rhamdia quelen* (A), *Cyprinus carpio* (B); Acanthopterygii: *Bathygobius soporator* (C) e *Sphoeroides greeleyi* (D). FOTOS: Enrico Ritcher (disponível em: [scotcat.com](http://scotcat.com)) (A); acervo pessoal (B); L. Holly Sweat (disponível em [sms.si.edu](http://sms.si.edu)) (C); Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (disponível em: [biogeodb.srti.si.edu](http://biogeodb.srti.si.edu)) (D).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo busca evidenciar a necessidade de conhecimento individual das espécies, baseando-se em como uma espécie animal tem suas características moldadas de acordo com o ambiente em que a mesma habita e a quanto tempo está adaptada a este ambiente. Assim, espera-se avaliar os mecanismos ativados e respostas envolvidas na manutenção da homeostase em peixes de interesse econômico (seja na piscicultura, seja para ornamento) e biológico, submetidos a estresse de transporte. Foi utilizado o método de transporte individual em sacos plásticos, o que ocorre principalmente no comércio de peixes para fins ornamentais. Escolheu-se esse método dada a necessidade de análise individual dos espécimes, para que fossem obtidos resultados mais concisos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a tolerância fisiológica das espécies *Rhamdia quelen* e *Cyprinus carpio* (dulcícolas), *Bathygobius soporator* (de poça de maré) e *Sphoeroides greeleyi* (estuarina);
- Avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas dos peixes citados, submetidos a diferentes tempos experimentais de simulação de transporte, analisando: a capacidade de manutenção do teor hídrico tecidual, atividade da enzima anidrase carbônica, taxa de excreção de amônia e características abióticas da água de transporte;
- Observar possíveis respostas secundárias bioquímicas ocasionados pelo estresse com o teste de glicemia;
- Relacionar a tolerância dos peixes ao transporte com seu ambiente natural.

## 2.3 HIPÓTESES

De acordo com o habitat das espécies utilizadas neste trabalho, foi levantada uma hipótese em relação ao grau de tolerância de cada animal ao estresse de transporte. Espera-se que ocorram diferentes tipos de respostas ao estresse do transporte, e que essas respostas ajudem a ser explicadas pelo tipo de ambiente que habitam.

A hipótese é de que as espécies de ambientes instáveis sejam mais resistentes, quando comparadas às espécies de ambientes estáveis. Ou seja, o primeiro grupo possuiria mais ferramentas fisiológicas para suportar o estresse de transporte quando comparado ao segundo grupo. Assim, espera-se que as espécies de regiões instáveis *B. soporator* e *S. greeleyi* sejam mais tolerantes ao estresse de transporte do que *R. quelen* e *C. carpio*, que habitam regiões estáveis. Espera-se ainda que *B. soporator* seja mais resistente do que *S. greeleyi*, por habitar região de poça de marés, considerada extremamente instável, com sua água apresentando variações diárias de salinidade, oxigênio dissolvido e temperatura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 JUSTIFICATIVA PELA ESCOLHA DAS ESPÉCIES

Duas características foram levadas em conta na hora de escolher as espécies deste estudo: facilidade de coleta e importância econômica, ornamental e biológica. Uma das espécies ornamentais mais utilizadas em todo o mundo, *C. carpio* é facilmente encontrada em lojas de piscicultura. Para efetuar uma boa base de comparação com a carpa, decidiu-se a utilização do bagre *R. quelen*, uma espécie muito utilizada na pesquisa, com informações sobre sua biologia e fisiologia disponíveis, mas poucas delas relacionadas ao transporte.

A obtenção das espécies marinhas é mais complicada: seu preço no mercado ornamental é elevado, então optou-se por espécies estuarinas, de coleta mais fácil, e que possuam algum interesse para fins comerciais. Assim, *B. soporator* e *S. greeleyi* foram escolhidas por estarem em famílias que possuem espécies próximas filogeneticamente com relevância no mercado ornamental, além da abundância delas no litoral brasileiro.

#### 3.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO

Os animais utilizados neste trabalho foram obtidos por dois meios diferentes. As espécies dulcícolas *Rhamdia quelen* e *Cyprinus carpio* foram compradas de piscicultor na loja de alevinos “Peixes e Peixes”, localizada no CEASA-PR (Centrais de Abastecimento do Paraná), na cidade de Curitiba-PR. Foram realizadas duas compras em diferentes meses, a primeira para a realização dos experimentos com *R. quelen*, e a segunda para os experimentos com as carpas. Os animais foram todos acomodados em um mesmo saco plástico contendo água fresca e oxigenação saturada. Em seguida ocorreu o transporte dos espécimes para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO), Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná. Os animais, então, foram acomodados em um aquário estoque com

aeração constante, filtro externo e alimentados em dias alternados com ração em flocos comercial durante sete dias, período de aclimação. As condições abióticas do aquário estoque foram controladas diariamente: pH~7,5, oxigênio dissolvido na água de aproximadamente 8,0 mg/L, temperatura aproximada de 25°C e fotoperíodo natural.

A coleta da espécie estuarina *Sphoeroides greeleyi* ocorreu no município de Pontal do Paraná-PR (25° 42' 12''S, 48° 28' 10''W). Para a pesca dos espécimes foi utilizada uma rede de arrasto manual de malha fina. Os organismos que não eram de interesse da coleta foram rapidamente devolvidos à água, e os baiacus eram acomodados em tambores com água proveniente do local de coleta e aeração constante por aeradores a pilha. Após a coleta, os espécimes de baiacu foram acomodados no aquário estoque com água salobra a 25‰, as outras condições abióticas e a manutenção do aquário ocorreram tais como expostas anteriormente. Assim como fora realizado com as outras espécies, a aclimação de *S. greeleyi* foi de sete dias, com alimentação de ração de flocos comercial em dias alternados e fotoperíodo natural.

Por fim, a última espécie coletada foi *Bathygobius soporator*, conhecida popularmente como amboré ou aiboré. A coleta ocorreu no município de Pontal do Sul-PR (25° 33' 32'' S, 48° 21' 41''W), em regiões de praia durante a baixa das marés. Algumas dificuldades surgiram na coleta do amboré, sendo necessária uma coleta extra e aclimação mais rápida (quatro dias). Para a obtenção destes peixes foi utilizada vara com micro anzol e covo. Filés de peixe (merluza) foram utilizados como isca.

### 3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em cinco grupos (amostras aleatórias, em jejum de 24 horas) para a execução do protocolo experimental. O grupo controle não apresentava desafio de estresse de transporte, com os indivíduos sendo processados imediatamente após retirada do aquário estoque. Os grupos experimentais representaram o transporte individual de espécimes pelos períodos de tempo de 6, 24, 48 e 72 horas. A escolha por estes tempos deu-se



a partir de experimentos anteriores realizados no próprio laboratório (Sampaio, 2014; Sampaio e Freire, 2016).

Individualmente, os animais foram embalados em sacos plásticos semelhantes aos utilizados em lojas de aquário. Foram adicionados 1L de água (salinidade de 0‰ para as espécies dulcícolas, 25‰ para as marinhas), sendo oxigenada até saturação (acima de 8,0 mg/L). Em seguida, estes sacos ficaram acomodados em caixas de isopor, para que não houvesse interferência de condições ambientais externas, como luz e temperatura. Sacos plásticos sem peixes também foram fechados com a mesma água utilizada nos experimentos e oxigenação saturada, servindo de controle para os parâmetros abióticos, para cada tempo experimental. O protocolo experimental foi repetido entre as quatro espécies, com o seguinte número de indivíduos: 24 de *R. quelen* (n=6); 24 de *C. carpio* (n=6); 21 de *S. greeleyi* (6<n>9); 27 de *B. soporator* (6<n>7); n total de 96 indivíduos, além de 20 sacos plásticos vazios para o controle (branco).

Após o período experimental ocorreu o processamento das amostras.

### **3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS**

Imediatamente após a abertura do saco plástico uma amostra da água era retirada para a análise dos parâmetros abióticos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia). Cada peixe foi retirado do saco e mergulhado em água com benzocaína, um éster utilizado como anestésico (60 mg/L de água) durante aproximadamente um minuto, até o animal deixar de apresentar movimentos natatórios. Os peixes foram pesados (peso total) e medidos (comprimento total). Em seguida ocorria a eutanásia via secção medular, e o sangue obtido através deste corte foi utilizado para o teste de glicemia. Por fim, foram retiradas amostras das brânquias e um fragmento de tecido muscular. Estas amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf e congelados em ultrafreezer a -80°C, mantidos assim até a utilização nos ensaios de teor hídrico muscular e anidrase carbônica.

Este procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), processo de número 23075.153822/2017-71.

O processamento de cada amostra durou cerca de oito minutos. Tempo este que já fora planejado, sendo que os animais eram colocados nos sacos para o experimento em intervalos de dez minutos entre eles.

### **3.5 ANÁLISES**

#### **3.5.1 TEOR HÍDRICO TECIDUAL**

Para o ensaio de hidratação muscular (teor hídrico tecidual- TH) foram utilizadas as amostras de músculo dos animais. As amostras foram descongeladas e pesadas em tubos eppendorf em balança analítica (Bioprecisa FA2104 N, Brasil). Descontando o peso do tubo, tem-se o peso úmido do fragmento de músculo. Em seguida, esta amostra é transferida para estufa (BIOPAR S22ST) a 60°C por 24 horas. Após o tempo na estufa, a amostra é pesada novamente, e após descontar-se o peso do tubo, é obtido o peso seco. A porcentagem de água no tecido é obtida após o cálculo da seguinte fórmula:  $TH (\%) = [(peso\ úmido - peso\ seco) / peso\ úmido] \times 100$ .

#### **3.5.2 GLICEMIA**

A medida da glicemia foi realizada ao retirar uma gota de sangue do animal no momento em que este foi eutanasiado, via coração ou veia caudal. A gota de sangue foi depositada em uma tira para leitura, inserida em um aparelho comercial para medir glicemia (AccuChek®- Roche, modelo Performa Nano). O resultado é representado em mg/dL.

#### **3.5.3 DOSAGEM ENZIMÁTICA: ANIDRASE CARBÔNICA**

As amostras de brânquias foram descongeladas antes dos ensaios de quantificação da proteína anidrase carbônica, pesadas, e homogeneizadas com tampão fosfato 10mM, pH 7,4. Em seguida, este homogeneizado foi centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos em temperatura controlada, para a precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi separado em duas alíquotas: a primeira

para utilização na análise da concentração de proteínas totais, e a segunda para a quantificação da atividade da enzima anidrase carbônica.

O ensaio da atividade da enzima anidrase carbônica branquial foi realizado a partir de protocolo descrito por Vitale (1999). A partir deste método é possível quantificar a atividade desta enzima pela reação com uma solução contendo manitol (225mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10mM). Para a realização deste método é necessária a adição do sobrenadante das amostras de brânquia e água destilada saturada com CO<sub>2</sub> ao meio de reação citado anteriormente. Imediatamente após esta adição, o pH inicial de 7,4 começa a cair. Os valores do pH, à medida que este vai diminuindo, são anotados a cada quatro segundos, num período total de 20 segundos (pHmetro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW®). Durante esta reação a temperatura é mantida abaixo de 4°C. Os valores obtidos dão origem a uma reta de regressão linear (relação pH x tempo), que determina a taxa da reação enzimática catalisada (TC). A partir da realização do “branco” (mesmo procedimento, utilizando apenas o tampão, sem o homogeneizado), em quatro réplicas ao longo do ensaio, podese determinar a taxa da reação não catalisada (TNC).

Ao final do ensaio, para a determinação da atividade da anidrase carbônica (AAC), foi realizado um cálculo a partir da seguinte fórmula:  $AAC = [TC / (TNC - 1)] / \text{mg de proteína total}$ , onde TC é a taxa da reação catalisada e TNC corresponde à taxa de reação não catalisada.

Para determinação das proteínas totais no sobrenadante foi utilizado o método de Bradford (1976), a partir da alíquota de homogeneizado de brânquias. As amostras foram realizadas em triplicatas (5µm por amostra), em uma microplaca, a partir de uma curva padrão de BSA (soro de albumina bovina). Foi utilizado o reagente BioRadProteinAssay da Bio-RadLaboratories®. As amostras foram lidas em 595nm de absorbância (ELISA SUNRISE TECAN DEUTSCHLAND GMBH), com o resultado expresso em mg/mL<sup>-1</sup>.

### **3.6 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA DE TRANSPORTE**

A partir das amostras de água foi efetuada a análise dos seguintes parâmetros abióticos: temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD) e amônia

( $\text{NH}_3$ ). O pH foi medido em um pHmetro de bancada (inoLAB pH Level 1 da WTW®).

A quantificação da amônia ( $\text{N-NH}_3$ ) da água ocorreu através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro- Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), utilizando o kit comercial AlphaKit®.

### **3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Para as análises estatísticas dos dados gerados foi utilizado o programa SigmaPlot® versão 11.0. Foram realizados testes de variância de uma via (OneWay ANOVA) para tempos dentro de uma espécie e teste de Holm-Sidak ou Tukey para amostras não homogêneas, para comparações entre as espécies. Além destes, foi utilizado o teste t de student, e correlação de Pearson.

## 4.RESULTADOS

### 4.1 PESOS, COMPRIMENTOS E MORTALIDADE

As médias de peso e comprimento em cada espécie foram, respectivamente: 1,66g/ 5,99cm (*R. quelen*); 4,79g/ 6,99cm (*C. carpio*); 11,35g/ 9,34cm (*B. saporator*) e 13,38g/ 8,8796cm (*S. greeleyi*). Foi verificada mortalidade em todos os indivíduos da espécie *Sphoeroides greeleyi* no tempo de 72h, além de outros três animais do grupo 24h. A média de peso dos animais mortos no tempo de 24h foi de 24,04g, e a média de comprimento, 10,93cm. Não houve mortalidade nas outras espécies estudadas.

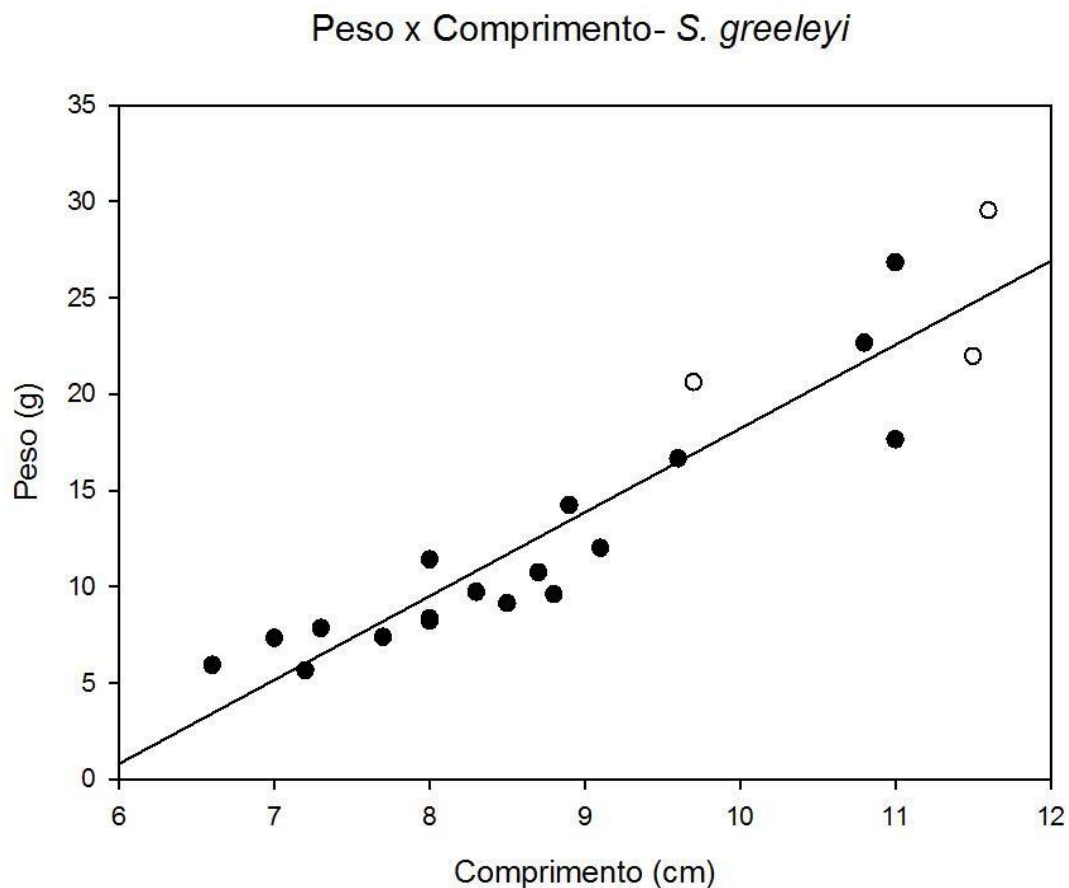


FIGURA 3. Relação Peso x Comprimento em *Sphoeroides greeleyi* em 0, 6 e 24 horas. Círculos pretos indicam animais que sobreviveram ao transporte (n=18); círculos brancos indicam animais que morreram após o transporte (n=3, até 24 horas).

Após análise da relação peso x comprimento em *S. greeleyi*, pode-se afirmar que os animais maiores são mais suscetíveis a não suportarem o transporte de 24 horas. Os espécimes com comprimento acima de 10 centímetros apenas sobreviveram em tempos curtos, até 6 horas. Em 24 horas houve a morte de três espécimes, todos possuíam mais de 10 centímetros. A partir de 72 horas nenhum espécime conseguiu sobreviver, independente de seu tamanho, portanto não foi observada relação entre o tamanho do indivíduo e a mortalidade nesse tempo.

#### **4.2 TEOR HÍDRICO TECIDUAL**

Os valores de hidratação tecidual mantiveram-se semelhantes, sem diferença estatística entre os grupos nas espécies analisadas (Figura 5). As diferenças significativas observadas foram entre as espécies dulcícolas e marinhas em tempos de 0 e/ou 72 horas. Entre *R. quelen* e *C. carpio* não houve diferenças em quaisquer tempos, o mesmo foi observado entre *B. soporator* e *S. greeleyi*. Porém, pode-se observar uma tendência de queda na manutenção do teor hídrico em espécies dulcícolas no tempo de 24 horas, com um reestabelecimento de uma condição mais próxima do ideal (controle) em 72 horas. Nas espécies marinhas, houve aumento da hidratação muscular em 6 horas, com redução gradativa, mas não significativa em tempos posteriores.

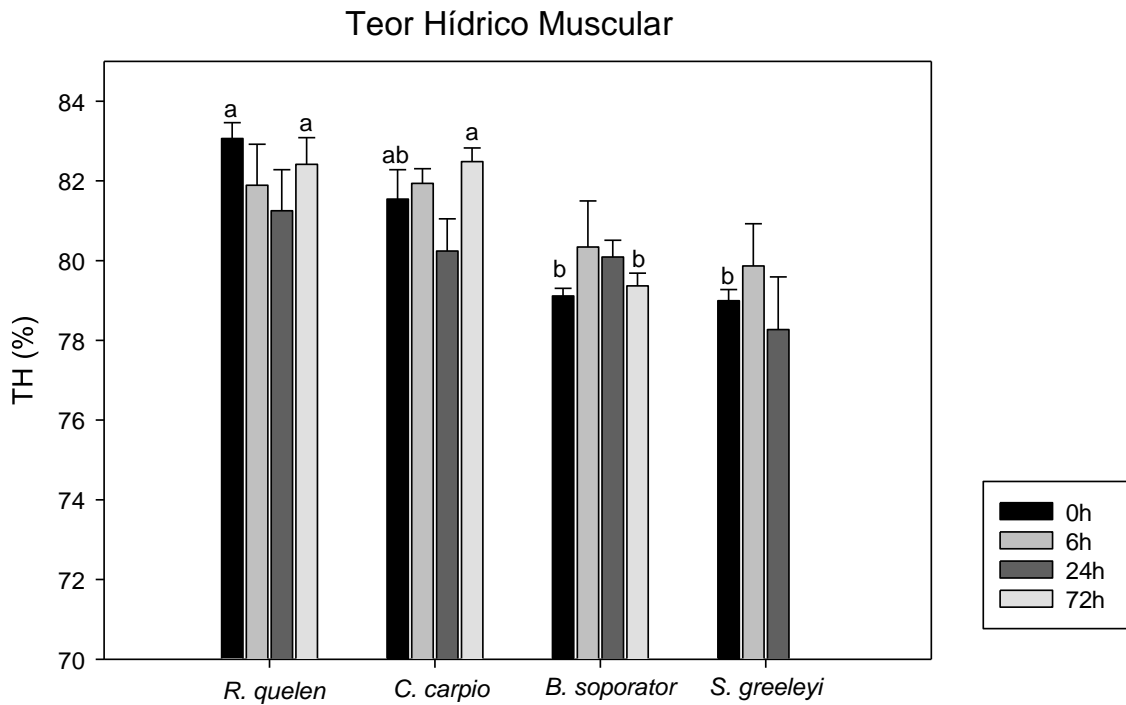


FIGURA 4: Valores de hidratação tecidual (%). Os teores hídricos das células dos indivíduos mantiveram-se numa faixa estável. Não houve diferenças significativas entre tempos. Letras minúsculas representam diferenças entre espécies em um mesmo tempo.  $n < 9$

### 4.3 GLICEMIA

Os valores de glicemia variaram muito entre espécies e até mesmo entre os indivíduos. Em *R. quelen*, os valores médios de glicemia variaram entre 14 e 39mg/dL. Em *C. carpio*, as médias por tempo mantiveram-se entre 42 e 61mg/dL. Em *S. greeleyi* houve uma tendência de aumento ao decorrer do tempo, não podendo ser confirmada em 72 horas. Porém, em *B. soporator* as diferenças foram significativas, de 72 horas para os outros tempos, o que pode levar a crer que essa espécie ativou mecanismos ligados ao metabolismo de glicose para manter a homeostase.

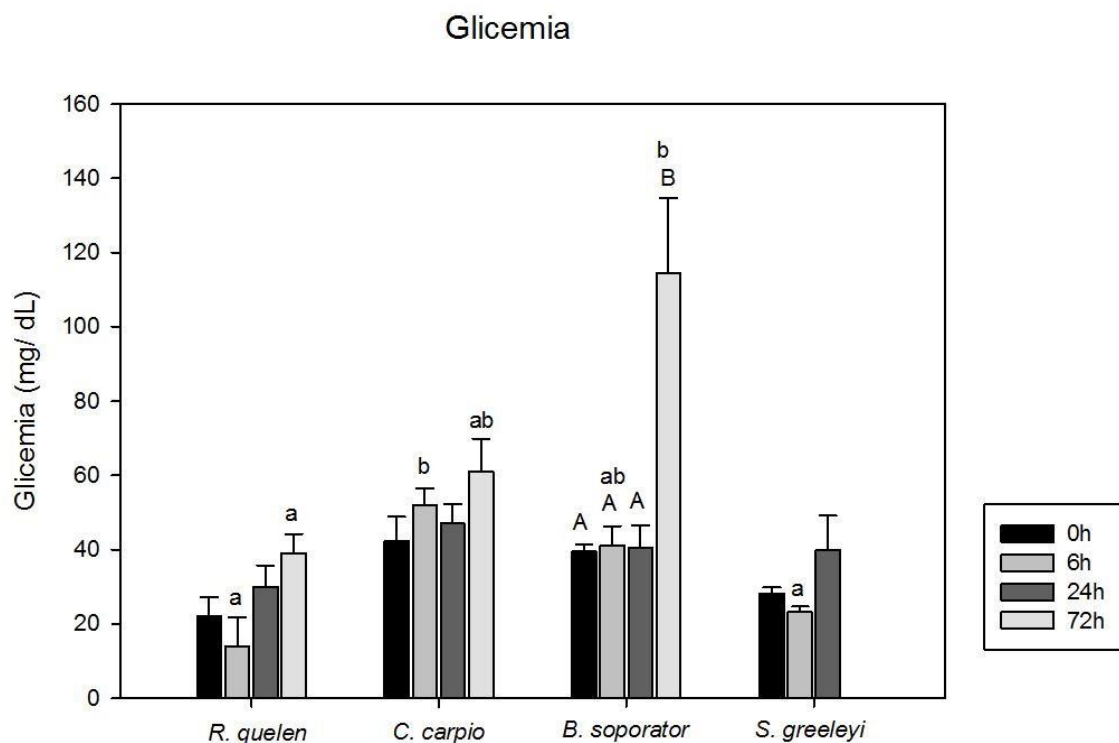


FIGURA 5: Glicemia medida nos indivíduos após a simulação de transporte. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre tempos de um mesmo grupo. Letras minúsculas indicam diferença significativas entre os grupos, em um mesmo tempo.  $6 > n < 9$

#### 4.4 ANIDRASE CARBÔNICA

A atividade de AC não sofreu alterações significativas em *R. quelen*, nem em *C. carpio*, apesar do aumento no tempo de 6 horas. Porém, quando comparadas entre si, a atividade da AC em *C. carpio* foi muito maior, com diferenças significativas em todos os tempos. Nas espécies marinhas a quantidade de proteína ativa diminuiu significativamente no último tempo testado (no caso de *B. saporator*, em 72 horas, e no caso de *S. greeleyi*, em 24 horas).



### Atividade da Anidrase Carbônica

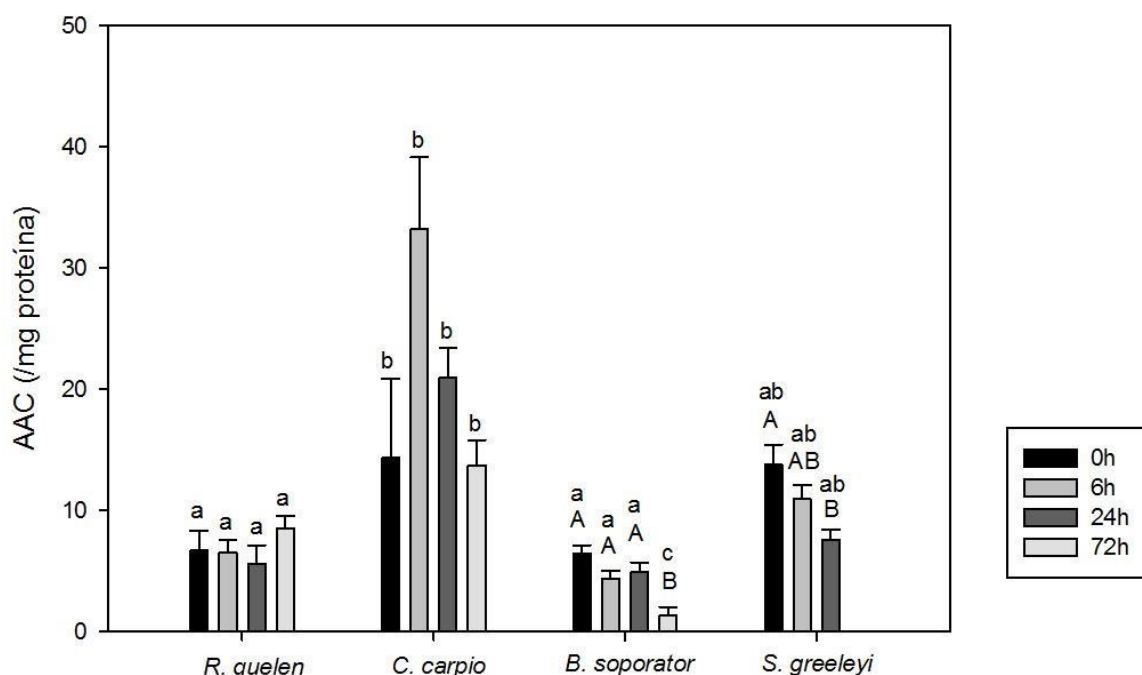


FIGURA 6: Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) após a simulação de transporte individual. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tempos de uma espécie. Letras minúsculas indicam diferenças entre as espécies em um mesmo tempo.  $6 > n < 9$

#### 4.5 AMÔNIA, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E pH

Os parâmetros físicos e químicos da água foram medidos após a simulação de transporte, exceto em *S. greeleyi* (72h), em que a água não apresentava condições confiáveis para retirada de amostra.

Foram efetuados o teste de amônia total ( $\text{NH}_3$ ), pH e verificado o total de oxigênio dissolvido (OD) na água da embalagem de cada animal.

Os valores de amônia variaram entre: 0,0546 e 0,7423 mg/L em *R. quelen*; 0,2063 e 2,3889 mg/L em *C. carpio*; 0,3096 e 0,7871 mg/L em *B. saporator*, e 0,2452 e 1,2917 mg/L em *S. greeleyi*.

A concentração de amônia na água de transporte após a simulação teve tendência de aumento em todas as espécies. Em *R. quelen*, este aumento não foi significativo entre os tempos experimentais, apenas de 0 para 24 e 72 horas, o que já era esperado. A quantidade de amônia encontrada na água dos indivíduos de *B. saporator* foi baixa, e em *S. greeleyi* apresentou um aumento

abrupto em 24 horas, significativo em relação ao controle mas ainda não significativo em relação a 6 horas, porém, imagina-se que essa tendência se manteria em 72 horas, fato que pode estar ligado à mortalidade neste tempo. A amônia produzida pelos indivíduos de *C. carpio* foi a maior em quantidade, quando analisada uma relação tamanho x amônia.

Os valores de OD (Tabela 1) apresentaram tendência de queda em todas as espécies nos tempos 6h, 24h e 72h, exceto em *R. quelen*, que em 72h apresentou um aumento não significativo (de 7,61 para 9,14 mg/L).

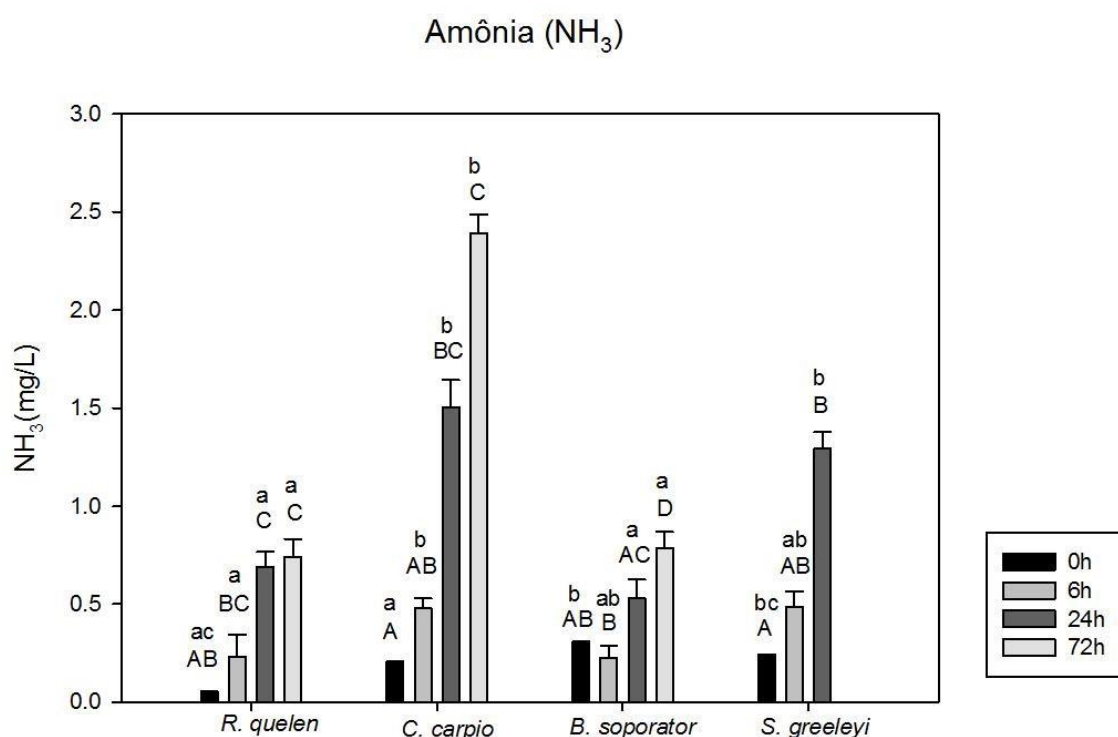


FIGURA 7: Amônia (NH<sub>3</sub>) encontrada na água após a simulação de transporte. Os valores de 0h representam o valor de amônia da água utilizada para o transporte, antes do início do experimento. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos em uma mesma espécie. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre espécies em um mesmo tempo. 6>n<9

Quanto ao oxigênio dissolvido (OD), os valores que mais chamam a atenção são em *C. carpio* e *B. soporator*, apesar de não chegarem a representar quadros de hipóxia.

O pH apresentou queda ao passar do tempo em todas as espécies. Quanto a *S. greeleyi*, não se observou uma queda relevante no OD que pudesse caracterizar hipóxia nos casos dos animais mortos. Porém, a queda significativa no pH aliado a um aumento na excreção de amônia nesta espécie, podem ajudar a explicar a mortalidade.

<b>A</b>	Tempos	OD Inicial	OD Final
<i>R. quelen</i>	Controle	6,26	6,26 ± 0,00 ac A
	6 horas	8,16	8,98 ± 0,30 B *
	24 horas	8,79	8,75 ± 0,48 a C
	72 horas	7,61	9,14 ± 0,18 a BC *
<b>B</b>			
<i>C. carpio</i>	Controle	5,59	5,59 ± 0,00 b A
	6 horas	9,87	8,39 ± 0,32 B *
	24 horas	8,79	8,64 ± 0,27 a B
	72 horas	7,4	6,87 ± 0,26 b AB
<b>C</b>			
<i>B. saporator</i>	Controle	6,08	6,08 ± 0,00 bc AB
	6 horas	8,66	7,84 ± 0,61 B *
	24 horas	9,27	6,25 ± 0,27 b AB *
	72 horas	6,58	5,24 ± 0,15 c A *
<b>D</b>			
<i>S. greeleyi</i>	Controle	6,45	6,45 ± 0,00 a A
	6 horas	7,8	7,46 ± 0,19 B
	24 horas	7,73	7,01 ± 0,29 c AB *
	72 horas	***	***

TABELA 1: Valores de OD (média + erro padrão), em mg/L, avaliados na água de transporte de *R. quelen* (n=6), *C. carpio* (n=6), *B. saporator* (n=7) e *S. greeleyi* (n=6, exceto em 24h, em que n=9). Controle= 0h. (\*) Indica diferença significativa nos valores iniciais e finais; Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos de uma mesma espécie; Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as espécies, em um mesmo tempo. (\*\*\*) Indicam a ausência de dados para o parâmetro para *S. greeleyi* em 72 horas, em que houve mortalidade total dos indivíduos, prejudicando a confiabilidade dos dados e inviabilizando a coleta das amostras.

<b>A</b>	Tempos	pH Inicial	pH Final
<i>R. quelen</i>	Controle	7,0	7,29 ± 0,00 ab A *
	6 horas	7,01	6,95 ± 0,03 a AB
	24 horas	7,09	6,70 ± 0,03 ab B *
	72 horas	6,95	6,69 ± 0,07 ab B *
<b>B</b>			
<i>C. carpio</i>	Controle	7,0	7,0 ± 0,00 c A
	6 horas	7,8	7,01 ± 0,06 ab AB *
	24 horas	6,87	6,20 ± 0,025 c C *
	72 horas	6,65	6,36 ± 0,10 a BC
<b>C</b>			
<i>B. saporator</i>	Controle	7,36	7,36 ± 0,00 a AB
	6 horas	8,04	7,59 ± 0,15 b A *
	24 horas	8,09	7,10 ± 0,04 a BC *
	72 horas	7,86	7,04 ± 0,06 b C *
<b>D</b>			
<i>S. greeleyi</i>	Controle	7,22	7,22 ± 0,00 bc A
	6 horas	7,0	6,85 ± 0,11 a AB
	24 horas	6,95	6,52 ± 0,07 bc B *
	72 horas	***	***

TABELA 2: Valores de pH inicial e final (média + erro padrão), em mg/L, avaliados na água de transporte de *R. quelen* (n=6), *C. carpio* (n=6), *B. saporator* (n=7) e *S. greeleyi* (n=6, exceto em 24h, em que n=9). Controle= 0h. (\*) Indica diferença significativa entre os valores iniciais e finais; Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos em uma espécie; Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as espécies, em um mesmo tempo. (\*\*\*) Indicam a ausência de dados para o parâmetro para *S. greeleyi* em 72 horas, em que houve mortalidade total dos indivíduos, prejudicando a confiabilidade dos dados e inviabilizando a coleta das amostras.

Foram encontradas correlações entre pH e amônia em todas as espécies: aumento na concentração da amônia levando à queda do pH. Além disso, outra relação observada foi entre pH e AAC nas espécies *B. saporator* e *S. greeleyi*, mostrando que a queda no pH nestes casos levou à diminuição na AAC.

## 5.DISCUSSÃO

### ***Rhamdia quelen***

Diferentemente do que fora hipotetizado, a espécie *R. quelen* foi a que menos sofreu com o estresse de transporte. Nenhum dos mecanismos regulatórios identificáveis pelos métodos utilizados neste trabalho parecem ter sido ativados. O aumento da quantidade de amônia na água de transporte é esperado, sendo originado naturalmente pelo metabolismo do animal. Apesar de significativo, este aumento não deve ter apresentado qualquer tipo de desafio à homeostase da espécie. Não houve risco de hipóxia para os indivíduos de *R. quelen*, e a AAC manteve-se regular em todos os tempos. A baixa variação na glicemia dos indivíduos leva a crer que não ocorreu nenhuma perturbação que demandasse de aumento no metabolismo energético. Ao analisar todos estes dados, chega-se à conclusão de que *R. quelen* apresenta boa capacidade de sobrevivência quando submetida a transporte tanto em curtas quanto em longas distâncias. Alguns trabalhos apontam a ocorrência de espécimes do gênero e até mesmo de *Rhamdia quelen* em ambientes de água salobra (Vargas & Bessonart, 2007; Milani & Fontoura, 2007; Souza-Bastos & Freire, 2009), ressaltando sua grande plasticidade ambiental, mesmo pertencendo a um grupo considerado estritamente dulcícola. A espécie lida bem com situações de estresse em ambiente estável, como é o caso do estresse de transporte. Quando ocorre a saturação de oxigênio no saco de transporte não há risco de hipóxia mesmo em transportes mais longos, o que faz de *R. quelen* uma boa espécie para ser transportada, apesar da ausência do interesse ornamental. Porém, parece ser uma ótima opção para uso científico.

### ***Cyprinus carpio***

Assim como ocorreu com *R. quelen*, não houve risco de hipóxia para *C. carpio*, com os valores mantendo-se sem qualquer variação significativa. Com a queda do pH em 72 horas, provavelmente decorrente do aumento na quantidade de amônia (uma correlação positiva foi encontrada), ocorre a

elevação da quantidade de amônia ionizada ( $\text{NH}_4$ ), menos tóxica para os peixes (Benli *et al.*, 2008; Randall and Tsui, 2002; Weihrauch *et al.*, 2009; Wilkie, 1997, 2002; Wright and Wood, 2009). Mesmo sendo menos tóxica do que a forma ionizada, esse ambiente torna-se altamente nocivo à homeostase dos animais, tendo em vista a possibilidade da ocorrência dos efeitos Bohr e Raiz. No entanto, a alta concentração de amônia no ambiente não parece ter causado qualquer tipo de perturbação mais grave para os indivíduos, tendo em vista que não houve variação no teor hídrico e nem mortalidade. Imagina-se que assim como ocorre com o peixe dourado, outro ciprinídeo (Sinha *et al.*, 2012), as carpas possuam um mecanismo de defesa contra o aumento da toxicidade causada pela amônia durante exposição por longos períodos, envolvendo respostas compensatórias bioquímicas e iônicas, melhorando a capacidade de excreção de amônia pelo indivíduo. Em experimentos com peixes dourados e com a própria carpa comum, foi observado que a taxa de excreção de amônia nesses organismos foi aumentada em animais alimentados, quando comparados com animais em jejum (Sinha, *et al.*, 2012; Diricx *et al.*, 2013). Este dado se contrapõe ao que é comumente empregado no transporte de peixes (e o que foi realizado neste estudo), em que busca-se efetuar o jejum dos indivíduos, diminuindo assim a taxa de excreção de amônia e conseqüentemente levando à diminuição da toxicidade ambiental (Harmon, 2009; Sampaio & Freire, 2016). Supõem-se que a eliminação da amônia pelas carpas pode ocorrer diretamente por trocas com  $\text{Na}^+$  (Wright, *et al.*, 1995). Neste caso, o aumento de amônia na água pode não refletir uma elevação da mesma no meio interno, nem toxicidade ao indivíduo. Vale ressaltar que a partir do tempo de 24 horas a concentração de amônia encontrada na água (132~221  $\mu\text{mol/L}$ , convertido de  $\text{mg/L}$ ) foi muito maior do que as utilizadas normalmente em experimentos de toxicidade (58,8  $\mu\text{mol/L}$ , em média) (Sinha *et al.*, 2012; Diricx *et al.*, 2013). Outros estudos sugerem o envolvimento de proteínas chaperonas, como as da família de Hsps (heat shock proteins) na proteção contra a toxicidade ocasionada pela amônia, com um aumento na síntese de Hsp70 em situações de estresse (Sung, *et al.*, 2012; Poltronieri, *et al.*, 2009). Pode-se concluir então que as carpas possuem tolerância a níveis acima dos considerados sub-letais de  $1\text{mg/L}$  (Diricx *et al.*, 2013), analisando os grupos de 24 e 72 horas, onde a concentração de amônia

ambiental esteve entre 1,5 e 2,5 mg/L. A ativação de respostas metabólicas contra a perturbação não foi muito custosa ao organismo, tendo em vista que não houve variações significativas na mobilização de glicemia e nem no consumo de OD. Outras variáveis relacionadas ao estresse de transporte, como deficit de OD e queda do pH não foram prejudiciais. Estes resultados vão de encontro com outro experimento realizado com transporte de carpas (Dobsikova, *et al.*, 2006).

### ***Bathygobius soporator***

O transporte proporcionou um desafio à homeostase das espécies de ambientes instáveis maior do que era esperado. Em *B. soporator* a queda de OD foi um fator limitante e prejudicial, com alterações significativas em todos os tempos, sendo mais incisivo em 72 horas. Foi observada uma queda a partir de 24 horas, seguida pelo aumento da concentração de amônia durante o mesmo período, indicando alta atividade metabólica. Após a realização de uma correlação de Pearson, ficou evidente que os valores de AAC de 6 a 24 horas tendem a cair junto com a concentração de OD. Essa relação mostra a importância da anidrase carbônica no controle da respiração em situações adversas, além do já conhecido papel na manutenção do equilíbrio ácido-base (Gilmour & Perry, 2009). É provável o envolvimento do Efeito Raiz e/ou do Efeito Bohr nesta espécie, a partir da queda do pH no ambiente, provavelmente afetando também os indivíduos. Essa queda no pH levou o organismo dos animais a exercer respostas compensatórias, como a diminuição da AAC, e ativar mecanismos energéticos, explicando o pico de glicemia em 72 horas. A importância da diminuição na AAC, como dito anteriormente, é facilitar o aporte de oxigênio ao diminuir a geração de CO<sub>2</sub> resultante da atividade da enzima. A partir de 72 horas, período de maior baixa na disponibilidade de oxigênio, a AAC chega próximo a zero, caracterizando um desequilíbrio na capacidade respiratória e de manutenção do pH interno.

Não existem muitas pesquisas de estresse relacionando *B. soporator*, muito menos de transporte com essa espécie, sendo a maior parte dos estudos relacionada a levantamento de ictiofauna, filogenética e resistência a altas

temperaturas (Vinagre et al., 2015; Freitas & Velastin, 2010; Lima et al., 2005; Andem et al., 2016; Brito & Miller, 2001; Macieira & Joyeux, 2011; Fanta, 1997; Rummer et al., 2009).

A elevada glicemia no organismo dos peixes é um clássico sinal de ativação de mecanismos energéticos, provocado pelo aumento da liberação de cortisol no plasma em resposta ao estresse. Um aumento significativo de amônia no ambiente é uma evidência a mais da elevada taxa metabólica da espécie, e que mobilização de reservas energéticas de fato foram necessárias, principalmente em 72 horas. A mobilização de reservas energéticas favorece a ativação de mecanismos compensatórios para lidar com um quadro de estresse acentuado, protegendo assim o meio interno.

Após a análise dos dados obtidos pelos experimentos com *B. soporator*, chega-se à conclusão de que a espécie em questão não é recomendada para utilização ornamental, tendo em vista a história evolutiva recente, de adaptação a ambientes extremamente instáveis (Rummer, et al., 2009). Imagina-se que peixes de região de poças de marés possuam mecanismos para lidar com casos de hipóxia durante períodos curtos e flutuantes de tempo, como funções circadianas (Fanta, 1997). Fato este que leva a crer que em casos de estresse contínuo, sem flutuações, sejam menos efetivos e necessitem de maior mobilização energética. Normalmente ambientes como aquários não possuem a instabilidade circadiana pela qual estes peixes estão adaptados. Porém, caso o transporte seja necessário, é preferível evitar que este seja próximo a 72 horas, quando as condições abióticas começam a oferecer um desafio mais sério para a homeostase de *B. soporator*.

Quando comparada a outra espécie que habita uma região próxima, também de poças de marés, *Abdefduf saxatilis*, percebemos diferenças nos padrões de respostas fisiológicas ao estresse de transporte. Para *B. soporator* os fatores prejudiciais à integridade do organismo foram relacionados à dificuldade de captação de oxigênio ocasionada pela queda no pH. Em estudo semelhante com *A. saxatilis* (popularmente conhecido como sargento), o fator mais diretamente relacionado a mortalidade também foi o pH (Sampaio, 2014). Mesmo com as semelhanças de habitat (e havendo a possibilidade de o sargento utilizar a poça apenas como berçário) e dos estressores, foram percebidas



peculiaridades em como as duas espécies lidaram com esses desafios, exaltando o fato de que cada espécie sofre perturbações e respondem de modos distintos. Por exemplo, enquanto *B. soporator* apresentou aumento de glicemia e diminuição na AAC, *A. saxatilis* não demonstrou a ativação dessas respostas, ocorrendo inclusive mortalidade em alguns indivíduos (Sampaio, 2014).

### ***Sphoeroides greeleyi***

A espécie que se mostrou menos resistente ao estresse de transporte foi *S. greeleyi*. Apesar de não se conhecer ao certo o motivo da mortalidade total em 72 horas, algumas hipóteses podem ser levantadas a partir da análise dos dados até 24 horas, tempo no qual também houve mortalidade (3 indivíduos). Analisando os dados apenas dos indivíduos de 24 horas, constatou-se diminuição significativa no valor de glicemia dos peixes mortos, indicando ineficiência do organismo na ativação de respostas metabólicas compensatórias. Mas o principal fator que pode estar ligado à mortalidade neste tempo é a queda de pH, somada à concentração de amônia na água de transporte. Pode-se sugerir que a queda de pH somada à amônia representam uma carga alostática em *S. greeleyi*, e nos indivíduos com mais de 9,7 cm de comprimento, esta condição foi mais significativa, gerando sobrecarga alostática.

Imagina-se então, que em 72 horas as condições de queda de pH e alta concentração de amônia tornaram-se mais significativas, acarretando sobrecarga a todos os espécimes, independente de comprimento, o que pode ter ocasionado a mortalidade total.

Assim como para *B. soporator*, podemos observar a possível ação dos efeitos Raiz e Bohr em *S. greeleyi*. Após uma correlação de Pearson entre pH x AAC, foi possível concluir que existe relação entre os dois fatores, e que possivelmente esses fatores estiveram envolvidos na mortalidade dos indivíduos de *S. greeleyi*. Outra hipótese que pode ser levantada e que pode estar ligada ao próprio fato descrito acima, é de acidose metabólica ocasionada por glicólise anaeróbica, quando ocorre a conversão de glicose a ácido láctico. A glicólise anaeróbica é um mecanismo observado em vertebrados, incluindo teleosteos (Hill *et al.*, 2012; Willmer *et al.*, 2005). Ao final do processo, o ácido láctico fica

retido no animal, o que pode gerar acidose metabólica. Este fato ajudaria a explicar tanto a mortalidade, quanto a queda no pH do ambiente e principalmente a diminuição da glicemia dos indivíduos mortos em 24 horas, que deve ser observada também em 72 horas. Porém, esse mecanismo ocorre na ausência de OD, fato esse que não foi detectado neste estudo. Pode-se concluir então, que a capacidade de captação de oxigênio pelos tecidos destes animais está comprometida.

É possível inferir um comprimento máximo para o transporte desta espécie, até 24 horas. Observa-se que todos os indivíduos acima de 9,7 cm morreram nesse tempo. Em 72 horas, todos os indivíduos morreram, independente do comprimento. Assim, sugere-se que o tamanho máximo para o transporte de *S. greeleyi* não ultrapasse 9,5 cm, e estudos posteriores com tempos intermediários entre 24 e 72 horas (48 horas por exemplo), são importantes para a determinação de um tempo máximo de transporte dos indivíduos desta espécie de baiacu.

### **Qualidade da água de transporte**

A qualidade da água de transporte é caráter fundamental para o transporte de teleósteos. Neste trabalho o parâmetro que mais afetou a qualidade da água e causou estresse aos indivíduos foi o pH. A amônia também ocasionou deterioração, fazendo com que o pH da água caísse, fato justificado ao efetuar uma correlação de Pearson. Essa relação ocorreu em todas as espécies.

Os valores de hidratação do tecido muscular não sofreram alterações significativas entre os tempos de uma mesma espécie. Este fato sugere que o estresse originado pelo transporte dos espécimes não chegou a causar danos diretos no equilíbrio osmótico das células dos indivíduos. Esta condição já era esperada, tendo em vista a importância da manutenção do conteúdo intracelular e do equilíbrio osmótico em espécies aquáticas. Caracteristicamente, teleósteos de ambiente marinho possuem um percentual de hidratação muscular levemente inferior quando comparados a teleósteos dulcícolas, como observado nos resultados deste trabalho. Isto se deve à tendência natural que peixes de

ambientes marinhos possuem (perder água, por serem hiposmóticos em relação ao ambiente), exatamente o inverso do que ocorre com peixes de ambientes dulcícolas, que são hiperosmóticos em relação ao ambiente (Hill *et al.*, 2012; Willmer *et al.*, 2005).

O OD é tido como o fator mais problemático aos organismos aquáticos submetidos ao transporte, sendo um causador de mortalidade. Os níveis de oxigênio dissolvido na água considerados normais são acima de 6mg/L (Ashley, 2007). Neste estudo esta variável não foi um grande problema. Outro fator indicado pela literatura como nocivo para os peixes durante o transporte é o aumento da amônia na água, produto do metabolismo dos animais (Harmon, 2009).

É possível concluir que os efeitos Bohr e Raiz tiveram papel importante e relação com a deterioração do ambiente no transporte de peixes, tendo sido observado nas espécies de ambientes instáveis. Apesar da aplicação de oxigênio na água de transporte, a queda de pH compromete a captação de oxigênio pelos espécimes, portanto esse fator demanda uma preocupação constante. Porém, para uma abordagem mais completa da capacidade resiliente de cada espécie, deve-se levar em conta a origem do grupo, ou seja, a ancestralidade recente ou não à região de água doce ou marinha. Afinal, os desafios ambientais a que os animais estão sujeitos habitualmente são os mais diversos, e a evolução dos mesmos pode ter privilegiado características variadas. Além disso, espécies de cativeiro tendem a ser mais resistentes do que espécies retiradas do seu ambiente de origem, por passarem por processos de melhoramento e seleção artificial. Esse fato pode ter auxiliado na resistência das espécies de água doce utilizadas nesse trabalho.

## 6.CONCLUSÃO

A instabilidade ou estabilidade do ambiente não foi característica determinante para a capacidade de tolerância ao estresse de transporte entre as espécies estudadas. As espécies de ambientes instáveis *B. soporator* e *S. greeleyi* sofreram mais com o estresse de transporte do que as espécies de ambientes estáveis *R. quelen* e *C. carpio*, fatos estes que não corroboram a hipótese levantada neste estudo. Não houve a oportunidade de estudar a tolerância ao transporte em animais marinhos de ambiente estável, o que enriqueceria mais a discussão. Conclui-se que de fato é necessário um estudo específico do estresse envolvido no transporte de cada espécie de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Albert, J.S.; Lovejoy, N.R.; Crampton, W.G.R. (2006) Miocene tectonism and the separation of cis- and trans- Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, v.21, 14-27;
- Andem, A. B., Ben Ekanem, S., & Oku, E. E. (2016). Environmental Variables and Ecological Distribution of Ichthyofauna Assemblages in the Calabar River, Nigeria: Present and Future Prospects. *Croatian Journal of Fisheries*, 74(4), 159-171;
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3), 199-235;
- Baldiserotto, B. (2009) *Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura*. Editora UFSM, Santa Maria;
- Balon, E. K. (1995) Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roma gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture*, 129, 3-48;
- Bane, V.; Lehane, M.; Dikshit, O'Riordan, A.; Furey, A. (2014) Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxin*, 6, 693-755;
- Barton, B. A.; and George K. I. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1, 3-26;
- Barton, B. A.; Morgan, J. D; Vijayan, M. M. (2002) Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*, 111-148;
- Benli, A. Ç. K., Köksal, G., & Özkul, A. (2008). Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*, 72(9), 1355-1358;

Berra, T. (2001) Freshwater fishes distribution. San Diego, CA: Academic Press;

Betancur-Rodriguez; *et al.* (2016) Phylogenetic classification of bony fishes Version 4. Deepfin;

Betancurt, R.; Orti, G.; Pyron, R.A. (2014) Fossil-based comparative analyses reveal ancient marine ancestry erased by extinction in ray-finned fishes. *Ecology Letters*, v. 18, 441-450;

Bonga, S.E.W (1997) The stress response in fish. *Physiological reviews*, 1997 - Am Physiological Soc;

Brabo, M. F.; Pereira, L. F. S.; Santana, J. V. M; Campelo, D. A. V.; Veras, G. C. (2016) Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. *Acta Fish. Aquat. Res.* 4, 50-58;

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry* 72, 248-254;

Brito, A., & Miller, P. J. (2001). Gobiid fishes from the Cape Verde Islands, including two new species of *Gobius* (Teleostei: Gobiidae). *Journal of Natural History*, 35(2), 253-277;

Britski, H.A.; Sato, Y.; Rosa, A.B.S. (1988) Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3ªed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação- CODEVASF 115p;

Carmichael, Gary J. (1984) Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass." *The Progressive Fish-Culturist* 46.2, 111-115;

Chau, R.; Kalaitzis, J.A.; Neilan, B.A. (2011) On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquatic toxicology*, 104, 61-72;

Chippari-Gomes, A.R. Temperaturas letais de larvas e alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824 – PISCES, PIMELODIDAE). Santa Maria – RS, 1998. 70 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pósgraduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1998;

Cull, F. (2015) Puff and bite: The relationship between the glucocorticoid stress response and anti-predator performance in checkered puffer. *General and comparative endocrinology*, vol:214 pg:1;

Darcy, G.H. (1980) Comparison of ecological and life history information on gobiid fishes, with emphasis on the south-eastern United States. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFC-15. 53pg;

Diricx, M., Sinha, A. K., Liew, H. J., Mauro, N., Blust, R., & De Boeck, G. (2013). Compensatory responses in common carp (*Cyprinus carpio*) under ammonia exposure: Additional effects of feeding and exercise. *Aquatic toxicology*, 142, 123-137;

Dobšíková, R., Svobodová, Z., Blahová, J., Modrá, H., & Velíšek, J. (2006). Stress response to long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 75(3), 437-448;

Elmqvist, T., Folke, C., Nyström, M., Peterson, G., Bengtsson, J., Walker, B., & Norberg, J. (2003). Response diversity, ecosystem change, and resilience. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(9), 488-494;

Fanta, E. (1997). Behaviour and circadian rhythm of the fish bathygobius soporator Valenciennes (Gobiidae) under the influence of environmental salinity and temperature. *Revista Brasileira de Zoologia*, 14(1), 221-244;

FAO, (2009) fao.org.br. última visualização: 21/06/2017;

Figueiredo, J.L.; Menezes, N.A. (2000) Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5). São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 116pg;

Floeter, S.R.; Gasparini, J.L.; Rocha, L.A.; Ferreira, C.E.L.; Rangel, C.A.; Feitoza, B.M. (2003) Brazilian reef fish fauna: checklist and remarks. Brazilian Reef Fish Project;

Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P., Vitule, J. R., Souza, M. M., & Prodocimo, V. (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149(4), 435-446;

Freitas, M. O., & Velastin, R. (2010). Ichthyofauna associated with a culture of mussel *Perna perna* in Northern Santa Catarina, Southern Brazil/Ictiofauna associada a um cultivo de mexilhao *Perna perna* (Linnaeus, 1758) Norte Catarinense, Sul do Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32(1), 3138;

Friedman, M. (2015) The early evolution of ray-finned fishes. *Palaeontology*, Vol.58, Part 2, 213-228;

Gallo, V. P., & Civinini, A. (2003). Survey of the adrenal homolog in teleosts. *International review of cytology*, 230, 89-187;

Gamper, N. L., & Savina, M. V. (2000). Reversible metabolic depression in hepatocytes of lamprey (*Lampetra fluviatilis*) during pre-spawning: regulation by substrate availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127(2), 147-154;



Garcia, C. Estudos cromossômicos e moleculares em Rhamdia (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas. (2009) Tese (Doutorado em Biologia (Genética)) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009;

Giles, S., Friedman, M. (2014) Virtual reconstruction of endocast anatomy in early ray-finned fishes (Osteichthyes, Actinopterygii). *Journal of Paleontology*, 88, 636-651;

Gilmour, K. M., & Perry, S. F. (2009). Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, 212(11), 1647-1661;

Gross (1968) Paleontology Database: *Andreolepis hedei*. Última visita em 10/05/2017- fossilworks.org;

Hammer, M. P., Bice, C. M., Hall, A., Frears, A., Watt, A., Whiterod, N. S. & Zampatti, B. P. (2013). Freshwater fish conservation in the face of critical water shortages in the southern Murray–Darling Basin, Australia. *Marine and Freshwater Research*, 64(9), 807-821;

Harmon, T. S. (2009). Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 58-66;

Harrison, I.J.; Miller, P.J.; Pezold, F. (2003) Faune des poisons d'eaux douce et saumâtres de l'Afrique de l'Ouest, Tome 2. Coll. Faune et Flore tropicales 40. Musée Royal de l'Afrique Centrale, Paris, France and Institut de Recherche pour le Développement. 815 pg;

Hill, R. W.; Wyse, G. A.; Anderson, M. (2012) *Animal Physiology*. Third ed. Sinauer Associations Inc. 800 pg;

Hulata, G. (1995) A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. *Aquaculture*, 129, 143-155;

IUCN red list.(2017) Disponível em: [iucnredlist.org](http://iucnredlist.org). Última visita em: 23/05/2017;

Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1), 304-310;

Iwama, G. K., McGeer, J. C., & Pawluk, M. P. (1989). The effects of five fish anaesthetics on acid–base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Canadian Journal of Zoology*, 67(8), 2065-2073;

John Wiley & Sons, Perdices, A.; Bermingham, E.; Montilla, A.; Doadrio, I. (2002) Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Mol Phylogenet Evol* 25:172-189;

Kardong, K. (2015) *Vertebrates: Comparative anatomy, function, evolution*. New York: McGraw-Hill education. 99-100;

Kottelat, M.; Freyhof, J (1972) *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. 646 pg;

Lago, J.; Rodriguez, L.P.; Blanco, L.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G. (2015) Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: distribution, toxicity, origin and therapeutical uses. *Marine Drugs*, 13, 384- 406;

Larsen, C. S. (2011) *Our origins: discovering physical anthropology- 2 ed*. Norton, p A11;

Larsson, Å., Haux, C., & Sjöbeck, M. L. (1985). Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9(3), 250-281;

Lima, D., Freitas, J. E. P., Araujo, M. E., & Solé-Cava, A. M. (2005). Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320(2), 211-223;

Macieira, R. M., & Joyeux, J. C. (2011). Distribution patterns of tidepool fishes on a tropical flat reef. *Fishery Bulletin*, 109(3), 305;

Marchioro, M.I. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, *Pimelodidae*) à variação de pH e salinidade da água de cultivo. Santa Maria, RS, 1997. 87p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1997;

McDonald, G., & Milligan, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. *Fish stress and health in aquaculture*, 62, 119-145;

McEwen, B. S., & Stellar, E. (1993). Stress and the individual: mechanisms leading to disease. *Archives of internal medicine*, 153(18), 2093-2101;

McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior*, 43(1), 2-15;

McEwen, B.S; Wingfield, J.C. (2010) What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Hormones and behavior*;

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(1), 82-125;

Miller, P. J. (1990) Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA) Gobiidae. JNICT, Lisbon, SEI, Paris. And UNESCO, Paris. Vol.2;

Milligan, C. L., & Wood, C. M. (1986). Tissue intracellular acid-base status and the fate of lactate after exhaustive exercise in the rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 123(1), 123-144;

Near, T. J.; *et al.* (2012) Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *PNAS*- vol. 109, no. 34;

Nelson, J.S. (2006) *Fishes of the World*. [S.I]: John Wiley & Sons, Inc.

Pelster, Bernd & Weber, Roy. (1991). The Physiology of the Root Effect. *Advances in Comparative & Environmental Physiology*. 8. 51-77.

Poltronieri, C., Negrato, E., Bertotto, D., Majolini, D., Simontacchi, C., & Radaelli, G. (2008) Immunohistochemical localization of constitutive and inducible Heat Shock Protein 70 in carp (*Cyprinus carpio*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to transport stress. *European journal of histochemistry: EJH*, 52(3), 191;

Prodocimo, V., & Freire, C. A. (2001). Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262(2), 243-253;

Quignard, J.P.; Tomasini, J. A. (2000) Mediterranean fish biodiversity. *Biol. Mar. Mediterr.* 7 (3), 1-66;

Rodríguez-Serrano, M.(2009) Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* 150.1, 229-243;

Rummer, J. L., Fangué, N. A., Jordan, H. L., Tiffany, B. N., Blansit, K. J., Galleher, S. & Bennett, W. A. (2009). Physiological tolerance to hyperthermia and hypoxia and effects on species richness and distribution of rockpool fishes of Loggerhead Key, Dry Tortugas National Park. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 371(2), 155-162;

Rummer J.L., McKenzie D.J., Innocenti A., Supuran C.T., Brauner C.J. (2013) Root Effect Hemoglobin May Have Evolved to Enhance General Tissue Oxygen Delivery. *Science* 340, 1327-1329.

Sampaio, F. D., & Freire, C. A. (2016). An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and Fisheries*, 17(4), 1055-1072;

Sampaio, F.D.F (2014) Estresse do Transporte de Peixes Ornamentais Marinhos: Aspectos Políticos para a Conservação, Aplicação Comercial e Avaliação Experimental. Tese doutorado, UFPR;

Schluter, D. (2000) The ecology of adaptative radiation. Oxford University Press, 10-11;

Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: the roles of allostasis an hormesis. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 549-556;

Schultz, Y. D.; Favaro, L. F.; Spach, H. L. (2002) Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae, da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19, 65-76;

Scott, W.B.; Crossman, E.J. (1973) Freshwater fishes of Canada. Bull. Fish. Res. Board Can, 184. 1-966;

Sferco, E.; Lopes-Arbarello, A.; Baez, A.M. (2015) Phylogenetic relationships of †*Luisiella feruglioi* (Bordas) and the recognition of a new clade of freshwater teleosts from the Jurassic of Gondwana. *BMC Evolutionary Biology*, v.15, 268-283;

Shukla, A, N. (2009) Physiology of fishes. Discovery Publishing House, 334 pg.

Silfvergrip, A.M.C., 1996. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei Pimelodidae). Swedish Museum of Natural History, Stockholm;

Sinha, A. K., Liew, H. J., Diricx, M., Blust, R., & De Boeck, G. (2012). The interactive effects of ammonia exposure, nutritional status and exercise on metabolic and physiological responses in gold fish (*Carassius auratus* L.). *Aquatic toxicology*, 109, 33-46;

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

Spillman, C. J. (1961) Faune de France: Poissons d'eau douce. Fédération Française des sociétés naturelles, Tome 65. Paris. 303 pg;

Steffens, W. (1989). Principles of fish nutrition. Ellis Horwood Limited; Sterling P., & Eyer, J. (1988). Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In S. Fisher & J. Reason (Eds.), *Handbook of life stress, cognition and health* (pp. 629-649);

Sterling, P. (2012). Allostasis: a model of predictive regulation. Cambridge University Press, UK. Pg 17-74.

Sung, Y. Y., Roberts, R. J., & Bossier, P. (2012). Enhancement of Hsp70 synthesis protects common carp, *Cyprinus carpio* L., against lethal ammonia toxicity. *Journal of fish diseases*, 35(8), 563-568;

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;

Verde, C., Vergara, A., Giodano, D., Mazzarella, L., & Di Prisco, G. (2007) The Root effect- A structural and evolutionary perspective. *Antarctic Science*, 19 (2), 271-278;

Vijayan, M. M., Reddy, P. K., Leatherland, J. F., & Moon, T. W. (1994). The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. *General and comparative endocrinology*, 96(1), 75-84;

Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., & Flores, A. A. (2015). Effect of warming rate on the critical thermal maxima of crabs, shrimp and fish. *Journal of thermal biology*, 47, 19-25;

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, 121-129;

Willmer, P.; Stone, G.; Johnston, I. (2005) *Environmental Physiology of Animals*. Second ed. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 pg;

Wilson, E.; Eisner, T.; Briggs, W.; Dickerson, R.; Metzenberg, R.; O'brien,R.; Susman, M.; Boggs, W. (1974) *Life on Earth: The Multiplication of Species; Biogeography*, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Stamford, Connecticut, 824–877;

Wood, E. (2001) *Global Advances in Conservation and Management of Marine Ornamental Resources*. *Aquarium sciences and conservation*. Vol 3, 65 pg;

Wright, P. A. (1995). Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*, 198(2), 273-281.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FELIPE BRANDALISE DE ARAÚJO

QUALIDADE DA ÁGUA E ESTRESSE NO TRANSPORTE DE PEIXES  
DULCÍCOLAS E ESTUARINOS

Dissertação apresentada como requisito  
parcial à obtenção do grau de mestre em  
Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Arruda  
de O. Freire

CURITIBA

2017



## AGRADECIMENTOS

Eu sou grato a tantas pessoas, por tantos motivos e momentos diferentes, que eu tenho certeza que vou esquecer de alguém. Mas tentarei...

Primeiramente, agradeço imensamente a minha orientadora Carolina Arruda de Oliveira Freire, que tanto me ensinou nestes anos de mestrado, sempre se preocupou com o crescimento profissional de cada orientado, com o máximo de paciência. Foi ótimo ser orientado por uma pessoa tão sábia.

Agradeço aos professores: Bruno Jacson Martinhak, por abrir espaço na sua disciplina para minha aula da prática de docência e me ajudar muito na mesma; Paulo de Tarso do Departamento de Zoologia, por sanar dúvidas pontuais em relação a teleósteos; Claudia Sallai, também pela prática de docência; Viviane Prodocimo, pelas dicas principalmente na apresentação do projeto e convivência no LFCO; Flávia Duarte Sampaio por ter me ajudado em coleta, e me ensinado a metodologia do experimento.

Muito obrigado ao João do Ceasa e Beto de Pontal do Paraná, pessoas que me auxiliaram na aquisição de espécies para o projeto. Ao Roberto Guimarães da secretaria, por me ajudar com diversos formulários e assinaturas, agilizando coisas que pareciam impossíveis e à CAPES pela bolsa.

Agora um agradecimento mais do que especial a todos meus amigos do LFCO: Isis Danniele, Natascha Wosnick, Guilherme Torres, Gustavo, Deivyson Bozza, Eloísa Pinheiro, Renata Daldin Leite, Daliana Bordin, e em especial à Giovanna Castellano (e Marcos Paulo) e à Juliane Ceron, por todos os ensinamentos nos ensaios e estatísticas. Por fim, ao Leonardo de Paula Rios, por todas as dezenas de galhos quebrados, seja em coletas, em escrita, e principalmente em conversas e convivência.

Agradeço ainda a toda a galera do Departamento de Fisiologia, principalmente ao grupo dos “Pangarés”, desde o povo de Tópicos até os “calouros”: Carlos Henrique (boa noite.), Gislaine Bonete, Thabata Caroline, Marcelo Ferrari, Amanda Bialli, Flavia Dourieux, Rebeca Buest, Helena Zanella e Bárbara Patrícia Schneider (minha melhor psicóloga).

Um abraço especial a todas as pessoas que contribuíram para minha formação, desde lá atrás, permanecendo na minha vida e auxiliando de alguma forma: Felipe Neves Ferrari (Harry) e Flavia Gulak Maia (Rush) (brothers supremos), Rafael Maschio,

Priscila Lemes Gross, Gabriel Roger Zanluca (Cueca), Ana Paula Farias, Maria Augusta Poersch, Julia Lopes (Coala), Eduardo Miguel, Yohan Sebastian, João Pedro Modric, Giuliana Taques, Heloísa Magagnin Brincas, Simone Fachin (Mony)...

Muito obrigado ao povo do futebol de toda a quinta feira/ time da bio: Bruno Koehler, Weslly Franco, Leo Amorim (brother de anos...), Fernando Souza (Pepino), Marcelo Bittencourt (joga 10), Felipe Marcelli, Bruno Bastos, Filipe dos Anjos (Batuque), Bruno Cassilha (Pato), Petrus Cuesta, Thiago Estefano, e todos os outros, valeu por me manterem menos sedentário do que eu poderia ter ficado!

Outro abraço especial para o povo do RPG: Caio Yamakawa, Mari Bourscheid, Gustavo Dias, Gustavo Stacheski (Formiguinha), Maurício Cezimbra.

Às pessoas que mesmo longe continuavam me ajudando e no meu pensamento, meus irmãos Guilherme Alves dos Passos, Henrique Araujo (Poodle) e William Ramos (Noturno).

Por fim, os agradecimentos principais: a Luiz Antônio Vilela de Araújo, Silvana Brandalise de Araújo e Isabela Brandalise de Araújo, por toda a força, presença mesmo longe, aporte financeiro, dentre outras coisas.

E à Juliana Herrera Forvile, pelos três melhores anos da minha vida.

Amo todos vocês.

*“Try to realize it's all within yourself,  
no-one else can make you change.  
And to see you're really only very small,  
and life flows on within you and without you.”*

*(George Harrison- Within You Without You, 1967)*

## RESUMO

O transporte dos peixes, seja para criação, engorda ou utilização em laboratórios e principalmente para aquarofilia é uma atividade extremamente estressante para os animais. Essa atividade representa um desafio à sua homeostase, podendo gerar danos irreversíveis aos indivíduos, levando até à morte. O presente estudo busca evidenciar a necessidade de conhecimento individual das espécies, avaliando os mecanismos ativados e envolvidos na manutenção da homeostase nesses animais. Espera-se assim auxiliar na padronização de transportes de acordo com as necessidades e peculiaridades de cada grupo, evitando a generalização de um transporte de características únicas para todas as espécies. Quatro espécies de diferentes ambientes foram escolhidas, para análise dos efeitos do transporte sobre a qualidade da água e de sua tolerância ao estresse: *Rhamdia quelen* (dulcícola); *Cyprinus carpio* (dulcícola); *Bathygobius soporator* (de poças de marés) e *Sphoeroides greeleyi* (marinho/estuarino). A instabilidade ou estabilidade do ambiente foi o parâmetro principal para a formulação da hipótese. Supõe-se que animais de ambientes instáveis (quanto a variáveis físicas e químicas) possuam mais ferramentas regulatórias e compensatórias para suportar ambientes estressantes. A hipótese formulada foi a de que os animais estuarinos e de poças de marés fossem mais resistentes ao transporte do que as espécies dulcícolas, de ambientes estáveis. Foram estipulados três tempos experimentais, além do controle (animais mantidos em aquário contendo água doce ou água do mar): 6, 24 e 72 horas. Alguns parâmetros fisiológicos e bioquímicos foram analisados nos peixes: teor hídrico muscular, glicemia e atividade da enzima anidrase carbônica branquial (AAC). Além disso, parâmetros da qualidade da água de transporte também foram examinados: amônia, pH e oxigênio dissolvido (OD). Houve diferentes padrões de respostas ao estresse nas espécies, e mortalidade apenas em *S. greeleyi* (33,3%), afetando todos os indivíduos de 72 horas e os de maior comprimento em 24 horas. Pode-se dizer que essa espécie foi a que mais sofreu com os agentes estressores observados na água de transporte, e a queda no pH foi a principal característica limitante. Em *B. soporator* a condição de queda no pH também foi observada, tendo relação com a baixa disponibilidade de OD e diminuição na AAC, sugerindo a presença do Efeito Raiz e/ou do Efeito Bohr. Essa espécie apresentou a ativação de mecanismos que possibilitaram a sobrevivência e manutenção da homeostase de seus indivíduos, mesmo em condições de baixa qualidade da água. A espécie *R. quelen* foi a espécie mais tolerante ao

protocolo de transporte, mesmo sendo de ambiente estável. Por fim, *C. carpio* apresentou uma importante manutenção corpórea em face a uma elevada concentração de amônia. De forma geral, conclui-se que de fato é necessário um estudo específico do estresse envolvido no transporte de cada espécie de interesse. A estabilidade ou instabilidade do ambiente de origem não foi, aqui, fator determinante na tolerância dos animais ao estresse de transporte. Não foi possível testar espécie de ambiente marinho estável, sendo em geral animais de maiores profundidades, e de difícil acesso.

Palavras chaves: transporte, estresse, tolerância, amônia, pH, anidrase carbônica, piscicultura, ornamental.

## ABSTRACT

The transport of fish, whether for breeding, fattening or use in laboratories and especially for aquariums is an extremely stressful activity for animals. This activity represents a challenge to its homeostasis, which can lead to irreversible damage to the individuals, leading to death. The present study aims to evidence the need for individual knowledge of the species, evaluating the mechanisms activated and involved in the maintenance of homeostasis in these animals. It is hoped to help in the standardization of transport according to the needs and peculiarities of each group, avoiding the generalization of a transport of characteristics unique to all species. Four species of different environments were chosen to analyze the effects of transport on water quality and its stress tolerance: *Rhamdia quelen* (fresh water); *Cyprinus carpio* (fresh water); *Bathygobius soporator* (from tidal pools) and *Sphoeroides greeleyi* (marine / estuarine). The instability or stability of the environment was the main parameter for the formulation of the hypothesis. It is assumed that animals from unstable environments (as to physical and chemical variables) have more regulatory and compensatory tools to support stressful environments. The hypothesis formulated was that estuarine and tidal pools animals were more resistant to transport than the fresh water species, of stable environments. Three experimental times, besides the control (animals kept in aquarium containing fresh water or sea water) were stipulated: 6, 24 and 72 hours. Some physiological and biochemical parameters were analyzed in fish: muscular water content, glycemia and activity of the branchial carbonic anhydrase enzyme (CAA). In addition, transport water quality parameters were also examined: ammonia, pH and dissolved oxygen (DO). There were different patterns of stress responses in the species, and mortality in *S. greeleyi* (33.3%), affecting all individuals of 72 hours and those of greater length in 24 hours. It can be said that this species suffered the most from the stressors observed in the transport water, and the fall in pH was the main limiting characteristic. In *B. soporator* the pH fall condition was also observed, having relation with the low availability of DO and decrease in the CAA, suggesting the presence of the Root Effect. This species presented the activation of mechanisms that allowed the survival and maintenance of homeostasis of its individuals, even in conditions of poor water quality. The *R. quelen* species was the most tolerant species to the transport protocol, even though it was of a stable environment. Finally, *C. carpio* presented an important bodily maintenance in the face of a high concentration of ammonia. In general, it is concluded that in fact it is necessary a

specific study of the stress involved in the transport of each species of interest. The stability or instability of the environment of origin was not, here, a determining factor in the animals' tolerance to the transport stress. It was not possible to test species of stable marine environment, being generally animals of greater depths, and of difficult access.

Keywords: transport, stress, tolerance, ammonia, pH, carbonic anhydrase, fish farming, ornamental.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Variáveis fisiológicas em teleósteos, que podem sofrer alterações a partir de atividades estressantes, como o transporte. Em (A), observamos o modelo básico de representação das respostas fisiológicas de animais conformadores e reguladores. Utilizando como exemplo a alteração de salinidade, temos que animais conformadores não possuem a capacidade de manter o meio interno (LEC) constante à medida que o meio externo (o ambiente) sofre alterações. Assim, o meio interno varia à medida que o meio externo é alterado. Os animais reguladores possuem a capacidade de manter a homeostase do meio interno, independente das alterações ambientais. Em (B), as mudanças de temperatura e de pH em peixes são semelhantes, tanto em animais de ambientes estáveis quanto em animais de ambientes instáveis. Como estes animais não possuem ferramentas para regular para estas características, seguem tendências semelhantes a animais conformadores. Em (C) temos as respostas oxirreguladoras. Peixes regulam seu meio interno até um limite de disponibilidade de oxigênio. Após isso, com baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, passam a conformar. Por fim, em (D), peixes de ambientes estáveis não possuem capacidade de evitar a acumulação de amônia ( $\text{NH}_3$ ) na água, o que a partir de certo ponto passa a ser danoso ao organismo. Algumas espécies de peixes de ambientes instáveis, entretanto, possuem ferramentas para a síntese de uréia.....22

FIGURA 2: Espécies utilizadas nesta dissertação. Ostariophys: *Rhamdia quelen* (A), *Cyprinus carpio* (B); Acanthopterygii: *Bathygobius soporator* (C) e *Sphoeroides greeleyi* (D).....27

FIGURA 3: Relação Peso x Comprimento em *Sphoeroides greeleyi* em 0, 6 e 24 horas. Círculos pretos indicam animais que sobreviveram ao transporte (n=18); círculos brancos indicam animais que morreram após o transporte (n=3, até 24 horas).....36

FIGURA 4: Valores de hidratação tecidual (%). Os teores hídricos das células dos indivíduos mantiveram-se numa faixa estável. Não houve diferenças significativas



entre tempos. Letras minúsculas representam diferenças entre espécies em um mesmo tempo. 6>n<9.....38

FIGURA 5: Glicemia medida nos indivíduos após a simulação de transporte. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre tempos de um mesmo grupo. Letras minúsculas indicam diferença significativas entre os grupos, em um mesmo tempo. 6>n<9.....39

FIGURA 6: Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) após a simulação de transporte individual. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tempos de uma espécie. Letras minúsculas indicam diferenças entre as espécies em um mesmo tempo. 6>n<9.....40

FIGURA 7: Amônia (NH<sub>3</sub>) encontrada na água após a simulação de transporte. Os valores de 0h representam o valor de amônia da água utilizada para o transporte, antes do início do experimento. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos em uma mesma espécie. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre espécies em um mesmo tempo. 6>n<9.....41

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Valores de OD (média + erro padrão), em mg/L, avaliados na água de transporte de *R. quelen* (n=6), *C. carpio* (n=6), *B. soporator* (n=7) e *S. greeleyi* (n=6, exceto em 24h, em que n=9). Controle= 0h. (\*) Indica diferença significativa nos valores iniciais e finais; Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos de uma mesma espécie; Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as espécies, em um mesmo tempo. (\*\*\*) Indicam a ausência de dados para o parâmetro para *S. greeleyi* em 72 horas, em que houve mortalidade total dos indivíduos, prejudicando a confiabilidade dos dados e inviabilizando a coleta das amostras.....42

TABELA 2: Valores de pH inicial e final (média + erro padrão), em mg/L, avaliados na água de transporte de *R. quelen* (n=6), *C. carpio* (n=6), *B. soporator* (n=7) e *S. greeleyi* (n=6, exceto em 24h, em que n=9). Controle= 0h. (\*) Indica diferença significativa entre os valores iniciais e finais; Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos em uma espécie; Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as espécies, em um mesmo tempo. (\*\*\*) Indicam a ausência de dados para o parâmetro para *S. greeleyi* em 72 horas, em que houve mortalidade total dos indivíduos, prejudicando a confiabilidade dos dados e inviabilizando a coleta das amostras.....43

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 PANORAMA DA PISCICULTURA.....	15
1.2 MANEJO COMO ATIVIDADE ESTRESSANTE .....	15
1.3 HOMEOSTASE E ALOSTASE.....	16
1.4 AGENTES ESTRESSORES.....	18
1.5 AMBIENTES ESTÁVEIS E INSTÁVEIS.....	20
1.6 BIOLOGIA E FILOGENIA DAS ESPÉCIES.....	22
1.6.1 <i>Rhamdia quelen</i> .....	24
1.6.2 <i>Cyprinus carpio</i> .....	25
1.6.3 <i>Bathygobius soporator</i> .....	25
1.6.4 <i>Sphoeroides greeleyi</i> .....	26
2. OBJETIVOS.....	28
2.1 OBJETIVO GERAL.....	28
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
2.3 HIPÓTESES.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 JUSTIFICATIVA PELA ESCOLHA DAS ESPÉCIES.....	30
3.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO.....	30
3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	31
3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	32
3.5 ANÁLISES.....	33
3.5.1 TEOR HÍDRICO TECIDUAL.....	33
3.5.2 GLICEMIA.....	33
3.5.3 DOSAGEM ENZIMÁTICA: ANIDRASE CARBÔNICA.....	33
3.6 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA DE TRANSPORTE.....	34
3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1 PESOS, COMPRIMENTOS E MORTALIDADE.....	36
4.2 TEOR HÍDRICO TECIDUAL.....	37
4.3 GLICEMIA.....	38

4.4 ANIDRASE CARBÔNICA.....	39
4.5 AMÔNIA, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E pH.....	40
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1 PANORAMA DA PISCICULTURA**

O ambiente aquático possibilita o desenvolvimento de diversas atividades econômicas. O Brasil possui grande potencial para a aquicultura (cultivo de espécies aquáticas), já que conta com clima favorável, disponibilidade hídrica e ocorrência de variadas espécies de interesse econômico (Brabo *et al.*, 2013). Esse interesse pode ser traduzido em necessidades para a demanda do mercado alimentício e para bens de recreação ou ornamentação. Grande parte dessas atividades requer a necessidade de transporte dos animais vivos, tais como engorda, aquariofilia ou destinação a repovoamento. O mercado ornamental brasileiro é muito produtivo, apesar de não haver estatísticas oficiais relacionadas a esse comércio. O Brasil exporta peixes ornamentais para diferentes países, sendo um dos principais fornecedores dos Estados Unidos, da Europa e do Japão. Outros mercados importantes na área ornamental são os orientais, representados por países como Filipinas, Vietnã e Sri Lanka (Wood, 2001).

Além do caráter ornamental, a aquicultura auxilia na produção de peixes para alimentação. Segundo a FAO, em 2009 o consumo global de produtos marinhos alcançou a marca de 143 milhões de toneladas. Somando esse aumento constante de consumo ao crescimento populacional mundial e à escassez no volume de pescados disponíveis nos mares, torna-se importante o investimento na aquicultura, visando suprir a demanda por este produto. O desenvolvimento da piscicultura como atividade sustentável necessita do aumento da produção atrelado à diminuição de despesas, a fim de se obter aumento no lucro (Baldiserotto, 2009), e para tal tornam-se imprescindíveis os esforços na otimização do transporte de peixes.

### **1.2 MANEJO COMO ATIVIDADE ESTRESSANTE**

O manejo e o transporte são atividades extremamente estressantes para os animais aquáticos. A exposição a agentes estressores resulta em perturbações fisiológicas, que por sua vez acarretam quebra da homeostase

(Barton & Iwama, 1991), muitas vezes gerando mortalidade. Visando a otimização na produção, busca-se melhorar nas condições do transporte de peixes (Baldisserotto, 2009).

As formas mais comuns de transporte das espécies são em sacolas plásticas (no caso de peixes ornamentais e alevinos para piscicultura, principalmente), ou em tanques (peixes para engorda ou aquários públicos) (Harmon, 2009). Para que a otimização no transporte ocorra de forma efetiva e plena para todas as espécies, é necessário levar em conta que cada animal tem suas peculiaridades, tendo em vista as variadas características biológicas e os mais diversos habitats onde os peixes podem ser encontrados.

Podemos dizer que uma atividade é estressante quando essa perturba a homeostase do animal. Homeostase, num sentido pleno, pode ser descrita como o equilíbrio dinâmico do meio interno (Wondelaar-Bonga, 1997). O meio interno, no caso dos organismos aquáticos, é composto pelo líquido intracelular (LIC) e pelo líquido extracelular (LEC), em que as células estão banhadas. O meio externo é o ambiente em que o animal está imerso. No caso dos peixes, o contato entre o meio externo e o meio interno pode ocorrer diretamente, pelas brânquias, um epitélio de troca (Hill, 2012; Willmer *et al.*, 2005).

### **1.3 HOMEOSTASE E ALOSTASE**

Os chamados agentes estressores ameaçam o equilíbrio dinâmico (homeostase) do organismo, levando a perturbações que provocam um conjunto de respostas comportamentais e fisiológicas, ações compensatórias, que levam o animal a superar os efeitos estressantes (Carmichael, 1984). As respostas fisiológicas ao estresse fazem com que o organismo priorize a manutenção de algumas funções em detrimento de outras, podendo representar um custo importante a outras funções, como imunocompetência, crescimento e reprodução (Barton & Iwama, 1991; Barton, 2002; Romero *et al.*, 2009).

Os teleósteos são animais reguladores para muitas características, ou seja, quando ocorre um desafio à estabilidade do organismo, mecanismos regulatórios são ativados para o retorno à condição homeostática. Os animais reguladores podem assim o ser para algumas características, como para

salinidade (osmoreguladores), porém, podem não o ser para outras, como temperatura, por exemplo.

Como contraponto à homeostase, foi proposto um modelo que integra o conceito de alostase (Sterling, 1988). Em um sentido pleno, a alostase é um processo em que o organismo busca atingir o equilíbrio em um outro estado, diferente do anterior. Segundo McEwen & Stellar (1993), alostase é “o processo do alcance da estabilidade através da mudança”. Ou seja, enquanto o conceito de homeostase retrata o funcionamento do organismo em uma condição basal, o conceito de alostase leva em conta alterações internas e externas. De acordo com a homeostase, o organismo visa o retorno ao estado inicial, enquanto na visão alostática, o organismo tende a adquirir certa flexibilidade no estado homeostático. A tendência é que o termo alostase ganhe mais força, podendo substituir o conceito de homeostase, justamente por demonstrar melhor a característica de equilíbrio dinâmico a qual os organismos estão dispostos (McEwen & Wingfield, 2010). Um exemplo aplicado na fisiologia voltada à ecologia (ecofisiologia): uma espécie de peixe vive em um ambiente estuarino em que o mar tem avançado nos últimos tempos, tornando a salinidade da região mais elevada. Continuamente essa espécie tem sofrido uma carga alostática, ou seja, perturbações que afetam a condição homeostática (o aumento na salinidade levando a um desequilíbrio osmótico). Quando ocorre essa perturbação ao equilíbrio do organismo, mecanismos de resposta ao estresse, geralmente hormonais e ligados ao metabolismo energético são ativados. O foco dessas respostas não é o retorno à condição inicial, e sim a adaptação ao novo nível (alostase) (Schreck, 2010). Quando a carga alostática sobrepõe-se à capacidade do organismo de responder aos estressores, uma condição fisiopatológica pode ocorrer. Nesse momento diz-se que está ocorrendo uma sobrecarga alostática, em que a demanda energética excede a capacidade do organismo (McEwen & Wingfield, 2003). A condição de sobrecarga alostática pode ser irreversível, levando o animal à morte.

As respostas fisiológicas de teleósteos ao estresse são divididas em respostas primária, secundária e terciária. A resposta primária envolve o aumento de produção e liberação de hormônios ligados ao metabolismo energético, como catecolaminas e cortisol, diretamente para a circulação dos

animais (Gamper & Boutilier, 1994; Iwama, 2006). A resposta secundária é uma extensão das ações hormonais de ativação de diferentes vias, levando à alteração na composição do sangue, efeitos bioquímicos diversos, como alterações de concentrações iônicas e ativação de proteínas de estresse (Vijayan *et al.*, 1994; Barton, 2002). Por fim, as respostas terciárias envolvem o animal como um todo, podendo influenciar gerações futuras (Iwama, 1998), com alterações no crescimento, resistência a doenças e capacidade metabólica ligada à sobrevivência (Haux *et al.*, 1985).

#### **1.4 AGENTES ESTRESSORES**

Dentre os principais desafios que os peixes enfrentam durante o transporte estão as variações de temperatura, acidificação da água (gerada por produtos do metabolismo do próprio peixe) (Paterson *et al.*, 2003), aumento da concentração de amônia e claro, diminuição na disponibilidade de oxigênio na água de transporte. A parte da amônia que oferece maior risco aos organismos, por ser mais tóxica, é a forma não-ionizada ( $\text{NH}_3$ ). Essa forma pode atravessar a membrana do epitélio branquial passivamente, graças a sua natureza lipofílica e ausência de carga (Benli *et al.*, 2008; Randall and Tsui, 2002). Quando a morte de um peixe é motivada por toxicidade por amônia, alguns sinais podem auxiliar o diagnóstico, como: redução de nado, aumento da respiração e aparecimento de lesões nas branquias (Benli, Köksal & Özkul 2008).

O risco de morte por hipóxia ou anóxia é o mais fácil de ser eliminado ou diminuído, através da adição de oxigênio puro à embalagem de transporte. Além disso, outras medidas podem ser adotadas: adição de tampão à água para evitar a acidificação por  $\text{CO}_2$ ; submissão dos indivíduos a jejum pré-transporte, minimizando o aumento de amônia proveniente do metabolismo; alteração da salinidade da água do transporte, minimizando assim o custo metabólico da osmorregulação (Sampaio, 2014). Porém, alterações relacionadas ao limite de tolerância ambiental podem ocasionar distúrbios osmorregulatórios, além de um aumento na concentração de ácido láctico (Steffens, 1989). Ocorre aumento de adrenalina como resposta metabólica do animal ao ambiente estressante, que irá mediar um aumento na permeabilidade das brânquias a íons e água, além de elevar as concentrações de lactato nos músculos. A alta concentração de lactato



irá aumentar a pressão osmótica intracelular, levando a uma troca de fluidos entre os compartimentos intracelular e extracelular, para restauração do equilíbrio osmótico (Milligan & Wood, 1986). Os níveis de lactato que entram no sangue são baixos quando comparados aos que ficam retidos nos músculos. Consequentemente, o gradiente transcelular osmótico causa um impacto no sangue, observado através de aumento no hematócrito (porcentagem de volume do sangue ocupada por hemácias) e proteínas plasmáticas (McDonald & Milligan, 1997).

A diminuição no pH do ambiente da água de transporte está diretamente ligada com a baixa capacidade de tamponamento dos teleósteos, por não apresentarem o tampão bicarbonato (Hill *et al.*, 2008) e com a geração de ácido pelo próprio metabolismo. Dessa forma, a queda do pH representa outro desafio importante para os peixes durante o transporte, muito difícil de ser contornado pelos piscicultores, principalmente pela possível ocorrência do Efeito Raiz e do Efeito Bohr. O Efeito Raiz é definido como a redução na capacidade de transporte de oxigênio pelas hemoglobinas do organismo. Já o Efeito Bohr difere-se do primeiro, sendo descrito como a redução na afinidade entre hemoglobina e oxigênio. Ambos efeitos ocorrem quando há queda no pH e aumento na concentração de CO<sub>2</sub> no organismo. Assim, mesmo que a oxigenação no ambiente esteja saturada, esta não irá se refletir em capacidade de absorção de O<sub>2</sub> pelo teleósteo (Pelster & Weber, 1991; Verde *et al.*, 2007; Shukla, 2009).

A relação da anidrase carbônica com o estresse de transporte pode ser explicada pelos efeitos Raiz e Bohr. Uma queda significativa de pH no sangue leva ao comprometimento da absorção de O<sub>2</sub> pelas brânquias. A AC é uma enzima que catalisa a conversão de HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> e H<sup>+</sup> em CO<sub>2</sub>. Imagina-se, então que a diminuição de sua atividade no tecido branquial seja um mecanismo que eleva o aporte de O<sub>2</sub> nessas situações de baixa de pH (Rummer *et al.*, 2013).

A quantificação do cortisol plasmático é um meio de analisar a demanda energética do organismo durante a situação de estresse. O cortisol é um hormônio esteróide, e nos peixes é produzido pelas células cromafins e interrenais, localizadas no rim cefálico, em contato com as veias pós-cardinais (Gallo & Civinini, 2003). A elevação do cortisol no sangue é o indicador primário

de estresse mais amplamente utilizado em peixes. Geralmente, o cortisol plasmático eleva-se poucos minutos após a exposição ao estímulo agressor, com o retorno aos níveis basais levando até pouco mais de uma hora (Wendelaar Bonga, 1997). O cortisol liberado causa mobilização de reservas energéticas, mantendo suprimento de energia e homeostasia osmótica (George *et al.*, 2013), o que gera então a resposta secundária: estimulação da gliconeogênese e glicogenólise, para que o indivíduo possa lidar com o agente estressor (Iwama *et al.*, 2006). Logo, os níveis de glicose e glicogênio podem ser utilizados como marcadores de estresse em peixes (Sampaio & Freire, 2016). Porém, se houver a possibilidade de investimento em teste de cortisol o resultado pode ser mais confiável. Relações diretas entre aumento de cortisol e de glicemia em conjunto já foram encontradas em várias espécies de teleósteos, como em *Sphoeroides testudineus* (Cull, 2015).

## 1.5 AMBIENTES ESTÁVEIS E INSTÁVEIS

A adaptação de um animal a um ambiente está diretamente ligada à capacidade de manutenção do meio interno relativamente constante em face às variações das condições abióticas. Pode-se dizer então, que existe uma relação direta entre essas variações abióticas do ambiente e os mecanismos biológicos necessários para a sobrevivência do animal a esse ambiente. Assim, quanto mais instáveis são os ambientes, uma maior plasticidade e mecanismos mais diversos e aprimorados devem ser exibidos pelos animais habitantes (Hill, 2012; Willmer *et al.*, 2005).

Quanto aos ambientes das espécies estudadas neste trabalho, podemos dividi-los em quatro: córregos, rios perenes, poças de marés e águas costeiras/estuários. Os ambientes aquáticos considerados estáveis são aqueles que possuem pequenas variações de condições abióticas, como temperatura, salinidade e pH ao longo do espaço ou do tempo (Hill, 2012; Willmer *et al.*, 2005). Como exemplo, podemos citar os ambientes marinhos abaixo da linha de maré baixa e ambientes dulcícolas como rios e córregos. Peixes teleósteos de ambientes estáveis, em geral, em princípio possuem tolerância ambiental mais baixa. Algumas espécies, porém, ainda apresentam certa plasticidade

fisiológica, graças à ancestralidade recente em ambiente mais instável (Freire *et al.*, 2008). As espécies de ambientes estáveis utilizadas neste trabalho foram *R. quelen* e *C. carpio*.

Diferentemente da estabilidade dos mares e rios, áreas de estuário, marinhos de regiões de costões rochosos ou com formação de poças de marés possuem grande instabilidade de fatores abióticos atingindo as espécies habitantes. Nesses ambientes são encontradas as espécies denominadas “euri”, que possuem maior faixa de tolerância a mudanças ambientais, ou seja, maior plasticidade ambiental. Em contraponto à denominação “euri” diz-se que as espécies de regiões estáveis são “esteno”, com uma plasticidade ambiental diminuída (Willmer, *et al.*, 2005).

Os teleósteos são animais reguladores para salinidade, mas não o são para muitas outras características, tais como oxigênio, amônia e pH (Sampaio, 2014). Porém, espécies de ambientes instáveis conseguem tolerar mais, mesmo em respostas conformadoras. No caso da amônia, algumas espécies de ambientes estáveis possuem a capacidade de síntese da uréia, que funciona como um tipo de regulação para esse parâmetro (Hill, 2012). As espécies ditas de ambientes instáveis utilizadas neste projeto são *B. soporator* (de poça de marés) e *S. greeleyi* (estuarina).

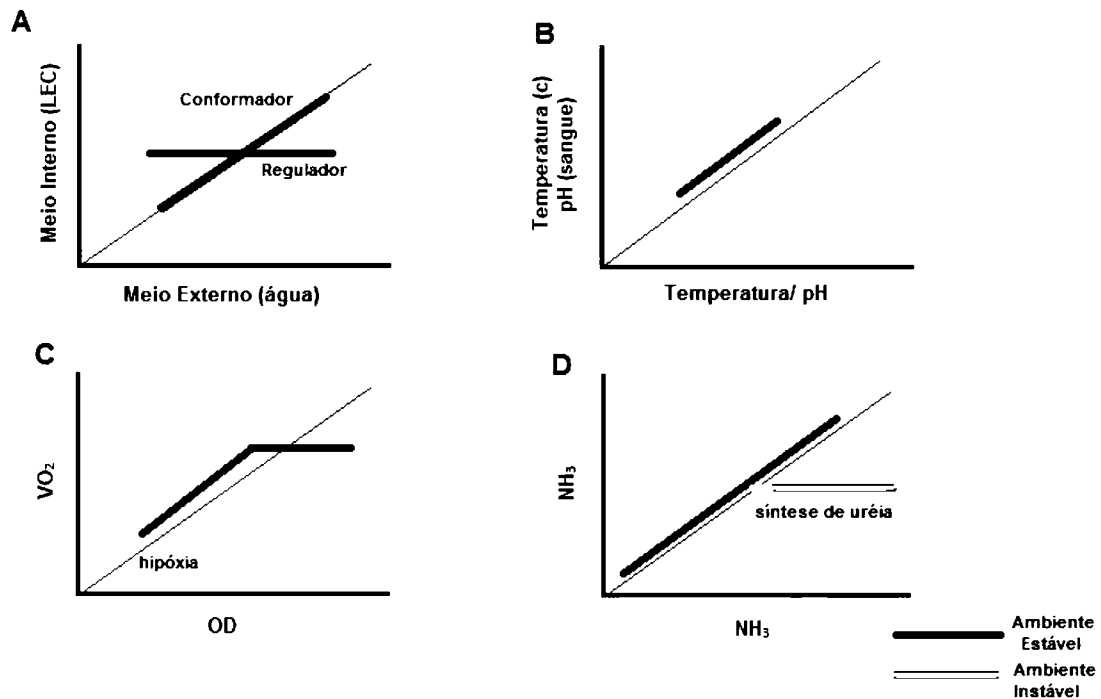


Figura 1. Variáveis fisiológicas em teleósteos, que podem sofrer alterações a partir de atividades estressantes, como o transporte. Em (A), observamos o modelo básico de representação das respostas fisiológicas de animais conformadores e reguladores. Utilizando como exemplo a alteração de salinidade, temos que animais conformadores não possuem a capacidade de manter o meio interno (LEC) constante à medida que o meio externo (o ambiente) sofre alterações. Assim, o meio interno varia à medida que o meio externo é alterado. Os animais reguladores possuem a capacidade de manter a homeostase do meio interno, independente das alterações ambientais. Em (B), as mudanças de temperatura e de pH em peixes são semelhantes, tanto em animais de ambientes estáveis quanto em animais de ambientes instáveis. Como estes animais não possuem ferramentas para regular para estas características, seguem tendências semelhantes a animais conformadores. Em (C) temos as respostas oxirreguladoras. Peixes regulam seu meio interno até um limite de disponibilidade de oxigênio. Após isso, com baixa disponibilidade de oxigênio dissolvido na água, passam a conformar. Por fim, em (D), peixes de ambientes estáveis não possuem capacidade de evitar a acumulação de amônia (NH<sub>3</sub>) na água, o que a partir de certo ponto passa a ser danoso ao organismo. Algumas espécies de peixes de ambientes instáveis, entretanto, possuem ferramentas para a síntese de uréia. Adaptado de: Sampaio, 2014.

## 1.6 BIOLOGIA E FILOGENIA DAS ESPÉCIES

A classe Actinopterygii abrange mais da metade de todas as espécies de vertebrados existentes. Os grupos pertencentes à classe Actinopterygii possuem uma grande variedade de formas, tamanhos, cores e tipos de sistemas

sensoriais, com espécies especializadas em quimiorrecepção, eletrorrecepção, dentre outras. Algumas espécies chegam a produzir luz ou eletricidade (Berra, 2001). Toda esta variedade e as peculiaridades possibilitaram aos membros desta classe habitarem diferentes regiões do planeta, até as mais inóspitas. A principal característica de Actinopterygii é a presença de nadadeiras chamadas lepidotríquias, isto é, nadadeiras em rede suportadas por raios anexadas a uma base óssea (Kardong, 2015).

Apesar da filogenia atual ser bem definida, existem diversas dificuldades na classificação basal do grupo, principalmente pela pobreza de dados fósseis, e pela disparidade no aumento de especiações durante o Devoniano (gerando muitos dados fósseis repetidos) (Friedman, 2015). Com o intuito de melhorar a qualidade de dados relacionados a grupos basais da classe, estudo recente tem levantado esforços no desenvolvimento de tecnologias de imageamento de alta qualidade, possibilitando reconstituições de fósseis mais antigos na história evolutiva de Actinopterygii (Friedman, 2015; Giles & Friedman, 2014).

O surgimento dos actinopterígeos ocorreu durante o Período Siluriano (há cerca de 420 milhões de anos), com uma explosão no número de espécies durante o Devoniano (Paleontology Database, 2017) A partir de então houve o início de um processo de irradiação, no qual os organismos se diversificam rapidamente, levando a várias especiações a partir de uma espécie ancestral. Este processo ocorre principalmente quando uma grande mudança ambiental possibilita a criação de novos nichos, com novos recursos e diferentes desafios ambientais, além de isolamento de grupos (Larsen, 2011; Schluter, 2000; Wilson, 1974). Este processo deu origem a um grupo chamado Neopterygii, que após outra radiação originou duas Infraclasses: Holostei (Neopterígeos primitivos) e Teleostei, entre os Períodos Permiano e Triássico (respectivamente há 275 e 310 milhões de anos, aproximadamente) (Near, 2012).

A infraclasse Teleostei abrange todos os peixes ósseos de nadadeiras raiadas (excetuando os representantes da Infraclasse Holostei), equivalendo a cerca de 96% de todos os peixes existentes. Mais de 32 mil espécies já foram descritas, habitando os mais diferentes ambientes aquáticos: desde mares e lagos até rios, estuários e mangues (Betancurt *et al.*, 2015). Processos naturais

como o tectonismo contribuíram para a irradiação adaptativa das espécies de Teleostei, principalmente durante o Jurássico Superior (há 163 milhões de anos) e o Mioceno (há 23 milhões de anos) (Sferco *et al.*, 2015; Albert *et al.*, 2006). Os teleósteos são divididos em duas superordens. A primeira delas, Ostariophysii, é um diverso grupo com mais de 8 mil espécies, sendo 68% habitantes de água dulcícola (Nelson, 2006). Duas espécies estudadas nesta dissertação pertencem a este grupo: *Rhamdia quelen* (Ordem Siluriformes) e *Cyprinus carpio* (Ordem Cypriniformes). A segunda superordem na qual os teleósteos são classificados é Acanthopterygii, a qual pertencem as outras duas espécies utilizadas neste projeto: *Bathygobius soporator* (Ordem Perciformes) e *Sphoeroides greeleyi* (Ordem Tetraodontiformes). Esta superordem está encaixada no clado Neoteleostei, que engloba grupos mais recentes de teleósteos, originados há aproximadamente 175 milhões de anos.

### **1.6.1 *Rhamdia quelen***

O jundiá (*Rhamdia quelen*, Siluriformes: Heptapteridae) é um bagre neotropical encontrado em pequenos córregos, lagos e rios (Garcia, 2009), habitando desde o centro da Argentina até o sul do México (Silfvergrip, 1996). Apesar de ser uma espécie pertencente a uma ordem bem estudada (principalmente na América Latina), ainda existem divergências quanto a sua filogenia. Essas divergências ocorrem por conflitos taxonômicos existentes devido à semelhança morfológica das espécies representantes da ordem Siluriformes (Perdices *et al.*, 2002). Dentre as características em comum da ordem destaca-se o corpo nu, envolto por uma espessa pele, sendo às vezes coberta por placas ósseas (Britski *et al.*, 1988). O gênero *Rhamdia* possui múltiplas linhagens evolutivas, tendo sofrido processos de diferenciação de espécies em diversas regiões do continente americano. Assim, o estudo do tempo de colonização e consequente taxa de dispersão do gênero torna-se uma opção instigante (Perdices *et al.* 2002). Existem atualmente 211 espécies descritas pertencentes à família Heptapteridae (Nelson, 2006). O jundiá pode ser considerado um peixe resistente quanto à variação de pH, suportando uma faixa

entre 4,0 e 8,5 (Marchioro, 1997). Além disso, é euritérmico, ou seja, suporta uma faixa relativamente alta de variação térmica: a partir de experimentos realizados por Chippari Gomes (1998), observou-se tolerância de *R. quelen* a uma faixa de 15 a 34°C.

### **1.6.2 *Cyprinus carpio***

Por ser uma das espécies mais difundidas em diversas regiões do planeta, a carpa comum, *Cyprinus carpio* (Cypriniformes: Cyprinidae) dificilmente é encontrada na sua forma selvagem. A distribuição desta espécie segue um padrão dúbio: nas regiões em que foi introduzida, é considerada invasiva (em regiões como América do Norte e Austrália). Porém, em suas áreas nativas (Ásia e leste da Europa), é tratada como vulnerável, correndo risco de extinção das linhagens selvagens pela perda de variabilidade genética após anos de pressões de seleção natural e artificial (Mondol *et al.*, 2006; Balon, 1995). Domesticada desde os tempos romanos, a carpa comum é encontrada em mais de 100 países ao redor do mundo (Balon, 1995).

Morfologicamente, as carpas apresentam uma rara diversidade de colorações, desde cinza até alaranjada, motivo pelo qual são visadas no mercado ornamental. Além disso, possuem diferentes formatos corpóreos (normalmente em forma de “torpedo”), proporções e desenvolvimento das nadadeiras (Spillman, 1961). Habitam regiões quentes e profundas de rios e lagos com grande vegetação. É uma espécie com maior atividade durante as manhãs e o crepúsculo (Scott & Crossman, 1973; Kottelat & Freyhof, 1972).

A história evolutiva de *C. carpio* é bem estruturada, havendo muitos dados disponíveis. Por ser uma espécie que há muito tempo sofre com intensa seleção artificial, muitos fenótipos resistentes a doenças e condições desfavoráveis surgiram (Hulata, 1995).

### **1.6.3 *Bathygobius soporator***

O *Bathygobius soporator* (Perciformes: Gobiidae) é um peixe marinho proveniente de regiões tropicais, com distribuição desde o leste do Atlântico

(Senegal e Angola), mares mediterrâneos, até a costa oeste do Atlântico (Estados Unidos, América Central e costa brasileira) (Floeter *et al.*, 2003; Harrison, 2003; Quignard & Tomasini, 2000). Conhecido popularmente no Brasil como amboré ou aiboré, possui grande tolerância osmótica (Darcy, 1980), podendo ser encontrado em águas marinhas e salobras, em estuários ou poças de marés (Miller, 1990).

A principal característica morfológica de *B. soporator* é a modificação da nadadeira ventral em ventosa, a qual possibilita ao peixe aderência ao substrato. Apesar de não possuir valor alimentício, é possível encontrar esta espécie no mercado ornamental ocasionalmente (IUCN Red List, 2017). O amboré não possui características migratórias, o que abre margem para estudos acerca da adaptação e resistência da espécie a ambientes diferentes do habitual.

#### **1.6.4 *Sphoeroides greeleyi***

A espécie *Sphoeroides greeleyi* (Tetraodontiformes: Tetraodontidae), é um baiacu de águas marinhas e salobras. Muito comum no litoral brasileiro, é encontrado em regiões de baías junto à área de rebentação e estuários com águas de pouca profundidade (Figueiredo & Menezes, 2000). Apesar de ser reconhecidamente uma espécie de águas estuarinas, pode-se dizer que *S. greeleyi* habita regiões menos instáveis do que seu congênere *Sphoeroides testudineus*, sendo considerado, assim, menos eurihalino. Enquanto *S. testudineus* tem a capacidade de suportar águas mais diluídas, *S. greeleyi* se mantém limitado a regiões de maior salinidade (~30‰) (Prodocimo & Freire, 2001). A distribuição desta espécie é restrita à porção central das Américas, costa atlântica, numa faixa que abrange desde Honduras até o sul do Brasil (Floeter *et al.*, 2003). Habita águas rasas, normalmente permanecendo próximo aos substratos lodosos e arenosos (Schultz *et al.*, 2002). Pode ser encontrada em mercados ornamentais, porém em menor quantidade do que outras espécies da mesma família.



Os indivíduos desta espécie, assim como membros da família Tetraodontidae (baiacus) possuem a capacidade de inflar-se através da ingestão de ar ou água. Outra característica marcante de peixes desta família, que inclusive é encontrada em *S. greeleyi* (em quantidades menores), é a produção da substância neurotóxica tetrodotoxina (Bane *et al.*, 2014; Chau *et al.*, 2011; Lago, *et al.*, 2015). A tetrodotoxina age no sistema nervoso bloqueando os canais de sódio voltagem-dependente, inibindo o disparo de potenciais de ação (Bane *et al.*, 2014).

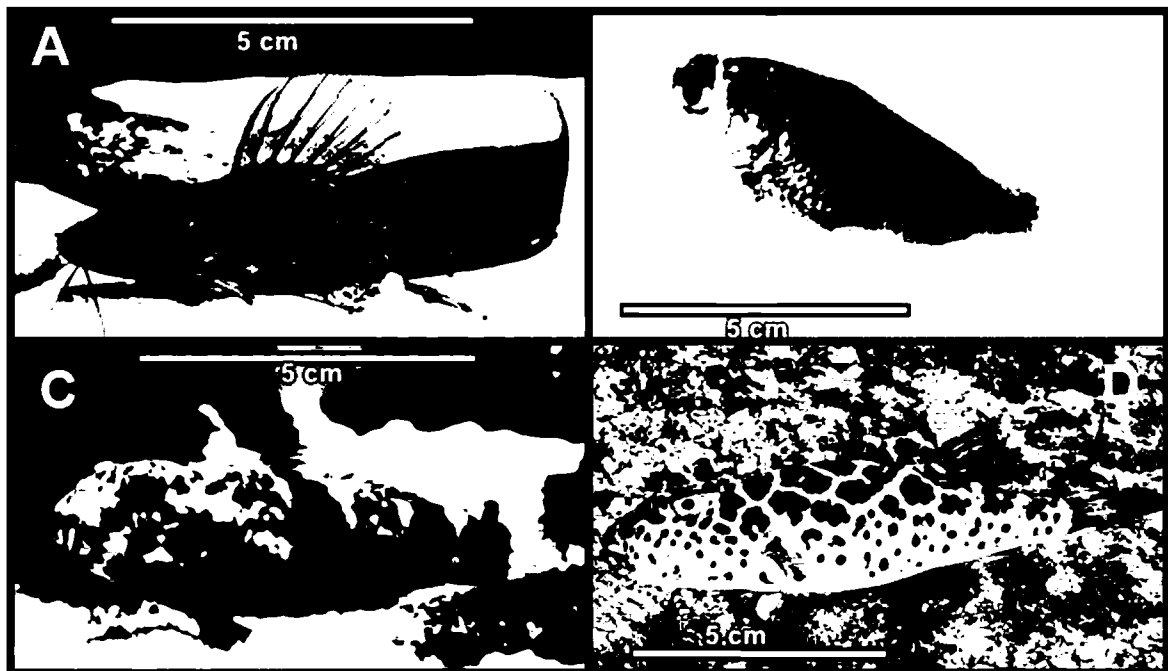


FIGURA 2. Espécies utilizadas nesta dissertação. Ostariophysi: *Rhamdia quelen* (A), *Cyprinus carpio* (B); Acanthopterygii: *Bathygobius soporator* (C) e *Sphoeroides greeleyi* (D). FOTOS: Enrico Ritcher (disponível em: [scotcat.com](http://scotcat.com)) (A); acervo pessoal (B); L. Holly Sweat (disponível em [sms.si.edu](http://sms.si.edu)) (C); Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (disponível em: [biogeodb.srti.si.edu](http://biogeodb.srti.si.edu)) (D).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo busca evidenciar a necessidade de conhecimento individual das espécies, baseando-se em como uma espécie animal tem suas características moldadas de acordo com o ambiente em que a mesma habita e a quanto tempo está adaptada a este ambiente. Assim, espera-se avaliar os mecanismos ativados e respostas envolvidas na manutenção da homeostase em peixes de interesse econômico (seja na piscicultura, seja para ornamento) e biológico, submetidos a estresse de transporte. Foi utilizado o método de transporte individual em sacos plásticos, o que ocorre principalmente no comércio de peixes para fins ornamentais. Escolheu-se esse método dada a necessidade de análise individual dos espécimes, para que fossem obtidos resultados mais concisos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a tolerância fisiológica das espécies *Rhamdia quelen* e *Cyprinus carpio* (dulcícolas), *Bathygobius soporator* (de poça de maré) e *Sphoeroides greeleyi* (estuarina);
- Avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas dos peixes citados, submetidos a diferentes tempos experimentais de simulação de transporte, analisando: a capacidade de manutenção do teor hídrico tecidual, atividade da enzima anidrase carbônica, taxa de excreção de amônia e características abióticas da água de transporte;
- Observar possíveis respostas secundárias bioquímicas ocasionados pelo estresse com o teste de glicemia;
- Relacionar a tolerância dos peixes ao transporte com seu ambiente natural.

## 2.3 HIPÓTESES

De acordo com o habitat das espécies utilizadas neste trabalho, foi levantada uma hipótese em relação ao grau de tolerância de cada animal ao estresse de transporte. Espera-se que ocorram diferentes tipos de respostas ao estresse do transporte, e que essas respostas ajudem a ser explicadas pelo tipo de ambiente que habitam.

A hipótese é de que as espécies de ambientes instáveis sejam mais resistentes, quando comparadas às espécies de ambientes estáveis. Ou seja, o primeiro grupo possuiria mais ferramentas fisiológicas para suportar o estresse de transporte quando comparado ao segundo grupo. Assim, espera-se que as espécies de regiões instáveis *B. soporator* e *S. greeleyi* sejam mais tolerantes ao estresse de transporte do que *R. quelen* e *C. carpio*, que habitam regiões estáveis. Espera-se ainda que *B. soporator* seja mais resistente do que *S. greeleyi*, por habitar região de poça de marés, considerada extremamente instável, com sua água apresentando variações diárias de salinidade, oxigênio dissolvido e temperatura.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 JUSTIFICATIVA PELA ESCOLHA DAS ESPÉCIES

Duas características foram levadas em conta na hora de escolher as espécies deste estudo: facilidade de coleta e importância econômica, ornamental e biológica. Uma das espécies ornamentais mais utilizadas em todo o mundo, *C. carpio* é facilmente encontrada em lojas de piscicultura. Para efetuar uma boa base de comparação com a carpa, decidiu-se a utilização do bagre *R. quelen*, uma espécie muito utilizada na pesquisa, com informações sobre sua biologia e fisiologia disponíveis, mas poucas delas relacionadas ao transporte.

A obtenção das espécies marinhas é mais complicada: seu preço no mercado ornamental é elevado, então optou-se por espécies estuarinas, de coleta mais fácil, e que possuam algum interesse para fins comerciais. Assim, *B. soporator* e *S. greeleyi* foram escolhidas por estarem em famílias que possuem espécies próximas filogeneticamente com relevância no mercado ornamental, além da abundância delas no litoral brasileiro.

#### 3.2 COLETA E ACLIMATAÇÃO

Os animais utilizados neste trabalho foram obtidos por dois meios diferentes. As espécies dulcícolas *Rhamdia quelen* e *Cyprinus carpio* foram compradas de piscicultor na loja de alevinos “Peixes e Peixes”, localizada no CEASA-PR (Centrais de Abastecimento do Paraná), na cidade de Curitiba-PR. Foram realizadas duas compras em diferentes meses, a primeira para a realização dos experimentos com *R. quelen*, e a segunda para os experimentos com as carpas. Os animais foram todos acomodados em um mesmo saco plástico contendo água fresca e oxigenação saturada. Em seguida ocorreu o transporte dos espécimes para o Laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO), Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Paraná. Os animais, então, foram acomodados em um aquário estoque com

aeração constante, filtro externo e alimentados em dias alternados com ração em flocos comercial durante sete dias, período de aclimação. As condições abióticas do aquário estoque foram controladas diariamente: pH~7,5, oxigênio dissolvido na água de aproximadamente 8,0 mg/L, temperatura aproximada de 25°C e fotoperíodo natural.

A coleta da espécie estuarina *Sphoeroides greeleyi* ocorreu no município de Pontal do Paraná-PR (25° 42' 12''S, 48° 28' 10''W). Para a pesca dos espécimes foi utilizada uma rede de arrasto manual de malha fina. Os organismos que não eram de interesse da coleta foram rapidamente devolvidos à água, e os baiacus eram acomodados em tambores com água proveniente do local de coleta e aeração constante por aeradores a pilha. Após a coleta, os espécimes de baiacu foram acomodados no aquário estoque com água salobra a 25‰, as outras condições abióticas e a manutenção do aquário ocorreram tais como expostas anteriormente. Assim como fora realizado com as outras espécies, a aclimação de *S. greeleyi* foi de sete dias, com alimentação de ração de flocos comercial em dias alternados e fotoperíodo natural.

Por fim, a última espécie coletada foi *Bathygobius soporator*, conhecida popularmente como amboré ou aiboré. A coleta ocorreu no município de Pontal do Sul-PR (25° 33' 32'' S, 48° 21' 41''W), em regiões de praia durante a baixa das marés. Algumas dificuldades surgiram na coleta do amboré, sendo necessária uma coleta extra e aclimação mais rápida (quatro dias). Para a obtenção destes peixes foi utilizada vara com micro anzol e covo. Filés de peixe (merluza) foram utilizados como isca.

### 3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em cinco grupos (amostras aleatórias, em jejum de 24 horas) para a execução do protocolo experimental. O grupo controle não apresentava desafio de estresse de transporte, com os indivíduos sendo processados imediatamente após retirada do aquário estoque. Os grupos experimentais representaram o transporte individual de espécimes pelos períodos de tempo de 6, 24, 48 e 72 horas. A escolha por estes tempos deu-se

a partir de experimentos anteriores realizados no próprio laboratório (Sampaio, 2014; Sampaio e Freire, 2016).

Individualmente, os animais foram embalados em sacos plásticos semelhantes aos utilizados em lojas de aquário. Foram adicionados 1L de água (salinidade de 0‰ para as espécies dulcícolas, 25‰ para as marinhas), sendo oxigenada até saturação (acima de 8,0 mg/L). Em seguida, estes sacos ficaram acomodados em caixas de isopor, para que não houvesse interferência de condições ambientais externas, como luz e temperatura. Sacos plásticos sem peixes também foram fechados com a mesma água utilizada nos experimentos e oxigenação saturada, servindo de controle para os parâmetros abióticos, para cada tempo experimental. O protocolo experimental foi repetido entre as quatro espécies, com o seguinte número de indivíduos: 24 de *R. quelen* (n=6); 24 de *C. carpio* (n=6); 21 de *S. greeleyi* (6<n>9); 27 de *B. soporator* (6<n>7); n total de 96 indivíduos, além de 20 sacos plásticos vazios para o controle (branco).

Após o período experimental ocorreu o processamento das amostras.

### **3.4 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS**

Imediatamente após a abertura do saco plástico uma amostra da água era retirada para a análise dos parâmetros abióticos (pH, temperatura, oxigênio dissolvido e amônia). Cada peixe foi retirado do saco e mergulhado em água com benzocaína, um éster utilizado como anestésico (60 mg/L de água) durante aproximadamente um minuto, até o animal deixar de apresentar movimentos natatórios. Os peixes foram pesados (peso total) e medidos (comprimento total). Em seguida ocorria a eutanásia via secção medular, e o sangue obtido através deste corte foi utilizado para o teste de glicemia. Por fim, foram retiradas amostras das brânquias e um fragmento de tecido muscular. Estas amostras foram acondicionadas em tubos eppendorf e congelados em ultrafreezer a -80°C, mantidos assim até a utilização nos ensaios de teor hídrico muscular e anidrase carbônica.

Este procedimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), processo de número 23075.153822/2017-71.

O processamento de cada amostra durou cerca de oito minutos. Tempo este que já fora planejado, sendo que os animais eram colocados nos sacos para o experimento em intervalos de dez minutos entre eles.

### **3.5 ANÁLISES**

#### **3.5.1 TEOR HÍDRICO TECIDUAL**

Para o ensaio de hidratação muscular (teor hídrico tecidual- TH) foram utilizadas as amostras de músculo dos animais. As amostras foram descongeladas e pesadas em tubos eppendorf em balança analítica (Bioprecisa FA2104 N, Brasil). Descontando o peso do tubo, tem-se o peso úmido do fragmento de músculo. Em seguida, esta amostra é transferida para estufa (BIOPAR S22ST) a 60°C por 24 horas. Após o tempo na estufa, a amostra é pesada novamente, e após descontar-se o peso do tubo, é obtido o peso seco. A porcentagem de água no tecido é obtida após o cálculo da seguinte fórmula:  
$$\text{TH (\%)} = [(\text{peso úmido} - \text{peso seco}) / \text{peso úmido}] \times 100.$$

#### **3.5.2 GLICEMIA**

A medida da glicemia foi realizada ao retirar uma gota de sangue do animal no momento em que este foi eutanasiado, via coração ou veia caudal. A gota de sangue foi depositada em uma tira para leitura, inserida em um aparelho comercial para medir glicemia (AccuChek®- Roche, modelo Performa Nano). O resultado é representado em mg/dL.

#### **3.5.3 DOSAGEM ENZIMÁTICA: ANIDRASE CARBÔNICA**

As amostras de brânquias foram descongeladas antes dos ensaios de quantificação da proteína anidrase carbônica, pesadas, e homogeneizadas com tampão fosfato 10mM, pH 7,4. Em seguida, este homogeneizado foi centrifugado a 13.400 rpm por 5 minutos em temperatura controlada, para a precipitação dos restos celulares. O sobrenadante foi separado em duas alíquotas: a primeira

para utilização na análise da concentração de proteínas totais, e a segunda para a quantificação da atividade da enzima anidrase carbônica.

O ensaio da atividade da enzima anidrase carbônica branquial foi realizado a partir de protocolo descrito por Vitale (1999). A partir deste método é possível quantificar a atividade desta enzima pela reação com uma solução contendo manitol (225mM), sacarose (75 mM) e tris-fosfato (10mM). Para a realização deste método é necessária a adição do sobrenadante das amostras de brânquia e água destilada saturada com CO<sub>2</sub> ao meio de reação citado anteriormente. Imediatamente após esta adição, o pH inicial de 7,4 começa a cair. Os valores do pH, à medida que este vai diminuindo, são anotados a cada quatro segundos, num período total de 20 segundos (pHmetro de bancada inoLAB pH Level 1 da WTW®). Durante esta reação a temperatura é mantida abaixo de 4°C. Os valores obtidos dão origem a uma reta de regressão linear (relação pH x tempo), que determina a taxa da reação enzimática catalisada (TC). A partir da realização do “branco” (mesmo procedimento, utilizando apenas o tampão, sem o homogeneizado), em quatro réplicas ao longo do ensaio, pode-se determinar a taxa da reação não catalisada (TNC).

Ao final do ensaio, para a determinação da atividade da anidrase carbônica (AAC), foi realizado um cálculo a partir da seguinte fórmula:  $AAC = [TC / (TNC - 1)] / \text{mg de proteína total}$ , onde TC é a taxa da reação catalisada e TNC corresponde à taxa de reação não catalisada.

Para determinação das proteínas totais no sobrenadante foi utilizado o método de Bradford (1976), a partir da alíquota de homogeneizado de brânquias. As amostras foram realizadas em triplicatas (5µm por amostra), em uma microplaca, a partir de uma curva padrão de BSA (soro de albumina bovina). Foi utilizado o reagente BioRadProteinAssay da Bio-RadLaboratories®. As amostras foram lidas em 595nm de absorvância (ELISA SUNRISE TECAN DEUTSCHLAND GMBH), com o resultado expresso em mg/mL<sup>-1</sup>.

### **3.6 PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DA ÁGUA DE TRANSPORTE**

A partir das amostras de água foi efetuada a análise dos seguintes parâmetros abióticos: temperatura, pH, oxigênio dissolvido (OD) e amônia



( $\text{NH}_3$ ). O pH foi medido em um pHmetro de bancada (inoLAB pH Level 1 da WTW®).

A quantificação da amônia ( $\text{N-NH}_3$ ) da água ocorreu através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (ULTROSPEC 2100 pro- Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), utilizando o kit comercial AlphaKit®.

### **3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Para as análises estatísticas dos dados gerados foi utilizado o programa SigmaPlot® versão 11.0. Foram realizados testes de variância de uma via (OneWay ANOVA) para tempos dentro de uma espécie e teste de Holm-Sidak ou Tukey para amostras não homogêneas, para comparações entre as espécies. Além destes, foi utilizado o teste t de student, e correlação de Pearson.

## 4.RESULTADOS

### 4.1 PESOS, COMPRIMENTOS E MORTALIDADE

As médias de peso e comprimento em cada espécie foram, respectivamente: 1,66g/ 5,99cm (*R. quelen*); 4,79g/ 6,99cm (*C. carpio*); 11,35g/ 9,34cm (*B. saporator*) e 13,38g/ 8,8796cm (*S. greeleyi*). Foi verificada mortalidade em todos os indivíduos da espécie *Sphoeroides greeleyi* no tempo de 72h, além de outros três animais do grupo 24h. A média de peso dos animais mortos no tempo de 24h foi de 24,04g, e a média de comprimento, 10,93cm. Não houve mortalidade nas outras espécies estudadas.

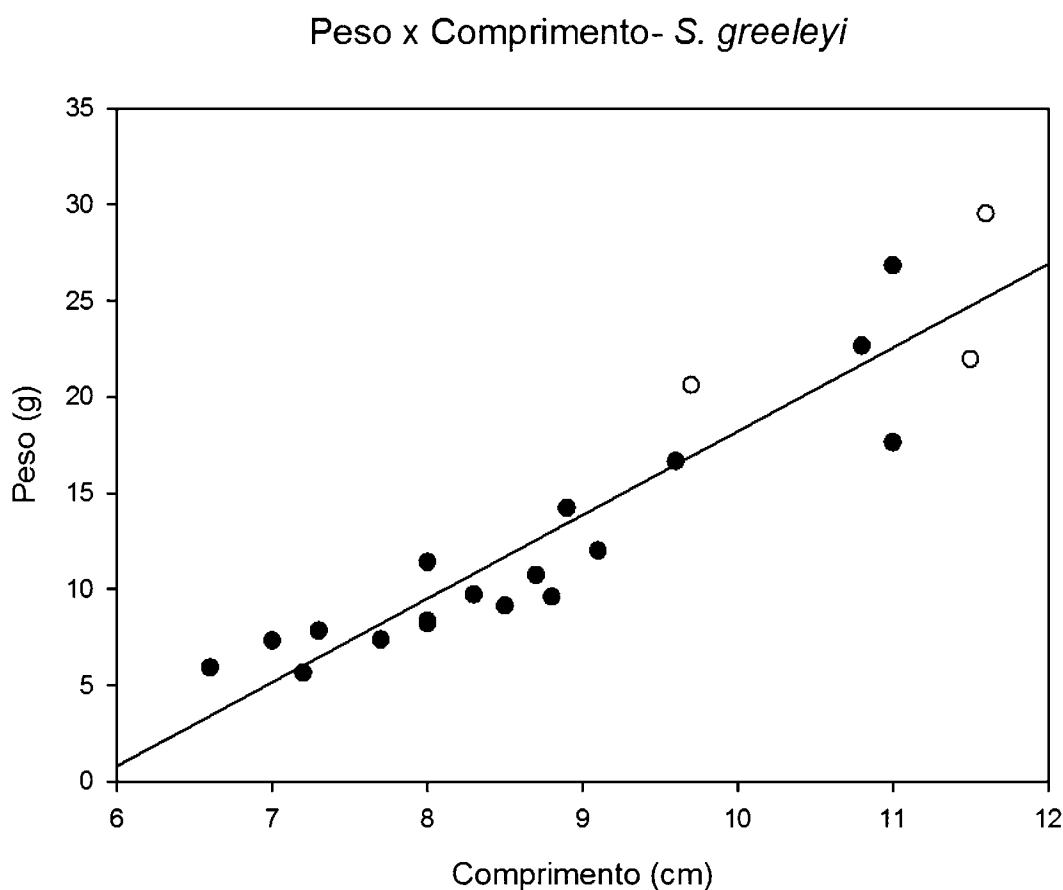


FIGURA 3. Relação Peso x Comprimento em *Sphoeroides greeleyi* em 0, 6 e 24 horas. Círculos pretos indicam animais que sobreviveram ao transporte (n=18); círculos brancos indicam animais que morreram após o transporte (n=3, até 24 horas).

Após análise da relação peso x comprimento em *S. greeleyi*, pode-se afirmar que os animais maiores são mais suscetíveis a não suportarem o transporte de 24 horas. Os espécimes com comprimento acima de 10 centímetros apenas sobreviveram em tempos curtos, até 6 horas. Em 24 horas houve a morte de três espécimes, todos possuíam mais de 10 centímetros. A partir de 72 horas nenhum espécime conseguiu sobreviver, independente de seu tamanho, portanto não foi observada relação entre o tamanho do indivíduo e a mortalidade nesse tempo.

#### **4.2 TEOR HÍDRICO TECIDUAL**

Os valores de hidratação tecidual mantiveram-se semelhantes, sem diferença estatística entre os grupos nas espécies analisadas (Figura 5). As diferenças significativas observadas foram entre as espécies dulcícolas e marinhas em tempos de 0 e/ou 72 horas. Entre *R. quelen* e *C. carpio* não houve diferenças em quaisquer tempos, o mesmo foi observado entre *B. soporator* e *S. greeleyi*. Porém, pode-se observar uma tendência de queda na manutenção do teor hídrico em espécies dulcícolas no tempo de 24 horas, com um reestabelecimento de uma condição mais próxima do ideal (controle) em 72 horas. Nas espécies marinhas, houve aumento da hidratação muscular em 6 horas, com redução gradativa, mas não significativa em tempos posteriores.

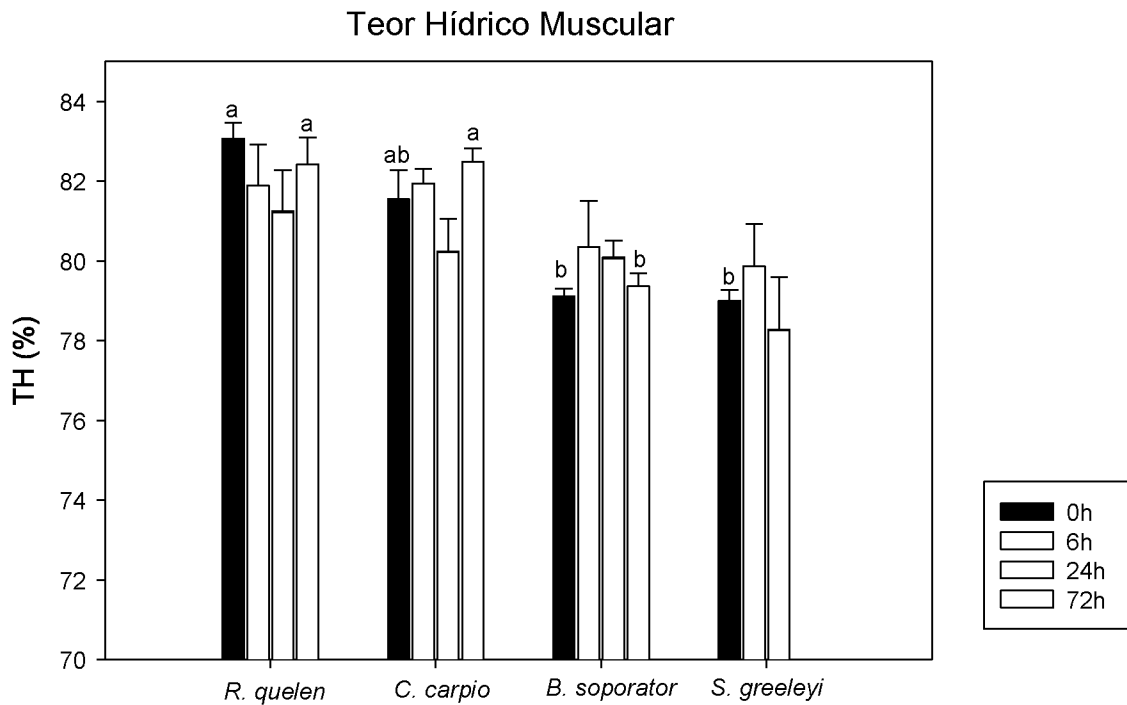


FIGURA 4: Valores de hidratação tecidual (%). Os teores hídricos das células dos indivíduos mantiveram-se numa faixa estável. Não houve diferenças significativas entre tempos. Letras minúsculas representam diferenças entre espécies em um mesmo tempo.  $p < 0.05$

### 4.3 GLICEMIA

Os valores de glicemia variaram muito entre espécies e até mesmo entre os indivíduos. Em *R. quelen*, os valores médios de glicemia variaram entre 14 e 39mg/dL. Em *C. carpio*, as médias por tempo mantiveram-se entre 42 e 61mg/dL. Em *S. greeleyi* houve uma tendência de aumento ao decorrer do tempo, não podendo ser confirmada em 72 horas. Porém, em *B. saporator* as diferenças foram significativas, de 72 horas para os outros tempos, o que pode levar a crer que essa espécie ativou mecanismos ligados ao metabolismo de glicose para manter a homeostase.

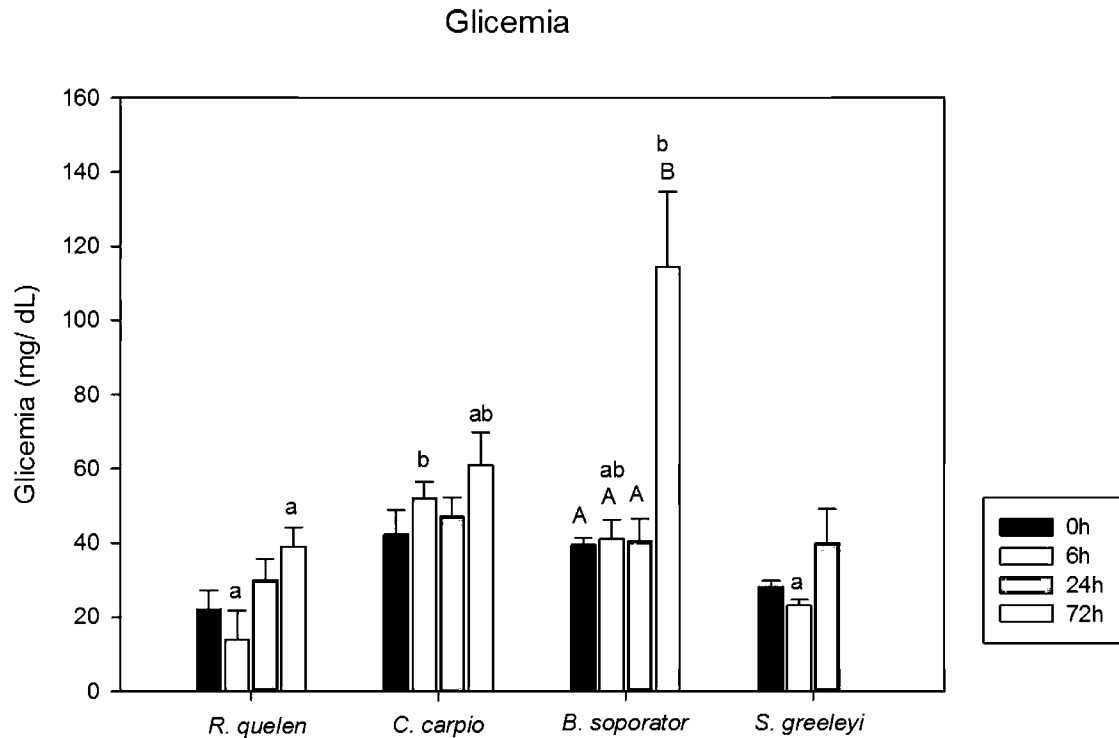


FIGURA 5: Glicemia medida nos indivíduos após a simulação de transporte. Letras maiúsculas indicam diferença significativa entre tempos de um mesmo grupo. Letras minúsculas indicam diferença significativas entre os grupos, em um mesmo tempo.  $6 > n < 9$

#### 4.4 ANIDRASE CARBÔNICA

A atividade de AC não sofreu alterações significativas em *R. quelen*, nem em *C. carpio*, apesar do aumento no tempo de 6 horas. Porém, quando comparadas entre si, a atividade da AC em *C. carpio* foi muito maior, com diferenças significativas em todos os tempos. Nas espécies marinhas a quantidade de proteína ativa diminuiu significativamente no último tempo testado (no caso de *B. saporator*, em 72 horas, e no caso de *S. greeleyi*, em 24 horas).

### Atividade da Anidrase Carbônica

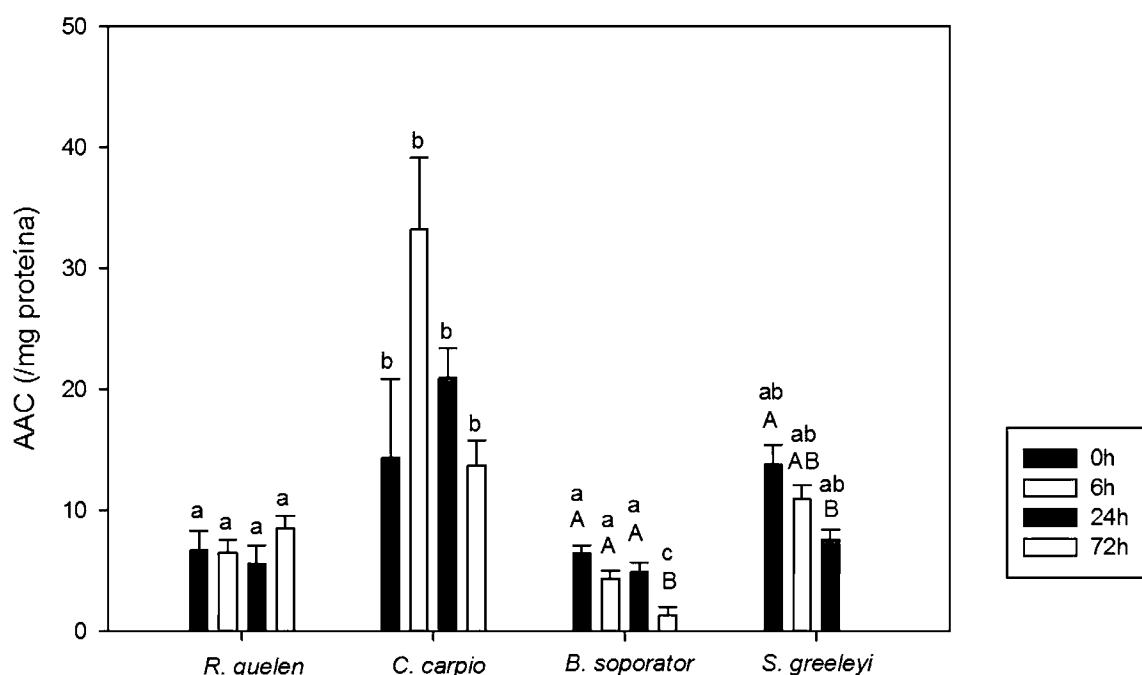


FIGURA 6: Atividade da enzima anidrase carbônica (AC) após a simulação de transporte individual. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os tempos de uma espécie. Letras minúsculas indicam diferenças entre as espécies em um mesmo tempo.  $6 > n < 9$

#### 4.5 AMÔNIA, OXIGÊNIO DISSOLVIDO E pH

Os parâmetros físicos e químicos da água foram medidos após a simulação de transporte, exceto em *S. greeleyi* (72h), em que a água não apresentava condições confiáveis para retirada de amostra.

Foram efetuados o teste de amônia total ( $\text{NH}_3$ ), pH e verificado o total de oxigênio dissolvido (OD) na água da embalagem de cada animal.

Os valores de amônia variaram entre: 0,0546 e 0,7423 mg/L em *R. quelen*; 0,2063 e 2,3889 mg/L em *C. carpio*; 0,3096 e 0,7871 mg/L em *B. saporator*; e 0,2452 e 1,2917 mg/L em *S. greeleyi*.

A concentração de amônia na água de transporte após a simulação teve tendência de aumento em todas as espécies. Em *R. quelen*, este aumento não foi significativo entre os tempos experimentais, apenas de 0 para 24 e 72 horas, o que já era esperado. A quantidade de amônia encontrada na água dos indivíduos de *B. saporator* foi baixa, e em *S. greeleyi* apresentou um aumento

abrupto em 24 horas, significativo em relação ao controle mas ainda não significativo em relação a 6 horas, porém, imagina-se que essa tendência se manteria em 72 horas, fato que pode estar ligado à mortalidade neste tempo. A amônia produzida pelos indivíduos de *C. carpio* foi a maior em quantidade, quando analisada uma relação tamanho x amônia.

Os valores de OD (Tabela 1) apresentaram tendência de queda em todas as espécies nos tempos 6h, 24h e 72h, exceto em *R. quelen*, que em 72h apresentou um aumento não significativo (de 7,61 para 9,14 mg/L).

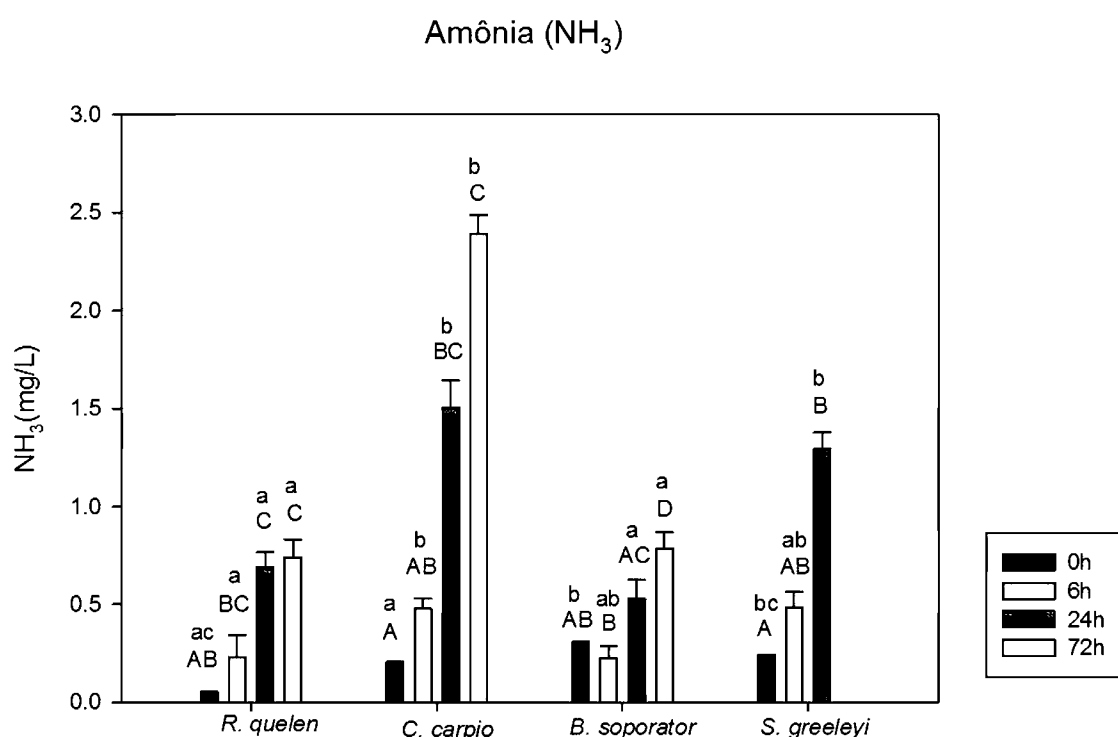


FIGURA 7: Amônia (NH<sub>3</sub>) encontrada na água após a simulação de transporte. Os valores de 0h representam o valor de amônia da água utilizada para o transporte, antes do início do experimento. Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos em uma mesma espécie. Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre espécies em um mesmo tempo. 6>n<9

Quanto ao oxigênio dissolvido (OD), os valores que mais chamam a atenção são em *C. carpio* e *B. saporator*, apesar de não chegarem a representar quadros de hipóxia.

O pH apresentou queda ao passar do tempo em todas as espécies. Quanto a *S. greeleyi*, não se observou uma queda relevante no OD que pudesse caracterizar hipóxia nos casos dos animais mortos. Porém, a queda significativa no pH aliado a um aumento na excreção de amônia nesta espécie, podem ajudar a explicar a mortalidade.

<b>A</b>	Tempos	OD Inicial	OD Final
<i>R. quelen</i>	Controle	6,26	6,26 ± 0,00 ac A
	6 horas	8,16	8,98 ± 0,30 B *
	24 horas	8,79	8,75 ± 0,48 a C
	72 horas	7,61	9,14 ± 0,18 a BC *
<b>B</b>			
<i>C. carpio</i>	Controle	5,59	5,59 ± 0,00 b A
	6 horas	9,87	8,39 ± 0,32 B *
	24 horas	8,79	8,64 ± 0,27 a B
	72 horas	7,4	6,87 ± 0,26 b AB
<b>C</b>			
<i>B. saporator</i>	Controle	6,08	6,08 ± 0,00 bc AB
	6 horas	8,66	7,84 ± 0,61 B *
	24 horas	9,27	6,25 ± 0,27 b AB *
	72 horas	6,58	5,24 ± 0,15 c A *
<b>D</b>			
<i>S. greeleyi</i>	Controle	6,45	6,45 ± 0,00 a A
	6 horas	7,8	7,46 ± 0,19 B
	24 horas	7,73	7,01 ± 0,29 c AB *
	72 horas	***	***

TABELA 1: Valores de OD (média + erro padrão), em mg/L, avaliados na água de transporte de *R. quelen* (n=6), *C. carpio* (n=6), *B. saporator* (n=7) e *S. greeleyi* (n=6, exceto em 24h, em que n=9). Controle= 0h. (\*) Indica diferença significativa nos valores iniciais e finais; Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos de uma mesma espécie; Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as espécies, em um mesmo tempo. (\*\*\*) Indicam a ausência de dados para o parâmetro para *S. greeleyi* em 72 horas, em que houve mortalidade total dos indivíduos, prejudicando a confiabilidade dos dados e inviabilizando a coleta das amostras.



<b>A</b>	Tempos	pH Inicial	pH Final
<i>R. quelen</i>	Controle	7,0	7,29 ± 0,00 ab A *
	6 horas	7,01	6,95 ± 0,03 a AB
	24 horas	7,09	6,70 ± 0,03 ab B *
	72 horas	6,95	6,69 ± 0,07 ab B *
<b>B</b>			
<i>C. carpio</i>	Controle	7,0	7,0 ± 0,00 c A
	6 horas	7,8	7,01 ± 0,06 ab AB *
	24 horas	6,87	6,20 ± 0,025 c C *
	72 horas	6,65	6,36 ± 0,10 a BC
<b>C</b>			
<i>B. saporator</i>	Controle	7,36	7,36 ± 0,00 a AB
	6 horas	8,04	7,59 ± 0,15 b A *
	24 horas	8,09	7,10 ± 0,04 a BC *
	72 horas	7,86	7,04 ± 0,06 b C *
<b>D</b>			
<i>S. greeleyi</i>	Controle	7,22	7,22 ± 0,00 bc A
	6 horas	7,0	6,85 ± 0,11 a AB
	24 horas	6,95	6,52 ± 0,07 bc B *
	72 horas	***	***

TABELA 2: Valores de pH inicial e final (média + erro padrão), em mg/L, avaliados na água de transporte de *R. quelen* (n=6), *C. carpio* (n=6), *B. saporator* (n=7) e *S. greeleyi* (n=6, exceto em 24h, em que n=9). Controle= 0h. (\*) Indica diferença significativa entre os valores iniciais e finais; Letras maiúsculas representam diferenças significativas entre os tempos em uma espécie; Letras minúsculas representam diferenças significativas entre as espécies, em um mesmo tempo. (\*\*\*) Indicam a ausência de dados para o parâmetro para *S. greeleyi* em 72 horas, em que houve mortalidade total dos indivíduos, prejudicando a confiabilidade dos dados e inviabilizando a coleta das amostras.

Foram encontradas correlações entre pH e amônia em todas as espécies: aumento na concentração da amônia levando à queda do pH. Além disso, outra relação observada foi entre pH e AAC nas espécies *B. saporator* e *S. greeleyi*, mostrando que a queda no pH nestes casos levou à diminuição na AAC.

## 5.DISCUSSÃO

### ***Rhamdia quelen***

Diferentemente do que fora hipotetizado, a espécie *R. quelen* foi a que menos sofreu com o estresse de transporte. Nenhum dos mecanismos regulatórios identificáveis pelos métodos utilizados neste trabalho parecem ter sido ativados. O aumento da quantidade de amônia na água de transporte é esperado, sendo originado naturalmente pelo metabolismo do animal. Apesar de significativo, este aumento não deve ter apresentado qualquer tipo de desafio à homeostase da espécie. Não houve risco de hipóxia para os indivíduos de *R. quelen*, e a AAC manteve-se regular em todos os tempos. A baixa variação na glicemia dos indivíduos leva a crer que não ocorreu nenhuma perturbação que demandasse de aumento no metabolismo energético. Ao analisar todos estes dados, chega-se à conclusão de que *R. quelen* apresenta boa capacidade de sobrevivência quando submetida a transporte tanto em curtas quanto em longas distâncias. Alguns trabalhos apontam a ocorrência de espécimes do gênero e até mesmo de *Rhamdia quelen* em ambientes de água salobra (Vargas & Bessonart, 2007; Milani & Fontoura, 2007; Souza-Bastos & Freire, 2009), ressaltando sua grande plasticidade ambiental, mesmo pertencendo a um grupo considerado estritamente dulcícola. A espécie lida bem com situações de estresse em ambiente estável, como é o caso do estresse de transporte. Quando ocorre a saturação de oxigênio no saco de transporte não há risco de hipóxia mesmo em transportes mais longos, o que faz de *R. quelen* uma boa espécie para ser transportada, apesar da ausência do interesse ornamental. Porém, parece ser uma ótima opção para uso científico.

### ***Cyprinus carpio***

Assim como ocorreu com *R. quelen*, não houve risco de hipóxia para *C. carpio*, com os valores mantendo-se sem qualquer variação significativa. Com a queda do pH em 72 horas, provavelmente decorrente do aumento na quantidade de amônia (uma correlação positiva foi encontrada), ocorre a

elevação da quantidade de amônia ionizada ( $\text{NH}_4$ ), menos tóxica para os peixes (Benli *et al.*, 2008; Randall and Tsui, 2002; Weihrauch *et al.*, 2009; Wilkie, 1997, 2002; Wright and Wood, 2009). Mesmo sendo menos tóxica do que a forma ionizada, esse ambiente torna-se altamente nocivo à homeostase dos animais, tendo em vista a possibilidade da ocorrência dos efeitos Bohr e Raiz. No entanto, a alta concentração de amônia no ambiente não parece ter causado qualquer tipo de perturbação mais grave para os indivíduos, tendo em vista que não houve variação no teor hídrico e nem mortalidade. Imagina-se que assim como ocorre com o peixe dourado, outro ciprinídeo (Sinha *et al.*, 2012), as carpas possuam um mecanismo de defesa contra o aumento da toxicidade causada pela amônia durante exposição por longos períodos, envolvendo respostas compensatórias bioquímicas e iônicas, melhorando a capacidade de excreção de amônia pelo indivíduo. Em experimentos com peixes dourados e com a própria carpa comum, foi observado que a taxa de excreção de amônia nesses organismos foi aumentada em animais alimentados, quando comparados com animais em jejum (Sinha, *et al.*, 2012; Diricx *et al.*, 2013). Este dado se contrapõe ao que é comumente empregado no transporte de peixes (e o que foi realizado neste estudo), em que busca-se efetuar o jejum dos indivíduos, diminuindo assim a taxa de excreção de amônia e conseqüentemente levando à diminuição da toxicidade ambiental (Harmon, 2009; Sampaio & Freire, 2016). Supõem-se que a eliminação da amônia pelas carpas pode ocorrer diretamente por trocas com  $\text{Na}^+$  (Wright, *et al.*, 1995). Neste caso, o aumento de amônia na água pode não refletir uma elevação da mesma no meio interno, nem toxicidade ao indivíduo. Vale ressaltar que a partir do tempo de 24 horas a concentração de amônia encontrada na água (132~221  $\mu\text{mol/L}$ , convertido de  $\text{mg/L}$ ) foi muito maior do que as utilizadas normalmente em experimentos de toxicidade (58,8  $\mu\text{mol/L}$ , em média) (Sinha *et al.*, 2012; Diricx *et al.*, 2013). Outros estudos sugerem o envolvimento de proteínas chaperonas, como as da família de Hsps (heat shock proteins) na proteção contra a toxicidade ocasionada pela amônia, com um aumento na síntese de Hsp70 em situações de estresse (Sung, *et al.*, 2012; Poltronieri, *et al.*, 2009). Pode-se concluir então que as carpas possuem tolerância a níveis acima dos considerados sub-letais de  $1\text{mg/L}$  (Diricx *et al.*, 2013), analisando os grupos de 24 e 72 horas, onde a concentração de amônia

ambiental esteve entre 1,5 e 2,5 mg/L. A ativação de respostas metabólicas contra a perturbação não foi muito custosa ao organismo, tendo em vista que não houve variações significativas na mobilização de glicemia e nem no consumo de OD. Outras variáveis relacionadas ao estresse de transporte, como deficit de OD e queda do pH não foram prejudiciais. Estes resultados vão de encontro com outro experimento realizado com transporte de carpas (Dobsikova, *et al.*, 2006).

### ***Bathygobius soporator***

O transporte proporcionou um desafio à homeostase das espécies de ambientes instáveis maior do que era esperado. Em *B. soporator* a queda de OD foi um fator limitante e prejudicial, com alterações significativas em todos os tempos, sendo mais incisivo em 72 horas. Foi observada uma queda a partir de 24 horas, seguida pelo aumento da concentração de amônia durante o mesmo período, indicando alta atividade metabólica. Após a realização de uma correlação de Pearson, ficou evidente que os valores de AAC de 6 a 24 horas tendem a cair junto com a concentração de OD. Essa relação mostra a importância da anidrase carbônica no controle da respiração em situações adversas, além do já conhecido papel na manutenção do equilíbrio ácido-base (Gilmour & Perry, 2009). É provável o envolvimento do Efeito Raiz e/ou do Efeito Bohr nesta espécie, a partir da queda do pH no ambiente, provavelmente afetando também os indivíduos. Essa queda no pH levou o organismo dos animais a exercer respostas compensatórias, como a diminuição da AAC, e ativar mecanismos energéticos, explicando o pico de glicemia em 72 horas. A importância da diminuição na AAC, como dito anteriormente, é facilitar o aporte de oxigênio ao diminuir a geração de CO<sub>2</sub> resultante da atividade da enzima. A partir de 72 horas, período de maior baixa na disponibilidade de oxigênio, a AAC chega próximo a zero, caracterizando um desequilíbrio na capacidade respiratória e de manutenção do pH interno.

Não existem muitas pesquisas de estresse relacionando *B. soporator*, muito menos de transporte com essa espécie, sendo a maior parte dos estudos relacionada a levantamento de ictiofauna, filogenética e resistência a altas

temperaturas (Vinagre et al., 2015; Freitas & Velastin, 2010; Lima et al., 2005; Andem et al., 2016; Brito & Miller, 2001; Macieira & Joyeux, 2011; Fanta, 1997; Rummer et al., 2009).

A elevada glicemia no organismo dos peixes é um clássico sinal de ativação de mecanismos energéticos, provocado pelo aumento da liberação de cortisol no plasma em resposta ao estresse. Um aumento significativo de amônia no ambiente é uma evidência a mais da elevada taxa metabólica da espécie, e que mobilização de reservas energéticas de fato foram necessárias, principalmente em 72 horas. A mobilização de reservas energéticas favorece a ativação de mecanismos compensatórios para lidar com um quadro de estresse acentuado, protegendo assim o meio interno.

Após a análise dos dados obtidos pelos experimentos com *B. soporator*, chega-se à conclusão de que a espécie em questão não é recomendada para utilização ornamental, tendo em vista a história evolutiva recente, de adaptação a ambientes extremamente instáveis (Rummer, et al., 2009). Imagina-se que peixes de região de poças de marés possuam mecanismos para lidar com casos de hipóxia durante períodos curtos e flutuantes de tempo, como funções circadianas (Fanta, 1997). Fato este que leva a crer que em casos de estresse contínuo, sem flutuações, sejam menos efetivos e necessitem de maior mobilização energética. Normalmente ambientes como aquários não possuem a instabilidade circadiana pela qual estes peixes estão adaptados. Porém, caso o transporte seja necessário, é preferível evitar que este seja próximo a 72 horas, quando as condições abióticas começam a oferecer um desafio mais sério para a homeostase de *B. soporator*.

Quando comparada a outra espécie que habita uma região próxima, também de poças de marés, *Abdefduf saxatilis*, percebemos diferenças nos padrões de respostas fisiológicas ao estresse de transporte. Para *B. soporator* os fatores prejudiciais à integridade do organismo foram relacionados à dificuldade de captação de oxigênio ocasionada pela queda no pH. Em estudo semelhante com *A. saxatilis* (popularmente conhecido como sargento), o fator mais diretamente relacionado a mortalidade também foi o pH (Sampaio, 2014). Mesmo com as semelhanças de habitat (e havendo a possibilidade de o sargento utilizar a poça apenas como berçário) e dos estressores, foram percebidas

peculiaridades em como as duas espécies lidaram com esses desafios, exaltando o fato de que cada espécie sofre perturbações e respondem de modos distintos. Por exemplo, enquanto *B. soporator* apresentou aumento de glicemia e diminuição na AAC, *A. saxatilis* não demonstrou a ativação dessas respostas, ocorrendo inclusive mortalidade em alguns indivíduos (Sampaio, 2014).

### ***Sphoeroides greeleyi***

A espécie que se mostrou menos resistente ao estresse de transporte foi *S. greeleyi*. Apesar de não se conhecer ao certo o motivo da mortalidade total em 72 horas, algumas hipóteses podem ser levantadas a partir da análise dos dados até 24 horas, tempo no qual também houve mortalidade (3 indivíduos). Analisando os dados apenas dos indivíduos de 24 horas, constatou-se diminuição significativa no valor de glicemia dos peixes mortos, indicando ineficiência do organismo na ativação de respostas metabólicas compensatórias. Mas o principal fator que pode estar ligado à mortalidade neste tempo é a queda de pH, somada à concentração de amônia na água de transporte. Pode-se sugerir que a queda de pH somada à amônia representam uma carga alostática em *S. greeleyi*, e nos indivíduos com mais de 9,7 cm de comprimento, esta condição foi mais significativa, gerando sobrecarga alostática.

Imagina-se então, que em 72 horas as condições de queda de pH e alta concentração de amônia tornaram-se mais significativas, acarretando sobrecarga a todos os espécimes, independente de comprimento, o que pode ter ocasionado a mortalidade total.

Assim como para *B. soporator*, podemos observar a possível ação dos efeitos Raiz e Bohr em *S. greeleyi*. Após uma correlação de Pearson entre pH x AAC, foi possível concluir que existe relação entre os dois fatores, e que possivelmente esses fatores estiveram envolvidos na mortalidade dos indivíduos de *S. greeleyi*. Outra hipótese que pode ser levantada e que pode estar ligada ao próprio fato descrito acima, é de acidose metabólica ocasionada por glicólise anaeróbica, quando ocorre a conversão de glicose a ácido láctico. A glicólise anaeróbica é um mecanismo observado em vertebrados, incluindo teleosteos (Hill *et al.*, 2012; Willmer *et al.*, 2005). Ao final do processo, o ácido láctico fica

retido no animal, o que pode gerar acidose metabólica. Este fato ajudaria a explicar tanto a mortalidade, quanto a queda no pH do ambiente e principalmente a diminuição da glicemia dos indivíduos mortos em 24 horas, que deve ser observada também em 72 horas. Porém, esse mecanismo ocorre na ausência de OD, fato esse que não foi detectado neste estudo. Pode-se concluir então, que a capacidade de captação de oxigênio pelos tecidos destes animais está comprometida.

É possível inferir um comprimento máximo para o transporte desta espécie, até 24 horas. Observa-se que todos os indivíduos acima de 9,7 cm morreram nesse tempo. Em 72 horas, todos os indivíduos morreram, independente do comprimento. Assim, sugere-se que o tamanho máximo para o transporte de *S. greeleyi* não ultrapasse 9,5 cm, e estudos posteriores com tempos intermediários entre 24 e 72 horas (48 horas por exemplo), são importantes para a determinação de um tempo máximo de transporte dos indivíduos desta espécie de baiacu.

### **Qualidade da água de transporte**

A qualidade da água de transporte é caráter fundamental para o transporte de teleósteos. Neste trabalho o parâmetro que mais afetou a qualidade da água e causou estresse aos indivíduos foi o pH. A amônia também ocasionou deterioração, fazendo com que o pH da água caísse, fato justificado ao efetuar uma correlação de Pearson. Essa relação ocorreu em todas as espécies.

Os valores de hidratação do tecido muscular não sofreram alterações significativas entre os tempos de uma mesma espécie. Este fato sugere que o estresse originado pelo transporte dos espécimes não chegou a causar danos diretos no equilíbrio osmótico das células dos indivíduos. Esta condição já era esperada, tendo em vista a importância da manutenção do conteúdo intracelular e do equilíbrio osmótico em espécies aquáticas. Caracteristicamente, teleósteos de ambiente marinho possuem um percentual de hidratação muscular levemente inferior quando comparados a teleósteos dulcícolas, como observado nos resultados deste trabalho. Isto se deve à tendência natural que peixes de

ambientes marinhos possuem (perder água, por serem hiposmóticos em relação ao ambiente), exatamente o inverso do que ocorre com peixes de ambientes dulcícolas, que são hiperosmóticos em relação ao ambiente (Hill *et al.*, 2012; Willmer *et al.*, 2005).

O OD é tido como o fator mais problemático aos organismos aquáticos submetidos ao transporte, sendo um causador de mortalidade. Os níveis de oxigênio dissolvido na água considerados normais são acima de 6mg/L (Ashley, 2007). Neste estudo esta variável não foi um grande problema. Outro fator indicado pela literatura como nocivo para os peixes durante o transporte é o aumento da amônia na água, produto do metabolismo dos animais (Harmon, 2009).

É possível concluir que os efeitos Bohr e Raiz tiveram papel importante e relação com a deterioração do ambiente no transporte de peixes, tendo sido observado nas espécies de ambientes instáveis. Apesar da aplicação de oxigênio na água de transporte, a queda de pH compromete a captação de oxigênio pelos espécimes, portanto esse fator demanda uma preocupação constante. Porém, para uma abordagem mais completa da capacidade resiliente de cada espécie, deve-se levar em conta a origem do grupo, ou seja, a ancestralidade recente ou não à região de água doce ou marinha. Afinal, os desafios ambientais a que os animais estão sujeitos habitualmente são os mais diversos, e a evolução dos mesmos pode ter privilegiado características variadas. Além disso, espécies de cativeiro tendem a ser mais resistentes do que espécies retiradas do seu ambiente de origem, por passarem por processos de melhoramento e seleção artificial. Esse fato pode ter auxiliado na resistência das espécies de água doce utilizadas nesse trabalho.



## 6.CONCLUSÃO

A instabilidade ou estabilidade do ambiente não foi característica determinante para a capacidade de tolerância ao estresse de transporte entre as espécies estudadas. As espécies de ambientes instáveis *B. soporator* e *S. greeleyi* sofreram mais com o estresse de transporte do que as espécies de ambientes estáveis *R. quelen* e *C. carpio*, fatos estes que não corroboram a hipótese levantada neste estudo. Não houve a oportunidade de estudar a tolerância ao transporte em animais marinhos de ambiente estável, o que enriqueceria mais a discussão. Conclui-se que de fato é necessário um estudo específico do estresse envolvido no transporte de cada espécie de interesse.

## REFERÊNCIAS

- Albert, J.S.; Lovejoy, N.R.; Crampton, W.G.R. (2006) Miocene tectonism and the separation of cis- and trans- Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, v.21, 14-27;
- Andem, A. B., Ben Ekanem, S., & Oku, E. E. (2016). Environmental Variables and Ecological Distribution of Ichthyofauna Assemblages in the Calabar River, Nigeria: Present and Future Prospects. *Croatian Journal of Fisheries*, 74(4), 159-171;
- Ashley, P. J. (2007). Fish welfare: current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, 104(3), 199-235;
- Baldiserotto, B. (2009) Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Editora UFSC, Santa Maria;
- Balon, E. K. (1995) Origin and domestication of the wild carp, *Cyprinus carpio*: from Roma gourmets to the swimming flowers. *Aquaculture*, 129, 3-48;
- Bane, V.; Lehane, M.; Dikshit, O'Riordan, A.; Furey, A. (2014) Tetrodotoxin: chemistry, toxicity, source, distribution and detection. *Toxin*, 6, 693-755;
- Barton, B. A.; and George K. I. (1991) Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1, 3-26;
- Barton, B. A.; Morgan, J. D; Vijayan, M. M. (2002) Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. *Biological indicators of aquatic ecosystem stress*, 111-148;
- Benli, A. Ç. K., Köksal, G., & Özkul, A. (2008). Sublethal ammonia exposure of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): effects on gill, liver and kidney histology. *Chemosphere*, 72(9), 1355-1358;

Berra, T. (2001) Freshwater fishes distribution. San Diego, CA: Academic Press;

Betancur-Rodriguez; *et al.* (2016) Phylogenetic classification of bony fishes Version 4. Deepfin;

Betancurt, R.; Orti, G.; Pyron, R.A. (2014) Fossil-based comparative analyses reveal ancient marine ancestry erased by extinction in ray-finned fishes. *Ecology Letters*, v. 18, 441-450;

Bonga, S.E.W (1997) The stress response in fish. *Physiological reviews*, 1997 - Am Physiological Soc;

Brabo, M. F.; Pereira, L. F. S.; Santana, J. V. M; Campelo, D. A. V.; Veras, G. C. (2016) Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. *Acta Fish. Aquat. Res.* 4, 50-58;

Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry* 72, 248-254;

Brito, A., & Miller, P. J. (2001). Gobiid fishes from the Cape Verde Islands, including two new species of *Gobius* (Teleostei: Gobioidae). *Journal of Natural History*, 35(2), 253-277;

Britski, H.A.; Sato, Y.; Rosa, A.B.S. (1988) Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3ªed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação- CODEVASF 115p;

Carmichael, Gary J. (1984) Long distance truck transport of intensively reared largemouth bass." *The Progressive Fish-Culturist* 46.2, 111-115;

Chau, R.; Kalaitzis, J.A.; Neilan, B.A. (2011) On the origins and biosynthesis of tetrodotoxin. *Aquatic toxicology*, 104, 61-72;

Chippari-Gomes, A.R. Temperaturas letais de larvas e alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824 – PISCES, PIMELODIDAE). Santa Maria – RS, 1998. 70 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pósgraduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1998;

Cull, F. (2015) Puff and bite: The relationship between the glucocorticoid stress response and anti-predator performance in checkered puffer. *General and comparative endocrinology*, vol:214 pg:1;

Darcy, G.H. (1980) Comparison of ecological and life history information on gobiid fishes, with emphasis on the south-eastern United States. NOAA Tech. Mem. NMFS-SEFC-15. 53pg;

Diricx, M., Sinha, A. K., Liew, H. J., Mauro, N., Blust, R., & De Boeck, G. (2013). Compensatory responses in common carp (*Cyprinus carpio*) under ammonia exposure: Additional effects of feeding and exercise. *Aquatic toxicology*, 142, 123-137;

Dobšíková, R., Svobodová, Z., Blahová, J., Modrá, H., & Velíšek, J. (2006). Stress response to long distance transportation of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 75(3), 437-448;

Elmqvist, T., Folke, C., Nyström, M., Peterson, G., Bengtsson, J., Walker, B., & Norberg, J. (2003). Response diversity, ecosystem change, and resilience. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(9), 488-494;

Fanta, E. (1997). Behaviour and orcadian rhythm of the fish bathygobius soporator Valenciennes (Gobiidae) under the influence of environmental salinity and temperature. *Revista Brasileira de Zoologia*, 14(1), 221-244;

FAO, (2009) fao.org.br. última visualização: 21/06/2017;

Figueiredo, J.L.; Menezes, N.A. (2000) Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. VI. Teleostei (5). São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 116pg;

Floeter, S.R.; Gasparini, J.L.; Rocha, L.A.; Ferreira, C.E.L.; Rangel, C.A.; Feitoza, B.M. (2003) Brazilian reef fish fauna: checklist and remarks. Brazilian Reef Fish Project;

Freire, C. A., Amado, E. M., Souza, L. R., Veiga, M. P., Vitule, J. R., Souza, M. M., & Prodocimo, V. (2008). Muscle water control in crustaceans and fishes as a function of habitat, osmoregulatory capacity, and degree of euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149(4), 435-446;

Freitas, M. O., & Velastin, R. (2010). Ichthyofauna associated with a culture of mussel *Perna perna* in Northern Santa Catarina, Southern Brazil/Ictiofauna associada a um cultivo de mexilho *Perna perna* (Linnaeus, 1758) Norte Catarinense, Sul do Brasil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 32(1), 3138;

Friedman, M. (2015) The early evolution of ray-finned fishes. *Palaeontology*, Vol.58, Part 2, 213-228;

Gallo, V. P., & Civinini, A. (2003). Survey of the adrenal homolog in teleosts. *International review of cytology*, 230, 89-187;

Gamper, N. L., & Savina, M. V. (2000). Reversible metabolic depression in hepatocytes of lamprey (*Lampetra fluviatilis*) during pre-spawning: regulation by substrate availability. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 127(2), 147-154;

Garcia, C. Estudos cromossômicos e moleculares em Rhamdia (Pisces, Siluriformes, Heptapteridae): análise de relações evolutivas. (2009) Tese (Doutorado em Biologia (Genética)) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009;

Giles, S., Friedman, M. (2014) Virtual reconstruction of endocast anatomy in early ray-finned fishes (Osteichthyes, Actinopterygii). *Journal of Paleontology*, 88, 636-651;

Gilmour, K. M., & Perry, S. F. (2009). Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *Journal of Experimental Biology*, 212(11), 1647-1661;

Gross (1968) Paleontology Database: *Andreolepis hedei*. Última visita em 10/05/2017- fossilworks.org;

Hammer, M. P., Bice, C. M., Hall, A., Frears, A., Watt, A., Whiterod, N. S. & Zampatti, B. P. (2013). Freshwater fish conservation in the face of critical water shortages in the southern Murray–Darling Basin, Australia. *Marine and Freshwater Research*, 64(9), 807-821;

Harmon, T. S. (2009). Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. *Reviews in Aquaculture*, 1(1), 58-66;

Harrison, I.J.; Miller, P.J.; Pezold, F. (2003) Faune des poisons d'eaux douce et saumâtres de l'Afrique de l'Ouest, Tome 2. Coll. Faune et Flore tropicales 40. Musée Royal de l'Afrique Centrale, Paris, France and Institut de Recherche pour le Développement. 815 pg;

Hill, R. W.; Wyse, G. A.; Anderson, M. (2012) *Animal Physiology*. Third ed. Sinauer Associations Inc. 800 pg;

Hulata, G. (1995) A review of genetic improvement of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) and other cyprinids by crossbreeding, hybridization and selection. *Aquaculture*, 129, 143-155;

IUCN red list.(2017) Disponível em: [iucnredlist.org](http://iucnredlist.org). Última visita em: 23/05/2017;

Iwama, G. K. (1998). Stress in fish. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851(1), 304-310;

Iwama, G. K., McGeer, J. C., & Pawluk, M. P. (1989). The effects of five fish anaesthetics on acid–base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. *Canadian Journal of Zoology*, 67(8), 2065-2073;

John Wiley & Sons, Perdices, A.; Bermingham, E.; Montilla, A.; Doadrio, I. (2002) Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. *Mol Phylogenet Evol* 25:172-189;

Kardong, K. (2015) *Vertebrates: Comparative anatomy, function, evolution*. New York: McGraw-Hill education. 99-100;

Kottelat, M.; Freyhof, J (1972) *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. 646 pg;

Lago, J.; Rodriguez, L.P.; Blanco, L.; Vieites, J.M.; Cabado, A.G. (2015) Tetrodotoxin, an extremely potent marine neurotoxin: distribution, toxicity, origin and therapeutical uses. *Marine Drugs*, 13, 384- 406;

Larsen, C. S. (2011) *Our origins: discovering physical anthropology- 2 ed*. Norton, p A11;

Larsson, Å., Haux, C., & Sjöbeck, M. L. (1985). Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9(3), 250-281;

Lima, D., Freitas, J. E. P., Araujo, M. E., & Solé-Cava, A. M. (2005). Genetic detection of cryptic species in the frillfin goby *Bathygobius soporator*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 320(2), 211-223;

Macieira, R. M., & Joyeux, J. C. (2011). Distribution patterns of tidepool fishes on a tropical flat reef. *Fishery Bulletin*, 109(3), 305;

Marchioro, M.I. Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, *Pimelodidae*) à variação de pH e salinidade da água de cultivo. Santa Maria, RS, 1997. 87p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1997;

McDonald, G., & Milligan, L. (1997). Ionic, osmotic and acid-base regulation in stress. *Fish stress and health in aquaculture*, 62, 119-145;

McEwen, B. S., & Stellar, E. (1993). Stress and the individual: mechanisms leading to disease. *Archives of internal medicine*, 153(18), 2093-2101;

McEwen, B. S., & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and behavior*, 43(1), 2-15;

McEwen, B.S; Wingfield, J.C. (2010) What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Hormones and behavior*;

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(1), 82-125;

Miller, P. J. (1990) Check-list of the fishes of the eastern tropical Atlantic (CLOFETA) Gobiidae. JNICT, Lisbon, SEI, Paris. And UNESCO, Paris. Vol.2;



Milligan, C. L., & Wood, C. M. (1986). Tissue intracellular acid-base status and the fate of lactate after exhaustive exercise in the rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 123(1), 123-144;

Near, T. J.; *et al.* (2012) Resolution of ray-finned fish phylogeny and timing of diversification. *PNAS*- vol. 109, no. 34;

Nelson, J.S. (2006) *Fishes of the World*. [S.I]: John Wiley & Sons, Inc.

Pelster, Bernd & Weber, Roy. (1991). The Physiology of the Root Effect. *Advances in Comparative & Environmental Physiology*. 8. 51-77.

Poltronieri, C., Negrato, E., Bertotto, D., Majolini, D., Simontacchi, C., & Radaelli, G. (2008) Immunohistochemical localization of constitutive and inducible Heat Shock Protein 70 in carp (*Cyprinus carpio*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to transport stress. *European journal of histochemistry: EJH*, 52(3), 191;

Prodocimo, V., & Freire, C. A. (2001). Ionic regulation in aglomerular tropical estuarine pufferfishes submitted to sea water dilution. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 262(2), 243-253;

Quignard, J.P.; Tomasini, J. A. (2000) Mediterranean fish biodiversity. *Biol. Mar. Mediterr.* 7 (3), 1-66;

Rodríguez-Serrano, M.(2009) Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology* 150.1, 229-243;

Rummer, J. L., Fangué, N. A., Jordan, H. L., Tiffany, B. N., Blansit, K. J., Galleher, S. & Bennett, W. A. (2009). Physiological tolerance to hyperthermia and hypoxia and effects on species richness and distribution of rockpool fishes of Loggerhead Key, Dry Tortugas National Park. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 371(2), 155-162;

Rummer J.L., McKenzie D.J., Innocenti A., Supuran C.T., Brauner C.J. (2013) Root Effect Hemoglobin May Have Evolved to Enhance General Tissue Oxygen Delivery. *Science* 340, 1327-1329.

Sampaio, F. D., & Freire, C. A. (2016). An overview of stress physiology of fish transport: changes in water quality as a function of transport duration. *Fish and Fisheries*, 17(4), 1055-1072;

Sampaio, F.D.F (2014) Estresse do Transporte de Peixes Ornamentais Marinhos: Aspectos Políticos para a Conservação, Aplicação Comercial e Avaliação Experimental. Tese doutorado, UFPR;

Schluter, D. (2000) The ecology of adaptative radiation. Oxford University Press, 10-11;

Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: the roles of allostasis an hormesis. *General and comparative endocrinology*, 165(3), 549-556;

Schultz, Y. D.; Favaro, L. F.; Spach, H. L. (2002) Aspectos reprodutivos de *Sphoeroides greeleyi* (Gilbert), Pisces, Osteichthyes, Tetraodontidae, da gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 19, 65-76;

Scott, W.B.; Crossman, E.J. (1973) Freshwater fishes of Canada. Bull. Fish. Res. Board Can, 184. 1-966;

Sferco, E.; Lopes-Arbarello, A.; Baez, A.M. (2015) Phylogenetic relationships of †*Luisiella feruglioi* (Bordas) and the recognition of a new clade of freshwater teleosts from the Jurassic of Gondwana. *BMC Evolutionary Biology*, v. 15, 268-283;

Shukla, A, N. (2009) Physiology of fishes. Discovery Publishing House, 334 pg.

Silfvergrip, A.M.C., 1996. A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei Pimelodidae). Swedish Museum of Natural History, Stockholm;

Sinha, A. K., Liew, H. J., Diricx, M., Blust, R., & De Boeck, G. (2012). The interactive effects of ammonia exposure, nutritional status and exercise on metabolic and physiological responses in gold fish (*Carassius auratus* L.). *Aquatic toxicology*, 109, 33-46;

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

Spillman, C. J. (1961) Faune de France: Poissons d'eau douce. Fédération Française des sociétés naturelles, Tome 65. Paris. 303 pg;

Steffens, W. (1989). Principles of fish nutrition. Ellis Horwood Limited; Sterling P., & Eyer, J. (1988). Allostasis: A new paradigm to explain arousal pathology. In S. Fisher & J. Reason (Eds.), *Handbook of life stress, cognition and health* (pp. 629-649);

Sterling, P. (2012). Allostasis: a model of predictive regulation. Cambridge University Press, UK. Pg 17-74.

Sung, Y. Y., Roberts, R. J., & Bossier, P. (2012). Enhancement of Hsp70 synthesis protects common carp, *Cyprinus carpio* L., against lethal ammonia toxicity. *Journal of fish diseases*, 35(8), 563-568;

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;

Verde, C., Vergara, A., Giodano, D., Mazzarella, L., & Di Prisco, G. (2007) The Root effect- A structural and evolutionary perspective. *Antarctic Science*, 19 (2), 271-278;

Vijayan, M. M., Reddy, P. K., Leatherland, J. F., & Moon, T. W. (1994). The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. *General and comparative endocrinology*, 96(1), 75-84;

Vinagre, C., Leal, I., Mendonça, V., & Flores, A. A. (2015). Effect of warming rate on the critical thermal maxima of crabs, shrimp and fish. *Journal of thermal biology*, 47, 19-25;

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, 121-129;

Willmer, P.; Stone, G.; Johnston, I. (2005) *Environmental Physiology of Animals*. Second ed. Blackwell Science, Oxford, U.K. 754 pg;

Wilson, E.; Eisner, T.; Briggs, W.; Dickerson, R.; Metzenberg, R.; O'brien, R.; Susman, M.; Boggs, W. (1974) *Life on Earth: The Multiplication of Species; Biogeography*, Sinauer Associates, Inc., Publishers, Stamford, Connecticut, 824–877;

Wood, E. (2001) *Global Advances in Conservation and Management of Marine Ornamental Resources*. *Aquarium sciences and conservation*. Vol 3, 65 pg;

Wright, P. A. (1995). Nitrogen excretion: three end products, many physiological roles. *Journal of Experimental Biology*, 198(2), 273-281.