



Universidade Federal de São Carlos

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DO JEJU

***Hoplerythrinus unitaeniatus* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE)**

A EXPOSIÇÃO AÉREA.

WAGNER DOS SANTOS MARIANO

**SÃO CARLOS – SP
2006**

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DO JEJU
***Hoplerythrinus unitaeniatus* (CHARACIFORMES, ERYTHRINIDAE)**
A EXPOSIÇÃO AÉREA.

WAGNER DOS SANTOS MARIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

SÃO CARLOS – SP
2006

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M333rf

Mariano, Wagner dos Santos.

Respostas fisiológicas e bioquímicas do jeju
Hoplerythrinus unitaeniatus (Characiformes, Erythrinidae) a
exposição aérea / Wagner dos Santos Mariano. -- São
Carlos : UFSCar, 2006.
72 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2006.

1. Fisiologia comparada. 2. Estresse. 3. *Hoplerythrinus
unitaeniatus*. 4. Metabolismo oxidativo. 5. Peixe. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)

ORIENTADORA:

Prof^ª Dr^ª MARISA NARCISO FERNANDES

Dedico ao meu querido avô
João dos Santos (*in
memorian*) pelo exemplo de
vida e amor incondicional.

“...Valeu a pena, sou pescador de ilusões...”

AGRADECIMENTOS

A Jesus Cristo pela vida e constante cuidado a mim, minha família e todos aqueles que amo.

À Professora Doutora Marisa Narciso Fernandes pela oportunidade, dedicação e exemplo profissional.

À minha família: meus pais Cláudio e Tereza, meus irmãos Marcelo, Cláudia, e Elaine, meus cunhados Marcio e Carlos e meus lindos sobrinhos Lucas, Amanda e Maria Eduarda por acreditarem nos meus sonhos e fazerem parte deles.

Ao meu mais que amigo Eltongil pelos incentivos e por estar ao meu lado nos dias de sol e de chuva.

Ao meu primo-irmão Alexandre por fazer parte de vários bons capítulos da minha história.

Às minhas queridas e inteligentes amigas Eliane e Laila por me ensinarem e ajudarem durante os experimentos, as análises e redação da presente dissertação. Além da amizade e convivência.

Ao grande amigo Fábio pela sugestão do tema deste trabalho e por todos os bons momentos que compartilhamos.

Aos amigos do laboratório: Fernada, Lenise, Cheila, Lyandra, Cleo, Cleoni, Thiagos (s), Cleverson, Patrícia, Vanessa, Mônica, Kátia, Diana, Marise, André, Cláudio e Telma por me ajudarem direta ou indiretamente nesta minha jornada.

Aos amigos de Campo Grande: Nely Jane, Guilherme, Viviane e Flávio pelo prazer da companhia e amizade.

À minha Grande Família: Avó, tios (as), primos (as) por acreditarem nos meus projetos e me incentivarem sempre.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin por permitir utilização dos equipamentos necessários nas análises dos intermediários metabólicos.

À Professora Doutora Elizabete Urbinati (Unesp – Jaboticabal) e a técnica do laboratório Damaris pela análise do cortisol.

A todos os professores do departamento de Ciências Fisiológicas, em especial a Prof^a Dr^a Keiko e Prof^a Dr^a Ana Lúcia, pelos ensinamentos constantes.

Aos membros da banca examinadora, Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho e Profa. Dra. Lucia Helena de Aguiar pelas sugestões.

À Prof^a Msc. Mainaide Velasques Zanotto e a Universidade Católica Dom Bosco (UCDB) pela oportunidade de trabalho como docente.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento e aprimoramento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Estresse em Peixes.....	01
1.2 Radicais Livres, Defesas Antioxidantes e Estresse Oxidativo.....	04
1.3 Respiração em Peixes.....	10
2. OBJETIVO.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 A espécie: <i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>.....	15
3.2 Desenho Experimental.....	16
3.3 Análises Sangüíneas.....	18
3.3.1 pH sanguíneo.....	18
3.3.2 Hematócrito (Hct).....	18
3.3.3 Contagem de Eritrócitos (RBC).....	18
3.3.4 Dosagem de Hemoglobina Total ([Hb]).....	19
3.3.5 Índices Hematimétricos.....	19
3.4 Análises Plasmáticas.....	20
3.4.1 Amônia.....	20
3.4.2 Piruvato.....	20
3.4.3 Lactato.....	21
3.4.4 Glicose.....	21
3.4.5 Osmolalidade.....	21
3.4.6 Íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻.....	22

3.4.7	Cortisol.....	22
3.5	Peroxidação Lipídica, Enzimas Antioxidantes e Proteínas Totais.....	22
3.5.1	Hidroperóxido de Lipídios (FOX).....	22
3.5.2	Superóxido Dismutase (SOD).....	23
3.5.3	Glutathiona Peroxidase (GPX).....	23
3.5.4	Catalase (CAT).....	24
3.5.5	Proteínas Totais.....	24
3.6	Análise Estatística.....	25
4.	RESULTADOS.....	26
4.1	Cortisol e Glicose.....	26
4.2	Intermediários Metabólicos Plasmáticos.....	28
4.3	Osmolalidade Plasmática, pH sanguíneo e íons.....	31
4.4	Parâmetros Hematológicos.....	35
4.5	Hidroperóxidos de lipídios Proteínas Totais e Enzimas Antioxidantes.....	35
4.5.1	Análises Plasmáticas.....	35
4.5.2	Análises do Tecido Hepático.....	38
5.	DISCUSSÃO.....	46
5.1	Defesas Antioxidantes e estresse oxidativo.....	51
6.	CONCLUSÃO.....	57
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila.
.....07
- Figura 2.** Peroxidação lipídica iniciada pelo radical hidroxila
.....09
- Figura 3.** O jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (GILL, 1895). Foto: Sandro E. Moron.
.....14
- Figura 4.** O jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* exposto ao ar atmosférico.
.....17
- Figura 5.** Valores médios (\pm E.P.M) das concentrações de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) e glicose (nmol/ml) plasmáticos de *H. unitaeniatus* (n = 8) do grupo controle (T0), durante exposição ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação em meio aquático (TR1 e TR6). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).
.....27
- Figura 6.** Valores médios (\pm E.P.M) dos níveis plasmáticos de lactato, piruvato e amônia (nmol/mL) do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.
.....30
- Figura 7.** Valores médios (\pm E.P.M) da osmolalidade plasmática (mOsmol/kg H₂O) e pH sanguíneo de *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).
.....33

Figura 8. Valores médios (\pm E.P.M) da concentração de íons plasmáticos (mEq/L) de *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

.....34

Figura 9. Valores médios (\pm E.P.M) dos parâmetros hematológicos do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle, T0.

.....37

Figura 10. Valores médios (\pm E.P.M) da concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol Fe³⁺/g tec.) e Proteínas Totais (mg/mL) plasmáticos do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

.....40

Figura 11. Valores médios (\pm E.P.M) de atividade específica das enzimas antioxidantes Glutathiona Peroxidase –GPX (nmol/mg prot) e Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) plasmáticas do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

.....41

Figura 12. Valores médios (\pm E.P.M) da concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol Fe³⁺/g tec.) e Proteínas Totais (mg/mL) hepáticas do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

.....44

Figura 13. Valores médios (\pm E.P.M) de atividade específica das enzimas antioxidantes Glutathiona Peroxidase –GPX (nmol/mg prot), Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) e Catalase - CAT (U B/mg prot) hepático do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

.....45

Figura 14. Glutathione peroxidase remove peróxido de hidrogênio, bem como peróxidos de lipídios. Adaptado de Devlin (2003).

.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios (\pm E.P.M) das concentrações de cortisol ($\mu\text{g/dL}$) e glicose (nmol/ml) plasmáticos de *H. unitaeniatus* ($n = 8$) do grupo controle (T0), durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação em meio aquático (TR1 e TR6). * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

.....27

Tabela 2. Valores médios (\pm E.P.M) das concentrações plasmáticas de lactato, piruvato e amônia (nmol/mL) do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático ($n = 8$). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.

.....29

Tabela 3. Valores médios (\pm E.P.M) de concentração dos íons plasmático (mEq/L), osmolalidade e pH sanguíneo ($\text{mOsmol/kg}_{\text{H}_2\text{O}}$) do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático ($n = 8$). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.

.....32

Tabela 4. Valores médios (\pm E.P.M) dos parâmetros hematológicos do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático ($n = 8$). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.

.....36

Tabela 5. Valores médios (\pm E.P.M) da concentração de Hidroperóxidos (HP) ($\text{nmol Fe}^{3+}/\text{g tec.}$), Proteínas Totais (mg/mL) e das enzimas antioxidantes Glutathiona Peroxidase –GPX (nmol/mg prot) e Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) plasmáticos do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático ($n = 8$). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

.....39

Tabela 6. Valores médios (\pm E.P.M) da concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol Fe^{3+} /g tec.), Proteínas Totais (mg/mL) e das enzimas antioxidantes Glutathione Peroxidase –GPX (nmol/mg prot) e Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) hepáticos do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

RESUMO

As respostas fisiológicas e bioquímicas de jejum, *Hoplerthrinus unitaeniatus* a exposição ao ar foram analisadas após 1 (T1), 6 (T6) e 12 (T12) horas de exposição ao ar e 1 (TR1) e 6 (TR6) horas após o retorno ao ambiente aquático. As concentrações plasmáticas de cortisol e glicose foram significativamente maiores que as do grupo controle (T0) em 1 e 6 horas e 1, 6 e 12 horas em exposição ao ar, respectivamente. Desequilíbrio iônico e ácido-base durante exposição aérea foram evidenciados pela redução do Na^+ e K^+ plasmático e pH com subsequente restauração do equilíbrio ácido-base quando o animal retornou ao meio aquático. Acúmulo de amônia foi observado em todos os grupos experimentais, aumentando progressivamente durante a exposição ao ar de 102,20 nmol/mL em T0 para 339,53 nmol/mL em T12. Durante recuperação em meio aquático, a amônia mostrou tendência a diminuir mas ainda foi significativamente maior do que a do grupo controle. A concentração de lactato mostrou tendência a aumento durante a exposição aérea, mais foi significativamente maior apenas após 1h de recuperação em meio aquático (de 4115,42 nmol/mL em T0 para 6423,84 nmol/mL no grupo TR1) enquanto que o piruvato aumentou após 6 horas de recuperação (de 171,87 nmol/mL no T0 para 243,96 nmol/mL no TR6) no meio aquático. O hematócrito, número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e concentração de hemoglobina corpuscular média aumentaram significativamente nos animais expostos ao ar atmosférico. Durante a primeira hora de exposição ao ar houve aumento de hidroperóxidos de lipídeos (HP). Durante a exposição aérea ocorreu diminuição da atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) e aumento da atividade glutatona peroxidase (GPX). A exposição ao ar atmosférico pode ser caracterizada como um agente estressor para *H. unitaeniatus* e implica em ajustes fisiológicos para manter a transferência do O_2 atmosférico para os tecidos e a homeostase e mobilização de energia.

ABSTRACT

The physiological and biochemical responses to air exposure were analyzed in jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* at 1 (T1), 6 (T6) and 12 (T12) hours of exposure and 1 (TR1) e 6 (TR6) hours after returning to water environment. Plasma cortisol and glucose were significantly higher than those of control group (T0) after 1 and 6 hours and 1, 6 and 12 hours of air exposure, respectively. Acid-base and ionic unbalances during air exposure were evidenced by plasma pH and Na⁺ and K⁺ concentration following pH recovery as fish returned to water environment. Ammonia accumulation was found in all experimental groups increasing continuously during air exposure (from 102.20 nmol/mL in T0 to 339.53 nmol/mL in T12). During the recovery period in water there was a reduction in plasma ammonia concentration but it was significantly higher than the controls. Plasma lactate showed a slightly increase during air exposure and was significantly higher than the controls only 1 hour after recovery in water (from 4115.42 nmol/mL in T0 to 6423.84 nmol/mL in TR1) while piruvate increased after 6 hour in water (from 171.87 nmol/mL in T0 para 243.96 nmol/mL in TR6). Hematocrit, red blood cells, hemoglobin concentration and mean corpuscular hemoglobin concentration increased significantly during air exposure. On the first hour of air exposure the lipid hydroperoxide (HP) increased. There was a reduction of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activity and an increase of glutathione peroxidase (GPX) during air exposure. Air exposure can be characterized as an stressor agent to *H. unitaeniatus* and imply in physiological adjustments to keep the O₂ transfer from air to tissue and homeostasis as well as energy mobilization.

1. INTRODUÇÃO

O termo *Homeostasis* foi criado por Walter Cannon para descrever os processos corporais coordenados para manter o meio interno aproximadamente constante (CANNON 1929; 1939). Estudando a função secretora da adrenal, Cannon concluiu que, em situações de emergência, o organismo poderia preservar o meio interno, via ajustes compensatórios, e aumentar a probabilidade de sobrevivência (CANNON, 1929; CANNON, 1939; GAUTHIER et al. 1972; JULIEN et al., 1990;).

O termo estresse tem sido utilizado para caracterizar um estado de ameaça a homeostase causada por um estímulo estressante, o estressor (WENDELAAR BONGA, 1997). O estresse tem sido caracterizado como uma resposta comportamental geral na qual há reações motoras e neurovegetativas mediadas pelo sistema neuro-endócrino e a mobilização de energia para o organismo escapar ou combater o estressor (PICKERING, 1981).

Muitos fatores podem determinar a resposta do sistema neuro-endócrino a estímulos estressantes gerando variabilidade na resposta ao estresse. As causas de tais variabilidades podem ser devido a processos adquiridos ao longo da vida do indivíduo, a ajustes às particularidades do ambiente e desenvolvimento do animal e evolutivas, ou seja, adaptações geneticamente estruturadas (VIGAS, 1980; PICKERING, 1981). A resposta a um agente estressor também pode ser determinada filogeneticamente, refletindo a história da espécie (VIGAS, 1980; SCHRECK, 1981).

1.1 – Estresse em Peixes

O ambiente aquático é extremamente dinâmico e os animais que vivem nesse ambiente enfrentam alterações ambientais dificilmente enfrentadas pelos animais

terrestres como mudanças rápidas ou extremas na concentração de O₂ dissolvido, pH e salinidade, o que podem ocasionar estresse e reduzir a habilidade em manter a homeostase.

Os agentes estressores podem ser de natureza química; como por exemplo, redução da concentração de O₂ dissolvido, concentração elevada de amônia (MORAES, et al, 2004) e nitrito (COSTA et al., 2004), decorrente da degradação da matéria orgânica, poluentes orgânicos e inorgânicos (JORGENSEN, et al, 2002; CARVALHO & FERNANDES, 2006) ou resultantes da atividade agro-industriais; ou podem ser de natureza física, como alta densidade populacional, confinamento, captura ou mudanças no ambiente físico (COLOMBO et al.1990), como a redução do nível de água dos corpos d'água que caracterizam os períodos de estiagem em regiões tropicais e subtropicais (CADAVID GARCIA, 1984).

Quando o peixe é exposto a um agente estressor ocorre a ativação de dois eixos neuro-endócrinos: o eixo hipotálamo-sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC) que resulta na liberação de catecolaminas: epinefrina e norepinefrina como produtos finais e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) que libera os corticosteróides cortisol e cortisona dos quais o principal é o cortisol. A ação destes hormônios em diversos órgãos alvo, especialmente naqueles que estão sob múltiplo controle endócrino, resultam em modificações bioquímicas e fisiológicas denominadas respostas secundárias ao estresse (PERRY & LAURENT, 1993; WENDELAAR BONGA, 1997).

A biossíntese de catecolaminas ocorre nas células cromafins localizadas na região anterior dos rins dos peixes e a inativação dessas moléculas ocorre no fígado e rins, antes de serem excretadas pela urina. A ativação adrenérgica resulta em efeitos secundários principalmente sobre a circulação, respiração, osmorregulação e

metabolismo dos peixes (MAZEAUD & MAZEAUD, 1981). O aumento das catecolaminas circulantes favorece o aumento da tomada de oxigênio nas brânquias e conseqüentemente o aumento na oxigenação dos tecidos. O aumento da absorção de oxigênio nas brânquias deve-se ao efeito das catecolaminas no aumento na ventilação branquial, no fluxo sangüíneo nas lamelas secundárias, na capacidade de difusão do oxigênio do meio aquático para o sangue bem como na capacidade de transporte do oxigênio pelo sangue (RANDALL & PERRY, 1992). Entretanto, o aumento da perfusão das brânquias favorece a perda de íons por difusão do sangue para o meio externo podendo ocorrer desequilíbrio iônico. As catecolaminas também estimulam a glicogenólise que resulta na liberação de glicose do fígado para o sangue levando a hiperglicemia sob condições de estresse (NOLAN, 2000).

O eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo HHI) desencadeia outras respostas secundárias. Em peixes, assim como em mamíferos, a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise está sob controle do hipotálamo, via síntese e liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) podendo ser mediada também pelo hormônio melanócito estimulante (α MSH) e, possivelmente, por β -endorfina (WENDELAAR BONGA, 1997). Quando o sistema sensorial detecta mudanças no meio externo e/ou interno dos peixes ocorre a ativação do hipotálamo, que libera CRF o qual estimula as células corticotróficas da hipófise a produzir e liberar ACTH que, por sua vez, estimula a síntese e liberação dos corticosteróides pelas células da interrenal localizada na região anterior do rim (NANDI, 1962; DONALDSON, 1981).

O nível basal de cortisol varia entre as espécies. Por exemplo, em salmonídeos em condições de repouso é abaixo de 10 ng/mL, porém em situações de estresse agudo pode elevar-se 100 vezes o valor do nível basal (PICKERING & POTTINGER 1989);

em *Oreochromis niloticus* o nível basal de cortisol varia entre 22 a 78 ng/mL (BARRETO 2002) e em *Leuciscus cephalus* é de aproximadamente 250 ng/mL (POTTINGER et al., 2000).

O cortisol em peixes atua via dois tipos de receptores intracelulares, os mineralocorticóides e glicocorticóides. Em sua função mineralocorticóide, o cortisol atua na regulação osmótica e iônica estimulando a diferenciação de células de cloreto nas brânquias e aumentando a atividade da enzima sódio-potássio adenosinatrifosfatase (Na^+/K^+ - ATPase) que participam no transporte ativo dos íons sódio e cloreto. Em sua função como glicocorticóide, o cortisol estimula a glicogenólise no fígado, ocasionando uma hiperglicemia, além de estimular também a gliconeogênese neste mesmo órgão (PICKERING, 1981; WENDELAAR BONGA, 1997).

1.2 Radicais Livres, Defesas Antioxidantes e Estresse Oxidativo.

O organismo dos animais possui a habilidade de se adaptar a variados estresses, internos e externos, aos quais é submetido. Se o animal for habitualmente exposto a um estímulo estressor podem ocorrer adaptações para recuperar a homeostase. Por exemplo, quando o O_2 passou a ser utilizado no processo de respiração ocorreu, paralelamente, o desenvolvimento de um sistema antioxidante para proteger as células da toxicidade daquele gás, uma vez que o metabolismo aeróbico conduz à formação de radicais livres. Desse modo, qualquer estímulo que leve à produção excessiva de radicais livres e/ou à depleção de antioxidantes conduz a uma alteração significativa do balanço entre a produção e remoção de radicais livres (DROGE, 2002; URSO & CLARKSON, 2003).

Os radicais livres são definidos como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo

(HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989), sendo que esse elétron desemparelhado ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. Esse elétron não-emparelhando torna o átomo extremamente instável. Na tentativa de estabilizar-se, ele reage com um elétron de outro átomo. Em sistemas biológicos, os radicais livres reagem com os elétrons das biomoléculas que estão à sua volta, ou seja, proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Cada vez que uma biomolécula perde um elétron, ela sofre uma modificação na sua forma e função, podendo perder a sua utilidade no organismo (RAMOS & HERMES-LIMA, 2000). Estes radicais livres e demais moléculas que surgem em função das suas ações oxidativas (Fig 1) nos sistemas biológicos são denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (STOREY, 1996; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002).

Exemplos de EROs são: oxigênio molecular (O_2), radical hidroxila (OH^\cdot), ânion ou radical superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (PEREIRA, 1994 b; ARUOMA, 1994; YU, 1994; SJODIN et al., 1990). Destes radicais livres, o OH^\cdot e o O_2^- são os que têm maior importância biológica porque são formados durante o processo normal de redução de O_2 no interior das mitocôndrias (BENZI, 1993).

O H_2O_2 surge no interior das células quando o O_2 é reduzido ou quando o O_2^- sofre dismutação espontânea ou catalisada. Além disso, por não possuir elétrons desemparelhados, não é classificado como radical livre, sendo, portanto menos reativo que os radicais livres citados (PEREIRA, 1994 a; HALLIWELL & GUTTIRIDGE, 1989). O principal problema é que o H_2O_2 atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxila (HALLIWELL & GUTTIRIDGE, 1989).

O OH^\cdot é o mais reativo e pode formar-se: 1) pela fissão homóloga da ligação O-O da molécula de H_2O_2 ($O-O$ do $H_2O_2 \rightarrow OH + OH^\cdot$); 2) pela simples mistura de

H₂O₂ com sal de ferro (Reação de Fenton, $\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH} + \text{OH}^-$); 3) pela interação do H₂O₂ com o O₂⁻ (Reação de Haber-Weiss, $\text{O}_2^- + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{OH}$); 4) quando uma forma reduzida do cobre entra em contato com o H₂O₂ ($\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{+2} + \text{OH} + \text{OH}^-$) (GUTERRIDGE & HALLIWEL 1984; HALLIWEL & GUTTIRIDGE, 1989; STOREY, 1996).

O radical O₂⁻ é menos reativo que o OH, e é formado a partir da redução do O₂ com um elétron. Em condições fisiológicas é gerado principalmente nas mitocôndrias, microsomas e peroxissomas (ANDRADE et al. 2005).

A maior reatividade exibida pelos radicais livres, comparativamente aos não radicais, pode ser evidenciada pelo menor tempo de vida média que possuem. O radical OH⁻ e o ânion O₂⁻ possuem tempo de vida média respectivamente de 1x10⁻⁹ e 1x10⁻⁶ segundos, enquanto que o H₂O₂ superior a 10⁻² segundos. Apesar de o O₂ ser um radical livre sua reatividade também é muito baixa (tempo de vida média superior a 10² segundos) (YU, 1994). Este tempo de vida extremamente curta dos radicais livres é devido a instabilidade eletrônica que apresentam. Isto resulta na possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com as quais venham a colidir, promovendo formação de outros radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

A peroxidação dos lipídios (Fig. 2) das membranas celulares é apenas um exemplo de lesão biológica que poder ser promovida pelos radicais livres, uma vez que praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis á oxidação (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos não-enzimáticos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o *α*-tocoferol (vitamina E) e βcarotêno, selênio, ácido ascóbio (vitamina C), glutathiona reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica das EROs produzidas intra e extracelularmente (YU, 1994). No segundo

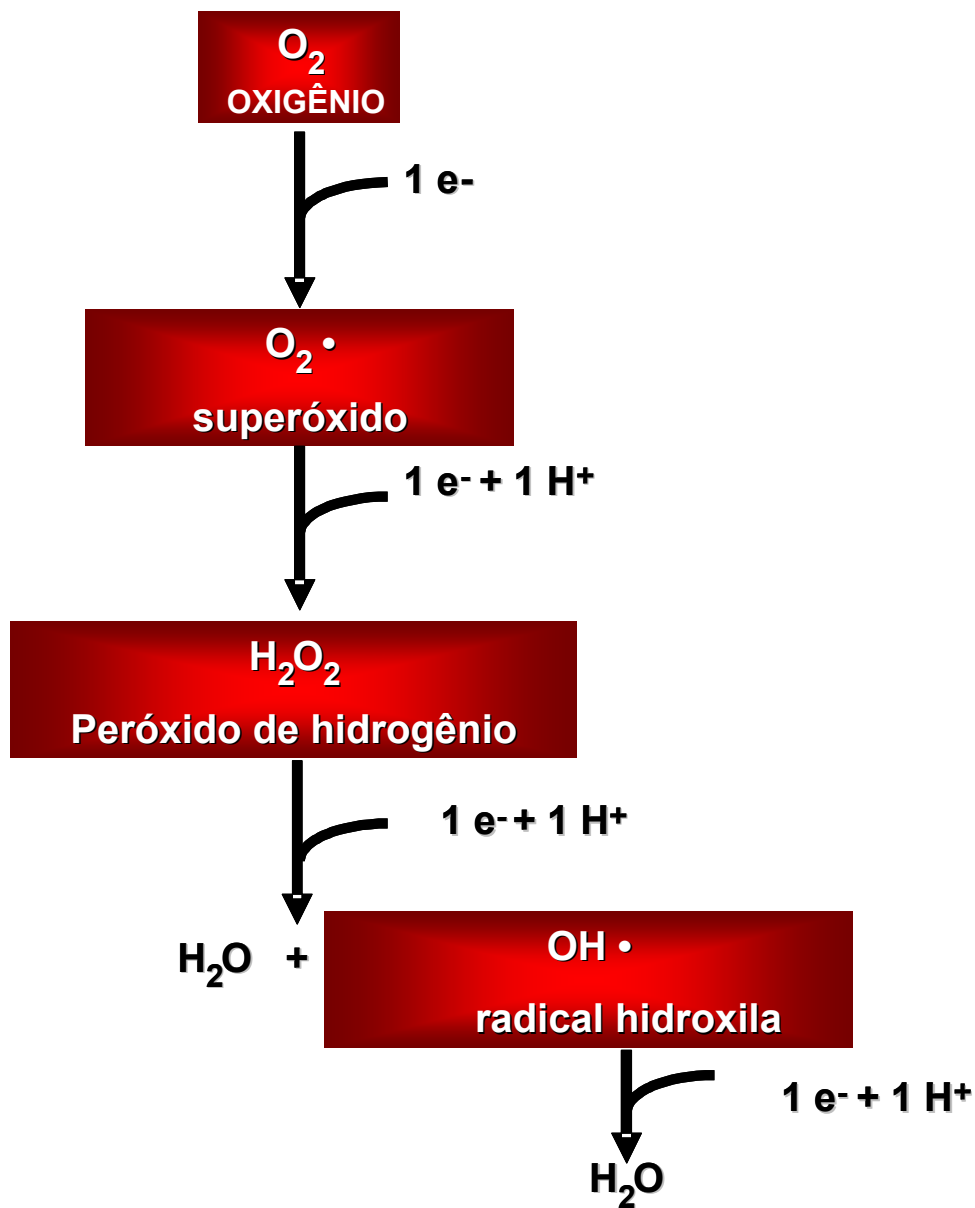


Figura 1. Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Adaptado de DEVLIN (2003).

caso, quando são expostos às EROs os organismos sintetizam proteínas (enzimas) antioxidantes como:

a) Superóxido dismutase (CuZn-SOD; Mn-SOD) que corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. A forma CuZn-SOD está presente principalmente no citosol e meio extracelular, enquanto que a Mn-SOD está localizada primariamente na mitocôndria. Esta enzima tem um papel antioxidante, pois catalisa a dismutação do O_2^- em H_2O_2 .

b) Catalase (CAT) que é uma enzima citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 e sua atividade é dependente de NADPH (SCOTT et al., 1991).

c) Glutathione Peroxidase (GPX – dependentes e não dependentes de selênio) enzima que tem um papel antioxidante, pois decompõem respectivamente o superóxido O_2^- , H_2O_2 e hidroperóxidos (YU, 1994).

Apesar de essas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROs, os organismos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente, quando isso acontece ocorre estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; STOREY, 1996.) Algumas situações geradoras de estresse oxidativo já foram descritos como: ativação de fagócitos por microrganismos, radiação ionizante, xenobióticos, exercício físico extenuante, hiperóxia (YU, 1994; PEREIRA, 1994a; BENZI, 1993), anóxia, hipóxia e isquemia (RAMOS & HERMES-LIMA, 2000).

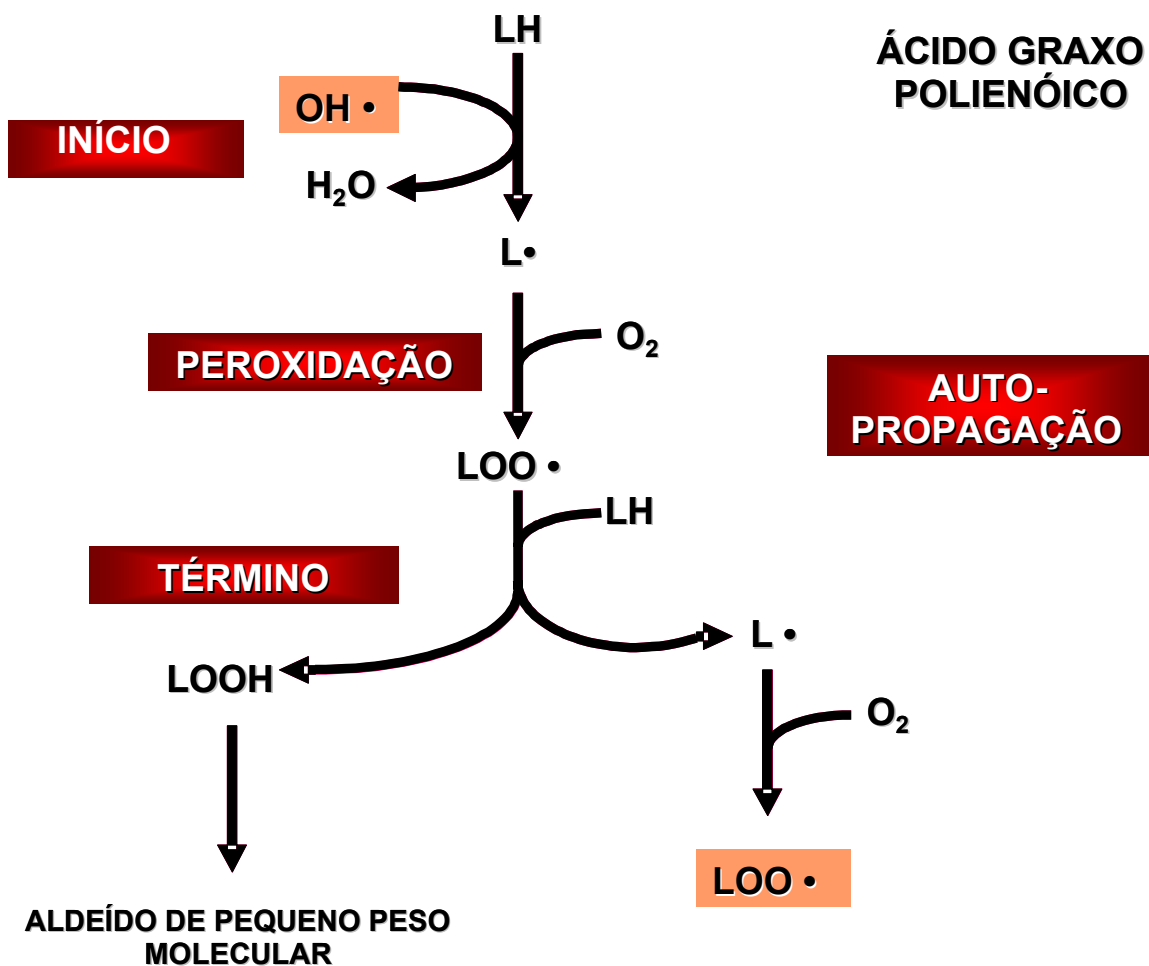


Figura 2. Peroxidação lipídica iniciada pelo radical hidroxila. Adaptado de DEVLIN (2003).

Os ajustes fisiológicos promovidos durante o estresse causado pela exposição aérea, como as possíveis alterações hormonais, metabólicas, hematológicas, dessecação e desequilíbrio osmótico-iônico poderão levar a um aumento no consumo de O₂ e com isso gerar uma maior produção de radicais livres, bem como de defesas antioxidantes, promovendo ou não estresse oxidativo.

1.3 – Respiração em Peixes

Quanto ao processo de obtenção de oxigênio em peixes, as espécies podem ser classificadas como de respiração exclusivamente aquática; de respiração aérea obrigatória e de respiração aérea facultativa ou acessória. Tal classificação corresponde aos mecanismos de respiração unimodal aquática, unimodal aérea e bimodal aérea e aquática (KRAMER, 1983). Os peixes que utilizam a respiração aérea possuem adaptações morfológicas e/ou fisiológicas visando uma melhor utilização do O₂ disponível no ar atmosférico (SUNDIN et al, 2000). Essas espécies geralmente vivem em estuários e águas doces tropicais, onde condições de escassez do oxigênio dissolvido são mais frequentes (DEHADRAI & TRIPATHI, 1976; GLASS et al., 1986; GRAHAM, 1997).

Em peixes de respiração aérea, facultativa ou obrigatória, os órgãos respiratórios podem ser derivados do trato alimentar como a cavidade bucal em *Electrophorus* e *Symbranchus*; o estômago em loricariídeos como *Hypostomus* e *Pterygoplichthys*; o intestino em calictídeos como *Callichthys* e *Hoplosternum* ou podem apresentar modificações na bexiga natatória (vascularização) como em *Hoplerythrinus* e *Piabucina* (CARTER & BEADLE, 1931; LOWE-McCONNEL, 1987, FERNANDES & MORON, 1996; GRAHAM, 1997).

As modificações desses órgãos desenvolveram-se independentemente em várias famílias de teleósteos tropicais demonstrando assim que os diferentes tipos de

respiração aérea em peixes são adaptações espécie-específicas (JOHANSEN, 1970; VAL & ALMEIDA-VAL, 1995; GRAHAM, 1997).

Durante períodos de seca em regiões tropicais, peixes que tipicamente ocorrem em riachos ou rios, podem ficar confinados durante semanas ou meses em lagoas marginais com águas hipóxicas e hipercápnicas, além de migrarem entre as lagoas e a respiração aérea facultativa aumenta, sem dúvida, a probabilidade de sobrevivência desses peixes nessas condições (KRAMER et al., 1978; FINK & FINK, 1978; GRAHAM, 1997).

Em muitos peixes fisóstomos, a bexiga natatória é considerada uma estrutura homóloga aos pulmões dos demais vertebrados e apresenta função respiratória em holósteos como, por exemplo, em *Amia* e *Lepisosteus* (FANGE, 1973). Já na maioria dos teleósteos esta estrutura está mais associada às funções hidrostáticas, produção e percepção de sons (ALEXANDER, 1966). Apesar disso, a utilização da bexiga natatória como órgão respiratório é amplamente difundida entre os teleósteos, a exemplo de *Gymnotus*, *Umbra*, *Mystus*, *Piabucina*, *Hoplerythrinus*, *Erythrinus* e *Arapaima* (CARTER & BEADLE, 1931; GRAHAM et al., 1977, NATARAJAN, 1979; GEE, 1980; LIEM et al., 1984).

Aspectos da fisiologia *H. unitaeniatus* tem sido estudado por vários autores e dentre os mais recentes estão as respostas fisiológicas ao estresse de confinamento (CASTRO, 2002); o efeito da temperatura nas respostas cardio-respiratórias e na respiração aérea (OLIVEIRA et al., 2004), a localização e orientação dos quimiorreceptores de O₂ envolvidos no controle dos reflexos cardio-respiratórios e da respiração aérea em resposta à hipóxia ambiental (LOPES, 2003), as diferentes estratégias bioquímicas para a excreção do nitrogênio durante a exposição aérea (POLEZ et al., 2003) e a localização e orientação dos quimiorreceptores de CO₂ e/ou

pH envolvidos no controle dos reflexos cardio-respiratórios e da respiração aérea (BOIJINK, 2004).

O *H. unitaeniatus* é uma espécie encontrada no Pantanal e anualmente é submetido a longos períodos de estiagem (junho a setembro) (CADAVID GARCIA, 1984), quando eventualmente é encontrado migrando entre as baias e corixos, ficando assim exposto ao ar. O presente estudo verificou se a exposição ao ar é um agente causador de estresse, pois impõe ao animal o risco de predação por animais aéreos, dessecação, hipertermia e, ainda a disfunção branquial, uma vez que as brânquias além da respiração têm importante papel na regulação osmótica, iônica (MCDONALD E MILLIGAN, 1997, PERRY, 1997, PIIPER, 1989), equilíbrio ácido-base (GILMOUR, 2001, BOIJINK, 2004) e na excreção de produtos nitrogenados (RANDALL et al., 2004). Portanto, a exposição aérea pode se refletir em alterações hematológicas (DETHLOFF et al, 1999) hormonais, metabólicas (CARRAGHER & REES, 1994; BARTON & IWAMA, 1991; PICKERING & POTTINGER, 1989) e na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).

2.OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo determinar se a exposição ao ar atmosférico é um agente de estresse para esta espécie e quais as alterações fisiológicas e bioquímicas desencadeadas pela exposição aérea e subsequente retorno ao meio aquático em *H. unitaeniatus*.

Para responder a essas questões, os objetivos específicos foram:

- a) Determinar como variam as concentrações plasmáticas de cortisol, glicose, lactato, piruvato, amônia, íons plasmáticos, osmolalidade e proteínas totais durante a exposição ao ar atmosférico e subsequente retorno ao meio aquático;
- b) Determinar como variam os parâmetros hematológicos durante a exposição ao ar atmosférico e subsequente retorno ao meio aquático;
- c) Determinar se ocorre modificação no pH sanguíneo durante a exposição ao ar atmosférico e subsequente retorno ao meio aquático;
- d) Determinar se os indicadores de estresse oxidativo como os níveis de hidroperóxidos de lipídios e a atividade das enzimas oxidativas: Superóxido Dismutase (SOD); Glutathione Peroxidase (GPX) e Catalase (CAT) variam durante a exposição ao ar atmosférico e subsequente retorno ao meio aquático;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Exemplares adultos de ambos os sexos de jeju, *H. unitaneniatus* (Figura 1), [Massa corpórea (Mc) = $187,8 \pm 26,08$ g (média \pm EPM)] foram coletados na bacia do rio Paraná, município de Bataguçu, MS. Após coleta, os espécimes foram transportados ao Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa (DCF/UFSCar), onde foram mantidos em tanques de 1.000 litros com fluxo de água contínuo, aeração constante, 25 ± 1 °C, pH $7,0 \pm 0,5$ e fotoperíodo natural. Os animais foram alimentados 3X por semana com peixes de pequeno porte. A alimentação foi suspensa 24h antes dos experimentos.



Figura 3. O jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (GILL, 1895). Foto: Sandro E. Moron.

3.1 A espécie: *Hoplerythrinus unitaeniatus*

Segundo a classificação taxonômica de BRITSKI *et al.* (1984) o

Hoplerythrinus unitaeniatus tem a seguinte classificação sistemática:

Superordem: Ostariophysi

Série: Otophysi

Ordem: Characiformes

Família: Erythrinidae

Gênero: *Hoplerythrinus*

Espécie: *Hoplerythrinus unitaeniatus*

Na América do Sul existem apenas três gêneros da família Erythrinidae: *Erythrinus* SCOPOLI, 1777; *Hoplias* GILL, 1903 e *Hoplerythrinus* GILL, 1895 (GODOY, 1975). *Hoplias* apresenta respiração exclusivamente aquática e os dois outros gêneros possuem respiração aérea facultativa. A distribuição geográfica do gênero *Hoplerythrinus* abrange o Peru, Bolívia, Venezuela, Guiana, Paraguai e Brasil (GODOY, 1979). Vulgarmente conhecido por jeju (SMITH, 1979) o *H. unitaeniatus* é a única espécie citada para este gênero. A espécie é ativa, carnívora, de crescimento rápido e ocorre em águas de inundação temporária (LOWE-McCONNEL, 1987).

Esta espécie extrai cerca de 25% de seu requerimento de O₂ através de bexiga natatória quando em águas normóxicas e, se o conteúdo de O₂ da água decresce drasticamente, a tomada de O₂ passa a ser diretamente do ar atmosférico (STEVENS & HOLETON, 1978; KRAMER, 1978, MATTIAS *et al.*, 1996). FERNANDES *et al.* (1994) observaram que esta espécie apresenta filamentos branquiais curtos e poucas lamelas secundárias por filamentos, resultando em uma área branquial reduzida, característica de peixes de respiração aérea acessória.

3.2 – Desenho Experimental:

Após o período de aclimação (90 dias) às condições laboratoriais, os animais foram divididos em **6 grupos (n = 8** em cada grupo): um grupo (**Controle, T0**) foi mantido submerso nas mesmas condições de aclimação; três grupos foram expostos ao meio aéreo (Figura 2) durante 1h (**T1**); 6 h (**T6**) e 12 h (**T12**) respectivamente e dois grupos foram expostos ao meio aéreo durante 12 horas seguido de retorno ao meio aquático durante 1h (**TR1**) e 6h (**TR6**) para recuperação.

Os animais foram mantidos no tanque em meio aquático 24h antes do início dos experimentos. Posteriormente a água do tanque foi lentamente removida (para promover a exposição ao ar) através de um sifão para não causar distúrbios aos animais. Um fino filme de água foi deixado no fundo do tanque para manter a umidade do ambiente e evitar a dessecação, porém sem permitir a respiração aquática durante todo o período de exposição ao meio aéreo. Nos experimentos de exposição aérea seguido de recuperação em meio aquático, a água foi reintroduzida lentamente no tanque experimental após 12 horas de exposição aérea.

Imediatamente após o período de exposição ao meio aéreo e o período de recuperação em meio aquático, amostras de sangue dos animais foram obtidas por punção da veia caudal e processadas de acordo com as análises a serem efetuadas. Após a coleta de sangue os animais foram sacrificados por secção medular e o fígado foi removido e congelado em freezer a -80°C para posteriores análises das atividades específicas das enzimas antioxidantes, proteínas totais e hidroperóxidos de lipídios.



Figura 4. O jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* exposto ao ar atmosférico.

3.3 – Análises Sangüíneas:

Imediatamente após a coleta do sangue, foram determinadas as seguintes variáveis sangüíneas: hematócrito, dosagem de hemoglobina e pH. Uma alíquota do sangue foi utilizada para a contagem de eritrócitos. O sangue remanescente foi centrifugado a 12000 rpm durante 5 minutos para obtenção do plasma. Uma pequena porção do plasma (20 μ l) foi utilizada para medir a osmolalidade. O restante foi dividido em alíquotas (300 μ l), congelado e mantido em freezer a -80 °C para análises posteriores.

3.3.1 - pH Sangüíneo:

O pH do sangue foi medido em um pHmetro Quimis mod. 400.A, calibrado com padrões de pH de precisão. A leitura foi feita quando não havia mais oscilações no *display* de leitura.

3.3.2 - Hematócrito (Hct)

O hematócrito (Hct=%) foi determinado em duplicatas utilizando o método de microhematócrito com tubo capilar heparinizado. O sangue foi centrifugado durante 5 minutos a 12000 rpm em uma centrífuga de microhematócrito FANEN, mod. 207/N. A proporção entre a parte sólida (eritrócitos e leucócitos) e líquida (plasma) do sangue de cada amostra foi estimada com o auxílio de um cartão padronizado e o valor para cada animal foi considerado como média das duas determinações.

3.3.3 - Contagem de Eritrócitos (RBC)

Para a contagem de eritrócitos (RBC= número de eritrócitos mm^{-3}) 10 μ l de sangue recém coletado foram diluídos em 2 mL de solução de formol citrato e a

contagem foi efetuada em uma câmara de Neubauer em duplicata. O valor médio foi multiplicado por 10.000 e o resultado foi expresso em milhões/mm³.

3.3.4 - Dosagem de Hemoglobina Total ([Hb])

A concentração de hemoglobina ([Hb] = g/dL) foi determinada a partir de amostras de 10 µl de sangue total segundo o método de formação de cianometahemoglobina utilizando 2 mL do reagente de Drabkin. Após agitação a solução diluída permaneceu em repouso por 15 minutos para que ocorresse a hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de acrílico e a leitura foi efetuada em 540 nm, contra um tubo branco contendo somente Drabkin, em um espectrofotômetro SPECTRONIC GENESYS 5.

$$\text{Hb total (gHb/dL)} = 0,0048 + \text{Abs}/0,0323$$

3.3.5 - Índices Hematimétricos

A partir dos valores de Hct, RBC e [Hb] foram determinados os índices hematimétricos:

Volume Corpuscular Médio (VCM):

$$\text{VCM} = \frac{\text{Hct (\%)}}{\text{RBC (erit. mm}^3)} \cdot 10^7 \Rightarrow \text{dado em } \mu\text{m}^3$$

Hemoglobina Corpuscular Média (HCM):

$$\text{HCM} = \frac{\text{Hb(g)} \cdot 10}{\text{RBC}} \Rightarrow \text{dado em pg. célula}^{-1}$$

Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM)

$$\text{CHCM} = \frac{\text{Hb (g)}.10}{\text{Hct (\%)}} \cdot 100 \Rightarrow \text{dado em (\%)}$$

3.4 – Análises Plasmáticas

Para a determinação de amônia, lactato, piruvato e glicose foi preparado um extrato desproteinizado da amostra, utilizando-se 100 µL de plasma total e 900 µL TCA 20% que foi centrifugado a 12.000 rpm por 3 minutos. Utilizou-se o sobrenadante desproteinizado para as análises.

3.4.1 - Amônia:

A concentração de amônia foi determinada por nesslerização (GENTZKON & MASEN, 1942). Adicionou-se, em tubo de ensaio de vidro, 300µl de plasma desproteinizado, 500µl de reativo de NESSLER e 1700µl de água destilada. Após 20 minutos à temperatura ambiente foi efetuada a leitura, em espectrofotômetro, a 420 nm contra uma solução padrão de amônia (100 mM NH₄Cl).

3.4.2 - Piruvato:

A determinação da concentração de piruvato foi efetuada segundo o método descrito por LU (1939). Em tubo de ensaio foi adicionado 400µl de amostra (plasma desproteinizado), 250 µl de reativo de Dinitrofenilhidrazina (DNPH) 0,1% em HCl 2,0N. Após 30 minutos em banho maria a 37° C, era adicionado à mistura de reação 3 ml NaOH 1,3 N e a leitura óptica foi realizada em 440 nm. A concentração de piruvato era determinada contra um padrão (20 mM) de piruvato.

3.4.3 - Lactato:

O método utilizado para a determinação da concentração de lactato foi o descrito por HARROWER & BROWN (1972). Em tubo de ensaio foi adicionado 50 µl do plasma, 450 µl de água destilada, 20 µl de CuSO₄ 4% e 3,5 ml de H₂SO₄. A solução foi, então, fervida durante 5 minutos e após o resfriamento foi adicionado 80 µL de *p*-fenilfenol e agitado em vórtex. Após 1 hora em descanso foi efetuada nova fervura de 90 segundos e a leitura foi realizada em 570 nm. Padrão de 100 nmol de ácido láctico foi utilizado para determinação da concentração de lactato µmol de lactato/mg de tecido ou mL de plasma.

3.4.4- Glicose:

A glicose foi determinada segundo o método descrito por DUBOIE et al., (1956). Em tubo de ensaio foi adicionado 100 µl de plasma desproteinizado, 400 µl de água destilada, 0,5 ml fenol 4,1% e 2 ml de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. Após esfriar em água corrente foi feita a leitura em 480 nm. Foi utilizada a solução padrão de glicose 0,02%.

3.4.5 - Osmolalidade:

A osmolaridade foi determinada por congelamento utilizando um micro-osmômetro µOSMETTE Precision.

3.4.6 - Íons Na⁺, K⁺ e Cl⁻ :

A concentração plasmática dos íons Na⁺ e K⁺ foi medida em um fotômetro de chama Digimed, modelo DM-61, após diluição de 1:100. A concentração de íons Cl⁻ foi quantificado utilizando kit comercial (kit Labtest Diagnóstica).

3.4.7 - Cortisol:

O cortisol foi determinado por radioimunoensaio com marcador ¹²⁵I (COAT-A-COUNT ® Cortisol, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA) em contador Gamma-C12. O Kit COAT-A-COUNT Cortisol permite quantificar o nível do cortisol (hidrocortisona, Composto F) por radioimunoensaio. Nos tubos revestidos com anticorpo de cortisol, foi pipetado 25 µl da amostra (plasma heparinizado) e adicionado 1,0 ml de cortisol ¹²⁵I a cada tubo. Em seguida os tubos foram agitados com agitadores (vórtex) e incubados durante 45 minutos a 37°C. Após esse período de incubação foi removida toda a umidade visível e levado ao contador DPC-gamma- C12 durante 1 minuto.

3.5 – Peroxidação Lipídica e Enzimas Antioxidantes e Proteínas Totais.

O tecido hepático foi homogeneizado em 1,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) na razão 1:10 utilizando homogeneizador Turratec TE-102 (Tecnal) e centrifugado a 10000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para as determinações enzimáticas (SOD, CAT e GSH-Px), Proteínas Totais e de HP.

3.5.1 – Hidroperóxido de Lipídio (FOX)

A peroxidação lipídica foi quantificada segundo a metodologia descrita por JIANG *et al.* (1991) em que há oxidação de Fe²⁺ (sulfato ferroso amoniacal) a Fe³⁺

seguida de reação com o alaranjado de xilenol formando um composto colorido. Aliquotas de 100 μ L de amostra foram misturadas e incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com 100 μ M de alaranjado de xilenol, 250 μ M de Fe²⁺, 25mM de H₂SO₄ e 4 mM de butilato hidroxitolueno (BHT-Sigma) em metanol 90%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Spectronic Genesys 5 em 560 nm. O coeficiente de extinção do complexo Fe³⁺-alaranjado de xilenol a 560nm utilizado é 4,3 x10⁴M⁻¹cm⁻¹. O resultado foi expresso em nmol de Fe³⁺/g de tecido ou nmol/mL de plasma.

3.5.2 - Superóxido Dismutase (SOD – E.C. 1.15.1.1)

A atividade da enzima SOD foi determinada segundo o método de SPITZ & OBERLEY (1989) tendo como base a capacidade da enzima em inibir a redução do NBT (nitroblue-tetrazólio) por radicais livres gerados pela hidroxilamina em meio alcalino. Em 100 μ L da amostra de plasma ou tecido hepático diluído (1:10) foi adicionado 500 μ L de NBT + EDTA e 2000 μ L de tampão carbonato de sódio (0,5 M) e hidroxilamina (37,05 M). Para a solução controle, no lugar da amostra, foi adicionado 100 μ L de mistura hidro-alcoólica (4:1). A reação foi feita no escuro e a leitura foi realizada em espectrofotômetro em 560 nm e a concentração foi expressa em unidade (U = quantidade necessária para gerar 50% de inibição da redução do NBT) por mg de proteína (USOD/mg de pt).

3.5.3 – Glutationa Peroxidase (GSH-Px - E.C. 1.11.1.9):

A atividade da enzima GPX foi determinada segundo o método descrito por HAFEMAN *et al.* (1974). A 10 μ L da amostra foi adicionado 100 μ L de GSH 2mM, 100 μ L de tampão fosfato de Na 0,4M (pH 7,0) contendo EDTA 0,4 mM, 50 μ L de

azida sódica (para inibir a catalase) e 140 µL de água destilada. Após 5 minutos de repouso a 37 °C foi adicionado 100 µL de H₂O₂ e após 3 minutos em banho-maria, uma alíquota de 100µL foi transferida para eppendorf e adicionado 400 µL do reagente de precipitação, centrifugada a 3000 pm por 10 min a 30 °C. Ao sobrenadante (400 µL) foi adicionado 400 µL Na₂HPO₄ 0,4M e 200 µL de DTNB (40mg/mL) preparado em citrato trissódico 1%. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 412 nm e expressa em nmol/mg pt.

3.5.4 – Catalase (CAT – E.C. 1.11.1.6):

Para a determinação da atividade da enzima catalase foi utilizado o método descrito por AEBI (1974). A 500 µL da amostra de plasma ou tecido hepático diluído (1:10) foi adicionado 500 µL de solução tampão fosfato de sódio e potássio 50 mM (pH 7,0) com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30%. Na solução controle foi adicionado tampão fosfato sem o peróxido. A leitura foi realizada em espectrofotômetro em 240 nm em intervalos de 15 segundos. O resultado foi expresso em unidades de Bergmeyer (UB/mg proteína) (Aebi, 1974). Uma unidade de Bergmeyer é definida como:

$$UB = \frac{(2,3/t) \cdot \log (E1/E2)}{0,00693}$$

onde: t = tempo de 15 segundos de intervalo de leitura; E1 = leitura no tempo 1; E2 = leitura no tempo 2 e 0,00693 é uma constante (K)

3.5.5 – Proteínas Totais

A concentração das proteínas totais foi quantificada pelo método descrito por BRADFORD (1976) utilizando como padrão protéico albumina sérica bovina. A 10µL

de amostra previamente diluída (1:50 para o plasma e 1:10 para o fígado) foi adicionado 200 μ L de reagente de Bradford. A leitura foi realizada em uma leitora de microplaca (Dynex Technologies, Inc.) em 595 nm.

3.6 - Análise Estatística:

Os resultados obtidos estão apresentados como média \pm E.P.M.(erro padrão da média). O teste de Bartlett foi utilizado para determinar a homogeneidade dos dados e definir a aplicação de testes paramétrico ou não paramétrico às variáveis analisadas. A análise de variância KRUSKAL-WALLIS seguida do pós-teste Dunn (não paramétrico) foi utilizada nos dados de glicose, cortisol, osmolaridade, concentração de Hb, proteínas totais do fígado e da enzima SOD. A análise de variância ANOVA seguida do pós-teste Dunnett's (paramétrico) foi utilizada para os demais dados. Toda análise estatística foi efetuada com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico GraphPad InStat versão 2.01 (GraphPad software, San Diego, CA – USA).

4. RESULTADOS

Nenhum peixe morreu durante os experimentos e, durante a primeira hora de exposição ao ar os peixes apresentaram maior movimentação e, no decorrer da exposição aérea, foram gradualmente diminuindo a movimentação até permanecerem praticamente imóveis com raros movimentos. Durante a respiração aérea foi possível perceber um aumento de muco ao redor dos peixes. Após o retorno ao meio aquático os peixes voltaram a apresentar os movimentos aleatórios característicos da espécie, semelhantes aos movimentos dos peixes do grupo controle.

4.1 – Cortisol e Glicose.

A Tabela 1 e Figura 5 mostram os valores médios (\pm E.P.M) das concentrações de cortisol e glicose plasmáticos de *H. unitaeniatus* durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático.

O cortisol apresentou um aumento significativo de aproximadamente 6 vezes em relação ao controle na primeira hora (T1) de exposição ao ar que foi de 2,49 (T0) para 17,25 (T1) $\mu\text{g/dL}$ e, a partir de 6h de exposição mostrou uma tendência a redução retornando ao nível do grupo controle após 12h (T12) de exposição ao ar ($p > 0,05$). O retorno ao meio aquático não alterou a concentração de cortisol plasmática.

A glicose aumentou significativamente ($p < 0,05$) em todos os grupos durante a exposição ao meio aéreo (T1, T6 e T12), entretanto após o retorno ao meio aquático (TR1 e TR6) os valores médios da concentração da glicose foram semelhantes ao do grupo controle (T0).

Tabela 1. Valores médios (\pm E.P.M) dos níveis plasmáticos de cortisol e glicose de *H. unitaeniatus* (n = 8) do grupo controle (T0), durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação em meio aquático (TR1 e TR6). * indica diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

	Controle	Exposição ao ar atmosférico (h)			Recuperação em Meio Aquático (h)	
	T0	T1	T6	T12	TR1	TR6
Cortisol	2,41	17,25	10,59	6,63	1,54	1,812
($\mu\text{g/dL}$)	$\pm 1,00$	$\pm 2,03^*$	$\pm 1,52^*$	$\pm 1,76$	$\pm 0,06$	$\pm 0,58$
Glicose	646,38	1315,04	1394,71	1368,12	847,95	963,62
(nmol/mL)	$\pm 79,28$	$\pm 164,12^*$	$\pm 167,84^*$	$\pm 114,03^*$	$\pm 66,38$	$\pm 52,70$

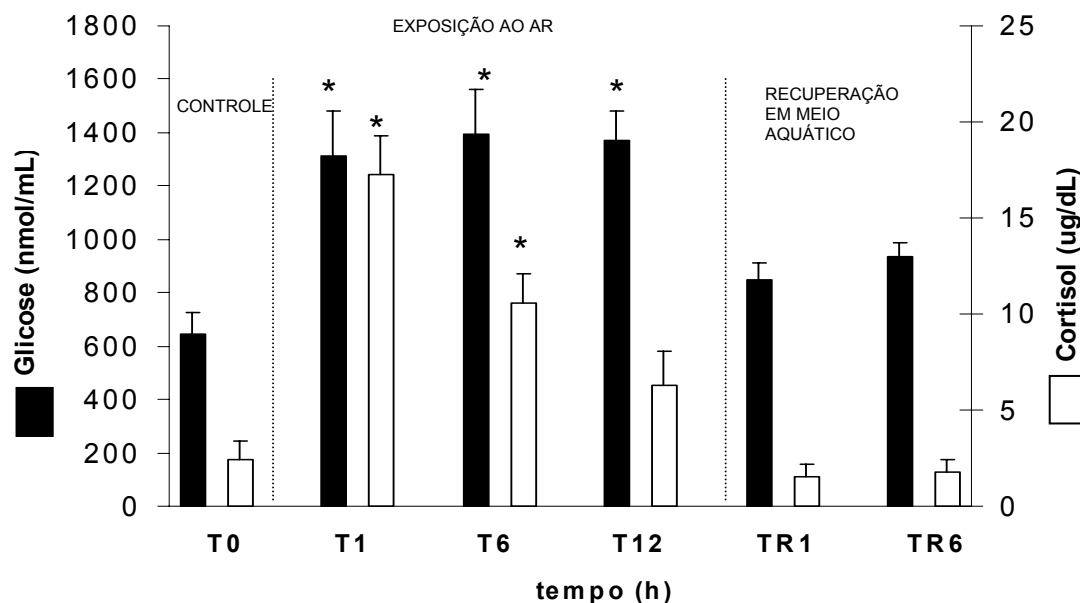


Figura 5. Valores médios (\pm E.P.M) dos níveis plasmáticos de cortisol e glicose de *H. unitaeniatus* (n = 8) do grupo controle (T0), durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação em meio aquático (TR1 e TR6). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

4.2 – Intermediários Metabólicos Plasmáticos.

A concentração de lactato plasmático (Tabela 2 e Figura 6 A) mostrou tendência a aumentar em 6 e 12h de exposição ao ar (T6 e T12), mas foi significativamente maior ($p < 0,05$) uma hora após o retorno ao meio aquático (TR1). Após seis horas de recuperação a concentração de lactato plasmático foi igual ao grupo controle ($p > 0,05$) mostrando que 6 horas de recuperação são suficientes para que o nível do lactato voltasse ao normal.

A concentração de piruvato plasmático (Tabela 2 e Figura 6 B) mostrou uma tendência a diminuir durante a exposição aérea, mas não foi diferente do grupo controle, entretanto 6 horas após o retorno ao meio aquático (TR6) mostrou um aumento significativo, quando comparado com o grupo controle.

A concentração de amônia plasmática (Tabela 2 e Figura 6 C) foi significativamente maior ($p < 0,05$) em todos os grupos tanto os de exposição ao ar como os de recuperação em meio aquático. Durante a exposição ao ar o nível de amônia plasmática aumentou progressivamente de 102,2 (T0) para 339,53 (nmol/mL) (T12). No primeiro grupo de recuperação (TR1) o nível de amônia mostrou tendência a diminuir de 339,53 em T12 a 220,3 em TR1 chegando a 161,22 em TR6.

Tabela 2. Valores médios (\pm E.M) dos níveis plasmáticos de lactato, piruvato e amônia (nmol/mL) do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.

	Controle		Exposição ao ar atmosférico			Recuperação	
			(h)			em Meio Aquático (h)	
	T0	T1	T6	T12	TR1	TR6	
Lactato	4115,42	3914,64	4728,47	5014,19	6423,84	3907,28	
(nmol/mL)	$\pm 346,97$	$\pm 379,86$	$\pm 601,38$	$\pm 360,05$	$\pm 876,08^*$	$\pm 342,20$	
Piruvato	171,87	136,42	148,08	147,88	180,63	243,96	
(nmol/mL)	$\pm 12,32$	$\pm 11,81$	$\pm 7,66$	$\pm 11,89$	$\pm 17,90$	$\pm 17,07^*$	
Amônia	102,20	165,34	230,96	339,53	220,30	161,22	
(nmol/mL)	$\pm 8,37$	$\pm 7,29^*$	$\pm 14,73^*$	$\pm 13,27^*$	$\pm 19,09^*$	$\pm 10,73^*$	

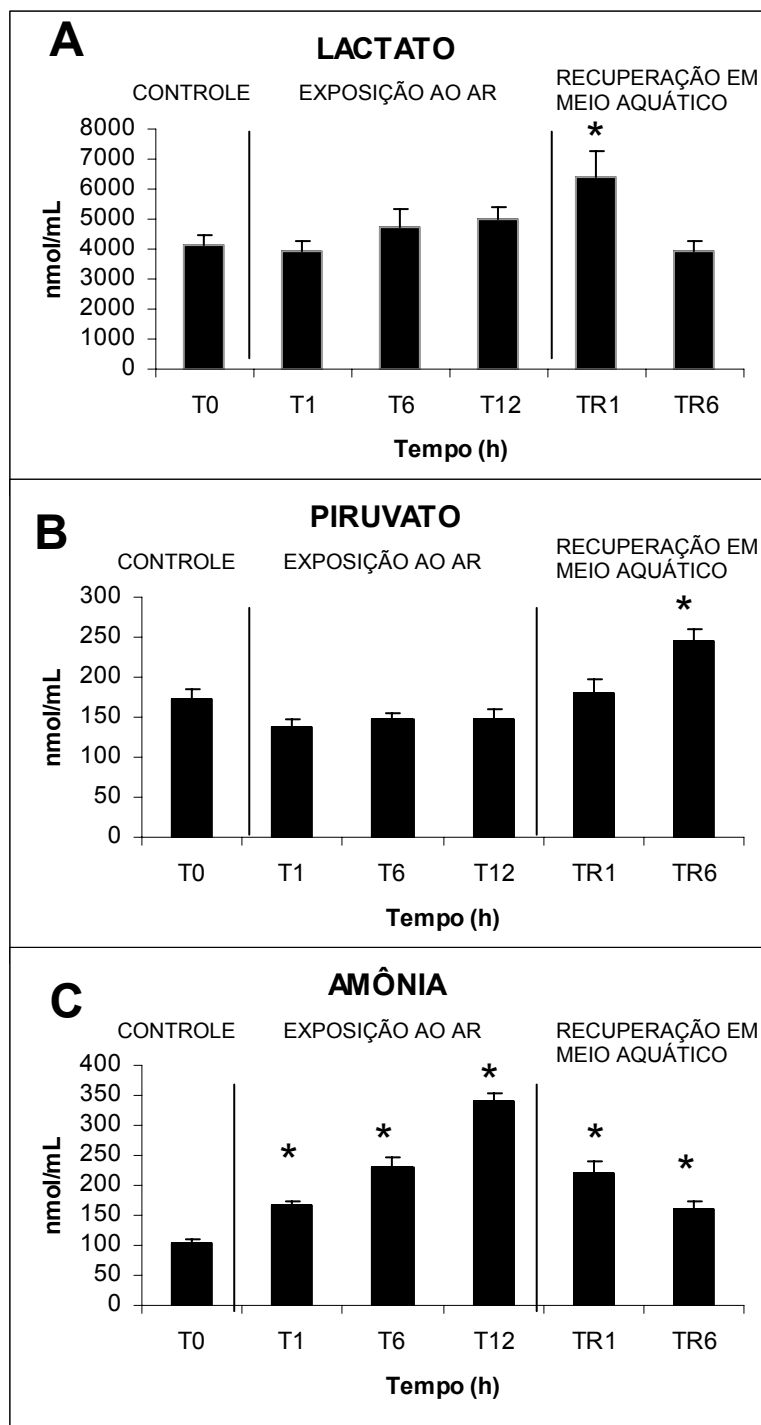


Figura 6. Valores médios (\pm E.P.M) dos níveis plasmáticos de lactato, piruvato e amônia (nmol/mL) do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.

4.3 –Osmolalidade Plasmática, pH sangüíneo e Íons.

A osmolalidade (Tabela 3 e Figura 7 A) aumentou ($p < 0,05$) apenas no grupo de 6 horas de exposição ao ar (T6), sendo que em T0 (controle) era 255,83 e em T6 foi 285,12 mOsmol/kg_{H2O}. Doze horas após a exposição ao ar (T12) a osmolalidade retornou ao valor semelhante ao do grupo controle (T0). Nos grupos de recuperação (TR1 e TR6) não houve diferença significativa quando comparados com o grupo controle (T0).

O pH sangüíneo (Tabela 3 e Figura 7 B) diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nos grupos de exposição ao ar (T1, T6, T12), quando comparado com o grupo controle (T0). Após 1 hora (TR1) de recuperação em meio aquático, aumento não mais diferenciando do grupo controle.

Após 6 horas de recuperação em meio aquático (TR6) o pH aumento significativamente ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo controle.

O íon sódio (Na⁺) (Tabela 3 e Figura 8 A) diminuiu significativamente ($p < 0,05$) durante a exposição ao ar (T1, T6 e T12) e recuperação em meio aquático (TR1 e TR6), diminuindo gradativamente de 152,0 mEq/L no grupo controle (T0) para 125,11 no grupo TR6. O íon potássio (K⁺) (Tabela 3 e Figura 8 B) diminuiu significativamente ($p < 0,05$) até 6h exposição ao ar (T1 e T6) e a partir de 12h (T12) retornou ao nível semelhante ao do grupo controle. Os grupos de recuperação (TR1 e TR6) não apresentaram diferenças significativas quando comparados com o grupo controle.

O íon cloreto (Cl⁻) (Tabela 3 e Figura 8 C) não apresentou diferença significativa nos grupos experimentais (T1, T6, T12, TR1 e TR6) quando comparado com o grupo controle.

Tabela 3. Valores médios (\pm E.P.M) dos íons plasmático (mEq/L), osmolalidade e pH sanguíneo (mOsmol/kg_{H2O}) do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático (n = 8) .* indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.

	Controle	Exposição ao ar atmosférico			Recuperação	
	T0	T1	T6	T12	em Meio Aquático (h)	
Na⁺						
(mEq/ L)	152,00	137,1	137,3	129,7	132,4	125,11
	$\pm 2,02$	$\pm 3,55^*$	$\pm 2,42^*$	$\pm 5,73^*$	$\pm 1,56^*$	$\pm 4,66^*$
K⁺						
(mEq/ L)	4,1	3,07	3,4	3,9	4,1	3,8
	$\pm 0,05$	$\pm 0,14^*$	$\pm 0,1^*$	$\pm 0,23$	$\pm 0,10$	$\pm 0,03$
Cl⁻						
(mEq/ L)	138,2	137,8	133,9	126,6	136,3	131,1
	$\pm 2,25$	$\pm 8,83$	$\pm 8,29$	$\pm 12,2$	$\pm 18,1$	$\pm 6,95$
Osmolalidade						
(mOsmol/Kg H ₂ O)	256,12	273,33	281,87	256,87	249,33	268,86
	$\pm 2,24$	$\pm 4,68$	$\pm 3,23^*$	$\pm 3,23$	$\pm 6,83$	$\pm 11,54$
pH						
	7,61	7,49	7,46	7,54	7,66	7,70
	$\pm 0,017$	$\pm 0,012^*$	$\pm 0,02^*$	$\pm 0,01^*$	$\pm 0,02$	$\pm 0,02^*$

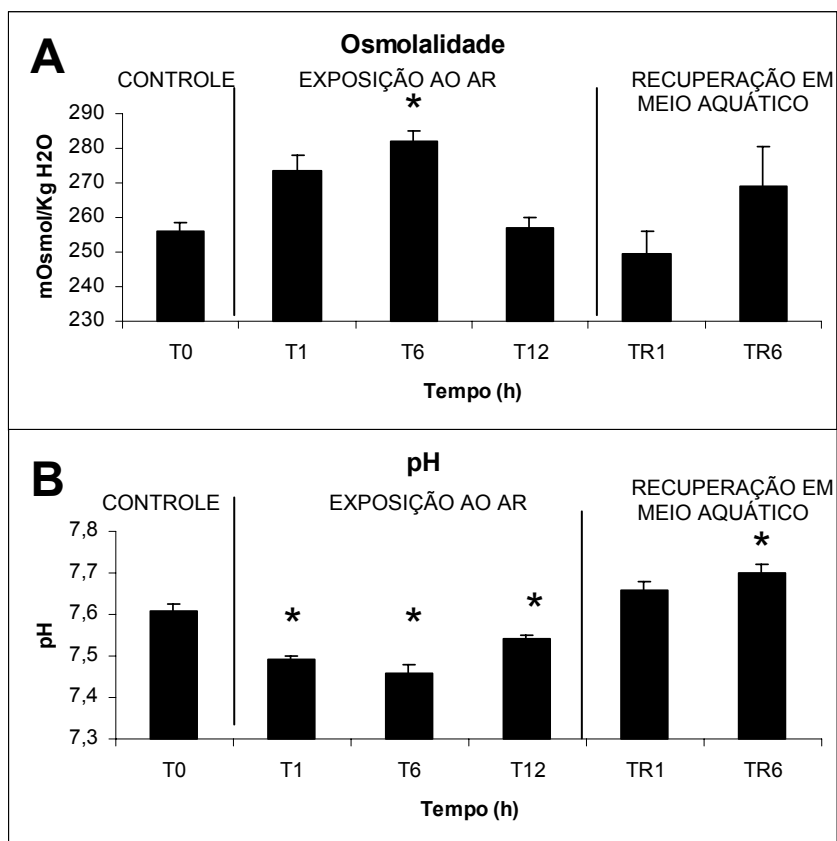


Figura 7. Valores médios (\pm E.P.M) da osmolalidade plasmática (mOsmol/kg H₂O) e pH sanguíneo de *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subseqüente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

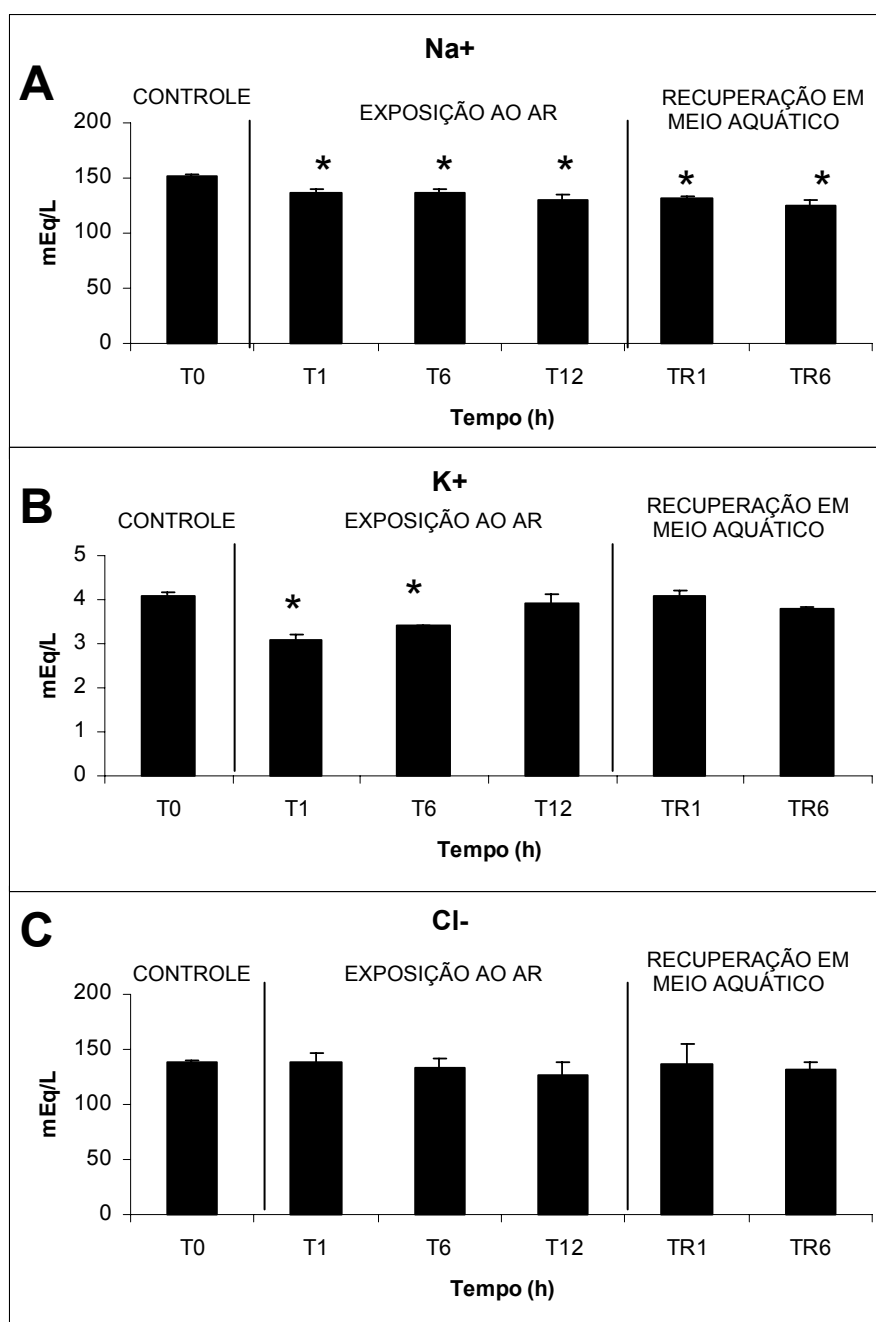


Figura 8. Valores médios (\pm E.P.M) da concentração dos íons plasmáticos (mEq/L) de *H. unitaeniatius*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

4.4 – Parâmetros Hematológicos

A tabela 4 e Figura 9 mostram os valores médios (\pm E.P.M) do Hct, RBC e a [Hb] e índices hematimétricos de *H. unitaeniatus* (n = 8) durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático.

Os valores médios de Hct (Figura 9 A), concentração de Hb (Figura 9 B) e RBC (Figura 9 C) aumentaram significativamente ($p < 0,05$) durante a exposição ao ar (T1, T6, T12) e retornaram aos valores semelhantes ao do grupo controle (T0) durante o período de recuperação (TR1; TR6).

O CHCM (Figura 9 D) foi significativamente maior ($p < 0,05$) durante a exposição aérea e a primeira hora de recuperação em meio aquático. Entretanto o HCM (Figura 9 E) e o VCM (Figura 9 F), não mostraram diferença significativa durante a exposição aérea e o período de recuperação quando comparados com o grupo controle.

4.5 – Hidroperóxido de Lipídios, Proteínas totais e Enzimas Antioxidantes.

4.5.1 – Análise Plasmática.

A Tabela 5 e as Figuras 10 e 11 mostram os valores médios (\pm E.P.M) da concentração de hidroperóxidos de lipídeos (HP), proteínas totais e das enzimas antioxidantes Glutationa Peroxidase (GPX) e Superóxido Dismutase (SOD) no plasma do *H. unitaeniatus* durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático.

Tabela 4. Valores médios (\pm E.P.M) dos parâmetros hematológicos do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.

	Controle	Exposição ao ar atmosférico				Recuperação	
	T0	(h)				em Meio Aquático (h)	
	T0	T1	T6	T12	TR1	TR6	
Hct	36,43	46,70	48,87	43,50	39,71	39,5	
(%)	$\pm 0,57$	$\pm 1,25^*$	$\pm 1,50^*$	$\pm 0,84^*$	$\pm 1,21$	$\pm 1,67$	
RBC	1,99	2,87	2,89	2,82	2,47	2,28	
($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$\pm 0,17$	$\pm 0,12^*$	$\pm 0,16^*$	$\pm 0,11^*$	$\pm 0,08$	$\pm 2,37$	
CHCM	12,97	15,59	15,85	14,54	14,67	13,04	
(%)	$\pm 0,24$	$\pm 0,36^*$	$\pm 0,56^*$	$\pm 0,23^*$	$\pm 0,30^*$	$\pm 0,52$	
HCM	57,05	52,12	56,18	51,32	59,34	59,71	
(pg)	$\pm 5,68$	$\pm 0,99$	$\pm 3,03$	$\pm 2,23$	$\pm 1,83$	$\pm 3,47$	
VCM	160,44	149,54	168,43	159,54	166,04	164,94	
(μm^3)	$\pm 10,15$	$\pm 5,56$	$\pm 6,94$	$\pm 4,05$	$\pm 7,03$	$\pm 7,39$	

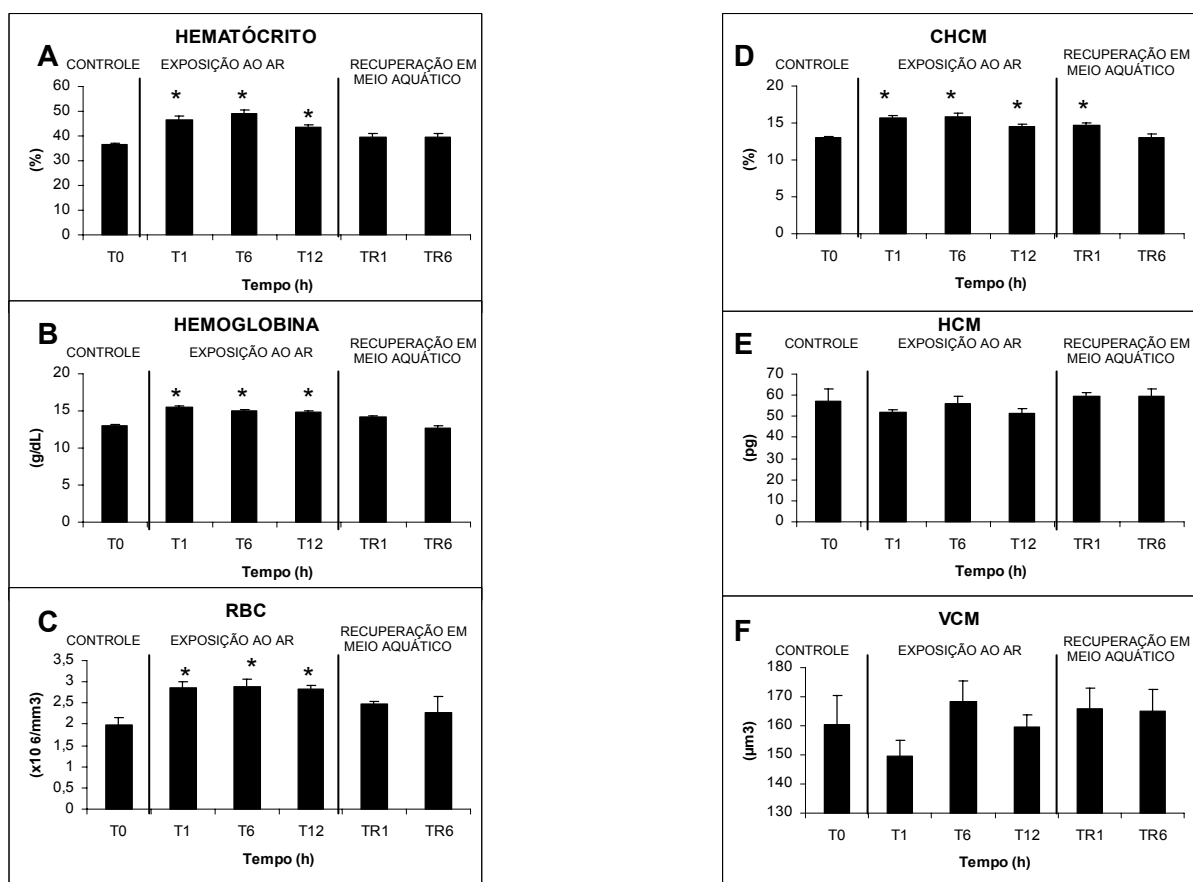


Figura 9. Valores médios (\pm E.P.M) dos parâmetros hematológicos do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar (T1, T6 e T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, T0.

Os níveis de HPs no plasma de animais do grupo T1 foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com o controle (T0) sendo que nos demais períodos de exposição ao ar (T6,T12) e durante a recuperação em meio aquático (TR1 e TR6) não houve diferença em relação ao grupo controle (T0) (Tabela 5, Figura 10 A).

A concentração de proteínas totais no plasma mostrou uma tendência a aumentar, mais não foi significativamente diferente do grupo controle durante a exposição aérea e a recuperação em meio aquático (Tabela 5, Figura 10 B).

A atividade da GPX plasmática aumentou progressivamente ($p < 0,05$) em todos os grupos experimentais desde 3,88 nmol/mg prot no grupo T0 (controle) até 5,91 nmol/mg prot no grupo TR6 (Tabela 5, Figura 11 A).

Durante a exposição ao ar a atividade da SOD plasmática mostrou redução gradual e foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que no grupo controle após 12 horas de exposição ao ar (T12). Durante a recuperação em meio aquático atividade da enzima continuou a diminuir passando de 137,62 (U SOD/ mg prot) no grupo T0 para 35,092 (U SOD/ mg prot) em TR6 (Tabela 5, Figura 11 B).

4.5.2 – Análise do Tecido Hepático.

A Tabela 6 e as Figuras 12 e 13 mostram os valores médios (\pm E.P.M) da concentração de hidroperóxidos de lipídeos (HP), proteínas totais, a atividade das enzimas antioxidantes Glutathione Peroxidase (GPX), Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT) no tecido hepático do *H. unitaeniatus* durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático.

Tabela 5. Valores médios (\pm E.P.M) da Concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol Fe^{3+} /g tec.), Proteínas Totais (mg/mL) e da atividade das enzimas antioxidantes Glutationa Peroxidase –GPX (nmol/mg prot) e Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) plasmático do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subseqüente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

	Controle	Exposição ao ar atmosférico				Recuperação	
	T0	(h)				em Meio Aquático (h)	
	T0	T1	T6	T12	TR1	TR6	
HP							
(nmol Fe^{3+} /mL pl)	20,03 $\pm 0,44$	22,66 $\pm 0,40^*$	21,12 $\pm 0,28$	20,27 $\pm 0,27$	20,58 $\pm 0,27$	20,98 $\pm 0,57$	
Proteínas							
(mg/mL)	18,43 $\pm 0,81$	21,70 $\pm 0,48$	22,81 $\pm 0,84$	20,46 $\pm 0,55$	19,50 $\pm 0,39$	17,91 $\pm 0,37$	
GPX							
(nmol/mg prot)	3,88 $\pm 0,15$	4,06 $\pm 0,20^*$	4,83 $\pm 0,17^*$	5,27 $\pm 0,18^*$	5,85 $\pm 0,25^*$	5,91 $\pm 0,38^*$	
SOD							
(USOD/mgprot)	137,62 $\pm 4,03$	107,93 $\pm 2,16$	74,61 $\pm 3,63$	59,83 $\pm 4,16^*$	35,33 $\pm 3,19^*$	35,09 $\pm 2,53^*$	

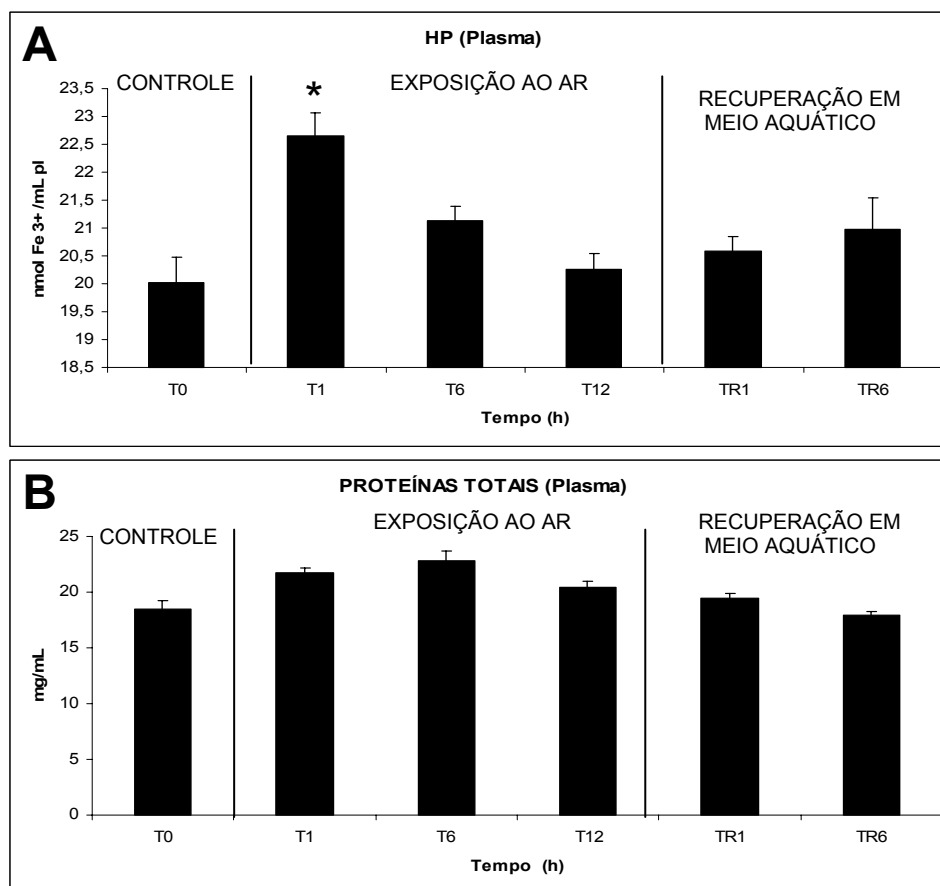


Figura 10. Valores médios (\pm E.P.M) da concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol Fe³⁺/g tec.) e Proteínas Totais (mg/mL) plasmáticos do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

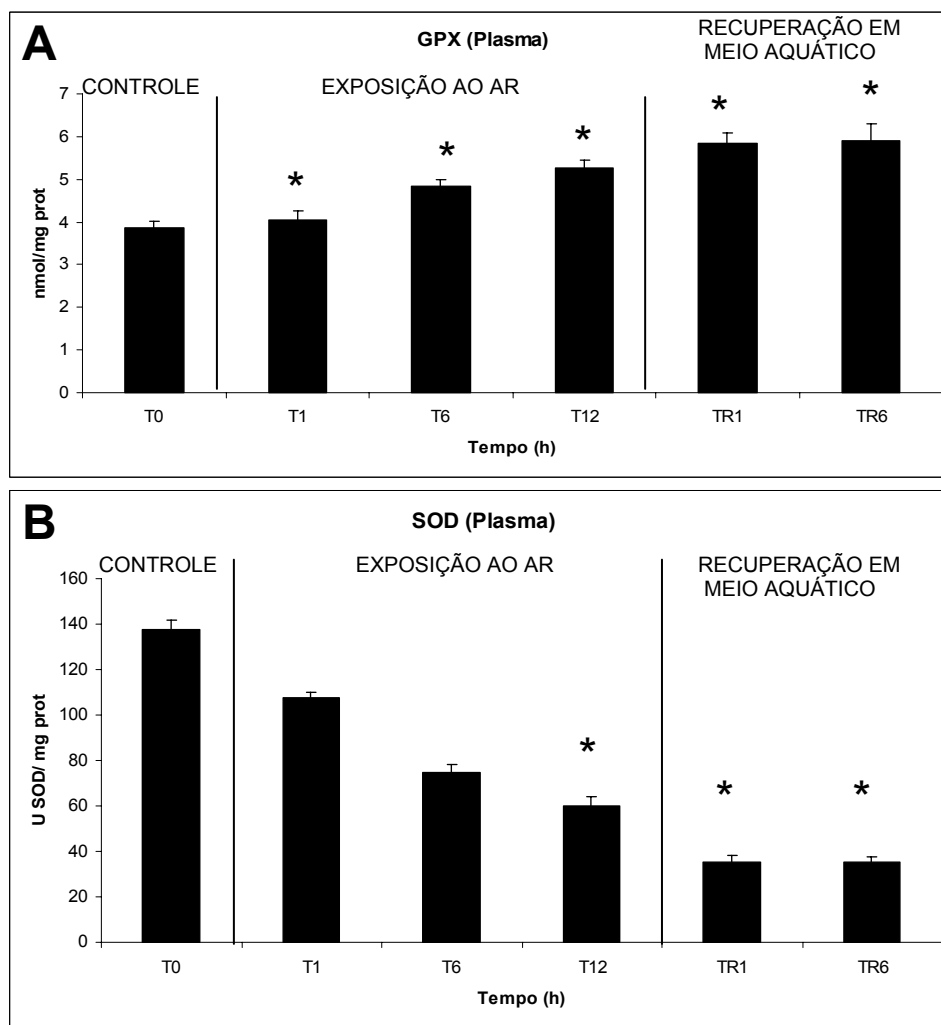


Figura 11. Valores médios (\pm E.P.M) da atividade das enzimas antioxidantes Glutationa Peroxidase –GPX (nmol/mg prot) e Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) plasmático do *H. unitaeniatatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

Os níveis de hidroperoxidação de lipídios no tecido hepático em jeju durante a exposição ao ar (T1, T6, T12) e subsequente recuperação (TR1 e TR6) não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo controle (T0) (Tabela 6, Figura 12 A).

A concentração de proteínas totais tecido hepático demonstrou tendência a aumentar durante a exposição ao ar sendo significativamente diferente ($p < 0,05$) apenas após 12 horas (T12) de exposição. A concentração de proteínas nos grupos em recuperação (TR1 e TR6) não apresentou diferença significativa quando comparados com o grupo controle. (Tabela 6, Figura 12 B).

A atividade da GPX no tecido hepático aumentou durante a exposição ao ar apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os grupos em relação ao controle. A atividade da GPX foi 17,53 nmol/mg prot no grupo controle (T0), 24,82 nmol/mg prot no grupo exposto 12 horas ao ar (T12) e 25,27 nmol/mg prot após 6h de recuperação em meio aquático. (Tabela 6, Figura 13A).

A atividade da enzima SOD no tecido hepático mostrou tendência a diminuir durante a primeira hora (T1) de exposição ao ar e, a partir da 6 horas (T6) foi significativamente menor ($p < 0,05$) do que a atividade do grupo controle (T0). Durante a recuperação em meio aquático (TR1 e TR6) a atividade da enzima SOD mostrou tendência a aumentar, mas ainda foi significativamente menor ($p < 0,05$) que a do grupo controle (Tabela 6, Figura 13 B).

A atividade da enzima CAT diminuiu significativamente nos grupos de exposição ao ar (T1, T6 e T12) em relação ao grupo controle. Após 1 hora (TR1) e 6 horas (TR6) de recuperação em meio aquático a atividade da enzima ainda foi significativamente maior que o controle ($p < 0,05$), porém uma tendência a aumentar foi evidenciada. (Tabela 6, Figura 13 C).

Tabela 6. Valores médios (\pm E.P.M) da Concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol Fe^{3+} /g tec.), Proteínas Totais (mg/mL) e da atividade das enzimas antioxidantes Glutathiona Peroxidase –GPX (nmol/mg prot), Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) e Catalase- CAT (U B/ mg prot) hepático do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

	Controle		Exposição ao ar atmosférico		Recuperação	
			(h)		em Meio Aquático (h)	
	T0	T1	T6	T12	TR1	TR6
HP						
(nmol Fe^{3+} /mL)	233,85	212,20	254,85	205,68	195,59	244,73
pl)	$\pm 19,13$	$\pm 19,32$	$\pm 14,64$	$\pm 17,73$	$\pm 11,69$	$\pm 13,02$
Proteínas						
(mg/mL)	6,20	6,46	7,44	8,23	7,40	7,12
	$\pm 0,24$	$\pm 0,28$	$\pm 0,23$	$\pm 0,57^*$	$\pm 0,128$	$\pm 0,528$
GPX						
(nmol/mg prot)	17,53	23,17	24,09	24,82	23,96	25,27
	$\pm 1,67$	$\pm 1,73^*$	$\pm 1,54^*$	$\pm 0,55^*$	$\pm 1,37^*$	$\pm 1,95^*$
SOD						
(USOD/mgprot)	200,16	186,01	157,91	126,86	127,14	158,45
	$\pm 8,51$	$\pm 11,48$	$\pm 4,06^*$	$\pm 8,19^*$	$\pm 5,36^*$	$\pm 11,58^*$
CAT						
(U B/mg prot)	40,01	36,47	31,01	23,84	26,2	30,34
	$\pm 1,89$	$\pm 2,35^*$	$\pm 1,97^*$	$\pm 2,18^*$	$\pm 2,1^*$	$\pm 1,38^*$

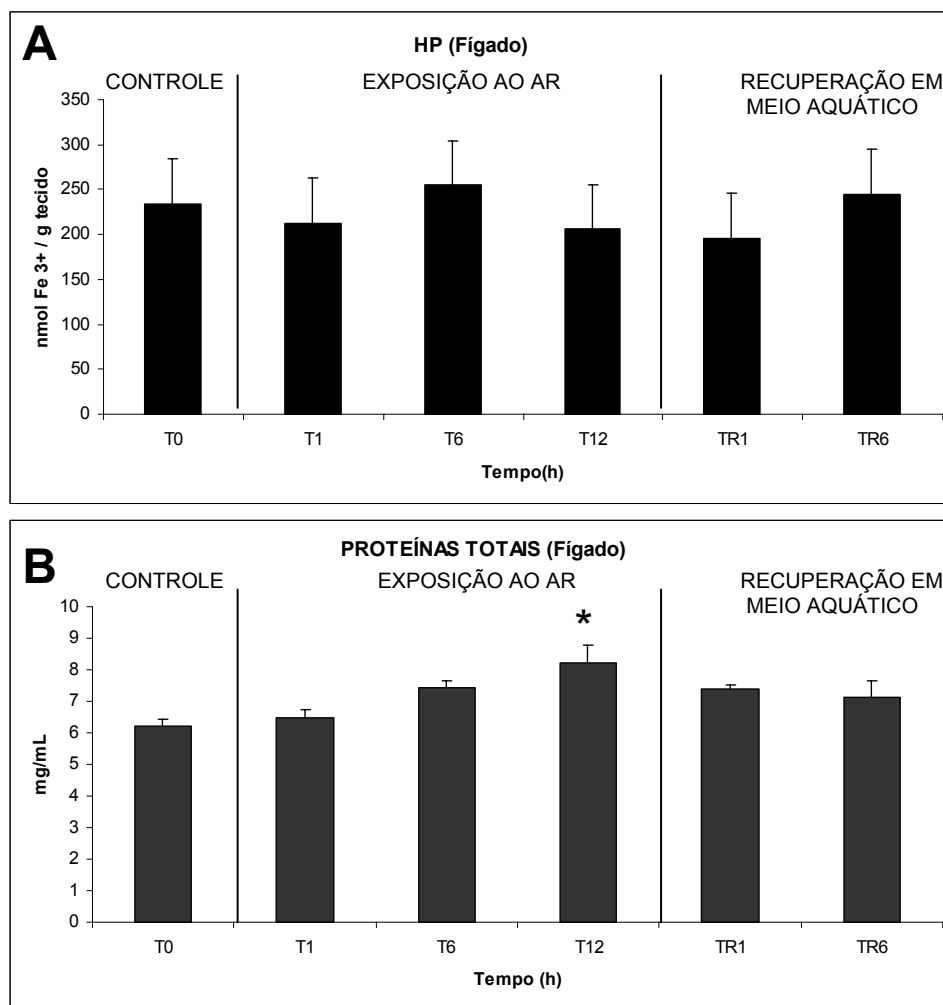


Figura 12. Valores médios (\pm E.P.M) da Concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol Fe³⁺/g tec.) e Proteínas Totais (mg/mL) hepático do *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

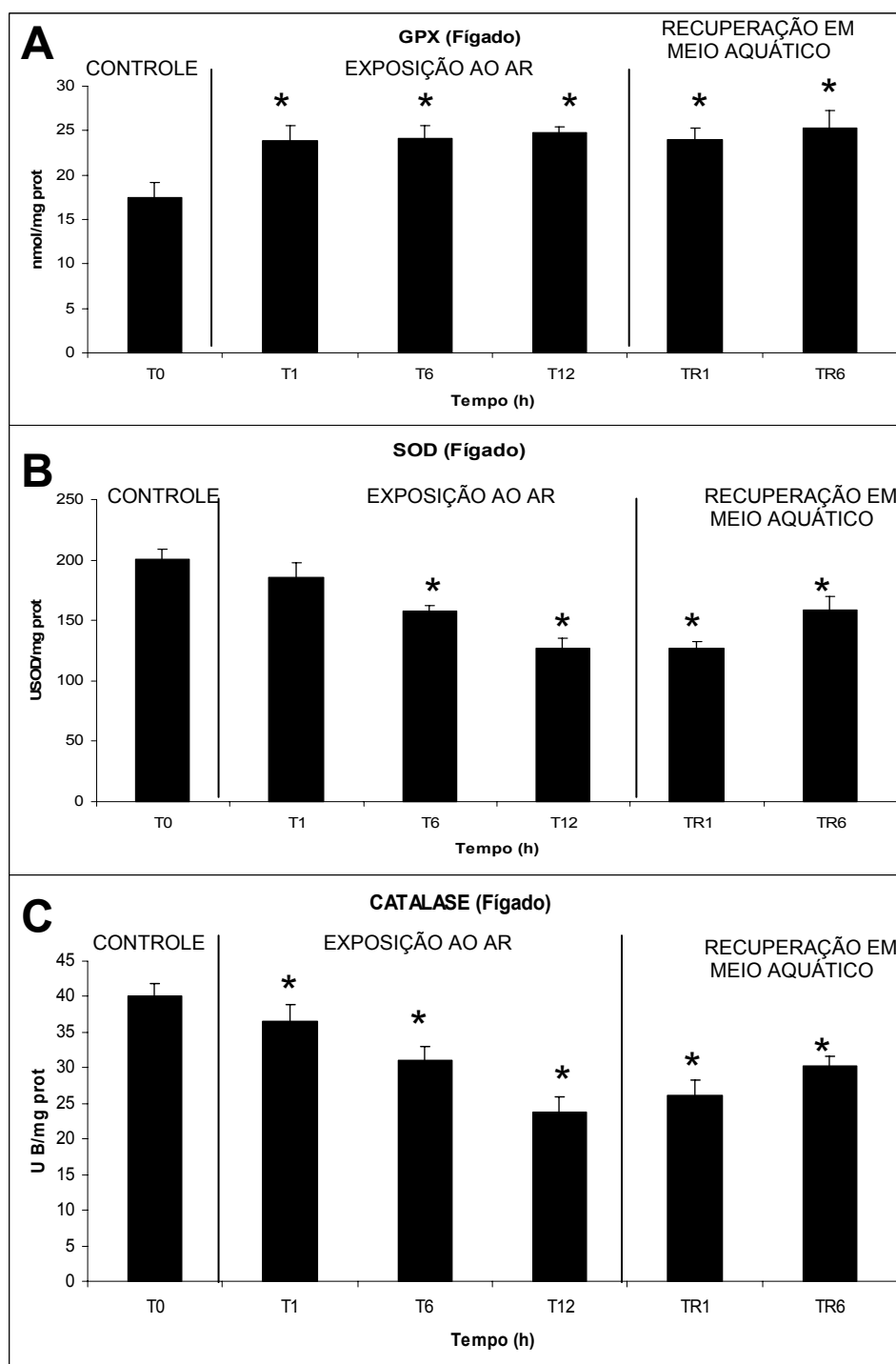


Figura 13. Valores médios (\pm E.P.M) da atividade das enzimas antioxidantes Glutationa Peroxidase –GPX (nmol/mg prot), Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) e Catalase - CAT (U B/mg prot) hepático do *H. unitaeniatius*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). * indica diferença estatística ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (T0).

5. DISCUSSÃO

O estresse, em peixes, é caracterizado principalmente pela elevação da concentração plasmática do cortisol (BARTON & IWAMA, 1991; WENDELAA BONGA, 1997) o qual pode aumentar de 10 até 100 vezes o valor do nível basal em situações de estresse agudo (PICKERING & POTTINGER, 1989). O aumento de aproximadamente 6 vezes na concentração do cortisol plasmático (2,90 a 17,24 µg/dL) após a primeira hora de exposição ao ar seguido do retorno gradual aos níveis semelhantes ao controle sugere que a exposição ao ar pode ser caracterizada como estresse agudo para *H. unitaeniatus*.

Essa mesma espécie submetida à uma hora de confinamento aumentou em 3 vezes o nível de cortisol ao final desse período (CASTRO, 2002) evidenciando que, embora a exposição ao ar e o confinamento são situações estressantes, a resposta ao estresse depende da intensidade, duração e tipo de estímulo estressor, além de ser espécie-específica como enfatizado por WENDELAAR BONGA (1997). A concentração de cortisol plasmático em *Sparus aurata* exposto ao ar atmosférico (3 minutos) foi, 1 hora após o estímulo, 23 vezes maior que o nível basal enquanto que o confinamento (24h) provocou um aumento de 8 vezes (ARENDS et al., 1999). Em *Oncorhynchus mykiss*, trinta segundos de exposição ao ar, resultou em um aumento de 60 vezes na concentração basal de cortisol (SLOMAN et al., 2001).

O aumento da glicose plasmática é uma resposta comum ao estresse (MAZEAUD et al, 1977; AFFONSO et al., 2002; MORAES et al., 2002, ACERETE et al., 2004; BRACEWELL et al., 2004) e constitui uma fonte extra de energia que possibilita ao animal superar os distúrbios causados pelo agente estressor (WENDELAAR BONGA, 1997). Em geral, o aumento da glicose plasmática tem sido

considerado como o resultado da ação das catecolaminas no fígado (PICKERING, 1981; HOCHACKA & SOMERO, 1984; JANSSENS & WATERMAN, 1988; RANDALL & PERRY 1992; WENDELAAR BONGA, 1997), entretanto o aumento do cortisol também está associado ao aumento da glicose plasmática, principalmente durante estresse prolongado, via gliconeogênese (WENDELAAR BONGA, 1997).

O aumento da glicose e a ausência de aumento significativo na concentração de lactato e piruvato sugerem que o O₂ absorvido pela bexiga natatória durante exposição aérea, mediado por ajustes hematológicos, manteve o suprimento de O₂ aos tecidos e, conseqüentemente, o metabolismo aeróbico durante a exposição aérea. A absorção de O₂ pela bexiga natatória de *H. unitaeniatus* é maior do que 30 % em condições de hipóxia ambiental e livre acesso ao ar atmosférico, e aumenta à medida que a concentração de O₂ diminui na água (STEVENS & HOLETON, 1978) extraindo aproximadamente 7 mL O₂/respiração aérea/kg quando em severa hipóxia (JUCÁ-CHAGAS, 2004).

Durante hipóxia gradual ocorre um aumento contínuo da freqüência de respiração aérea a partir da pressão parcial de O₂ igual a 80-60 mmHg (FERNANDES & MORON, 1996; OLIVEIRA et al., 2004) atingindo aproximadamente 20 respirações aéreas/h e 100 s/h em tensão de O₂ abaixo de 20 mmHg (OLIVEIRA et al., 2004). Em condições de exposição ao ar 100% do O₂ tem que ser obtido via bexiga natatória.

Os parâmetros hematológicos, Hct, [Hb] e CHCM, em *H. unitaeniatus* do grupo controle foram semelhantes aos determinados por JOHANSEN et al. (1978) para esta espécie coletada na região Amazônica (rio Solimões e lagos adjacentes). De acordo com estes autores o sangue de espécies que possuem respiração aérea tem alta capacidade para transportar O₂ e baixa afinidade Hb-O₂ comparado com o de peixes de respiração exclusivamente aquática. A afinidade Hb-O₂ em *H. unitaeniatus* mostra alta

sensibilidade ao pH do sangue comparado a outras espécies que possuem respiração aérea.

O aumento dos parâmetros hematológicos, Hct, [Hb] e RBC durante a exposição aérea, como observado em *H. unitaeniatus*, aumentam a capacidade de transporte do O₂, colaboram para minimizar os efeitos do agente estressor e auxiliam a manutenção da homeostase, uma vez que corrobora para manter o suprimento de O₂ aos tecidos. O Hct depende do número de eritrócitos presentes no sangue e pode ser influenciado por sua forma e tamanho (SOUZA, 1999). O VCM e a osmolalidade plasmática (exceto em T6) não mostraram diferenças significativas durante a exposição aérea sugerindo que o aumento no Hct em *H. unitaeniatus* ocorreu possivelmente pela liberação de novos eritrócitos pelos centros hematopoiéticos durante a exposição ao ar. As catecolaminas estimulam a liberação de novas células sanguíneas por contração esplênica (PICKERING, 1981), o que pode justificar o aumento no número de eritrócitos em *H. unitaeniatus*.

O aumento do lactato na primeira hora após retorno dos peixes ao meio aquático, que possui menor disponibilidade de O₂ do que o ar atmosférico pode ter ocorrido devido ao aumento brusco da atividade animal uma vez que, segundo STEVENS & HOLETON (1978), o consumo de O₂ do meio aquático em *H. unitaeniatus* após 24 de exposição ao ar não é muito alto não evidenciando um débito de O₂ muito alto. ARENDS et al. (1999) também considerou que o aumento do nível de lactato plasmático durante a exposição aérea (3 minutos) de *Sparus aurata* foi possivelmente devido ao aumento da atividade muscular.

Peixes que possuem respiração aérea, como *H. unitaeniatus*, mantém as brânquias como os órgãos primários para a excreção de CO₂, amônia e equivalentes ácidos (HYDE & PERRY, 1987, RANDALL et al., 2004). A ausência do fluxo de água

sobre as brânquias devido a supressão da ventilação branquial durante a exposição aérea elimina a ação deste órgão como potencial sítio de regulação iônica, ácido-base e excreção de amônia. O balanço hidromineral em peixes, embora possa ser modificado por muitos agentes estressores, esta associado à atividade da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+(\text{NH}_4^+)\text{-ATPase}$ na região basolateral das células de cloreto e a ação de trocadores iônicos Na^+/H^+ (NH_4^+) e Cl^-/OH^- (HCO_3^-) na região apical destas células cujo transporte de íons compensam as perdas iônicas por difusão. Além disso, a absorção de Na^+ , via canais de Na^+ , também ocorre durante a excreção ativa de H^+ (via V-ATPase) na região apical das células pavimentosas (RANDALL et al., 2004). Processo semelhante também ocorre nos túbulos renais para a reabsorção de íons (CAMERON & WOOD 1978).

Os peixes de água doce são hipertônicos em relação ao meio e o excesso de água que penetra no organismo, devido ao gradiente osmótico, é eliminado como urina hipotônica (SCHIMIDT-NIELSEN, 2002). Os rins nos teleósteos possuem grandes glomérulos e funcionam principalmente para eliminar o excesso de água, atuando também na captação/eliminação de íons (EVANS, 1993). A diminuição na concentração dos íons plasmáticos (Na^+ e K^+) durante a exposição aérea em *H. unitaeniatus* pode ter ocorrido via excreção renal. Segundo CAMERON & WOOD (1978), em condições de repouso e em meio aquático, o fluxo urinário de íons e a excreção de amônia pelos rins de *H. unitaeniatus* é comparável a outros teleósteos e ligeiramente maior do que em traira, *Hoplias malabaricus*, espécie da família Erythrinidae com respiração exclusivamente aquática.

A redução do pH e o acúmulo de amônia durante a exposição aérea mostraram que *H. unitaeniatus*, tem uma capacidade limitada para a regulação ácido-base. A redução do pH sanguíneo durante a exposição aérea parece estar relacionada principalmente à retenção de CO_2 que normalmente seria excretado pelas brânquias por

difusão ou hidratado participando da regulação ácido-base, uma vez que uma hora após o retorno ao meio aquático o pH sanguíneo foi restaurado.

Em *H. unitaeniatus* a participação de NH_4^+ na acidificação da urina pelos rins é de 87% em condições de repouso (CAMERON & WOOD, 1978). Em *Anguilla rostrata* exposta ao ar há um pequeno aumento na excreção de H^+ pelos rins, sendo que a recuperação do pH após o retorno ao meio aquático deve-se primariamente ao trocador $\text{Na}^+/\text{H}^+(\text{NH}_4^+)$ nas brânquias (HYDE & PERRY, 1987). Esses mesmos autores enfatizaram que o principal papel dos rins durante a exposição aérea é minimizar o possível risco de desidratação.

O aumento da concentração de amônia plasmática em todos os grupos experimentais pode estar associados à dificuldade de excreção, via brânquias, pois houve um aumento gradativo em 1, 6 e 12 horas de exposição aérea, e com o retorno da água o nível diminuiu também gradativamente, mais 6 horas de recuperação não foram suficientes para que a amônia plasmática retornasse ao normal. POLEZ et al. (2003) também verificaram que *H. unitaeniatus* exposto ao ar por 2 horas apresentou aumento significativo da amônia plasmática. Nesse mesmo estudo, estes autores demonstraram ainda que o *H. unitaeniatus* aumenta a atividade da enzima glutamina sintetase, uma das enzimas do ciclo da uréia que converte amônia em glutamina (WRIGHT, 1995; MOMMSEN & WALSH, 1992, 1989), minimizando os efeitos da toxicidade da amônia, pois a glutamina é menos tóxica do que a amônia (MCKENZIE et al. 1999; MOMMSEN & WALSH, 1992, 1989). Além disso, essa conversão pode auxiliar no controle do pH, uma vez que para cada molécula de glutamina metabolizada surge dois íons amônio (NH_4^+) que poderão ser excretados pelo rim e dois íons bicarbonatos (HCO_3^+) que serão lançados na corrente sanguínea (ALPERN & RECTOR, 1996; SCHWARTZ, 1995). Entretanto os dados obtidos no presente estudo mostraram que

embora esta estratégia possa estar ocorrendo 12 horas de exposição ao ar não impede o aumento da amônia plasmática.

Embora *H. unitaeniatus* possa sobreviver 24h no meio aéreo (STEVENS & HOLETON, 1978) os dados obtidos no presente estudo evidenciam que a exposição ao ar atmosférico, situação que o animal enfrenta em seu habitat natural durante o período de seca, eliciam as denominadas respostas primárias e secundárias ao estresse concomitante com uma disfunção branquial associada à excreção da amônia.

5.1 – Defesas Antioxidantes e Estresse Oxidativo

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são difíceis de serem detectados nos ensaios experimentais porque a meia vida desses radicais são extremamente curtas, em média, 10^{-9} a 10^{-6} segundos. Para superar essa dificuldade técnica, muitos métodos têm surgido tendo por base a detecção de produtos estáveis formados pela ação desses radicais em substratos específicos como, por exemplo, os hidroperóxidos de lipídios (HP). Os HP são os produtos estáveis formados durante a peroxidação de lipídios insaturados, como ácidos graxos e colesterol (ANDRADE JR. et al., 2005).

As membranas das células e organelas contém grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol e danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana e pode levar ao rompimento. O ataque de algumas espécies reativas que abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, inicia o processo de peroxidação lipídica (RAMOS et al., 2000; HALLIWEL & GUITTERIDGE, 1989). A decomposição dos hidroperóxidos resulta na formação do radical peroxila, que pode iniciar uma reação em cadeia,

propagando a peroxidação lipídica (JIALAL & GRUNDY, 1992; ESTERBAUER, 1987).

O aumento na concentração plasmática de hidroperóxidos em *H. unitaeniatus* durante a primeira hora de exposição ao ar atmosférico (grupo T1) sugere uma tendência ao estresse oxidativo durante esse período, mas que logo foi controlada, possivelmente pela atuação das enzimas antioxidantes, principalmente a GPX cuja concentração aumentou significativamente durante toda a exposição aérea e inclusive após o retorno ao meio aquático.

A produção de radicais livres pelas células pode ocorrer por auto-oxidação de pequenas moléculas, como as catecolaminas (CAs) (YU, 1994; STOREY, 1996), o que pode ter influenciado no aumento dos HPs durante a primeira hora de exposição ao ar, já que a síntese e liberação de CAs acontecem imediatamente após a atuação do estímulo estressor, neste caso a exposição ao ar atmosférico. Com a possível diminuição das catecolaminas não oxidadas e o aumento da concentração da GPX os níveis de HPs retornaram aos valores apresentados pelo grupo controle.

O conjunto das substâncias que neutralizam os efeitos danosos dos radicais livres de oxigênio constitui o sistema de defesas antioxidantes. Neste sistema estão incluídas as enzimas SOD, CAT e a GPX, citada acima, que não estão exclusivamente no citosol, mas também nas mitocôndrias, onde grande parte dos RLO é produzido (JI, et al., 1988; STOREY, 1996; HERMES-LIMA & ZENTENO-SAVÍN, 2002).

Em meio ácido, o O_2^- rapidamente forma o H_2O_2 , já em meio neutro ou pH alto a dismutação do O_2^- é catalisada pela SOD (GREGORY & FRIDOVICH, 1973; FRIDOVICH, 1978 e 1995). A diminuição da SOD tanto no fígado quanto no plasma apresentada em todos os grupos a partir de 6 horas de exposição ao ar e nos grupos de recuperação pode ter sido influenciado pela diminuição do pH (tabela 3 e figura 5B),

pois como a conversão O_2^- à H_2O_2 poderia ter acontecido pela acidez do meio a SOD teve sua atividade reduzida neste processo.

Quando os peixes voltaram ao ambiente aquático, apesar do pH estar restaurado, a SOD ainda permaneceu reduzida em TR1 e TR6, apresentando diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Possivelmente 6 horas de recuperação em meio aquático não são insuficientes para restauração dos níveis desta enzima ou ainda pela redução da produção do radical O_2^- durante a exposição aérea. O resultado mostrado corrobora com o estudo de PANNUNZIO & STOREY (1998) onde *Littorina littorea* foi submetido a 6 dias de anóxia e mostrou redução da atividade da SOD quando comparado com o grupo controle e a recuperação durante 12 horas não foi suficiente para que retornasse ao nível do grupo controle.

A enzima CAT é considerada o maior componente da defesa antioxidante primária, atuando na catálise da decomposição de H_2O_2 em água e dividindo esta função com a enzima GPX (RAMOS et al., 2000; CHUNG-MAN et al. 2001; ANDRADE JR. et al., 2005). A diminuição da atividade hepática da enzima CAT em todos os grupos de exposição aérea, mesmo evidenciando uma tendência a aumentar durante a recuperação, e o aumento da enzima GPX (hepática e plasmática) em todos os grupos experimentais (tanto os grupos de exposição ao ar como os grupos de recuperação em meio aquático) estão relacionados à diminuição da produção de H_2O_2 , principalmente pelo aumento do pH na recuperação. CHUNG-MAN et al. (2001) verificou que na presença de baixos níveis de H_2O_2 , os peróxidos são eliminados preferencialmente pela glutathione peroxidase, enquanto que em altas concentrações de H_2O_2 predomina a catalase, o que explica os resultados obtidos no presente estudo.

A GPX, segundo DEVLIN (2003), é um importante mecanismo de proteção o dano causado por radicais de oxigênio, pois catalisa a redução de peróxido de

hidrogênio e de peróxidos de lipídios (Fig. 14). Essa enzima contendo selênio usa grupos sulfidril da glutathione (GSH) como doador de hidrogênio para formação da forma dissulfeto oxidada da glutathione (GSSG). Glutathione redutase converte a forma dissulfeto da glutathione de volta à forma sulfidril usando NADPH produzido na via das pentoses fosfatos como doador de elétrons.

A oxidação dos aminoácidos pelos EROs induz a mudanças físicas nas proteínas constituídas por eles (GRIFFITHS et al., 1988). As proteínas são seletivamente fragmentadas nos resíduos de prolina (radical hidroxila), bem como nos aminoácidos histidina e arginina, que estão em íntima associação com os metais de transição (WOLFF & DEAN, 1986). A degradação proteolítica é o resultado das alterações grosseiras da conformação protéica que podem ocorrer pela ação dos EROs (MARX & CHEVION, 1986). A atuação dos EROs sobre as proteínas no presente estudo não parece ter sido significativa, pois a concentração de proteínas totais (plasmática e hepática) não demonstrou diferença, exceto em T12 no fígado, quando ocorre um aumento em relação ao grupo controle, o que pode estar associado a perda d'água .

O estresse oxidativo ocorre quando há uma elevação da produção de radicais livres de oxigênio seguida da diminuição das defesas antioxidantes (SIES, 1993; STOREY, 1996; HERMES-LIMA, 1998; RAMOS et al., 2000; HERMES-LIMA, 2002; CHUNG-MAN et al. 2001; ANDRADE JR. et al., 2005). Apesar da diminuição da atividade da CAT e da concentração da SOD, a peroxidação lipídica das membranas não foi evidenciada no presente estudo, não sendo possível afirmar que houve estresse oxidativo durante a maioria do tempo de exposição aérea e subsequente retorno ao ambiente aquático, exceto em T1 (plasma). A diminuição do pH e o aumento da concentração da GPX podem ter corroborado com a minimização dos efeitos dos EROs.

em *H. unitaeniatus* durante 12 horas de exposição aérea e recuperação em ambiente aquático,

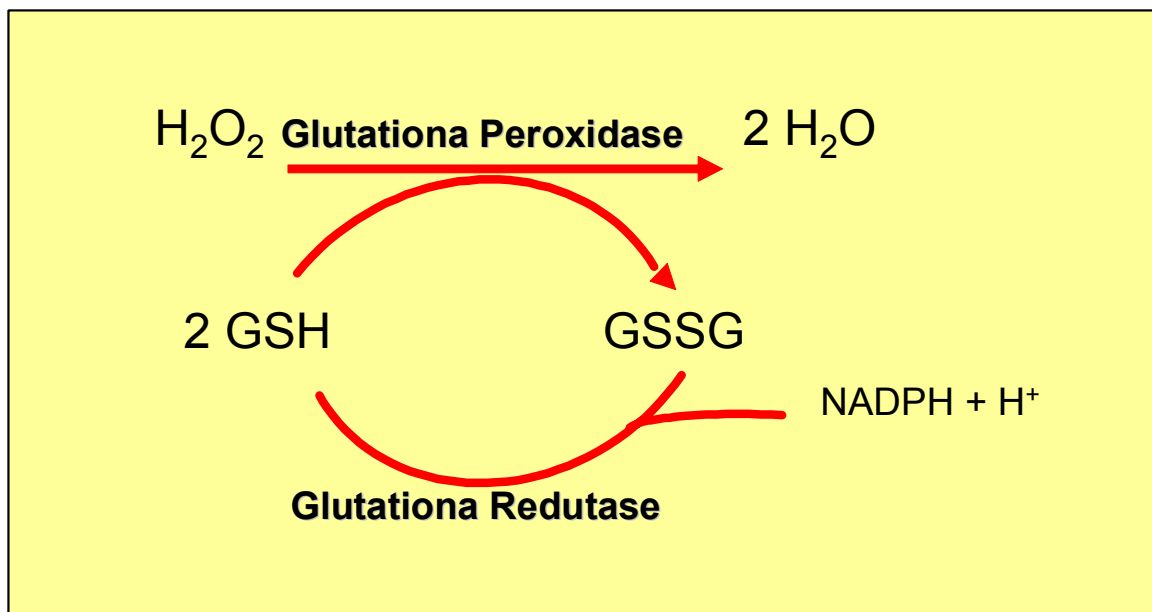


Figura 14. Glutaciona peroxidase remove peróxido de hidrogênio, bem como peróxidos de lipídios. Adaptado de Devlin (2003).

RAMOS & HERMES-LIMA (2000) comentam que 1 hora de recuperação após 8 horas de anóxia em goldfish, *Carassius auratus*, causou um aumento de 100% no nível de peroxidação lipídica hepática e que a atividade da CAT no fígado, durante a anóxia, serviu para manter a peroxidação lipídica em níveis fisiologicamente suportáveis, porém os resultados apresentados pelos HPs, enzimas antioxidantes (CAT, SOD E GPX) e proteínas totais mostram que apesar do *H. unitaeniatus*, durante a exposição aérea, ter maior acesso ao O₂ pelo aumento do número de eritrócitos/hemoglobina, e maior disponibilidade de O₂ na atmosfera não demonstrou estresse oxidativo durante a exposição aérea, exceto na primeira hora (T1). E que a GPX parece ter sido a principal responsável pela prevenção do estresse oxidativo nesta espécie.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem-nos concluir que:

- A exposição aérea para o jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, atua como um estressor agudo, caracterizado por um aumento na concentração do hormônio cortisol e da glicose plasmática. Seis horas em meio aquático após a exposição aérea são suficientes para a recuperação.
- Durante a respiração aérea o metabolismo aeróbico é possivelmente mantido, baseado no resultado apresentado pelo lactato e piruvato plasmático, possivelmente pela eficiência da bexiga natatória na obtenção de O₂, associado aos ajustes hematológicos mostrados durante a exposição aérea.
- Durante 12 horas de exposição ao ar o *H. unitaeniatus* apresenta um desequilíbrio iônico, caracterizado pela diminuição dos íons Na⁺ e K⁺ e seis horas de recuperação em meio aquático não são suficientes para a recuperação.
- A exposição aérea dificulta a excreção de amônia, evidenciado pelo acúmulo crescente de amônia durante todos os grupos de exposição aérea. Seis horas de recuperação não são suficientes para que o nível de amônia retorne ao normal.

- Durante a exposição aérea há a síntese e liberação de eritrócitos, evidenciado pelos resultados apresentados pelo Hct, Hb, RBC e VCM.
- A exposição aérea provoca desequilíbrio ácido-base em *H. unitaeniatus*, caracterizado pela redução do pH em todos os grupos expostos ao ar.
- Durante a primeira hora de exposição ao ar há aumento da peroxidação lipídica caracterizada pelo aumento dos HPs plasmáticos em T1.
- Apesar da diminuição das enzimas CAT e SOD, durante a exposição aérea, a peroxidação lipídica a partir de seis horas de recuperação foi controlada possivelmente pela atuação da GPX que aumentou em todos os grupos experimentais.
- A GPX é a principal enzima antioxidante que atua durante a exposição aérea.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERETE, L.; BALASCH, J.C.; ESPINOSA, E.; JOSA, A.; TORT, L. 2004. Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*. 237, 167-178.
- AEBI, H. 1974. Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer V.H. (eds) Academic Press, New York and London. 2, 137-158.
- AFFONSO, E.G.; POLEZ, V.L.P.; CORRÊA, C.F.; MAZON, A.F.; ARAÚJO, M.R.; MORAES, G.; RANTIN, F.T. 2002. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. C* 133, 375-382.
- ALEXANDRE, R.M. 1966. Physical aspects of swin bladder function. *Biol. Rev.* 41, 141-176.
- ALPERN R.J.; RECTOR F.J.JR. 1996. Renal acidification mechanisms. In: Brenner B.M.; Rector F.C. (eds.) *The Kidney*. 5th Ed., Philadelphia.
- ANDRADE-JUNIOR, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. 2005. Os Radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J. Bras. Pneumol.* 31(1) 60-68.
- ARENDS, R.J.; MANCERA, J.M.; MUNÓZ, J.L.; WENDELAAR BONGA, S.E. 1999. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *J. of Endocrinol.* 163, 149-157.
- ARUOMA, O.I. 1994. Free radical and antioxidant strategies in sports. *J. Nutr. Biochem.* 5, 370-381.
- BARRETO, R.E. 2002. Estressor social facilita estresse na tilápia-do-Nilo? Botucatu, SP. 38p. (dissertação de mestrado) Universidade Estadual Paulista -Botucatu.

- BARTON, B.A.; IWAMA, G.K. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annu. Rev. Fish Dis.* 1, 3-26.
- BENZI, G. 1993. Antioxidant nutrients and immune functions. In: PHILLIPS, M. & TERGERDY, R.P. (eds). *Advances in Exp. Med. Biol.* Bendich, APlenum Press. N.Y. and London, 1990.
- BOIJINK, C.L. 2004. Localização e orientação dos quimiorreceptores de CO₂ e/ou pH envolvidos no controle dos reflexos cardio-respiratórios e da respiração aérea de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. São Carlos, SP. 98p. Tese (Doutorado em Ciências) – PPGCF, Universidade Federal de São Carlos.
- BRACEWELL, P.; COWX, G. I.; UGLOW, R.F., 2004. Effects of handling and electrofishing on plasma glucose and whole blood lactate of *Leuciscus cephalus*. *J. Fish Biol.* 64, 65-71.
- BRADFORD, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. 1984. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias. Câmara dos Deputados/Codevasf, Brasília, 143.
- CAMERON, J.N.; WOOD, C.M., 1978. Renal function and acid-base regulation in two Amazonian erythrinid fishes: *Hoplias malabaricus*, a water breather, and *Hoplerythrinus unitaeniatus*, a facultative air breather. *Can. J. Zool.* 56, 917-930.
- CANNON, W. 1929. Organization for physiology homeostase. *Physiol. Rev.* 9, 399-431.
- CANNON, W. 1939. The wisdom of the body. Ed. W. W. Norton, New York.

- CADAVID GARCIA, E.A., 1984. O clima do Pantanal Mato-grossense. Corumbá: Embrapa – CPAP. 39P (Embrapa-CPAP. Circular Técnica, 14).
- CARRAGHER, J. F.; RESS, C. M., 1994. Primary and secondary stress responses in golden perch, *Macquaria ambigua*. *Comp. Biochem. Physiol. A* .107, 49-56.
- CARTER, G.S.; BEADLE, L.C. 1931. The fauna of the swamps of the Paraguayan Chaco in relation to its. Environments: III Respiratory adaptation in the fishes. *J. Limn. Soc.* 37, 327-366.
- CARVALHO, C. S.; FERNANDES, M.N., 2006. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. *Aquaculture*. 251 (1), 109-117.
- CASTRO, F.J. 2002. Respostas fisiológicas ao estresse de confinamento em jeju, *Hoplerthrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae). São Carlos. 64p. Dissertação (Mestrado em ciências fisiológicas)- PPGCF, Universidade Federal de São Carlos.
- CHUNG-MAN, H.J.; ZHENG S.; COMHAIR, S.A.; FARVER, C. 2001. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* 61, 8578-8585.
- COLOMBO, L.; PICKERING, A. D.; BELVETERE, P.; SCHERECK, C. B. 1990. Stress inducing factors and stress reaction in aquaculture. In: DE PANW, N., BILLARD, R. (eds.), Bredene: Aquaculture Europe 89 – business Joins Science, special publication .18, 93-121.
- COSTA, O. F. T., FERREIRA, D.J.S., MENDONÇA F. L. P., F.L.P.; FERNANDES, M. N., 2004. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae) to short-term exposure to nitrite. *Aquaculture*. 232, 627-636.

- DEHADRAI, P. V.; TRIPATHI, S.D. 1976. Environment and ecology of freshwater air-breathing teleosts. In: HUGHES, G.M. (eds) *Respiration of Amphibious vertebrates*. Academic Press, London, 39-72.
- DETHLOFF, G.M.; SCHLENK, D.; KHAN, S.; BAILEY, H.C., 1999. The effects of copper on blood and biochemical parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. of Enviro. Contam. and Toxicol.* 36 (4), 415-423.
- DEVLIN, T.M. 2003. Manual de Bioquímica com correlações clínicas. Edgard Blucher(eds). São Paulo, 521-523.
- DONALDSON, E.M. 1981. The pituitary-interrenal Axis as an indicator of stress in fish. In: *Stress and Fish*, PICKERING, A.D. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 11-47.
- DROGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 82, 47-95.
- DUBOIE, M. G.; HAMILTON K. A.; ROBERTS. J. K.; SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-358.
- ESTERBAUER, H.; JURGENS, G.; QUEHENBERGER, O. KOLLER, E. 1987. Autoxidation of human low density lipoprotein loss of polyunsaturated fatty acids and citamin E and generation of aldehydes. *J. Lipid Res.* 28, 495-509.
- EVANS, D.H.1993. Osmotic and Ionic regulation. In: EVANS D.H. (eds) *The physiology of fishes*. CRC, Press, Boca Raton.
- FANGE, R. 1973. The Physiology of the swinblader. In. BOLIS, L.; SCHIMIDT-NIELSEN, K. MADDRELL, S.H.P. *Comparative physiology*. North-Holland Publ. Co. New York, p. 135-159.

- FERNANDES, M.N.; MORON, S.E. 1996. Respiratory organs in erythrinid fishes. In: Proceeding of Physiology of Tropical fishes. In: VAL, A.L.; RANDALL, D.J.; MACKINLEY, D. (eds.), p. 93-100, American Fisheries Society, San Francisco University, San Francisco, pp 141.
- FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L.; MORON, S.E. 1994. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. *Can. J. Zool.* 72, 160-165.
- FINK, W. I.; FINK, S.V. 1978. A Amazônia central e seus peixes. *Supl. Acta Amazônica.* 8(4), 19-42.
- FRIDOVICH, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science.* 201, 875-780.
- FRIDOVICH, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64-97.
- GAUTHIER, P.; NADEAU, R.; DE CHAMPLAIN, J. 1972. Acute and chronic cardiovascular effects of 6-hydroxydopamine in dogs. 31, 207-217.
- GEE, J. H. 1980. Respiratory patterns and atipredator responses in the central mudminnow, *Umbra limi*, a continuous facultative air-breathing fish. *Can J. Zool.* 58, 819-827.
- GENTZKON, C.J.; MASEN, J.M., 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. of Biolog. Chemists.* 143, 531-544.
- GILMOUR, K.M. 2001. The Co₂/pH ventilatory drive in fish. *Comp. Biochem. Physiol.A.* 130, 219-240.
- GLASS, M.L.; ISHIMATSU, A.; JOHANSEN, K. 1986. Responses of aerial ventilation to hypoxia and hypercapnia in *Channa argus*, an air-breathing fish. *J.Comp. Physiol.* 156(B), 425-430.

- GODOY, M.P., 1975. Família Erythrinidae. In: Peixes do Brasil, Sub-ordem Caracoidei. Bacia do Rio Mogi Guaçu, Editora Franciscana, Piracicaba. 3, 440-444.
- GODOY, M.P. 1979. Rio Iguazu, Paraná, Brasil: reconhecimento da ictiofauna, modificações ambientais e usos múltiplos dos reservatórios. Eletrosul.
- GRAHAM, J.B; KRAMER, D.L.; PINEDA, E. 1977. Respiration of the air-breathing fish. *Piabucina festae*. *J. Comp. Physiol.* 22, 295-310.
- GRAHAM, J.B. 1997. Air-breathing fishes: evolution, diversity and adaptation. Academic Press. pp. 299.
- GREGORY, E.M.; FRIDOVICH, I. 1973. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 114, 1193-1197.
- GRIFFITHS, H.R.; UNSWORTH, J.; BLAKE, D.R.; LUNEC, J. 1988. Free radicals in chemistry, pathology and medicine. London: Richelieu. pp. 439-454.
- GUTERRIDGE, M.C.; HALIWELL B. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transitions metals and disease. *Biochem J.* 219, 1-14.
- HALFEMAN, D.G.; SUNDAE, R.A.; HOEKSTRA, W.G.1974. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. *J.Nutr.* 104, 580-587.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 1989. Free Radicals in biology and medicine. Oxford University Press. p 543.
- HARROWER, J. R.; BROWN, C.H., 1972. Blood lactic acid. micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.* 32(5), 224-228.

- HERMES-LIMA, M.; STOREY, J.M.; STOREY, K.B. 1998. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 120, 437-448.
- HERMES-LIMA, M.; ZENTENO-SAVÍN. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 133, 537-556.
- HOCHACKA, P. W.; SOMERO, G.N., 1984. *Biochemical Adaptation*. Princeton Univ. Press, Princeton.
- HYDE, D.A.; PERRY, S.F., 1987. Acid-base and ionic regulation in the American eel (*Anguilla rostrata*) during and after prolonged aerial exposure: branchial and renal adjustments. *J. Exp. Biol.* 133, 429-447.
- JANSSENS, P.A., WATERMAN, J., 1988. Hormonal regulation of gluconeogenesis and glycogenolysis in carp (*Cyprinus carpio*) liver pieces cultured in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. A* 91, 451-455.
- JOHANSEN, K. 1970. Air Breathing in fishes. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J. *Fish Physiology*. Academic Press New York, 4 361-411.
- JØRGENSEN, E.H.; VIJAYAN, M.M.; ALURU, N.; MAULE, A.G., 2002. Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose, and lactate responses to a handling disturbance in *Arctic charr*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 132, 235-245.
- JL, L.L., STRATMAN F.W.; LARDY, H.A. 1988. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch Biochem. Biophys.* 263, 150-160.
- JIALAL, I.; GRUNDY, S.D. 1992. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. New York. 669 (30), 239-248

- JIANG Z. Y. et al. 1991. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe^{2+} in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. *Lipids*, 26, 853-856.
- JUCÁ-CHAGAS, R., 2004. Air breathing of the neotropical fishes *Lepidosiren paradoxa*, *Hoplerythrinus unitaeniatus* and *Hoplosternum littorale* during aquatic hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139, 49-53.
- JULIEN, C.; KANDZA, P.; BARRESC. L.O.M.; CERUTTI,C.; SASSARD,J. 1990. Effects of sympathectomy on blood pressure and its variability in *conscious rats*. *Am. J. Physiol.*, 259 1337-1342.
- KRAMER, D.L., 1978. Ventilation of the respiratory gas bladder in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Characoidei, Erythrinidae). *Can. J. Zool.* 56, 931-938.
- KRAMER, D.L. 1983. The evolutionary ecology of respiratory mode in fishes: an analysis based on the cost of breathing. *Env. Biol. Fish.* 9, 145-158.
- LIEM, K.F.; ECLANCHER, B.; FINK, W.L. 1984, Aerial respiration in the banked knife fish *Gymnotus carapo* (Teleostei: Gymnotoidei). *Physiol. Zool.* 57, 185-195.
- LOPES, J.M. 2003. Localização e orientação dos quimiorreceptores de O_2 envolvidos no controle dos reflexos cardio-respiratórios e da respiração aérea acessória de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae) em resposta à hipóxia ambiental. São Carlos, SP. 80p. Tese (doutorado em ciências) – PPGCF, Universidade Federal de São Carlos.
- LOWE-MCCONNEL, R.H. 1987. Ecological studies in tropical fish communities. Cambridge University Press, Cambridge 382.
- LU, G. D., 1939. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B- deficient state. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. *Biochem. J.* 33, 249-254.

- MARX G.; CHEVION M., 1986. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper and ascorbate. *Biochem. J.* 236, 397-400.
- MATTIAS, A. T.; MORON, S. E.; FERNANDES, M. N. 1996. Aquatic respiration during hypoxia of the facultative air-breathing fish, *Hoplerythrinus unitaeniatus*. A comparison with the water-breathing, *Hoplias malabaricus*. In: VAL, A.L. ALMEIDA-VAL, V.M.F. & RANDLL, D.J., (eds.). *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon.*, INPA, Manaus, p. 203-211.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.* 106, 201-212.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A.D. *Stress and Fish*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 49-75.
- MCDONALD, G.; MILLIGAN, L. 1997. Ionic, osmotic and acid-base regulation. In: IWAMA, G.K.; PICKERING, A. D.; SUMPTER, J.P.; SCHRECK, C.B. (Eds.), *Fish stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K, pp. 119-144.
- MCKENZIE D.J.; PIRACCINI G.; FELSKIE A.; ROMANO P.; BRONZI P.; BOLIS C.L. 1999. Efecets of plasma total ammonia content and pH on urea excretion in *Nile tilapia*. *Physiol. and Biochem. Zool.* 72, 116-125.
- MOMMSEN T.P E WALSH P J., 1992. Biochemical and environmental perspectives on nitrogen metabolism. *Experientia.* 48, 583-593.
- MOMMSEN T.P E WALSH P J., 1989. Evolution of urea synthesis in vertebrate: The piscine connection. *Science.* 243, 72-75.

- MORAES, G., AVILEZ, I.M., ALTRAN, A.E., BARBOSA, C.C., 2002. Biochemical and hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) exposed to environmental hypoxia. *Braz. J. Biol.* 62 (4A), 633-640.
- MORAES, G., POLEZ, V.L.P., IWAMA, G.K., 2004. Biochemical responses of two erythrinidae fish to environmental ammonia. *Braz. J. Biol.* 64(1), 95-102.
- NANDI, J. 1962. The structure of the interrenal gland in teleost fishes. *Univ. of Calif. Publs Zool.* 65, 129-211.
- NATARAJAN, G.M. 1979. Observations on the oxygen consumption in Indian air-breathing fishes . III Oxygen consumption in the fresh water catfish, *Mystus gulio*. *Comp. Physiol. Ecol.*, 4,38-40.
- NOLAN, D.T., 2000. Skin response of fish to stressors. Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.
- OLIVEIRA, R.D.; LOPES, J.M.; SANCHES, J.R.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L.; RANTIN, F.T. 2004. Cardiorespiratory responses of the facultative air-breathing fish jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Teleostei, Erythrinidae), exposed to graded ambient hypoxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 139, 479-485.
- PANNUNZIO, M.T.; STOREY, K.B. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. of Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221, 277-292.
- PEREIRA, B. 1994 (a). Exercício físico como pró-oxidante. Ver. Paul. Ed. Ed.Fis. 8, 77,89.
- PEREIRA, B.; CURI, R.; COSTA ROSA, L.F.B.; SAFI, D.A.; MEDEIROS, M.H.G. & BECHARA, E.J.H. 1994 (b). Superoxide dismutase, catalase and glutathione

- peroxidase Activities in Immune organs and muscles of sedentary and exercised-trained rats. *Physiol & Behav.* 56, 1095-1099.
- PERRY, S.F.; LAURENT, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J.C. JENSEN, F.B. *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, p. 231-264.
- PERRY, S. F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 59, 325-347.
- PICKERING, A.D., 1981. *Stress and Fish*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 1-9.
- PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. and Biochem.* 7 (1-4), 253-258.
- PIIPER, J., 1989. Factors affecting gas transfer in respiratory organs of vertebrates. *Can. J. Zool.* 67, 2956-2960.
- POLEZ, V.L.P.; MORAES, G.; SANTOS NETO, C. 2003. Different biochemical strategies of two Neotropical fish to cope with the impairment of nitrogen excretion during air exposure. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36 (2), 279-285.
- POTTINGER, T.G.; CARRICK, T.R.; APPLEBY, A.; YEOMANS, W.E. 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: is the chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol-resistant teleost? *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 108-117.
- RAMOS, G.; ALVES, A.L.; HERMES-LIMA, M. 2000. Radicais livres, antioxidantes e adaptabilidade animal. In: EL-HANI, C.N.; VIDEIRA, A.A.P. (eds). O que é vida: para entender a biología do século XXI. 209-231.
- RANDALL, D.J.; PERRY, S.F. 1992. Catecolamines. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., FARRELL, A.P., *Fish Physiology*. San Diego: Academic Press, pp. 255-300.

- RANDALL, D.J., IP, Y. K., CHEW, S.F., WILSON, J. M., 2004. Air breathing and ammonia excretion in the giant mudskipper, *Periophthalmus schlosseri*. *Physiol. and biochem. Zool.* 77, 783-788.
- SCHRECK, C.B. 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: PICKERING, A.D.(EDS), *stress and fish*. Academic Press, London, 295-321.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 2002. *Fisiologia animal – Adaptação e Meio Ambiente*. Santos (ed) São Paulo. 5 edição. 369-372.
- SCHWARTZ, J.H. 1995. Renal acid-base transport: The regulatory role of the inner medullary collectin duct. *Kidney Int.* 47, 333.
- SCOTT, M.D; LUBIN, B.H; ZUO, L; KUYPERS, F.A; 1991. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J. Lab. Clin Med.* 118, 7-16.
- SIES, H. 1993. Strategies of antioxidants defenses. Review. *European Journal of Biochemistry.* 215(2), 213-219.
- SJODIN, B.; WESTING, Y.H.; APLLE, F.S. 1990. Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 10, 236-254.
- SLOMAN, K.A; DESFORGES, P.R; GILMOUR, K.M., 2001. Evidence for a mineralocorticóide-like receptor linked to branchial chloride cell proliferation in freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 204, 3953-3961.
- SMITH, N.J.H. 1979. A pesca no rio Amazonas. IMPA, Manaus, 1979. p.154.
- SOUZA, R.H.S., 1999. Respostas cárdio-respiratórias e metabólicas de dourado, *Salminus maxilloso* (Valenciennes,1849) (Teleostei, Characidae) submetido à

- hipóxia ambiental. 160f. Tese. Centro de ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.
- SPLITZ D. R.; OBERLEY, L.W. 1989. An assay for Superoxide Dismutase Activity in Mammalian Tissue homogenates. *Anal. Biochem.* 179, 8-18.
- STOREY, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (12) 1715-1733.
- STEVENS, E.D.; HOLETON, G.F., 1978. The partitioning of oxygen uptake from air and from water by erythrinids. *Can. J. Zool.* 56, 965-969.
- SUNDIM, L.I.; REID, S.G.; KALININ, F.T.; RANTIN, F.T. 2000. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*) O₂ chemioresponses. *Resp. Physiol.* 116, 181-199.
- URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 189, 41-54.
- VAL, A.L; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 1995. Fishes of the Amazon and their environment. Physiological and Biochemical Features. Springer-Verlag, Heidelberg. *Zoophysiology.* 32, 224.
- VIGAS, M. 1980. Contribution to the understanding of the stress concept. In: USDIN, KVETRIANSKY, KOPIN. (eds) *Catecholamines and stress: Recent advances.* Elsevier, North Holland 573-577.
- WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. The Stress Response in Fish. *Physiol.* 77, 591-625.
- WOLFF. S.P.; DEAN, S.T. 1986. Fragmentation of protein by free radical and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.* 234, 399-403.

WRIGHT P.A., 1995. Review: Nitrogen excretion: Three end products, many physiological roles. *J. of Exp. Biol.* 198, 273-281.

YU, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 139-161.