

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**O COMPORTAMENTO RESPIRATÓRIO E A CASCATA DE O<sub>2</sub>**  
**NO CASCU DO DE RESPIRAÇÃO BIMODAL**  
*Pterygoplichthys anisitsi*  
**(TELEOSTEI, LORICARIIDAE)**

**ANDRÉ LUIS DA CRUZ**

Tese 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 Doutor em Ciências, área de Concentração em Ciências Fisiológicas.

**SÃO CARLOS – SP**  
**2007**

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

C955cr

Cruz, André Luis da.

O comportamento respiratório e a cascata de O<sub>2</sub> no cascudo de respiração bimodal *Pterygoplichthys anisitsi* (Teleostei, Loricariidae) / André Luis da Cruz. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

161 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

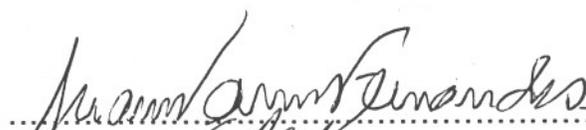
1. Fisiologia respiratória. 2. Loricariidae. 3. Peixe – respiração. 4. Superfície respiratória. 5. Hemoglobina. 6. Metabolismo. I. Título.

CDD:591.1 (20<sup>a</sup>)

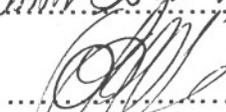
Universidade Federal de São Carlos  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de ANDRÉ LUÍS DA CRUZ

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes .....



Prof. Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez .....



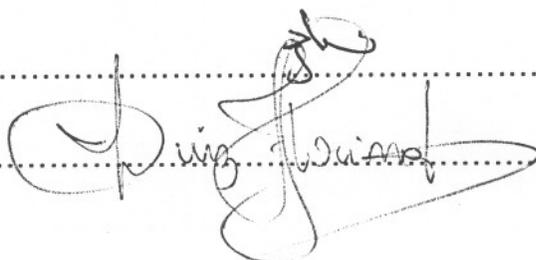
Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini .....



Prof. Dr. Augusto Shinya Abe .....



Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo .....



*“Quanto aos sentimentos: são puros todos aqueles que o senhor concentra e guarda; impuros os que agarram só um lado de seu ser e o deformam. Tudo o que pode pensar a respeito de sua infância é bom. Tudo que o torna algo mais do que foi até agora em suas melhores horas é bom. Toda intensificação é boa, quando está em todo o seu sangue, quando não é turva e ebriedade, mas alegria cujo fundo se vê. Compreende o que quero dizer? Sua dúvida pode tornar-se uma qualidade se o senhor a educar. Deve-se transformar em saber, em crítica. Cada vez que ela lhe quiser estragar uma coisa, pergunte-lhe por que aquilo é feio. Peça-lhe provas, examine-a; talvez a ache indecisa e embaraçada, talvez revoltada. Mas não ceda, exija argumentos. Ponha-se a agir assim, atenta e conseqüentemente, cada vez e dia verá em que, de destruidora, ela se tornará sua melhor colaboradora, talvez a mais sábia de quantas cooperam na construção de sua vida.”*

Rainer Maria Rilke

*“O senhor escute meu coração, pegue no meu pulso. O senhor avista meus cabelos brancos...Viver- não é?- é muito perigoso. Porque ainda não se sabe. Porque aprender-a-viver é que é o viver, mesmo. O sertão me produz, depois me engoliu, depois me cuspiu do quente da boca...O senhor creê minha narração?”*

João Guimarães Rosa

## **DEDICO**

Aos meus pais, Alcides e Maria, por tudo o que me ensinaram, até agora, e pelo amor incondicional.

Ao professor, orientador e amigo Francisco Langeani Neto, toda minha gratidão pelos seus ensinamentos, incentivo e encorajamento desde o início de minha graduação.

ORIENTADORA

---

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, pela orientação, confiança e incentivo desde o início do meu curso de doutorado;

Ao Prof. Dr. Steven F. Perry, pelo incentivo constante e ensinamentos durante meu estágio de doutorado na Universidade de Bonn, Alemanha;

Aos professores da banca examinadora, Dr. Augusto Shinya Abe, Dr. Carlos Alberto Vicentini, Dr. Gustavo Orlando Bonilla Rodriguez e Dr. Luiz Henrique Florindo, que muito contribuíram com seus comentários e sugestões.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas; em especial, Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin, tecnólogo José Roberto Sanches e laboratorista Nelson S. A. Matos (*in memoriam*), pela agradável convivência, atenção de sempre e ensinamentos constantes;

Ao Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo (UNESP, São José do Rio Preto), pelo incentivo de sempre, desde o início do meu curso de doutorado;

Aos colegas de laboratório, Eliane, Fábio, Cláudio, Jane, Kátia, Laila, Cleoni, Tiago, Fernanda, Marise, Thiago, Danilo, Daniela e Vinícius pela convivência e ensinamentos; em especial, agradeço ao Guilherme, Lenise, Ana Carolina, Cheila, Cléo, Diana e Hugo, pelo apoio fundamental e trabalho conjunto para a realização deste trabalho;

Aos professores Dr. Arno Rudi Schwantes, Dra. Maria Luiza B. Schwantes e Dr. Gilberto Moraes, pela utilização de seus laboratórios e pela participação direta neste trabalho, com seus constantes ensinamentos e incentivo; e Dra. Lícia Lundstedt e Dra. Flávia Munin pelo auxílio em laboratório;

Ao Departamento de Engenharia de Materiais pela utilização do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE); em especial, aos técnicos Marco A. Militão de L. Prieto e Maria Helena Racy pelo auxílio na utilização dos microscópios eletrônicos.

Ao Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), Campus de Jaboticabal, pela doação dos peixes para o estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos;

Aos amigos Sandro Moron e Aurélia Mazon, pela dedicada atenção de sempre e bons conselhos;

Aos primos Luiz Francisco e Carol, pela ajuda e companhia no fim do doutorado.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida e, ao Programa Brasil-Alemanha (CAPES) pelo suporte financeiro na realização do meu estágio na Universidade de Bonn.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e principalmente pessoal,

*Meus sinceros agradecimentos.*

*“E a vida?*

*E a vida o que é diga lá, meu irmão?*

*Ela é a batida de um coração?*

*Ela é uma doce ilusão?*

*Mas e a vida?*

*Ela é maravilha ou é sofrimento?*

*Ela é alegria ou lamento?*

*O que é, o que é meu irmão?*

*Há quem fale que a vida da gente*

*É um nada no mundo*

*É uma gota, é um tempo*

*Que nem dá um segundo,*

*Há quem fale que é um divino*

*Mistério profundo*

*É o sopro do Criador*

*Numa atitude repleta de amor*

*Você diz que é luta e prazer;*

*Ele diz que a vida é viver;*

*Ela diz que o melhor é morrer,*

*Pois amada não é*

*E o verbo é sofrer*

*Eu só sei que confio na moça*

*E na moça eu ponho a força da fé*

*Somos nós que fazemos a vida*

*Como der ou puder ou quiser*

*Sempre desejada*

*Por mais que esteja errada*

*Ninguém quer a morte*

*Só saúde e sorte*

*E a pergunta roda*

*E a cabeça agita*

*Fico com a pureza da resposta das crianças*

*É a vida, é bonita e é bonita.*

*Viver e não ter a vergonha de ser feliz*

*Cantar e cantar e cantar*

*A beleza de ser um eterno aprendiz*

*Eu sei que a vida devia ser bem melhor e será*

*Mas isto não impede que eu repita*

*É bonita, é bonita e é bonita...”*

Gonzaguinha

Aos amigos de sempre, Luis Inoue, Monica Costa, Cléo Leite, Keico Nonaka, Ivani Albers e Fernando D'Ávila, pelo grande companheirismo e pelas longas conversas de sempre... É a Vida, e é bonita!!!

“É o céu uma abóbada aureolada  
 Rodeada de gases venenosos  
 Radiantes planetas luminosos  
 Gravidade na cósmica camada  
 Galáxia também hidrogenada  
 Como é lindo o espaço azul-turquesa  
 E o sol fulgurante tocha acesa  
 Flamejando sem pausa e sem escala  
 Quem de nós pensaria apagá-la  
 Só o santo doutor da natureza  
 De tais obras, o homem e a mulher  
 São antigos e ricos patrimônios  
 Geram corpos em forma de hormônios  
 Criam seres sem dúvida sequer  
 O homem após esse mister  
 Perpetua a espécie com certeza  
 A mulher carinhosa e indefesa  
 Dá à luz uma vida, novo brilho  
 Nove meses no ventre aloja o filho  
 Pelo santo poder da sã natureza  
 O peixe é bastante diferente  
 Ninguém pode entender como é seu gênio  
 Reservas porções de oxigênio  
 Mutações para o meio ambiente  
 Tem mais cartilagem resistente  
 Habitando na orla ou profundidade  
 Devora outros peixes pra despesa  
 E tem época do acasalamento  
 Revestido de escamas esse elemento  
 Com a força da santa natureza  
 O poraquê ou peixe-elétrico é um tipo genuíno  
 Habitante dos rios e águas pretas  
 Com ele possui certas plaquetas  
 Que o dotam de um mecanismo fino  
 Com tal cartilagem esse ladino  
 Faz contato com muita ligeireza  
 Quem tocá-lo padece de surpresa  
 Descarga mortífera absoluta  
 Sua auto voltagem eletrocuta  
 Com os fios da santa natureza  
 Tartaruga gostosa, feia e mansa  
 Habitantes dos rios e oceanos  
 Chegar aos quatrocentos anos  
 Para ela é rotina, é confiança  
 Guarda ovos na areia e nem se cansa  
 De por ele zelar como defesa  
 Nascido os filhotes com presteza  
 Nas águas revoltas já se jogam  
 Por instinto da raça não se afogam  
 E pelo santo poder da natureza  
 O canário é pássaro cantor  
 Diferente de garça e pelicano

Papagaio, arara e tucano  
 Todos eles com majestosa cor  
 O gavião é um tipo caçador  
 E columbiforme é a bruguesa  
 O aquático flamingo é da represa  
 A águia rapace agigantada  
 Eis o mundo das aves a passarada  
 Quanto é grande, poderosa e bela a natureza...  
 O macaco faz tudo mas não fala  
 Por atraso da espécie, por fraqueza...  
 Acho também interessante  
 O réptil de aspecto esquisito  
 O pequeno tamanho do mosquito...  
 A saliva incolor do ruminante  
 A mosca nociva e indefesa  
 A cobra que ataca de surpresa  
 Aplicar veneno é seu mister  
 De uma vez mata trinta se puder  
 Mas isso é coisa da natureza  
 No nordeste há quem diga que o corão  
 Possui certos poderes encantados  
 Através de fenômenos variados  
 Prevê a mudança de estação  
 De fato no auge do verão  
 Ele entoia seu cântico de tristeza  
 De repente um milagre, uma surpresa  
 Cai a chuva benéfica e divina  
 Quem lhe diz, quem lhe mostra, quem lhe  
 ensina?  
 Só pode ser o autor da natureza  
 Quem é que não sabe que o morcego  
 Com o rato bastante se parece  
 Nas cavernas escuras sobe e desce  
 Sugar sangue dos outros é seu emprego  
 Às noites escuras tem apego  
 Asqueroso ele é tenho certeza  
 Tem na vista sintoma de fraqueza  
 Porém o seu ouvido é muito fino  
 E um sonar aparelho pequenino  
 Que lhe deu o autor da natureza...  
 A aranha pequena, tão arguta  
 De finíssimos fios faz a teia  
 Nesse mundo almoça, janta e ceia  
 É ali que passeia, vive e luta  
 Labirinto intrincado ela executa  
 Seu trabalho é bordado em qualquer mesa  
 Quem pensar destruir-lhe a fortaleza  
 Perderá de uma vez toda a esperança  
 Sua rede é autêntica segurança  
 Operária das mãos da natureza...”

Ivanildo Vilanova e Xangai

Aos modelos experimentais de nossos trabalhos, os seres vivos.

## ÍNDICE

CAPÍTULO 1.....	1
Introdução Geral	
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	5
3. Referências.....	8
CAPÍTULO 2.....	11
Comportamento Respiratório e Respostas Ventilatórias do Cascudo <i>Pterygoplichthys anisitsi</i> (Teleostei, Loricariidae) Submetido às Condições de Normóxia e Hipóxia	
1. Introdução.....	12
2. Materiais e Métodos.....	13
3. Resultados.....	18
4. Discussão.....	28
5. Referências.....	35
CAPÍTULO 3.....	41
Adaptação Morfofuncional do Estômago do Cascudo <i>Pterygoplichthys anisitsi</i> (Teleostei, Loricariidae) para a Respiração Aérea	
1. Introdução.....	42
2. Materiais e Métodos.....	43
3. Resultados.....	48
4. Discussão.....	65
5. Referências.....	70
CAPÍTULO 4.....	75
Fracionamento da Superfície Respiratória das Brânquias e do Estômago do Cascudo <i>Pterygoplichthys anisitsi</i> (Teleostei, Loricariidae)	
1. Introdução.....	76
2. Materiais e Métodos.....	77
3. Resultados.....	84

4. Discussão.....	92
5. Referências.....	95
 CAPÍTULO 5.....	 99
Caracterização Estrutural e Funcional das Hemoglobinas do Cascudo de Respiração Bimodal <i>Pterygoplichthys anisitsi</i> (Teleostei, Loricariidae) Submetido à Hipóxia Gradual e à Exposição Aérea	
1. Introdução.....	100
2. Materiais e Métodos.....	102
3. Resultados.....	107
4. Discussão.....	112
5. Referências.....	120
 CAPÍTULO 6.....	 125
Respostas Hematológicas e Metabólicas do Cascudo <i>Pterygoplichthys anisitsi</i> (Teleostei, Loricariidae) Submetido à Hipóxia Aguda e à Exposição Aérea	
1. Introdução.....	126
2. Materiais e Métodos.....	127
3. Resultados.....	131
4. Discussão.....	141
5. Referências.....	151
 CAPÍTULO 7.....	 156
Conclusões	
1. Conclusões específicas.....	156
2. Conclusões gerais.....	158

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

**Figura 1:** Espécime de *Pterygoplichthys anisitsi* (37 cm).....4

**Figura 2:** Esquema dos objetivos do estudo, considerando comportamento respiratório e a cascata de O<sub>2</sub>, desde o transporte de oxigênio a partir da água/ar até a utilização pelos tecidos em *P. anisitsi*. O transporte segue as seguintes etapas: ventilação, difusão de oxigênio pelas superfícies respiratórias do água/ar (brânquias/estômago) para o sangue, circulação (ligação Hb-O<sub>2</sub>) e difusão do oxigênio para os tecidos (metabolismo glicídico). Do lado direito do diagrama estão indicados os objetivos específicos dessas etapas consideradas para o estudo.....7

### Capítulo 2

**Figura 1.** Esquema do sistema de respirometria de fluxo constante utilizado para determinação dos parâmetros respiratórios em *Pterygoplichthys anisitsi*. **a.** respirômetro; **b, c.** catéteres de polietileno para a tomada da água que entra (PinO<sub>2</sub>) e que sai (PoutO<sub>2</sub>) do respirômetro, respectivamente; **d, e.** catéteres provenientes do opérculo (PeO<sub>2</sub>) e boca (PiO<sub>2</sub>), respectivamente; **f.** transdutor de pressão GOULD P23 XL; **g.** eletrodo de referência; **h.** torneira de três vias; **i, j.** analisadores de oxigênio FAC-204A; **k.** amplificador de pressão Narco Bio-Systems P-1000B; **P.** registrador de quatro canais Narco Bio-Systems; **m.** frasco de ajuste de fluxo; **n.** bomba para circulação da água; **o.** recipiente para circulação de água; **p.** controlador de temperatura FAC-207.....16

**Figura 2 a:** Registros respiratórios obtidos em hipóxia gradual durante experimento de respirometria sem acesso ao ar atmosférico no espécime “1”. O registro de cada tensão de oxigênio (mmHg) mostrado é de 10 segundos.....25

**Figura 2 b:** Registros respiratórios obtidos em hipóxia gradual durante experimento de respirometria sem acesso ao ar atmosférico no espécime “2”. O registro de cada tensão de oxigênio (mmHg) mostrado é de 10 segundos.....26

**Figura 2 c:** Registros respiratórios obtidos em hipóxia gradual durante experimento de respirometria sem acesso ao ar atmosférico no espécime “3”. O registro de cada tensão de oxigênio (mmHg) mostrado é de 10 segundos.....27

### Capítulo 3

**Figura 1:** **(a)** Seção histológica (3 µm) do estômago de *P. anisitsi* sobre o qual foi colocado um sistema-teste de pontos para estimativa da densidade de volume dos principais tecidos **(b)** Seção histológica (3 µm) do estômago de *P. anisitsi* sobre o qual foi colocado um sistema-teste de arcos ciclóides e pontos para estimativa da densidade de superfície e a superfície total do epitélio respiratório. Coloração: Azul de Toluidina/Fucsina. Escala: 10 µm.....47

**Figura 2.** (a) Vista ventral de *P. anisitsi*, o estômago é localizado no interior da cavidade celomática, mostrando parede translúcida e vascularizado. Escala: 1 cm (b) Vista ventral do estômago de *P. anisitsi*, após ser retirado do interior da cavidade celomática, mostrando a porção final do esôfago e a inicial do intestino. Escala: 0,5 cm (c) Vista da face interna do estômago de *P. anisitsi* observado sob estereoscópio. (d) Seção histológica (3 µm) do estômago mostrando as quatro camadas: (1) serosa com epitélio pavimentoso simples, (2) muscular lisa não organizada no interior de distintas camadas, (3) submucosa de tecido conjuntivo frouxo e (4) mucosa formada por epitélio pavimentoso simples e lâmina própria. Coloração: Azul de Toluidina. Escala: 10 µm.....49

**Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura de regiões do estômago de *P. anisitsi*. A baixa magnificação, as regiões cárdica (a), fúndica (c) e pilórica (e). Em alta magnificação da camada mucosa do epitélio, as regiões cárdica (b), fúndica (d) e pilórica (f). Notar a superfície celular com microvilos curtos em (b) e (f), e uma superfície lisa em (d). As setas indicam as aberturas das glândulas gástricas.....51

**Figura 4.** (a) Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando núcleo de uma célula epitelial do estômago localizado entre capilares vizinhos (N), eritrócito (E) no interior de um capilar, núcleo da célula endotelial (Ne) e nas proximidades fibras colágenas (Co). Escala: 5µm. (b) fotomicrografia mostrando o núcleo de uma célula epitelial da mucosa estomacal (seta). Capilar sangüíneo (\*) e eritrócito (E). Escala: 5µm.....52

**Figura 5.** (a) Fotomicrografia eletrônica de transmissão da região apical de uma célula epitelial. São evidenciadas mitocôndrias (M), cisternas de Golgi dilatadas (C) e complexo de Golgi (G), e corpos lamelares (L). (b) fotomicrografia mostrando corpos lamelares em diferentes estágios de maturação situados em uma célula epitelial (setas). Eritrócito (E). Escala: 0,5 µm.....53

**Figura 6.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando junções intercelulares de células epiteliais. Zônula de oclusão (o), zônula de adesão (a), desmossomo (d) e interdigitações (i). Núcleo da célula epitelial (N) e eritrócito (E). Escala: 0,5 µm.....54

**Figura 7.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão da barreira ar-sangue do estômago de *L. anisitsi* composta pela célula epitelial (C), membrana basal (asterisco) e membrana endotelial (seta) exibindo adesão celular por desmossomos entre células vizinhas. Eritrócito (E). Escala: 0,5 µm.....56

**Figura 8.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma glândula gástrica (Gg) exibindo em seu interior grande quantidade de corpos lamelares (seta). Os tecidos das proximidades das glândulas são ricos em fibras colágenas (Co). Escala: 5 µm.....57

**Figura 9.** Porcentagem dos volumes dos constituintes da mucosa do estômago de *P. anisitsi*.....62

## Capítulo 4

**Figura 1.** Diagrama do esquema de amostragem do seccionamento das brânquias. (A) Brânquias mostrando os pontos de seção dos 4 arcos branquiais sequencialmente numerados para obter 3 amostras de cada arco. (B) Esquema dos 4 quatro blocos de metacrilato mostrando as porções branquiais embebidas aleatoriamente e a orientação sequencial de cada porção branquial sobre o eixo vertical de 0-180°C para obter amostragem combinada para determinar o volume de referência pelo princípio de Cavalieri e a superfície respiratória pelo método de seção vertical. A rotação sequencial foi feita adicionando-se 15°C a cada porção branquial do ponto inicial. As medidas de comprimento dos tecidos branquiais (L1, L2, L3) dentro dos blocos para determinar o comprimento total ( $L_T$  = comprimento dos 4 blocos). (C) Visão superior detalhada de um bloco de metacrilato indicando a rotação sequencial das três porções branquiais aleatórias sobre o eixo vertical. (D) Visão lateral de um bloco de metacrilato embebido com três porções aleatórias de arcos branquiais. Linhas tracejadas indicam a distância (d) entre as seções no eixo vertical (VA, seta). (E) Vista frontal de um bloco de metacrilato mostrando as porções de brânquias embebidas aleatoriamente e uma seção. O plano horizontal (HP) é o plano do papel.....80

**Figura 2:** Sistema arcos ciclóides e pontos utilizados para a determinação do volume de referência, superfície respiratória e densidade de volume ( $V_v$ ) das brânquias. Coloração: Azul de Toluidina/Fucsina. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .....83

**Figura 3. (a)** Vista geral de um corte de brânquias de *Pterygoplichthys anisitsi* mostrando filamentos e lamelas secundárias (L). Escala: 2 mm (b) Parte de filamentos branquiais; a seta vermelha indica uma extensão da cartilagem de sustentação; a seta preta evidencia uma lamela secundária. Coloração: Azul de Toluidina. Escala: 5  $\mu\text{m}$ .....85

## Capítulo 5

**Figura 1.** Representação esquemática dos padrões eletroforéticos das hemoglobinas de *Pterygoplichthys anisitsi*, normóxia (N), hipóxia (HX), ar 24 horas (AR), comparativamente a humana (H). A linha tracejada corresponde ao ponto de aplicação das amostras.....108

**Figura 2.** Comportamento funcional da afinidade da afinidade por oxigênio ( $P_{50}$ ) e cooperatividade (n) em relação ao pH dos hemolisados *stripped* e em sangue total de *P. anisitsi* em condições de normóxia, hipóxia e exposição ao ar por 24 horas.....111

## Capítulo 6

**Figura 1.** Parâmetros hematológicos de *P. anisitsi*, (a) hematócrito, (b) concentração de hemoglobina, (c) número de eritrócitos e (d) pH, ao longo dos 4 períodos de hipóxia e após 24h de exposição aérea. Média  $\pm$  Desvio Padrão.....133

**Figura 2.** Índices hematimétricos de *P. anisitsi*, **(a)** concentração de hemoglobina corpuscular média, **(b)** volume corpuscular médio e **(c)** hemoglobina corpuscular média, ao longo dos 4 períodos de hipóxia e após 24h de exposição aérea. Média ± Desvio Padrão.....134

**Figura 3.** Concentrações de glicogênio de *P. anisitsi* no **(a)** fígado e no **(b)** músculo branco, ao longo dos 4 períodos de hipóxia e após 24h de exposição aérea. Média ± Desvio padrão.....137

**Figura 4.** Concentrações de glicose de *P. anisitsi* no **(a)** fígado, **(b)** músculo branco e **(c)** plasma, ao longo dos 4 períodos de hipóxia e após 24h de exposição aérea. Média ± Desvio Padrão.....138

**Figura 5.** Concentrações de lactato de *P. anisitsi* no **(a)** fígado, **(b)** músculo branco e **(c)** plasma, ao longo dos 4 períodos de hipóxia e após 24h de exposição aérea. Média ± Desvio Padrão.....139

**Figura 6.** Concentrações de piruvato de *P. anisitsi* no **(a)** fígado, **(b)** músculo branco e **(c)** plasma, ao longo dos 4 períodos de hipóxia e após 24h de exposição aérea. Média ± Desvio Padrão.....140

**Figura 7a.** Diferenças nas concentrações dos intermediários metabólicos nos tecidos analisados ao longo das 4h de hipóxia.....148

**Figura 7b.** Diferenças nas concentrações dos intermediários metabólicos nos tecidos analisados após 24h de exposição aérea.....150

## Capítulo 7

**Figura 1.** Esquema das conclusões do estudo proposto em condição de hipóxia no meio aquático considerando o comportamento respiratório e a cascata de O<sub>2</sub>, desde o transporte de oxigênio a partir da água/ar até a utilização pelos tecidos em *P. anisitsi*.....159

**Figura 2:** Esquema das conclusões do estudo proposto em condição de exposição aérea considerando o comportamento respiratório e a cascata de O<sub>2</sub>, desde o transporte de oxigênio a partir do ar até a utilização pelos tecidos em *P. anisitsi*.....161

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

**Tabela 1.** Frequência dos comportamentos de respiração aérea exibidos por *Pterygoplichthys anisitsi* em condição de normóxia durante dois períodos. F1: registro entre 11-12:30 h; F2: registro entre 12:30-14 h; F3: registro entre 18-19:30 h; F4: registro entre 19:30-21 h); NRA: sem episódios de respiração aérea; S: episódios de respiração aérea contínuos e sincrônicos. Os números correspondem aos minutos dos registros em que ocorreram episódios de respiração aérea.....20

**Tabela 2.** Frequência dos episódios de respiração aérea de *Pterygoplichthys anisitsi* em função das reduções gradual e aguda das tensões de oxigênio. Os experimentos de 1 a 6, indicados entre parênteses, foram conduzidos em tríades de espécimes (E1,E2,E3 e E8,E9,E10) e duplas (E4 e E5, E6 e E7, E11 e E12, E13 e E14). NRA: sem episódios de respiração aérea. O espécime 13, na tensão de 70 mmHg, foi à superfície para engolfamento de ar uma única vez.....21

**Tabela 3.** Valores medianos (n= 6) da taxa metabólica ( $VO_2$ ) e dos parâmetros ventilatórios branquiais ( $V_G$ ,  $V_T$ ,  $EO_2$  e  $f_R$ ) em função das reduções nas tensões de oxigênio da água inspirada ( $PiO_2$ ) de *P. anisitsi* em hipóxia gradual sem acesso ao ar atmosférico. Entre parênteses estão os valores mínimo e máximo dos parâmetros analisados.....24

### Capítulo 3

**Tabela 1.** Volume de ar ( $V_{ar, estôm.}$ ), volume de tecido ( $V_{tec., estôm.}$ ), volume total do estômago ( $V_{tot., estôm.}$ ) e relação volume total do estômago/ massa corpórea ( $V_{tot., estôm.}/M_C$ ) do estômago de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.....60

**Tabela 2.** Volumes fracionais ( $V_V$ ) dos principais componentes do estômago de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.....61

**Tabela 3.** Superfície do estômago ( $S_E$ ) e porcentagem da área de superfície que é respiratória ( $\%S_{R E}$ ) do estômago de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.....63

**Tabela 4.** Espessura da barreira de difusão ar-sangue [ $(\tau_{arith})$  média aritmética,  $(\tau_h)$  média harmônica], (ADF) fator anatômico de difusão (=  $S_{AR}/\tau_h$ ) e capacidade morfométrica de difusão para oxigênio ( $D_{O_2}$ ) do estômago de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.....64

### Capítulo 4

**Tabela 1.** Volume das lamelas ( $V_L$ ) e dos filamentos ( $V_F$ ) e, densidade de volume das lamelas( $V_{V L}$ ) e filamentos ( $V_{V F}$ ) das brânquias de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.....87

**Tabela 2.** Tabela 2. Superfície branquial (S), relação superfície/massa corpórea (S/M<sub>C</sub>), razão superfície-volume (S<sub>V</sub>), porcentagem da área de superfície que é respiratória (%S<sub>R<sub>B</sub></sub>) das lamelas e filamentos de *P. anisitsi*. Média ± Erro Padrão da Média.....88

**Tabela 3.** Volume total do estômago (V<sub>T<sub>E</sub></sub>), volume total das brânquias (V<sub>T<sub>B</sub></sub>), relação volume do estômago/massa corpórea (V<sub>T<sub>E</sub></sub>/M<sub>C</sub>) e relação volume das brânquias/massa corpórea (V<sub>T<sub>B</sub></sub>/M<sub>C</sub>) de *P. anisitsi*. Média ± Erro Padrão da Média.....90

**Tabela 4.** Superfície (S), relação superfície/massa corpórea (S/M<sub>C</sub>), relação superfície/volume (S<sub>V</sub>) da mucosa estomacal e das lamelas branquiais de *P. anisitsi*. Média ± Erro Padrão da Média.....91

## Capítulo 5

**Tabela 1.** Valores de efeito Bohr ( $\phi$ ), log de P<sub>50</sub>, P<sub>50</sub> e cooperatividade (n) para diferentes condições da Hb stripped e sangue não fracionado de *Pterygoplichthys anisitsi*.....110

## Capítulo 6

**Tabela 1.** Concentrações dos intermediários metabólicos e relação lactato:piruvato ao longo das 4h de hipóxia de *P. anisitsi*. Média ± Desvio padrão.....136

## RESUMO

A condição de pouca disponibilidade de oxigênio, conhecida como hipóxia, pode afetar ambientes aquáticos. Suas causas podem ser naturais ou, mais comumente, devido à ação antropogênica. Entre os peixes, o grupo Siluriformes (bagres e cascudos) possui espécies tolerantes à hipóxia, sendo consideradas bons modelos experimentais para estudos com hipóxia. Este estudo utilizou o cascudo de respiração aérea acessória *Pterygoplichthys anisitsi*, com o objetivo de analisar sua fisiologia respiratória, em respiração aquática e em respiração aérea, sob condições experimentais de hipóxia e de exposição aérea para interrelacionar seu comportamento respiratório e os eventos da cascata de O<sub>2</sub> (ventilatórios, morfofuncionais, hemoglobínicos e metabólicos). A partir dos experimentos realizados com esses aspectos, em condição de hipóxia, foi concluído que a superfície respiratória das brânquias é maior que a superfície respiratória estomacal, o que indica dependência da respiração aquática e, o órgão de respiração aérea serve como um reservatório de ar e pode auxiliar na tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio na água. Como verificado, o comportamento de respiração aérea é contínuo, em intervalos não regulares, mas não-obrigatório e, mesmo em normóxia, sua maior frequência ocorre no período noturno e de modo sincrônico, possivelmente, um comportamento antipredatório. Já na exposição à hipóxia, sem acesso ao ar atmosférico, a partir da diminuição da taxa metabólica e extração de O<sub>2</sub>, o estômago suporta o comportamento oxi-conformista caracterizado por apnéia com a redução gradual da tensão de oxigênio. Aliado ao fato do estômago ser fonte de estocagem de ar, a respiração aérea ser contínua mas não-obrigatória e o comportamento, em hipóxia sem acesso ao ar atmosférico, ser oxi-conformista caracterizado por apnéia, também a presença de uma componente hemoglobínica catódica, com alta afinidade ao oxigênio e não afetada por diminuição de pH, e a verificação de uma maior afinidade hemoglobina-oxigênio em hipóxia constituem ajustes auxiliares e necessários frente à condição de hipóxia. Conjuntamente, a esses ajustes, a tolerância à hipóxia também é suportada pelos parâmetros hematológicos, por meio da hemoconcentração que contribui para maior capacidade de carreamento de oxigênio para uma demanda aumentada e, da mesma forma, a afinidade hemoglobina-oxigênio é maior. Ainda, com a diminuição da taxa metabólica e extração de O<sub>2</sub>, há ativação do metabolismo anaeróbico com o processo de fermentação láctica para tentar manter o fornecimento energético. Diferentemente da condição de hipóxia, as brânquias, aparentemente, não são funcionais na exposição aérea, pois não há fluxo de água que passa entre seus filamentos e, dessa forma, a superfície respiratória a ser considerada é unicamente a do estômago. Quando exposto ao ar são verificados períodos de comportamento de “inspiração” e “expiração” intermitentes pela boca, de forma a suprir o estômago com ar. Na condição de exposição ao ar, a afinidade hemoglobina-oxigênio é similar àquela da condição de normóxia e, da mesma forma, não há alteração nos parâmetros hematológicos, o que evidencia a funcionalidade da superfície respiratória estomacal e, também, há a manutenção do metabolismo aeróbio. Embora não ocorram alterações nesses parâmetros e a espécie mostre capacidade de obter O<sub>2</sub> atmosférico, a exposição aérea é uma condição estressante, verificado pela redução de glicose hepática e muscular e, aumento da glicose plasmática, e assim parece ser utilizada pela espécie em situações emergenciais.

## ABSTRACT

The condition of poor oxygen, called hypoxia, can affect aquatic environments. Their cause can be natural or, more frequently, a consequence of anthropogenic action. Among fish, the Siluriformes group (catfishes and armoured catfishes) contains hypoxic-tolerant species, being considered interesting experimental models. This study utilized the air-breathing armoured catfish *Pterygoplichthys anisitsi*, with the objective to analyze its respiratory physiology, at aquatic and air respiration, submitted to experimental conditions of hypoxia and air exposure to compare its respiratory behaviour and oxygen transport cascade steps (ventilatory, morphofunctional, haemoglobin and metabolic aspects). From all these experiments it can be concluded that gills respiratory surface is much more developed than stomach's surface, which indicates dependency on aquatic respiration. Furthermore, the air-breathing organ serves as an air reservoir that can assure the tolerance to reduced oxygen availability in the water. It was verified that the air-breathing behaviour is continuous, in non regular periods, but not obligatory and, even in normoxia, its more frequently occurs at night and in synchronic episodes, probably consisting in an antipredatory behaviour. In exposure to hypoxia and without access to atmospheric air, the reduction in metabolic rate and O<sub>2</sub> extraction, the stomach supports the oxy-conformist behaviour that is characterized by apnoea with the gradual reduction of oxygen tension. The association among a stomach air reservoir, the continuous, but non-obligatory air breathing, an oxy-conformist behaviour characterized by apnoea, the presence of an haemoglobin cathodic component, and a higher haemoglobin-oxygen affinity in hypoxia perform necessary adjustments to hypoxia conditions. Moreover, the haematological parameters increase hypoxia tolerance, since hemoconcentration contribute to the enhanced capacity of O<sub>2</sub> transportation in response to the increased demand and, therefore, result in a higher haemoglobin-oxygen affinity. With the decrease of metabolic rate and O<sub>2</sub> extraction, there is the activation of anaerobic metabolism by fermentative process to maintain the energetic supply. Differently from hypoxia condition, the gills do not seem to be functional during air exposure, given that it was not observed a water flow through branchial filaments and, thus the stomach surface can be considered the respiratory organ in this condition. When exposed to air, periods of intermittent "inspiration" and "expiration" behaviour through the mouth are verified in order to supply air to the stomach. Additionally, haemoglobin-oxygen affinity is similar to that observed in normoxia and, in the same way, there is not alteration on haematological parameters. These observations indicate the functionality of stomach as a respiratory surface and the maintenance of aerobic metabolism. However, air exposure is a stressful condition, as it can be proved by the reduction of hepatic and muscular glucose and, the increase of plasma glucose, and may, as a consequence, be utilized by species only in emergence situations.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO GERAL

#### 1. Introdução

Na fisiologia animal, a compreensão das funções de órgãos e sistemas dos animais e seus ajustes frente às alterações internas e externas são, sem dúvida, sustentados pelo uso de uma abordagem comparativa que permite uma melhor compreensão de como cada animal ou grupos de animais enfrentam as limitações impostas pelo ambiente garantindo a manutenção da vida. Os animais não poderiam existir independentemente do ambiente, ao utilizar seus recursos devem ser também capazes de enfrentar as adversidades que o mesmo pode apresentar, como insuficiência ou ausência de oxigênio (hipóxia ou anóxia), de água, de alimento e variação de temperatura (Dejours, 1981; Schmidt-Nielsen, 1996).

Nos ambientes aquáticos, o oxigênio proveniente da atmosfera ou do fitoplâncton é dissolvido na água e, via respiração, supre as necessidades metabólicas dos animais, que vivem nesse ambiente, seja na coluna d'água ou no substrato. Uma vez dissolvido nas superfícies aquáticas, a condição normal é que ocorra a difusão do oxigênio para as águas mais profundas. Quando o suprimento de oxigênio é interrompido, ou a taxa de consumo dos animais e das plantas aquáticas excede o difundido, a concentração de oxigênio declina além da concentração mínima necessária para a vida da maioria dos animais. A condição de baixa concentração de oxigênio dissolvido é conhecida como hipóxia ambiental (Diaz, 2001; Karim *et al.*, 2003). A concentração de oxigênio em que os peixes e outros organismos aquáticos começam a apresentar sinais de falta de oxigênio é variável, mas em geral, isso ocorre quando a concentração de oxigênio está abaixo de  $2 \text{ mgO}_2 \cdot \text{L}^{-1}$  (Diaz, 2001).

A hipóxia ambiental pode ser um fenômeno natural causado pela estratificação vertical da coluna d'água. Porém, frequentemente, a hipóxia é provocada pela ação

antropogênica por meio do excessivo despejo de nutrientes e matéria orgânica dentro de corpos d'água. Atualmente, hipóxia ou anóxia afetam águas continentais e grandes extensões costeiras marinhas em todos os continentes do mundo (Soares *et al.*, 2006; Camargo e Alonso, 2006). Nas últimas décadas, aumento nos níveis de nutrientes tem sido evidente, o que é atribuído à excessiva utilização de fertilizantes, desflorestamento, descarga de esgotos domésticos e a atividade de pisciculturas. Em consequência, pode ocorrer mortalidade em massa de peixes e mamíferos, diminuição das populações bentônicas e diminuição na produção pesqueira (Wu, 2002; Camargo e Alonso, 2006).

Em águas doces tropicais, que são caracterizadas por uma combinação de altas temperaturas e baixa concentração de oxigênio na água, a situação torna-se drástica. Frequentemente, os peixes confrontam suas necessidades de oxigênio para satisfazer seus requerimentos metabólicos com condições de reduzida disponibilidade de oxigênio na água (Val, 1996; Hochachka e Somero, 2002). As águas doces subtropicais, entretanto, exibem mudanças cíclicas na temperatura e, embora frequentemente oxigenadas, durante a estação chuvosa os peixes podem ser expostos a períodos de altas temperaturas e hipóxia devido à alta entrada de materiais orgânicos ou florações de microrganismos. Em tais ambientes instáveis, tanto os peixes de respiração exclusivamente aquática quanto os peixes de respiração aérea acessória mostram respostas que integram os níveis de organização biológica para sobreviverem (Kalinin *et al.*, 1996; Fernandes *et al.*, 1999).

Os peixes com respiração aérea obtêm oxigênio do ar atmosférico a partir da utilização de superfícies respiratórias localizadas na região da cabeça, como as superfícies bucais, faringeanas, branquiais e câmara opercular, ou em órgãos ao longo do tubo digestório ou a ele associados, como esôfago, estômago e intestino e, o ducto pneumático e a bexiga natatória (Graham, 1997; Satora, 1998; Satora e Winnicki, 2000; Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2002; Moron *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2005). Como nos peixes com respiração exclusivamente aquática, os peixes com respiração aérea também ajustam as atividades ventilatórias e cardíacas (Graham, 1997; Takasusuki *et al.*, 1998; Mattias *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2004; Jucá-Chagas, 2004; Affonso e Rantin, 2005) e mostram alterações bioquímicas (Graham, 1997; Weber *et al.*, 2000; Nelson, 2002; Moraes *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2004; Peres *et al.*, 2004) dependendo do nível hipóxico.

A obtenção de oxigênio do ambiente e seu transporte para o tecido metabolizante estão na dependência de processos convectivos e difusivos. Esse transporte é conhecido como “cascata de O<sub>2</sub>”, e resulta da interação de quatro eventos na transferência do O<sub>2</sub>, os quais funcionam em série: ventilação, difusão de O<sub>2</sub> do ar para o sangue, circulação e difusão de O<sub>2</sub> para o interior das células (Wang e Hicks, 2002).

Na maioria dos estudos de respiração em peixes são considerados aspectos particulares, ou seja, as respostas ventilatórias e cardíacas, ou a morfologia dos órgãos respiratórios, ou as alterações bioquímicas, como nas referências citadas acima. Neste estudo, foram analisados conjuntamente o comportamento respiratório e aspectos da cascata de O<sub>2</sub> (ventilatórios, morfofuncionais, hemoglobínicos e metabólicos) em diferentes condições experimentais para uma melhor compreensão da respiração do cascudo *Pterygoplichthys anisitsi*.

O cascudo, *P. anisitsi*, utiliza o estômago como órgão de respiração aérea. No rio Preto (Mirassolândia-SP), ele é encontrado tanto em locais bem oxigenados quanto em regiões poluídas, caracterizadas principalmente por baixas concentrações de oxigênio (CETESB, 2002, 2004). Essa espécie é pertencente aos Siluriformes, grupo esse apontado em revisão efetuada por Hochachka e Lutz (2001), como contendo peixes altamente tolerantes à hipóxia. Assim, tais características tornam a espécie em questão um modelo experimental adequado para o estudo aqui proposto.

### ***Considerações Sobre a Espécie***

#### *Aspectos morfológicos*

*Pterygoplichthys anisitsi* é um loricariídeo de porte grande, com comprimento total e massa corpórea alcançando, aproximadamente, 50 cm e 900 g, respectivamente. A espécie apresenta o corpo achatado coberto por placas dérmicas, pedúnculo caudal longo, nadadeiras peitorais grandes, olhos dorsais e boca na posição ventral com lábios relativamente desenvolvidos, que funcionam como ventosas (Figura 1) (Weber, 1992).



**Figura 1:** Espécime de *Pterygoplichthys anisitsi* (37 cm).

#### *Posição taxonômica*

Durante muito tempo todas as espécies de Loricariidae com nadadeira dorsal de base longa (10 ou mais raios ramificados) eram pertencentes ao gênero *Pterygoplichthys* Gill, 1858. Em 1980, Isbrucker descreveu *Megalancistrus* e agrupou nesse novo gênero as espécies que possuíam odontodes pré-operculares muito desenvolvidos. Finalmente, Weber (1992) dividiu as espécies remanescentes de *Pterygoplichthys sensu latu* em três gêneros: *Pterygoplichthys* Gill, 1858; *Liposarcus* Gunther, 1864 (revalidado) e *Gliptoperichthys* gen. n. Weber, 1991.

Mais recentemente, Armbruster (2004) realizou a análise filogenética da família Loricariidae considerando sua osteologia, anatomia externa e anatomia do trato digestório, e verificou que as espécies de *Pterygoplichthys*, *Gliptoperichthys* e *Liposarcus* formam um clado bem diagnosticado, e o fato que estes são prontamente identificáveis da maioria das outras espécies de Loricariidae por seu alto número de raios da nadadeira dorsal, considerou que essas espécies pertencem a um único gênero, *Pterygoplichthys*.

Dentro da organização sistemática animal, *Pterygoplichthys anisitsi* ocupa a seguinte posição:

Classe: Osteichthyes

Ordem: Siluriformes

Família: Loricariidae

Tribo: Pterygoplichthini

Gênero: *Pterygoplichthys*

Espécie: *P. anisitsi*

### *Distribuição geográfica, habitats e procedência*

*Pterygoplichthys anisitsi* é uma espécie com ocorrência na América do Sul nas bacias do médio e alto Paraná, do Paraguai e do Uruguai (Weber, 1992; Langeani e Araújo, 1993). A espécie explora três microambientes ao longo do ano e do desenvolvimento ontogenético. Um deles, o leito do rio, no qual cresce, prepara-se para a desova, constrói a loca e desova (onde passa a maior parte do tempo); outro, as lagoas marginais perenes, nas quais permanece de 2 a 3 meses após o período reprodutivo; finalmente, o terceiro, as lagoas temporárias, que é aquele explorado pelas larvas e jovens. Nelas permanecem também de 2 a 3 meses, é a larvicultura. Assim, durante seu ciclo de vida, esse cascudo utiliza mais de um microambiente, em que a ocupação é sazonal e fisiológica (Garutti e Figueiredo-Garutti, 1993).

Os espécimes adultos de cascudo, *P. anisitsi*, foram obtidos no Centro de Aqüicultura da UNESP (CAUNESP), *Campus* de Jaboticabal, SP, Brasil. A procedência desses cascudos é do rio Preto (20°32'S-49°29'W), cuja bacia hidrográfica situa-se na região Noroeste do Estado de São Paulo, a 430 e 600 m de altitude. O rio Preto é afluente da margem esquerda do rio Turvo, que deságua na margem esquerda do rio Grande, integrante da bacia do alto Paraná. O rio Preto em seu trajeto no sentido SE-NO apresenta várzeas largas em alguns trechos e muitas lagoas marginais temporárias e perenes (Garutti, 1993).

## **2. Objetivos**

### *Objetivo geral*

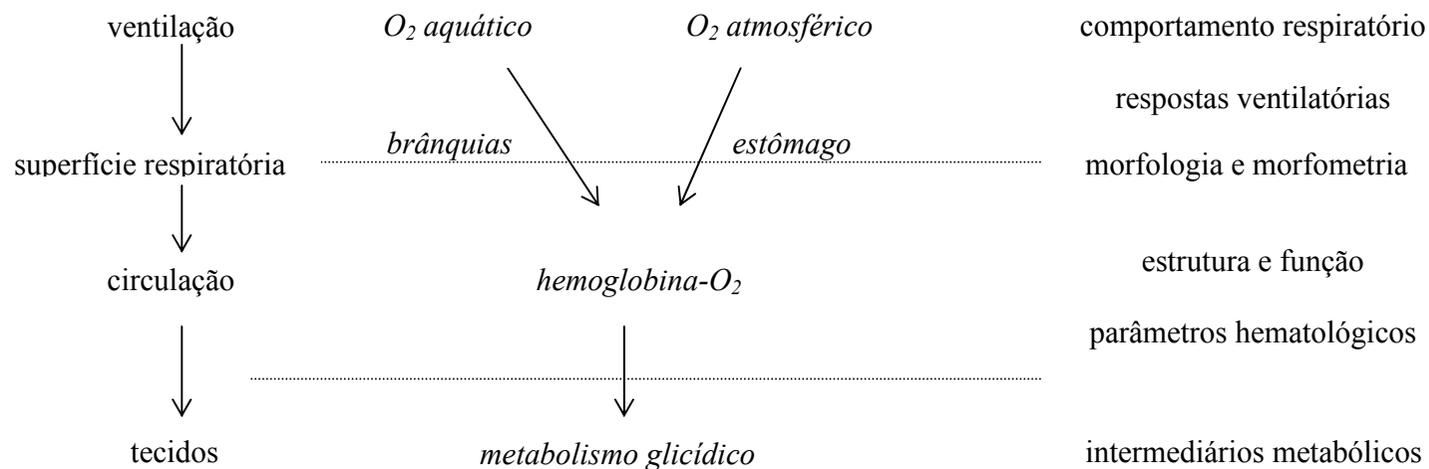
Analisar conjuntamente o comportamento respiratório e aspectos da cascata de O<sub>2</sub> (ventilatórios, morfofuncionais, hemoglobínicos e metabólicos) da respiração bimodal do cascudo *Pterygoplichthys anisitsi*, durante a respiração aquática em condições de normóxia e hipóxia ambiental e, durante a exposição aérea para avaliar a capacidade de adaptação desta espécie a essas condições ambientais.

### *Objetivos específicos*

- (a) determinar se *P. anisitsi* é uma espécie que apresenta respiração aérea facultativa ou respiração contínua não-obrigatória, segundo definição de Graham (1997);

- (b) determinar as respostas ventilatórias de *P. anisitsi* frente à hipóxia gradual sem acesso a superfície aquática, e à hipóxia gradual e aguda com acesso a superfície aquática;
- (c) descrever a morfologia do estômago de *P. anisitsi* quanto à organização estrutural e adaptação como órgão para a respiração aérea;
- (d) descrever a morfologia branquial de *P. anisitsi* e estimar a superfície potencialmente respiratória;
- (e) caracterizar estrutural e funcionalmente as hemoglobinas de *P. anisitsi* em condições de normóxia, submetidos à hipóxia gradual e expostos ao ar atmosférico;
- (f) determinar os parâmetros hematológicos e os intermediários metabólicos no plasma, fígado e músculo branco em *P. anisitsi* expostos a hipóxia aguda no ambiente aquático e ao ar atmosférico.

Na figura 2, os objetivos estão apresentados esquematicamente.



**Figura 2:** Esquema dos objetivos do estudo proposto considerando o comportamento respiratório e a cascata de  $O_2$ , desde o transporte de oxigênio a partir da água/ar até a utilização pelos tecidos em *P. anisitsi*. O transporte de oxigênio segue os seguintes eventos: ventilação das superfícies respiratórias, difusão de oxigênio através das superfícies respiratórias para absorção em água/ar (brânquias/estômago) para o sangue, circulação (ligação Hb- $O_2$ ) e difusão do oxigênio para os tecidos (metabolismo glicídico). Do lado direito do diagrama estão indicados os objetivos específicos do estudo.

### 3. Referências

- Affonso EG, Rantin FT (2005) Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141: 275-280
- Armbruster JW (2004) Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zool. J. Linn. Society* 141: 1-80
- Camargo JA, Alonso A (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assesment. *Environ. International* 32: 831-849
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) (2002). Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo, São Paulo
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) (2004). Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo, São Paulo
- Dejours P (1981) Principles of comparative respiratory physiology. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam New York Oxford
- Diaz RJ (2001) Overview of hypoxia around the world. *J. Environ. Quality* 30: 275-281
- Fernandes MN, Sanches JR, Matsuzaki M, Panepucci L, Rantin FT (1999) Aquatic respiration in facultative air-breathing fish: effects of temperature and hypoxia. *In: Biology of Tropical Fishes*, INPA, Manaus
- Garutti V (1993) Estudos biológicos do cascudo cinza *Liposarcus* (Piscae, Loricariidae) do rio Preto, bacia do rio Paraná. *In: Projeto Cascudo*, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto
- Garutti V, Figueiredo-Garutti ML (1993) Migração transversal e observações reprodutivas do cascudo cinza, *Liposarcus* sp (Loricariidae, Siluriformes) no rio Preto, bacia do rio Paraná. *In: Projeto Cascudo*, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto
- Graham JB (1997) Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation. Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto
- Hochachka PW, Lutz PL (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 130: 435-459

- Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford, New York
- Isbrucker IJH (1980) Classification and catalogue of the mailed Loricariidae (Pisces, Siluriformes). Versl. Techn. Geg., Inst. Taxon. Zool. (Zool. Mus.), Univ. Amsterdam 22: 1-181
- Jucá-Chagas R (2004) Air breathing of the neotropical fishes *Lepidosiren paradoxa*, *Hoplerythrinus initaeniatus* and *Hoplosternum littorale* during aquatic hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. A 139: 49-53
- Kalinin AL, Rantin FT, Fernandes MN, Glass ML (1996) Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In: Biology of Tropical Fishes, INPA, Manaus
- Karim MR, Sekini M, Ukita M (2003) A model of fish preference and mortality under hypoxic water in the coastal environment. Mar. Pollut. Bull. 47: 25-29
- Langeani F, Araújo RB (1993) *Liposarcus weberi* sp. n., um novo Loricariidae (Ostariophysi, Siluriformes) da bacia do Alto Paraná, Brasil. In: Projeto Cascudo, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto
- Mattias AT, Rantin FT, Fernandes MN (1998) Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). Comp. Biochem. Physiol. A 120: 311-315
- Moraes G, Avilez IM, Altran AE, Barbosa CC (2002) Biochemical and hematological responses of the banded knife fish *Gymnotus carapo* (Linnaeus, 1758) exposed to environmental hypoxia. Braz. J. Biol. 62: 633-640
- Moraes G, Choudhuri JV, Souza RHS, Neto CS (2004) Metabolic effects of exercise in the golden fish *Salminus maxillosus* “dourado” (Valenciennes, 1849). Braz. J. Biol. 64: 655-660
- Moraes MFPG, Höller S, Costa OTF, Glass ML, Fernandes MN, Perry SF (2005) Morphometric comparison of the respiratory organs of the south American lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). Physiol. Biochem. Zool. 78: 546-559
- Moron SE, Oba ET, Andrade CA, Fernandes MN (2003) Chloride cell response to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids *Hoplias malabaricus* and *Hoplerythrinus unitaeniatus*. J. Exp. Zool. 298: 93-104
- Nelson JA (2002) Metabolism of three species of herbivorous loricariid catfishes: influence of size and diet. J. Fish Biol. 61: 1586-1599

- Oliveira RD, Lopes JM, Sanches JR, Kalinin AL, Glass ML, Rantin FT (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
- Peres P, Azevedo Jr. WF, Bonilla-Rodriguez GO (2004) Allosteric water and phosphate effects in *Hoplosternum littorale* hemoglobins. *Eur. J. Biochem.* 271: 4270-4274
- Podkowa D, Goniakowska-Witalinska L (2002) Adaptations to the air breathing in the posterior intestine of the catfish (*Corydoras aeneus*, Callichthyidae): A histological and ultrastructural study. *Folia Biol.* 50: 69-82
- Satora L (1998) Histological and ultrastructural study of the stomach of the air-breathing *Ancistrus multispinnis* (Siluriformes, Teleostei). *Can. J. Zool.* 76: 83-86
- Satora L, Winnicki A (2000) Stomach as an additional respiratory organ, as exemplified by *Ancistrus multispinnis* (Cuvier et Valenciennes, 1937), Siluriformes, Teleostei. *Acta Ichth. Piscat.* 30: 73-79
- Schimidt-Nielsen K (1996) Fisiologia animal: adaptação e meio ambiente. Santos Livraria Editora, São Paulo
- Soares MGM, Menezes NA, Junk WJ (2006) Adaptations of fish species to oxygen depletion in a central Amazonian floodplain lake. *Hydrobiologia* 568: 353-367
- Takasusuki J, Fernandes MN, Severi W (1998) The occurrence of aerial respiration in *Rhinelepis strigosa* during progressive hypoxia. *J. Fish Biol.* 52: 369-379
- Val AL (1996) Surviving low oxygen levels: lessons from fishes of the Amazon. *In: Biology of Tropical Fishes*, INPA, Manaus
- Wang T, Hicks JW (2002) An integrative model to predict maximum O<sub>2</sub> uptake in animals with central vascular shunts. *Zoology* 105: 45-53
- Weber C (1992) Révision du genre *Pterygoplichthys* sensu lato (Pisces, Siluriformes, Loricariidae). *Revue Fr. Aquariol.* 19: 1-36
- Weber RE, Fago A, Val AL, Bang A, Van Hauwaert ML, Dewilde S, Zal F, Moens L (2000). *J. Biol. Chemistry* 275: 17297-17305
- Wu RSS (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar. Pollution Bull.* 45: 35-45

## CAPÍTULO 2

### COMPORTAMENTO RESPIRATÓRIO E RESPOSTAS VENTILATÓRIAS DO CASCUDO *PTERYGOLICHTHYS ANISITSI* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE) SUBMETIDO ÀS CONDIÇÕES DE NORMÓXIA E HIPÓXIA.

**Palavras-chave:** *Pterygoplichthys anisitsi*, respiração bimodal, apnéia, respiração intermitente

## 1. Introdução

Os primeiros vertebrados com respiração aérea foram os sarcopterígeos (peixes de nadadeiras lobadas) do Período Devoniano (350-400 milhões de anos), os quais ocupam a posição basal em toda linhagem desde os peixes do Paleozóico aos mais derivados tetrápodos. Assim, a respiração aérea teve importância fundamental ao longo da história evolutiva dos peixes recentes e, essa especialização, reflete a presença constante de fatores selecionando (Graham, 1994; Perry e Sander, 2004). As diferenças físicas entre água e ar, e os efeitos destes meios sobre a respiração, os fatores ecológicos e físicos que afetam as concentrações de oxigênio em diferentes habitats aquáticos, constituem o cenário evolutivo dos 450 milhões de anos da evolução dos peixes e contribuem para a origem dos peixes de respiração aérea (Graham, 1990, 1997; Graham e Lee, 2004). As fontes de oxigênio em corpos aquáticos naturais são a fotossíntese realizada pelo fitoplâncton e macroalgas e, a difusão do oxigênio proveniente da atmosfera (Chambers *et al.*, 2006). Condições hipóxicas que diminuem o conteúdo aquático de oxigênio ocorrem com frequência em corpos d'água onde há fluxo pequeno e lento ou estagnado, pouca fotossíntese pela limitação na penetração de luz, além das oscilações de temperatura e salinidade (Dejours, 1981; Karim *et al.*, 2003). Entretanto, a produção deficitária de oxigênio também está frequentemente associada à ação antropogênica pelo excessivo depósito de nutrientes e matéria orgânica em muitos corpos d'água em todo o mundo (Diaz, 2001; Wu, 2002).

Nessas condições hipóxicas, os peixes de respiração aérea garantem o suprimento adequado de oxigênio até os tecidos por meio dos órgãos de respiração aérea (Graham, 1994, 1997). A predominância da respiração aquática ou aérea em peixes está frequentemente relacionada à área de superfície dos órgãos respiratórios, às propriedades sanguíneas respiratórias e à habilidade das espécies detectarem uma redução do oxigênio ambiental e iniciarem mecanismos fisiológicos para compensar a diminuição de oxigênio (Johansen *et al.*, 1978; Rantin *et al.*, 1992; Fernandes *et al.*, 1994, 1995).

Segundo Graham (1997), os peixes respiradores aéreos estão divididos em facultativos e contínuos. Por exemplo, os cascudos *Ancistrus* e *Hypostomus* são respiradores aéreos facultativos, não respiram ar normalmente quando em água em condições de normóxia, mas necessitam adotar este modo de respiração quando expostos a

condições desfavoráveis para respiração aquática (e.g. hipóxia, hipercapnia) ou em resposta ao aumento do requerimento de oxigênio, como um resultado de mudanças na temperatura da água e/ou atividade do animal. Já os respiradores contínuos tomam ar a intervalos mais ou menos regulares, porém não altamente predizíveis, sob todas as condições aquáticas, de hiperóxia à hipóxia. Contudo, sua frequência de respiração aérea é regulada por fatores afetando sua necessidade por oxigênio atmosférico, tal como hipóxia aquática, temperatura da água e nível de atividade. Além disso, os respiradores contínuos podem ser divididos em dois tipos, os obrigatórios e os não-obrigatórios. Por exemplo, *Arapaima* e *Anabas* são respiradores obrigatórios, não são capazes de sobreviver com a quantidade de oxigênio obtida pela respiração aquática, mesmo em condições de normóxia, e assim sempre necessitam de oxigênio aéreo suplementar. Em contraste, como exemplo, *Hoplosternum*, *Piabucina* e *Erythrinus* são respiradores contínuos não-obrigatórios que não requerem respiração aérea para sobreviver enquanto em condição normóxica.

O cascudo *Pterygoplichthys anisitsi* (Teleostei, Loricariidae) apresenta respiração aérea e habita regiões poluídas sendo encontrado no rio Preto (Mirassolândia - SP), cujas águas são caracterizadas por concentrações baixas de oxigênio (CETESB, 2002 e 2004). A espécie é pertencente ao grupo dos Siluriformes; grupo esse apontado por Hochachka & Lutz (2001), como contendo espécies altamente tolerantes a hipóxia, o que torna a espécie em questão um modelo experimental adequado para estudos de respiração aérea.

Assim, este estudo teve como objetivo determinar o tipo de respiração aérea de *P. anisitsi* e as respostas ventilatórias com acesso ao ar atmosférico em hipóxia gradual e aguda e sem acesso ao ar atmosférico em hipóxia gradual.

## **2. Material e Métodos**

### *Animais experimentais*

Espécimes adultos de *Pterygoplichthys anisitsi* [massa corporal ( $M_C$ )= 0,139-0,382 kg] foram obtidos no CAUNESP (Centro de Aqüicultura da UNESP, *Campus* de Jaboticabal, SP, Brasil). No laboratório, os peixes foram mantidos em tanque (1.000 L)

com fluxo de água contínuo e aeração constante, a 23-25°C e alimentados com ração comercial e folhas de alface (*Lactuca sativa*).

#### *Experimentos com acesso ao ar atmosférico em normóxia*

O experimento para verificar se a respiração aérea é do tipo contínua mesmo em condições normóxicas foram realizados com espécimes (n= 3) em um aquário-teste (120x30x40 cm) com acesso livre à superfície da água. A alimentação foi interrompida 24 h antes do experimento quando os espécimes foram introduzidos no aquário-teste mantido com aeração constante (água normóxica, PO<sub>2</sub>= 130-140 mmHg) e temperatura entre 23-25 °C. Os animais foram mantidos nessas condições durante 18 h antes do experimento.

Os espécimes foram filmados (Câmera JVC Videomovie GR-AXM77UM) em dois períodos do dia (das 11:00 às 14:00 h e das 18:00 às 21:00 h) para observação da atividade natatória e comportamento dos peixes principalmente quanto à utilização da respiração aérea. No primeiro período de observação (11:00 às 14:00 h), o ambiente manteve-se iluminado pela luz solar (claridade do dia) e iluminação artificial com lâmpadas fluorescentes. No segundo período (18:00 às 21:00 h), as lâmpadas fluorescentes foram apagadas e a claridade do dia diminuiu com o entardecer. Para as filmagens nesse período foi necessária a utilização de uma lâmpada incandescente indireta colocada embaixo da mesa do aquário, garantindo somente a luminosidade suficiente para os registros para que não influenciasse o comportamento dos animais.

#### *Experimentos com acesso ao ar atmosférico em hipóxia gradual e aguda*

Os experimentos com acesso ao ar atmosférico em hipóxia gradual e aguda foram realizados com espécimes (n= 14) colocados em um aquário-teste (120x30x40 cm) com livre acesso à superfície da água. Os espécimes foram introduzidos no aquário-teste com água normóxica (PO<sub>2</sub>= 130-140 mmHg), a alimentação foi interrompida 24 h antes do experimento, e a temperatura permaneceu constante e igual a do período de aclimação (23-25 °C). Os animais foram mantidos nessas condições por pelo menos 18 h antes dos experimentos.

A redução gradual na tensão de  $O_2$  da água foi alcançada por interrupção da aeração e o borbulhamento de  $N_2$  no aquário como descrito abaixo para os experimentos sem acesso ao ar atmosférico em hipóxia gradual. A redução aguda de  $O_2$  do meio aquático foi efetuada por borbulhamento constante de  $N_2$  com pressão de  $1 \text{ kg.cm}^{-2}$ , de forma que em cerca de 30 min era atingida a tensão de 20 mmHg. As reduções da  $PO_2$  foram continuamente monitoradas com um analisador de  $O_2$  FAC-204A (FAC, São Carlos, SP, Brasil). O comportamento do peixe e a frequência da respiração aérea foram monitorados em circuito fechado de TV (Micro-câmera CMOS Fujika 586C Color).

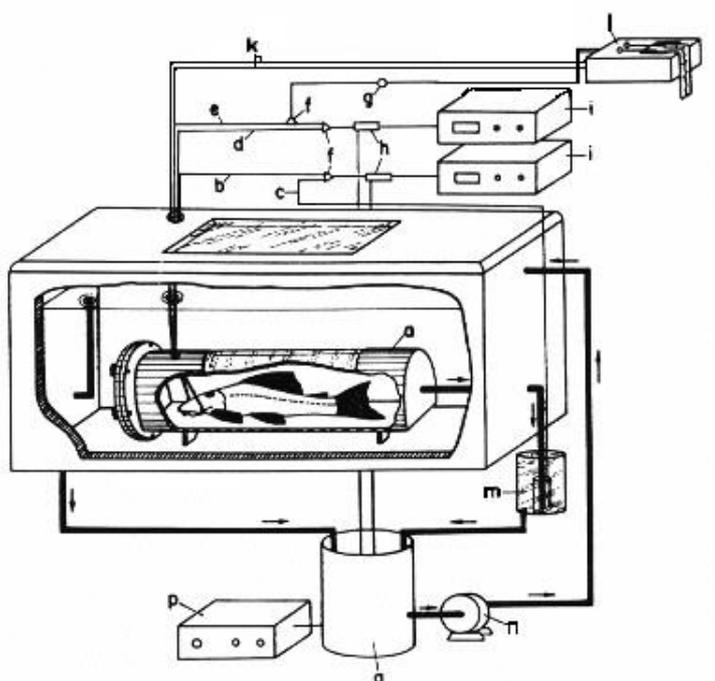
#### *Experimentos sem acesso ao ar atmosférico em hipóxia gradual*

Espécimes de *P. anisitsi* ( $n= 6$ ) foram anestesiados por imersão em Benzocaína® (Sigma) 0,01% e posteriormente medidos e pesados. Em seguida, foram efetuados os procedimentos cirúrgicos para as canulações das cavidades bucal e opercular com cânulas de polietileno. A cânula da cavidade bucal foi introduzida através de um orifício, aberto com o auxílio de uma furadeira Philips Mini Drill SBC 319, na região mediana da cabeça, imediatamente posterior às válvulas orais, tornando-se possível a tomada de amostras da água inspirada. A cânula da cavidade opercular foi introduzida através de um orifício aberto, utilizando-se a mesma metodologia anterior, no opérculo, possibilitando assim, a tomada de amostras da água expirada pelo animal. Posteriormente, os espécimes foram colocados no interior de respirômetros e transferidos para o sistema experimental de respirometria (38 L) de fluxo constante (Figura 1) para determinação da  $\dot{V}O_2$  (taxa metabólica),  $\dot{V}_G$  (ventilação branquial),  $f_R$  (frequência respiratória),  $V_T$  (volume ventilatório) e  $EO_2$  (extração de  $O_2$ ). Todos os experimentos foram iniciados depois do período de recuperação da anestesia e manuseio, que foi de 18 h após a introdução no respirômetro.

As tensões de oxigênio ( $PO_2$ ) da água que entrava no respirômetro ( $P_{in}O_2$ ), para a determinação das respostas ventilatórias foram 140 (normóxia), 100, 70, 50, 40, 30 e 20 mmHg. As reduções das tensões de oxigênio da água do tanque experimental foram feitas de forma gradual por meio de borbulhamento de nitrogênio através de dispersores. O tempo

para a redução de uma tensão para a imediatamente inferior foi de aproximadamente 10 min. Após a estabilização, cada tensão experimental foi mantida constante durante 45 min.

Os teores de oxigênio para a manutenção das diferentes tensões foram constantemente monitorados por um analisador digital de oxigênio FAC-204A. O tanque de respirometria permaneceu fechado durante os experimentos, permitindo assim a manutenção da tensão de oxigênio experimental desejada por períodos de tempo relativamente prolongados.



Fonte: Mattias (1994)

**Figura 1.** Esquema do sistema de respirometria de fluxo constante utilizado para determinação dos parâmetros respiratórios em *Pterygoplichthys anisitsi*. **a.** respirômetro; **b, c.** cateteres de polietileno para a tomada da água que entra ( $P_{inO_2}$ ) e que sai ( $P_{outO_2}$ ) do respirômetro, respectivamente; **d, e.** cateteres provenientes do opérculo ( $P_{eO_2}$ ) e boca ( $P_{iO_2}$ ), respectivamente; **f.** transdutor de pressão GOULD P23 XL; **g.** eletrodo de referência; **h.** torneira de três vias; **i, j.** analisadores de oxigênio FAC-204A; **k.** amplificador de pressão Narco Bio-Systems P-1000B; **p.** registrador de quatro canais Narco Bio-Systems; **m.** frasco de ajuste de fluxo; **n.** bomba para circulação da água; **o.** recipiente para circulação de água; **p.** controlador de temperatura FAC-207.

As medidas de taxa metabólica ( $\dot{V}\mathcal{O}_2 = \text{mLO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) foram efetuadas em respirômetro de fluxo constante. As tensões de oxigênio da água de entrada ( $\text{PinO}_2$ ) e de saída ( $\text{PoutO}_2$ ) do respirômetro foram medidas sifonando-a com catéteres de polietileno e fazendo-a passar, por gravidade, por meio de uma cuveta de PVC termostalizada contendo um eletrodo de oxigênio. Este, por sua vez, foi conectado ao analisador digital de oxigênio FAC-204A que forneceu as pressões parciais de oxigênio em mmHg. A saída do respirômetro foi conectada a um frasco coletor situado do lado externo do tanque experimental. O ajuste desse frasco em diferentes alturas permitiu regular o fluxo de água através do respirômetro que foi ajustado de acordo com o tamanho do animal e calibrado volumetricamente utilizando-se uma proveta e um cronômetro.

A determinação da taxa metabólica pelos animais foi obtida como descrito por Hughes *et al.*, (1983) utilizando a seguinte equação:  $\dot{V}\mathcal{O}_2 = (\text{PinO}_2 - \text{PoutO}_2) \cdot \alpha_{\text{wO}_2} \cdot V_R / \text{Mc}$ , onde:  $\text{PinO}_2$ : tensão de oxigênio (mmHg) da água que entra no respirômetro;  $\text{PoutO}_2$ : tensão de oxigênio (mmHg) da água que sai no respirômetro;  $\alpha_{\text{wO}_2}$ : coeficiente de solubilidade do oxigênio na água ( $\text{mLO}_2 \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1}$ );  $V_R$ : fluxo de água através do respirômetro ( $\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$ );  $\text{Mc}$ : massa corpórea (kg).

Os parâmetros respiratórios branquiais,  $\dot{V}_G$ ,  $V_T$  e  $\text{EO}_2$ , foram determinados utilizando o método descrito por Hughes *et al.* (1983) por meio de medidas diretas da  $\text{PO}_2$  água inspirada ( $\text{PiO}_2$ ) e expirada ( $\text{PeO}_2$ ) pelo peixe.

A  $\text{PiO}_2$  e  $\text{PeO}_2$  foram medidas, respectivamente, por meio de amostras de água obtidas diretamente da boca e opérculo do peixe, sifonando a água por meio de catéteres de polietileno implantados na cavidade bucal e opercular.

A ventilação branquial ( $\dot{V}_G = \text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ) foi calculada como:  $\dot{V}_G = (\text{PinO}_2 - \text{PoutO}_2) / (\text{PiO}_2 - \text{PeO}_2) V_R / \text{Mc}$ .

A extração de  $\text{O}_2$  da corrente ventilatória (ou porcentagem da utilização de  $\text{O}_2$ :  $\text{EO}_2$  %) foi calculada como:  $\text{EO}_2 = 100(\text{PiO}_2 - \text{PeO}_2) / \text{PiO}_2$ .

A frequência respiratória ( $f_R = \text{batimentos} \cdot \text{min}^{-1}$ ) foi registrada conectando o catéter bucal a um transdutor de pressão. Os sinais emitidos foram amplificados e registrados em um fisiógrafo Narco Bio-Systems, que permitiu determinar as variações de amplitude e frequência dos movimentos ventilatórios no decorrer de todo o experimento. O volume

ventilatório ( $V_T = \dot{V}_C / f_R$ ) foi calculado dividindo-se a ventilação branquial pela frequência respiratória.

#### *Análise estatística*

Os experimentos para avaliação do comportamento de respiração aérea, *com acesso ao ar atmosférico em hipóxia gradual e aguda e com acesso ao ar atmosférico em normóxia*, foram avaliados em função do tempo e frequência e, qualitativamente descritos.

Os dados das respostas respiratórias à *hipóxia gradual sem acesso ao ar atmosférico* não apresentaram normalidade, motivo pelo qual se adotou as medianas ao invés dos valores médios para sua melhor representação, e foram analisados pela prova de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos com o teste de Dunn para comparações múltiplas (Zar, 1999).

### **3. Resultados**

#### *Respiração aérea*

Na Tabela 1, estão apresentados os resultados do experimento de normóxia, no qual foi observado um grupo com três animais com acesso ao ar atmosférico em dois períodos do dia. Somente no segundo período do estudo (18:00-21:00 h) ocorreu respiração aérea. A partir do intervalo entre 18:00-19:30 h, quando o laboratório estava quase totalmente escuro, os espécimes iniciaram movimentos exploratórios (natação contínua) e os comportamentos de tomada rápida de ar na superfície por engolfamento. Quando o laboratório já se encontrava totalmente escuro (19:30-21:00 h) a movimentação se intensificou e o comportamento descrito acima foi exibido continuamente ao longo dos registros. Para a tomada de ar na superfície foram observados os comportamentos de (a) tomada rápida de ar na superfície por *engolfamento* (cinco vezes, Tabela 1) e (b) tomada de ar em quase todo o tempo de registro com os espécimes nadando na *superfície* com a boca acima do nível da água.

As frequências de episódios de respiração aérea em espécimes submetidos à hipóxia gradual e aguda com acesso ao ar atmosférico estão apresentadas na Tabela 2.

Nos experimentos de redução gradual das tensões de oxigênio, realizados durante o dia, não houve respiração aérea acessória (NRA). Respiração aérea somente ocorreu quando a redução foi aguda, nesse caso foi observado o comportamento de engolfamento de ar na superfície aquática. A tomada rápida (*engolfamento*) de ar na superfície foi caracterizada pelos seguintes comportamentos: (a) liberação de bolhas de ar pela boca e opérculos, seguido de (b) rápida atividade de natação sinuosa em direção à superfície, (c) tomada do ar atmosférico, seguida por (d) submersão rápida ao fundo do aquário. Antes ou após as tomadas de ar foi observado comportamento agressivo deflagrado pelos espécimes maiores em relação aos menores.

Ao reduzir as tensões de oxigênio experimentais foi observado que quando a tensão de oxigênio da água atingiu cerca de 50 mmHg os espécimes exibiram o comportamento de *apnéia* ao (a) fecharem os opérculos, (b) protraírem seus lábios e (c) iniciarem movimentos da boca em forma de pulsações, por cerca de 20 segundos, fazendo com que a água entrasse e saísse exclusivamente pela boca e, na seqüência, (d) fecharem a boca completamente.

**Tabela 1.** Frequência dos comportamentos de respiração aérea exibidos por *Pterygoplichthys anisitsi* em condição de normóxia durante dois períodos. F1: registro entre 11:00-12:30 h; F2: registro entre 12:30-14:00 h; F3: registro entre 18:00-19:30 h; F4: registro entre 19:30-21:00 h; NRA: sem episódios de respiração aérea; S: episódios de respiração aérea contínuos e sincrônicos. Os números correspondem aos minutos dos registros em que ocorreram episódios de respiração aérea.

COMPORTAMENTO	F1	F2	F3	F4
engolfamento	NRA	NRA	26; 91	9;17;54;67;68
superfície	NRA	NRA	NRA	S

**Tabela 2.** Frequência dos episódios de respiração aérea de *Pterygoplichthys anisitsi* em função das reduções gradual e aguda das tensões de oxigênio. Os experimentos de 1 a 6, indicados entre parênteses, foram conduzidos em tríades de espécimes (E1,E2,E3 e E8,E9,E10) e duplas (E4 e E5, E6 e E7, E11 e E12, E13 e E14). NRA: sem episódios de respiração aérea. O espécime 13, na tensão de 70 mmHg, foi à superfície para engolfamento de ar uma única vez.

Hipóxia	Espécime	Tensão (mmHg)	Episódios de Respiração Aérea
Gradual	E1 (1)	20	NRA
	E2 (1)	20	NRA
	E3 (1)	20	NRA
	E4 (2)	20	NRA
	E5 (2)	20	NRA
	E6 (3)	20	NRA
	E7 (3)	20	NRA
Aguda	E8 (4)	20	10
	E9 (4)	20	3
	E10 (4)	20	3
	E11 (5)	20	4
	E12 (5)	20	NRA
	E13 (6)	70	1
	E14 (6)	20	NRA

### *Respiração aquática*

Os resultados da taxa metabólica ( $\dot{V}\mathcal{O}_2$ ) e dos parâmetros respiratórios ( $\dot{V}_G$ ,  $V_T$ ,  $EO_2$ ,  $f_R$ ) do cascudo *P. anisitsi* frente às tensões de oxigênio da água de entrada ( $P_{inO_2}$ ) estão apresentados na Tabela 3 e, na Figura 2 estão graficamente apresentados os registros da frequência respiratória de três espécimes.

A taxa metabólica e os parâmetros respiratórios sem acesso ao ar atmosférico apresentaram ampla variação em cada tensão de oxigênio da água.

Durante os experimentos de hipóxia gradual sem acesso à superfície aquática foi observado que os espécimes entravam em longos períodos de *apnéia* em diferentes tensões de oxigênio, fato caracterizado pela ausência dos registros das frequências respiratórias, o que levou à interrupção dos experimentos. Em um estudo piloto, foi verificado que um espécime ficou em apnéia por 4,5 h. Logo após ser retirado do respirômetro realizou profundo engolfamento de ar atmosférico pela boca e, em seguida à sua recolocação no tanque de manutenção, em condição de normóxia, exibiu recuperação, fato verificado pela sua sobrevivência.

A Figura 2a, b e c ( $PO_2 = 140$  mmHg) mostra a variação dos registros da frequência respiratória obtida em condição de normóxia, anteriormente ao início da redução gradual de oxigênio, e dos registros nas tensões anteriores às que precederam a apnéia (Fig. 2a, b, c;  $PO_2 = 40, 40$  e  $20$  mmHg, respectivamente). Um espécime (Fig. 2c) não apresentou respiração contínua ao longo da hipóxia gradual até a tensão de  $20$  mmHg; seu padrão respiratório foi caracterizado por frequências cíclicas (ver Reid *et al.*, 2003) de diferentes amplitudes, interrompidos por períodos curtos de apnéia.

Apesar da ampla variação verificada para a espécie nos parâmetros respiratórios e do comportamento de apnéia foi detectada diferença significativa nos parâmetros respiratórios durante a hipóxia gradual sem acesso à superfície. A taxa metabólica ( $\dot{V}\mathcal{O}_2$ ) diminuiu na tensão de  $40$  mmHg em relação às condições de normóxia ( $p= 0,004$ ).

Ao contrário da taxa metabólica, a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e a frequência respiratória ( $f_R$ ) mostraram uma tendência no aumento de seus valores ( $p= 0,07$  e  $p= 0,058$ , respectivamente).

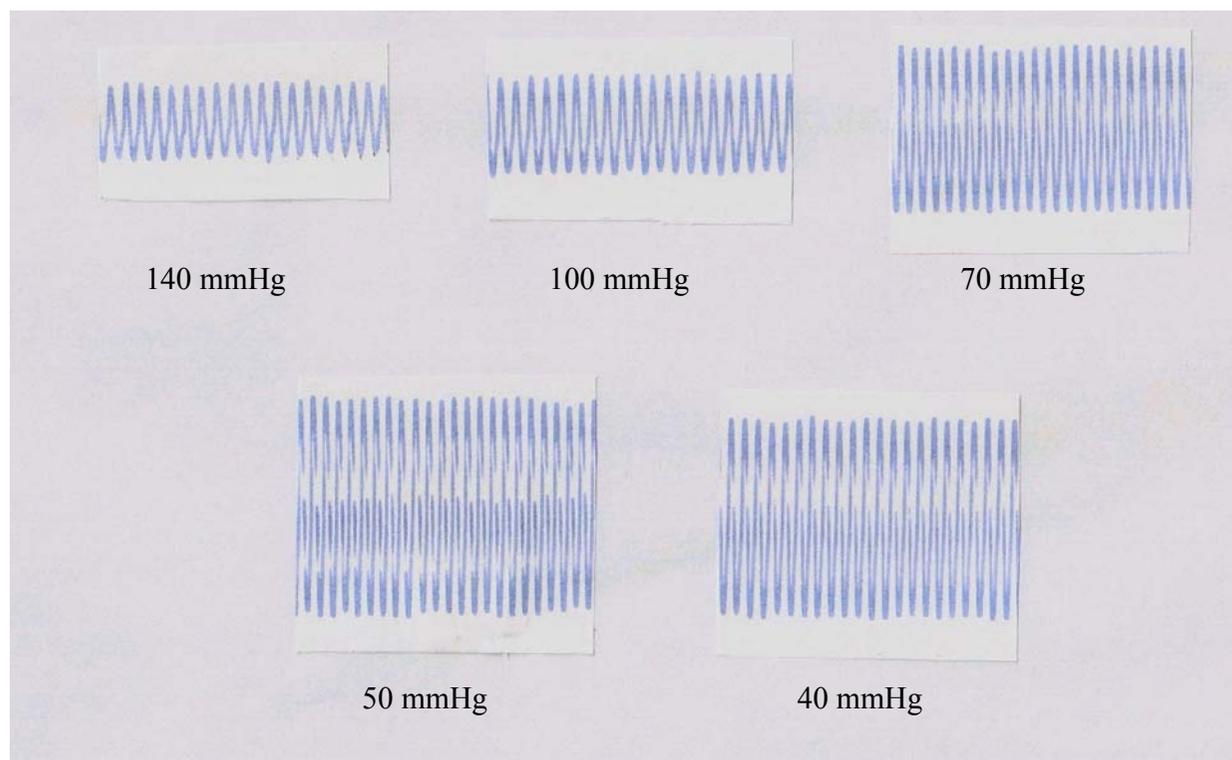
Por outro lado, o volume ventilatório e a extração de oxigênio não apresentaram diferenças significativas durante a redução gradual das tensões de oxigênio. Considerando a

variabilidade das respostas (Tabela 3), o volume ventilatório, na tensão de 50 mmHg, apresentou a maior amplitude (4-107 mL $O_2$ .kg<sup>-1</sup>.bat<sup>-1</sup>). Enquanto que, ao considerar os valores medianos, a extração de oxigênio, na tensão de 40 mmHg, apresentou menor valor.

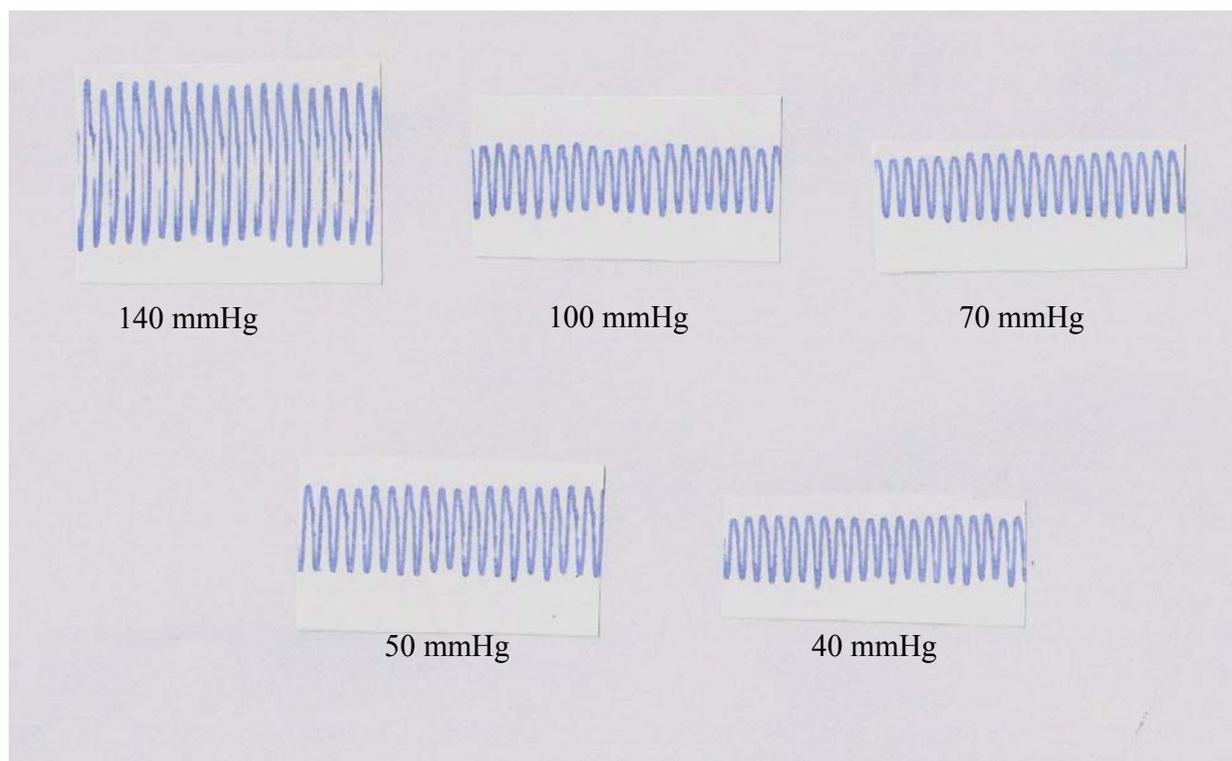
O espécime 6 foi o único animal levado até a tensão de 20 e 10 mmHg. Nessas tensões houve elevação acentuada da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e volume ventilatório ( $V_T$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Valores medianos (n= 6) da taxa metabólica ( $\dot{V}\mathcal{O}_2$ ) e dos parâmetros ventilatórios branquiais ( $\dot{V}_G$ ,  $V_T$ ,  $EO_2$  e  $f_R$ ) em função das reduções nas tensões de oxigênio da água inspirada ( $PiO_2$ ) de *P. anisitsi* em hipóxia gradual sem acesso ao ar atmosférico. Entre parênteses estão os valores mínimo e máximo dos parâmetros analisados.

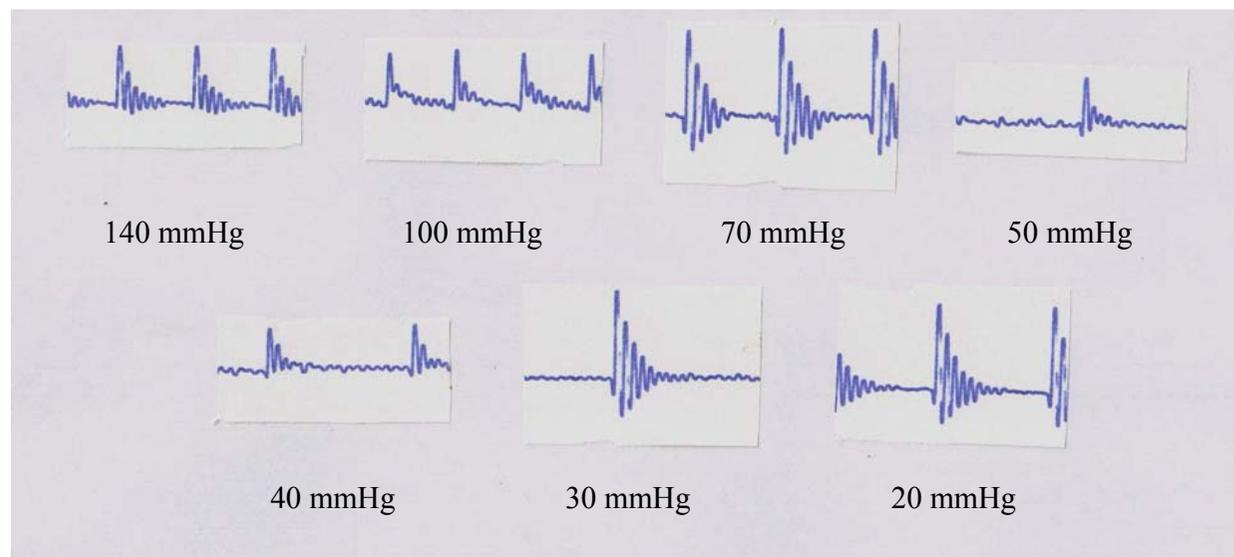
<b>PiO<sub>2</sub></b> <b>(mmHg)</b>	<b><math>\dot{V}\mathcal{O}_2</math></b> <b>(mLO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\dot{V}_G</math></b> <b>(mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>)</b>	<b>V<sub>T</sub></b> <b>(mLO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.bat<sup>-1</sup>)</b>	<b>EO<sub>2</sub></b> <b>(%)</b>	<b>f<sub>R</sub></b> <b>(bat.min<sup>-1</sup>)</b>	<b>n<sup>o</sup></b> <b>espécimes</b>
132 (121-136)	52 (30-97)	734 (603-1452)	6 (5-11)	20 (12-38)	117 (106-132)	6
93 (86-101)	42 (24-56)	501 (253-1843)	5 (2-15)	27 (12-66)	122 (118-144)	6
68 (58-74)	39 (27-46)	936 (413-8710)	7 (3-66)	26 (2-59)	127 (120-142)	4
49 (41-54)	36 (30-58)	1496 (474-11982)	10 (4-107)	25 (3-56)	118 (110-124)	4
40 (38-42)	12 (9-32)	1290 (513-6490)	9 (2-50)	14 (2-62)	132 (122-218)	4
28	34	9890	159	5	62	1
13	5	23076	262	1	88	1



**Figura 2 a:** Registros respiratórios obtidos em hipóxia gradual durante experimento de respirometria sem acesso ao ar atmosférico no espécime “1”. O registro de cada tensão de oxigênio (mmHg) mostrado é de 10 segundos.



**Figura 2 b:** Registros respiratórios obtidos em hipóxia gradual durante experimento de respirometria sem acesso ao ar atmosférico no espécime “2”. O registro de cada tensão de oxigênio (mmHg) mostrado é de 10 segundos.



**Figura 2 c:** Registros respiratórios obtidos em hipóxia gradual durante experimento de respirometria sem acesso ao ar atmosférico no espécime “3”. O registro de cada tensão de oxigênio (mmHg) mostrado é de 10 segundos.

#### 4. Discussão

##### *Respiração aérea*

Entre os peixes de água doce, a causa primária para a respiração aérea parece decorrer dos efeitos de condições aquáticas hipóxicas (Randall *et al.*, 1981). De fato, a maioria dos peixes recentes que possuem respiração aérea ocorre em ambientes tropicais, os quais estão sujeitos a períodos sazonais de seca e flutuações de temperatura e O<sub>2</sub> (Graham e Baird, 1982; Graham, 1997; Takasusuki *et al.*, 1998; Mattias *et al.*, 1998).

A diminuição das concentrações de oxigênio está associada a um limiar para o início da respiração aérea, a partir do qual é característico um aumento considerável de sua frequência (Graham e Baird, 1982; Graham, 1997; Takasusuki *et al.*, 1998; Mattias *et al.*, 1998). Por outro lado, o aumento da frequência de respiração aérea também pode ser devido a um aumento de atividade animal, como verificado para *Hoplosternum thoracatum* (Gee e Graham, 1978).

Outros loricariídeos como *Glyptoperichthyes gibbiceps* e *Pterygoplichthys pardalis* exibem grande tolerância em níveis extremamente baixos de oxigênio dissolvido (menos que 1 mg.L<sup>-1</sup>) sendo capazes de sobreviver por 2,5 horas em hipóxia, mostrando não serem estritamente dependentes da respiração aérea para sobreviver em condições hipóxicas (MacCormack *et al.*, 2003).

Neste estudo, *P. anisisti* exibiu respiração aérea em normóxia apenas no período de maior restrição luminosa no qual também ocorreu maior atividade. A espécie mostrou tolerância à hipóxia, porém nessas condições ambientais a atividade natatória foi semelhante à apresentada pela espécie durante o período diurno em normóxia, ou seja, ficando inativa no fundo do aquário com pequenas movimentações. Dessa forma, *P. anisisti*, segundo a terminologia proposta por Graham (1997), se comporta como um respirador aéreo contínuo, mas não obrigatório, ou seja, captam ar sob todas as condições de oxigênio dissolvido a intervalos não regulares.

Análises de radiotelemetria sobre o comportamento de quatro espécimes de *G. gibbiceps* mostraram um padrão cíclico de comportamento. Os espécimes permanecem sobre o fundo durante o dia e exploram a coluna d'água, mais freqüentemente, durante a

noite e início da manhã em ambiente em que o oxigênio dissolvido e a temperatura não variaram nas profundidades testadas (MacCormack *et al.*, 2003).

Esse padrão cíclico apresentado por *G. gibbiceps* é semelhante ao observado para *P. anisitsi*. Um padrão comportamental semelhante em espécies de mesmo grupo pode significar padrões fisiológicos adaptados às necessidades frente ao ambiente.

Um importante fator a ser considerado no ambiente de peixes respiradores aéreos são os potenciais predadores aquáticos e terrestres (Power, 1987). Grupos de algumas espécies respiram ar em intervalos curtos de tempo onde a respiração por um peixe é seguida pela respiração de um ou mais peixes, ocorrendo assim um sincronismo entre eles. Entre os peixes de respiração aérea esse comportamento é comum e, tem sido sugerido que esse comportamento reduz a probabilidade de contato entre predador e presa (peixe), assim como o efeito de cardume (Kramer e Graham, 1976; Gee e Graham, 1978; Gee, 1980). Em *P. anisitsi*, também foi observado sincronismo na respiração aérea e esse possível comportamento anti-predação pode ser auxiliado pelo fato que as excursões à superfície são realizadas, com maior frequência, durante o período noturno.

A hipóxia nos ambientes aquáticos é considerada como o fator primário na evolução da respiração aérea em peixes e a manutenção da respiração aérea pode conferir um alto grau de independência da qualidade da água às espécies que apresentam esse modo de respiração.

Em algumas espécies, a respiração aérea pode permitir melhor prevenção contra predadores do que outros tipos de estratégias de sobrevivência, como a respiração na superfície aquática (Gee e Graham, 1978; Florindo, 2002), uma vez que gastam menos tempo na superfície aquática onde os peixes são vulneráveis à predação aérea. Além disso, a respiração bimodal pode ser energeticamente favorável sobre a respiração exclusivamente aquática devido às diferenças de densidade e viscosidade entre ar e água (Kramer *et al.*, 1978).

As brânquias apresentam o sistema de contracorrente para respiração aquática que é a forma mais efetiva para troca de gases no meio aquático (Hughes e Morgan, 1973; Evans *et al.*, 2005). Em condições hipóxicas, em que não houve respiração aérea, anteriormente à subida para engolfamento de ar, houve fechamento dos opérculos e, aparentemente, ocorreu a ventilação das brânquias com água que entrava e saía exclusivamente pela boca. Esse

comportamento pareceu ser uma resposta à asfixia provocada pela condição hipóxica. Posteriormente, os espécimes fechavam completamente a boca e se iniciava um período de apnéia.

A utilização de um padrão de respiração intermitente é característico em *Synbranchus marmoratus*, no qual períodos de apnéia são regularmente interespaçados com intervalos de ventilação aquática. Quando submetido à hipóxia, o animal responde primeiro com a redução dos intervalos apnéicos, deste modo diminuindo a frequência ventilatória, e finalmente pela completa parada ventilatória (Graham e Baird, 1984; Graham *et al.*, 1987).

A respiração contínua ou intermitente são manifestações de um sistema de controle comum em todos os vertebrados de respiração aérea. Em muitas espécies de peixes que normalmente exibem ventilação contínua é também observada a passagem da respiração contínua para intermitente em água bem oxigenada sob condições de baixa taxa metabólica (Milsson, 1991). O mesmo autor comenta que sob essas condições, os padrões de respiração intermitente podem representar estratégias adaptativas que, em parte, servem para minimizar o custo da ventilação.

Em Loricariidae, assim como proposto para Synbranchidae (Graham *et al.*, 1987), o conjunto das especializações respiratórias exibidas por diferentes espécies da família podem exemplificar diferentes formas no processo respiratório, já que o cascudo *Loricaria typus* (Carter e Beadle, 1931) apresenta respiração aquática exclusiva, *Hypostomus regani* e *Rhinelepis strigosa* (respectivamente, Mattias *et al.*, 1998 e Takasusuki *et al.*, 1998) respiração aérea facultativa e, *P. anisitsi* (este trabalho) respiração aérea contínua.

#### *Respiração aquática*

#### *Taxa metabólica ( $\dot{V}\dot{\mathcal{O}}_2$ )*

A taxa metabólica ( $\dot{V}\dot{\mathcal{O}}_2$ : mL $\mathcal{O}_2$ .kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) de teleósteos exibe uma ampla variação dependendo da temperatura, atividade, habitat e estado fisiológico das distintas espécies. A taxa metabólica é utilizada como uma medida quantitativa da atividade geral de uma espécie e de suas necessidades metabólicas (Rantin e Johansen, 1984; Fernandes e Rantin, 1989; Fernandes *et al.*, 1995; Muusze *et al.*, 1998; Sakuragui *et al.*, 2003; Affonso e Rantin, 2005).

Considerando as espécies que possuem respiração aérea acessória, duas comparações interespecíficas podem enfatizar a relação entre respiração aérea e uma limitada capacidade para respiração aquática. A comparação dos efeitos da hipóxia gradual sobre o não respirador aéreo *Piabucina panamensis* e seu congêneres respirador aéreo *P. festae* mostra que o respirador aéreo tem reduzida capacidade ventilatória e não pode sustentar seu consumo de oxigênio aquático na mais baixas tensões de oxigênio (Graham *et al.*, 1978). O mesmo padrão foi observado para outros caracíneos, como o não respirador aéreo *Hoplias malabaricus* e o respirador aéreo *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Mattias *et al.*, 1996).

Entre as espécies de Loricariidae já estudadas, há grande variação na taxa metabólica, apesar das espécies pertencentes à família possuírem baixa atividade natatória e apresentarem baixas taxas metabólicas. Em condições normóxicas da água, *Ancistrus chagresi* a 25-27°C apresentou  $\dot{V}\mathcal{O}_2 = 84 \pm 4 \text{ mL O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Graham, 1983), *Rhinelepis strigosa* a 25°C apresentou  $\dot{V}\mathcal{O}_2 = 23 \pm 2,7 \text{ mL O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Takasusuki *et al.*, 1998) e *Hypostomus regani* a 25°C apresentou  $\dot{V}\mathcal{O}_2 = 39,75 \pm 2,19 \text{ mL O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Mattias *et al.*, 1998). Já *Pterygoplichthys anisitsi*, segundo os valores medianos, a 23-25°C apresentou  $\dot{V}\mathcal{O}_2 = 52 \text{ mL O}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . A baixa taxa metabólica ( $\dot{V}\mathcal{O}_2$ ) verificada em loricariídeos pode estar relacionada à grande quantidade de tecido cujo metabolismo é muito baixo.

Nelson *et al.* (2006) também encontraram uma grande variação nas respostas respiratórias em *H. regani* submetido à hipóxia e sugeriram que essa variação poderia ser o resultado de diferente nível de estresse individual às condições experimentais como anestesia, canulação e presença humana o que poderia modular as respostas fisiológicas.

Neste estudo, a variação individual foi muito grande e os valores médios não foram representativos da taxa metabólica. Apesar disso, foi observado que ocorreu redução na taxa metabólica entre as condições normóxicas e a tensão de oxigênio experimental de 40 mmHg, o que segundo os valores medianos representa uma redução maior que quatro vezes ou 77% da taxa metabólica em normóxia. A gradativa redução da  $\dot{V}\mathcal{O}_2$  (valores medianos) de *P. anisitsi* durante a hipóxia mostrou que a espécie não foi capaz de manter a  $\dot{V}\mathcal{O}_2$  e pode ser considerada como uma espécie oxi-conformista.

As espécies oxi-conformistas são incapazes de regular a taxa metabólica e permitem passivamente que a taxa diminua continuamente com a redução da tensão de oxigênio do meio (Dejours, 1981; Piiper, 1982). De forma geral, os teleósteos de respiração exclusiva aquática como *Oreochromis niloticus* (Fernandes e Rantin, 1989), *Salminus maxillosus* (Salvo Souza, 1999), *Prochilodus scrofa* (Fernandes *et al.*, 1995) e *Hoplias malabaricus* (Sakuragui *et al.*, 2003) são oxi-reguladores, o que implica que quando submetidos à hipóxia gradual são capazes de manter sua taxa metabólica até uma tensão crítica. Alguns loricarídeos como *H. regani* e *R. strigosa*, também são oxi-reguladores e a tensão crítica de O<sub>2</sub> foram determinadas como PO<sub>2</sub> = 34 e 23,9 mmHg, respectivamente (Mattias *et al.*, 1998 e Takasusuki *et al.*, 1998) e em *A. chagresi*, a taxa metabólica diminui rapidamente abaixo da tensão de oxigênio da câmara experimental estar em 40 mmHg, nesta tensão a taxa é aproximadamente 60 mL O<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

As especializações como área branquial e musculatura ventilatória reduzida, desvios na circulação branquial, mudanças na concentração de hemoglobina e afinidade da hemoglobina ao oxigênio, que minimizam a perda potencial de oxigênio pelas brânquias, também reduz a capacidade para a respiração aquática (Graham e Baird, 1982). Desta forma, a baixa taxa metabólica e a incapacidade de mantê-la constante frente à hipóxia gradual como observado em *P. anisitsi* podem refletir as limitações da respiração aquática pela presença dessas especializações favorecendo uma eficiente respiração aérea.

*Ventilação branquial ( $V_G$ ), Freqüência respiratória ( $f_R$ ), Volume ventilatório ( $V_T$ ) e Extração ( $EO_2$ )*

Em ambientes aquáticos sujeitos a oscilações na concentração de oxigênio ou a frequentes períodos hipóxicos é necessário que os peixes promovam ajustes respiratórios para manterem a transferência adequada de oxigênio do ambiente aos tecidos para garantir os processos aeróbicos (Fernandes e Rantin, 1989). Para isso é fundamental que exista a capacidade de integrar as informações sensoriais sobre as variações dos níveis de oxigênio do meio para que ocorram ajustes cardio-respiratórios adequados para a sobrevivência em condições adversas (Fritsche e Nilsson, 1993; Taylor *et al.*, 1999; Florindo *et al.*, 2004; Reid *et al.*, 2005).

Entre as respostas produzidas pelo estímulo dos receptores de oxigênio estão o aumento na ventilação, a bradicardia hipóxica, o sincronismo cardio-respiratório e a constrição dos vasos sanguíneos periféricos (Satchell, 1991).

O aumento da ventilação branquial tem sido considerado como a primeira resposta dos teleósteos à hipóxia ambiental (Lomholt e Johansen, 1979). A ventilação branquial ocorre pela ação alternada de uma bomba de pressão na cavidade bucal e, de uma bomba de sucção na cavidade opercular e pode ser avaliada como a amplitude e frequência dos batimentos operculares. Conseqüentemente, o aumento da ventilação pode ser o resultado do aumento da amplitude e/ou da frequência respiratória (Hughes e Shelton, 1962; Hughes e Morgan, 1973; Jensen *et al.*, 1993). A reduzida tensão de oxigênio da água é compensada passando uma maior quantidade de água pelas brânquias por unidade de tempo. Entretanto, quando o custo energético da ventilação excede o ganho na tomada de oxigênio, ocorre uma diminuição na ventilação. A tensão de oxigênio da água do meio em que ocorre esta transição é denominada tensão crítica de oxigênio ( $P_{cO_2}$ ), onde o peixe perde a capacidade de compensar a diminuição da tensão de oxigênio do meio e não mais mantém o consumo (Fernandes e Rantin, 1989).

Diferentes espécies de teleósteos apresentam diferentes modos para acionar a hiperventilação quando em hipóxia. A resposta mais comum é a hiperventilação por um maior aumento no volume ventilatório que na frequência respiratória. Possivelmente, esse tipo de resposta está relacionado à vantagem de um menor custo energético na ventilação branquial, enquanto que uma alta frequência de contração é limitada pelo trabalho contra uma alta viscosidade interna dos músculos e da alta viscosidade da água (Rantin *et al.* 1992).

A capacidade de extração de oxigênio do meio pelos peixes depende, entre outros fatores, do volume e da velocidade do fluxo de água sobre as brânquias. Quando um grande volume de água passa sobre as brânquias, parte dela não entra em contato com as lamelas e, um aumento na velocidade do fluxo reduz o tempo de difusão do oxigênio, resultando numa diminuição na eficiência das trocas gasosas (Hughes e Shelton, 1962).

Em hipóxia gradual, existe um aumento na ventilação numa relação inversa à tensão do meio, com um conseqüente aumento no volume e na velocidade do fluxo de água sobre as brânquias, diminuindo a eficiência da extração pelas mesmas. Abaixo da tensão crítica, o

animal perde a capacidade de compensar maiores reduções na tensão do meio, ocorrendo uma diminuição da ventilação branquial e do volume ventilatório e, uma redução na velocidade e no volume do fluxo de água sobre as brânquias, com um aumento percentual da extração de oxigênio.

Em *Hoplias malabaricus*, peixe com respiração exclusivamente aquática, o aumento da ventilação branquial ocorreu pelo aumento conjunto do volume ventilatório e frequência respiratória (Sakuragui *et al.*, 2003). No cascudo *H. regani* a hiperventilação, durante hipóxia, ocorreu devido a um maior aumento no volume ventilatório do que na frequência respiratória embora essa espécie como os demais loricariídeos tenha certa limitação anatômica quanto à capacidade para expansão das cavidades bucal e opercular (Mattias *et al.*, 1998). No cascudo *R. strigosa* foi observado uma correlação entre o aumento da ventilação branquial e do volume ventilatório e, uma diminuição da extração de oxigênio até atingir a tensão crítica, abaixo da qual ocorreu o inverso, ou seja, a diminuição da ventilação branquial e do volume ventilatório e, um aumento na extração (Takasusuki *et al.*, 1998). Porém, neste estudo, *P. anisitsi* exibiu uma tendência a aumentar a ventilação branquial por meio da frequência respiratória como mecanismo compensatório frente à redução na disponibilidade de oxigênio no meio. O mecanismo compensatório exibido por *P. anisitsi* parece ser a consequência de sua ineficiência em utilizar os ajustes respiratórios já discutidos frente à hipóxia, o que o faz se comportar como oxi-conformista. Os mecanismos compensatórios também podem ser ineficientes devido às brânquias tornarem-se completamente não efetivas como órgão de captação de oxigênio em hipóxia e poderem perder oxigênio para a água, como verificado em *Lepisosteus oculatus* (Smatresk e Cameron, 1982; Burlson *et al.*, 1998).

Entre os fatores morfológicos e fisiológicos que propiciaram uma menor dependência do oxigênio dissolvido na água estão os órgãos de respiração aérea, as adaptações circulatórias, o controle cardio-respiratório, as propriedades respiratórias sanguíneas e as adaptações metabólicas (Graham, 1997).

De acordo com Roberts e Graham (1985), os peixes que são respiradores aéreos em água hipóxica não ventilam suas brânquias o tempo todo, mesmo quando eles não estão utilizando a respiração aérea. Por exemplo, *Synbranchus marmoratus* apresenta apnéia quando submetido à hipóxia gradual sem acesso ao ar diminuindo a frequência ventilatória

e posteriormente apresentando parada respiratória completa (Graham *et al.*, 1987). O comportamento respiratório de apnéia exibido por *P. anisitsi* submetido à hipóxia gradual também é uma resposta respiratória frente à hipóxia, já que a espécie apresenta características adaptativas que a torna capaz de manter sua sobrevivência em situações hipóxicas com maior independência do meio aquático.

A respiração aérea normalmente suplementa a respiração branquial e, durante o aumento de atividade, pode proporcionar o aumento da capacidade metabólica além dos limites da respiração exclusivamente branquial (Gee e Graham, 1978).

Assim, o comportamento oxi-conformista e a interrupção da respiração exibido por *P. anisitsi* em hipóxia, sugere que a ventilação branquial é um processo energeticamente caro e não eficaz frente às reduções graduais das tensões de oxigênio.

## 5. Referências

- Affonso EG, Rantin FT (2005) Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141: 275-280
- Burleson ML, Shipman BN, Smatresk NJ (1998) Ventilation and acid-base recovery following exhausting activity in an air-breathing fish. *J. Exp. Biol.* 201: 1359-1368
- Carter GS, Beadle LC (1931) The fauna of the swamps of Paraguayan Chaco in relation to its environment. II. Respiratory adaptations in the fishes. *J. Linn. Soc. London (Zool)* 37: 327-368
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) (2002). Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo, São Paulo
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) (2004). Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo, São Paulo
- Chambers PA, Culp JM, Glozier NE, Cash KJ, Wrona FJ, Noton L (2006) Northern rivers ecosystem initiative: nutrients and dissolved oxygen- issues and impacts. *Environ. Monit. Assess.* 113: 117-141
- Dejours P (1981) Principles of comparative respiratory physiology. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam New York Oxford

- Diaz RJ (2001) Overview of hypoxia around the world. *J. Environ. Quality* 30: 275-281
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97-177
- Fernandes MN, Barrionuevo WR, Rantin FT (1995) Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a south american prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. *J. Fish Biol.* 46: 123-133
- Fernandes MN, Rantin FT (1989) Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. *J. Fish Biol.* 35: 509-519
- Fernandes MN, Rantin FT, Kalinin AL, Moron SE (1994) Comparative study of gill dimension of three erythrinid species in relation to their respiratory function. *Can. J. Zool.* 72: 160-165
- Florindo LH (2002) O papel dos quimiorreceptores de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>/pH no controle dos reflexos cardio-respiratórios e da respiração na superfície aquática (ASR) em tambaqui, *Colossoma macropomum*: respostas a longo prazo durante a hipóxia e a hipercarbica. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Paulo
- Florindo LH, Reid SG, Kalinin AL, Milson WK, Rantin FT (2004) Cardiorespiratory reflexes and aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): acute responses to hypercarbica. *J. Comp. Physiol. B* 174: 319-328.
- Fritsche R, Nilsson S (1993) Cardiovascular and ventilatory control during hypoxia. *In: Ecophysiology*. Chapman e Hall, London
- Gee JH (1980) Respiratory patterns and antipredator responses in the central mudminnow, *Umbra limi*, a continuous, facultative, air-breathing fish. *Can. J. Zool.* 58: 819-827
- Gee JH, Graham JB (1978) Respiratory and hidrostatic functions of the intestine of the catfishes *Hoplosternum thoracatum* and *Brochis splendens* (Callichthyidae). *J. Exp. Biol.* 74: 1-16
- Graham JB (1983) The transition to air breathing in fishes. II. Effects of hypoxia acclimation on the bimodal gas exchange of *Ancistrus chagresi* (Loricariidae). *J. Exp. Biol.* 102: 157-173
- Graham JB (1990) Ecological, evolutionary, and physical factors influencing aquatic animal respiration. *Amer. Zool.* 30: 137-146

- Graham JB (1994) An evolutionary perspective for bimodal respiration: a biological synthesis of fish air breathing. *Amer. Zool.* 34: 229-237
- Graham JB (1997) Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation. Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto
- Graham JB, Baird TA, Stockmann W (1987) The transition to air breathing in fishes. IV. Impact of branchial specializations for an air breathing on the aquatic respiratory mechanisms and ventilatory costs of the swamp eel *Synbranchus marmoratus*. *J. Exp. Biol.* 129: 83-106
- Graham JB, Kramer DL, Pineda E (1978) Comparative respiration of an air-breathing and a non-air-breathing characoid fish and the evolution of aerial respiration in characins. *Physiol. Zool.* 51: 279-288
- Graham JB, Baird TA (1982) The transition to air breathing in fishes. I. Environmental effects on the facultative air breathing of *Ancistrus chagresi* and *Hypostomus plecostomus* (Loricariidae). *J. Exp. Biol.* 96: 53-67
- Graham JB, Lee HJ (2004) Breathing air in air: in what ways might extant amphibious fish biology relate to prevailing concepts about early tetrapods, the evolution of vertebrate air breathing, and the vertebrate land transition? *Physiol. Biochem. Zool.* 77: 720-731
- Hochachka PW, Lutz PL (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 130: 435-459.
- Hughes GM, Morgan M (1973) The structure of fish gills in relation to their respiratory function. *Biol. Rev.* 48: 419-475
- Hughes GM, Shelton G (1962) Respiratory mechanisms and their nervous control in fish. *In: Advances in comparative physiology and biochemistry.* Academic Press, London
- Hughes GM, Albers C, Muster D, Gotz KH (1983) Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20°C and the effects of hypoxia. *J. Fish Biol.* 22: 613-628
- Jensen FB, Nikinmaa M, Weber R (1993) Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. *In: Ecophysiology.* Chapman e Hall, London
- Johansen K, Mangum CP, Lykkeboe G (1978) Respiratory properties of the blood of Amazon fishes. *Can. J. Zool.* 56: 898-906

- Karim MR, Sekine M, Ukita M (2003) A model of fish preference and mortality under hypoxic water in the coastal environment. *Mar. Pollution Bull.* 47: 25-29
- Kramer DL (1988) The behavioral ecology of air breathing by aquatic animals. *Can. J. Zool.* 66: 89-94
- Kramer DL, Graham JB (1976) Synchronous air breathing, a social component of respiration in fishes. *Copeia* 1976: 689-697
- Kramer DL, Lindsey CC, Moodie GEE, Stevens ED (1978) The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. *Can. J. Zool.* 56: 717-729
- Lomholt JP, Johansen K (1979) Hypoxia acclimation in carp: how it affects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. *Physiol. Zool.* 52: 38-49
- MacCormack TJ, McKinley RS, Roubach R, Almeida-Val VMF, Val AL, Driedzic WR (2003) Changes in ventilation, metabolism, and behaviour, but not bradycardia, contribute to hypoxia survival in two species of Amazonian armoured catfish. *Can. J. Zool.* 81: 272-280
- Mattias AT (1994) Estudo do comportamento de cascudo *Hypostomus regani* (Ihering, 1905), frente à hipóxia ambiental. Aspectos da fisiologia respiratória. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Paulo
- Mattias AT, Moron SE, Fernandes MN (1996) Aquatic respiration during hypoxia of the facultative air-breathing *Hoplerethrinus unitaeniatus*. A comparison with the water-breathing *Hoplias malabaricus*. In: *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*. Inpa, Manaus
- Mattias AT, Rantin FT, Fernandes MN (1998) Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). *Comp. Biochem. Physiol. A* 120: 311-315
- Milsson WK (1991) Intermittent breathing in vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 87-105
- Muusze B, Marcon J, van den Thillart G, Almeida-Val V (1998) Hypoxia tolerance of Amazon fish: Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120:151-156
- Nelson JA, Rios FS, Sanches JR, Fernandes MN, Rantin FT (2006) Environmental influences on the respiratory physiology and gut chemistry of a facultatively air-breathing, tropical herbivorous fish *Hypostomus regani* (Ihering, 1905). In: *Fish respiration and environment*. Science Publisher, Enfield, Jersey, Plymouth

- Perry SF, Sander M (2004) Reconstructing the evolution of the respiratory apparatus in tetrapods. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 144:125-139
- Piiper J (1982) Respiratory gas exchange at lungs, gills and tissues: mechanisms and adjustments. *J. Exp. Biol.* 100: 5-22
- Power ME (1987) Predator avoidance by grazing fishes in temperate and tropical streams: importance of stream depth and prey size. *In: Predation: direct and indirect impacts on aquatic communities.* University Press of New England, London
- Randall DJ, Burggren WW, Farrel AP, Haswell MS (1981) The evolution of air-breathing in vertebrates. Cambridge University Press, Cambridge
- Rantin FT, Johansen K (1984) Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to hypoxia. *Env. Biol. Fish.* 11: 221-228
- Rantin FT, Kalinin AL, Glass ML, Fernandes MN (1992) Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). *J. Fish Biol.* 41: 805-812
- Reid SG, Sundin L, Florindo LH, Rantin FT, Milsson WR (2003) Effects of afferent input on the breathing pattern continuum in the tambaqui, *Colossoma macropomum*. *Respiration Physiology and Neurobiology* 36: 39-53
- Reid SG, Perry SF, Gilmour KM, Milsson WK, Rantin FT (2005) Reciprocal modulation of O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> cardiorespiratory chemoreflexes in the tambaqui. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 146: 175-194
- Roberts JL, Grahm JB (1985) Adjustments of cardiac rate to changes in respiratory gases by a bimodal breather, the Panamanian swamp eel, *Synbranchus marmoratus*. *Amer. Zool.* 25: 266
- Sakuragui MM, Sanches JR, Fernandes MN (2003) Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *J. Comp. Physiol. B* 173: 309-317
- Salvo Souza RH (1999) Respostas cardio-respiratórias e metabólicas de dourado, *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1849) (Teleostei, Characidae) submetido à hipóxia ambiental. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Paulo
- Satchell GH (1991) Physiology and form of fish circulation. Cambridge University Press, Cambridge

- Smatresk NJ, Cameron JN (1982) Respiration and acid-base physiology of the spotted gar, a bimodal breather. II. Responses to temperature change and hypercapnia. *J. Exp. Biol.* 96: 281-293
- Takasusuki J (1994) Respostas respiratórias de cascudo preto *Rhinelepis strigosa* (Agassiz, 1829) (Teleostei, Loricariidae), hipóxia ambiental. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), São Paulo
- Takasusuki J, Fernandes MN, Severi W (1998) The occurrence of aerial respiration in *Rhinelepis strigosa* during progressive hypoxia. *J. Fish Biol.* 52: 369-379
- Taylor EW, Jordan D, Coote JH (1999) Central control of the cardiovascular and respiratory systems and their interactions in vertebrates. *Physiol. Rev.* 79: 855-916
- Wu RSS (2002) Hypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Mar. Pollution Bull.* 45: 35-45
- Zar JH (1999) Biostatistical analysis. Prentice Hall. Upper Saddle River, New Jersey

### CAPÍTULO 3

#### ADAPTAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO ESTÔMAGO DO CASCUDO *PTERYGOPLICHTHYS ANISITSI* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE) PARA A RESPIRAÇÃO AÉREA

**Palavras-chave:** *Pterygoplichthys anisitsi*, respiração bimodal, estômago, superfície respiratória e capacidade de difusão morfométrica

## 1. Introdução

Muitas espécies de peixes podem respirar ar atmosférico utilizando ampla variedade de adaptações estruturais para respiração aérea a partir de diversos órgãos ou tecidos (Graham, 1997). No decorrer das eras geológicas ocorreram grandes oscilações na concentração de oxigênio como resultado de altas temperaturas e da decomposição de material orgânico em rios e lagos rasos, e várzeas. Tais oscilações têm sido consideradas como o estímulo para a transição da respiração aquática para a aérea em peixes, o que ocorreu muitas vezes ao longo da evolução (Johansen, 1970). Os peixes ósseos com respiração bimodal estão distribuídos em 49 famílias e utilizam diferentes estruturas para trocas gasosas, como pulmões, boca, faringe, divertículo branquial, ducto pneumático, estômago, intestino e pele (Graham, 1997). O cascudo, *Pterygoplichthys anisitsi* Eigenmann e Kennedy, 1903, é um teleósteo de água doce da família Loricariidae que utiliza o estômago como órgão de respiração aérea (Oliveira *et al.*, 2001). A espécie é pertencente ao grupo dos Siluriformes; grupo esse apontado em revisão efetuada por Hochachka e Lutz (2001), como contendo espécies altamente tolerantes à hipóxia.

Um órgão com função respiratória aérea deve possuir epitélio altamente vascularizado, e ser capaz de realizar trocas gasosas entre o meio externo e o interno (Huebner e Chee, 1978; Daniels *et al.*, 2004). O conhecimento da estrutura de órgãos de respiração aérea em peixes tem progredido a partir de estudos morfológicos e morfométricos e, as microscopias eletrônicas de varredura e a de transmissão têm revelado particularidades estruturais e ultraestruturais de superfícies respiratórias fundamentais à respiração aérea (Maina, 1987; Hughes *et al.*, 1992; Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 1998; Daniels *et al.*, 2004). No caso de uma superfície respiratória desenvolvida no trato digestório se faz necessária uma modificação regional não só quanto ao aumento da vascularização, mas também quanto a especializações na conformação do epitélio do órgão acessório (Huebner e Chee, 1978). Modificações do trato digestório para respiração aérea em peixes têm sido descritas na família Loricariidae (Silva *et al.*, 1997; Satora, 1998; Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 1998, Satora e Winnicki, 2000; Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2003). Entretanto, esses estudos não têm fornecido dados quantitativos que possibilitem uma avaliação da capacidade morfométrica de difusão dos

gases nessas estruturas. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a superfície respiratória, espessura da barreira ar-sangue e capacidade de difusão morfométrica dos gases respiratórios associado às modificações do estômago de *P. anisitsi* de forma a contribuir para a melhor compreensão da fisiologia respiratória dessa espécie.

## 2. Materiais e Métodos

### *Animais experimentais*

Espécimes adultos de cascudo *Pterygoplichthys anisitsi* [massa corporal ( $M_C$ )= 0,084 a 0,600 kg; comprimento total ( $C_T$ ): 24 a 39cm] foram obtidos no CAUNESP (Centro de Aqüicultura da UNESP, *Campus* de Jaboticabal, SP, Brasil). No laboratório, os peixes foram mantidos em tanque (1.000 L) com fluxo de água contínuo e aeração constante, a 23-25°C durante 3 semanas e alimentados com ração comercial e folhas de alface (*Lactuca sativa*).

### *Anestesia e fixação*

Os peixes foram gradativamente anestesiados, por imersão em solução de Benzocaína® (Synth) 0,1%, para incisão da cavidade abdominal e posterior remoção do estômago. Foi efetuada uma fixação prévia *in situ* para evitar alteração do tecido estomacal durante a remoção do mesmo. A fixação teve início com a introdução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4; 300 mOsm) no estômago, via cavidade bucal, logo após o sacrifício de cada animal, e o fechamento das transições esôfago-estômago e estômago-intestino garantiu a permanência do fixador dentro do órgão. Após a remoção do estômago, o mesmo permaneceu imerso no mesmo fixador para completar a fixação por 24 h.

### *Processamento histológico*

As amostras do estômago dos espécimens foram aleatoriamente retiradas seguindo os princípios da estereologia. Para tanto foram selecionadas aleatoriamente cinco regiões de amostragem ao longo de todo órgão, de onde foram retirados fragmentos com área superficial de 1 cm<sup>2</sup> e desidratadas em etanol. Posteriormente, as amostras foram embebidas

em Historesina (Leica, Heidelberg, Germany), efetuados cortes de 3  $\mu\text{m}$  de espessura e corados com azul de toluidina/fucsina para análise estrutural e morfométrica. Os cortes semi-finos foram submetidos à reação de ácido periódico de Schiff para a detecção de mucopolissacarídeos neutros (PAS) e à coloração com Alcian Blue pH 2,5 foi feita para detecção de mucopolissacarídeos ácidos.

No processamento para microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras pré-fixadas das regiões cárdica, fúndica e pilórica do estômago foram submetidas a tratamento para retirada do excesso de muco por meio de imersão em glicerol 16% por 24 h seguido de etanol 20% por mais 24 h, e lavagens em tampão fosfato 0,1M pH 7,4. Em seguida, as amostras foram desidratadas em gradiente crescente de solução de etanol, até etanol absoluto, secas com HMDS (hexametildisilazane, 98%), aderidas a suportes próprios com cola de prata condutora 200 (Degusa S.A.) e recobertas com ouro 99% e analisadas em um microscópio de varredura ZEISS-DSM 940A.

Para processamento para microscopia eletrônica de transmissão (MET), cinco fragmentos com 3  $\text{mm}^2$  do estômago dos cinco espécimes obtidas segundo os princípios da estereologia foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% com o mesmo tampão fosfato, desidratadas em série crescente de acetona e incluídas em Araldite 6005 Resin (Ladd, Burlington, Vermont, USA). Cortes semi-finos (0,5  $\mu\text{m}$ ) foram corados com azul de toluidina. Posteriormente foram feitos cortes ultra-finos (60-90 nm), corados com acetato de uracila e citrato de chumbo, e fotografados em um microscópio de transmissão JEOL JEM 100 CX TEM a 80 kV. Os negativos obtidos foram utilizados para as análises da estrutura estomacal e morfométrica da barreira de difusão ar-sangue.

#### *Determinação do volume e superfície do estômago*

As determinações do volume de referência do estômago, densidade de volume (razão volume/volume) dos tecidos que constituem o estômago, superfície respiratória e densidade de superfície (razão superfície/volume) desse órgão foram realizadas em microscópio de luz Olympus BX com câmara de vídeo e acoplada a um computador que possui um sistema de análise de imagens especial para estereologia (C.A.S.T. System, Olympus, Denmark).

O volume interno do estômago foi determinado após a remoção do ar e pela introdução de quantidades controladas de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,4; 300 mOsm). O volume de referência e a maior circunferência transversal e anterior-posterior foram determinados após a abertura do estômago. O volume de referência do tecido estomacal foi calculado em função da área (A) do estômago aberto e da espessura (E) do tecido estomacal ( $V_{Ref} = A.E$ ). A área foi determinada usando contagem de pontos de um sistema-teste isotrópico, sendo a área do ponto conhecida. A área total do estômago foi calculada com a equação,  $A = \sum P.d^2$ , onde  $\sum P$  é o número total de pontos sobre a superfície do estômago e  $d^2$  é a área associada a cada ponto. A espessura da parede do estômago foi determinada por meio de seções verticais VUR (seções verticais e aleatórias ao plano horizontal da parede do estômago) em microscopia de luz. O volume de referência total do estômago foi calculado somando-se o volume aéreo ao volume do tecido estomacal. A densidade de volume ( $V_v$ : proporção de volume da estrutura analisada em relação ao volume de referência do órgão) dos principais tecidos estomacais foi calculada utilizando-se contagem de pontos de um sistema-teste isotrópico, no qual a área do ponto era conhecida e a equação:  $V_v = P_E/P_T$ , onde  $P_E$  é o número de pontos sobre a estrutura analisada e  $P_T$  é o número de pontos sobre uma seção histológica em microscopia de luz a um aumento final de 3.800x (Fig. 1a).

A área de superfície por unidade de volume (densidade de superfície =  $S_v$ ) e a superfície total (S) do estômago foram calculadas pela contagem de intersecções com a superfície mucosa e serosa do estômago e pontos sobre o tecido estomacal utilizando um sistema-teste de arcos ciclóides seguindo Howard e Reed (1998):

$$S_v = 2. \sum I_i / (I/p. \sum P_i) \quad \text{e} \quad S = S_v. V$$

onde,  $P_i$  é o número de pontos sobre o tecido,  $I/p$  é o comprimento do arco ciclóide por ponto do sistema-teste e  $I_i$  é o número da contagem de intersecções com a superfície respiratória em microscopia de luz a um aumento final de 3.800x (Fig. 1b).

### *Determinação da barreira ar-sangue do estômago*

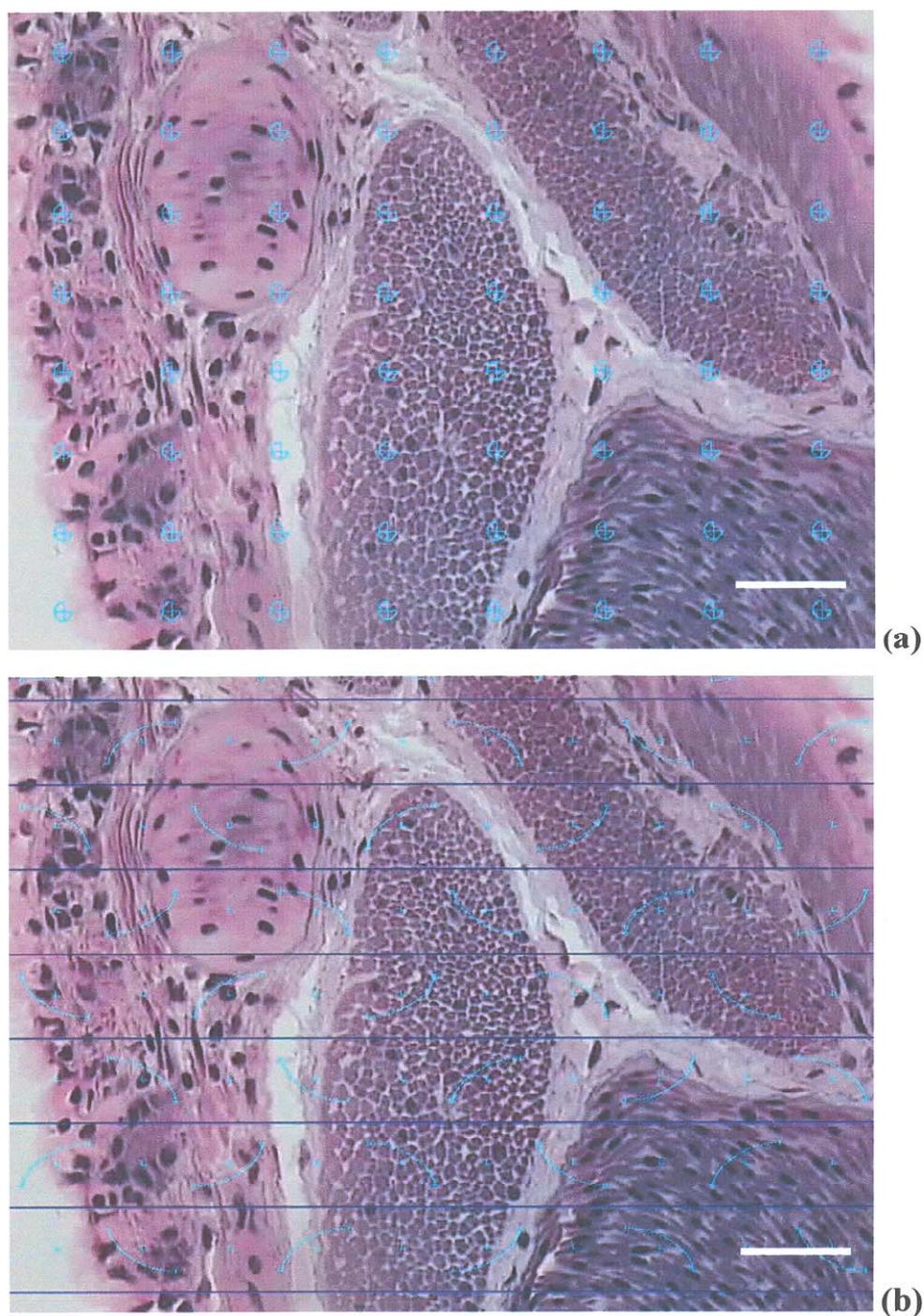
As determinações da espessura da barreira de difusão ar-sangue para cada indivíduo foram realizadas em negativos de micrografias eletrônicas de transmissão a magnificação final de 3.300x. Para a determinação da espessura da barreira ar-sangue do estômago foi utilizado um sistema constituído de um visor de negativos sobre o qual se colocava o negativo e a este era sobreposto um sistema-teste de arcos ciclóides. O comprimento de cada segmento de linha do sistema-teste conectando as superfícies do epitélio e da célula sangüínea foi medido com uma régua logarítmica, de acordo com o método de Perry (1983).

### *Fator anatômico de difusão (ADF) e da capacidade de difusão morfométrica*

O ADF, definido como a razão da área da superfície respiratória em relação a massa corporal dividido pela média harmônica da espessura da barreira de difusão ( $\tau$ ), foi calculado diretamente a partir dos dados estereológicos dessas variáveis. A estimativa da capacidade de difusão morfométrica foi calculada como o produto de ADF pelo coeficiente de difusão de Krogh (K). O valor de K foi corrigido para 25°C. No estômago, para o epitélio e o endotélio foi assumido o valor de K para “tecido de pulmão de rato” e para a membrana basal foi assumido o valor de K para “tecido conjuntivo de rã” (Bartels, 1971). Os valores de K assumidos são em decorrência de serem tecidos similares, já que não há valores de K para os tecidos analisados.

### *Análise estatística*

Os cálculos para determinar a precisão da estimativa de volume e superfície estomacal foram feitos para cada indivíduo de acordo com Gundersen e Jensen (1987) e Howard e Reed (1998). A variabilidade entre os espécimes foi representada pelos valores médios, acompanhados pelos respectivos erros padrões da média. Uma vez que o desvio-padrão da média harmônica não é definido, foi calculado o erro padrão das médias aritméticas da distância de difusão da barreira ar-sangue.



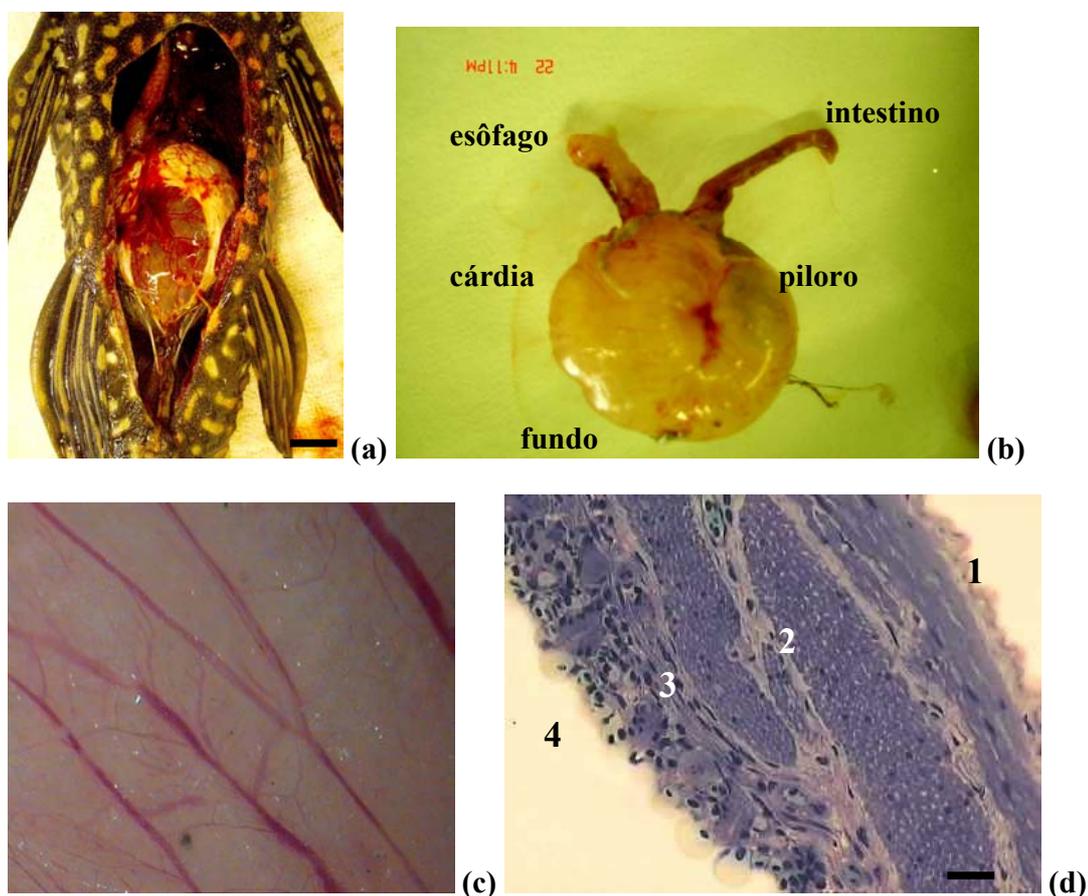
**Figura 1:** (a) Seção histológica (3  $\mu\text{m}$ ) do estômago de *P. anisitsi* sobre o qual foi colocado um sistema-teste de pontos para estimativa da densidade de volume dos principais tecidos (b) Seção histológica (3  $\mu\text{m}$ ) do estômago de *P. anisitsi* sobre o qual foi colocado um sistema-teste de arcos ciclóides e pontos para estimativa da densidade de superfície e a superfície total do epitélio respiratório. Coloração: Azul de Toluidina/Fucsina. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3. Resultados

#### *Aspectos estruturais*

*Pterygoplichthys anisitsi* tem um esôfago muscular e curto que se abre em um estômago grande em formato de U com parede fina e translúcida (Fig. 2a, 2b). O estômago, altamente vascularizado (Fig. 2b, 2c) e expandido com bolhas de ar, ocupa aproximadamente toda cavidade celomática e não foram encontradas partículas alimentares em seu interior em todos os espécimes analisados. Contínuo ao estômago há um longo, fino e transparente intestino localizado ventralmente ao estômago e disposto em formato espiralizado.

Histologicamente, o estômago consiste de quatro camadas: (1) serosa, a camada mais externa que é caracterizada por camada simples de células epiteliais pavimentosas sustentadas por tecido conjuntivo frouxo contendo vasos sanguíneos; (2) muscular lisa, formada por finos feixes de musculatura lisa circular e feixes descontínuos com orientação longitudinal e oblíqua entre quantidades pequenas de tecido conjuntivo; (3) submucosa, constituída por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos de diferentes diâmetros; e (4) mucosa, constituída por lâmina própria contendo vasos sanguíneos pequenos e uma camada simples de células epiteliais achatadas, a qual sua superfície apical está contactando o lúmen estomacal, apoiada na membrana basal que está em contato com numerosos capilares sanguíneos (Fig. 2d). As glândulas gástricas estão localizadas na camada mucosa (Fig. 2d).



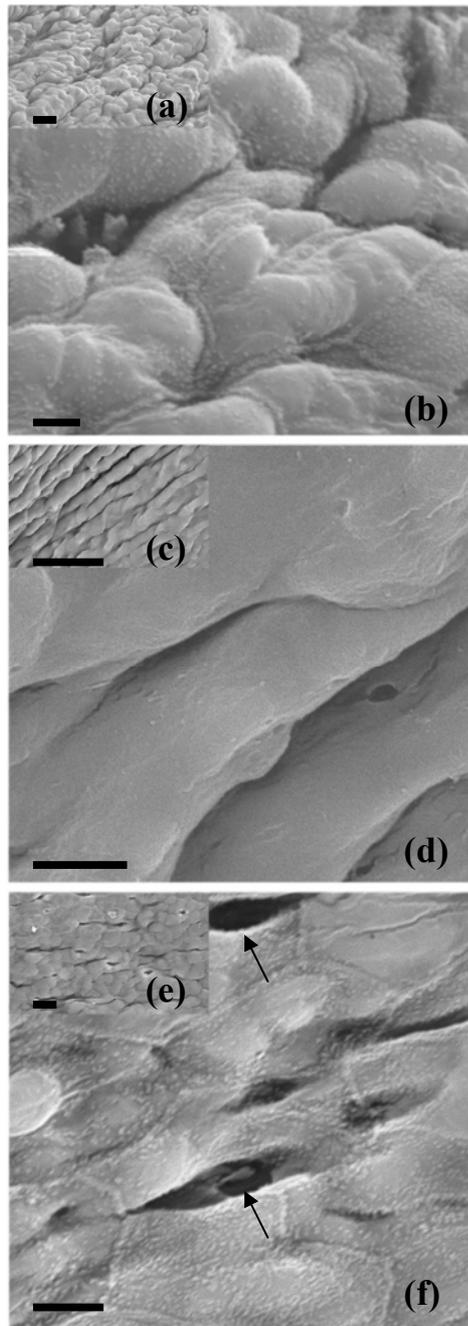
**Figura 2.** (a) Vista ventral de *P. anisitsi*, o estômago é localizado no interior da cavidade celomática, mostrando parede translúcida e vascularizado. Escala: 1 cm (b) Vista ventral do estômago de *P. anisitsi*, após ser retirado do interior da cavidade celomática, mostrando a porção final do esôfago e a inicial do intestino. (c) Vista da face interna do estômago de *P. anisitsi* observado sob estereoscópio. (d) Seção histológica (3  $\mu\text{m}$ ) do estômago mostrando as quatro camadas: (1) serosa com epitélio pavimentoso simples, (2) muscular lisa não organizada no interior de distintas camadas, (3) submucosa de tecido conjuntivo frouxo e (4) mucosa formada por epitélio pavimentoso simples e lâmina própria. Coloração: Azul de Toluidina. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

### *Aspectos Ultraestruturais*

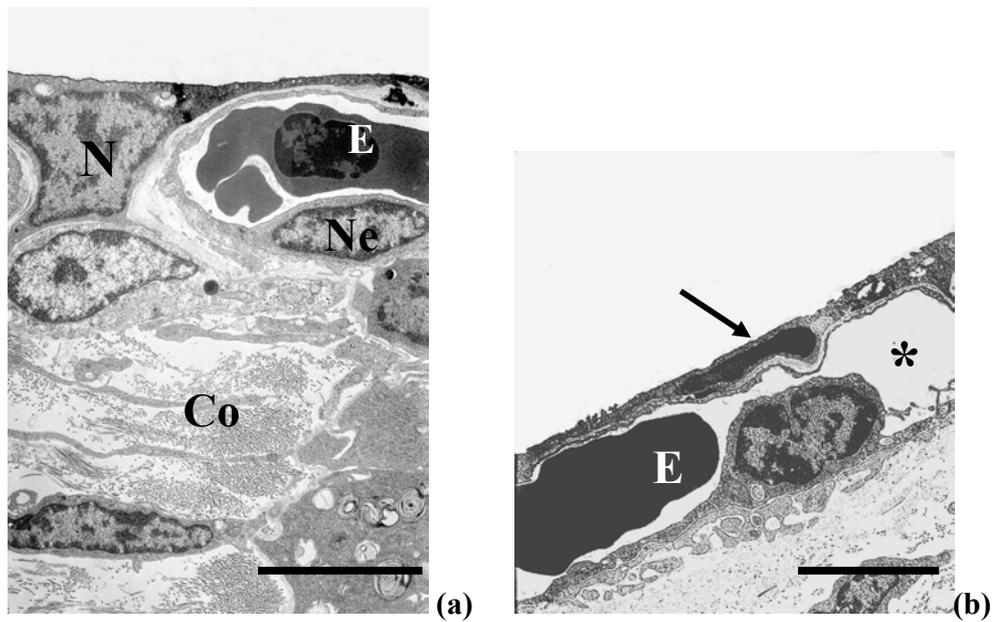
Análises de microscopia eletrônica de varredura da superfície mucosa de *P. anisitsi*, a baixa magnificação, mostra dobras irregulares na mucosa na região cárdica (Fig. 3a, 1.500x), dobras longitudinais na região fúndica (Fig. 3c, 1.000x) e quase ausência de dobras na região pilórica (Fig. 3e, 500x). A alta magnificação mostra que as células epiteliais pavimentosas são poligonais na forma e, a maioria delas das regiões cárdica e pilórica tem microvilos curtos distribuídos irregularmente pela superfície celular (Fig. 3b, 4.000x; 3f, 3.000x), mas algumas das células possuem superfície celular lisa e seus limites não são claramente identificados (Fig. 3d, 5.000x). Numerosas aberturas de glândulas gástricas são distribuídas entre as células em todas as regiões do estômago (Fig. 3b, 3d, 3f).

As células epiteliais da camada mucosa do estômago são achatadas com núcleos grandes, em geral, e localizados entre capilares adjacentes (Fig. 4a) ou, raramente, alongados se localizados sobre capilares que estão imediatamente abaixo da membrana basal (Fig. 4b). Essas células epiteliais possuem muitas mitocôndrias, complexos de Golgi bem desenvolvidos, retículo endoplasmático rugoso e ribossomos (Fig 5a e 5b). A maioria das células possui numerosos corpos lamelares em diferentes estágios de maturação (Fig. 5a e 5b). Em alguns corpos lamelares é observada uma região central amorfa elétron densa da qual emerge um sistema de membranas concêntricas (Fig. 5b).

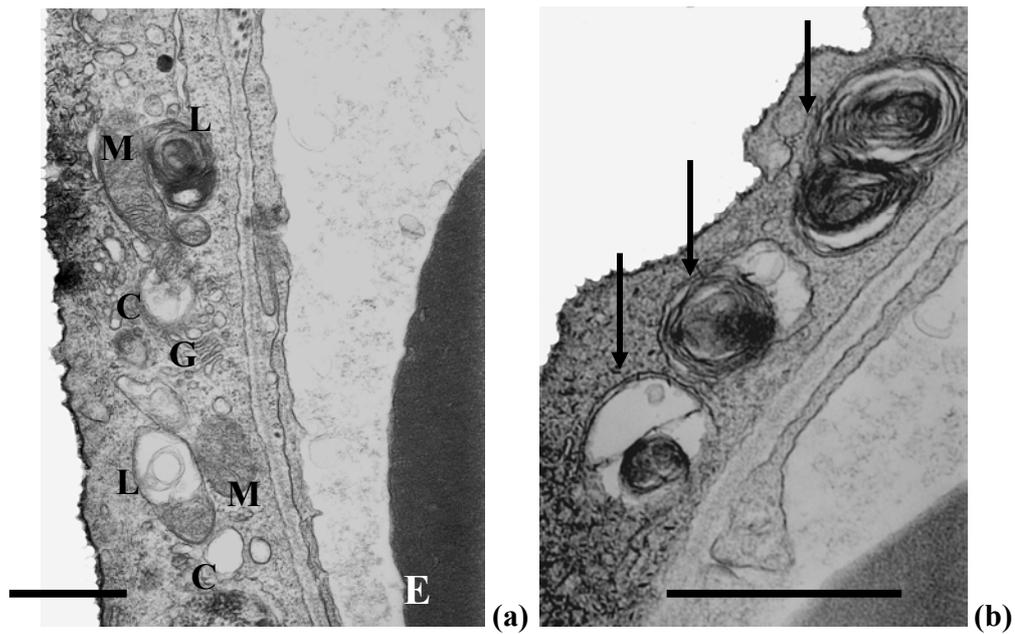
As células epiteliais são unidas entre si por complexo juncional curto caracterizado por zônula de oclusão, zônula de adesão com, em geral, apenas um desmosomo e intensa interdigitação entre as células (Fig. 6). A lâmina basal sobre a qual se apóia as células epiteliais está em contato direto com o endotélio dos capilares, exceto nas regiões onde são encontradas as glândulas gástricas. As células endoteliais possuem núcleo heterocromático localizados na região basal do capilar e podem ser alongadas ou projetar-se para o interior do capilar (Fig. 4b).



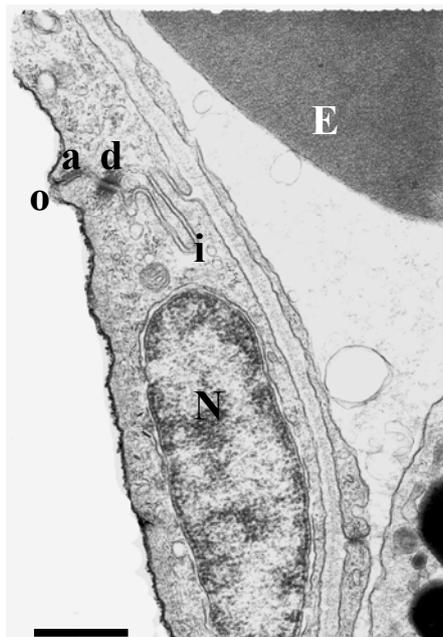
**Figura 3.** Microscopia eletrônica de varredura de regiões do estômago de *P. anisitsi*. A baixa magnificação, as regiões cárdica (**a**, 1.500x), escala 2 $\mu$ m; fúndica (**c**, 1.000x), escala 5  $\mu$ m; pilórica (**e**, 500x), escala 2  $\mu$ m. Em alta magnificação da camada mucosa do epitélio, as regiões cárdica (**b**, 4.000x), escala 0,5  $\mu$ m; fúndica (**d**, 5.000x), escala 4  $\mu$ m e pilórica (**f**, 3.000x), escala 5  $\mu$ m. Notar a superfície celular com microvilos curtos em (**b**) e (**f**), e uma superfície lisa em (**d**). As setas indicam as aberturas das glândulas gástricas.



**Figura 4.** (a) Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando núcleo de uma célula epitelial do estômago localizado entre capilares vizinhos (N), eritrócito (E) no interior de um capilar, núcleo da célula endotelial (Ne) e nas proximidades fibras colágenas (Co). Escala: 5µm. (b) fotomicrografia mostrando o núcleo de uma célula epitelial da mucosa estomacal (seta). Capilar sanguíneo (\*) e eritrócito (E). Escala: 5µm.



**Figura 5.** (a) Fotomicrografia eletrônica de transmissão da região apical de uma célula epitelial. São evidenciadas mitocôndrias (M), cisternas de Golgi dilatadas (C) e complexo de Golgi (G), e corpos lamelares (L). (b) fotomicrografia mostrando corpos lamelares em diferentes estágios de maturação situados em uma célula epitelial (setas). Eritrócito (E). Escala: 0,5  $\mu\text{m}$ .

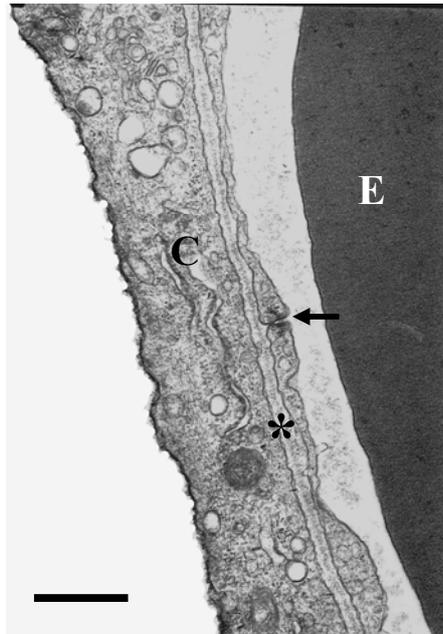


**Figura 6.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão mostrando junções intercelulares de células epiteliais. Zônula de oclusão (o), zônula de adesão (a), desmossomo (d) e interdigitações (i). Núcleo da célula epitelial (N) e eritrócito (E). Escala: 0,5  $\mu\text{m}$ .

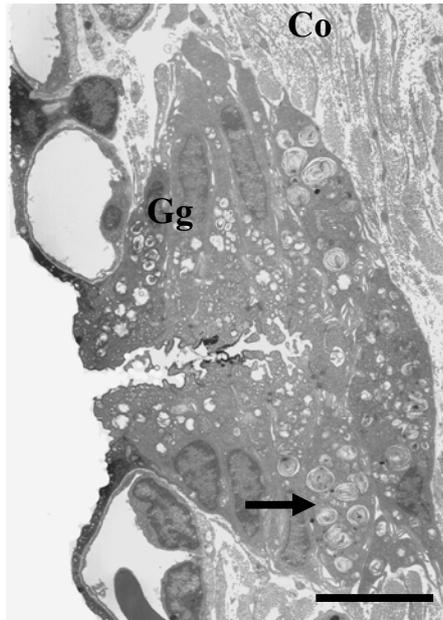
Células endoteliais adjacentes podem sobrepor-se mostrando pequenos dobramentos e frequentemente um desmossomo pode ser identificado nas junções celulares (Fig. 7). A barreira ar-sangue que separa o lúmen gástrico dos capilares sangüíneos é muito delgada e constituída por três camadas, expansão citoplasmática das células epiteliais pavimentosas, lâmina basal, e a fina camada de células endoteliais (Fig. 7).

Entre os capilares, leucócitos e outras células nas camadas mucosa e submucosa e outros tecidos que constituem a parede do estômago são preenchidos com grupos de fibras de colágeno em direções diferentes. (Fig 4a)

As glândulas gástricas são regularmente distribuídas ao longo da mucosa sendo mais frequentes nas regiões fúndica e pilórica e podem ter formato arrendodado ou piramidal. Nenhuma diferença morfológica foi identificada entre as glândulas gástricas das três regiões do estômago. Embora elas sejam contínuas com o epitélio, as glândulas na lâmina própria são circundadas por fibras colágenas. Tais glândulas se apresentam abaixo do epitélio e se abrem ao lúmen estomacal sendo constituídas de 8 a 12 células (Fig. 8). As células dessas glândulas possuem núcleo heterocromático basal, poucas organelas citoplasmáticas e numerosos corpos lamelares. A região apical dessas células contém numerosas vesículas. As células glandulares são aderidas entre si por desmossomos e interdigitações. A coloração com Alcian Blue e a reação do ácido periódico de Schiff (PAS) negativas indicaram que essas glândulas não sintetizam, respectivamente, mucopolissacarídeos ácidos e neutros.



**Figura 7.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão da barreira ar-sangue do estômago de *L. anisitsi* composta pela célula epitelial (C), membrana basal (asterisco) e membrana endotelial (seta) exibindo adesão celular por desmossomos entre células vizinhas. Eritrócito (E). Escala: 0,5  $\mu$ m.



**Figura 8.** Fotomicrografia eletrônica de transmissão de uma glândula gástrica (Gg) exibindo em seu interior grande quantidade de corpos lamelares (seta). Os tecidos das proximidades das glândulas são ricos em fibras colágenas (Co). Escala: 5  $\mu$ m.

### *Morfometria do estômago*

O volume total do estômago inflado (ar + tecido), volume de tecido estomacal e os volumes fracionais dos principais componentes do estômago de *P. anisitsi* estão apresentados na Tabela 1 e 2. De  $20,24 \pm 4,75 \text{ cm}^3$  que corresponde ao volume total do estômago (ar + tecido) somente  $0,42 \pm 0,07 \text{ cm}^3$  representa o tecido estomacal sendo a razão volume total do estômago/massa corpórea igual a  $85,21 \pm 14,09 \text{ cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$  (Tabela 1). O volume total do estômago inflado mostrou correlação com massa corpórea ( $p= 0,0014$ ), entretanto o volume de tecido não mostrou correlação com a massa corpórea ( $p= 0,09$ ).

A camada muscular ( $34,80 \pm 1,56\%$ ) corresponde a maior densidade de volume do estômago (Tabela 2) sendo que a mucosa e a submucosa, onde se localizam alta densidade de capilares e as glândulas estomacais, correspondem a 48,44%. A serosa corresponde a 16,75% do tecido estomacal (Tabela 1). Considerando apenas a mucosa, as glândulas gástricas, os capilares sanguíneos e o epitélio representam, respectivamente, 46%, 34% e 20% de seus volumes (Fig. 9).

A densidade média da superfície respiratória do estômago representa 68,60% da proporção da superfície respiratória do estômago. A relação superfície do estômago e a massa corpórea (i.e. superfície respiratória específica) é, em média,  $157,21 \pm 45,33 \text{ cm}^2 \cdot \text{kg}^{-1}$  (Tabela 3). A superfície respiratória não mostrou correlação com a massa corpórea dos espécimes ( $p= 0,25$ ).

O valor médio da espessura da barreira de difusão ar-sangue (média aritmética) foi determinado como  $1,24 \pm 0,17 \mu\text{m}$  e a resistência da barreira de difusão ar-sangue calculada pela média harmônica dos interceptos das distâncias de difusão variaram de 0,31 a 0,82  $\mu\text{m}$  (Tabela 4). O fator anatômico de difusão (ADF) médio para o estômago de *P. anisitsi* foi

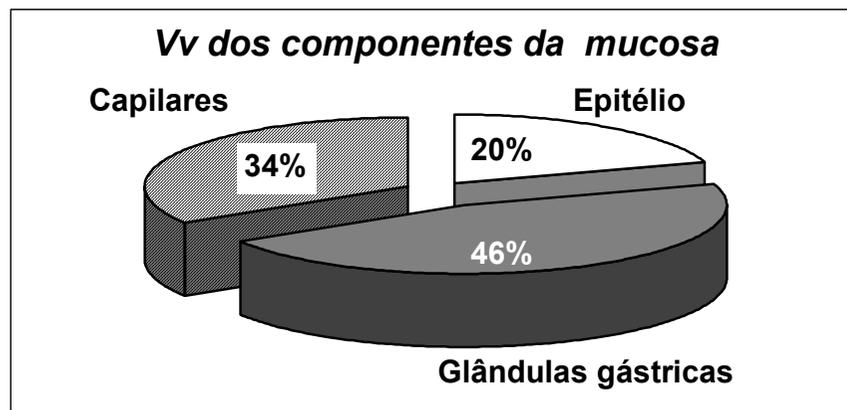
calculado em  $331,43 \pm 172,75 \text{ cm}^2 \cdot \mu\text{m}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  e a média específica da capacidade de difusão morfométrica ( $D_{O_2}$ ) foi calculado em  $0,0972 \pm 0,0469 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Os valores de ADF e da capacidade de difusão do oxigênio foram maiores para os menores indivíduos e menores para os maiores (Tabela 4).

**Tabela 1.** Volume de ar ( $V_{ar, estôm.}$ ), volume de tecido ( $V_{tec., estôm.}$ ), volume total do estômago ( $V_{tot., estôm.}$ ) e relação volume total do estômago/ massa corpórea ( $V_{tot., estôm.}/M_C$ ) do estômago de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

Animal N <sup>o</sup>	Massa corpórea ( $M_C$ ) (kg)	Comprimento total ( $C_T$ ) (cm)	$V_{ar, estôm.}$ ( $cm^3$ )	$V_{tec., estôm.}$ ( $cm^3$ )	$V_{tot., estôm.}$ ( $cm^3$ )	$V_{tot., estôm.}/M_C$ ( $cm^3.kg^{-1}$ )
1	0,084	23	11,30	0,22	11,52	137,13
2	0,151	28	10,60	0,49	11,09	73,47
3	0,178	29	16,10	0,25	16,35	91,86
4	0,415	37	26,10	0,55	26,65	64,22
5	0,600	42	35,00	0,61	35,61	59,35
Média	0,285	31,80	19,32	0,42	20,24	85,21
Erro Padrão	0,096	3,39	4,69	0,07	4,75	14,09

**Tabela 2.** Volumes fracionais (V<sub>v</sub>) dos principais componentes do estômago de *P. anisitsi*. Média ± Erro Padrão da Média.

Animal N <sup>o</sup>	Massa corpórea (M <sub>c</sub> ) (kg)	V <sub>v</sub> (%)			
		Mucosa (%)	Submucosa (%)	Muscular (%)	Serosa (%)
1	0,084	23,51	17,96	32,69	25,83
2	0,151	20,32	29,76	40,06	9,85
3	0,178	19,00	34,64	35,95	10,41
4	0,415	16,69	35,61	34,43	13,27
5	0,600	16,64	28,07	30,88	24,42
Média	0,285	19,23	29,21	34,80	16,75
Erro Padrão	0,096	1,28	3,15	1,56	3,47



**Figura 9.** Porcentagem dos volumes dos componentes da mucosa do estômago de *P. anisitsi*.

**Tabela 3.** Superfície do estômago ( $S_E$ ) e porcentagem da área de superfície que é respiratória ( $\%S_{RE}$ ) do estômago de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

Animal N <sup>o</sup>	Superfície Estomacal ( $S_E$ )		$\%S_R$  (%)
	Superfície Respiratória  (cm <sup>2</sup> )	Superfície Respiratória/ $M_C$  (cm <sup>2</sup> .kg <sup>-1</sup> )	
1	23,64	281,40	45
2	38,07	252,15	74
3	19,00	106,72	69
4	32,23	77,68	76
5	40,85	68,08	79
Média	30,76	157,21	68,60
Erro Padrão	4,15	45,33	6,11

**Tabela 4.** Espessura da barreira de difusão ar-sangue [( $\tau_{arith}$ ) média aritmética, ( $\tau_h$ ) média harmônica], (ADF) fator anatômico de difusão ( $= S_{AR}/\tau_h$ ) e capacidade morfométrica de difusão para oxigênio ( $D_{O_2}$ ) do estômago de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

Animal N <sup>o</sup>	$\tau_{arith, estôm.}$ ( $\mu m$ )	$\tau_h, estôm.$ ( $\mu m$ )	ADF $estôm.$ ( $cm^2 \mu m^{-1} kg^{-1}$ )	$D_{O_2} estôm.$ ( $cm^3 min^{-1} mmHg^{-1} kg^{-1}$ )
1	0,72	0,31	593,33	0,2466
2	1,28	0,51	531,54	0,1335
3	1,67	0,82	225,04	0,0354
4	1,02	0,46	163,73	0,0451
5	1,51	0,71	143,53	0,0252
Média	1,24	--	331,43	0,0972
Erro Padrão	0,17	--	172,75	0,0469

#### 4. Discussão

Os peixes são dependentes de metabolismo aeróbico, exceção feita a curtos períodos de anaerobiose quando expostos a condição de baixa disponibilidade de oxigênio (Fernandes *et al.*, 1999). Sob tais condições, apenas a respiração branquial não é suficiente para a manutenção da taxa metabólica e algumas espécies garantem a sobrevivência quando em condições de oxigênio desfavoráveis devido à capacidade para respirar ar atmosférico a partir de uma diversidade de órgãos adaptados à absorção de oxigênio (Johansen, 1970). Na família Loricariidae, muitas espécies são capazes de extrair oxigênio ao longo do trato digestório (Armbruster, 1998; Delariva e Agostinho, 2001, Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2002, 2003).

O grau de diversidade do trato digestório de peixes é muito grande. Diferentes espécies com o mesmo tipo de dieta podem diferir na estrutura do sistema alimentar, mas as adaptações funcionais relacionadas à natureza do alimento e hábito alimentar são similares, embora exista variação do grau de relação entre trato digestório e alimento (Kapoor *et al.*, 1975).

Em peixes herbívoros pode faltar o estômago e o esôfago é, em geral, curto e com camada muscular mais espessa do que outras regiões do trato digestório (Logothetis *et al.*, 2001). Segundo esses autores a ausência do estômago e o rápido tempo de passagem do alimento para o intestino são decorrentes do baixo conteúdo protéico do hábito herbívoro. Nos loricariídeos, cujas espécies são herbívoras e/ou detritívoras, a presença de intestino longo caracteriza a maioria das espécies, e é maior em espécies com estômagos pouco desenvolvidos (Delariva e Agostinho, 2001). Em *Pterygoplichthys anisitsi*, espécie de hábito herbívoro e detritívoro, a um esôfago curto e muscular seguem-se um estômago grande, pouco diferenciado e altamente vascularizado, geralmente vazio de alimento, mas distendido por ar engolfado pelo animal, e um intestino muito longo. Assim, para essa espécie de cascudo não há uma relação entre sua dieta alimentar e anatomia do estômago.

O estômago típico de peixes teleosteos, assim como para os vertebrados em geral, é o sítio de digestão alimentar e sua parede espessa é composta pelas seguintes camadas: serosa, espessa camada muscular de células lisas, submucosa de tecido conjuntivo, e mucosa com vasos sanguíneos presentes na lâmina própria da camada mucosa sob o

epitélio (Kapoor *et al.*, 1975; Sis *et al.*, 1979; Caceci *et al.*, 1997; Albrecht *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2003). Dentre as espécies da família Loricariidae que usam o estômago como um órgão de respiração aérea acessória, a adaptação desse órgão para as trocas de gases inclui uma capilarização extensa imediatamente abaixo do epitélio da mucosa estomacal além dos vasos sanguíneos distribuídos na lâmina própria, o que favorece a absorção de oxigênio como descrito em *Ancistrus multisppinis* (Satora, 1998), *P. anisitsi* (Oliveira *et al.*, 2001), *Hypostomus plecostomus* (Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2003) e no presente estudo. Diversidade quanto à adaptação desta estrutura também é encontrada entre os loricariídeos como, por exemplo, o estômago de *Loricariichthys platymetopon* que possui a forma de dois sacos livres alongados como estrutura respiratória, em que os capilares penetram a mucosa e formam uma rede intraepitelial ocorrendo a fusão entre a membrana basal do endotélio com a do epitélio (Silva *et al.*, 1997). O trajeto esôfago-intestino, passando pelo estômago nos loricariídeos, apresenta diferenças com relação à anatomia e estrutura de seus componentes, com isso mostrando diferentes adaptações para a respiração aérea (Armbruster, 1998). Por exemplo, *A. multisppinis* possui estômago com três regiões gástricas distintas, cardia, corpo e piloro e, não apresenta camada muscular (Satora, 1998), enquanto *P. anisitsi*, como já verificado por Oliveira *et al.* (2001), possui estômago pouco diferenciado em regiões e apresenta camada muscular descontínua. Outro componente estrutural é o colágeno, que constitui um tipo de proteínas selecionado para exercer diferentes funções, principalmente estruturais, como a sustentação de órgãos expansíveis. Durante o processo de evolução, o colágeno modificou-se e adquiriu graus variáveis de rigidez, elasticidade e força de tensão (Junqueira, 2004). No baiacu *Diodon holocanthus*, as fibras colágenas na derme são fundamentais para o inflamento e suporte dos espinhos eréteis do corpo que tem função defensiva (Brainerd, 1994). As numerosas fibras colágenas no estômago de *P. anisitsi*, também verificadas para a espécie por Oliveira *et al.* (2001), fornecem sustentação da estrutura das paredes do órgão frente à distensão provocada pelo engolfamento de ar, como é nos sacos respiratórios de *P. platymetopon* (Silva *et al.*, 1997), no estômago de *H. plecostomus* (Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2003) e nos capilares respiratórios do réptil *Rhacodactylus leachianus* (Perry *et al.*, 1989). A camada muscular dos estômagos adaptados à troca de gases é relativamente fina quando comparada à lâmina própria e em *P. anisitsi*, ela é arranjada em feixes descontínuos de

musculatura lisa envolvidos por tecido conjuntivo, semelhante ao estômago de *Hypostomus plecostomus* (Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2003).

De forma geral, a principal diferença entre o estômago típico de teleósteos e aqueles adaptados para a troca de gases está na camada mucosa. A mucosa dos estômagos típicos é composta por altas dobras e coberta por epitélio colunar simples (Morrison e Wright, 1999; Cataldi *et al.*, 2002). Enquanto que nos estômagos com função respiratória, como em *P. anisitsi*, a mucosa é caracterizada por um epitélio pavimentoso simples.

O citoplasma apical das células epiteliais em estômagos digestivos de teleósteos é preenchido por numerosas vesículas contendo mucopolissacarídeos ácidos (Caceci *et al.*, 1997; Albrecht *et al.*, 2001; Diaz *et al.*, 2003). O muco é secretado no interior do lúmen estomacal e forma uma camada que protege o epitélio contra o atrito mecânico dos alimentos, agindo como um lubrificante para o conteúdo estomacal, e contra atividade enzimática (Kapoor *et al.*, 1975). No estômago de *P. anisitsi*, a região apical das células epiteliais, bem como suas superfícies, não mostra reações positivas ao Alcian Blue e PAS, sugerindo que o estômago não sintetiza, respectivamente, mucopolissacarídeos ácidos e neutros, tal como já descrito para os sacos respiratórios de *Loricariichthys platymetopon* (Silva *et al.*, 1997) e para o estômago respiratório de *H. plecostomus* (Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2003).

Em peixes, as glândulas gástricas são tubulares e estão no tecido conjuntivo, consistindo de células piramidais e trapezóides com núcleo localizado basalmente (Coetzee *et al.*, 1991). Em estômagos respiratórios, glândulas exócrinas são um componente da camada epitelial mucosa e apresentam-se na forma de rasas depressões, como nos sacos respiratórios de *L. platymetopon* (Silva *et al.*, 1997), e região cárdica do estômago de *A. multispinnis* (Satora, 1998). No interior dessas glândulas (*L. platymetopon*) ou no citoplasma das células epiteliais (*A. multispinnis*) estão localizados corpos lamelares. Em *P. anisitsi*, corpos lamelares são observados tanto no interior das glândulas gástricas quanto no citoplasma das células epiteliais, e os seus conteúdos parecem ser liberados no lúmen estomacal por exocitose. Corpos lamelares são característicos do epitélio do pulmão de vertebrados (dipnóicos, anfíbios, répteis e mamíferos) e são os sítios de acúmulo de surfactante, que reduz a tensão superficial na superfície mucosa dos pulmões e bexigas natatórias (Daniels *et al.*, 2004). Os surfactantes, além de facilitarem a absorção de

oxigênio, também estão envolvidos nos mecanismos de defesa e na remoção de substâncias estranhas que alcançam as vias respiratórias atuando como um anti-adesivo (Orgeig e Daniels, 2001). Além disso, o surfactante pode também evitar dessecação e danos oxidativos no epitélio (Daniels e Orgeig, 2001). A função do surfactante no estômago de *P. anisitsi* parece estar relacionada ao dessecação visto que quando em contato com o ar atmosférico em situações de engolfamento de ar ou de secas de corpos d'água em que o peixe está fora d'água é imprescindível a manutenção da superfície respiratória úmida. Visto que corpos lamelares são comuns nas glândulas gástricas do estômago de *P. anisitsi* e pulmões de vertebrados é possível estabelecer uma analogia funcional entre essas glândulas e os pneumócitos de mamíferos.

Ao mesmo tempo em que o surfactante em *P. anisitsi* evita dessecação da superfície respiratória estomacal, a presença de microvilos, aparelhos de Golgi, mitocôndrias e complexos juncionais também são fundamentais para garantir a funcionalidade do epitélio dessa superfície respiratória pela expansão da área superficial, manutenção do epitélio de transporte e coesão celular, o que também é registrado para as células ciliadas do epitélio respiratório de vertebrados (Perry *et al.*, 1989).

Em *P. anisitsi*, a presença de microvilos pode ter também funções sensoriais e quimiorreceptoras. No intestino posterior do peixe *Corydoras aeneus*, sua fina parede é adaptada para respiração aérea. Nessa região, a mucosa é delineada com epitélio respiratório e células quimiosensórias solitárias que possuem longos e finos microvilos presentes (Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2002). Segundo Sbarbati e Osculati (2005), a presença de microvilos em superfícies digestória e respiratória deve ser considerada uma especialização da membrana apical e participar de um sistema de quimiorrecepção difuso, que recobre grandes áreas possuindo analogias com os sistemas quimio-sensórios descritos em vertebrados aquáticos.

A arquitetura da barreira de difusão ar-sangue do epitélio respiratório do estômago de *P. anisitsi* é a mesma para o epitélio respiratório dos vertebrados na obtenção de oxigênio molecular. O modelo da tripla membrana (epitélio, membrana basal e endotélio) da barreira de difusão para os gases respiratórios é característico da barreira água-sangue das brânquias de peixes e também da barreira ar-sangue dos pulmões de vertebrados de respiração aérea,

que primeiro surgiu nos peixes pulmonados a cerca de 400 milhões de anos (Maina e West, 2005).

Os volumes dos capilares e vasos das camadas mucosa e submucosa do estômago de *P. anisitsi*, a presença de glândulas gástricas com corpos lamelares e a barreira ar-sangue muito delgada caracterizaram o órgão como uma superfície respiratória apta para absorção de oxigênio, cuja superfície potencialmente respiratória corresponde a 68,46% do total da superfície do estômago. Em outros vertebrados, como o dipnóico *Lepidosiren paradoxa* (Moraes *et al.*, 2005), alguns répteis, aves e mamíferos (Perry, 1989) que dependem da estrutura pulmonar para a obtenção do oxigênio necessário ao metabolismo, a superfície potencialmente respiratória corresponde a valores acima de 70% de toda estrutura pulmonar. A espessura da barreira ar-sangue expressa pelas médias aritmética e harmônica do estômago de *P. anisitsi* são similares às obtidas para pulmões de outros grupos de vertebrados (Maina e West, 2005). A média aritmética da barreira ar-sangue do estômago de *H. plecostomus* foi calculada em  $0,86 \pm 0,41 \mu\text{m}$  (Podkowa e Goniakowska-Witalinska, 2003). Esse valor pode ser considerado muito baixo e provavelmente deve-se à metodologia utilizada nas determinações efetuadas considerando apenas as distâncias mais curtas da barreira de difusão. No presente estudo e naqueles efetuados nos demais vertebrados citados (Perry, 1989), a estereologia foi a metodologia utilizada, metodologia esta sem tendências e amplamente aceita pelos pesquisadores (Runciman *et al.*, 1999; Barbier e Bachofen, 2000; Burri *et al.*, 2003).

Do ponto de vista evolutivo, com relação aos valores similares entre espécies de diferentes grupos de vertebrados (Maina e West, 2005) e os valores obtidos neste estudo para *P. anisitsi*, é importante considerar o fato da conservação da barreira água/ar-sangue ao longo do processo evolutivo (Maina e West, 2005). Dessa forma, a ocorrência conjunta tanto espacial (presente nos diversos grupos animais) quanto temporal (ao longo do tempo evolutivo), tem mostrado que o modelo da barreira de difusão de gases tem sido preservado nas suas propriedades estruturais, espessura extremamente fina, para permitir eficiente processo de difusão durante as trocas gasosas. Assim, os valores registrados para as barreiras não parecem representar grandes discrepâncias entre si.

Em pulmões, a capacidade de difusão morfométrica estima a máxima condutância possível sob condições ideais de ventilação e perfusão em toda a barreira embora tais

condições sejam raramente alcançadas mesmo durante exercícios (Weibel, 1999). A estimativa fisiológica da capacidade de difusão é sempre menor do que a estimativa morfométrica (Perry, 1989). O fato de a barreira ser extremamente delgada é essencial para uma troca gasosa eficiente por difusão passiva, enquanto a força de coesão da barreira é necessária para manter sua integridade estrutural (Maina e West, 2005); um aumento na espessura da barreira conseqüentemente levaria a uma diminuição da capacidade de difusão o que poderia causar um processo de hipoxemia (Bajanowski e Brinkmann, 2000). Mesmo em espécies filogeneticamente distantes, a comparação entre a capacidade de difusão morfométrica de gases do estômago de *P. anisitsi* ( $0,0972 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) e do pulmão de *P. paradoxa* ( $0,110 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mmHg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) pode refletir uma semelhança entre as características estruturais e funcionais dos tecidos respiratórios e também o padrão de atividade das espécies, já que se tratam de peixes com baixa atividade natatória.

A descrição da estrutura de um órgão é provavelmente um pré-requisito para o desenvolvimento do entendimento da função e o estudo da morfologia funcional é uma contribuição essencial para estudos fisiológicos (Gilmour, 1998). Ao mesmo tempo, o estudo morfométrico da barreira água/ar-sangue é de igual relevância para análise fisiológica ao medir o grau de resistência que a barreira pode oferecer aos gases respiratórios (capacidade de difusão) e estimar a quantidade de atividade metabólica a ser esperada neste local crítico (Weibel e Knight, 1964). O fato de *P. anisitsi* ser um peixe adaptado à respiração acessória aérea utilizando-se de uma superfície estomacal com propriedades morfológicas e morfométricas necessárias para obtenção suficiente de oxigênio o capacita a viver em ambientes pobres em oxigênio quando comparado a peixes de exclusiva respiração aquática.

## 5. Referências

- Albrecht MP, Ferreira MFN, Caramaschi EP (2001) Anatomical features and histology of the digestive tract of two related neotropical omnivorous fishes (Characiformes; Anostomidae). J. Fish Biol. 58: 419-430
- Armbruster JW (1998) Modifications of the digestive tract for holding air in loricariid and scoloplacid catfishes. Copeia 3: 663-675

- Bajanowski T, Brinkmann B (2000) Thickness of the air-blood tissue barrier in infants. *Int. J. Legal Med.* 113: 332-337
- Barbier A, Bachofen H (2000) The lung of the marmoset (*Callithrix jacchus*): ultrastructure and morphometric data. *Resp. Physiol.* 120: 167-177
- Bartels H (1971) Diffusion coefficients and Krogh's diffusion constants. *In: Altman PL, Dittmer DS (eds) Respiration and Circulation. Biological Handbooks, Federation of American Societies for Experimental Biology, Bethesda, pp 21-22*
- Brainerd EL (1994) Pufferfish inflation: functional morphology of postcranial structures in *Diodon holocanthus* (Tetraodontiformes). *J. Morphol.* 220: 243-261
- Burri PH, Haeni B, Tschanz AS, Makanya AN (2003) Morphometry and allometry of the postnatal marsupial lung development: an ultrastructural study. *Resp. Physiol. Neurobiol.* 138: 309-324
- Caceci T, El-Haback HA, Smith AS, Smith BJ (1997) The stomach of *Oreochromis niloticus* has three regions. *J. Fish Biol.* 50: 939-952
- Cataldi E, Albano C, Boglione C, Dini L, Monaco G, Bronzi P, Cataudella S (2002). *Acipenser naccarii*: fine structure of the alimentary canal with references to its ontogenesis. *J. Appl. Ichthyol.* 18: 329-337
- Coetzee HL, Nel MN, Swanepoel JH, van Aswegen G (1991) Light, electron microscopical, and immunocytochemical investigation of the stomach wall of the tigerfish *Hydrocynus forskahlii*. *J. Morphol.* 208: 311-321
- Daniels CB, Orgeig, S (2001) The comparative biology of pulmonary surfactant: past, present and future. *Comp. Biochem. Physiol. A* 129: 9-36
- Daniels CB, Orgeig S, Sullivan LC, Ling N, Bennett MB, Schürch S, Val AL, Brauner CJ (2004) The origin and evolution of the surfactant system in fish: insights into the evolution of lungs and swim bladders. *Physiol. Biochem. Zool.* 77: 732-749
- Delariva RL, Agostinho AA (2001) Relationship between morphology and diets of six neotropical loriciariids. *J. Fish Biol.* 58: 832-847
- Diaz AO, Garcia AM, Devincence CV, Goldemberg AL (2003) Morphological and histochemical characterization of the mucosa of the digestive tract in *Engraulis anchoita* (Hubbs and Marini, 1935). *Anat. Histol. Embryol.* 32: 341-346
- Fernandes MN, Sanches JR, Matsuzaki M, Panepucci L, Rantin FT (1999) Aquatic respiration in facultative air-breathing fish: effects of temperature and hypoxia. *In: Val AL, Almeida-Val VM (eds) Biology of tropical fishes. Inpa, Manaus, pp 341-352*

- Gilmour KM (1998) Morphology meets physiology. *Environ. Biol. Fish.* 51: 231-234
- Graham JB (1997) Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation. Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto
- Gundersen HJG, Jensen EB (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J. Microscopy* 147: 229-263
- Hochachka PW, Lutz PL (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 130: 435-459
- Howard CV, Reed MG (1998) Unbiased stereology, Three-dimensional measurement in microscopy, Bios Scientific Publishers, Oxford
- Huebner E, Chee G (1978) Histological and ultrastructural specialization of the digestive tract of the intestinal air breather *Hoplosternum thoracatum* (Teleost). *J. Morphol.* 157: 301-328
- Hughes GM, Roy PK, Munshi JSD (1992) Morphometric estimation of oxygen diffusing capacity for the air-sac in the catfish *Heteropneustes fossilis*. *J. Zool. London* 227: 193-209
- Johansen K (1970) Air-breathing in fishes. In: Hoar WS, Randall DJ (eds) Fish physiology. Vol IV. Academic Press, San Diego New York Berkeley Boston London Sydney Tokyo Toronto, pp 361-411
- Junqueira LC, Carneiro J (2004) *Histologia básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Kapoor BG, Smit H, Verighina IA (1975) The alimentary canal and digestion in teleosts. *Adv. Mar. Biol.* 13: 109-239.
- Logothetis EA, Horn MH, Dickson KA (2001) Gut morphology and function in *Atherinops affinis* (Teleostei: Atherinopsidae), a stomachless omnivore feeding on macroalgae. *J. Fish Biol.* 59: 1298-1312
- Maina JN (1987) The morphology of the lung of the African lungfish, *Protopterus aethiopicus*: a scanning electron microscopic study. *Cell Tissue Res.* 250: 191-196
- Maina JN, West, JB (2005) Thin and strong! The bioengineering dilemma in the structural and functional design of the blood-gas barrier. *Physiol. Rev.* 85: 811-844
- Moraes MFGP, Höller S, Costa OTF, Glass ML, Fernandes MN, Perry SF (2005) Morphometric comparison of the respiratory organs of the south American lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). *Physiol. Biochem. Zool.* 78: 546-559

- Morrison CM, Wright Jr JR (1999) A study of the histology of the digestive tract of the Nile tilapia. *J. Fish Biol.* 54: 597-606
- Oliveira C, Taboga SR, Smarra ALS, Bonilla-Rodriguez GO (2001) Microscopical aspects of accessory air breathing through a modified stomach in the armoured catfish *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes, Loricariidae). *Cytobios* 105: 153-162
- Orgeig S, Daniels CB (2001) The roles of cholesterol in pulmonary surfactant: insights from comparative and evolutionary studies. *Comp. Biochem. Physiol. A* 129: 75-89
- Perry SF (1983) Reptilian lungs: functional anatomy and evolution. In: Beck F, Hild W, van Limborgh J, Ortmann R, Pauly JE, Schiebler TH (eds) *Advances in anatomy, embryology and cell biology*, vol 79. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York
- Perry SF (1989) Structure and function of the reptilian respiratory system. In: Wood SC (ed) *Comparative Pulmonary Physiology, Current concepts*. Marcel Dekker, New York, pp 193-236
- Perry SF, Bauer AM, Russel AP, Alston JT, Maloney JE (1989) Lungs of the gecko *Rhacodactylus leachianus* (Reptilia: Gekkonidae): a correlative gross anatomical and light and electron microscopic study. *J. Morphol.* 199: 23-40
- Podkova D, Goniakowska-Witalinska L (1998) The structure of the airbladder of the catfish *Pangasius hypophthalmus* Roberts and Vidthayanon 1991, (previously *P. sutchi* Fowler 1937). *Folia Biol.* 46:189-196
- Podkova D, Goniakowska-Witalinska L (2002) Adaptations to the air breathing in the posterior intestine of the catfish (*Corydoras aeneus*, Callichthyidae): A histological and ultrastructural study. *Folia Biol.* 50: 69-82
- Podkova D, Goniakowska-Witalinska L (2003) Morphology of the air-breathing stomach of the catfish *Hypostomus plecostomus*. *J. Morphol.* 257: 147-163
- Runciman SIC, Baudinette RV, Gannon BJ, Lipsett J (1999) Morphometric analysis of postnatal lung development in a marsupial: transmission electron microscopy. *Resp. Physiol.* 118: 61-75
- Satora L (1998) Histological and ultrastructural study of the stomach of the air-breathing *Ancistrus multispinnis* (Siluriformes, Teleostei). *Can. J. Zool.* 76: 83-86
- Satora L, Winnicki A (2000) Stomach as an additional respiratory organ, as exemplified by *Ancistrus multispinnis* (Cuvier et Valenciennes, 1937), Siluriformes, Teleostei. *Acta Ichth. Piscat.* 30: 73-79
- Sbarbati A, Osculati F (2005) A new fate for old cells: brush cells and related elements. *J. Anat.* 206: 349-358.

- Silva JM, Hernandez-Blazquez FJ, Julio Jr HF (1997) A new accessory respiratory organ in fishes: morphology of the respiratory purses of *Loricariichthys platymetopon* (Pisces, Loricariidae). *Ann. Sci. Natur. Zool.* 18: 93-103
- Sis RF, Ives PJ, Jones DM, Lewis DH (1979) The microscopic anatomy of the oesophagus, stomach and intestine of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Fish Biol.* 14: 179-186
- Weibel ER (1999) Understanding the limitation of O<sub>2</sub> supply through comparative physiology. *Resp. Physiol.* 118: 85-93
- Weibel ER, Knight BW (1964) A morphometric study on the thickness of the pulmonary air-blood barrier. *J. Cell Biol.* 21: 367-384

## CAPÍTULO 4

### FRACIONAMENTO DA SUPERFÍCIE RESPIRATÓRIA DAS BRÂNQUIAS E DO ESTÔMAGO DO CASCUDO *PTERYGOPLICHTHYS ANISITSI* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE)

**Palavras-chave:** *Pterygoplichthys anisitsi*, brânquias, estômago, morfometria, estereologia, superfície respiratória

## 1. Introdução

A obtenção de oxigênio nas superfícies respiratórias é o processo inicial para a produção de energia necessária a todos os processos biológicos nos organismos aeróbios e depende da superfície do órgão (S) e da distância de difusão (t) entre os meios interno e externo do animal, que pode ser descrita como  $D_{O_2} = K.S/t$  onde  $D_{O_2}$  é a capacidade de difusão do oxigênio e K é a constante de difusão de Krogh (Hughes, 1984; Perry, 1989).

Na maioria dos peixes, as brânquias são os principais órgãos para a respiração. O oxigênio contido na água é extraído por um sistema de contracorrente (Hughes, 1966; Piiper, 1998) entre a água, no meio externo, e o sangue que circula no interior das lamelas, assegurando uma alta porcentagem de utilização do oxigênio dissolvido na água de até 80-90% em algumas espécies, como a traíra, *Hoplias malabaricus* (Rantin *et al.*, 1992), a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Fernandes *et al.*, 1996) e o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Aguiar *et al.*, 2002). O oxigênio absorvido pelas brânquias é transportado ao restante do corpo por vasos e capilares e, destes difunde-se para as células teciduais (Hughes, 1984).

Como meio respiratório, a água é 50 vezes mais viscosa que o ar, a concentração de oxigênio dissolvido na água é cerca de 1/30 do ar, a taxa de difusão do oxigênio na água é  $8 \times 10^3$  menor que a do ar e, o coeficiente de capacitância, isto é, o aumento da concentração por aumento na pressão parcial de oxigênio, na água é 30 vezes menor que no ar. Em água saturada com  $O_2$ , a 20°C, 1 mL de oxigênio está contido em 200 mL (aproximadamente 200g) de água, enquanto 1 mL de oxigênio está presente em 5 mL de ar (aproximadamente 7g de massa) (Dejours, 1981). Assim, considerando essas propriedades, a respiração aquática comparada à respiração aérea requer mais energia para obter uma quantidade equivalente de oxigênio (Maina, 2002). Além disso, alterações no ambiente aquático provocadas por altas temperaturas, introdução de matéria orgânica e, poluição causada por processos industriais e metais pesados provenientes da agricultura, contribuem para a redução da disponibilidade de oxigênio para a respiração dos peixes e outros animais aquáticos (Diaz, 2001; Mazon *et al.*, 2002).

As limitações de oxigênio no meio aquático e as variações que este gás apresenta dependendo das condições ambientais estimulam a evolução de várias espécies de peixes que realizam respiração aérea acessória (Johansen, 1970). A respiração aérea se torna possível a partir de órgãos especializados para absorção de oxigênio atmosférico com a finalidade de complementar as necessidades metabólicas do organismo. Entre os órgãos especializados para a respiração aérea estão a cavidade bucal, a pele, o trato gastrointestinal e a bexiga natatória (Graham, 1997).

A predominância da respiração aquática ou aérea em peixes está freqüentemente relacionada à área de superfície dos órgãos respiratórios, às propriedades sanguíneas respiratórias e à capacidade das espécies detectarem uma redução do oxigênio ambiental e iniciarem mecanismos fisiológicos para compensar a diminuição de oxigênio (Johansen *et al.*, 1978; Rantin *et al.*, 1992; Fernandes *et al.*, 1995, 1996).

Na maioria dos peixes de respiração aérea, é bem documentada uma redução geral da área respiratória branquial. A interpretação mais parcimoniosa é que a redução da superfície branquial respiratória faz parte do fracionamento respiratório aéreo e aquático que, para função respiratória ótima, sofreu seleção conjuntamente com o desenvolvimento do órgão de respiração aérea (Graham, 1997). Com relação ao fracionamento respiratório, o mesmo autor ainda comenta sobre a importância da realização de estudos para comparar, de forma mais completa e crítica, as inter-relações entre os órgãos de respiração aérea e as brânquias.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi estimar a superfície potencialmente respiratória das brânquias e comparar com a do estômago (capítulo 3) para avaliar a participação de cada um desses órgãos na obtenção de oxigênio em *Pterygoplichthys anisitsi*.

## **2. Materiais e Métodos**

### *Animais experimentais*

Espécimes adultos de cascudo *Pterygoplichthys anisitsi* [massa corpórea ( $M_C$ )= 0,084 a 0,600 kg; comprimento total ( $C_T$ ): 24 a 39 cm] foram obtidos no CAUNESP (Centro de

Aqüicultura da UNESP, *Campus* de Jaboticabal, SP, Brasil). No laboratório, os peixes foram mantidos em tanque (1.000 L) com fluxo de água contínuo e aeração constante, a 23-25°C durante 3 semanas e alimentados com ração comercial e folhas de alface (*Lactuca sativa*).

#### *Anestesia e fixação*

Os mesmos peixes que foram anestesiados por imersão em solução de Benzocaína® (Sigma) 0,1% para posterior remoção do estômago (capítulo 3) também tiveram suas brânquias removidas. As brânquias foram fixadas em solução de glutaraldeído (GTA) 2,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4; 300 mOsM). A fixação teve início através de introdução de solução fixadora de GTA nas cavidades branquiais logo após o sacrifício de cada animal, para que não houvesse alteração dos tecidos durante a retirada do material. As brânquias foram mantidas em GTA 2,5% por 24 h e, após esse período, foram transferidas para uma solução de GTA 0,5% em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4; 300 mOsM) para conservação até o momento do processamento histológico.

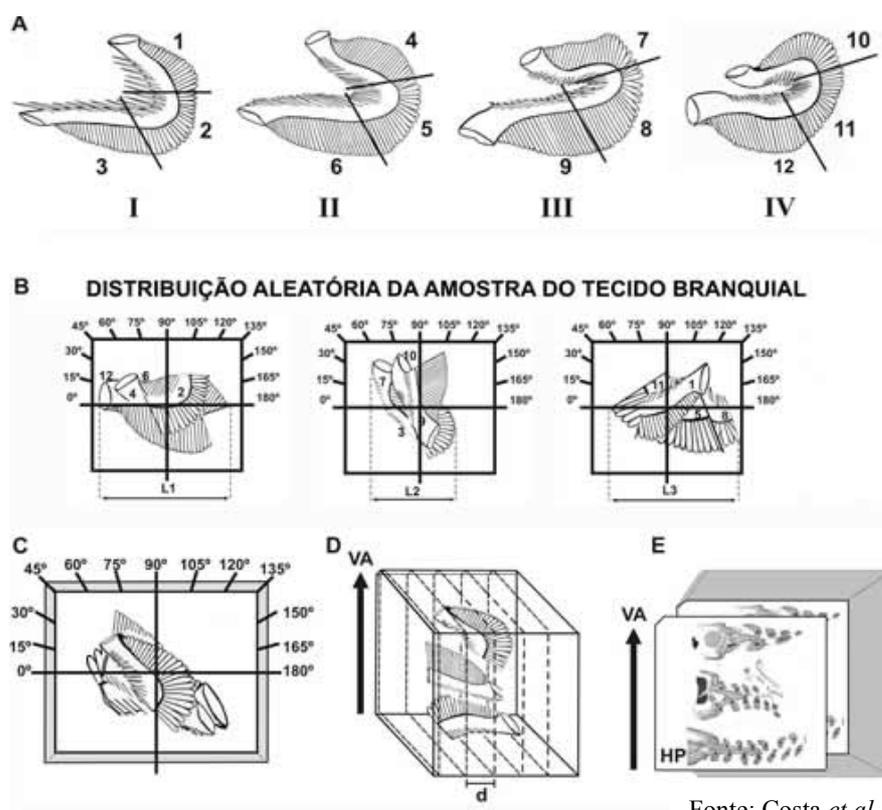
#### *Processamento histológico*

A amostragem e o procedimento para inclusão das brânquias foram efetuados de forma a combinar o princípio de Cavalieri para determinação do volume de referência com o método de secção vertical para determinação da superfície respiratória (Costa *et al.*, 2007).

Os arcos branquiais do lado esquerdo do animal foram individualmente separados e os rastros e os ossos do epi- e ceratobranquial foram removidos. As amostras constituídas pelos filamentos e as lamelas foram desidratadas em etanol e incluídas em metacrilato (Historesin® Leica) de acordo com Moraes *et al.* (2005) e Costa *et al.* (2007). Uma breve descrição do processamento histológico é mostrada na Figura 1: (1) os arcos branquiais foram seccionados em três partes cada (Fig. 1a) e números aleatórios foram dados às amostras que foram incluídas com a hemibrânquia anterior voltada para baixo, assim definindo o plano horizontal para que os cortes verticais fossem efetuados posteriormente, ou seja, todos os planos perpendiculares ao plano horizontal; (2) cada porção do arco branquial foi girada em seu eixo do eixo vertical (Fig. 1b e c) de acordo com o método para

amostragem aleatória sistemática (VUR) (Gundersen e Jensen, 1987); (3) em cada peixe, o corte inicial foi escolhido aleatoriamente entre 0 e 15° a partir da orientação inicial (o eixo transversal foi 0°) e adicionado 15° na amostra branquial seguinte (Fig. 1b). Quatro amostras foram incluídas em cada bloco, uma sobre a anterior após a polimerização parcial da resina na temperatura ambiente, de forma que todo o tecido branquial respiratório de um lado do animal estivesse incluído em somente três blocos, cada um contendo quatro amostras com diferentes orientações (Fig. 1b).

Os blocos foram seccionados com espessura de 3 µm e oito cortes foram obtidos do total dos três blocos a distâncias regulares cujo corte inicial foi aleatório (Fig. 1d e 1e). Os cortes foram corados com azul de toluidina/fucsina ácida e utilizados para determinar o volume de referência, segundo o princípio de Cavalieri, e a superfície das lamelas (região respiratória das brânquias).



Fonte: Costa *et al.*, 2007

**Figura 1.** Diagrama do esquema de amostragem do seccionamento das brânquias. **(A)** Brânquias mostrando os pontos de seção dos 4 arcos branquiais sequencialmente numerados para obter 3 amostras de cada arco. **(B)** Esquema dos 4 blocos de metacrilato mostrando as porções branquiais embebidas aleatoriamente e a orientação sequencial de cada porção branquial sobre o eixo vertical de 0-180°C para obter amostragem combinada para determinar o volume de referência pelo princípio de Cavalieri e a superfície respiratória pelo método de seção vertical. A rotação sequencial foi feita adicionando-se 15°C a cada porção branquial do ponto inicial. As medidas de comprimento dos tecidos branquiais (L1, L2, L3) dentro dos blocos para determinar o comprimento total ( $L_T =$  comprimento dos 4 blocos). **(C)** Visão superior detalhada de um bloco de metacrilato indicando a rotação sequencial das três porções branquiais aleatórias sobre o eixo vertical. **(D)** Visão lateral de um bloco de metacrilato embebido com três porções aleatórias de arcos branquiais. Linhas tracejadas indicam a distância (d) entre as seções no eixo vertical (VA, seta). **(E)** Vista frontal de um bloco de metacrilato mostrando as porções de brânquias embebidas aleatoriamente e uma seção. O plano horizontal (HP) é o plano do papel.

*Determinação do volume e da superfície das brânquias*

O volume da região respiratória das brânquias e a sua respectiva superfície foram estimados utilizando um sistema-teste de contagem de pontos e interseções (pontos e arcos ciclóides que possuem uma orientação de distribuição proporcional ao seno do ângulo do eixo vertical) cujas áreas associadas a cada ponto e intersecção são conhecidas. As análises foram efetuadas em um microscópio Olympus BX com câmara de vídeo acoplado a um computador que contém um programa para análise de imagens especializado em estereologia (C.A.S.T. System, Olympus, Denmark) a um aumento final igual a 760x.

O volume da região respiratória e de cada componente das lamelas (espaço sangüíneo, células pilares e epitélio) foi estimado segundo a equação de Howard e Reed (1998):  $V = T.a/p.\sum P_i$ , onde T é a distância entre os cortes, a/p é a área do ponto e  $P_i$  é o número de pontos sobre a estrutura a ser estimada (Fig. 2).

A densidade de volume ( $V_v$ : proporção do volume da estrutura analisada em relação ao volume total do órgão) dos filamentos e lamelas foi estimada utilizando a contagem de pontos de um sistema-teste isotrópico, cuja área do ponto é conhecida, sobre os cortes histológicos (Fig. 2) de acordo com a seguinte equação:  $V_v = P_E / P_T$ , onde  $P_E$  é o número de pontos sobre a estrutura analisada e  $P_T$  é o número de pontos sobre uma seção histológica em microscopia de luz.

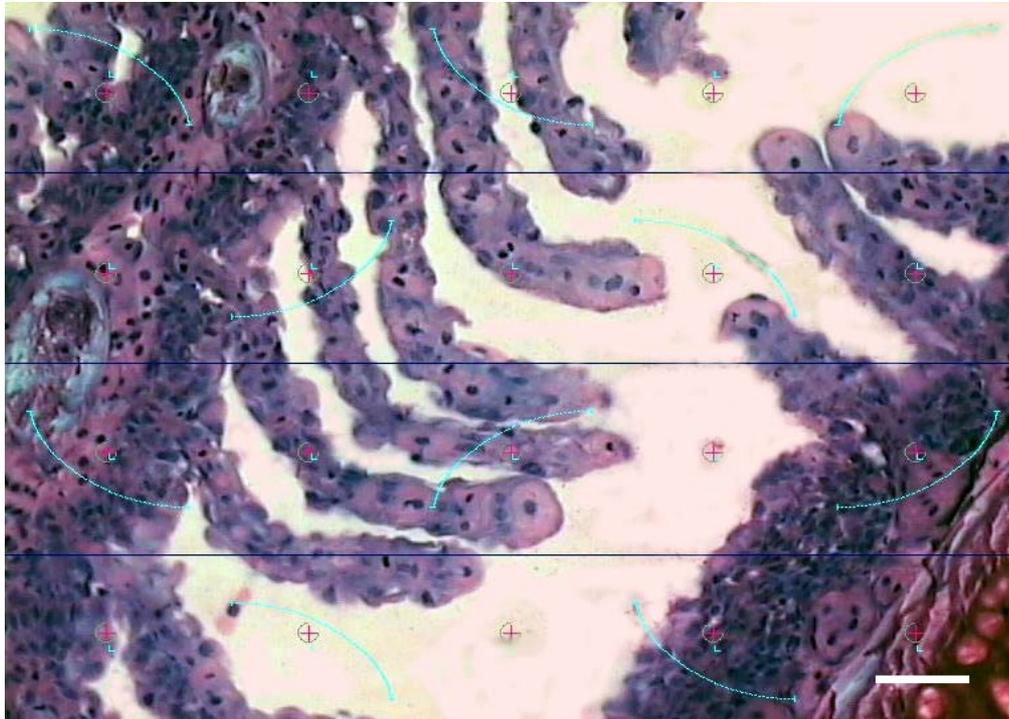
A superfície respiratória e não-respiratória foi estimada utilizando a contagem das interseções dos arcos ciclóides com a superfície das lamelas e do filamento, respectivamente (Fig. 2). A superfície respiratória por unidade de volume (densidade de superfície =  $S_v$ ) e a superfície total (S) foram estimadas segundo as equações de Howard e Reed (1998):

$$S_v = 2.\sum I_i(I/p.\sum P_i) \quad e \quad S = S_v.V$$

onde,  $P_i$  é o número de pontos sobre o tecido,  $I/p$  é o comprimento do arco ciclóide por ponto do sistema-teste e  $I_i$  é o número da contagem de interseções com a superfície das lamelas em microscopia de luz.

*Análise estatística*

A determinação da precisão da estimativa de volume e superfície branquial foi feito para cada indivíduo de acordo com Gundersen e Jensen (1987) e Howard e Reed (1998) utilizando software Microsoft Excel. A variabilidade entre os espécimes foi representada pelos valores médios e acompanhada pelos respectivos erros padrões da média.



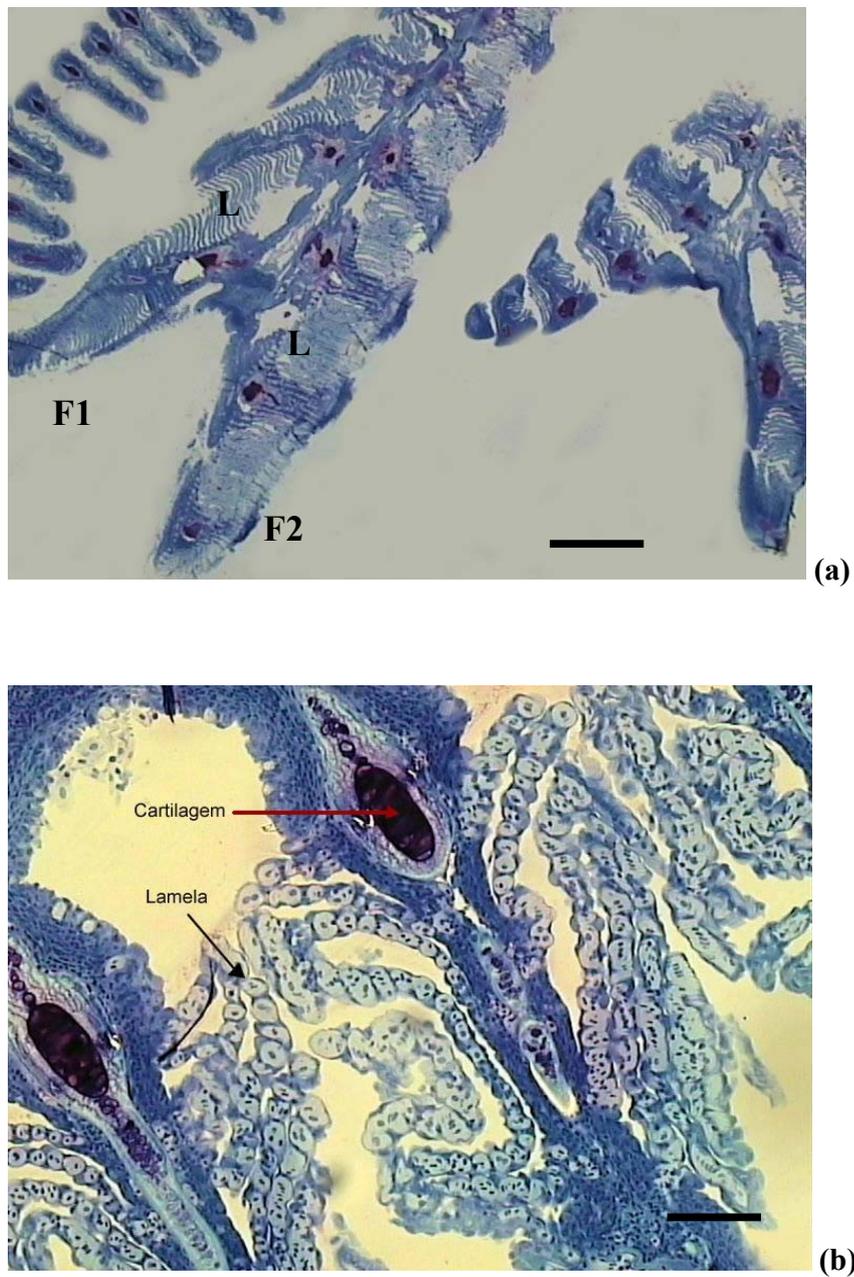
**Figura 2:** Sistema arcos ciclóides e pontos utilizados para a determinação do volume de referência, superfície respiratória e densidade de volume ( $V_v$ ) das brânquias. Coloração: Azul de Toluidina/Fucsina. Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3. Resultados

#### *Aspectos estruturais*

As brânquias do cascudo *Pterygoplichthys anisitsi* são constituídas por quatro arcos branquiais que se dispõem de cada lado da faringe, delimitando as fendas branquiais. Os arcos branquiais são formados por ossos delgados que estão suspensos no teto do crânio e se articulam com a mandíbula por meio de ligamentos e cartilagens na sua região inferior. Esses arcos suportam as holobrânquias que são constituídas por duas fileiras de filamentos branquiais e voltadas para a cavidade opercular. As duas fileiras de filamentos branquiais, inseridas no arco branquial, possuem as lamelas, regularmente espaçadas e dispostas acima e abaixo dos filamentos (Fig. 3a e 3b).

Um raio cartilaginoso de forma cilíndrica e com prolongamentos transversais ao longo do seu eixo longitudinal (cartilagem de sustentação) se articula com os ossos do arco branquial e dá sustentação aos filamentos (Fig. 3b). A artéria branquial aferente dá origem às artérias primárias. Essas artérias, que se localizam no septo interbranquial e ao longo dos filamentos, dão origem às artérias secundárias que se ramificam e chegam às lamelas. O sangue passa pelos espaços formados pelos flanges das células pilares, canal proximal e marginal e é recolhido um sistema de artérias eferentes: artérias secundárias, artérias primárias e branquial.



**Figura 3.** (a) Vista geral de um corte de brânquias de *Pterygoplichthys anisitsi* mostrando filamentos (F) e lamelas secundárias (L). Escala: 2 mm  
 (b) Parte de filamentos branquiais; a seta vermelha indica uma extensão da cartilagem de sustentação; a seta preta indica uma lamela secundária. Coloração: Azul de Toluidina. Escala: 5  $\mu$ m.

### *Análise quantitativa das brânquias*

Para a análise quantitativa foram considerados as lamelas branquiais e os filamentos, os quais incluíram os septos branquiais, a cartilagem branquial, as artérias primárias aferentes e eferentes, o seio venoso e o epitélio.

Os volumes das lamelas ( $V_L$ ) e dos filamentos ( $V_F$ ) foram  $231,87 \pm 35,99 \text{ cm}^3$  e  $547,83 \pm 221,39 \text{ cm}^3$ , respectivamente, e a densidade de volume para as lamelas ( $V_{VL}$ ) e para os filamentos ( $V_{VF}$ ) correspondeu a 35,11 e 64,89%, respectivamente. Nenhuma correlação foi verificada entre os volumes e a massa corpórea dos espécimes (Tabela 1).

A superfície total lamelar ( $S_L$ ) e do filamento ( $S_F$ ) foi  $173,35 \pm 43,07 \text{ cm}^2$  e  $66,47 \pm 17,12 \text{ cm}^2$ , respectivamente (Tabela 2), enquanto a densidade de superfície lamelar ( $S_{VL}$ ) foi de  $704,71 \pm 132,77 \mu\text{m}^{-1}$  e a densidade de superfície do filamento ( $S_{VF}$ ) igual a  $142,38 \pm 31,18 \mu\text{m}^{-1}$ . A densidade média da superfície lamelar das brânquias foi cerca de 5 vezes a superfície do filamento e representa 82,40% da superfície respiratória da brânquia. A relação superfície lamelar e a massa corpórea (i.e. superfície respiratória específica) foi, em média,  $2.889,23 \pm 717,89 \text{ cm}^2.\text{kg}^{-1}$  (Tabela 2). A superfície respiratória não mostrou correlação com a massa corpórea dos espécimes.

**Tabela 1.** Volume das lamelas ( $V_L$ ) e dos filamentos ( $V_F$ ) e, porcentagem de volume das lamelas ( $V_{VL}$ ) e filamentos ( $V_{VF}$ ) das brânquias de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

Animal N <sup>o</sup>	Massa corpórea (M <sub>C</sub> )  (kg)	Volume da Lamela (V <sub>L</sub> )  (cm <sup>3</sup> )	Volume do Filamento (V <sub>F</sub> )  (cm <sup>3</sup> )	Porcentagem do Volume das Lamelas (V <sub>VL</sub> )  (%)	Porcentagem do Volume dos Filamentos (V <sub>VF</sub> )  (%)
1	0,084	134,88	147,05	47,84	52,16
2	0,151	228,75	421,01	35,20	64,80
3	0,178	305,58	1180,62	20,56	79,44
4	0,415	258,27	442,63	36,85	63,15
Média	0,207	231,87	547,83	35,11	64,89
Erro Padrão	0,072	35,99	221,39	3,34	3,34

**Tabela 2.** Tabela 2. Superfície branquial (S), relação superfície/massa corpórea (S/M<sub>C</sub>), razão superfície-volume (S<sub>V</sub>), porcentagem da área de superfície que é respiratória (%S<sub>R B</sub>) das lamelas e filamentos de *P. anisitsi*. Média ± Erro Padrão da Média.

Animal No.	Superfície Branquial Lamelar (S <sub>L</sub> )	Superfície Branquial Filamentar (S <sub>F</sub> )	Superfície Lamelar/Massa corpórea (S <sub>L</sub> /M <sub>C</sub> )	Superfície Filamentar/Massa corpórea (S <sub>F</sub> /M <sub>C</sub> )	Superfície/Volume Lamelar (S <sub>VL</sub> )	Superfície/Volume Filamentar (S <sub>VF</sub> )	Superfície Respiratória Branquial (S <sub>RB</sub> )
	(cm <sup>2</sup> )	(cm <sup>2</sup> )	(cm <sup>2</sup> .kg <sup>-1</sup> )	(cm <sup>2</sup> .kg <sup>-1</sup> )	(μm <sup>-1</sup> )	(μm <sup>-1</sup> )	(%)
1	44,68	17,11	744,80	285,25	331,31	116,38	74,00
2	207,94	71,26	3.465,81	1.187,71	909,04	169,26	84,30
3	213,77	82,99	3.562,88	1.383,20	699,56	70,29	90,87
4	227,00	94,54	3.783,44	1.575,73	878,93	213,59	80,45
Média	173,35	66,47	2.889,23	1.107,97	704,71	142,38	82,40
Erro Padrão	43,07	17,12	717,89	285,45	132,77	31,18	2,65

*Comparação morfológica entre estômago e brânquias*

As brânquias apresentaram um volume total maior do que o estômago ( $779,70 \pm 227,18 \text{ cm}^3$  e  $20,24 \pm 4,75 \text{ cm}^3$ , respectivamente), bem como maior relação volume/massa corpórea ( $4.424,48 \pm 1.269,52 \text{ cm}^3.\text{kg}^{-1}$  e  $85,20 \pm 14,16 \text{ cm}^3.\text{kg}^{-1}$ , respectivamente) (Tabela 3).

A densidade de superfície (relação superfície/volume) das lamelas branquiais ( $0,070 \pm 0,013 \mu\text{m}^{-1}$ ), assim como sua área total ( $173,35 \pm 43,07 \text{ cm}^2$ ) foram maiores que a da mucosa estomacal, a qual possuiu densidade de superfície igual a  $0,007 \pm 0,0008 \mu\text{m}^{-1}$  e área total de  $30,76 \pm 9,31 \text{ cm}^2$  (Tabela 4).

As lamelas branquiais também apresentaram maior relação superfície/massa corpórea que a mucosa estomacal,  $2.889,23 \pm 717,89 \text{ cm}^2.\text{kg}^{-1}$  e  $157,20 \pm 45,54 \text{ cm}^2.\text{kg}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 4).

**Tabela 3.** Volume total do estômago ( $V_{TE}$ ), volume total das brânquias ( $V_{TB}$ ), relação volume do estômago/massa corpórea ( $V_{TE}/M_C$ ) e relação volume das brânquias/massa corpórea ( $V_{TB}/M_C$ ) de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Erro Padrão da Média.

Animal N <sup>o</sup>	Volume total do Estômago ( $V_{TE}$ )  ( $\text{cm}^3$ )	Volume total das Brânquias ( $V_{TB}$ )  ( $\text{cm}^3$ )	Volume do Estômago/ Massa corpórea ( $V_{TE}/M_C$ )  ( $\text{cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ )	Volume das Brânquias/ Massa corpórea ( $V_{TB}/M_C$ )  ( $\text{cm}^3 \cdot \text{kg}^{-1}$ )
1	11,52	281,93	144	3356,40
2	11,09	649,77	73,93	4303,13
3	16,35	1486,20	96,17	8349,47
4	26,65	700,90	64,63	1688,93
5	35,61	-	59,35	-
Média	20,24	779,70	85,19	4.424,48
Erro Padrão	4,75	227,18	14,16	1.269,52

**Tabela 4.** Superfície (S), relação superfície/massa corpórea (S/M<sub>C</sub>), relação superfície/volume (S<sub>V</sub>) da mucosa estomacal e das lamelas branquiais de *P. anisitsi*. Média ± Erro Padrão da Média.

Animal N <sup>o</sup>	Superfície da Mucosa (S <sub>M</sub> )	Superfície da Lamela (S <sub>L</sub> )	Superfície/ Massa corpórea da Mucosa (S/Mc <sub>M</sub> )	Superfície/ Massa corpórea da Lamela (S/Mc <sub>L</sub> )	Superfície/ Volume da Mucosa (S <sub>V</sub> M)	Superfície/ Volume da Lamela (S <sub>V</sub> L)
	(cm <sup>2</sup> )	(cm <sup>2</sup> )	(cm <sup>2</sup> .kg <sup>-1</sup> )	(cm <sup>2</sup> .kg <sup>-1</sup> )	(μm <sup>-1</sup> )	(μm <sup>-1</sup> )
1	23,63	44,68	281,39	744,80	0,010	0,033
2	38,07	207,94	252,15	3465,81	0,007	0,090
3	18,99	213,77	106,72	3562,88	0,007	0,069
4	32,23	227,00	77,67	3783,45	0,005	0,087
5	40,85	-	68,08	-	0,006	-
Média	30,76	173,35	157,20	2.889,23	0,007	0,070
Erro Padrão	4,17	43,07	45,54	717,89	0,0008	0,013

#### 4. Discussão

##### *Morfologia branquial*

Todas as superfícies respiratórias apresentam aspectos morfológicos básicos como (1) evaginação ou invaginação a partir da superfície corpórea; (2) estratificação ou compartimentalização, meios pelos quais uma extensa área superficial é formada em espaço limitado; (3) intensa vascularização, característica que aumenta o volume de sangue ao meio respiratório externo e (4) organização geométrica dos componentes estruturais, característica que determina a interação com o meio respiratório (Hughes e Morgan, 1973; Maina, 2002).

As superfícies respiratórias, nos diferentes grupos animais, são constituintes dos diferentes sistemas de trocas gasosas evolutivamente selecionados. Entre esses sistemas, o sistema contracorrente, utilizado pelos peixes para ventilar suas brânquias, é considerado o de maior eficiência garantindo altas taxas de absorção de oxigênio a partir da água que passa entre as lamelas (Piiper, 1998; Maina, 2002; Wilson e Laurent, 2002).

Geralmente, as brânquias de peixes teleósteos de respiração exclusivamente aquática são compostas por quatro arcos branquiais de cada lado da faringe, cada um sustentando duas fileiras de filamentos branquiais. A superfície dos filamentos contém uma fileira de lamelas, os sítios de trocas gasosas, regularmente espaçadas de cada lado (Hughes, 1984; Laurent, 1984; Fernandes, 1996).

Cascudos que possuem respiração aérea como *Hypostomus plecostomus* (Perna, 1996) e *Rhinelepis strigosa* (Santos, 1994), e também *Pterygoplichthys anisitsi*, verificado neste estudo, possuem a mesma estrutura básica das brânquias de peixes teleósteos de respiração exclusiva aquática, com holobrânquias em todos os arcos branquiais e com lamelas acima e abaixo dos filamentos branquiais. Por comparação, o posicionamento e a distribuição dos componentes branquiais, sua forma e especialmente a sua dimensão podem variar entre as espécies (Hughes e Morgan, 1973) e poderia refletir dependência da respiração aquática.

As lamelas são dobras transversas sobre ambas as superfícies dos filamentos branquiais que são constituídas por finas lâminas de formato triangular, com a parte mais alta voltada para o lado da entrada da água, apoiadas sobre redes vasculares de modo a favorecer as trocas gasosas (Hughes e Morgan, 1973).

As lamelas consistem de uma camada vascular central formada pelos flanges de células pilares, revestidas por uma fina membrana basal e duas camadas bilaterais de epitélio constituído por células pavimentosas. As lamelas não apresentam uma organização vascular semelhante à estrutura de capilares sanguíneos, o sangue flui entre os espaços formados por prolongamentos laterais ou flanges das células pilares. O sangue chega às lamelas por meio de uma rede de vasos aferentes provenientes da aorta ventral e é levado por vasos eferentes que vão formar a aorta dorsal. O fluxo de água e de sangue ocorre em sentidos opostos (sistema de contracorrente). Uma haste fina de cartilagem sustenta os filamentos, com o auxílio de músculos abdutores e adutores, que movem os filamentos durante o ciclo respiratório (Hughes, 1984; Fernandes, 1996; Evans *et al.*, 2005).

Geralmente, peixes de respiração aérea facultativa têm filamentos branquiais reduzidos e menor número de lamelas com lamelas adaptadas para manutenção respiratória e eficiência osmorregulatória. Por exemplo, *Hoplerythrinus unitaeniatus*, que tem uma bexiga natatória como um órgão respiratório acessório, tem quatro arcos branquiais funcionais, porém sua superfície lamelar é reduzida e a organização das células pilares forma canais paralelos em contraste ao arranjo hexagonal e tortuoso encontrado em espécies de respiração aquática como *Hoplías malabaricus* (Moron, 1994).

A morfologia branquial é considerada uma estrutura dinâmica com função para os ajustes dos processos fisiológicos frente às condições ambientais. Recentemente, Sollid *et al.* (2003 e 2005) e Sollid e Nilsson (2006) demonstraram remodelamento na morfologia geral das brânquias de peixes do gênero *Carassius* em resposta às mudanças na temperatura e disponibilidade de oxigênio.

#### *Morfometria branquial*

A morfometria branquial é de grande importância para um melhor entendimento da fisiologia respiratória de peixes. Os estudos morfométricos com peixes geralmente se referem às correlações entre a massa corpórea e a área de superfície respiratória, à adaptação ao ambiente aquático, à compreensão de processos osmorregulatórios e à atividade dos animais (Hughes, 1984).

A área total da superfície branquial respiratória é o parâmetro mais utilizado na análise morfométrica para a comparação entre as diferentes espécies de peixes, com relação

aos seus hábitos, ambientes e conseqüentemente suas necessidades metabólicas (Santos, 1994; Fernandes, 1996).

Neste trabalho, para se estimar a superfície respiratória foram utilizados os princípios da estereologia (Howard e Reed, 1998, Moraes *et al.*, 2005, Costa *et al.*, 2007), uma metodologia de probabilidades (não de reconstrução de objetos tridimensionais) que fornece uma estimativa de volume, área superficial a partir de seções bidimensionais aleatórias de amostras de tecido branquial. Essa metodologia é alternativa à descrita por Hughes (1966 e 1984b), utilizada em todos os trabalhos anteriormente citados neste item, na qual são utilizadas três medidas essenciais, (a) o comprimento total de todos os filamentos branquiais, (b) o número das lamelas nos dois lados dos filamentos e (c) uma estimativa da área bilateral de uma lamela que pode ser considerada como representativa de todas as lamelas de um particular sistema branquial. Assim o produto das medidas (a).(b) fornece o número total de lamelas e, o produto (a).(b).(c) a área total das lamelas.

Um possível erro metodológico para a obtenção das medidas bidimensionais são os efeitos dos processamentos histológicos, como a retração dos tecidos devido aos produtos químicos utilizados no processamento (Hughes, 1984b). Para *P. anisitsi*, foram realizadas medidas das brânquias desde o tecido recém-extraído até os cortes histológicos incluídos em metacrilato e não foram verificadas diferenças significativas ao longo do processamento histológico (Cruz AL, Fernandes MN e Perry SF, em preparação).

A área de superfície branquial pode estar relacionada à atividade e requerimentos de oxigênio da espécie. Geralmente, uma área branquial muito reduzida é encontrada em peixes que tenham baixos requerimentos metabólicos e em peixes com respiração acessória que possuem a capacidade de obter oxigênio no ar atmosférico (Hughes, 1972). De fato, ao comparar a superfície branquial de *P. anisitsi* ( $2.889,23 \text{ cm}^2.\text{kg}^{-1}$ ) com outros valores estereológicos para brânquias de *Lepidosiren paradoxa* ( $0,65 \text{ cm}^2.\text{kg}^{-1}$ ; Moraes *et al.*, 2005) e brânquias de *Arapaima gigas* ( $579,41 \text{ cm}^2.\text{kg}^{-1}$ ; Costa *et al.*, 2007) é verificado que esse cascudo de respiração acessória contínua mas não obrigatória (capítulo 2) possui área de superfície branquial maior que *Lepidosiren* e *Arapaima*, duas espécies de respiração aérea obrigatória que utilizam os pulmões e a bexiga natatória, respectivamente, como principais órgãos respiratórios, o que indica uma relação de dependência do meio aquático para a respiração de *P. anisitsi*.

Embora realizada a comparação com espécies (*Lepidosiren* e *Arapaima*) que possuem brânquias extremamente reduzidas e com pequena função respiratória, novos estudos necessitam ser realizados com a aplicação desse método, desde com peixes com respiração aquática exclusiva até com outros peixes pulmonados, para uma maior comparação e estabelecimento de relações entre as espécies e seus ambientes aquáticos.

Ao comparar os elementos branquiais de *P. anisitsi* entre si, foi verificado um volume menor e uma superfície maior das lamelas quando comparadas aos filamentos. De fato, pela disposição com inúmeras dobras, as lamelas aumentam em muito a superfície do epitélio branquial, o que resulta em uma pequena distância de difusão entre o sangue que perfunde cada lamela e a água, o meio respiratório (Evans *et al.*, 2005). A superfície respiratória branquial em *P. anisitsi* corresponde a 82,40% do total da superfície da brânquia.

#### *Comparação morfométrica entre estômago e brânquias*

As brânquias têm maior volume que o estômago, assim como maior relação volume/massa corpórea. Além disso, as lamelas possuem área superficial, relação superfície/massa corpórea e densidade de superfície maior do que a mucosa estomacal. Isso indica que *P. anisitsi* é uma espécie que possui dependência da respiração aquática, como também evidenciado pela sua morfologia branquial. Mas, por outro lado, as propriedades do meio respiratório aquático tornam a respiração aquática um processo energeticamente caro quando comparado ao meio aéreo, *eg*, a quantidade de oxigênio dissolvido no ar é muito maior que na água. Para *P. anisitsi* as trocas gasosas realizadas pelo estômago podem ser mais eficientes que as realizadas pelas brânquias, mesmo o estômago possuindo uma superfície respiratória menor.

Assim, alternativamente, *P. anisitsi* utiliza brânquias ou estômago para a obtenção de oxigênio na dependência da necessidade de aporte suficiente de oxigênio para suprir suas necessidades metabólicas, o que pode ser limitado por concentrações de oxigênio insuficientes no meio aquático.

## **5. Referências**

- Aguiar LH, Kalinin AL, Rantin FT (2002). The effects of temperature on the cardio-respiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. *J. Therm. Biol.* 27:299-308
- Costa OFT, Pedretti AC, Schmitz A, Perry SF, Fernandes, MN (2007) Stereological estimation of surface area and barrier thickness of fish gills in vertical sections. *J. Microscopy* 225: 1-9
- Dejours P (1981) Principles of comparative respiratory physiology. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam New York Oxford
- Diaz RJ (2001) Overview of hypoxia around the world. *J. Environ. Quality* 30: 275-281
- Evans DH, Piermarini PM, Choe KP (2005) The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85: 97-177
- Fernandes MN, Perna SA (1995) Internal morphology of the gill of a loricariid fish, *Hypostomus plecostomus*: arterio-arterial vasculature and muscle organization. *Can. J. Zool.* 73: 2259-2265
- Fernandes MN (1996) Morpho-functional adaptations of gills in tropical fish. *In: Biology of Tropical Fishes*, Inpa, Manaus
- Graham JB (1997) Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto
- Gundersen HJG, Jensen EB (1987) The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microscopy* 147: 229-263
- Howard CV, Reed MG (1998) Unbiased stereology, Three-dimensional measurement in microscopy, Bios Scientific Publishers, Oxford
- Hughes GM (1966) The dimensions of fish gills in relation to their function. *J. Exp. Biol.* 45: 177-195
- Hughes GM (1972) Morphometrics of fish gills. *Respir. Physiol.* 14: 1-25

- Hughes GM (1984) General anatomy of the gills. *In: Fish Physiology*, Academic Press, New York
- Hughes GM (1984b) Measurement of gill area in fishes: practices and problems. *J. Mar. Biol.* 64: 637-655
- Hughes GM e Morgan M (1973) The structure of fish gills in relation to their respiratory function. *Biol. Rev.* 48: 419-475
- Johansen K (1970) Air breathing in fishes. *In: Fish physiology*, Academic Press, New York
- Johansen K, Mangum CP, Lykkeboe G (1978) Respiratory properties of the blood of Amazon fishes. *Can. J. Zool.* 56: 898-906
- Laurent P (1984) Gill structure and function. *In: Comparative pulmonary physiology*, Marcel Decker, New York
- Maina JN (2002) Structure, function and evolution of the gas exchangers: comparative perspectives. *J. Anat.* 201: 281-304
- Mazon AF, Monteiro EAS, Pinheiro GHD, Fernandes MN (2002) Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to cooper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol.* 62: 621-631
- Moraes MFPG, Höller S, Costa OTF, Glass ML, Fernandes MN, Perry SF (2005) Morphometric comparison of the respiratory organs of the south American lungfish *Lepidosiren paradoxa* (Dipnoi). *Physiol Biochem Zool* 78: 546-559
- Moron SE (1994) Organização estrutural das brânquias de traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de São Carlos
- Perna AS, Fernandes MN (1996) Gill morphometry of the facultative air-breathing loricariid fish, *Hypostomus plecostomus* (Walbaum) with special emphasis on aquatic respiration. *Fish. Physiol. Biochem.* 15: 213-220
- Perry SF (1989) Structure and function of the reptilian respiratory system. *In: Comparative Pulmonary Physiology, Current concepts*. Marcel Dekker, New York

- Piiper J (1998) Branchial gas transfer models. *Comp. Biochem. Physiol.* 119 A: 125-130
- Rantin FT, Kalinin AL, Glass ML, Fernandes MN (1992) Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). *J. Fish Biol.* 41: 805-812
- Santos CTC, Fernandes MN, Severi W (1994) Respiratory gill surface area of a facultative air breathing loricariidae fish, *Rhinelepis strigosa*. *Can. J. Zool.* 72: 2009-2013
- Sollid J, de Angelis P, Gundersen K, Nilsson GE (2003) Hypoxia induces adaptative and reversible gross morphological changes in crucian carp gills. *J. Exp. Zool.* 206: 3667-3673
- Sollid J, Weber RE, Nilsson GE (2005) Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp (*Carassius carassius*) and goldfish (*Carassius aurata*). *J. Exp. Zool.* 208: 1109-1116
- Sollid J, Nilsson GE (2006) Plasticity of respiratory structures- adaptative remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154: 241-251
- Wilson JM, Laurent P (2002) Fish gill morphology: inside out. *J. Exp. Zool.* 293: 192-213

## CAPÍTULO 5

### CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E FUNCIONAL DAS HEMOGLOBINAS DO CASCUDO DE RESPIRAÇÃO BIMODAL *PTERYGOPLICHTHYS ANISITSI* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE) SUBMETIDO À HIPÓXIA GRADUAL E À EXPOSIÇÃO AÉREA

**Palavras-chave:** *Pterygoplichthys anisitsi*, hipóxia gradual, exposição aérea, padrão eletroforético, componente catódico, afinidade hemoglobina-oxigênio

## 1. Introdução

Os organismos com maior complexidade celular e maior tamanho corporal possuem uma alta demanda de oxigênio para a respiração que não é satisfeita por pequenas quantidades de oxigênio dissolvidas diretamente no sangue. Um grande passo evolutivo foi o surgimento dos pigmentos respiratórios para transportar o oxigênio do ambiente externo para os tecidos, onde é utilizado como aceptor final no catabolismo (Weber e Jensen, 1988; Giardina, *et al.*, 2004).

Em todos os vertebrados, a base química para o transporte de oxigênio é representada pelas moléculas de hemoglobinas que estão no interior de células especializadas, os eritrócitos, que são suficientemente maleáveis e resistentes para não se romper com o estresse mecânico durante sua circulação no sistema cardiovascular dos organismos (Weber e Jensen, 1988; Nikinmaa, 1990; Giardina *et al.*, 2004).

A quantidade de oxigênio transportada por unidade de volume de sangue depende da tensão de oxigênio, do número de eritrócitos, da quantidade de hemoglobina nos eritrócitos e da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Essa afinidade desempenha duas importantes funções: a hemoglobina deve chegar efetivamente saturada de oxigênio ( $O_2$ ) nos capilares dos órgãos de troca gasosa e, liberar o  $O_2$  nos capilares dos tecidos a alta pressão parcial de oxigênio, necessária para manter um gradiente de difusão entre o sangue e as estruturas que utilizam oxigênio (Riggs, 1988; Nikinmaa, 1992,1997).

Ao considerar a variedade de espécies que depende das hemoglobinas para o transporte de oxigênio, essas moléculas desempenham suas funções primárias sob condições ambientais extremamente variáveis dependendo dos habitats das espécies (Weber e Jensen, 1988; Clementi *et al.*, 1994; Brauner e Weber, 1998; Weber *et al.*, 2002). Por essa razão, as hemoglobinas sofrem grande pressão evolutiva, o que resulta no desenvolvimento de mecanismos regulatórios complexos desenvolvidos para satisfazer os requerimentos fisiológicos dos organismos (Giardina *et al.*, 2004; Jensen, 2004).

A relação entre transporte de oxigênio e mecanismos regulatórios em hemoglobinas pode ser evidenciada pela disponibilidade de oxigênio em ambientes aquáticos de água doce, os quais mostram acentuada variação diária, espacial e sazonal (Val e Almeida-Val, 1995). A respiração em meio aquático demanda grande energia metabólica, pois a

concentração de oxigênio é baixa mesmo em água saturada de ar (Withers, 1992). Ao mesmo tempo, a respiração de organismos e a decomposição de matéria orgânica podem causar grandes diminuições nas tensões de oxigênio em ambientes aquáticos de água doce, o que resulta em condições hipóxicas, especialmente durante o período noturno quando a fotossíntese não ocorre. Além disso, a superfície de águas eutróficas é frequentemente coberta com plantas, as quais dificultam a difusão de oxigênio (Nikinmaa, 2002).

Assim, nenhum outro grupo de vertebrados está sujeito a tão grandes variações ambientais como os peixes (Hochachka e Somero, 2002). Em peixes, podem ser identificadas estratégias adaptativas, com relação às hemoglobinas, para a otimização da captação e do transporte de oxigênio frente às alterações ambientais, como a multiplicidade de componentes e alterações na afinidade da hemoglobina ao oxigênio (Di Prisco e Tamburrini, 1992). As flutuações na disponibilidade de oxigênio também são consideradas como o fator mais importante na evolução de peixes de respiração bimodal (Graham, 1997).

Com relação ao estudo com hemoglobinas em peixes de respiração bimodal, os cascudos (Loricariidae) são um grupo de destaque na literatura, com estudos realizados desde a Expedição Alpha Helix 1976/1977, referentes ao efeito do pH na cinética das reações de oxigênio e monóxido de carbono com hemoglobina de *Loricariichthys* sp (Focesi *et al.*, 1978), à separação e caracterização de componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis* (Brunori *et al.*, 1978) e, ao equilíbrio de oxigenação de hemoglobinas de *Hypostomus* e *Pterygoplichthys* e suas sensibilidades a fosfatos orgânicos (Weber e Wood, 1979). Posteriormente, Val *et al.* (1985 e 1990) avaliaram os padrões eletroforéticos, os fosfatos intraeritrocitários e o efeito Bohr das hemoglobinas de, respectivamente, *Hypostomus regani* e *Pterygoplichthys multiradiatus* e, mais recentemente, Smarra *et al.* (2000) e Delatorre *et al.* (2001) realizaram a purificação, cristalização e difração de raio-X de hemoglobinas de *Pterygoplichthys anisitsi*.

Com relação à análise da fisiologia respiratória de *Pterygoplichthys anisitsi*, o objetivo deste estudo foi a caracterização estrutural e funcional das hemoglobinas em espécimes em condições de normóxia, submetidos à hipóxia gradual e expostos ao ar atmosférico por 24 horas.

## 2. Material e Métodos

### *Animais experimentais*

Espécimes adultos de *Pterygoplichthys anisitsi* [massa corporal ( $M_C$ )= 0,139-0,382 kg] foram obtidos no CAUNESP (Centro de Aqüicultura da UNESP, *Campus* de Jaboticabal, SP, Brasil). No laboratório, os peixes foram mantidos em tanque (1.000 L) com fluxo de água contínuo e aeração constante, a 23-25°C e alimentados com ração comercial e folhas de alface (*Lactuca sativa*).

### *Protocolo experimental*

*Hipóxia gradual.* Um espécime de *P. anisitsi* foi colocado no interior de um respirômetro e transferido para o sistema experimental de respirometria (38 L) de fluxo constante. O experimento foi iniciado 18 h após a introdução no respirômetro. As reduções das tensões de oxigênio (140, 100, 70, 50, 40, 30 e 20 mmHg) da água do tanque experimental foram feitas de forma gradual por meio de borbulhamento de nitrogênio através de dispersores. O tempo para a redução de uma tensão para a imediatamente inferior foi de aproximadamente 10 min. Após a estabilização, cada tensão experimental foi mantida constante durante 45 min. Os teores de oxigênio para a manutenção das diferentes tensões foram constantemente monitorados por um analisador digital de oxigênio FAC-204A. O tanque de respirometria permaneceu fechado durante o experimento, permitindo assim a manutenção da tensão de oxigênio experimental desejada por períodos de tempo relativamente prolongados. Após as reduções das tensões de oxigênio, o espécime foi retirado do respirômetro e, imediatamente, realizada a retirada de sangue por punção da veia caudal.

*Exposição aérea.* Um espécime de *P. anisitsi* foi colocado em um sistema experimental de PVC e exposto ao ar atmosférico por 24 h em ambiente com um fino filme de água suficiente para manutenção da umidade e evitar o dessecamento do animal. Após as 24 h de exposição aérea foi realizada a retirada de sangue por punção da veia caudal.

### *Coleta de sangue e solução de hemoglobina*

As amostras de sangue dos espécimes foram obtidas por punção da veia caudal com seringas heparinizadas. O sangue foi centrifugado a  $1.085 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min, em centrífuga Sorvall RC-5B e o plasma foi eliminado. Em seguida, os eritrócitos foram lavados três vezes consecutivas com solução salina 0,9% (9g de NaCl em 1.000 mL de água destilada). Após esse procedimento, o precipitado (eritrócitos) foi mantido em congelador, a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em tubos de ensaios para utilização em experimentos posteriores.

Quando para uso imediato, após a última lavagem, a amostra foi hemolisada adicionando-se tampão Tris HCl 10 mM e EDTA 0,005 M (pH 8,0). Seguiu-se o congelamento e descongelamento da amostra por três vezes para uma hemólise mais efetiva e, a centrifugação a  $20.200 \times g$ , a  $4^{\circ}\text{C}$  por 20 min, em centrífuga Sorvall RC-5B.

A solução de hemoglobina assim obtida foi utilizada nos experimentos de equilíbrio de oxigenação da hemoglobina *stripped* e nas eletroforeses em gel de amido.

### *Hemoglobina stripped e redução de metahemoglobina*

As amostras de hemolisado de sangue foram filtradas em coluna de Sephadex G-25, com a presença de ditionito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ), para a obtenção de uma solução de hemoglobina isenta de efetores alostéricos (*stripped*) e, para a redução de metahemoglobina, geralmente presente. A hemoglobina elui rapidamente pela coluna por não se ligar à resina. Quando essa passa pelo ditionito de sódio reduz-se totalmente, passando à desoxihemoglobina. Ao sair da coluna, a hemoglobina entra em contato com o ar atmosférico, oxigenando-se por completo e conservando o ferro reduzido ( $\text{Fe}^{+2}$ ).

A resina foi empacotada em uma coluna de 35 cm de comprimento por 1 cm de diâmetro e equilibrada com solução tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Após a resina estar equilibrada, a coluna foi fechada retirando-se o eluente que estava acima do topo da resina. A seguir, foi adicionado à coluna 1 mL de solução de ditionito de sódio a 5% em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. A coluna foi aberta e tão logo a solução de ditionito penetrou na resina, aplicou-se de 2 a 3 mL de solução de hemoglobina com o uso de pipeta de Pasteur. A seguir, a coluna foi ligada a um reservatório contendo Tris-HCl 50 mM pH 8,0.

A primeira fração de hemoglobina a sair da coluna foi descartada devido à sua alta diluição. A segunda fração coletada em um tubo de ensaio foi a amostra de hemoglobina *stripped* utilizada nos experimentos de equilíbrio de oxigenação. Esses procedimentos foram realizados no máximo 20 min antes do início dos experimentos.

*Equilíbrio de oxigenação em solução de hemoglobina: método espectrofotométrico*

De acordo com o seu grau de oxigenação, a hemoglobina expõe diferentemente os átomos de ferro de seus grupos tetrapirrólicos (Antonini e Brunori, 1971). Hemoglobinas com taxas de oxigenação diferentes possuem diferentes conformações espaciais, com diferentes espectros de absorção medidos entre 500 e 600 nm. Por meio da análise desses espectros diferenciais pode-se correlacionar pressão de oxigênio e taxa de oxigenação da hemoglobina.

A afinidade da hemoglobina ao oxigênio foi determinada de acordo com o método descrito por Riggs e Wolbach (1956). Foram usados tonômetros cuja parte inferior é uma cubeta de vidro de 1 cm de percurso ótico.

Para o cálculo do volume da solução de hemoglobina a ser adicionada ao tonômetro foi utilizada a seguinte equação:  $V = 0,85 \cdot 3 / L \cdot 60$ , onde V: volume de hemoglobina para os tonômetros (mL), 0,85: densidade ótica desejada em 580 nm, 3: volume da cubeta dos tonômetros (mL), L: leitura da concentração de hemoglobina em 580 nm, e 60: diluição.

Ao volume da solução de hemoglobina determinado por essa equação foi adicionado 0,3 mL de tampão Tris ou Bis-Tris 0,1 M e água destilada para completar 3 mL.

A partir daí, a amostra *stripped* de hemoglobina foi desoxigenada por meio de passagem de nitrogênio (N<sub>2</sub>) e em seguida, submetida a vácuo, com subsequente agitação em banho rotativo. Após a desoxigenação foi traçado um espectro de absorção de 500 a 600 nm em um espectrofotômetro HP UV-VIS G 1107A acoplado a um micro-computador IBM compatível. Obtida a primeira curva, foram injetadas quantidades crescentes e conhecidas de ar e traçados novos espectros.

Após um mínimo de quatro injeções de ar, cada tonômetro foi aberto à pressão de oxigênio ambiente sobre a amostra, sendo traçada a última curva que corresponde ao espectro de absorção da hemoglobina 100% oxigenada.

A partir dos espectros de absorção obtidos, as oxigenações parciais da hemoglobina foram calculadas em três comprimentos de onda (540, 560 e 580 nm) obtendo-se a média aritmética das saturações parciais de cada injeção de ar (Y).

Para cada oxigenação a pressão de oxigênio foi calculada pela equação:  $PO_2 = R.V$ , onde,  $PO_2$ : pressão de oxigênio no interior do tonômetro (mmHg), V: volume de ar injetado (mL) e R: constante determinada por  $R = T_b/T_a \{0,2098 [PB_C - (P_V.UR)]\} / V_t - V_a$ , onde  $T_b$ : temperatura do banho (K),  $T_a$ : temperatura ambiente (K),  $PB_C$ : pressão barométrica corrigida,  $P_V$ : pressão de vapor da água, UR: umidade relativa do ar e  $V_a$ : volume da amostra colocada no tonômetro (Laboratório do Prof. Dr Joseph Bonaventura, Duke University, EUA).

Para cada tonômetro foi traçado um gráfico de  $\log PO_2 \cdot \log Y/1-Y$  para a determinação do valor de  $P_{50}$  e o coeficiente de Hill (n) pela declividade da reta obtida.

O coeficiente de Hill (n) indicou a cooperatividade das interações heme-heme, correspondendo ao valor do coeficiente angular da reta de regressão obtida para  $PO_2/\log Y/1-Y$ .

A pressão de oxigênio necessária para saturar 50% dos sítios da hemoglobina ( $P_{50}$ ), corresponde ao valor zero de  $\log PO_2/\log Y/1 - Y$ . Como as curvas foram feitas em diferentes pHs, foi elaborada uma representação gráfica do efeito Bohr ( $\Phi = \Delta \log P_{50} / \Delta pH$ ).

#### *Equilíbrio de oxigenação do sangue total: método gasométrico*

O método baseia-se na determinação contínua do oxigênio dissolvido em solução tamponada, contendo sangue e fermento biológico. Inicialmente, o fermento consome todo o oxigênio dissolvido na solução e, na tentativa de manter o equilíbrio da pressão parcial de oxigênio, o sangue cede o oxigênio ligado à hemoglobina ao meio.

As curvas de dissociação do complexo  $HbO_2$  no sangue foram traçadas em diferentes pHs com tampões isotônicos Bis-Tris/HCl 0,1 M (pH 6,0 a 7,4) e Tris-HCl 0,1 M (pH 7,6 a 9,0) e com auxílio de um monitor biológico YSI e um registrador CG, segundo metodologia descrita por Mangun e Kodon (1975) e Johansen *et al.* (1978).

Foram colocados 5 mL de cada tampão, fermento e algumas gotas de sangue na cubeta do eletrodo polarográfico. Após vigorosa agitação, o equipamento foi rapidamente

ligado e a curva de consumo de oxigênio foi detectada por um eletrodo polarográfico e registrada em um registrador gráfico. As curvas obtidas assinalam a variação decorrente do consumo de oxigênio do meio pelo fermento e da tentativa de manutenção de um equilíbrio pelo sangue. O pH inicial e final foi registrado.

As pressões parciais de oxigênio necessárias para uma saturação de 20, 40, 50, 60 e 80% de oxigênio do sangue foram obtidas pela equação:  $PO_2 (n) = PB \cdot 0,2098 \cdot Li / 4L_{100}$ , onde PB: pressão barométrica, Li: leitura obtida para cada porcentagem de saturação,  $L_{100}$ : leitura em 100% e n: porcentagem de hemoglobina ligada ao oxigênio.

Os valores de  $P_{50}$  (pressão de oxigênio necessária para saturar 50% da hemoglobina) foram convertidos para valores logarítmicos e plotados contra o pH final. As curvas de efeito Bohr ( $\Phi = P_{50} / \Delta pH$ ) foram traçadas a partir de regressão linear. Os resultados foram expressos em forma logarítmica e construído o gráfico Y/1-Y em função de  $\log PO_2$ .

#### *Eletroforese em gel de amido*

A eletroforese é um método físico-químico de separação utilizado no estudo da estrutura de compostos biológicos. Diferentes proteínas diferem em sua seqüência de aminoácidos e no conteúdo dos mesmos, bem como, na sua carga líquida a um dado pH. Esse método utiliza-se dessa diferença para separar proteínas em um campo elétrico e neste estudo foi utilizado para verificar o padrão eletroforético das amostras e a existência de variação intraespecífica.

O sistema de eletroforese em gel de amido utilizado foi o horizontal descrito por Smithies (1955, 1959). Na preparação do gel foi utilizado amido de milho a uma concentração de 13%, obtido segundo Val *et al.* (1981). Nesse sistema, as proteínas são separadas segundo sua carga elétrica e os poros do gel atuam como um filtro ao separar as moléculas segundo seus tamanhos e formas.

Para confecção do gel foi utilizado tampão Tris-Borato-EDTA ácido pH 8,6 (0,9 M Tris, 0,5 M ácido bórico, 0,02 M EDTA ácido) diluído 40 vezes com molaridade final de 0,036 M. Nesse pH, a concentração do amido 13% é suficiente para obter um gel com boas propriedades mecânicas e separativas. Nas cubas foi utilizado tampão Borato pH 8,5 0,35 M.

Ao término da cocção e deaeração, o gel foi despejado uniformemente em uma placa de acrílico, com óleo mineral em sua superfície para facilitar sua posterior retirada.

Após o resfriamento do gel até 4°C, as amostras foram aplicadas através de retângulos de papel Whatman 3MM (10 x 6mm) embebidos nas amostras de hemoglobina e inseridos a uma distância de 7 cm de distância da extremidade catódica do gel.

As migrações eletroforéticas foram feitas a 4°C, sendo aplicado ao gel uma diferença de potencial de 5 V/cm e uma corrente de 1,25 mA/cm durante 6 h utilizando-se uma fonte de tensão Permatron. Ocorrida a migração, o gel foi cortado no sentido horizontal, sendo a metade superior corada com Amido Black (solução saturada de amido black, metanol e água destilada, v/v), para proteínas totais, e a inferior tratada com Benzidina (benzidina 1 g, nitroprussiato de sódio 1 cristal e metanol qsp 75 mL) para revelação pela atividade peroxidásica das hemoglobinas. Na lavagem dos géis foram utilizadas soluções de ácido acético 0,2 volumes, metanol 1 volume e água destilada 1 volume para Amido Black e, éter 1 volume, metanol 2 volumes, ácido acético qsp para abaixar o pH a 4,0 e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 20V) 0,5 mL.

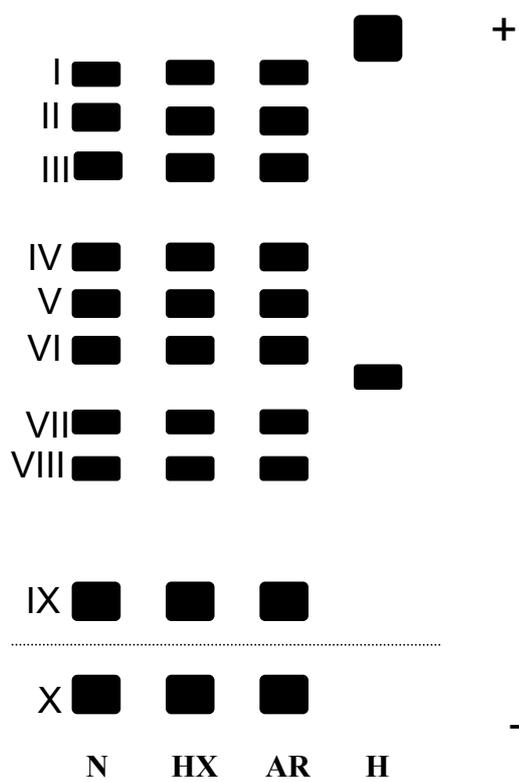
Após a revelação das bandas em gel de amido, as eletroforeses foram transparentizadas, colocando-as entre duas folhas de papel celofane esticadas em um bastidor e submetidas à desidratação em temperatura ambiente.

### 3. Resultados

#### *Estudo estrutural: eletroforese em gel de amido*

O hemolisado de *Pterygoplichthys anisitsi* revelou a presença de dez componentes hemoglobínicos, os quais foram numerados de acordo com a mobilidade anódica decrescente. O padrão eletroforético apresentou nove componentes anódicos, dois grupos de componentes rápidos (I, II, III e IV, V, VI), um grupo de componentes com migração intermediária (VII, VIII) e um componente de migração lenta (IX). O componente maior (X) correspondeu ao componente catódico (Fig. 1).

Nos padrões eletroforéticos não foram visualizadas diferenças evidentes entre os espécimes (n= 6), dessa forma não parecendo haver indicação de variação intraespecífica.



**Figura 1.** Representação esquemática dos padrões eletroforéticos das hemoglobinas de *Pterygoplichthys anisitsi*, normóxia (N), hipóxia (HX), ar 24 horas (AR), comparativamente a humana (H). A linha tracejada corresponde ao ponto de aplicação das amostras.

*Estudos funcionais: métodos espectrofotométrico e gasométrico*

O comportamento funcional das hemoglobinas em sangue total e hemolisado *stripped* mostraram ausência de efeito Bohr, no sangue total em condição de normóxia, ou efeito Bohr normal nas demais condições, ou seja, valores mais elevados de  $P_{50}$  à medida que o pH se acidifica. (Tabela 1 e Fig. 2).

O sangue total, na condição de normóxia, não mostrou a existência de efeito Bohr, por toda a faixa de pH analisada, enquanto que na condição de hipóxia foi verificada a maior amplitude de efeito Bohr ( $\Phi = -0,24$ ), o que indica uma maior dependência do pH (Tabela 1 e Fig. 2).

Ainda no sangue total, nas três condições estudadas, foram verificados valores de  $P_{50}$  maiores do que aqueles obtidos em hemolisado *stripped*, o que indica um aumento da afinidade da hemoglobina ao oxigênio na ausência de moduladores (*stripped*). Já entre as condições estudadas tanto em sangue total quanto no hemolisado *stripped*, a hemoglobina na condição de hipóxia apresentou valores menores de  $P_{50}$ , respectivamente, 4,4 e 1,7 mmHg, indicando um aumento na afinidade quando comparada às condições de normóxia e exposição ao ar (Tabela 1 e Fig. 2).

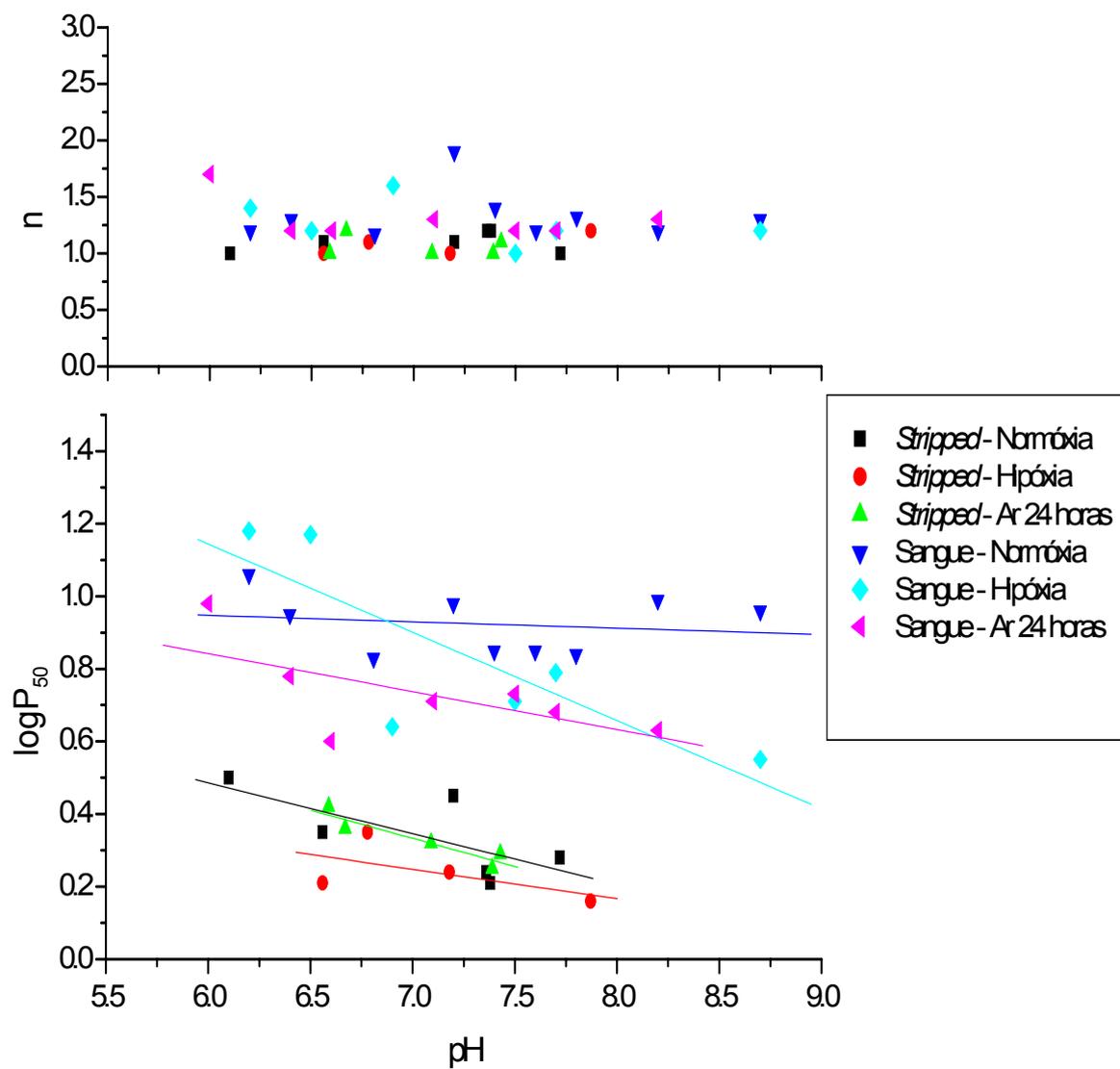
Entre os valores de  $P_{50}$ , quando comparadas cada uma das condições estudadas em sangue total e hemolisado *stripped*, foram obtidas razões similares entre hemolisado *stripped*/sangue total, 0,41, 0,39 e 0,40, respectivamente, para a condição de normóxia, hipóxia e exposição ao ar (Tabela 1 e Fig. 2).

Na condição de exposição ao ar, os valores de  $P_{50}$  foram próximos àqueles da condição de normóxia tanto entre a forma *stripped* quanto no sangue total, 2,1 e 2,8 mmHg, e 5,1 e 6,8 mmHg, respectivamente.

Os coeficientes de Hill (n), em hemolisado, foram iguais a 1,0 nas condições de hipóxia e exposição ao ar e igual a 1,1 na condição de normóxia, o que refletiu nenhuma ou baixa cooperatividade, respectivamente. No sangue total, os valores de cooperatividade aumentaram para 1,7, 1,6 e 1,3 para as condições de normóxia, hipóxia e exposição ao ar.

**Tabela 1.** Valores de efeito Bohr ( $\phi$ ), log de  $P_{50}$ ,  $P_{50}$  e cooperatividade (n) para diferentes condições do sangue total e hemolisado *stripped* de *Pterygoplichthys anisitsi*.

	Bohr ( $\phi$ )	log $P_{50}$ (pH: próx. 7,0)	$P_{50}$	Hill (n)
sangue: normóxia	-0,02	0,83	6,8	1,7
sangue: hipóxia	-0,24	0,64	4,4	1,6
sangue: ar 24 horas	-0,10	0,71	5,1	1,3
<i>stripped</i> : normóxia	-0,14	0,45	2,8	1,1
<i>stripped</i> : hipóxia	-0,10	0,24	1,7	1,0
<i>stripped</i> : ar 24 horas	-0,15	0,32	2,1	1,0



**Figura 2.** Comportamento funcional da afinidade por  $O_2$  ( $P_{50}$ ) e cooperatividade ( $n$ ) em relação ao pH dos hemolisados *stripped* e em relação ao sangue total de *P. anisitsi* em condições de normóxia, hipóxia e exposição ao ar por 24 horas.

#### 4. Discussão

Variações nas propriedades funcionais de hemoglobinas resultam parcialmente de variações na estrutura molecular que determinam as propriedades intrínsecas de ligação do oxigênio e parcialmente de mudanças regulatórias nas condições físico-químicas sob as quais elas operam *in vivo*, como no pH eritrocitário e, no tipo e concentração de efetores heterotrópicos, como os fosfatos orgânicos que diminuem a afinidade hemoglobina-oxigênio (Weber *et al.*, 2000).

Diferentemente da maioria dos mamíferos, os quais possuem um componente hemoglobínico com alta concentração, muitas espécies de peixes possuem iso-hemoglobinas que mostram diferenças consideráveis na seqüência de aminoácidos, designados como isoformas (Di Prisco e Tamburrini, 1992; Tamburrini *et al.*, 2001). Em alguns casos, os vários componentes têm distintamente diferentes propriedades funcionais, que leva à hipótese de que a multiplicidade representa um mecanismo de adaptação frente a uma variável ambiental (Bossa *et al.*, 1982). De acordo com Riggs (1979), sistemas de hemoglobinas múltiplas podem ter uma importante função na manutenção da solubilidade no interior dos eritrócitos, uma vez que hipóxia normalmente aumenta a desoxi-hemoglobina circulante, a qual é menos solúvel do que a forma oxi-hemoglobina.

Espécies de peixes amazônicas demonstram serem capazes de regular a concentração de cada componente com relação às condições ambientais (Val, 1986). Apesar disso, o mesmo autor comenta que tais ajustes não parecem ser rápidos o suficiente para reduzir os efeitos das variações ambientais diárias, mas que os ajustes parecem regular a síntese de suas cadeias de hemoglobinas de acordo com as oscilações sazonais, como demonstrado em *Prochilodus nigricans* (Val *et al.*, 1992).

Espécimes de *Hypostomus regani* provenientes de ambientes lótico e lântico exibiram diferenças significativas nas concentrações relativas de seus componentes anódicos (Val *et al.*, 1985). Da mesma forma, *Pterygoplichthys multiradiatus* em condições naturais, em período de baixa concentração de oxigênio, e submetidos experimentalmente a altos e baixos níveis de oxigênio por 30 dias exibiram diferenças nas concentrações relativas dos componentes detectados em eletroforese (Val *et al.*, 1990).

As concentrações relativas dos componentes detectados nos espécimes de *P. anisitsi* não exibiram diferenças evidentes entre as condições experimentais (hipóxia gradual por 4 horas e exposição ao ar por 24 horas) em relação à condição normóxica. Dessa forma, os tempos das condições experimentais parecem ter sido insuficientes para qualquer alteração nos padrões exibidos eletroforeticamente.

De acordo com Hochachka e Somero (2002), os peixes podem ser categorizados de acordo com suas isoformas de hemoglobina em (a) classe I, a qual compreende espécies que expressam eletroforeticamente hemoglobinas anódicas, com efeito Bohr normal, as quais exibem efeitos de pH e de temperatura relativamente normais [*Pimelodus maculatus*, Reischl (1977) e *Hypostomus* sp, Weber e Wood (1979)], em (b) classe II, a qual inclui espécies de peixes que expressam hemoglobinas anódicas (propriedades iguais à classe I) e que expressam hemoglobinas catódicas, as quais exibem excepcionalmente alta afinidade ao oxigênio e pequeno ou mesmo efeito Bohr reverso (por meio do qual a alta afinidade ao oxigênio não é afetada por baixo pH), e exibem baixa sensibilidade térmica [*Pterygoplichthys pardalis*, Brunori *et al.* (1979) e *Hoplosternum littorale*, Garlick *et al.* (1979)] e, em (c) classe III, a qual se refere às espécies de peixes que expressam hemoglobinas que são sensíveis ao pH (efeito Bohr normal) mas relativamente insensíveis à temperatura (Bonaventura *et al.*, 1975).

Com base nessa categorização em isoformas de hemoglobinas, *P. anisitsi* é pertencente à classe II, apresentando dez componentes hemoglobínicos, sendo o maior deles catódico. Funcionalmente, os componentes catódicos exibem alta afinidade ao oxigênio e insensibilidade ao pH e desta forma podem auxiliar como transportadores e reserva de oxigênio sob períodos de hipóxia e/ou acidose, quando os componentes anódicos são incapazes de descarregar oxigênio suficiente (Weber, 1988; Fago *et al.*, 1995, Tamburrini *et al.*, 2001).

Para *P. anisitsi* parece ser importante a manutenção de um sistema com hemoglobinas múltiplas detectado nos estudos eletroforéticos, uma vez que essa espécie se mostrou resistente às baixas tensões de oxigênio utilizadas nas condições experimentais. Assim, a manutenção de um sistema com hemoglobinas múltiplas na espécie é uma adaptação que confere a capacidade de sobrevivência em ambientes naturais caracterizados por águas hipóxicas ou anóxicas, como verificado em regiões no rio Preto (Cetesb, 2002, 2004).

Assim, o componente catódico verificado em *P. anisitsi* pode contribuir para a manutenção da oxigenação do organismo, o que pode torná-lo capaz em resistir à baixa disponibilidade de oxigênio ambiental.

Entretanto, não há uma relação clara entre o número de componentes hemoglobínicos frente às condições ambientais. Assim, o significado adaptativo da multiplicidade de componentes não é totalmente esclarecido e, estudado por meio da separação dos componentes e da análise de suas propriedades funcionais individuais (Riggs, 1979; Val, 1993).

A escolha dos meios de migração eletroforética é feita de acordo com determinados fatores, como o poder de resolução, o custo e a rapidez. No presente trabalho, foram detectados dez componentes eletroforéticos utilizando-se o gel de amido como meio de migração. A escolha desse suporte foi devido a apresentar alto grau de definição analítica dos componentes separados quando comparado à eletroforese de focalização isoelétrica em agarose (Naoum, 1993) e eletroforese em acetato de celulose (Smarra, 1997), nas quais foram detectados sete e quatro componentes, respectivamente, para a mesma espécie.

As propriedades funcionais do sangue refletem a interação entre os produtos gênicos (hemoglobinas) e os meios extra e intracelular, possuindo grande valor no entendimento dos hábitos e habitats de peixes (Val *et al.*, 1985 e 1986). A estrutura quaternária da hemoglobina possibilita a interação entre os sítios de ligação de oxigênio e, desses com outros ligantes presentes no meio caracterizando a alosteria, a qual propicia à hemoglobina desempenhar suas funções fisiológicas. A afinidade da hemoglobina ao oxigênio é convenientemente representada pela  $P_{50}$  (pressão parcial de oxigênio na qual 50% dos sítios de ligação da hemoglobina estão saturados com oxigênio).

Em *P. anisitsi*, os valores de  $P_{50}$  obtidos para os hemolisados *stripped* nos peixes mantidos em condições de normóxia, hipóxia e exposição ao ar foram menores do que para o sangue total nas mesmas condições, o que indica um acréscimo na afinidade de ligação do oxigênio à molécula de hemoglobina nos hemolisados *stripped*. A menor afinidade da hemoglobina ao oxigênio verificada no sangue total é devida à regulação dos efetores alostéricos, tais como cloreto ( $Cl^-$ ), prótons ( $H^+$ ), dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e os fosfatos orgânicos, juntamente com temperatura (Weber e Jensen, 1988; Weber *et al.*, 2000). Em

geral, o aumento de qualquer desses fatores ou parâmetros físicos dentro dos eritrócitos causa uma diminuição na afinidade da hemoglobina ao oxigênio.

Entre os hemolisados *stripped*, nas condições estudadas para *P. anisitsi*, houve afinidade mais elevada observada na condição de hipóxia ( $P_{50}$ = 1,7 mmHg), o que pode ser devido às diferenças de concentração dos componentes, apesar de que não tenham sido detectadas, visualmente, diferenças nas eletroforeses. A afinidade também pode ser determinada pelas diferenças funcionais dos componentes hemoglobínicos (Wilhelm e Weber, 1983). Neste estudo, não foram avaliadas as iso-hemoglobinas isoladamente, o que poderia indicar diferenças funcionais na afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Por exemplo, Francisco-Amaral (1989) analisou as propriedades funcionais da hemoglobina total de *Hypostomus regani* e de suas iso-hemoglobinas e encontrou diferenças funcionais entre as iso-hemoglobinas da espécie quanto à afinidade de suas hemoglobinas ao oxigênio.

Tanto entre as condições de hemolisado *stripped* quanto entre as mesmas condições de sangue total estudadas, a condição de hipóxia apresentou valores mais baixos de  $P_{50}$  (1,7 e 4,4 mmHg, respectivamente), do que nas condições de normóxia ( $P_{50}$ = 2,8 e 6,8 mmHg) e exposição ao ar ( $P_{50}$ = 2,1 e 5,1 mmHg), o que indica uma afinidade mais elevada da hemoglobina ao oxigênio quando *P. anisitsi* está submetido à condições de baixa disponibilidade de oxigênio.

Os valores de  $P_{50}$  encontrados neste estudo para o sangue total de *P. anisitsi* são comparáveis aos registrados para espécies de água doce amazônicas com respiração aquática (*Hoplias malabaricus*,  $P_{50}$ = 6,05 mmHg), respiração bimodal (*Hoplerythrinus unitaeniatus*,  $P_{50}$ = 12,07 mmHg; *Pterygoplichthys* sp.,  $P_{50}$ = 10,40 mmHg; *Synbranchus marmoratus*,  $P_{50}$ = 7,05 mmHg) e respiração aérea obrigatória (*Electrophorus electricus*,  $P_{50}$ = 9,7 mmHg; *Lepidosiren paradoxa*,  $P_{50}$ = 8,0 mmHg) (Johansen *et al.*, 1978).

A exposição ao ar por 24 horas de *P. anisitsi*, com relação à afinidade do oxigênio à molécula de hemoglobina, mostrou resultados similares com a condição de normóxia,  $P_{50}$ = 2,1 e 2,8 mmHg no hemolisado e,  $P_{50}$ = 5,1 e 6,8 mmHg no sangue. Essa similaridade exibida entre a  $P_{50}$  ao lado da capacidade morfológica do estômago na respiração aérea (ver capítulo 3) é mais uma característica que contribui para a respiração aérea garantindo a vida da espécie em ambientes com disponibilidade de oxigênio limitante.

A diferença observada entre os valores de  $P_{50}$  da solução de hemolisado *stripped* e do sangue total pode ser atribuída à presença de fosfatos orgânicos nos eritrócitos. Além disso, podem existir outros fatores que contribuem para as diferenças encontradas, incluindo maior concentração de hemoglobina na célula, portanto maior potencial de ligação; presença de  $\text{CO}_2$  no sangue, o que diminuiria o pH e conseqüentemente a afinidade ao  $\text{O}_2$ ; e o fato que o pH intraeritrocitário é menor que o pH do plasma, que são os valores medidos para o sangue total (Wood *et al.*, 1979).

Johansen *et al.* (1978) enfatizaram que as propriedades respiratórias do sangue, como a alta afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, está correlacionada com o meio de troca gasosa, dessa forma o que favorece a adaptação de espécies amazônicas de peixes a seus ambientes em que há oscilações diárias e sazonais nas concentrações de oxigênio. Do mesmo modo, a alta afinidade verificada para *P. anisitsi* parece ser uma característica que juntamente com as características fisiológicas e morfológicas (capítulos 2, 3, 4) tornam a espécie resistente à ambientes com pouca disponibilidade de oxigênio.

Em peixes, comumente, é observado o efeito Bohr, isto é, a afinidade da hemoglobina ao oxigênio diminui à medida que o pH diminui. Esse processo possui importante significado fisiológico ao facilitar a ligação do oxigênio à hemoglobina nas brânquias e a liberação desse gás para os tecidos com o aumento da acidez (Wood e Lenfant, 1979; Nikinmaa, 1990; Val e Almeida-Val, 1995).

O significado fisiológico do efeito Bohr facilitando a liberação de oxigênio para os tecidos é bem compreendido, mas o significado das diferenças na amplitude desse efeito entre as espécies não é clara. As espécies sujeitas as amplas variações de  $\text{pCO}_2$  e pH tendem a manter a regulação com a presença de um pequeno efeito Bohr, pois a presença de uma hemoglobina com amplo efeito Bohr, durante uma acidose interna, poderia impedir a captação do oxigênio nas brânquias e o peixe morreria por asfixia (Powers, 1979; Wood e Lenfant, 1979).

Neste estudo, a amplitude do efeito Bohr detectada para os hemolisados *stripped* variaram entre  $\Phi = -0,10$  em hipóxia,  $\Phi = -0,14$  em normóxia e  $\Phi = -0,15$  em exposição ao ar. Já os dados obtidos para o equilíbrio de oxigenação do sangue total mostraram um efeito Bohr nulo em condição de normóxia ( $\Phi = -0,02$ ), enquanto que em condição de hipóxia e exposição ao ar um efeito Bohr normal ( $\Phi = -0,24$  e  $\Phi = -0,10$ , respectivamente). Em *P.*

*anisitsi*, quando em condição de hipóxia, a elevação do efeito Bohr normal no sangue total é benéfica, visto que o efeito Bohr normal possibilita uma maior eficiência de tomada de oxigênio nas brânquias (pH alcalino: aumento de afinidade) e liberação desse gás nos tecidos (pH ácido: diminuição da afinidade), ou seja, quando a disponibilidade de oxigênio é baixa, há a necessidade de um eficiente sistema de tomada e liberação desse gás. A presença de um efeito Bohr nulo para as hemoglobinas de *P. anisitsi* em normóxia e de um efeito Bohr normal em hipóxia e exposição ao ar foram efeitos já verificados em *Hypostomus regani* (Val *et al.*, 1985), *Gymnotus carapo* (Taieiro, 1993) e *Hoplias malabaricus* (Francisco, 1995).

Com relação a essas diferenças encontradas entre os experimentos de equilíbrio de oxigenação do sangue total, Schwantes *et al.* (1993) também observaram o mesmo efeito em *Geophagus brasiliensis* e verificaram diferenças significativas entre o pH da solução (pHe) e o pH intraeritrocitário (pHi), sendo esse último menor. Segundo esses autores, parece que os eritrócitos tendem a manter o pH no seu interior tamponado, resistindo às alterações na concentração de prótons, possivelmente devido a alguma permeabilidade seletiva da membrana eritrocitária. Segundo Nikinmaa (1990), o transporte de íons através da membrana do eritrócito é o responsável pelo controle do pH intracelular.

A partir disso, algumas considerações poderiam ser feitas sobre qual seria o fator ou fatores responsáveis para o aumento da permeabilidade da membrana. Um fator poderia ser o CO<sub>2</sub>, geralmente mais abundante no ambiente e no organismo quando a concentração de oxigênio é baixa (Schwantes *et al.*, 1993). Outra possível explicação seria que, em condições de hipóxia, há aumento na liberação de catecolaminas na circulação de teleósteos (Randall, 1982; Nikinmaa *et al.*, 1987) e, como consequência, a troca Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> através da membrana do eritrócito é ativada e o pHi aumenta no início da hipóxia.

Segundo Nikinmaa (1983, 1992), a mobilização de catecolaminas no sangue da truta *Oncorhynchus mykiss* durante hipóxia, exercício severo, ou estresse generalizado causou uma diminuição no gradiente de pH ao longo da membrana celular eritrocítica. É demonstrado que essa resposta reflete estimulação de receptores β-adrenérgicos sobre a membrana do eritrócito, conseqüente ativação de adenilato ciclase, produção de AMPc como um mensageiro intracelular e, ativação de trocadores Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> na superfície celular. A partir dessas trocas, como consequência ocorre diminuição do pH extracelular (pHe) e

aumento do intracelular (pHi). O significado adaptativo da resposta é que o aumento no pHi, juntamente com a redução de nucleosídeos fosfatados, diluição da hemoglobina e seus efetores alostéricos da célula contribuem para melhorar a capacidade de transporte do oxigênio sanguíneo e afinidade em condições de hipóxia e acidose extracelular (Val *et al.*, 1998).

Os grupos hemo de uma molécula de hemoglobina se comunicam uns com os outros. As interações entre os sítios ligantes significam que a ligação de um sítio é afetada pela presença de um ligante em outro sítio na mesma molécula. O coeficiente de Hill (n) indica a presença ou não de interações entre os hemes da hemoglobina, sendo que  $n > 1,0$  indica a presença de uma interação heme-heme positiva e  $n = 1,0$  indica falta de cooperatividade (Weber e Jensen, 1988; Val e Almeida-Val, 1995; Giardina *et al.*, 2004). A ligação cooperativa do oxigênio à hemoglobina a habilita a entregar 1,83 vezes mais oxigênio do que faria se os centros fossem independentes (Stryer, 1996).

Da mesma forma, como em outras espécies de peixes, (Johansen *et al.*, 1978; Tamburrini *et al.*, 2001; Landini *et al.*, 2002), em *P. anisitsi*, os valores de cooperatividade (n) foram em torno de 1,0 exibindo baixa ou nenhuma cooperatividade. A exemplo de outras espécies de peixe, como *Hoplias malabaricus*, na ausência de moduladores, tanto em normóxia quanto em hipóxia, os valores de *n* ficam em torno de 1,0 (Riggs *et al.*, 1979; Francisco-Amaral, 1995).

O comportamento do hemolisado e sangue de *P. anisitsi*, exceto no sangue em condição de normóxia, pode ser explicado pelo efeito Bohr normal ou alcalino. Em pH ácido, a alta concentração de íons  $H^+$  estabiliza a hemoglobina no estado desoxigenado com alto  $P_{50}$ . Em pH alcalino, o efeito de íons  $H^+$  é reduzido, em virtude da desproteíntização dos resíduos envolvidos no efeito Bohr (Riggs, 1998).

Como observado em seu ambiente natural, essa espécie não deixa seu habitat devido a condições de hipóxia e anóxia devido à capacidade de realizar respiração aérea (Garutti e Figueiredo-Garutti, 2000). Contudo, apesar da obtenção do oxigênio com o comportamento de engolfamento de ar e absorção estomacal (capítulos 2 e 3), isso não ajusta completamente a fisiologia da espécie à baixa disponibilidade de oxigênio. Como observado aqui, a partir da caracterização estrutural e funcional das hemoglobinas de *P.*

*anisitsi*, outras modificações na sua fisiologia respiratória são adicionalmente necessárias para que a espécie seja capaz de sobreviver em ambientes hipóxicos e anóxicos.

Ainda com relação à capacidade de sobreviver em ambientes hipóxicos e anóxicos também há de se considerar a mioglobina, a qual possui uma maior afinidade ao oxigênio do que a hemoglobina. A mioglobina se expressa em miócitos oxidativos do músculo esquelético e cardíaco, onde desempenha a função na estocagem de oxigênio, além de facilitar a difusão de oxigênio dos capilares para a mitocôndria (Noren e Williams, 2000; Hoppeler e Vogt, 2001; Fraser *et al.*, 2006). A existência e função da mioglobina em mamíferos mergulhadores são bem reconhecidas quanto à estocagem de oxigênio durante os mergulhos (Wright e Davis, 2006; Richmond *et al.*, 2006).

Entre os demais vertebrados, o réptil *Amphisbaena alba*, um escavador verdadeiro que pode regularmente ser exposto à hipóxia em seu ambiente natural, a concentração de mioglobina encontrada nos músculos esquelético e cardíaco é maior do que a encontrada em muitos outros vertebrados terrestres. A afinidade da mioglobina desse réptil a 25°C, a média da temperatura do solo em seu ambiente natural no sudeste brasileiro, é muito similar ao que é verificada em homeotermos a 37°C (Weber *et al.*, 1981).

Neste estudo, não foi investigada a mioglobina, apesar de que seria importante verificar sua concentração, afinal há uma quantidade significativa de músculo vermelho no pedúnculo caudal de *P. anisitsi*. No caso da verificação de alta concentração dessa proteína, poderia ser caracterizada outra aptidão para a resistência a ambientes de baixa disponibilidade de oxigênio ambiental.

Em conclusão, o aumento da afinidade da hemoglobina pode ser uma característica vantajosa para *P. anisitsi* suportar períodos de limitadas concentrações de oxigênio aquáticas, enquanto que em exposição aérea o aumento na afinidade aparenta não ser necessário, visto que *P. anisitsi* apresenta seu órgão de respiração aérea (estômago) com características que o capacita a absorção de oxigênio e manutenção do processo respiratório.

## 5. Referências

- Antonini E, Brunori M (1971) Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. North Holland Publishing Company, Amsterdam-London
- Bonaventura J, Bonaventura C, Sullivan B (1975) Hemoglobins and hemocyanins: comparative aspects of structure and function. *J. Exp. Zool.* 194: 155-174
- Bossa F, Savi MR, Barra D, Brunori M (1982) Structural comparison of the hemoglobin components of the armoured catfish *Pterygoplichthys pardalis*. *Biochem. J.* 205: 39-42
- Brauner CJ, Weber RE (1998) Hydrogen ion titration of the anodic and cathodic haemoglobin components of the european eel *Anguilla anguilla*. *J. Exp. Biol.* 201: 2507-2514
- Brunori M, Bonaventura J, Focesi Jr A, Galdames-Portus MI, Wilson MT (1978) Separação e caracterização dos componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis*, o acaribodó. *Acta Amazônica Supl.* 4: 231-237
- Cetesb (2002) Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. São Paulo
- Cetesb (2004) Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo. São Paulo
- Clementi ME, Condò SG, Castagnola M, Giardina B (1994) Hemoglobin function under extreme life conditions. *Eur. J. Biochem.* 223: 309-317
- Delatorre P, Smarra ALS, Fadel V, Canduri F, Dellamano M, Bonilla-Rodriguez GO, Azevedo Jr WF (2001) Purification, crystallization and Patterson search of haemoglobin IV from the armoured catfish *Liposarcus anisitsi*. *Acta Cryst.* D57: 1329-1331
- Di Prisco G, Tamburrini M (1992) The hemoglobins of marine and freshwater fish: the search for correlations with physiological adaptation. *Comp. Biochem. Physiol.* 102B: 661-671
- Fago A, Carratore V, Di Prisco G, Feuerlein RJ, Sottrup-Jensen, Weber RE (1995) The cathodic hemoglobin of *Anguilla anguilla*. *J. Biol. Chemistry* 270: 18897-18902
- Focesi A, Brunori M, Bonaventura J, Wilson MT, Galdames-Portus MI (1978) Efeito do pH na cinética das reações de oxigênio e monóxido de carbono com hemoglobina de *Loricariichthys*: peixe aeróbio. *Acta Amazônica Supl.* 4: 227-230
- Francisco AM (1995) Aspectos estruturais, funcionais e adaptativos das hemoglobinas de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1847) (Erythrinidae). Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos

- Francisco-Amaral AM (1989) Separação e caracterização funcional das hemoglobinas de cascudo *Hypostomus regani* (Loricariidae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos
- Fraser J, Mello LV, Ward D, Rees HH, Williams DR, Fang Y, Brass A, Gracey AY, Cossins AR (2006) Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. PNAS 103: 2977-2981
- Garlick RL, Bunn HF, Fyhn HJ, Fynh UEH, Martin JP, Noble RW, Powers DA (1978) Estudos funcionais dos componentes separados da hemoglobina de um bague de respiração aérea, *Hoplosternum littorale* (Hancock). Acta Amazônica Supl. 4:293-303
- Garutti V, Figueiredo-Garutti ML (2000) Migração lateral de *Liposarcus anisitsi* (Siluriformes, Loricariidae) no rio Preto, bacia do Alto Paraná, Brasil. Iheringia- Sér. Zool. 88- 25-32
- Giardina B, Mosca D, De Rosa MC (2004) The Bohr effect of haemoglobin in vertebrates: an example of molecular adaptation to different physiological requirements. Acta Physiol. Scand. 182: 229-244
- Graham JB (1997) Air breathing fishes: evolution, diversity and adaptation. Academic Press, San Diego
- Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford
- Hoppeler H, Vogt M (2001) Muscle tissue adaptations to hypoxia. J. Exp. Biol. 204: 3133-3139
- Jensen FB (2004) Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> transport. Acta Physiol. Scand. 182: 215-227
- Johansen K, Mangum CP, Lykkeboe G (1978) Respiratory properties of the blood of amazon fishes. Can. J. Zool. 56: 898-906
- Landini GF, Schwantes AR, Schwantes MLB (2002) *Astyanax scabripinnis* (Pisces: Characidae) hemoglobins: structure and function. Braz. J. Biol. 62: 595-599
- Mangun CP, Kodon M (1995) The role of coelomic hemerythrin in the sipunculid worm *Phascolopsis gouldi*. Comp. Biochem. Physiol. A 50: 777-785
- Monod J, Wyman J, Changeaux JP (1965) On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. Mol. Biol. 12: 88-118
- Naoum PC (1999) Eletroforese, Técnicas e Interpretação. Editora Santos, São Paulo

- Nikinmaa M (1983) Adrenergic regulation of haemoglobin oxygen affinity in rainbow trout red cells. *J. Comp. Physiol. B* 152: 67-72
- Nikinmaa M, Cech JJ, Ryhänen EL, Salama A (1987) Red cell function of carp *Cyprinus carpio* in acute hypoxia. *Exp. Biol.* 47: 53-58
- Nikinmaa M (1990) Vertebrate red blood cells. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Nikinmaa M (1992) Membrane transport and the control of haemoglobin oxygen-affinity in nucleated erythrocytes. *Physiol. Rev.* 72: 301-321
- Nikinmaa M (1997) Oxygen and carbon dioxide transport in vertebrate erythrocytes: an evolutionary change in the role of membrane transport. *J. Exp. Biol.* 200: 369-380
- Nikinmaa M (2002) Oxygen-dependent cellular functions: why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comp. Biochem. Physiol. A* 133: 1-16
- Noren S, Williams T (2000) Body size and skeletal muscle myoglobin of cetaceans: adaptations for maximizing dive duration. *Comp. Biochem. Physiol. A* 126: 181-191
- Powers DA, Fyhn HJ, Fyhn UEH, Martin JP, Garlick RL, Wood SC (1979) A comparative study of the oxygen equilibria of blood from 40 genera of Amazonian fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 62: 67-85
- Randall DJ (1982) The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. *J. Exp. Biol.* 100: 275-288
- Reischl E (1977) Oxygen equilibria of the hemoglobins from the freshwater catfish *Pimelodus maculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 58: 217-221
- Richmond JP, Burns JM, Rea LD (2006) Ontogeny of total body oxygen stores and aerobic dive potential in Steller sea lions (*Eumetopias jubatus*). *J. Comp. Physiol. B* 176: 535-545
- Riggs A (1979) Studies of the hemoglobins of Amazonian fishes: an overview. *Comp. Biochem. Physiol. A* 62: 257-272
- Riggs AF (1988) The Bohr effect. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 181-204
- Riggs AF (1998) Self-association, cooperativity and supercooperativity of oxygen binding by hemoglobins. *J. Exp. Biol.* 201: 1073-1084
- Riggs A, Wolbach RA (1956) Sulphydryl groups and structure of the hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 39: 585-605

- Schwantes AR, Lima IBT, Schwantes MLB (1993) Functional properties of fish hemoglobins in erythrocytes and in solution. *In: The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life.* CRC Press, Boca Raton
- Smarra ALS (1997) Caracterização parcial das propriedades funcionais e estruturais das hemoglobinas do *Liposarcus anisitsi* (Pisces). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, Campus São José do Rio Preto
- Smarra ALS, Arni RK, Azevedo Jr WF, Colombo MF, Bonilla-Rodriguez GO (2000) Crystallization and X-ray diffraction data analysis of oxyhemoglobin-I from catfish *Liposarcus anisitsi* (Pisces). *Protein Peptide Letters* 4: 349-354
- Smithies O (1955) Zone electrophoresis in starch gels: group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629-641
- Smithies O (1959) An improved procedure for starch gel electrophoresis. *Biochem. J.* 71: 585-587
- Stryer L (1996) *Bioquímica.* Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Taipeiro EF (1993) Hemoglobinas de tuvira, *Gymnotus carapo*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos
- Tamburrini M, Verde C, Olianias A, Giardina B, Corda M, Sanna, MT, Fais A, Deianna AM, Di Prisco G, Pellegrini M (2001) The hemoglobin system of the brown moray *Gymnothorax unicolor*. *Eur. J. Biochem.* 268: 4104-4111
- Val AL, Schwantes AR, Schwantes MLB, De Luca PH (1981) Amido hidrolisado em milho como suporte eletroforético. *Ciência e Cultura* 33: 992-996
- Val AL, Schwantes AR, Almeida-Val VMF, Schwantes MLB (1985) Hemoglobin, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect from lotic and lentic *Hypostomus regani* populations (São Paulo, Brasil). *Comp. Biochem. Physiol.* 80B: 737-741
- Val AL (1986) Hemoglobinas de *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818: aspectos adaptativos. Tese de Doutorado, Inpa, Manaus
- Val AL, Almeida-Val VMF, Affonso EG (1990) Adaptive features of amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). *Comp. Biochem. Physiol* 97B: 435-440
- Val AL, Affonso EG, Almeida-Val VMF (1992) Adaptive features of amazon fishes: blood characteristics of curimatã (*Prochilodus cf. nigricans*, Osteichthyes). *Physiol. Zool.* 65: 832-843

- Val AL (1993) Adaptations of fishes to extreme conditions in freshwaters. *In: The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life.* CRC Press, Boca Raton
- Val AL (1998) Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. *J. Fish Biol.* 52: 83-93
- Val AL, Almeida-Val VMF (1995) *Fishes of the Amazon and their environment: physiological and biochemical aspects.* Springer, Berlin
- Weber RE, Johansen K, Abe AS (1981) Myoglobin from the burrowing reptile *Amphisbaena alba*. Concentrations and functional characteristics. *Comp. Biochem. Physiol.* 68A: 159-165.
- Weber RE, Jensen FB (1988) Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol.* 50: 161-179
- Weber RE, Fago A, Val AL, Bang A, Van Hauwaert ML, Dewilde S, Zal F, Moens L (2000). Isohemoglobin differentiation in the bimodal-breathing amazon catfish *Hoplosternum littorale*. *J. Biol. Chemistry* 275: 17297-17305
- Weber RE, Ostojic H, Fago A (2002) Novel mechanism for high-altitude adaptation in haemoglobin of the Andean frog *Telmatobius peruvianus*. *Am. J. Physiol. R* 283: 1052-1060
- Weber RE, Wood SC (1979) Effects of erythrocytic nucleoside triphosphates on oxygen equilibria of composite and fractionated hemoglobins from the facultative air-breathing Amazonian catfish, *Hypostomus* and *Pterygoplichthys*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 62: 179-183
- Wilhelm D, Weber RE (1983) Functional characterization of hemoglobins from south brazilian freshwater teleosts: I. Multiple hemoglobins from the gut/gill breather, *Callichthys callichthys*. *Comp. Biochem. Physiol.* 75A: 475-482
- Withers PC (1992). *Comparative animal physiology.* Saunders College Publishing, New York
- Wood SC, Weber RE, Powers DA (1979) Respiratory properties of blood and haemoglobin solutions from the piranha. *Comp. Biochem. Physiol. A* 62: 163-167
- Wood SC, Lenfant C (1979) Oxygen transport and oxygen delivery. *In: Evolution of respiratory processes: a comparative approach.* Marcell Decker, New York
- Wright TJ, Davis RW (2006) The effect of myoglobin concentration on aerobic dive limit in a Weddell seal. *J. Exp. Biol.* 209: 2576-2585

## CAPÍTULO 6

### RESPOSTAS HEMATOLÓGICAS E METABÓLICAS DO CASCUDO *PTERYGOPLICHTHYS ANISITSI* (TELEOSTEI, LORICARIIDAE) SUBMETIDO À HIPÓXIA AGUDA E À EXPOSIÇÃO AÉREA

**Palavras-chave:** *Pterygoplichthys anisitsi*, hipóxia aguda, exposição ao ar, parâmetros hematológicos, perfil glicídico

## 1. Introdução

Oscilações nos níveis de oxigênio são comumente observadas em cursos d'água das regiões tropicais. Essas oscilações podem ser devido a processos físicos, como o aumento de temperatura; à poluição, a qual aumenta a demanda bioquímica de oxigênio, ou ainda a uma combinação de ambos (Muusze *et al.*, 1998; Val *et al.*, 1998; Camargo e Alonso, 2006). Os peixes que habitam águas sujeitas a essas oscilações podem apresentar ajustes fisiológicos nos parâmetros respiratórios e circulatórios (Oliveira *et al.*, 2004; Affonso e Rantin, 2005), no controle cárdio-respiratório (Sundin *et al.*, 2000; Florindo *et al.*, 2004) e nas propriedades respiratórias do sangue (Hebert e Wells, 2001; Kind *et al.*, 2002), que permitem a sobrevivência em condições de reduzido nível de oxigênio ambiental. Entretanto, algumas vezes, a redução severa do nível de oxigênio no ambiente aquático torna-se limitante e os ajustes fisiológicos são incapazes de promover qualquer compensação. Assim, os organismos para maximizá-los necessitam de ajustes bioquímicos (Hochachka e Somero, 2002). Isto é observado, principalmente, em espécies altamente tolerantes à hipóxia, as quais utilizam esses ajustes combinando supressão metabólica e ativação do metabolismo anaeróbico para compensar a insuficiência de oxigênio ambiental (van den Thillart e van Waarde, 1985; Hochachka e Somero, 2002; van Heeswijk *et al.*, 2005).

Em organismos aeróbicos, a troca de gases entre ambiente e os tecidos ocorre por difusão e tem por objetivo maximizar a produção de energia metabólica (Prosser, 1991). O processo de produção de energia no metabolismo dos açúcares inicia-se com a glicólise (anaeróbico) e continua com o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa (aeróbico) resultando no máximo de produção de moléculas de ATP devido à oxidação completa da glicose (Hochachka e Lutz, 2001). No processo de fosforilação oxidativa, o ATP é gerado como resultado do transporte de elétrons ao longo da membrana interna da mitocôndria na presença de oxigênio. A geração de ATP pela fosforilação oxidativa é interrompida pela insuficiência de oxigênio e o déficit energético é suprido pelos mecanismos de produção anaeróbica de ATP (Hochachka e Somero, 2002).

Em peixes que possuem respiração aérea acessória, esses ajustes bioquímicos dependem da eficiência de absorção de oxigênio do meio aéreo para a manutenção do

metabolismo aeróbico. Em caso contrário, há necessidade de aumentar o metabolismo anaeróbico para satisfazer os requerimentos energéticos durante a hipóxia no ambiente aquático (Jackson, 2004; MacCormack *et al.*, 2006). O modo de respiração aérea traz a vantagem de reduzir a dependência das condições de aeração da água, e outros ajustes, tais como respostas comportamentais e ventilatórias (capítulo 2), adaptações morfológicas nos órgãos de respiração aérea (capítulo 3); e afinidade hemoglobina-oxigênio (capítulo 5), garantem a sobrevivência às condições de baixa disponibilidade de oxigênio no meio aquático.

O teleósteo de água doce *Pterygoplichthys anisitsi* (Loricariidae) é conhecido por sua capacidade de resistir à hipóxia no ambiente aquático e à exposição ao ar por longos períodos (Garutti, 1993). Além da utilização da respiração aérea, na qual a tomada de O<sub>2</sub> ocorre no aparelho digestório em um estômago modificado, os ajustes bioquímicos, podem ser relevantes para resistir às situações de hipóxia.

O estresse causado pela hipóxia no ambiente aquático ou devido à exposição aérea pode causar alterações hematológicas e teciduais. Os parâmetros hematológicos constituem frequentemente um reflexo de processos orgânicos que servem como indicadores das condições gerais de um organismo ou de distúrbios metabólicos (Aguiar, 2002; Lundstedt, 2003). Assim, considerando-se a disponibilidade de oxigênio como um fator limitante no processo metabólico oxidativo (Prosser, 1991), sua relação com tecido sangüíneo e a capacidade de tolerância à hipóxia em *P. anisitsi*, neste estudo foram analisados os ajustes hematológicos e metabólicos à hipóxia no ambiente aquático e à exposição aérea para avaliar o uso de diferentes estratégias em resposta a essas condições estressantes.

## 2. Materiais e Métodos

### *Animais experimentais*

Espécimes adultos de cascudo *Pterygoplichthys anisitsi* [massa corporal (M<sub>C</sub>)= 0,084 a 0,600 kg; comprimento total (C<sub>T</sub>): 24 a 39cm] foram obtidos no CAUNESP (Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, SP, Brasil). No laboratório, os peixes foram mantidos em tanque (1.000 L) com fluxo de água contínuo e aeração constante, a 23-

25°C durante 3 semanas e alimentados com ração comercial e folhas de alface (*Lactuca sativa*).

#### *Protocolo experimental*

Após a aclimatação em laboratório espécimes de *P. anisitsi* foram aleatoriamente removidos do tanque de aclimatação e introduzidos em um sistema experimental de PVC (150 L), dividido em seis compartimentos comunicantes de forma que um espécime foi colocado em cada compartimento. Os experimentos foram conduzidos da seguinte forma: 1) seis espécimes foram mantidos em água em condições de normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg) durante 24 h e foram utilizados como controle; 2) vinte e quatro espécimes foram expostos durante 1, 2, 3 e 4 h ( $n = 6$  cada período experimental) à hipóxia aguda ( $PO_2 = 30$  mmHg) sem acesso à superfície; 3) seis espécimes foram expostos ao ar atmosférico por 24 h em ambiente com um fino filme de água suficiente para manutenção da umidade e evitar o dessecação do animal. Após cada período experimental foi obtida amostra do sangue de cada animal por punção da veia caudal para análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos do sangue. Em seguida, os exemplares foram anestesiados com Benzocaína® (Synth) e mortos para a obtenção de amostras de fígado e músculo branco para análise bioquímica.

#### *Parâmetros hematológicos*

O pH sanguíneo foi imediatamente medido em um pHmetro Quimis®. Posteriormente, as amostras foram divididas em alíquotas para as determinações de hematócrito (Ht), contagem de eritrócitos (RBC) e concentração de hemoglobina total (Hb). A partir disso, foram calculados a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), o volume corpuscular médio (VCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM).

*Hematócrito (Hc)*. A alíquota de sangue para hematócrito foi transferida para capilares heparinizados de micro-hematócrito, em duplicata, fechados com massa apropriada e centrifugados por 3 min a  $14.400 \times g$ . A porcentagem de sedimentação dos eritrócitos foi lida em cartão padronizado para microhematócrito.

*Contagem de eritrócitos (RBC)*. Uma alíquota de 10  $\mu$ L de sangue total foi diluída em 2 mL de solução de citrato-formol (3,8 g de citrato-formol e 2 mL de formol 40% para

100 mL de água destilada q.s.p) para a contagem das células em câmara de Neubauer. Cinco campos foram contados e os valores foram expressos em milhões/mm<sup>3</sup> de sangue.

*Concentração de hemoglobina (Hb).* Uma alíquota de 10 µL de sangue total foi colocada em 2 mL de solução de Drabkin (0,5 g de KCN; 1,4 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 2 g de K<sub>3</sub>Fe<sub>2</sub>(CN)<sub>6</sub> em H<sub>2</sub>O dest. q.s.p. 1L) e a absorvância determinada em 420 nm (Drabkin 1948). A concentração foi calculada a partir de padronização prévia da solução para  $y = 30,179x$  onde:  $y = [Hb]$  e  $x = Abs_{420}$ . Os valores foram expressos em g.dL<sup>-1</sup> de Hb.

*Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).* A concentração de hemoglobina corpuscular média foi estimada pela razão entre a concentração de hemoglobina e o hematócrito  $CHCM = [Hb]/[Htc]$  e expressa em porcentagem (%).

*Volume corpuscular médio (VCM).* O volume corpuscular médio foi estimado pela razão entre o hematócrito e o número de eritrócitos:  $VCM = Htc / RBC$  e expresso em µm<sup>3</sup>.

*Hemoglobina corpuscular média (HCM).* A hemoglobina corpuscular média foi estimada pela razão entre a concentração de hemoglobina e o número de eritrócitos  $HCM = [Hb] / RBC$  e expressa em pg.cel<sup>-1</sup>.

#### *Preparação do plasma e dos tecidos*

Para as determinações de glicose, lactato e piruvato, o sangue remanescente foi centrifugado e o plasma separado. As amostras de tecido, previamente congeladas, e de plasma foram colocadas em tubos plásticos e uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 20% foi adicionada em proporções variáveis para cada tecido, para desproteíntização. Em seguida, os tecidos foram homogeneizados em homogeneizador rotativo com haste de teflon por 1 min em banho de gelo. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 x g por 3 min e o sobrenadante foi utilizado nas determinações dos intermediários metabólicos.

Para as determinações de glicogênio, os tecidos foram pesados, colocados em tubo de ensaio, e 1 mL de KOH 6,0N foi adicionado. Em seguida, os tubos foram aquecidos em banho fervente durante 2 a 3 min e posteriormente agitados para dissolução completa. O extrato alcalino foi utilizado para a determinação de glicogênio.

### *Determinações dos intermediários metabólicos*

*Glicose.* A concentração de glicose tecidual foi determinada segundo o método de Dubois (1956), que se baseia na formação de furfural em meio ácido. Os homogeneizados foram diluídos em 500  $\mu\text{L}$  de água destilada e, em seguida, foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de fenol 4,1%. Os tubos foram agitados e, então, foram adicionados 2 mL de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado. Após resfriamento foi efetuada a leitura espectrofotométrica em 480 nm. Para os cálculos da concentração de glicose, utilizou-se um padrão contendo 100 nmoles de glicose, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{moles.mL}^{-1}$  de plasma.

A concentração de glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose-oxidase (Trinder, 1969) em leitora de microplaca em 525 nm. Os ensaios foram realizados após a adição de 10  $\mu\text{L}$  de plasma em cada poço seguido da adição de 190  $\mu\text{L}$  de reagente Sigma® reconstituído. As curvas padrões foram obtidas a partir de soluções conhecidas de glicose.

*Lactato.* A concentração de lactato tecidual e plasmático foi determinada segundo o método de Harrower e Brown (1972), que se baseia na complexação do lactato com sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ), sendo o lactato revelado pelo p-fenilfenol e ácido sulfúrico. Os homogeneizados foram diluídos em 500  $\mu\text{L}$  de água destilada e, em seguida, 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{CuSO}_4$  a 4% foram adicionado. Lentamente, 3,5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado foram adicionados aos tubos. Após agitação, as amostras foram fervidas por 5 min e resfriadas em banho de gelo. Em seguida foram adicionados 80  $\mu\text{L}$  de p-fenilfenol e, então, as amostras foram agitadas em vórtex e mantidas em repouso por 1 h. Posteriormente, os tubos foram fervidos por 90 seg, para retirar o excesso de p-fenilfenol do meio de reação, e imediatamente resfriados em banho de água gelada. A leitura espectrofotométrica foi realizada em 570 nm. Para os cálculos da concentração de lactato foi utilizada uma solução de 20 nmoles de ácido láctico como padrão. A concentração final foi expressa em  $\mu\text{moles}$  de lactato. $\text{g}^{-1}$  de tecido ou  $\mu\text{moles}$  de lactato. $\text{mL}^{-1}$  de plasma.

*Piruvato.* A concentração de piruvato tecidual e plasmático foi determinada segundo o método de Lu (1939) pela reação de dinitrofenilhidrazina. Os homogeneizados foram diluídos em 500  $\mu\text{L}$  de água destilada e então foram adicionados 250  $\mu\text{L}$  de solução de dinitrofenilhidrazina 0,1% em solução aquosa de HCl 2,0N e, após 30 min de repouso, em banho-maria a 37°C, foram adicionados à mistura de reação 3 mL de NaOH 1,3N. A leitura

espectrofotométrica foi realizada em 440 nm. A concentração de piruvato foi calculada utilizando-se como padrão uma solução de piruvato de 100 nmoles. A concentração final foi expressa em  $\mu\text{moles de piruvato}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido ou  $\text{mL}^{-1}$  de plasma.

*Glicogênio.* As concentrações de glicogênio foram determinadas no fígado e músculo branco segundo o método de Bidinotto *et al.* (1997). Em tubos de ensaio foram colocados 200 e 250  $\mu\text{L}$  de extrato alcalino de fígado e músculo branco, respectivamente, e então foram adicionados 3 mL de etanol P.A. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de sulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ ) a 10% foram adicionados aos tubos. Após agitação, as soluções foram centrifugadas a  $2.000 \times g$  por 3 minutos, e os sobrenadantes foram descartados por inversão do tubo. Os precipitados foram re-suspendidos em 2,5 mL de água destilada, os tubos foram agitados e as amostras utilizadas para determinação de glicose pelo método de Dubois (1956). A concentração de glicosil-glicose foi estimada contra um padrão de glicose com concentração de 100 nmoles. Os valores de glicogênio foram expressos em  $\mu\text{moles de glicosil-glicose}\cdot\text{g}^{-1}$  de tecido.

#### *Análise estatística*

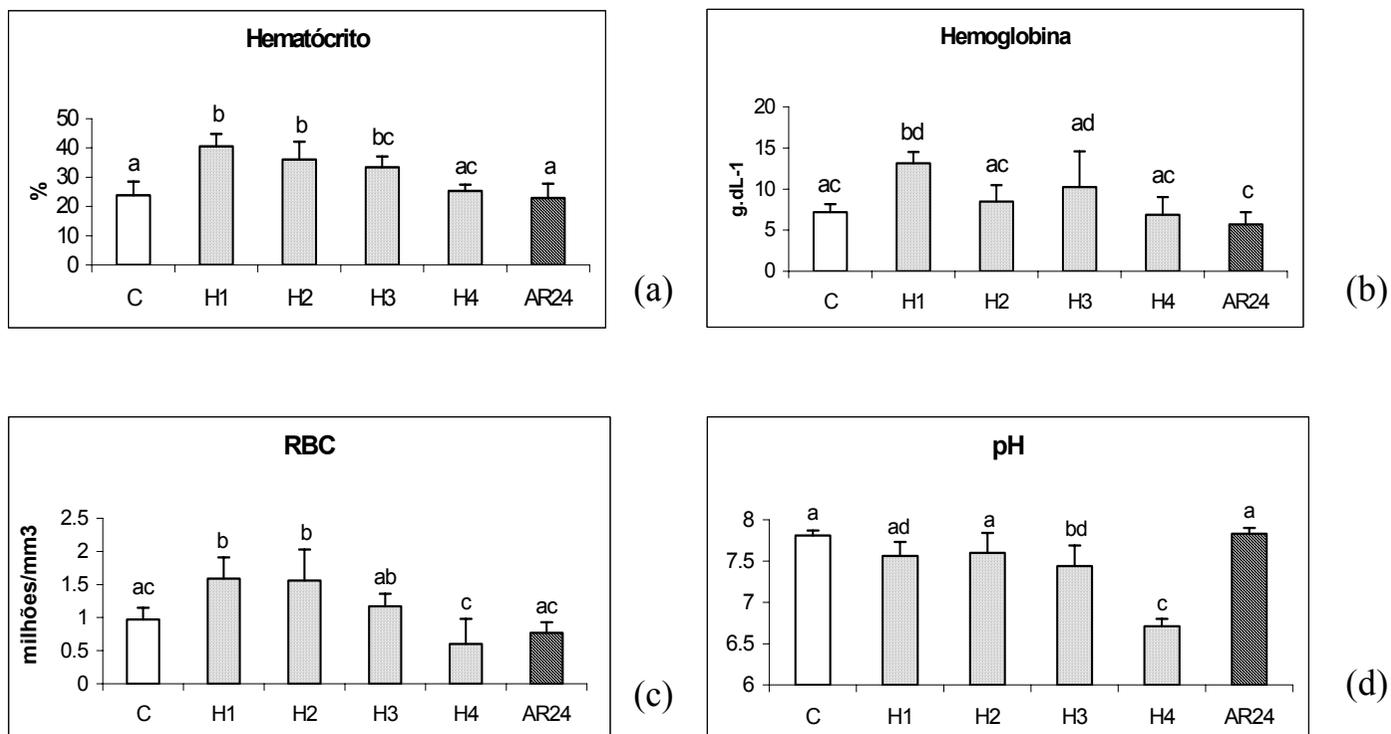
Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio-padrão. As diferenças significativas entre as médias foram testadas utilizando análise de variância (ANOVA) com o teste de Tukey para comparações múltiplas.

### **3. Resultados**

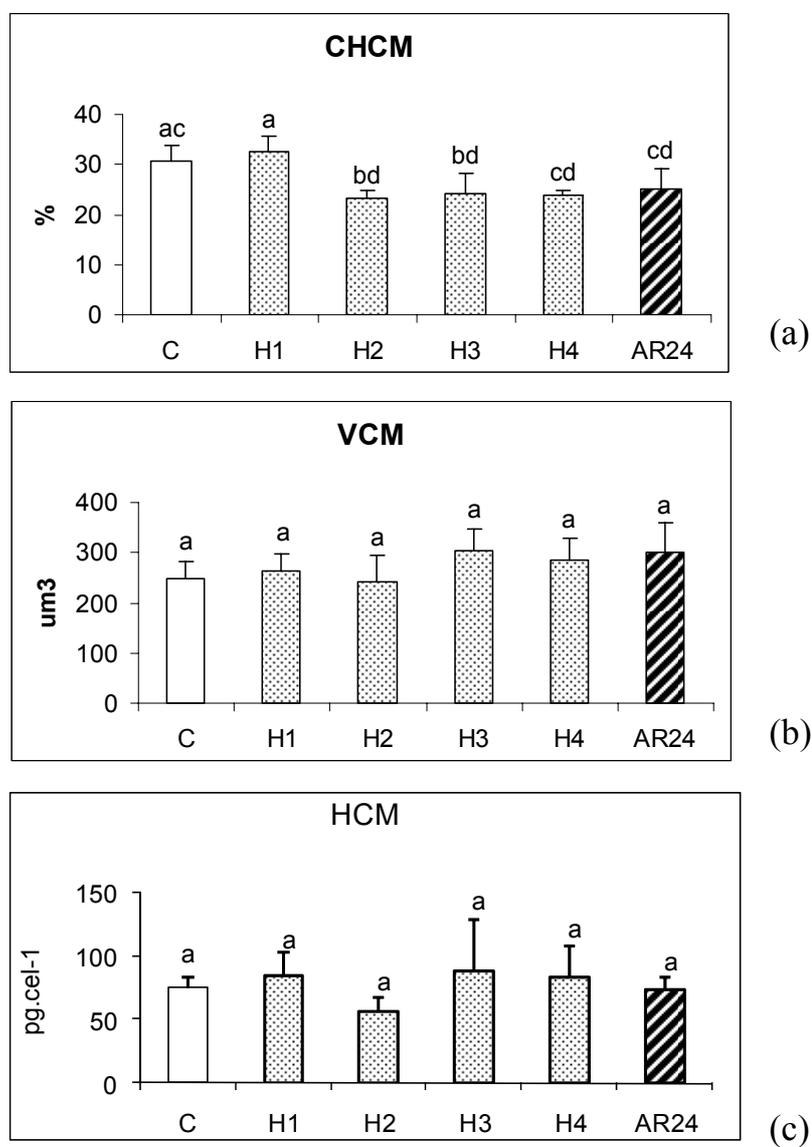
#### *Parâmetros hematológicos*

O hematócrito de *P. anisitsi* foi significativamente mais alto do que o do grupo controle após 1h ( $p < 0,001$ ), 2h ( $p < 0,01$ ) e 3h ( $p < 0,05$ ) de exposição à hipóxia (Fig. 1a). A hemoglobina aumentou somente após 1h ( $p < 0,01$ ) de exposição à hipóxia (Fig. 1b) e o RBC, após 1h e 2h ( $p < 0,05$ ; Fig. 1c). O pH manteve-se estável durante as duas primeiras horas de exposição, mas após 3h e 4h apresentou redução ( $p < 0,01$ ; Fig. 1d). A CHCM foi significativamente mais baixa após 2h ( $p < 0,01$ ) e 3h ( $p < 0,05$ ) de exposição à hipóxia (Fig. 2a), enquanto que não houve diferença significativa no VCM (Fig. 2b) e HCM (Fig. 2c) em

nenhuma condição experimental. Em todos esses parâmetros hematológicos analisados não foram verificadas diferenças nos espécimes submetidos à exposição ao ar por 24 horas.



**Figura 1.** Parâmetros hematológicos de *P. anisitsi*, **(a)** hematócrito, **(b)** concentração de hemoglobina, **(c)** número de eritrócitos e **(d)** pH, ao longo dos 4 períodos de hipóxia (H1, H2, H3 e H4) e após 24 h de exposição aérea (AR24). Média  $\pm$  Desvio Padrão. Ao menos uma letra igual não indica diferença significativa.



**Figura 2.** Índices hematimétricos de *P. anisitsi*, **(a)** concentração de hemoglobina corpuscular média, **(b)** volume corpuscular médio e **(c)** hemoglobina corpuscular média, ao longo dos 4 períodos de hipóxia (H1, H2, H3 e H4) e após 24 h de exposição aérea (AR24). Média  $\pm$  Desvio Padrão. Ao menos uma letra igual não indica diferença significativa.

### *Intermediários metabólicos*

Na Tabela 1 são apresentados os valores médios dos intermediários metabólicos (glicogênio, glicose, piruvato e lactato) em cada tecido analisado (fígado, músculo branco e plasma), e as relações lactato: piruvato ao longo das 4h de hipóxia.

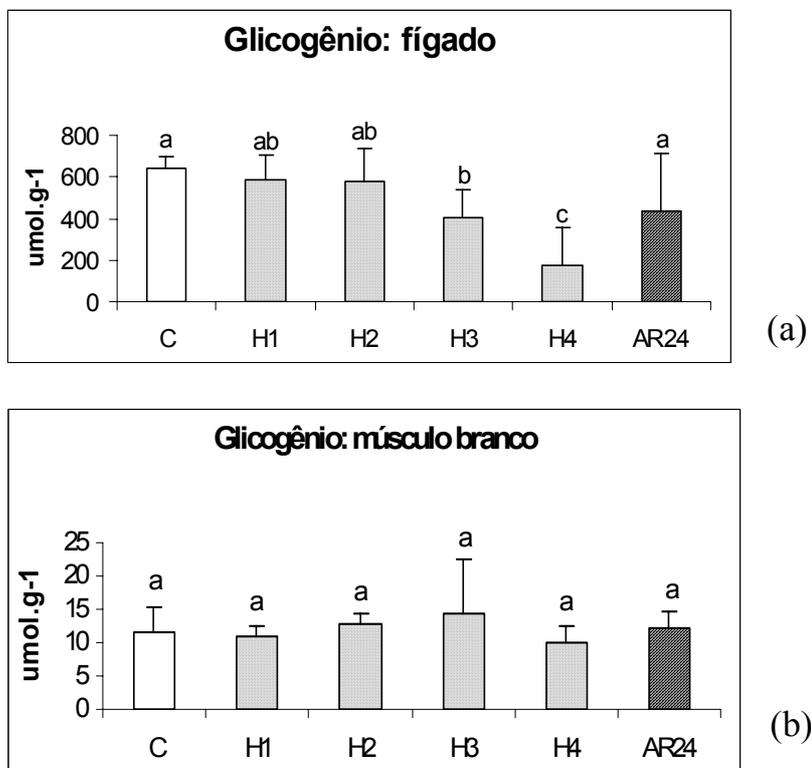
Os teores de glicogênio hepático foram reduzidos após 3 h ( $p < 0,05$ ) e 4 h ( $p < 0,001$ ) de exposição à hipóxia (Fig. 3a), mas nos animais expostos ao ar por 24 h não foram verificadas alterações significativas. No músculo os teores de glicogênio não apresentaram diferenças significativas em nenhuma das condições experimentais (Fig. 3b).

A concentração de glicose no fígado manteve-se constante até 2 h de exposição à hipóxia e após 3 h e 4 h foi significativamente reduzido. Nos espécimes expostos ao ar por 24 h também foi verificada redução na concentração de glicose ( $p < 0,01$ ; Fig. 4a). No músculo branco, a concentração de glicose foi menor após 4 h de exposição à hipóxia e após a exposição ao ar por 24 h ( $p < 0,01$ ; Fig. 4b). No plasma, houve aumento da glicose durante exposição à hipóxia e após a exposição ao ar por 24 h ( $p < 0,05$ ; Fig. 4c).

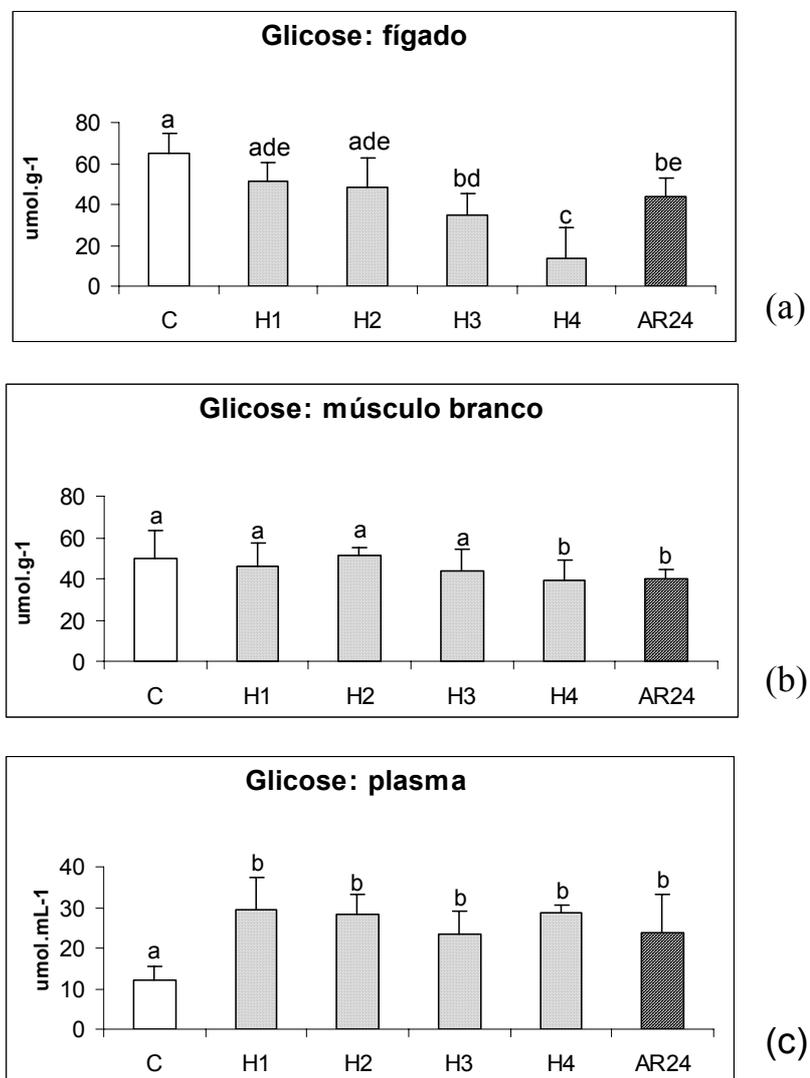
A concentração de lactato aumentou significativamente no fígado ( $p < 0,01$ ) e no músculo branco ( $p < 0,05$ ) após 4h de exposição à hipóxia (Fig. 5a e 5b, respectivamente), enquanto que no plasma a concentração aumentou após 3 h ( $p < 0,01$ ) e 4 h ( $p < 0,001$ ) de exposição (Fig. 5c). Não foram verificadas diferenças nas concentrações de lactato no plasma e nos tecidos analisados dos animais expostos ao ar por 24 h. A concentração de piruvato no fígado foi reduzida após 4h de exposição à hipóxia ( $p < 0,001$ ; Fig. 6a). No músculo branco houve aumento da concentração de piruvato após exposição ao ar por 24 h ( $p < 0,05$ ; Fig. 6b), e no plasma, o aumento da concentração de piruvato foi verificado somente após 1 h de exposição à hipóxia ( $p < 0,05$ ; Fig. 6c).

**Tabela 1.** Concentrações dos intermediários metabólicos e relação lactato:piruvato ao longo das 4 h de hipóxia de *P. anisitsi*. Média  $\pm$  Desvio padrão.

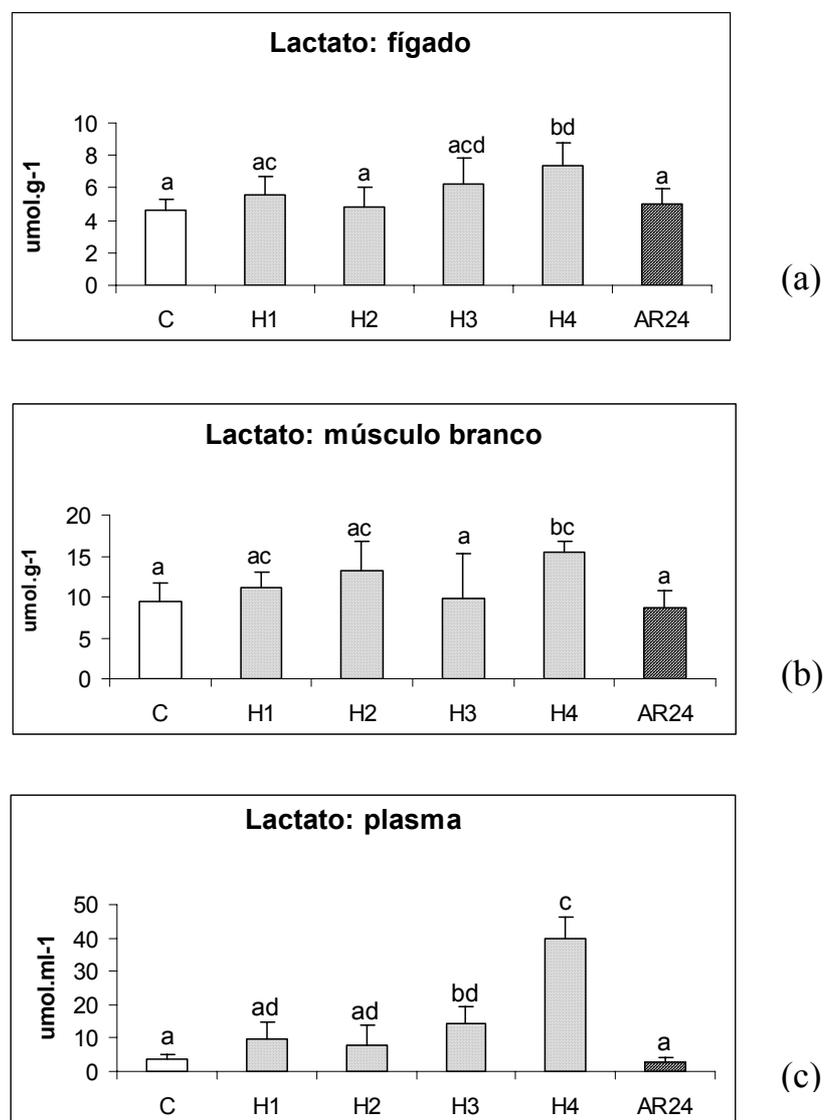
Metabólito	Hipóxia (horas)				
	0 (Controle)	H1	H2	H3	H4
<b>Fígado</b>					
Glicogênio	644,23 (50,21)	588,35 (118,52)	577,34 (161,73)	401,34 (135,6)	173,82 (180,44)
Glicose	64,54 (9,86)	51,4 (9,18)	48,49 (13,96)	35,07 (10,22)	10,33 (9,26)
Piruvato	0,75 (0,12)	0,77 (0,18)	0,89 (0,23)	0,64 (0,14)	0,29 (0,12)
Lactato	4,58 (0,71)	5,58 (1,09)	4,83 (1,24)	6,27 (1,53)	7,32 (1,42)
L:P	6,10	7,24	5,42	9,79	25,24
<b>Músculo branco</b>					
Glicogênio	12,43 (3,43)	10,85 (1,71)	12,77 (1,57)	11,72 (4,46)	9,89 (2,48)
Glicose	58,25 (5,47)	48,52 (10,34)	51,19 (3,81)	46,9 (7,72)	39,16 (10,18)
Piruvato	0,33 (0,11)	0,30 (0,10)	0,31 (0,09)	0,37 (0,04)	0,51 (0,04)
Lactato	9,46 (2,25)	11,06 (1,89)	12,16 (2,64)	9,76 (5,61)	15,51 (1,27)
L:P	28,66	36,86	39,22	26,37	30,41
<b>Plasma</b>					
Glicose	12,00 (3,54)	29,28 (7,96)	28,40 (4,71)	25,50 (5,43)	28,63 (2,01)
Piruvato	0,27 (0,03)	0,51 (0,19)	0,47 (0,06)	0,42 (0,19)	0,28 (0,03)
Lactato	3,65 (0,87)	10,27 (2,71)	7,87 (5,94)	12,43 (1,70)	32,84 (4,14)
L:P	13,51	20,13	16,74	29,59	117,28



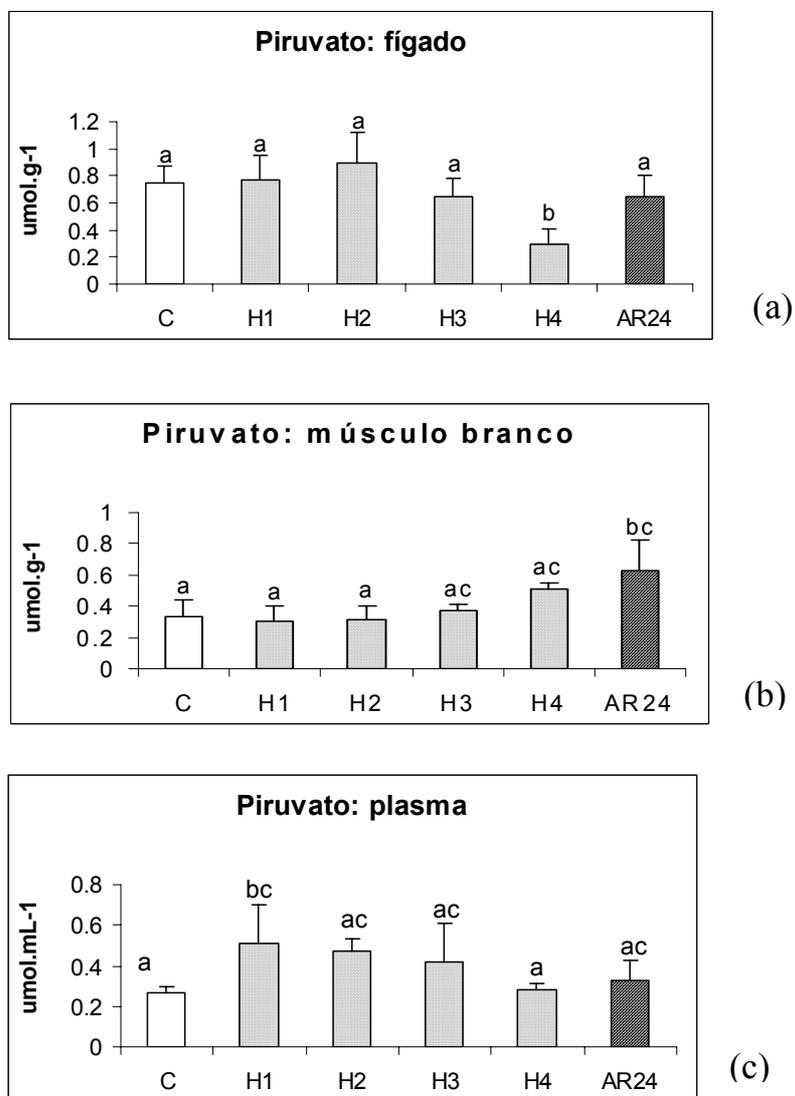
**Figura 3.** Concentrações de glicogênio de *P. anisitsi* no **(a)** fígado e no **(b)** músculo branco, ao longo dos 4 períodos de hipóxia (H1, H2, H3 e H4) e após 24 h de exposição aérea (AR24). Média  $\pm$  Desvio Padrão. Ao menos uma letra igual não indica diferença significativa.



**Figura 4.** Concentrações de glicose de *P. anisitsi* no (a) fígado, (b) músculo branco e (c) plasma, ao longo dos 4 períodos de hipóxia (H1, H2, H3 e H4) e após 24 h de exposição aérea (AR24). Média  $\pm$  Desvio Padrão. Ao menos uma letra igual não indica diferença significativa.



**Figura 5.** Concentrações de lactato de *P. anisitsi* no (a) fígado, (b) músculo branco e (c) plasma, ao longo dos 4 períodos de hipóxia (H1, H2, H3 e H4) e após 24 h de exposição aérea (AR24). Média  $\pm$  Desvio Padrão. Ao menos uma letra igual não indica diferença significativa.



**Figura 6.** Concentrações de piruvato de *P. anisitsi* no **(a)** fígado, **(b)** músculo branco e **(c)** plasma, ao longo dos 4 períodos de hipóxia (H1, H2, H3 e H4) e após 24 h de exposição aérea (AR24). Média  $\pm$  Desvio Padrão. Ao menos uma letra igual não indica diferença significativa.

#### 4. Discussão

Variações nos parâmetros sanguíneos dos peixes podem ocorrer devido a mudanças ambientais, como sazonalidade, temperatura, salinidade, dieta, condição reprodutiva e oxigênio dissolvido (Graham, 1997). Geralmente, entre os peixes de respiração aérea observa-se menor número de eritrócitos, porém essas células têm maior volume do que entre os de respiração exclusivamente aquática (Pérez *et al.*, 1984). Por exemplo, o peixe de respiração aérea *Pterygoplichthys multiradiatus* apresenta  $1,59 \pm 0,13 \cdot 10^6$  eritrócitos por  $\text{mm}^3$  com volume de  $217,3 \pm 5,5 \mu\text{m}^3$ , enquanto que *Prochilodus nigricans* de respiração exclusivamente aquática apresenta  $2,29 \pm 0,08 \cdot 10^6$  eritrócitos por  $\text{mm}^3$  com volume de  $153,28 \pm 11,83 \mu\text{m}^3$  (Val *et al.*, 1990; Val *et al.*, 1992). Da mesma forma, o cascudo, *P. anisitsi* parece seguir essa mesma tendência observada em peixes de respiração aérea.

A hemoconcentração observada em *P. anisitsi* pelos aumentos do hematócrito, da concentração de hemoglobina e do número de eritrócitos após 1 h de exposição à hipóxia pode ser uma resposta ao estresse resultante da baixa concentração de oxigênio na água. A hipóxia ambiental, em geral, estimula a liberação de adrenalina na circulação e a de eritrócitos por contração esplênica, e é uma resposta que se constitui em um ajuste para uma melhor captação de oxigênio (Nikinmaa, 1990).

As alterações hematológicas durante períodos de hipóxia frente à demanda de oxigênio têm implicações de custo-benefício. Assim, essa resposta parece não ser uma adaptação ideal para a hipóxia. Embora o aumento no RBC possa contribuir com o aumento do volume de oxigênio transportado para os tecidos durante condições de hipóxia, o aumento no trabalho cardiovascular pode ser maior do que as vantagens aferidas pelo aumento do número de RBC. A liberação esplênica de eritrócitos pode não ser uma resposta ideal em peixes submetidos à hipóxia devido ao custo gerado pelo grande esforço cardiovascular e pelo esgotamento da reserva de eritrócitos. (Caldwell e Hinshaw, 1994).

A contração esplênica em resposta ao estresse pode resultar em elevada concentração de hemoglobina total e ativação do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  da membrana eritrocitária (Jensen, 2004; Wells *et al.*, 2005). Em peixes teleósteos em hipóxia, o mecanismo de estimulação  $\beta$ -adrenérgica do trocador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  promove o influxo celular de  $\text{Na}^+$  e o efluxo de  $\text{H}^+$  que alcalinizam o citoplasma do eritrócito e aumentam a afinidade ao oxigênio

(Tetens e Christiansen, 1987; Weber e Jensen, 1988, Nikinmaa, 2001). Essa resposta  $\beta$ -adrenérgica em eritrócitos de peixes teleósteos é deflagrada quando as catecolaminas são liberadas para o sangue em situações de estresse. Em hipóxia, isto ocorre em tensões de oxigênio que correspondem a 50-60% da saturação da hemoglobina (Thomas e Perry, 1992).

Durante períodos de baixa disponibilidade de oxigênio, uma alta reserva de tampão é necessária para neutralizar o  $H^+$  gerado pela atividade metabólica anaeróbica. Os principais tampões do sangue são as proteínas plasmáticas, o sistema ácido carbônico/bicarbonato e a hemoglobina. A capacidade de tamponamento da hemoglobina é considerada, geralmente, pequena entre os teleósteos, mas alta em vertebrados de respiração aérea (Val *et al.*, 1990). Esse fato contribui com o aumento das alterações de pH por ação adrenérgica, pois se a capacidade de tamponamento fosse maior o fluxo de prótons requerido para uma alteração similar no pH intracelular seria muito mais pronunciado (Nikinmaa, 1997).

A diminuição no pH plasmático também é conseqüência de uma ativação do trocador  $Na^+/H^+$  na membrana do eritrócito pelas catecolaminas, o que leva à acidificação do plasma (Nikinmaa, 2001). Esse trocador é oxigênio-sensível e é preferencialmente ativado em baixas tensões de oxigênio (Salama e Nikinmaa, 1988). A redução de pH plasmático em *P. anisitsi* após 4 h de exposição à hipóxia poderia ser conseqüência da insuficiência dos sistemas de tamponamento para os derivados metabólicos ácidos produzidos, além da acidificação do plasma pela ativação do trocador  $Na^+/H^+$  depois de prolongado período de hipóxia.

As alterações nos parâmetros hematológicos durante a exposição à hipóxia refletem uma resposta típica de estresse a essa condição e a ausência de diferenças nos parâmetros hematológicos durante a exposição ao ar por 24 h parece ser mais um indicativo da ação de outros mecanismos de ajustes já discutidos anteriormente nos capítulos 2, 3 e 5. Esses ajustes seriam os principais responsáveis pela capacidade que *P. anisitsi* apresentou ao resistir ao período de exposição ao ar.

A limitação de oxigênio ao nível celular pode comprometer as funções fisiológicas dos organismos (Hochachka, 1980). Além dos ajustes fisiológicos, comportamentais e morfológicos serem importantes para assegurar a sobrevivência em condições hipóxicas,

muitos vertebrados também apresentam uma combinação de redução da taxa metabólica (supressão metabólica) com a ativação do metabolismo anaeróbico (Hochachka e Somero, 2002). Em peixes observa-se que muitas espécies possuem capacidade de sobreviver em ambientes hipóxicos ou anóxicos devido a um grande potencial anaeróbico (Hochachka, 1980; Moraes *et al.*, 1996; Chippari-Gomes *et al.*, 2005). Nos cascudos *Glyptoperichthyes gibbiceps* (MacCormack *et al.*, 2003) e *Pterygoplichthys pardalis* (MacCormack *et al.*, 2006), quando submetidos à hipóxia, os aumentos de glicose e de lactato plasmáticos sugerem uma estratégia metabólica anaeróbica.

A concentração de glicose observado no fígado de *P. anisitsi* em normóxia ( $64,54 \pm 9,86 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) é maior do que o relatado para o cascudo *P. pardalis* também em normóxia, cujo valor é, aproximadamente, de  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (MacCormack *et al.*, 2006). O valor plasmático de glicose em *P. anisitsi*, em normóxia, também é alto ( $11,99 \pm 3,54 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) quando comparado com *P. pardalis* ( $2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), porém menor que em *G. gibbiceps* ( $31,24 \pm 3,74 \mu\text{mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Essas comparações sugerem que *P. anisitsi* pode enfrentar períodos de hipóxia por meio de uma estratégia anaeróbica.

Nos períodos de hipóxia a manutenção dos estoques hepáticos de glicogênio até 3h foi seguida de redução drástica. Essa queda foi acompanhada da redução das concentrações de glicose hepática. Esses estoques seriam a fonte primária da glicose plasmática, que apresentou aumento significativo durante os períodos de hipóxia. A resposta observada é típica de situações de estresse. Animais expostos a condições como confinamento e hipóxia, exibem teores mais altos de glicose do que animais em ambientes semi-naturais (MacCormack *et al.*, 2006). Essa é uma resposta imediata à liberação de cortisol e auxilia o organismo a atender as demandas metabólicas. Além disso, o glicogênio, estocado em todos os animais, é considerado uma fonte primária de material energético também para o metabolismo anaeróbico, sendo que altas concentrações hepáticas estariam relacionadas com a tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio (Moraes *et al.*, 1996; Hochachka e Somero, 2002; Chippari-Gomes *et al.*, 2005). As concentrações de glicogênio hepático obtidos em *P. anisitsi* (normóxia:  $644,23 \pm 50,22 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ ) foram maiores do que em espécies consideradas resistentes à hipóxia como *P. pardalis*, cujo valor é de aproximadamente,  $45 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (MacCormack *et al.*, 2006), *Hypostomus regani*, de aproximadamente,  $320 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (Bidinotto *et al.*, 1997) e *Hoplias malabaricus*, de  $473,4 \pm$

32,1  $\mu\text{mol.g}^{-1}$  (Moraes *et al.*, 1996), enquanto que espécies não tolerantes como *Prochilodus scrofa*, *Brycon cephalus*, *Salminus maxillosus* e *Pimelodus maculatus* que vivem em rios de águas rápidas possuem concentrações de glicogênio relativamente baixas (Bidinotto *et al.*, 1997). Ainda em relação aos conteúdos de glicogênio, tem sido descrita uma transferência de glicose das reservas de glicogênio hepático para o tecido muscular. Em *Hoplias malabaricus* submetida à hipóxia aguda (21 mmHg) por 6 h, ocorreu redução do glicogênio hepático seguida de aumento do glicogênio muscular. Esse fato é suposto com uma estratégia do tecido muscular, a partir da mobilização hepática, para aumentar suas reservas de combustível para situações extremas de anaerobiose (Moraes *et al.*, 1996). Entretanto, essa estratégia não foi observada em *P. anisitsi*, que por outros ajustes (capítulos 2, 3 e 5) não deve enfrentar as mesmas situações agudas de hipóxia que podem ser observadas em *H. malabaricus*.

Diferentes padrões metabólicos podem ser dependentes do desenvolvimento ontogenético e ainda estarem correlacionados com diferenças nos hábitos de vida e padrões de atividade (Burgreen e Pinder, 1991). No caso de *H. malabaricus*, se trata de uma espécie que apresenta uma tática de forrageamento de predador de emboscada (ambush predator). Esses peixes utilizam estruturas do ambiente como esconderijo (total ou parcial), de onde atacam as presas que se aproximam com uso de uma investida súbita e muito rápida. A estrutura morfológica da traíra, com pedúnculo caudal forte e nadadeira caudal ampla, favorece esse tipo de tática alimentar (Jansen Zuanon, comum. pessoal). Por essas razões, a estrutura muscular da traíra é altamente adaptada a situações de anaerobiose geradas pelo seu tipo de natação (burst swimming), altamente dependente de glicogênio. Entretanto, *P. anisitsi* é uma espécie que se alimenta no fundo ou nas margens de rios e que apresenta pequenos deslocamentos ao longo do dia (Garutti e Figueiredo-Garutti, 1993). Assim, devido à espécie não ser predadora e apresentar um padrão comportamental altamente sedentário, não demanda estoques marcantes de glicogênio muscular fundamentais à sua sobrevivência. Apesar da possível correlação entre a estocagem de glicogênio muscular e os hábitos de vida e padrões de atividade diferentes, investigações bioquímicas adicionais são necessárias para melhor entendimento do mecanismo e utilidade do acúmulo de glicogênio muscular durante hipóxia em peixes tropicais.

Outra característica de peixes tolerantes à baixa disponibilidade de oxigênio é o alto valor do índice [glicogênio hepático]/[glicose plasmática] (Bidinotto *et al.*, 1997). Esses autores verificaram para espécies não tolerantes à hipóxia índices de 17,2 para *P. scrofa*, 17,4 para *B. cephalus*, 13,3 para *S. maxillosus* e 40,3 para *P. maculatus*, enquanto que para espécies tolerantes à hipóxia, índices de 104,16 para *H. regani*, 71,7 para *H. malabaricus* e 104,16 para *P. mesopotamicus*. Esse índice aplicado a *P. anisitsi* mostrou um valor intermediário (53,73) com relação às espécies descritas como tolerantes pelos mesmos autores. Ao considerar esse índice, *P. anisitsi* poderia ser classificada como uma espécie de moderada resistência à hipóxia.

Em *Piaractus mesopotamicus*, submetido à hipóxia aguda por 6 h, aumentos iniciais de glicemia e de lactemia, seguidos pela recuperação dos valores iniciais após duas horas, sugerem que o fígado e o músculo branco desempenham importante papel no metabolismo glicídico. Dessa forma, a hiperglicemia pode ser atribuída à liberação de glicose hepática e a hiperlactemia à fermentação muscular seguida da liberação do lactato para o compartimento plasmático (Moraes *et al.* 1997). No músculo branco de *P. anisitsi*, as concentrações de glicose e de lactato se mantiveram constantes em relação aos seus controles até 4h de hipóxia. Posteriormente, houve redução da glicose e aumento de lactato, indicando um processo de fermentação láctica no músculo. Esse tipo de resposta é previsível e tem sido verificada em outras espécies como *Synbranchus marmoratus* induzida a semi-estivação por 15 dias (Moraes *et al.*, 2005). Nesse caso, as concentrações de lactato plasmático não se alteraram em relação ao controle até 3 h, e após esse período foi observado hiperlactemia. Dessa forma, nessas espécies o fígado e o músculo branco responderiam pelos teores de glicose e lactato plasmáticos em função da hipóxia. Não somente a hipóxia ambiental, mas situações como o exercício pode levar à hipóxia tissular resultando em respostas semelhantes. *Salminus maxillosus*, quando submetido ao exercício intenso mostra um aumento na relação lactato: piruvato de músculo branco e plasma caracterizando a prevalência de processo fermentativo (Moraes *et al.*, 2004). Durante exercício, o aumento da dependência muscular pelo metabolismo da glicose derivada do fígado para manutenção da performance, destaca a importância das interações metabólicas inter-teciduals (Hochachka e Somero, 2002). Portanto, essa resposta a diferentes situações de hipóxia é frequentemente observada entre os peixes.

É importante também considerar os fatores que dirigem o fluxo de moléculas no metabolismo. No caso do piruvato, ele é primariamente derivado de glicose 6-fosfato, de alanina ou de lactato. A fácil redução do piruvato, catalisada por LDH, serve para regenerar  $\text{NAD}^+$ , permitindo que a glicólise prossiga temporariamente em condições anaeróbicas. O lactato formado em tecidos em atividade, tal como músculo em contração, é subsequentemente oxidado a piruvato, primariamente no fígado pelas formas isoenzimáticas da LDH. A razão dessa estratégia (ciclo de Cori) é a manutenção do estado redox do músculo na carência de oxigênio em um processo global conhecido como gliconeogênese. A maioria dos peixes, quando o oxigênio se torna limitado, produz lactato muscular pela redução de piruvato (Hochachka e Somero, 2002). Investigações com o acará *Cichlasoma amazonarum*, revelam que a presença de diferentes fenótipos de LDH nesta espécie está relacionada às tensões de oxigênio na água. A aclimatação à hipóxia aguda induz diferenças na distribuição de isoenzimas no fígado. Comparações entre o fenótipo inicial e final dos acarás, antes e depois dos experimentos, revelam diminuição na atividade absoluta de LDH e inibição da formação de piruvato no fígado (Almeida-Val *et al.*, 1999). Após quatro horas de hipóxia foi verificado no fígado de *P. anisitsi* um aumento da relação lactato: piruvato. O aumento de lactato poderia ser devido à hiperlactemia e ou à diminuição do piruvato pela sua recondução à glicose devido à diminuição da atividade das LDHs hepáticas cuja investigação passa a ser pertinente a partir do presente conjunto de resultados.

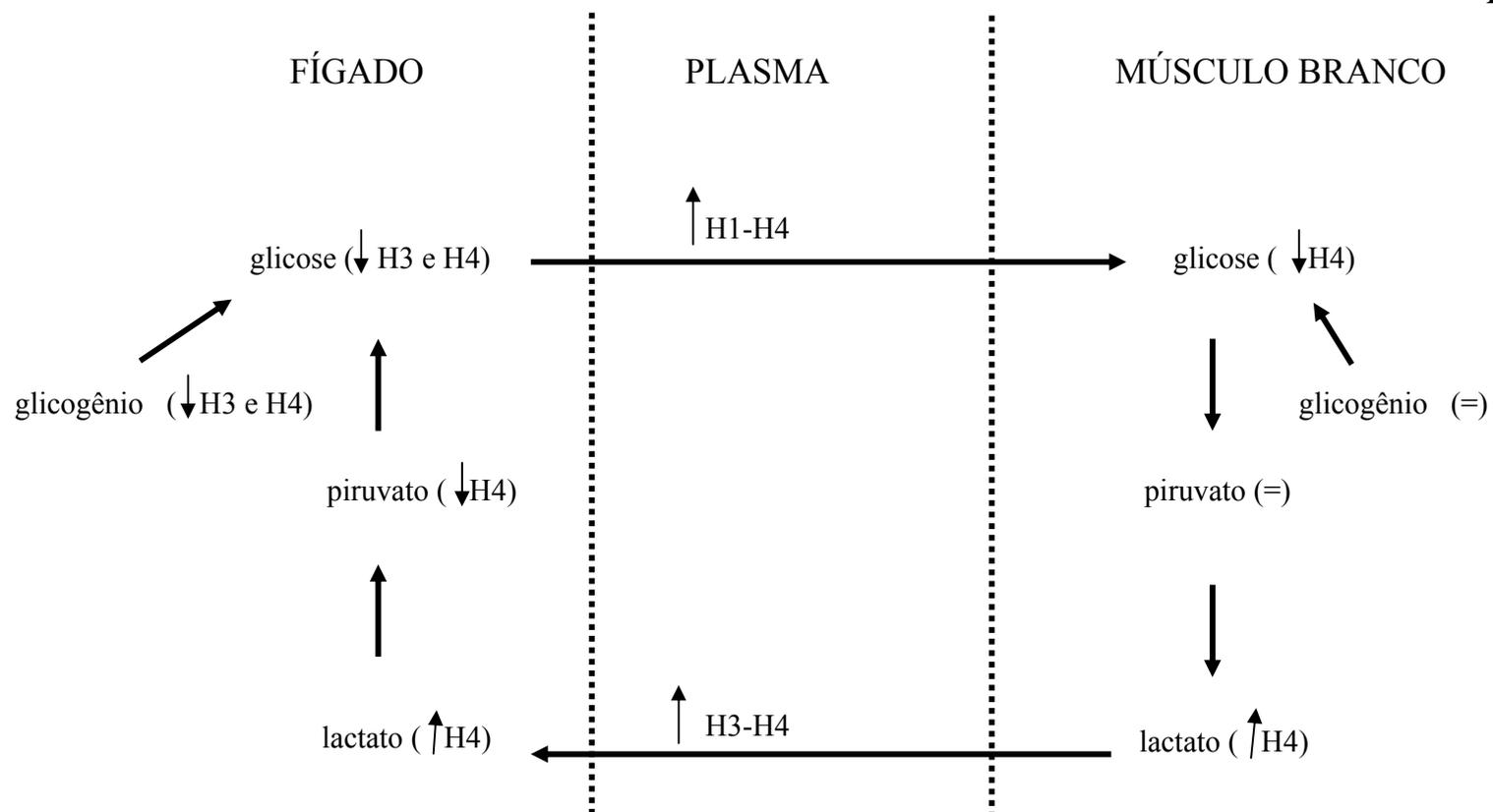
A glicose muscular de *P. anisitsi* foi consumida no processo de fermentação láctica devido às condições experimentais de hipóxia. A mesma resposta é observada em *P. pardalis*, quando em hipóxia (MacCormack *et al.*, 2006), o que sugere semelhanças no controle do perfil glicídico no músculo entre essas duas espécies de *Pterygoplichthys*. Considerando-se que após quatro horas de hipóxia em *P. anisitsi*, houve sensível redução de glicose muscular seguida de 25% de queda no glicogênio, 40% de aumento no lactato muscular e 800% de aumento na lactemia, é de se questionar se o processo fermentativo estaria no seu limite. O metabolismo é sabidamente regulado pela disponibilidade de substratos, pelo controle do teor de enzimas e de suas atividades catalíticas (Stryer, 1996). Um ou mais desses fatores poderia estar atuando via LDH já que a inter-relação fígado-músculo branco foi evidente. Delineamentos experimentais específicos poderiam avaliar

essas formas de regulação em *P. anisitsi* exposto a períodos de hipóxia e avaliar seus limites de capacidade anaeróbica.

De forma esquemática, a Figura 7a mostra a interpretação das diferenças nas concentrações dos intermediários metabólicos nos tecidos analisados ao longo das 4 h de hipóxia.

A respiração aérea em peixes, considerada como uma solução para o problema crítico da baixa disponibilidade de oxigênio traz vantagens metabólicas na produção de ATP. Entretanto, é obtida a um custo considerável. Essa estratégia leva a uma maior exposição à predação, particularmente predadores aéreos (Power, 1987; Kramer *et al.*, 1978) e devido a essa situação de risco a respiração aérea é obrigatoriamente rápida e realizada apenas quando necessária, ocorrendo geralmente em situações emergenciais (Hochachka, 1980).

As concentrações de glicogênio em *P. anisitsi* exposto ao ar por vinte e quatro horas não diminuíram, o que indica que a exposição ao ar não representou uma situação de hipóxia. Como visto nos capítulos 2, 3 e 5, as adaptações morfológicas e os ajustes respiratórios e hemoglobínicos parecem manter o metabolismo aeróbico de *P. anisitsi*, não requisitando as reservas de glicogênio hepático. A exposição ao ar do teleósteo do Pacífico

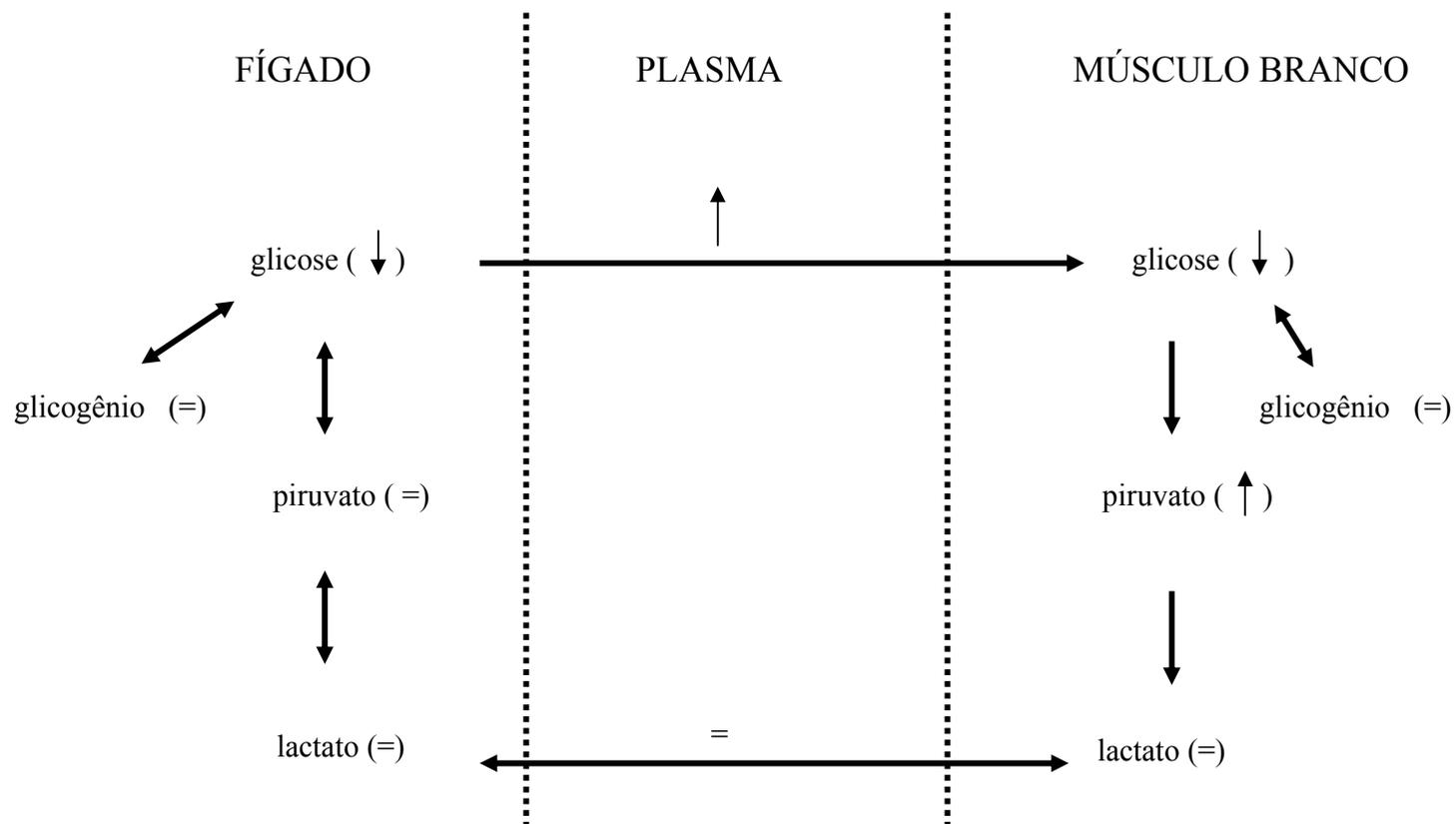
*hipóxia*

**Figura 7a.** Diferenças nas concentrações dos intermediários metabólicos nos tecidos analisados ao longo das 4 h de hipóxia.

*Hippoglossus stenolepis*, por 30 min, mostra alterações metabólicas como aumento de glicose e lactato plasmáticos associados a outros parâmetros de estresse (Haukenes e Buck, 2006). Igualmente, a exposição ao ar por vinte e quatro horas mostrou diferenças no metabolismo glicídico em *P. anisitsi*. A verificação de uma redução na glicose hepática e muscular e a conseqüente hiperglicemia seria uma resposta típica do estresse causado pela exposição aérea. O aumento de piruvato observado em paralelo a valores constantes de lactato muscular e plasmático seria função de um processo respiratório ou mesmo de um aumento do catabolismo protéico.

Nos peixes carnívoros, as proteínas são uma das fontes primárias de energia metabólica. Para que um aminoácido seja oxidado, o grupo amino deve ser removido. Esse processo leva à produção de amônia ou derivados. O peixe anfíbio *Periophthalmodon schlosseri* tem dificuldade de excretar amônia quando em atividade terrestre (Ip *et al.*, 2001). A transaminação de glutamato e piruvato para formar alanina seria uma forma de prevenir a liberação de amônia, o que seria vantajoso para a sobrevivência de *P. schlosseri* sem intoxicar seu meio interno. Diferentemente, o peixe anfíbio *Boleophthalmus boddarti* utiliza glicogênio muscular como fonte energética para as atividades no ambiente terrestre. Essa estratégia oferece uma quantidade limitada de energia por curto período, e como conseqüência, o conteúdo de ATP do músculo diminui para 1/10 dos valores normais. Devido aos altos níveis de amônia acumulados no músculo dessas espécies, a permanência fora da água por longos intervalos seria altamente desfavorável (Ip *et al.*, 2001). A exposição aérea de *P. anisitsi* levou à utilização de carboidratos (glicose hepática e muscular) tal como em *B. boddarti*. Porém, o aumento de piruvato é sugestivo de aumento do catabolismo protéico. Assim, a exposição aérea em *P. anisitsi* pode ser um fator de estresse tanto energético quanto metabólico devido ao acúmulo de amônia. Investigações posteriores podem esclarecer efetivamente sobre o efeito metabólico da exposição ao ar em *P. anisitsi* particularmente quanto a sua estratégia de excreção nitrogenada.

De forma esquemática, a Figura 7b mostra a interpretação das diferenças nas concentrações dos intermediários metabólicos nos tecidos analisados após as 24 h de exposição aérea.

*exposição aérea*

**Figura 7b.** Diferenças nas concentrações dos intermediários metabólicos nos tecidos analisados após 24h de exposição aérea.

Em conclusão, a baixa disponibilidade de oxigênio ambiental altera as respostas hematológicas e o perfil metabólico de *P. anisitsi* como resposta adaptativa às necessidades de oxigênio para suas funções vitais. A hipóxia levou a uma hemoconcentração causada por provável contração esplênica. As respostas metabólicas de *P. anisitsi* exposto à hipóxia manifestam-se a partir de três horas de exposição, observando drástica redução dos estoques de glicogênio. A reserva de glicogênio hepática seria a principal fonte de glicose na espécie, e a razão glicogênio hepático:lactato plasmático a enquadrar entre aquelas de tolerância média à hipóxia. O músculo branco sujeito à hipóxia consome glicose através de fermentação láctica.

A exposição de *P. anisitsi* ao ar não implica em danos causados por hipóxia, tendo sido observadas apenas mudanças que caracterizam um estresse por mudança ambiental. O perfil de piruvato muscular é sugestivo de um catabolismo protéico nessas condições. Esses fatos mostram a relevância da estratégia respiratória da espécie em ambientes secos.

## 5. Referências

- Affonso EG, Rantin FT (2005) Respiratory responses of the air-breathing fish *Hoplosternum littorale* to hypoxia and hydrogen sulfide. *Comp. Biochem. Physiol. C* 141: 275-280
- Aguar LH (2002) Efeitos do inseticida organofosforado methyl parathion (Folidol 600) sobre o teleosteo de água doce, matrinxã, *Brycon cephalus* (Gunther, 1869): aspectos do metabolismo intermediário. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos
- Almeida-Val VM, Val AL, Walker I (1999) Long- and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O<sub>2</sub> levels: intra-specific phenotypic plasticity and intra-specific variation. *In: Biology of Tropical Fishes*, Inpa, Manaus
- Bidinotto PM, Moraes G, Souza RHS (1997) Hepatic glycogen in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. *Bol. Técn. CEPTA* 10: 53-61
- Burgreen WW, Pinder AW (1991) Ontogeny of cardiovascular and respiratory physiology in lower vertebrates. *Annu. Rev. Physiol.* 53: 107-135
- Caldwell CA, Hinshaw J (1994) Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture* 126: 183-193

- Camargo JA, Alonso A (2006) Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: a global assesment. *Environ. International* 32: 831-849
- Chippari-Gomes AR, Gomes LC, Lopes NP (2005) Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comp. Biochem. Physiol. B* 141: 347-355
- Drabkin DL (1948) The standardization of haemoglobin measurement. *Amer. J. Med. Scienc.* 215: 110-111
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356
- Florindo LH, Reid SG, Kalinin AL, Milson WK, Rantin FT (2004) Cardiorespiratory reflexes and aquatic surface respiration in the neotropical fish tambaqui (*Colossoma macropomum*): acute responses to hypercarbia. *J. Comp. Physiol. B* 174: 319-328
- Garutti V (1993) Estudos biológicos do cascudo cinza *Liposarcus* (Piscae, Loricariidae) do rio Preto, bacia do rio Paraná. *In: Projeto Cascudo, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto*
- Garutti V, Figueiredo-Garutti ML (1993) Migração transversal e observações reprodutivas do cascudo cinza, *Liposarcus* sp (Loricariidae, Siluriformes) no rio Preto, bacia do rio Paraná. *In: Projeto Cascudo, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto*
- Graham JB (1997) Air-breathing fishes: evolution, diversity, and adaptation. Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto
- Harrower JR, Brown CH (1972) Blood lactic acid. A micro method adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.* 32: 224-228
- Hebert NA, Wells RMG (2001) The anaerobic physiology of the air-breathing blue gourami, *Trichogaster trichopterus*, necessitates behavioural regulation of breath-hold limits during hypoxic stress and predatory challenge. *J. Comp. Physiol. B* 171: 603-612
- Hochachka PW (1980) Living without oxygen: closed and open systems in hypoxia tolerance. Cambridge: Harvard University Press
- Hochachka PW, Lutz PL (2001) Mechanism, origin, and evolution of anoxia tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 130: 435-459
- Hochachka PW, Somero GN (2002) Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, Oxford, New York

- Haukenes AH, Buck CL (2006) Time course of osmoregulatory, metabolic, and endocrine stress responses of Pacific halibut following a 30-min air-exposure. *J. Appl. Ichthyol.* 22: 382-387
- Ip YK, Lim CB, Chew SF, Wilson JM, Randall DJ (2001) Partial aminoacid catabolism leading to the formation of alanine in *Periophthalmodon schlosseri*: a strategy that facilitates the use of aminoacids as an energy source during locomotory activity on land. *J. Exp. Biol.* 204: 1615-1624
- Jackson DC (2004) Acid-base balance during hypoxic hypometabolism: selected vertebrate strategies. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141: 273-283
- Jensen FB (2004) Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> transport. *Acta Physiol. Scand.* 182: 215-227
- Kind PK, Grigg GC, Booth DT (2002) Physiological responses to prolonged aquatic hypoxia in the Queensland lungfish *Neoceratodus forsteri*. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 132: 179-190
- Kramer DL, Lindsey CC, Moodie GEE, Stevens ED (1978) The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. *Can. J. Zool.* 56: 717-729
- Lu GD (1939) The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B- deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. *Biochem. J.* 33: 249-254
- Lundstedt LM (2003) Aspectos adaptativos dos processos digestivos e metabólico de juvenis de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) arraçoados com diferentes níveis de proteína e energia. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Sao Carlos
- MacCormack TJ, McKinley RS, Roubach R, Almeida-Val VMF, Val AL, Driedzic WR (2003) Changes in ventilation, metabolism, and behaviour, but not bradycardia, contribute to hypoxia survival in two species of Amazonian armoured catfish. *Can. J. Zool.* 81: 272-280
- MacCormack TJ, Lewis JM, Almeida-Val VMF (2006) Carbohydrate management, anarobic metabolism and adenosine levels in the armoured catfish *Liposarcus pardalis* (Castelnau) during hypoxia. *J. Exp. Zool. A* 305: 363-375
- Moraes G (1996) The metabolic pattern changes of *Hoplias malabaricus* from normoxia to hypoxia conditions. *Rev. Bras. Biol.* 56: 191-196
- Moraes G, Chippari AR, Guerra CDR, Gomes LC, Souza RHS (1997) Immediate changes on metabolic parameters of the freshwater teleost fish *Piaractus mesopotamicus*. *B. Técn. CEPTA* 10: 45-52
- Moraes G, Choudhuri JV, Souza RHS, Neto CS (2004) Metabolic effects of exercise in the golden fish *Salminus maxillosus* (Valenciennes, 1849). *Braz. J. Biol.* 64: 655-660

- Moraes G, Altran AE, Avilez IM, Brbosa CC, Bidinotto PM (2005) Metabolic adjustments during semi-aestivation of the marble swamp eel (*Synbranchus marmoratus*), a facultative air-breathing fish. *Braz. J. Biol.* 65: 305-312
- Muusze B, Marcon J, van den Thillart G, Almeida-Val V (1998) Hypoxia tolerance of Amazon fish: respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus ocellatus*. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120: 151-156
- Nikinmaa M (1990) Vertebrate red blood cells. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Nikinmaa M (1997) Oxygen and carbon dioxide transport in vertebrate erythrocytes: an evolutionary change in the role of membrane transport. *J. Exp. Biol.* 200: 369-380
- Nikinmaa M (2001) Hemoglobin function in vertebrates: evolutionary changes in cellular regulation in hypoxia. *Respir. Physiol.* 128: 317-329
- Oliveira RD, Lopes JM, Sanches JR, Kalinin AL, Glass ML, Rantin FT (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
- Pérez JE, Boada A, Ojeda G (1984) Blood parameters in fish. Hemoglobin concentration, hematocrit and the number of red blood cells in some freshwater fishes of eastern Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Venezuela* 23: 43-47
- Power ME (1987) Predator avoidance by grazing fishes in temperate and tropical streams: importance of stream depth and prey size. *In: Predation direct and indirect impacts on aquatic communities.* University Press of New England, London
- Prosser CL (1991) Environmental and metabolic animal physiology. John Wiley, New York
- Salama A, Nikinmaa M (1988) The adrenergic response of carp *Cyprinus carpio* red cells: effects of P<sub>O</sub><sub>2</sub> and pH. *J. Exp. Biol.* 136: 404-416
- Stryer L (1996) Bioquímica. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro
- Sundin L, Reid SG, Rantin FT, Milsson WK (2000) Branchial receptors and cardiorespiratory reflexes in a neotropical fish, the tambaqui *Colossoma macropomum*. *J. Exp. Biol.* 203: 1225-1239
- Tetens V, Christiansen NJ (1987) Beta-adrenergic control of blood oxygen affinity in acutely hypoxia exposed rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 157: 667-675
- Thomas S, Perry SF (1992) Control and consequences of adrenergic activation of red blood cell Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange on blood oxygen and carbon dioxide transport in fish. *J. Exp. Zool.* 263: 160-175

- Trinder P (1969) Determination of glucose in blood using glucose oxidase with the alternative oxygen acceptor. *Analyt. Clin Biochem.* 6: 24-25
- Val AL, Almeida-Val VMF, Affonso EG (1990) Adaptive features of Amazon fishes: hemoglobins, haematology, intraerythrocytic phosphates and whole blood Bohr effect of *Pterygoplichthys multirradiatus* (Siluriformes). *Comp. Biochem. Physiol.* 97: 435-440
- Val AL, Affonso EG, Almeida-Val VMF (1992) Adaptive features of Amazon fishes: blood characteristics of curimatá *Prochilodus nigricans*. *Physiol. Zool.* 65: 832-843
- Val AL, Menezes GC, Wood CM (1998) Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. *J. Fish Biol.* 52: 83-93
- van den Thillart GEEJM, van Waarde A (1985) Teleosts in hypoxia: aspects of anaerobic metabolism. *Mol. Physiol.* 8: 393-409
- van Hesswijk JCF, van Pelt J, van den Thillart GEEJM (2005) Free fatty acid metabolism in the air-breathing African catfish *Clarias gariepinus* during asphyxia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 141: 15-21
- Weber RE, Jensen FB (1988) Functional adaptations in hemoglobins from ectothermic vertebrates. *Ann. Rev. Physiol* 50: 161-179
- Wells RMG (2005) Red blood cell function and hematology in two tropical freshwater fishes from Australia. *Comp. Biochem. Physiol. A* 141: 87-93

## CAPÍTULO 7

### CONCLUSÕES

#### 1. Conclusões Específicas

- (a) *P. anisitsi*, se comporta como um respirador aéreo contínuo, mas não obrigatório, ou seja, captam ar sob condições de normóxia e hipóxia a intervalos não regulares; em normóxia, o comportamento de respiração aérea é sincrônico e de maior frequência no período noturno;
- (b) *P. anisitsi* é tolerante à hipóxia e seu o comportamento respiratório é oxiconformista e, apresenta apnéia durante reduções das tensões de oxigênio sem acesso ao ar atmosférico;
- (c) O estômago de *P. anisitsi* possui características morfológicas necessárias para obtenção de oxigênio atmosférico; é grande, pouco diferenciado em regiões gástricas, possui uma capilarização extensa imediatamente abaixo do epitélio da mucosa estomacal, além dos vasos sangüíneos distribuídos na lâmina própria e estruturas, organelas e barreira ar-sangue muito delgada características de uma superfície respiratória;
- (d) As brânquias de *P. anisitsi* possuem a mesma estrutura básica das brânquias de peixes teleósteos de respiração exclusiva aquática, com holobrânquias em todos os arcos branquiais e com lamelas acima e abaixo dos filamentos branquiais; essa estrutura básica reflete dependência à respiração aquática;
- (e) A superfície potencialmente respiratória das brânquias é maior que a do estômago e, corresponde a 82,40% do total da superfície das brânquias de *P. anisitsi*; ainda apresenta maior volume que o estômago, assim como maior relação volume/massa corpórea, suas lamelas possuem área superficial, relação superfície/massa corpórea e densidade de superfícies maiores do que a mucosa estomacal, o que sugere que a espécie possui dependência da respiração aquática;

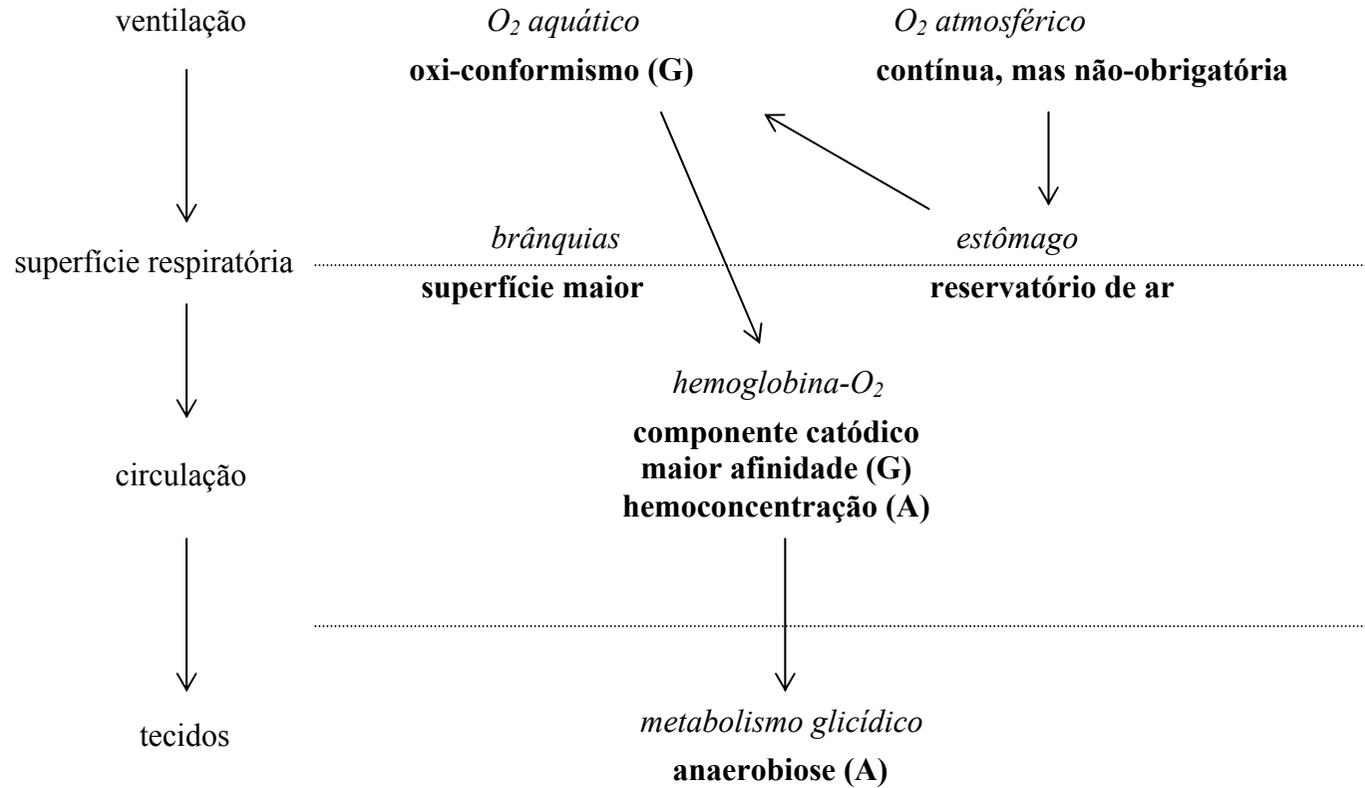
- (f) As hemoglobinas de *P. anisitsi* apresentam um componente catódico, o qual exibe alta afinidade ao oxigênio e insensibilidade ao pH e assim pode auxiliar como transportador e reserva de oxigênio sob períodos de hipóxia e/ou acidose; em condição de hipóxia, a afinidade do oxigênio à hemoglobina é mais elevada, enquanto que, na exposição ao ar, a afinidade é similar à condição de normóxia;
- (g) Os parâmetros hematológicos em *P. anisitsi* respondem à hipóxia com hemoconcentração provavelmente devido ao aumento da demanda de oxigênio, enquanto a ausência de diferenças nos parâmetros hematológicos durante a exposição ao ar por 24h é um indicativo da capacidade da espécie realizar respiração aérea;
- (h) No metabolismo glicídico de *P. anisitsi*, em condição de hipóxia, o fígado tem papel fundamental como fonte glicemiante para a ativação do metabolismo anaeróbico e, igualmente fundamental é sua interrelação com o músculo branco para a manutenção da produção energética fermentativa; na exposição ao ar, há a manutenção do metabolismo aeróbico, porém é considerada como fonte de estresse, verificada pelas reduções de glicose hepática e muscular.

## 2. Conclusões Gerais

Neste estudo, a partir das conclusões específicas de cada capítulo, se verifica que *P. anisitsi* apresenta diferentes respostas na dependência das condições experimentais a que é submetido. A interrelação dos aspectos analisados do comportamento respiratório e da cascata de O<sub>2</sub> fornece uma visão geral do funcionamento da espécie frente às condições experimentais, hipóxia e exposição ao ar, com relação à utilização de oxigênio.

### *Condição de hipóxia no meio aquático*

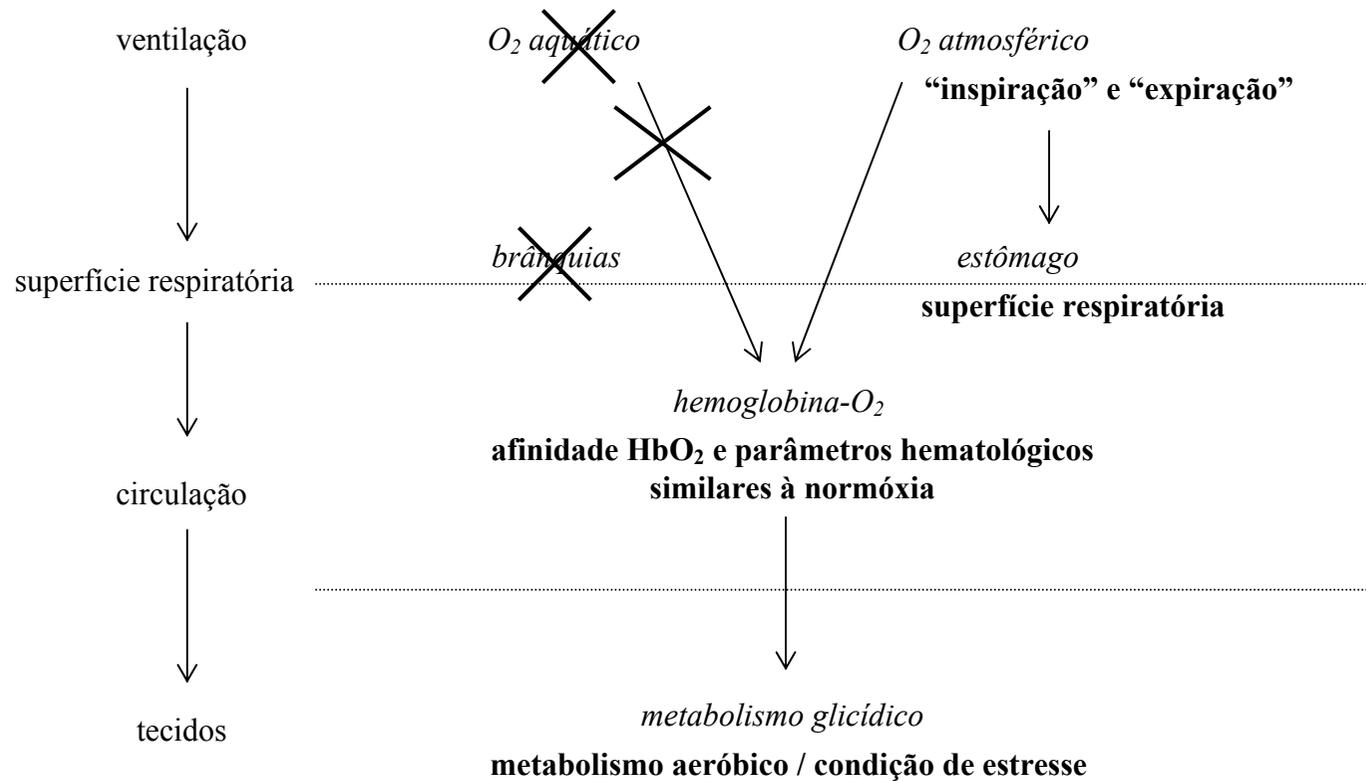
A superfície respiratória das brânquias é maior que a superfície respiratória estomacal, o que indica dependência da respiração aquática e, o órgão de respiração aérea serve como um reservatório de ar e pode auxiliar na tolerância à baixa disponibilidade de oxigênio na água. A respiração aérea é contínua, não-obrigatória com maior frequência durante o período noturno e sincrônica. O sincronismo apresentado durante respiração aérea sugere um comportamento antipredatório. Durante hipóxia gradual, sem acesso ao ar atmosférico, o estômago cheio de ar parece dar suporte ao comportamento oxi-conformista observado pela diminuição da taxa metabólica e a extração de O<sub>2</sub> e a apnéia. A presença de um componente hemoglobínico catódico, com alta afinidade ao oxigênio e não afetada por diminuição de pH, e a maior afinidade Hb-O<sub>2</sub> em hipóxia constituem ajustes auxiliares e necessários frente à condição de hipóxia. Conjuntamente a esses ajustes, a tolerância à hipóxia também é suportada pelas alterações nos parâmetros hematológicos que contribuem para maior capacidade de carreamento de oxigênio até os tecidos e, em casos extremos, pela ativação do metabolismo anaeróbico com o processo de fermentação láctica para tentar manter o fornecimento energético (Figura 1).



**Figura 1:** Esquema das conclusões do estudo proposto em condição de hipóxia no meio aquático considerando o comportamento respiratório e a cascata de O<sub>2</sub>, desde o transporte de oxigênio a partir da água/ar até a utilização pelos tecidos em *P. anisitsi*. Entre parênteses: G: hipóxia gradual e A: hipóxia aguda.

*Condição de exposição aérea*

Diferentemente da condição de hipóxia, as brânquias, aparentemente, não são funcionais na exposição aérea, pois não há fluxo de água que passa entre seus filamentos e, dessa forma, a superfície respiratória a ser considerada é unicamente a do estômago. Quando exposto ao ar há períodos de “inspiração” e “expiração” intermitentes pela boca, de forma a suprir o estômago com ar. Na condição de exposição ao ar, a afinidade Hb-O<sub>2</sub> é similar àquela da condição de normóxia e, da mesma forma, não há alteração nos parâmetros hematológicos, o que evidencia a funcionalidade da superfície respiratória estomacal e, também, há a manutenção do metabolismo aeróbio. Embora não ocorram alterações nesses parâmetros e a espécie mostre capacidade de obter O<sub>2</sub> atmosférico, a exposição aérea é uma condição estressante, verificado pela redução de glicose hepática e muscular e, aumento da glicose plasmática, e assim parece ser utilizada pela espécie em situações emergenciais (Figura 2).



**Figura 2:** Esquema das conclusões do estudo proposto em condição de exposição aérea considerando o comportamento respiratório e a cascata de O<sub>2</sub>, desde o transporte de oxigênio a partir do ar até a utilização pelos tecidos em *P. anisitsi*.