

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

**ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E CARDIO-RESPIRATÓRIAS DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) FRENTE À EXPOSIÇÃO SUB-LETAL
AO SULFATO DE COBRE**

Lyandra Mara Zanatta Neder

**SÃO CARLOS
2005**

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

ALTERAÇÕES BIOQUÍMICAS E CARDIO-RESPIRATÓRIAS DE
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*) FRENTE À EXPOSIÇÃO SUB-LETAL
AO SULFATO DE COBRE

LYANDRA MARA ZANATTA NEDER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas, tendo como orientador o Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin e co-orientadora Dra. Cheila de Lima Boijink.

SÃO CARLOS – SP
2005

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

N371ab

Neder, Lyandra Mara Zanatta.

Alterações bioquímicas e cardio-respiratórias de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) frente à exposição sub-letal ao sulfato de cobre / Lyandra Mara Zanatta Neder. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

66 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2005.

1. Fisiologia comparada. 2. Sulfato de cobre. 3. *Oreochromis niloticus*. 4. Respirimetria. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)

*Dedico esse trabalho à minha mãe.
Por tudo o que ela é pra mim.*

*“Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,
nem jamais penetrou em coração humano o que
Deus tem preparado para aqueles que O amam.”
(1 Coríntios 2:9)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus! Creio que tudo o que tenho passado, não só nos últimos tempos, mas desde que decidi segui-Lo, são presentes dos quais eu nem sou digna, mas como diz a Sua própria palavra, essa é a graça de Deus: embora não sejamos merecedores de coisa alguma, Ele nos dá porque se alegra em nos abençoar! E eu tenho provado isso a cada dia! Obrigada, Senhor, por sua fidelidade e amor sobre a minha vida!

Um muito obrigada extremamente especial ao professor Tadeu por ter me dado essa chance e por ter acreditado em mim! Por ter confiado ao ponto de me aceitar como orientada sem mesmo me conhecer... Obrigada pela oportunidade, Tadeu.

A próxima pessoa é a minha mãe! Tenho infinitamente a agradecer a essa super-mãe, que desde os meus três aninhos, é pai e mãe! E faz isso tão bem! Eu sempre digo às pessoas que se algum dia eu conseguir ser pelo menos metade do que ela é já me darei por satisfeita! Eu acredito também que foi ela quem me ensinou sobre a essência da vida, porquê para saber abraçar, é preciso antes, saber amar! Eu te amo muito, mãe! Obrigada por sempre me apoiar tanto em tudo!

Dando prosseguimento a minha família, agradeço aos meus irmãos, Cláudia e Marcos, simplesmente por existirem! Ainda que distantes, o amor que nos une é tão imenso! Sei bem que em todas as dificuldades sofremos juntos! Assim como também em todas as bênçãos, nos alegramos e glorificamos a Deus, juntos! Obrigada a vocês também pela extensão da família e alegria que me dão meus sobrinhos: Beto, Duda e Ana Júlia! E também meus cunhados Edson, por todo apoio e preocupação e à Cássia, pelas orações... Sintam-se abraçados agora!

Agradeço às minhas avós, tios e primos, que sempre torceram tanto por mim!

À minha família CEM também só tenho a agradecer! A Comunidade Evangélica Missionária tem sido também minha grande família! Especialmente aos pastores Alexandre

e Maria Alice, que acabaram me adotando aqui! Por onde eu for jamais esquecerei vocês! Vocês são mesmo a minha família de São Carlos! Seria impossível citar nesse texto a razão de tanto amor, pois aprendi a amá-los de forma indescritível! Estarei sempre pronta para um forte abraço!

Às grandes amigadas que se destacaram em meio à multidão: Gi, Sandrinha, Cheila, Carol Zak, Clene, Fer Sampaio, Fabinho, Rô Botelho, Rô Bela, Sany! Obrigada, gente! Um abraço “daqueles”!

Às pessoas da célula de estudo bíblico em família, por sempre orarem por mim e por participarem de cada fase que passo! Eu nem imagino como poderia ser, caso vocês não existissem na minha vida! Sentirei falta dos abraços!

À equipe de trabalho de aconselhamento voluntário da escola Juliano Neto: Wagney, Sarinha, Lucas, Nayra, Bruno e Tamara - foi muito gratificante ver todos os frutos e desenvolver esse trabalho com vocês, aprendendo a lidar com as pessoas e os seus problemas, nos lembrando sempre de que não importa o quão grande eles pareçam, Deus é sempre maior!

Ao grupo da Aliança Bíblica Universitária (ABU) por toda amizade, apoio, força e compreensão e... abraços! Ah! E também pelo carinhoso apelido de “Felícia”! Eu amo vocês!

Ao grupo de início da ABP (Aliança Bíblica de Profissionais): Anderson, Cynthia, Igor, Raquel e Rafa: obrigada pelos momentos e palavras de tanta sabedoria! Obrigada por me auxiliarem “na travessia da ponte”! E também pelos abraços!

Aos meus grandes amigos ausentes, mas, sempre presentes: Lígia, Pepinho e Humberto, por serem tão essenciais pra mim! Um forte abraço pra vocês!

Ao pessoal do lab: André, Cheila, Cláudia, Cláudio, Cléo, Cleoni, Débora, Diana, Eli, Fabinho, Fer, Guilherme, Jackie, Jane, Jeane, José Roberto, Kátia, Lailinha, Lenise,

Marina, Marise, Mônica, Tiago, Thiago, Wagner e também às professoras Ana e Marisa... Obrigada pelo tanto que pude aprender com vocês todos! Desejo que a “terapia do abraço” seja imortalizada entre vocês! Um grande e especial abraço a Cheila, a Fer, a Eli e a Lailinha por terem me auxiliado durante os experimentos!

Aos funcionários envolvidos na manutenção do departamento, especialmente à Selminha e à Carmem. Merecem um abraço!

Aos professores convidados para compor a banca examinadora, Cleoni e Luiz Henrique, obrigada pelas sábias sugestões e correções dadas ao trabalho!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 - A contaminação do ambiente aquático.....	1
1.2 - Os efeitos tóxicos no organismo.....	2
1.3 - OBJETIVOS	5
2.0 - MATERIAL E MÉTODOS.....	2
2.1 - Os animais	2
2.1.1 - Breves considerações sobre a espécie	2
2.1.2 – Posição Sistemática da espécie	8
2.1.3 - Coleta e Manutenção em Laboratório	8
2.2 - Delineamento experimental	9
2.2.1 - Primeira etapa: Determinação daCL₅₀	9
2.2.2 - Segunda etapa: Análises realizadas.....	12
2.2.2.a - Determinações Hematimétricas	12
2.2.2.b - Concentração de íons	14
2.2.2.c - Proteína total.....	14
2.2.2.d - Intermediários Metabólicos	15
2.2.2.e – Enzima: Na⁺/ K⁺ - ATPase branquial	17
2.2.2.f - Metalotioneína (MT) branquial.....	18
2.2.2.g - Acúmulo de cobre nas brânquias.....	19

2.2.3 - Terceira etapa: Avaliação dos parâmetros cardio-respiratórios.....	19
2.2.3.a - Parâmetros cardio-respiratórios.....	20
3.0 - Análise Estatística	23
4.0 - RESULTADOS.....	25
4.1 - Hematologia, íons e amônia plasmática.....	25
4.2 - Intermediários Metabólicos	27
4.3 - Na^+/K^+ - ATPase branquial.....	29
4.4 - Metalotioneína.....	31
4.5 - Acúmulo de cobre nas brânquias	33
4.6 - Spirometria.....	35
4.6.1 - Frequência Respiratória (f_R)	35
4.6.2 - Extração de Oxigênio	37
4.6.3 - Consumo de Oxigênio	39
4.6.4 - Ventilação Branquial	41
4.6.5 - Volume ventilatório (V_T)	43
4.6.7 - Frequência Cardíaca (f_H).....	45
5.0 - DISCUSSÃO.....	47
6.0 - CONCLUSÕES	57
7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. 7
- Figura 2** – percentagem de mortalidade de *Oreochromis niloticus* frente a diferentes concentrações de CuSO_4 (mg.L^{-1}), na determinação da CL_{50} – 48 h. 11
- Figura 3.** Valores médios \pm S.E.M. da atividade da Na^+/K^+ - ATPase branquial de de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), por 48 h (T1, representado por coluna branca e T2, representado por coluna preta). * representam diferenças significativas entre os grupos. Teste t ($P < 0,05$). 30
- Figura 4.** Valores médios \pm S.E.M. da metalotioneína branquial de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), por 48 h. (T1, representado por coluna branca e T2, representado por coluna preta). * representam diferenças significativas entre os grupos teste t ($P < 0,05$). 32
- Figura 5.** Valores médios \pm S.E.M. do acúmulo de cobre em tecido branquial de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), por 48 h. (T1, representado por coluna branca e T2, representado por coluna preta). * representam diferenças significativas entre os grupos teste t ($P < 0,05$). 34
- Figura 6.** Valores médios \pm S.E.M. da f_R de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$). 36
- Figura 7.** Valores médios \pm S.E.M. da EO_2 de tilápia, *Oreochromis niloticus*, grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$). 38
- Figura 8.** Valores médios \pm S.E.M. da $\dot{V}\text{O}_2$ de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$). 40
- Figura 9.** Valores médios \pm S.E.M. da $\dot{V}\text{G}$ de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$). 42
- Figura 10.** Valores médios \pm S.E.M. do V_T de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), em diferentes tempos,

durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$)..... 44

Figura 11. Valores médios \pm S.E.M. da f_H de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$). 46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores médios \pm S.E.M. dos parâmetros hematológicos, iônicos e concentração de amônia do plasma de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. T1 = grupo controle; T2 grupo tratado com CuSO₄ por 48 h.....26

TABELA 2. Valores médios \pm S.E.M. de lactato, piruvato, glicogênio e glicose em fígado, em músculos branco e vermelho e em plasma tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. T1 = grupo controle; T2 = grupo tratado com CuSO₄ por 48 h....28

RESUMO

O presente trabalho avaliou os efeitos da toxicidade do sulfato de cobre (CuSO_4) sobre as respostas bioquímicas e cardio-respiratórias da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Para isso, um grupo de animais foi exposto a 50% da CL_{50} (48 h) de CuSO_4 , e o grupo controle foi submetido às mesmas condições de qualidade da água sem CuSO_4 . Foram realizadas coletas de sangue, brânquias, fígado e músculos branco e vermelho no final do período experimental para as seguintes determinações: hematócrito (Hct), hemoglobina (Hb), contagem de eritrócitos (RBC), volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), Na^+/K^+ -ATPase, grupamentos-SH, glicose, lactato, piruvato, glicogênio, concentrações iônicas (Na^+ , K^+ e Cl^-) e amônia plasmática. Para determinação dos parâmetros cardio-respiratórios, no decorrer de 48 h, foram feitas as seguintes medidas: tomada de O_2 (taxa metabólica – $\dot{V}\text{O}_2$), extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2), frequência respiratória (f_R), ventilação branquial (\dot{V}_G), volume ventilatório (V_T) e frequência cardíaca (f_H). Observou-se que no tratamento com CuSO_4 , houve aumento significativo de Hct, Hb, RBC e VCM com relação ao grupo controle. Houve aumento de lactato no fígado e músculo vermelho, de glicose no fígado e diminuição nos músculos, e redução de glicogênio em todos os tecidos analisados. Com relação à respirometria, durante as 48 h de monitoramento, o grupo tratado com CuSO_4 apresentou redução da EO_2 após 3 h de exposição, redução da $\dot{V}\text{O}_2$ após 6 h, aumento da \dot{V}_G e f_R após 1 h e sem alteração significativa no V_T em relação ao grupo controle. A f_H apresentou bradicardia após 12 h.

ABSTRACT

The present study evaluated the biochemical, hematological and cardio-respiratory responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to copper sulfate (CuSO₄). A group of fish (T2; n = 8) was exposed to 50% of a CL₅₀ (48 h) of CuSO₄, while the control group (T1; n = 8) was submitted to the same conditions of water quality without CuSO₄. Samples of blood, gills, liver, white and red muscles were collected at the end of the experimental period for the following determination: Hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb), red blood cells (RBC), mean corpuscular volume (VCM), mean corpuscular hemoglobin (HCM), mean corpuscular hemoglobin concentration (CHCM), Na⁺/K⁺-ATPase, metallothionein (MT), glucose, lactate, pyruvate, glycogen, ionic concentrations (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) and plasmatic ammonia. The cardio-respiratory parameters (oxygen uptake - $\dot{V}O_2$, O₂ extraction from the ventilatory current - EO₂, respiratory frequency - f_R , gill ventilation - \dot{V}_G , ventilatory tidal volume - V_T, and heart rate - f_H). were also measured in both experimental groups during 48 h: When compared to the control group, fish treated with CuSO₄ showed a significant increase in Hct, Hb, RBC and VCM. Lactate concentration increased in liver and red muscle. Glucose increased also in liver, but decreased in the muscles, and a reduction on glycogen was observed in all the tissues analyzed. Fish exposed to CuSO₄ presented a reduction in EO₂ after 3 h and in $\dot{V}O_2$ after 6 h. An increase in \dot{V}_G was detected after 1 h of exposure to CuSO₄. This hyperventilation was mainly due to increases in the f_R , since the V_T remained constant during all the experimental time. Fish treated with CuSO₄ also displayed a significant bradycardia after 12 hours of exposure.

1. INTRODUÇÃO

1.1 - A contaminação do ambiente aquático

Nas últimas décadas, uma das atividades que mais cresceram no país foi o cultivo intensivo e semi-intensivo de peixes, consolidando-se como um setor de grande importância econômica (NEWMAN, 1993). Dentre as espécies comumente cultivadas, a tilápia do Nilo, (*Oreochromis niloticus*), é considerada uma das mais importantes para consumo humano em muitos países e seu cultivo tem crescido exponencialmente em aquicultura, inclusive no Brasil (ÇOĞUN & KARGIN, 2003).

Como todo setor de crescimento lucrativo, observam-se características desenfreadas de recursos mal-utilizados, sem serem avaliadas as consequências que estas podem trazer para o meio, afetando diretamente os animais aquáticos e indiretamente seus consumidores. Portanto, paralelamente a esse desenvolvimento, houve um aumento de doenças nos peixes cultivados. Assim, importantes intervenções têm sido realizadas com produtos tóxicos a fim de atenuar um aumento na incidência e severidade de ictiopatologias (PAVANELLI et al., 1998). Na tentativa de solucionar estes problemas, produtos químicos, como o sulfato de cobre (CuSO_4), têm sido não raramente, erroneamente utilizados (KUBITZA, 1998).

Em piscicultura o CuSO_4 é aplicado por ser um importante algicida, agindo na redução da floração de algas, cujo consumo excessivo de O_2 pode levar a um déficit desse gás para os demais organismos aquáticos. É também utilizado com finalidade terapêutica, diminuindo a incidência de endoparasitas em espécies cultivadas (SHELENK et al. 1999).

A aplicação usual de CuSO_4 na piscicultura varia de 0,025 a 2,00 mg. L^{-1} ; contudo, a administração desses produtos nem sempre é efetuada de forma controlada, sendo que seu uso

indiscriminado, mesmo de forma profilática, pode trazer conseqüências gravíssimas ao meio ambiente (BOYD, 1990).

Além disso, nos últimos anos, a poluição por agrotóxicos e metais pesados aumentou, como conseqüência do grande volume desses, lançados no ambiente aquático. No Brasil, a agroindústria é uma atividade em franco desenvolvimento e é responsável por boa parte da balança comercial do país. Para garantir a eficiência dessa atividade, os empresários da agroindústria e mesmo pequenos produtores rurais, muitas vezes utilizam produtos químicos com o intuito de garantir e maximizar suas produções (KUBITZA, 1998).

Sendo assim, além do uso de produtos químicos diretamente nas pisciculturas, podem ser encontrados também na natureza, como conseqüência de outras vias de aplicação (HEATH, 1995).

Os metais de transição (cobre, zinco, ferro, cobalto, selênio, manganês) têm grande significado biológico e são importantes ao bom funcionamento dos organismos, onde desempenham valiosas funções. Esses metais interagem com muitos tipos celulares e, assim, desempenham importante papel na respiração celular, no transporte de oxigênio, na estabilidade protéica, entre outros. Entretanto, em excesso, tornam-se tóxicos, pois se ligam inapropriadamente a moléculas ou formam radicais livres. Altas concentrações de cobre também afetam a função branquial através da perturbação da homeostase do sódio (LARÉN & McDONALD, 1985).

1.2 - Os efeitos tóxicos no organismo

Quando o cobre é utilizado indevidamente, pode apresentar efeitos tóxicos nas espécies aquáticas (BEAUMONT et al., 2000; NOVELLI FILHO et al., 2000; STRAUS, 2003). As substâncias tóxicas tendem a inibir ou acelerar o metabolismo (DANG, 2000),

sendo que esses efeitos iniciam-se primeiramente nas células e podem alterar a permeabilidade de membranas (NRIAGU & PACINA, 1988), afetando a integridade celular, tanto estrutural quanto fisiologicamente, resultando em lesões histológicas e levando ao comprometimento da função de um ou mais órgãos (HEATH, 1995).

Na maioria dos casos, os metais são transportados pelo sangue (SIMKISS & TAYLOR, 1981). Desta forma, podem ter efeitos nocivos nos mais variados órgãos. Os parâmetros hematológicos expressam processos corporais e servem como indicadores da condição geral ou dos distúrbios metabólicos (JYOTHI & NARAYAN, 1999). Distúrbios metabólicos em resposta ao estresse (JYOTHI & NARAYAN, 1999) podem promover alterações na concentração de amônia plasmática, mecanismo este que assegura o abastecimento e redistribuição de energia para manutenção da homeostase (WENDELAAR BONGA, 1997; VAN WEERD & KOMEN, 1998).

Durante a desintoxicação do organismo após exposição a metais, o fígado é o principal responsável pela retirada do excesso de tóxicos, sendo estes acumulados e concentrados na bile (SØRENSEN, 1991). Este excesso de metais para espécies aquáticas resulta em toxicidade, perda de íons, redução no crescimento e na sobrevivência dos organismos expostos (HOLGSTRAND & WOOD, 1996; TAYLOR et al., 1996; SCHERER et al., 1997; MAZON & FERNANDES, 2001).

O cobre também pode circular no organismo e se ligar à albumina e outras proteínas de pequeno peso molecular (HARRIS & BIRD, 2000). O principal local de excreção do excesso de cobre em peixes teleósteos é a bile (GROSELL et al., 2002). As brânquias de peixes também estão implicadas na excreção de cobre (ÇOĞUN & KARGIN, 2004).

Conforme o período de exposição e as concentrações de cobre impostas, podem ocorrer alterações nos intermediários metabólicos, o que permite verificar os ajustes no metabolismo energético (HEATH, 1995). A estimulação do metabolismo pode ser claramente

refletida nas mudanças no consumo de O_2 durante exposição ao cobre (McGEER et al., 2000) ou pelo aumento de excretas metabólicas como, por exemplo, a amônia (TAYLOR et al., 1996). No âmbito bioquímico, estas excretas podem refletir as mudanças nas enzimas envolvidas no metabolismo e aquelas funções críticas para a sobrevivência da célula, como a regulação iônica e atividade da Na^+/K^+ -ATPase (McGEER et al., 2000).

Como as brânquias dos peixes recebem um fluxo constante de água, são o primeiro contato com o meio aquático contaminado e podem acumular altas concentrações desses metais (ÇOĞUN & KARGIN, 2003). Além disso, desempenham um papel fundamental na respiração e no balanço hidro-eletrolítico (PINHEIRO, 2004). O cobre liga-se aos sítios ativos da Na^+/K^+ -ATPase, resultando em uma diminuição na sua atividade, desestabilizando o equilíbrio iônico e/ou osmótico do animal (GROSELL et al., 2002).

Para minimizar a extensão dos distúrbios causados pelos metais, o primeiro sistema de defesa da célula é o aumento da proteína metalotioneína (MT) que é um marcador bioquímico em potencial na contaminação de metais (OLSVIK et al., 2000; BRAGIGAND & BERTHET, 2003). Além disso, a MT apresenta diversas funções, como controle homeostático dos metais de transição e a desintoxicação de metais pesados (CARVALHO, 2003).

Além de avaliar as consequências relativas ao mecanismo interno do organismo do animal mediante aos metais ou aos produtos utilizados na piscicultura, é extremamente necessário analisar o comportamento fisiológico referente a tais alterações. A medida do consumo de O_2 torna-se, portanto, um instrumento eficiente para avaliar como os animais respondem às alterações tóxicas do meio a fim de manterem a homeostase interna. DALZELL et al. (2002) mostraram que a respirometria é um método eficaz para a avaliação da toxicidade de metais. A $\dot{V}O_2$ tem sido utilizada como uma medida quantitativa para avaliar a atividade geral dos peixes (JAGER & DEKKERS, 1975). Respostas distintas normalmente são encontradas para uma mesma espécie, devido a diferentes condições experimentais, como

temperatura da água, metodologia, tamanho e estado fisiológico do animal (TORT et al., 1986; RUS, 2000).

Altas concentrações de metais causam um aumento da camada de muco nas brânquias, dificultando a difusão do O₂ da água para o sangue (PLAYLE, 1998). Como consequência, um dos maiores efeitos tóxicos desses contaminantes é a diminuição da capacidade das brânquias em realizar com eficiência suas funções de trocas de gases respiratórios e íons (BEAMOUNT et al., 2002; MAZON et al., 2004).

1.3 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

a) Avaliar as possíveis alterações hematológicas (hematócrito - Hct, hemoglobina - Hb, contagem de eritrócitos - RBC, volume corpuscular médio - VCM, hemoglobina corpuscular média- HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média - CHCM).

b) avaliar a atividade da enzima Na⁺/K⁺-ATPase, da metalotioneína - MT - (grupamentos- SH), nas concentrações dos intermediários metabólicos (glicose, lactato, piruvato, glicogênio), concentrações iônicas (Na⁺, K⁺ e Cl⁻) e da amônia plasmática frente à exposição a concentrações sub-letais de CuSO₄.

b) Avaliar as respostas e adaptações dos parâmetros cardio-respiratórios (tomada de O₂ ou taxa metabólica – $\dot{V}O_2$, extração de O₂ da corrente ventilatória - EO₂, frequência respiratória - f_R , ventilação branquial - \dot{V}_G , volume ventilatório - V_T e frequência cardíaca - f_H) da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, frente à exposição a concentrações sub-letais de CuSO₄.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Os animais

2.1.1 - Breves considerações sobre a espécie

A tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* é uma espécie nativa da África onde encontra-se amplamente distribuída. Todavia, por ser um animal bastante rústico, resistente às doenças e ao manejo e devido à suas características agradáveis ao paladar e ao consumo humano, já destaca-se como um dos principais peixes cultivados em pisciculturas em regiões tropicais e sub-tropicais. Primeiramente, foi introduzida na América do Sul, parte da Índia e Ceilão. No Brasil foram introduzidas em 1971, na região Nordeste pelo Departamento de Obras Contra a Seca – DNOCS/Fortaleza, CE, provenientes da Costa do Marfim (DELAVECHIA, 1994). A partir daí, a espécie foi adotada em cultivos intensivos e semi-intensivos de várias regiões do Brasil, além de ter sido introduzida em vários corpos d'água naturais onde podem ser facilmente coletadas. A espécie se reproduz rapidamente e seu cultivo tem crescido exponencialmente em muitos países (ÇOĞUN & KARGIN, 2003).



Figura 1. Exemplar de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Fonte:

<http://www.fishbase.org/Photos/ThumbnailsSummary.cfm?ID=2>

2.1.2 – Posição Sistemática da espécie

Segundo TREWAVAS (1983) a tilápia do Nilo ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTECHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERYGII

Superordem: TELEOSTEI

Ordem: PERICIFORMES

Família: CICHLIDAE

Gênero: *Oreochromis*

Espécie: *niloticus*

2.1.3 - Coleta e Manutenção em Laboratório

Exemplares de *Oreochromis niloticus* foram obtidos na Piscicultura Visconde, nas proximidades do município de São Carlos, SP, e transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do DCF/UFSCar em sacos plásticos contendo água aerada com ar comprimido. No laboratório os animais foram aclimatados por 30 dias em tanques de 1000 L dotados de fluxo constante de água não clorada, aeração constante ($P_{wO_2} > 130$ mmHg), fotoperíodo natural, a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$; pH $\sim 7,30$; alcalinidade $\text{CaCO}_3 \sim 10$ mg. L^{-1} ; dureza $\text{CaCO}_3 \sim 35$ mg. L^{-1} ; $\text{Na}^+ \sim 1,6$ mEq. L^{-1} ; $\text{K}^+ \sim 3,8$ mEq. L^{-1} ; amônia $\sim 0,021$ mg. L^{-1} .

2.2 - Delineamento experimental

A experimentação foi subdividida em três etapas: a. determinação da CL_{50-48} h; b. análises bioquímicas e; c. análise dos parâmetros fisiológicos. Estas etapas são descritas a seguir:

2.2.1 - Primeira etapa: Determinação da CL_{50}

A primeira etapa constou da determinação da concentração letal para 50% dos organismos em estudo (CL_{50-48} h) na densidade de 5 g de peixe L^{-1} .

Exemplares de *O. niloticus* com peso médio de $116,80 \pm 3,02$ g, e comprimento total de $16,73 \pm 1,87$ cm, foram submetidos a diferentes doses de cobre, na forma de sulfato de cobre ($CuSO_4$). Para isso, os animais foram transferidos para aquários de vidro com volume de água de 180 L (sistemas estáticos), com aeração constante mantendo-se nas condições ideais os parâmetros físico-químicos da água, onde permaneceram por 24 h. Após esse período de recuperação do manuseio, era iniciada a contaminação por 48 h. Foram distribuídos 8 exemplares de *O. niloticus* em cada aquário, com a finalidade de simular a densidade de estocagem utilizada em sistemas de cultivo intensivo, que varia de 50 a 600 Kg de peixe $.m^{-3}$ (FURTADO, 1995; SCHMITTOU, 1995). Os animais não foram alimentados nas 24 horas prévias a transferência ou durante o período de exposição.

As definições das concentrações em cada teste, foram determinadas à partir de análises de outros trabalhos realizados com a mesma espécie, ou em condições semelhantes. Para cada concentração imposta, haviam dois aquários (réplica).

Os animais foram expostos a dosagens de 6, 8, 10, 12, 12,5, 13, 13,5, 14 e 16 mg .L⁻¹ de CuSO₄, durante 48 h, onde foi observada a mortalidade em cada concentração dentro desse período. Para cada teste realizado, havia um grupo controle nas mesmas condições e sem a contaminação; nesses grupos não houve mortalidade. Durante este processo foram observadas alterações de comportamento, tais como letargia, perda de equilíbrio e aumento na produção de muco na brânquias e na superfície do corpo dos animais. Após as exposições às diferentes concentrações de CuSO₄, os dados foram processados pelo programa JSphear para o cálculo da CL₅₀. O valor determinado para CL₅₀-48 h foi de 13,05 mg de Cu.L⁻¹, com intervalo de confiança entre 12,71 a 13,42. Esse valor equivale a 47, 14 mg de CuSO₄.L⁻¹.

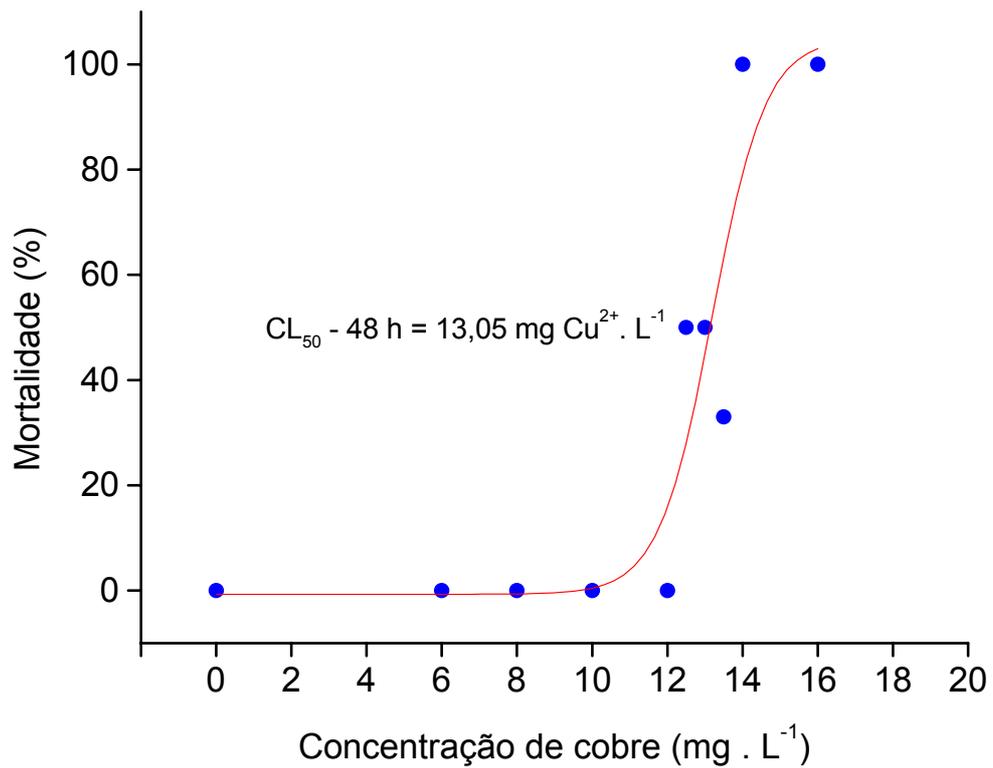


Figura 2 – Percentagem de mortalidade de *Oreochromis niloticus* frente a diferentes concentrações de CuSO_4 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), na determinação da $\text{CL}_{50} - 48 \text{ h}$.

2.2.2 - Segunda etapa: Análises realizadas

Para realização da segunda etapa, foi calculada uma concentração sub-letal, a partir da determinação da concentração letal, ficando assim estabelecido o valor de 50% da mesma. Portanto, os animais foram expostos uma concentração de $23,57 \text{ mg.L}^{-1}$ de CuSO_4 , na densidade de animais de 5 g.L^{-1} .

Para a realização desses experimentos, os peixes foram transferidos para aquários de vidro, de volume 180 L. Após 24 h da recuperação do manuseio, uma solução estoque de CuSO_4 foi preparada e o volume adequado acrescentado cuidadosamente nos aquários experimentais (T2), os quais mantinham as mesmas características dos do grupo controle (T1), no qual não houve mortalidade.

Após 48 h de exposição, todos os animais foram sacrificados e os órgãos (brânquias, fígado e músculos branco e vermelho) foram dissecados, retirados, lavados com solução salina (0,09%) e congelados (-80°C) para posterior análise.

2.2.2.a - Determinações Hematimétricas

As amostras de sangue foram coletadas por punção caudal, com seringas de 5 mL previamente heparinizadas. Foram realizadas as seguintes medições:

Hematócrito

A determinação do hematócrito (Hct = %) foi realizada em réplicas, pela técnica de centrifugação em capilares de vidro (GOLDENFARB et al., 1971). Os tubos capilares foram fechados em uma das extremidades com massa apropriada e centrifugados a 10.000

rpm, por 5 min. Os valores foram calculados a partir de um cartão de leitura padronizado e os valores foram expressos em %.

Taxa de hemoglobina

A concentração de hemoglobina ($Hb = g.mL^{-1}$) foi determinada pela formação de cianometahemoglobina como descrito por COLLIER (1944), onde 10 μL de sangue foi adicionado a 2 mL de solução Drabkin (KCN, KH_2PO_4 , $K_3[Fe(CN)_6]$ em água destilada), homogeneizado em agitador Vórtex e a leitura óptica foi feita em espectrofotômetro (Spectronic Genesys 5, Milron Roy, U.S.A.) à 540 nm.

Contagem de eritrócitos

A contagem do número de eritrócitos (RBC), foi feita com microscópio óptico, em câmara de Neubauer após a diluição de 10 μL de sangue em 2 mL de solução de citrato formol 4%, misturando-se sem hemolisar. A contagem foi feita em microscópio óptico, utilizando câmara de contagem e lamínula especial (Câmara de Neubauer).

Índices Hematimétricos

Os índices hematimétricos foram calculados a partir dos valores determinados para Hct, [Hb] e RBC, aplicando-se as seguintes fórmulas:

$$VCM \text{ (Volume Corpuscular Médio)} = Hct \cdot 10 / RBC$$

$$\text{HCM (Hemoglobina Corpuscular Média)} = \text{Hb} \cdot 10 / \text{RBC}$$

$$\text{CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média)} = \text{Hb} \cdot 10 / \text{Hct}$$

2.2.2.b - Concentração de íons

Sódio e Potássio

As concentrações de Na^+ e K^+ foram medidas por fotometria de chama, após diluição 1: 100 em água destilada.

Cloreto

A concentração de íon Cl^- foi medida pelo kit reagente comercial Labtest, cujo princípio é: o cloreto reage com tiocianato de mercúrio formando cloreto de mercúrico e tiocianato. O tiocianato quando combinado com os íons férricos forma tiocianato férrico, de coloração amarela com intensidade proporcional à concentração de cloretos que é medida em espectrofotômetro (Spectronic Genesys 5, Milron Roy, U.S.A.) à 570 nm.

2.2.2.c - Proteína total

A proteína total foi determinada pelo método de BRADFORD (2000), utilizando-se como padrão protéico a albumina sérica bovina. As concentrações foram determinadas em espectrofotômetro a 595 nm em leitura de microplaca (Dynex Technologies, Inc.).

2.2.2.d - Intermediários Metabólicos

Preparação dos extratos ácidos

Os tecidos hepático e musculares, foram amostrados sobre superfície gelada, e pesados em quantidades apropriadas para as determinações das concentrações dos intermediários metabólicos, mantida a proporção de 100 mg de tecido/ml de ácido tricloroacético (TCA) a 20 %. Após a homogeneização, os extratos eram centrifugados a 3.000 rpm e os sobrenadantes utilizados como extratos celulares nas determinações de intermediários metabólicos.

Amônia total

A amônia total foi determinada por nesslerização (GENTZKON & MASEN, 1942), pela transferência de um volume de extrato plasmático, ao qual se adicionou reativo Nessler. A leitura óptica foi realizada em 420 nm e a concentração, estimada contra um padrão contendo 100 nM de cloreto de amônio, expressa em $\mu\text{M.mL}^{-1}$ de plasma.

Glicose

A glicose foi determinada pelo método hidrolítico ácido de DUBOIS et al. (1956), realizada em ácido sulfúrico. O método baseia-se no uso de um volume de extrato (plasma = 100 μL ; fígado = 2 μL , músculos = 50 μL) adicionado de 500 μL de fenol 4,1 % e 2,0 mL de H_2SO_4 concentrado, rapidamente adicionado ao meio de reação. Os tubos de reação

foram imediatamente resfriados em banho de água e a leitura óptica realizada por espectrofotometria em 480 nm. A concentração de glicose foi estimada contra um padrão de glicose contendo 100 nM.

Glicogênio

O glicogênio foi determinado pelo método de BIDINOTTO et al. (1998) seguido pela determinação de glicose por DUBOIS et al. (1956). As amostras (50 mg de fígado ou 100 mg de músculos) foram dissolvidas em 1mL de KOH 6 N. Foi utilizada uma alíquota desse extrato (fígado = 50 μ L ou músculos = 250 μ L) e acrescentado à solução álcool etílico e H₂SO₄ (10%). As amostras foram então centrifugadas a 3000 rpm durante 3 min e o precipitado dissolvido em água destilada. As amostras foram lidas em espectrofotômetro a 480 nm e os resultados expressos em μ M de unidades glicosil-glicose. g⁻¹.

Lactato

O lactato foi determinado segundo o método de HARROWER & BROWN (1972). Um volume de extrato (plasma = 50 μ L; fígado = 20 μ L ou músculos = 10 μ L) foi adicionado de 20 μ l de CuSO₄, 5 H₂O 4 %, 2,5 ml de H₂SO₄ concentrado e 50 μ l de solução de p-fenilfenol (1,5 g de p-fenilfenol em solução aquosa de NaOH 2 %) lentamente adicionado. Após 15 min de repouso, os tubos foram fervidos por 90 s e em seguida imediatamente resfriados em banho de água com gelo. A leitura óptica foi realizada em 750 nm e a concentração foi estimada contra um padrão de lactato contendo 50 nM de lactato.

Piruvato

O piruvato foi determinado segundo o método de LU (1939). Um volume de extrato (plasma = 400 μ L ou músculos = 500 μ L) foi adicionado a 250 μ L de dinitrofenilhidrazina 0,1% em HCl 2,0 N. Após 30 minutos em banho-maria a 37 °C foi adicionado à mistura de reação 3,0 mL de NaOH 1,3 N e a leitura óptica foi realizada em 440 nm. A concentração foi determinada contra um padrão de piruvato.

2.2.2.e – Enzima: Na⁺/ K⁺ - ATPase branquial

Foi realizada previamente a padronização da técnica para espécie. A padronização consistiu da otimização da atividade da enzima e foi realizada através do ensaio e variação de cada um dos componentes:

- NaCl (10, 25, 50, 100, 200, 250 e 300 mM)
- MgCl₂ (3, 5, 8, 1, 24, 48 e 60 mM)
- Na₂ATP (1, 2, 3, 5 e 10 mM)
- KCl (5, 9, 13, 18, 25, 50, 70 e 80 mM)
- ouabaína (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 e 3 mM)
- tempo de incubação (10, 20, 30, 45 e 60 minutos)
- concentração de proteína do substrato (2 a 10 μ g . μ L⁻¹)

Após as brânquias terem sido congeladas em tampão SI (Sacarose 0,3 M; Imidazol 30 mM) (2:1), a -80°C, para a determinação da atividade da Na⁺/ K⁺ - ATPase utilizou-se o

método de QUARBIUS et al. (1997), modificado para leitora de microplaca por NOLAN (2000) e padronizada para a espécie em estudo.

O tecido branquial, depois de descongelado, foi homogeneizado em tampão SI, pH 7,4 e centrifugado em centrifuga refrigerada à -4°C. O sobrenadante de cada amostra foi colocado em seis poços da microplaca (quantidade que tinha 10 µg.µL⁻¹ de proteína) e adicionado 100 µL de tampão (NaCl 250 mM; MgCl₂ 10 mM; Imidazol 10 mM, pH 7,6) com 3 mM de Na₂ATP (Vanadium free). Nos 3 primeiros poços, foi adicionado 100 µL de tampão contendo KCl (5 mM) e nos 3 restantes, tampão contendo ouabaína (2,5 mM). Após serem incubados durante 30 min a 25 °C, no escuro, a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de uma mistura de 1:1 de 8,6% de TCA e o reagente de cor (H₂SO₄ 0,66 mM + molibdato de amônia 9,2 mM + FeSO₄ 7 H₂O 0,33 mM) e a leitura espectrofotométrica foi feita em 595 nm. A atividade da enzima foi expressa em µM Pi. mg.h⁻¹. O conteúdo de proteína total foi determinado de acordo com o método descrito por BRADFORD (2000).

2.2.2.f - Metalotioneína (MT) branquial

A MT branquial foi determinada pela concentração de grupamentos sulfidrilas (SH), segundo a metodologia descrita por VIARENGO et al. (1997), utilizando-se como padrão a glutathiona reduzida (GSH). Cerca de 200 mg de brânquias foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20 mM (pH 8,6) contendo sacarose 0,5 M e 0,01% de β-mercaptoetanol em Ultraturrax a 20.000 rpm. As amostras foram centrifugadas e o sobrenadante utilizado. A concentração de metalotioneína foi avaliada no sobrenadante utilizando-se uma fração parcialmente purificada de metaloproteína obtida em várias etapas de uma solução de etanol/clorofórmio. As amostras foram secas em um *speed vac*

por aproximadamente 4-6 h e ressuspendidas em uma solução de NaCl 0,25 M e HCl 1 N contendo EDTA 4 mM. A concentração de metalotioneína dos extratos, desnaturada em pH ácido e elevado comprimento iônico, foi quantificada espectrofotometricamente utilizando-se do Reagente de Ellman contendo NaCl 2 M, DTNB 0,43 M em tampão fosfato 0,2 M (pH 8,0). As leituras foram feitas em espectrofotômetro em 412 nm.

2.2.2.g - Acúmulo de cobre nas brânquias

Após a dissecação o tecido branquial foi pesado (aproximadamente 1 g) e mantido em estufa (60°C) para determinação do peso seco, foram feitas pesagens até que o peso se mantivesse constante. Adicionou-se ao tecido 10 mL H₂SO₄ concentrado a quente e após a dissolução acrescentou-se 10 ml de H₂O₂. O volume foi levado a 50 mL com água destilada. A análise do acúmulo de cobre foi efetuada utilizando-se o espectrofotômetro de absorção atômica (AA 12/1475 GEMINI).

2.2.3 - Terceira etapa: Avaliação dos parâmetros cardio-respiratórios

Estes parâmetros foram obtidos utilizando-se cânulas de polietileno e eletrodos implantados de acordo com os procedimentos cirúrgicos abaixo descritos.

Procedimentos Cirúrgicos

Os animais foram previamente anestesiados em solução de benzocaína (0,1g.L⁻¹) e transferidos para uma mesa cirúrgica onde suas brânquias foram ventiladas artificialmente com uma solução menos concentrada de benzocaína (0,05 g. L⁻¹) equilibrada com o ar

atmosférico. Cirurgias distintas foram realizadas em todos os animais para a respirometria e a eletrocardiografia. Para a primeira foi usada uma furadeira Dremel® e feito um orifício na região dorsal do palato, através do qual foi fixada uma cânula de polietileno flangeada (PE-100). Da mesma forma, outras duas cânulas foram fixadas, uma em cada borda dos opérculos (RANTIN et al, 1993). Após estes procedimentos, os animais foram inseridos dentro de um respirômetro e este dentro do tanque experimental. Para os registros da frequência cardíaca, foram implantados dois eletrodos de ECG, um na posição ventral, entre as brânquias e o coração, e outro na posição ventrocaudal, próximo à nadadeira pélvica. Um terceiro eletrodo, o de referência, foi colocado na água do tanque experimental (GLASS et al., 1991). Este tipo de preparação fornece traçados eletrocardiográficos equivalentes aos da derivação DI da eletrocardiografia padrão.

Protocolo experimental

Em ambos os casos, antes dos experimentos, os animais foram acompanhados por 24 h após a cirurgia ou até quando os parâmetros cardio-respiratórios apresentassem valores basais. Então, o sistema experimental era fechado para adição de CuSO_4 correspondente a 50% da CL_{50} – 48 h, apenas em T2, no recipiente anexo ao circuito de circulação do sistema. O sistema que continha o respirômetro apresenta um volume de 40 L, portanto, foi adicionado o CuSO_4 , de maneira a permanecer a concentração de 50% da CL_{50} – 48 h. Foram realizados registros 10 min antes do início do período experimental e 10 min no final de 1, 2, 3, 6, 12, 24 e 48 h para cada animal após a contaminação. O grupo controle recebeu o mesmo tratamento, mas sem adição de CuSO_4 .

2.2.3.a - Parâmetros cardio-respiratórios

Frequência respiratória (f_R)

A frequência respiratória (f_R) foi registrada conectando-se o cateter bucal a um transdutor de pressão Narco P-1000B e este a um acoplador universal (Narco 7198) de um fisiógrafo Narco Narcotrace 40 (Narco Bio-Systems, Houston, TX, USA). Tal preparação permite registros e medidas das variações da pressão intrabucal durante o ciclo respiratório. Os valores de f_R foram expressos em resp. min^{-1} .

Extração de O_2 (EO_2)

A porcentagem de extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2) foi expressa em porcentagem (%), conforme a seguinte equação descrita por HUGHES et al.(1983):

$$EO_2 = 100 (P_{\text{insp}O_2} - P_{\text{exp}O_2}) / P_{\text{insp}O_2}$$

onde: $P_{\text{insp}O_2}$ = pressão parcial de O_2 da água inspirada e $P_{\text{exp}O_2}$ = pressão parcial da água expirada.

Consumo de Oxigênio ($\dot{V}O_2$)

As medidas do consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$) foram realizadas de acordo com a metodologia empregada por FERNANDES & RANTIN (1989), adaptada de HUGHES et al. (1983) e RANTIN & JOHANSEN (1984). Essa metodologia consiste em utilizar um respirômetro de fluxo constante, cujo fluxo é ajustado por gravidade utilizando-se uma proveta graduada e um cronômetro. As tensões de O_2 da água que entra (P_{eO_2}) e que sai

(P_{sO_2}) do respirômetro em cada condição experimental foram monitoradas constantemente com amostras de água coletadas por catéteres de polietileno que passavam, por gravidade, através de uma cubeta contendo um eletrodo de O_2 (FAC 001) e este conectado a um analisador de O_2 (FAC-204A).

A $\dot{V}O_2$ foi calculada empregando-se a seguinte equação:

$$\dot{V}O_2 = (P_{eO_2} - P_{sO_2}) \alpha_{O_2} V_R / W_T$$

onde: P_{inO_2} = tensão de O_2 da água de entrada no respirômetro, P_{outO_2} = tensão de O_2 da água da saída do respirômetro, α_{O_2} = coeficiente de solubilidade do O_2 na água ($mL O_2 \cdot L^{-1} \cdot mmHg^{-1}$), V_R = fluxo de água através do respirômetro, W_T = peso fresco do animal

Os valores de $\dot{V}O_2$ foram expressos em $mLO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$.

Ventilação branquial (\dot{V}_G)

A ventilação branquial foi obtida pelo método descrito por SAUNDERS (1962) e adaptado por FERNANDES & RANTIN (1989). Esse método, baseado no princípio de Fick, utiliza as medidas das tensões de O_2 da água de entrada (P_{eO_2}) e de saída (P_{sO_2}) do respirômetro, bem como da água inspirada (P_{inspO_2}) e da expirada (P_{expO_2}) pelo animal. Os valores da ventilação branquial (\dot{V}_G) foram expressos em $mLH_2O \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$ e calculados de acordo com a seguinte equação:

$$\dot{V}_G = V_R (P_{eO_2} - P_{sO_2}) / (P_{inspO_2} - P_{expO_2}) / W_T$$

Volume ventilatório (V_T)

O volume ventilatório (V_T) foi calculado através do quociente entre os valores de \dot{V}_G e os seus respectivos valores de f_R (\dot{V}_G/f_R) nas diferentes condições estudadas. Os valores de V_T foram expressos em $\text{mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{resp.min}^{-1}$.

Frequência cardíaca (f_H)

A frequência cardíaca foi expressa em batimentos por minutos (bpm), pela contagem dos complexos QRS por unidade de tempo nos registos eletrocardiográficos.

3.0 - Análise Estatística

Os dados são apresentados como média \pm S.E.M. Para se detectar a diferença entre os grupos com relação aos parâmetros bioquímicos, utilizou-se a análise de variância com médias repetidas (ANOVA), seguida pelo teste t , quando necessário. Para os parâmetros cardio-respiratórios utilizou-se o teste t entre os grupos T1 e T2 e Dunnet comparando os valores basais em relação aos diferentes tempos de exposição. Todos os testes estatísticos, incluindo determinação da normalidade e análise de variância, foram executados usando-se o Software GraphPad InStat. O nível de significância máxima adotada foi de 5% ($P < 0,05$).

4.0 - RESULTADOS

4.1 - Hematologia, íons e amônia plasmática

Observando-se a tabela 1 verifica-se aumento significativo de Hct, [Hb], RBC e VCM nas tilápias expostas ao CuSO_4 por 48 h em relação ao grupo controle. Os índices de HCM, CHCM e a proteína plasmática não foram significativamente diferentes entre T1 e T2. Houve diminuição na concentração plasmática dos íons Na^+ e Cl^- e aumento de K^+ . Os níveis plasmáticos de amônia mostraram um aumento em T2, de mais de 10 vezes com relação a T1.

TABELA 1. Valores médios \pm S.E.M. dos parâmetros hematológicos, iônicos e concentração de amônia do plasma de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. T1 = grupo controle; T2 grupo tratado com CuSO₄ por 48 h.

Parâmetros	T1	T2
Hct (%)	26,06 \pm 0,690	36,25 \pm 1,319 *
[Hb] (g/dL)	7,27 \pm 0,04	10,08 \pm 0,05 *
RBC (x 10⁶/μL)	1,46 \pm 0,064	1,71 \pm 0,061 *
VCM (fL)	181,04 \pm 9,095	213,43 \pm 10,396 *
HCM (μm³)	50,62 \pm 3,39	59,42 \pm 3,49
CHCM (%)	28,43 \pm 0,90	28,11 \pm 1,80
Proteína (mg/mL)	10,53 \pm 1,330	9,11 \pm 1,696
[Na⁺] (mEq. L⁻¹)	156,00 \pm 7,36 *	110,16 \pm 8,3
[K⁺] (mEq. L⁻¹)	4,14 \pm 0,17	6,32 \pm 1,02 *
[Cl⁻] (mEq. L⁻¹)	0,0307 \pm 0,0006 *	0,0161 \pm 0,0008
Amônia (nM/mL)	0,049 \pm 0,012	0,583 \pm 0,079 *

Médias \pm S.E.M. seguidas por * na linha diferem entre si pelo teste *t* (P < 0,05)

4.2 - Intermediários Metabólicos

Analisando-se a tabela 2, nota-se aumento significativo das concentrações de glicose plasmática e hepática no grupo T2 em relação ao T1, enquanto que no músculo vermelho houve diminuição, mantendo-se inalterado no músculo branco. O glicogênio apresentou redução tanto no fígado, quanto no músculo branco nos animais submetidos ao cobre em relação ao grupo controle e sem alterações no músculo vermelho (Tabela 2). Já o piruvato permaneceu sem alterações significativas tanto no plasma quanto no fígado e nos músculos branco e vermelho no grupo T2 em relação ao grupo T1. O lactato aumentou significativamente no fígado e no músculo vermelho no grupo T2, não ocorrendo o mesmo para o músculo branco (Tabela 2).

TABELA 2. Valores médios \pm S.E.M. de lactato, piruvato, glicogênio e glicose em fígado, em músculos branco e vermelho e em plasma tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. T1 = grupo controle; T2 = grupo tratado com CuSO₄ por 48 h.

	FÍGADO		MÚSCULO BRANCO	
	T1	T2	T1	T2
Lactato (μ M/g)	28,91 \pm 2,03	45,46 \pm 5,62*	73,97 \pm 4,10	68,01 \pm 2,70
Piruvato (μ mol/mL)	1,16 \pm 0,06	1,20 \pm 0,07	1,55 \pm 0,32	1,11 \pm 0,11
Glicogênio (μ M unidades glicosil-glicose/g tecido)	162,61 \pm 28,54*	73,38 \pm 18,47	18,76 \pm 0,69*	14,01 \pm 1,15
Glicose (μ mol/mL)	960,88 \pm 97,40	1379,99 \pm 72,71*	27,06 \pm 1,11*	21,95 \pm 1,75
	MÚSCULO VERMELHO		PLASMA	
	T1	T2	T1	T2
Lactato (μ M/g)	65,18 \pm 3,62	81,37 \pm 4,34*	-	-
Piruvato (μ mol/mL)	1,38 \pm 0,08	1,21 \pm 0,07	0,12 \pm ,02	0,15 \pm 0,02
Glicogênio (μ M unidades glicosil-glicose/g tecido)	28,63 \pm 1,05	24,84 \pm 2,47	-	-
Glicose (μ mol/mL)	28,57 \pm 1,77*	22,78 \pm 1,70	0,13 \pm 0,04	0,54 \pm 0,09*

Médias \pm S.E.M. Valores seguidos por * na linha diferem entre si (teste *t*; P < 0,05).

4.3 - Na⁺/ K⁺ - ATPase branquial

Com relação à atividade da enzima Na⁺/ K⁺ - ATPase, houve uma redução significativa no grupo exposto ao cobre, quando comparado ao grupo controle, como demonstrado na Figura 3. Com essa redução, o grupo T2 apresentou somente 24% da atividade obtida por T1.

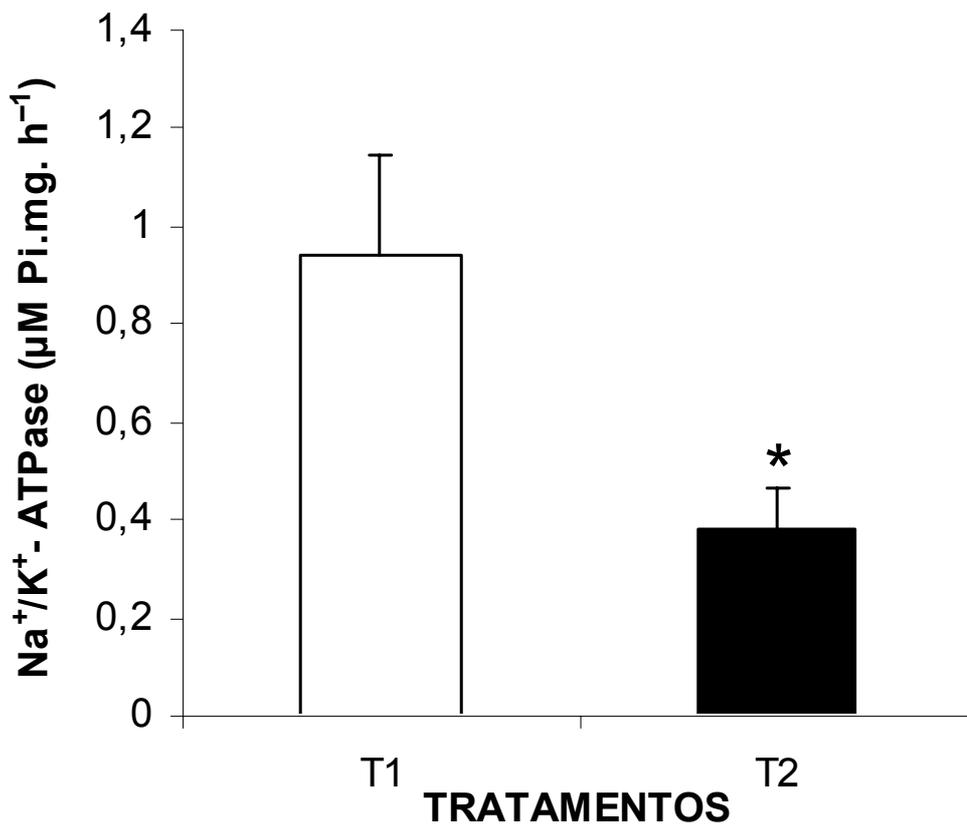


Figura 3. Valores médios \pm S.E.M. da atividade da Na⁺/K⁺ - ATPase branquial de de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO₄ (T2), por 48 h (T1, representado por coluna branca e T2, representado por coluna preta). * representam diferenças significativas entre os grupos. Teste *t* ($P < 0,05$).

4.4 - Metalotioneína

A MT é uma proteína que seqüestra os metais, permitindo ao animal uma maior resistência à exposição ao tóxico. Assim, quando comparados os grupos com e sem adição de cobre, o último apresentou menos MT por peso de tecido branquial. Isso indica que o cobre induz a produção de MT, já que o aumento em T2 foi significativamente maior do que em T1, como pode ser observado na Figura 4.

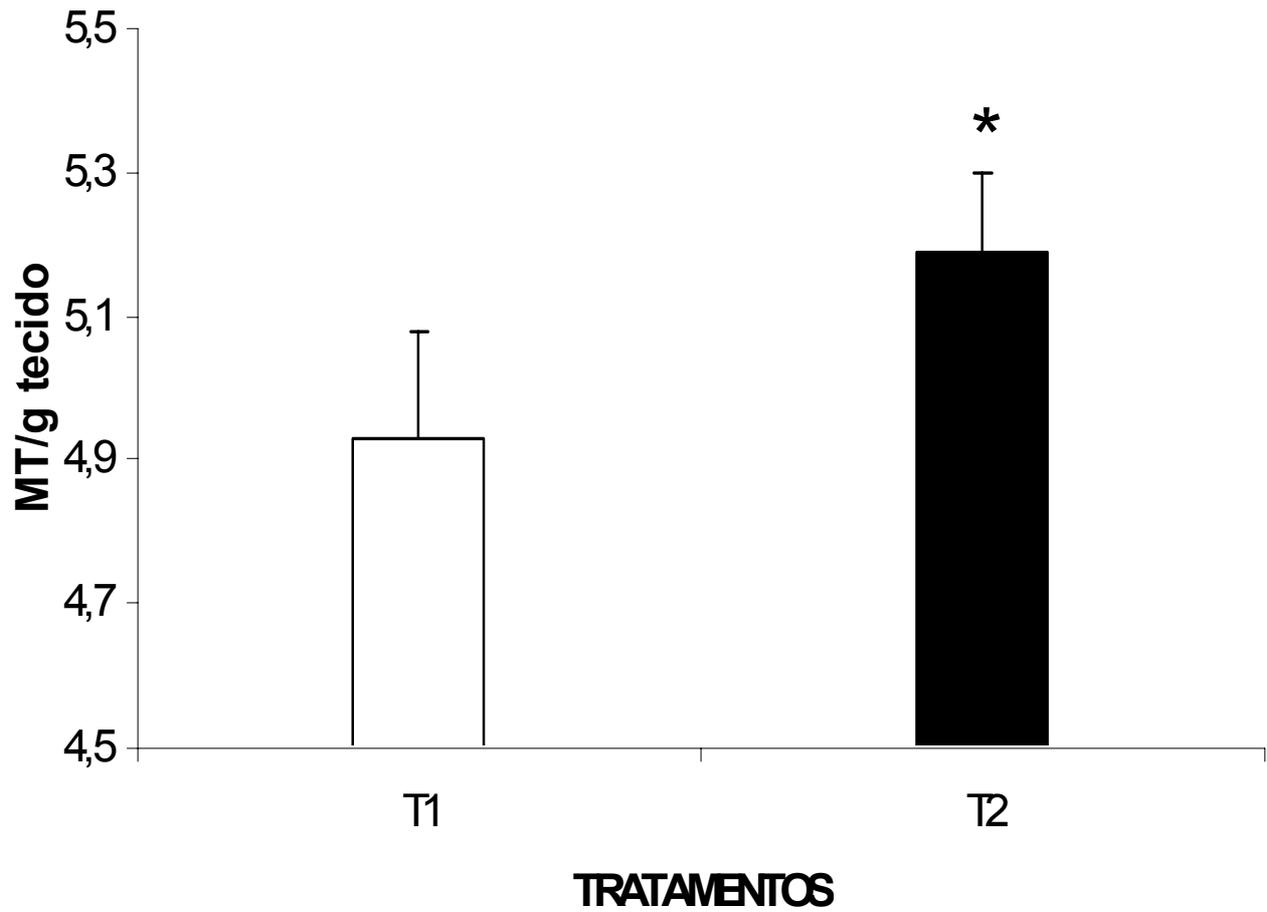


Figura 4. Valores médios \pm S.E.M. da metalotioneína branquial de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), por 48 h. (T1, representado por coluna branca e T2, representado por coluna preta). * representam diferenças significativas entre os grupos teste *t* ($P < 0,05$).

4.5 - Acúmulo de cobre nas brânquias

Pode-se observar um aumento importante do acúmulo de cobre nas brânquias dos animais expostos a $23,57 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \text{ CuSO}_4$, em relação ao grupo controle, onde não houve adição do composto (Figura 5). Esse aumento foi diretamente proporcional ao aumento da MT e inversamente em relação à atividade da enzima Na^+/K^+ - ATPase branquial.

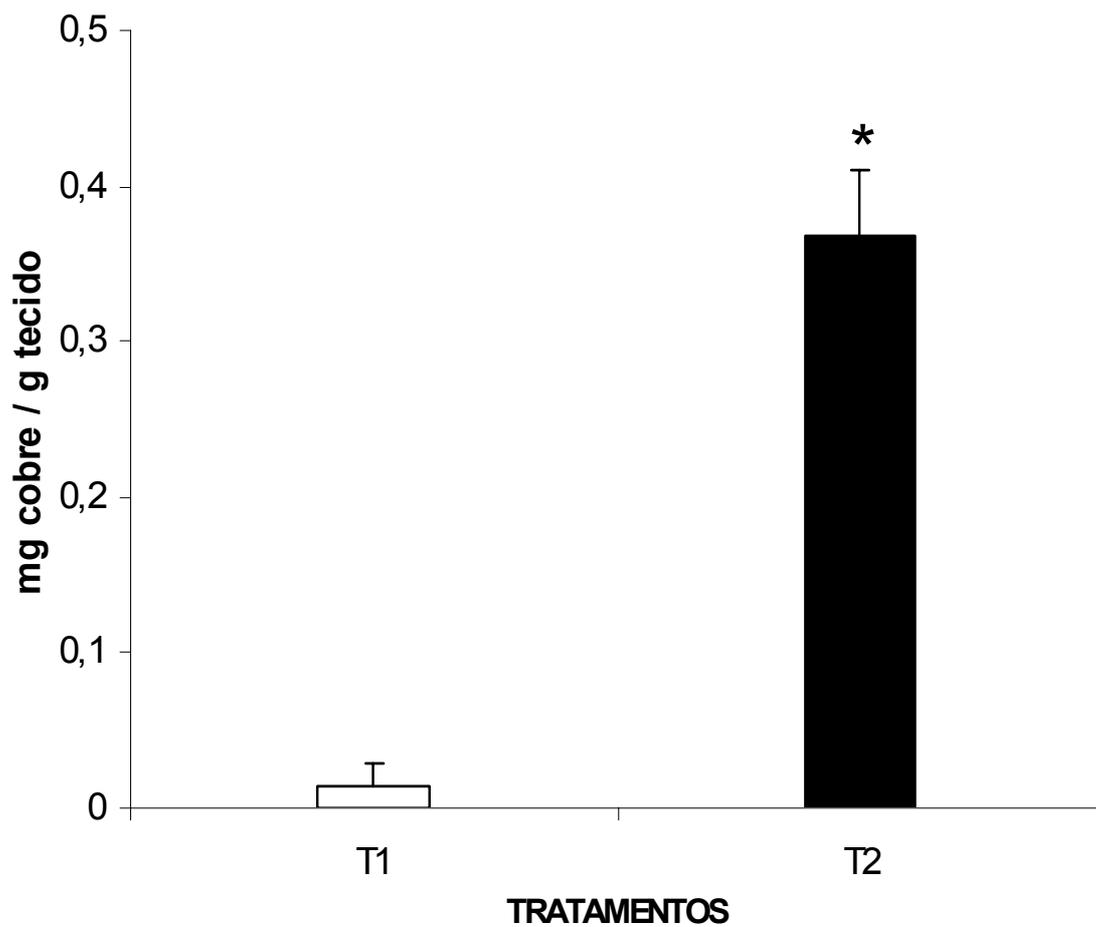


Figura 5. Valores médios \pm S.E.M. do acúmulo de cobre em tecido branquial de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), por 48 h. (T1, representado por coluna branca e T2, representado por coluna preta). * representam diferenças significativas entre os grupos teste t ($P < 0,05$).

4.6 - Respirometria

A respirometria apresentou diferentes tendências nos diversos parâmetros monitorados.

4.6.1 - Frequência Respiratória (f_R)

Avaliando-se os resultados obtidos após a exposição e monitoramento dos animais durante 48 h, observou-se que o grupo contaminado (T2), quando comparado ao grupo controle (T1), apresentou aumento da f_R à partir da segunda hora de exposição ao CuSO_4 , mantendo-se significativamente mais elevada em T1 e também em relação ao período prévio à exposição, em todos os tempos de aferição (Figura 6). No grupo T1 não observou-se alterações significativas na f_R durante todo o período experimental.

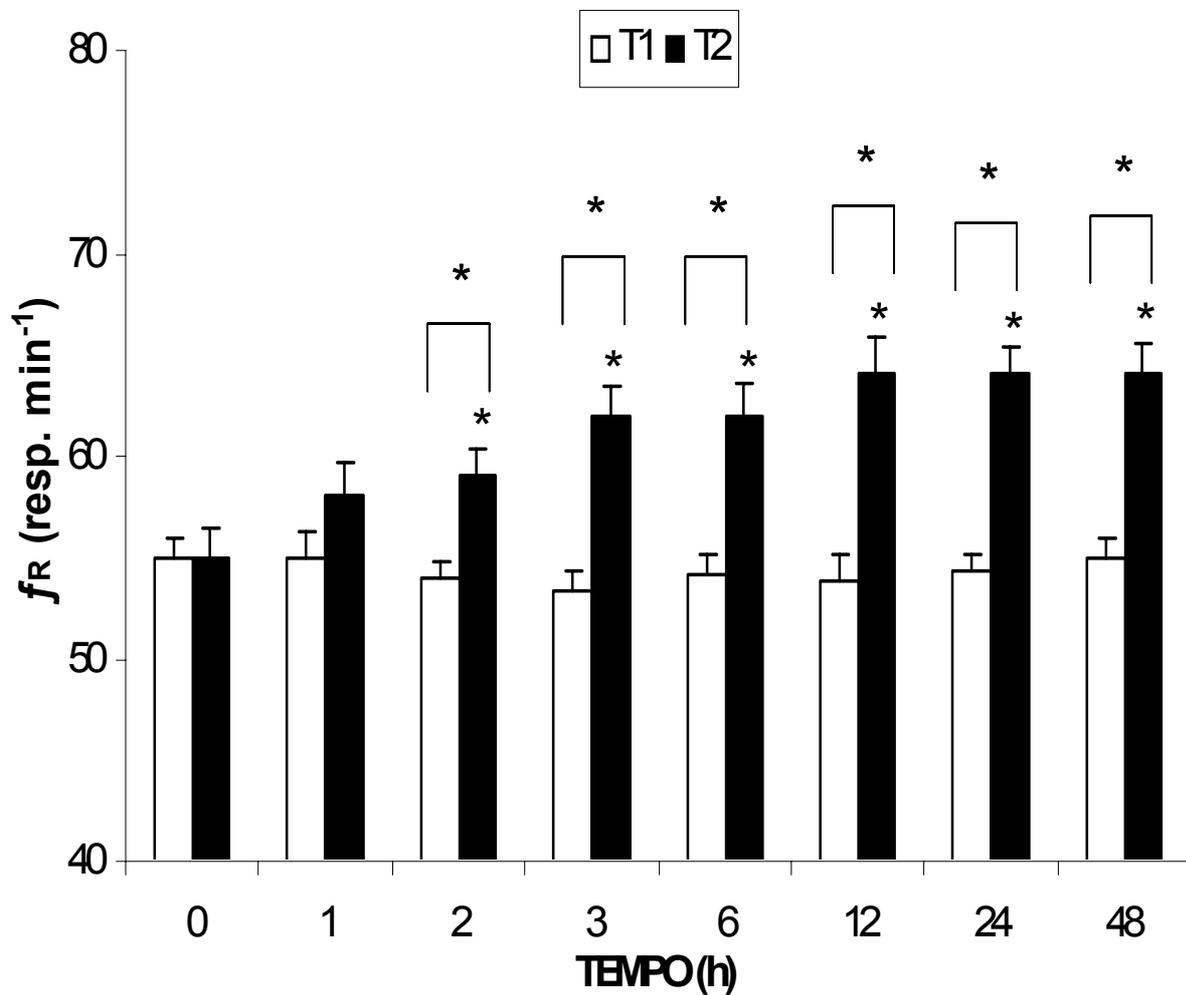


Figura 6. Valores médios \pm S.E.M. da f_R de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO₄ (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$).

4.6.2 - Extração de Oxigênio

Quando comparados os resultados obtidos para o grupo controle (T1) e o tratado com CuSO_4 (T2), após o período de monitoramento dos animais durante 48 h, observou-se que o grupo T2 apresentou redução da EO_2 à partir da terceira hora de exposição ao CuSO_4 , mantendo-se sempre menor do que no grupo T1 e também em relação ao período prévio à exposição, em todos os tempos de aferição posteriores (Figura 7). A EO_2 do grupo T1 permaneceu constante durante todo o período experimental de 48 h.

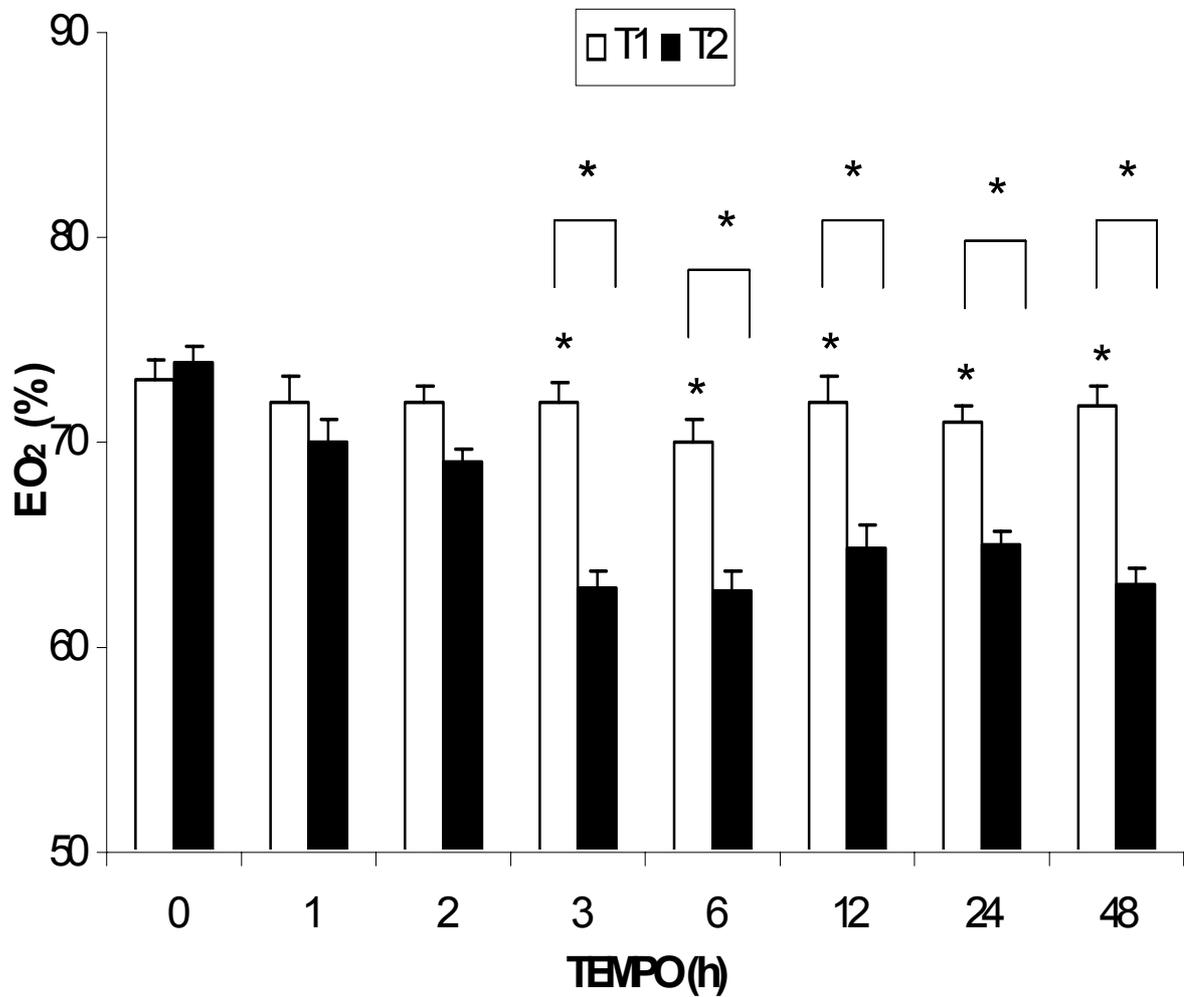


Figura 7. Valores médios \pm S.E.M. da EO₂ de tilápia, *Oreochromis niloticus*, grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO₄ (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 (P < 0,05).

4.6.3 - Consumo de Oxigênio

Dentre os resultados obtidos após o período de monitoramento dos animais durante 48 h, observou-se que o grupo contaminado (T2), quando comparado ao grupo controle (T1), apresentou redução da $\dot{V}O_2$ a partir da segunda hora de exposição ao $CuSO_4$, mantendo-se reduzida comparado a T1 e também em relação ao período prévio à exposição, em todos os tempos de aferição (Figura 8). A $\dot{V}O_2$ do grupo T1 permaneceu inalterada durante as 48 h de experimentação.

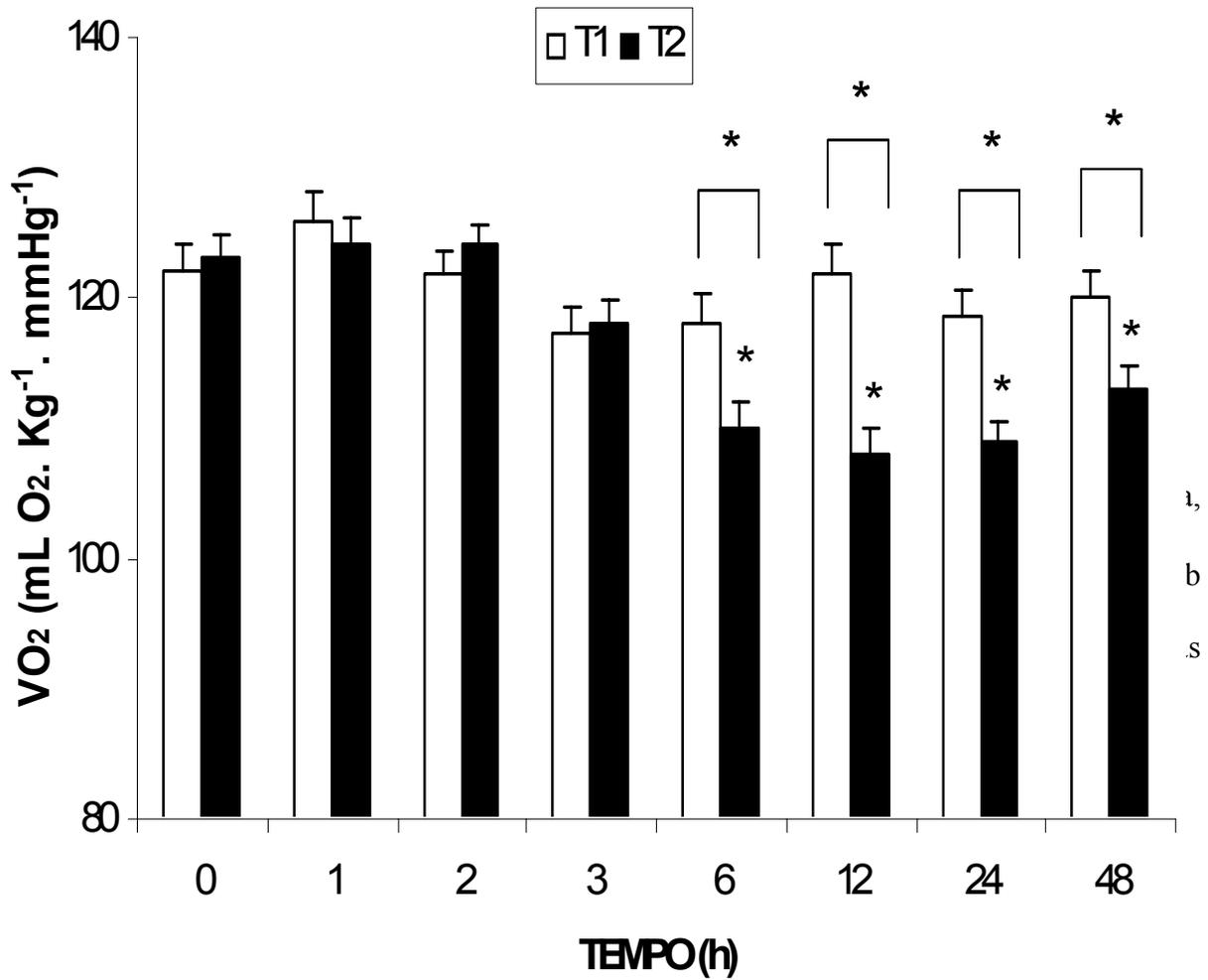


Figura 8. Valores médios \pm S.E.M. da $\dot{V}O_2$ de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao $CuSO_4$ (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$).

4.6.4 - Ventilação Branquial

Houve aumento da \dot{V}_G em T2 a partir da primeira hora (Figura 9). A \dot{V}_G aumentou gradualmente até o final do período experimental, desde a primeira hora em que os animais do grupo T2 foram expostos ao CuSO_4 , permanecendo com diferenças significativas com relação ao grupo controle e também quando comparado ao período anterior a contaminação do mesmo grupo.

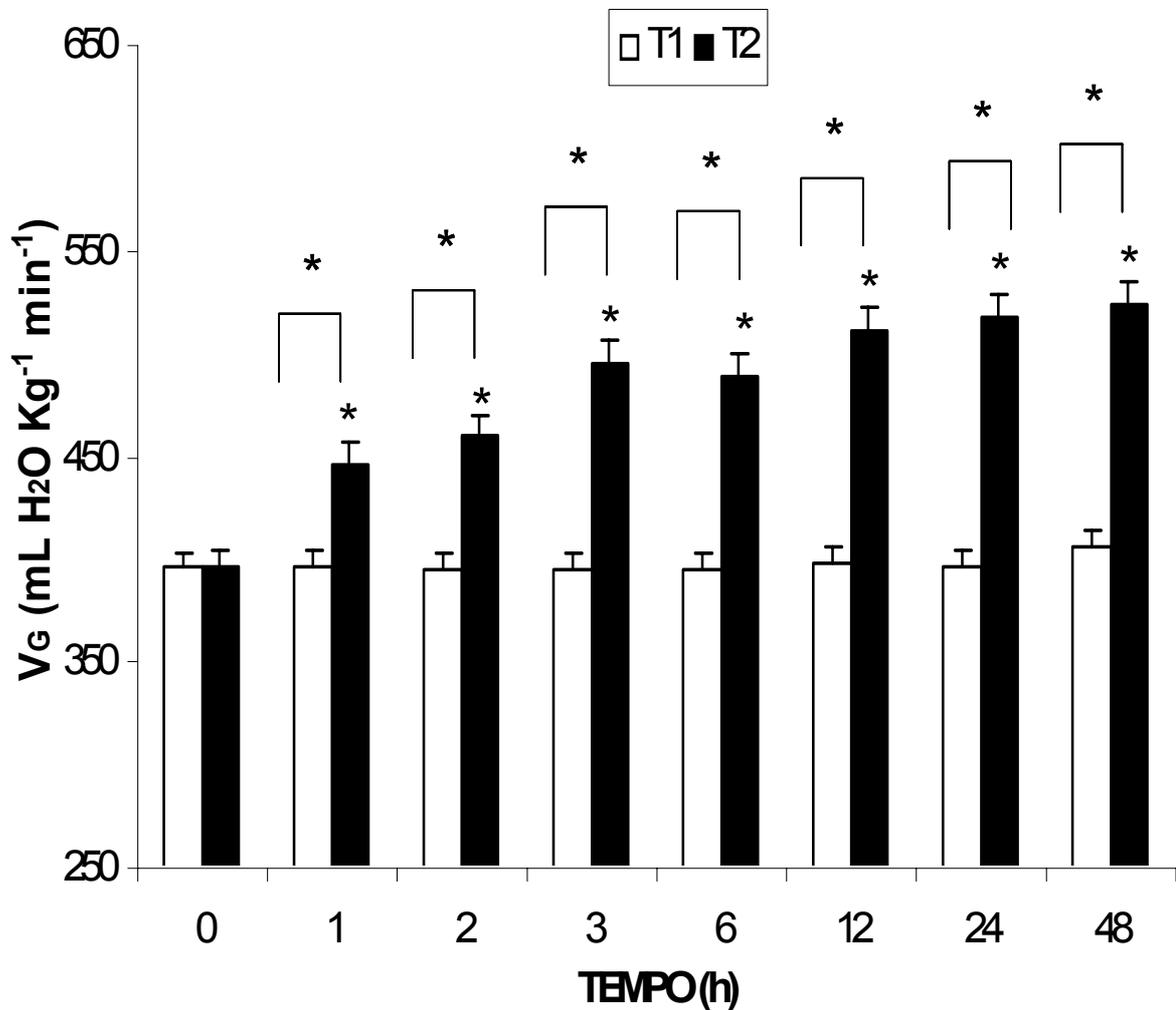


Figura 9. Valores médios \pm S.E.M. da V_G de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. Grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$).

4.6.5 - Volume ventilatório (V_T)

Houve aumento no V_T do grupo T2 a partir de décima segunda hora de exposição (Figura 10). Enquanto o V_T do grupo T1 permaneceu constante durante todo o período experimental, o V_T do grupo T2 apresentou tendência ao aumento desde o início da exposição ao cobre. Entretanto esse parâmetro só apresentou diferença estatisticamente significativa com relação ao grupo controle após 12 h de exposição ao CuSO_4 .

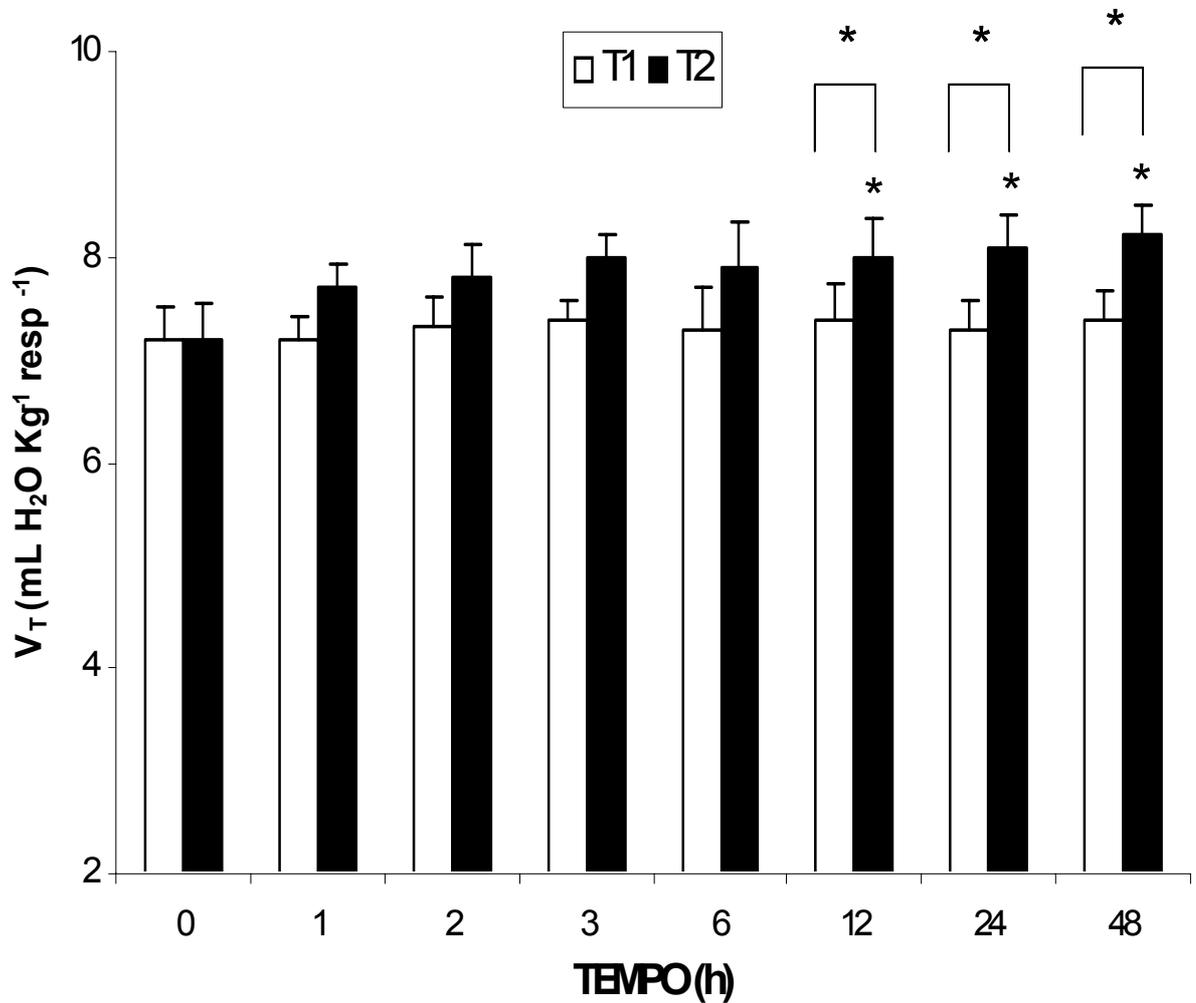


Figura 10. Valores médios \pm S.E.M. do V_T de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO₄ (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 (P < 0,05).

4.6.7 - Frequência Cardíaca (f_H)

Os animais do grupo T1 apresentaram bradicardia a partir da décima segunda hora de exposição ao CuSO_4 . A f_H apresentou redução em T2 quando comparado ao seu controle (T1) e também ao seu próprio tempo inicial, antes de ser adicionado o sulfato de cobre, conforme observado na Figura 11. No grupo controle (T1) a f_H permaneceu constante durante todo o período experimental de 48 h.

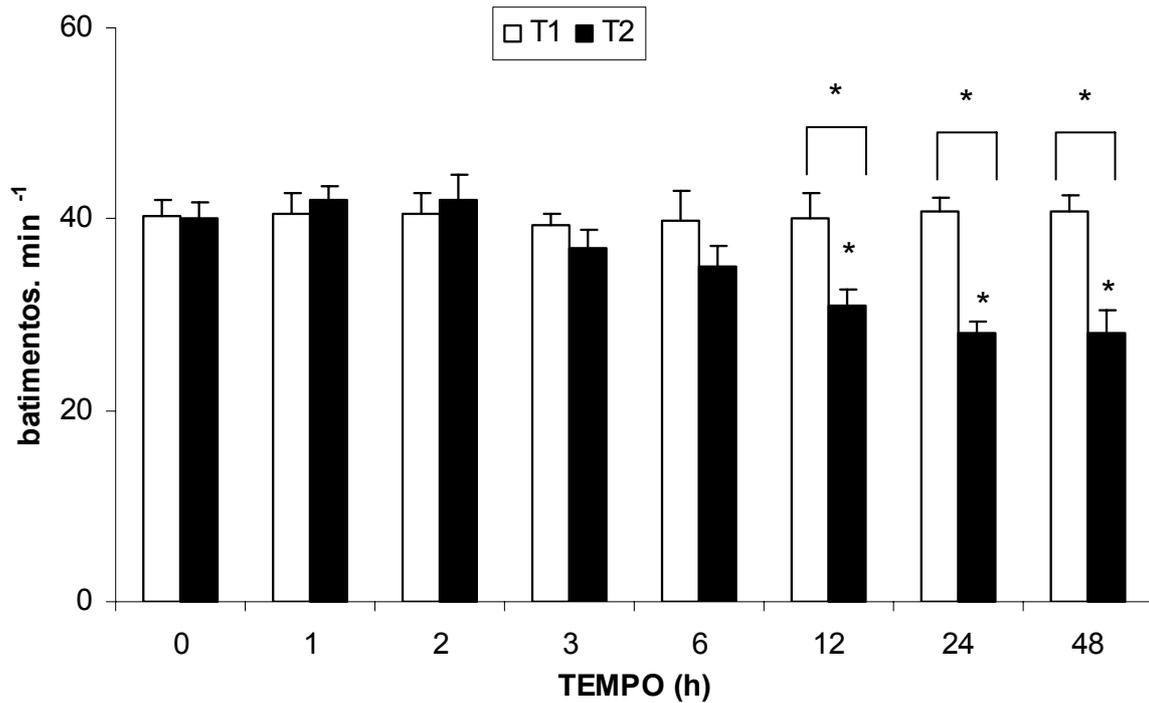


Figura 11. Valores médios \pm S.E.M. da f_H de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, grupo controle (T1) e sob exposição ao CuSO_4 (T2), em diferentes tempos, durante 48 h. (T1, representado por colunas brancas e T2, representado por colunas pretas). * representam diferenças significativas entre o tempo inicial e os demais tempos em T2, e entre os grupos T1 e T2 ($P < 0,05$).

5.0 - DISCUSSÃO

Durante os experimentos, foram observados letargia e aumento da produção de muco dos animais expostos ao cobre. Segundo SØRENSEN, (1991), alterações comportamentais são as primeiras a ocorrerem quando os animais detectam a presença de metais na água. Uma elevada produção de muco é uma resposta comum quando os peixes são expostos a maioria dos poluentes (MALLATT, 1985), e, em geral, serve para proteger as superfícies epidérmicas como brânquias e pele. Além disso, o muco contém cargas negativas que podem atrair os íons de cobre e, em seguida liberá-los durante a eliminação de água pelo opérculo, durante o ciclo respiratório (HEATH, 1995).

Como pode ser observado na tabela 1, houve relevantes alterações nos parâmetros hematológicos da tilápia do Nilo após exposição ao CuSO_4 .

O aumento no Hct acompanhado pelo aumento do RBC, no grupo T2, deve-se provavelmente ao aumento de células eritrocitárias na circulação e não somente ao aumento do VCM. Este aumento do Hct, caracterizado pela elevação do volume eritrocitário (VCM), pode ser uma consequência da entrada de água na célula, sendo este um mecanismo comum frente ao estresse ambiental em peixes. O aumento no RBC e [Hb], pode indicar tentativa do animal em elevar a captação de O_2 , garantindo a oxigenação adequada aos tecidos (HEATH, 1995).

Segundo CYRIAC et al., (1989) e NUSSEY et al., (1995) os metais, como cobre e mercúrio, estimulam a eritropoiese em peixes. WANG et al. em 1998, ao exporem a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, à concentração de $0,6 \text{ mg Cu}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$, observaram um aumento no RBC e nenhum efeito no Hct e na [Hb] que foram devido ao aumento no volume das células devido ao conteúdo de água. A mesma espécie exposta a $3,82$ e $10,06 \mu\text{g Cu}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ apresentou valores de Hct diminuídos, enquanto que a exposição prolongada

ao Cu^{2+} diminuiu o volume dos eritrócitos reduzindo a capacidade de captação do O_2 (DETHLOFF et al., 2001).

NUSSEY et al., (1995) ao estudarem os efeitos da exposição a $0,40 \text{ mg Cu}^{2+} \cdot \text{L}^{-1}$ na tilápia mossambica, *Oreochromis mossambicus*, observaram que os valores de Hct e [Hb] mantiveram-se constantes, mas o RBC diminuiu, atribuindo essas respostas à destruição de eritrócitos ou à inibição de sua síntese.

Houve também, no presente estudo, um aumento acentuado na concentração de amônia plasmática do grupo exposto ao cobre em relação ao grupo controle (tabela 1). Esse aumento pode ser devido à condição adversa ao que o animal foi exposto, levando a um possível aumento da produção de amônia interna. A maioria dos produtos nitrogenados é originada do catabolismo das proteínas e, em peixes a amônia é o principal produto final a ser excretado, principalmente pelas brânquias. A “queima” de proteínas, lipídeos e carboidratos como energia, pode ser influenciado por fatores internos e externos (DEVLIN, 1997).

Segundo BEAUMONT et al., (2002), o cobre não apenas aumenta a concentração de amônia plasmática e cortisol, mas também inibe o mecanismo excretório (trocaador $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$), embora esses autores não tenham observado acúmulo de amônia plasmática quando expuseram *Salmo trutta* ao cobre, provavelmente devido à baixa dosagem ($0,08 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). De acordo com VAN WAARDE et al (1983), o aumento do catabolismo de proteínas tem como consequência um aumento nos teores de amônia plasmática. Em algumas espécies, quando em situações ambientais que dificultam a excreção de amônia, pode ocorrer um aumento desta, entretanto, em condições normais, esse excesso de amônia produzido pelo catabolismo de proteínas é prontamente excretado pelas brânquias. Segundo WILSON & TAYLOR (1993), a excreção de amônia pode ser passiva ou ativa, utilizando-se de um trocaador, mas o cobre dificulta esse processo, por reduzir também o influxo de Na^+ .

Aumentos de amônia plasmática também foram observados em *Oreochromis mossambicus* (PELGROM et al., 1995), em truta arco-iris, *Oncorhynchus mykiss* (LAURÉN & McDONALD, 1985; CUSIMANO et al., 1986; WILSON & TAYLOR, 1993) em *Salmo salar* (MATEY & KOMOV, 1992) e em *Salmo trutta* (DAY & BUTLER, 1996; BEAUMONT et al., 2000; 2002), frente a exposição ao cobre em diferentes concentrações e períodos.

No presente estudo, observou-se uma diminuição na concentração plasmática dos íons Na^+ e Cl^- e aumento de K^+ . PELGROM et al., (1995), observaram uma diminuição na concentração dos íons Na^+ e Cl^- e aumento na concentração de K^+ , após exporem exemplares de *Oreochromis mossambicus* a concentrações sub-letais de cobre. NUSSEY et al. (1995), estudando a mesma espécie, observaram que houve alterações morfológicas nas brânquias quando expostas ao CuSO_4 , que refletiu na diminuição do Na^+ e do Cl^- e no aumento do K^+ . Segundo WILSON & TAYLOR, (1993); PILGAARD et al. (1994) e LARSEN et al. (1997), a exposição ao Cu^{2+} pode induzir mudanças no equilíbrio osmótico, no entanto, estas mudanças são algumas vezes pequenas ou até ausentes. Significantes distúrbios no transporte dos íons plasmáticos têm sido observados em estudos de avaliação da toxicidade do Cu^{2+} (CERQUEIRA & FERNANDES, 2002; GROSSELL et al., 2002).

A atividade da Na^+/K^+ -ATPase tem uma relação direta no transporte dos íons nas brânquias. Uma inibição dessa atividade com conseqüente diminuição no transporte ativo dos íons, altera as concentrações plasmáticas de Na^+ e de K^+ , como observado no presente trabalho, em que houve redução da atividade da enzima em T2 em relação a T1 (Figura 3). A Na^+/K^+ ATPase transporta Na^+ e K^+ em seqüência; o transporte de Na^+ precede o transporte de K^+ e o transporte de cada íon requer um cátion específico para catalisar as ligações de cada passo da catálise e a conformação da molécula. O Na^+ catalisa a fosforilação e é transportado e o K^+ catalisa a desfosforilação e é transportado. O

processo de transporte move 3 íons sódio para fora e 2 íons potássio para dentro da célula por molécula de ATP consumida. Assim, como pôde ser evidenciado nesse estudo, houve redução da atividade da enzima, com conseqüente diminuição de íons Na^+ livre no plasma e aumento de íons K^+ .

A determinação da atividade da Na^+/K^+ -ATPase em um tecido indica o transporte ativo de Na^+ e K^+ ocorrendo nesse tecido. Variações da atividade da Na^+/K^+ -ATPase frente a alterações que ocorrem no meio interno ou externo, podem sugerir a necessidade de um maior ou menor transporte ativo desses íons (EVANS, 1993). Entretanto, alterações que ocorrem nesses meios, como por exemplo, uma diminuição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase influenciada pela presença do cobre, não obrigatoriamente sugere uma redução na necessidade de transporte ativo para a manutenção do equilíbrio iônico, mas, nesse caso, pode indicar quebra na estrutura da membrana biológica.

Assim, esta redução de atividade encontrada no presente estudo, pode ter sido causada, provavelmente, por danos estruturais nas brânquias, em resposta a exposição ao cobre, conforme observado anteriormente em truta arco-íris por GROSSEL & WOOD (2002). Segundo esses mesmos autores, essa inibição da atividade da Na^+/K^+ -ATPase, é devido ao fato do cobre ligar-se aos sítios ativos da enzima inibindo o transporte iônico nas brânquias ou em outros órgãos envolvidos nos processos de íon e/ou osmorregulação, desestabilizando o equilíbrio iônico e/ou osmótico do animal. REID & McDONALD (1988), também postulam que o aumento da perda passiva dos íons nas brânquias seja decorrente às alterações na permeabilidade do epitélio, ocasionado pelo efeito do Cu^{2+} . Em truta arco-íris, o cobre induz distúrbios osmorregulatórios pela diminuição da captação ativa de íons devido à inibição direta da atividade de enzimas específicas para o transporte iônico, tal como a Na^+/K^+ -ATPase (LI et al., 1998; DE BOECK et al., 2000). Uma inibição paralela entre a captação de Na^+ e a atividade da Na^+/K^+ -ATPase, foi observado por SOLA

et al. (1995) em truta arco-íris e por LI et al., (1998) em tilápia mossâmbica, durante a exposição desses animais ao cobre. Entretanto, McGEER et al. (2000) observaram que a truta arco-íris quando exposta cronicamente ao cobre apresenta uma atividade aumentada da Na^+/K^+ -ATPase branquial.

Foi observado no presente estudo, um aumento nos níveis de glicose plasmática e hepática, com diminuição nos músculos em resposta a exposição ao cobre, 48 h (tabela 2). A glicose é, quantitativamente, o principal substrato oxidável utilizado para a maioria dos organismos como fonte de energia (DEVLIN, 1997). Esse aumento é necessário para disponibilizar ATP para o processo de desintoxicação de metais. A hiperglicemia já foi reportada em muitos teleósteos como uma resposta comum ao estresse, considerada como principal efeito imediato da liberação de catecolaminas (HATTINGH, 1976, PINHEIRO, 2004). Este aumento da demanda energética exigida numa situação de estresse é requerido inclusive nos sistemas respiratório e cardiovascular (RANDALL & PERRY, 1992; PINHEIRO, 2004).

O piruvato manteve-se constante em todos os tecidos sem diferenças entre os grupos experimentais (tabela 2). A conversão da glicose a piruvato, permite aproveitar somente uma pequena parcela (menos de 10%) da energia total da glicose, ficando a maior parte convertida em piruvato. Em aerobiose o piruvato é oxidado a CO_2 , pelas mitocôndrias no Ciclo de Krebs, havendo maior produção de energia; em anaerobiose, entretanto, o piruvato é convertido em lactato (DEVLIN, 1997). Assim, a manutenção de níveis constantes do piruvato do grupo T2 em relação ao T1, nesse estudo, pode refletir o aumento de lactato no fígado e no músculo vermelho de T2. Segundo HEATH (1995), a exposições a substâncias tóxicas pode criar uma condição hipóxica tecidual pela diminuição do fluxo de oxigênio da água para o sangue, produzido por um aumento da barreira difusiva na superfície branquial, resultando num aumento de ácido láctico,

indicador da glicólise anaeróbia.

As concentrações de glicogênio hepático e do músculo branco diminuíram significativamente no grupo T2 em relação ao controle (tabela 2). Esta resposta pode estar relacionada a glicogenólise induzida pelas catecolaminas em curtos períodos de estresse, para possível demanda de energia usada na tentativa de desintoxicação (VIJAYAN et al., 1994; FABBRI et al., 1998; MOMMSEN et al., 1999). A gliconeogênese também pode ser responsável pelo aumento da glicose plasmática quando o glicogênio hepático já tiver sido exaurido (JANSSENS & WATERMAN, 1988).

Ao expor exemplares de tilápia do Nilo a concentração de cobre por 48 h, houve elevação significativa da MT no tecido branquial (Figura 4). O aumento de concentração desse composto, tanto nas brânquias quanto no fígado ocorre devido às metalotioneínas se ligarem aos metais, inclusive ao cobre, pois o seqüestram e servem como um mecanismo de proteção, mantendo a concentração de metal livre extremamente baixa, e, assim, evitando as alterações induzidas por este agente estressor (BRAGIGAND & BERTHET, 2003; MAYER et al., 2003; RYU et al., 2003), e aumentando a tolerância dos peixes aos metais (SCHLENK et al., 1999; AHMAD et al., 2000; CAJARAVILLE et al., 2000; LINDE et al., 2001). McCARTER & ROCH (1983, 1984) relataram em coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), um aumento da MT com um aumento na concentração de cobre na água. OLSVIK et al. (2000) relataram um aumento na indução da MT em *Salmo trutta* de rios contaminados por metais acompanhados de aumento na concentração de metal na água. Além disso, a MT parece estar envolvida no transporte intracelular de cobre e zinco participando no metabolismo de metais essenciais e também pode ser induzida por situações estressantes, não somente metais (CAJARAVILLE et al., 2000; LINDE et al., 2001). A indução da MT simultaneamente com aumento de glicocorticóides, lipopolissacarídeos, interleucina-1 e -interferem durante a maturação sexual e condições de

estresse fortalece o papel desta proteína na regulação da homeostase de metais (SIMKISS & TAYLOR, 1981; DUTTON et al., 1993; SCHLENK et al., 1999; OLSVIK et al., 2000).

No presente estudo, observou-se um acúmulo importante de cobre nas brânquias dos animais do grupo T2 (Figura 5). Normalmente, o cobre se acumula no fígado e a sua presença em outros órgãos ocorre somente quando a capacidade de estoque do metal neste órgão torna-se saturada (CARVALHO et al, 2004). O acúmulo de metais em órgãos como brânquias e rins também pode ser observado em peixes contaminados, porém em menor intensidade (PILGAARD et al, 1994; PELGROM et al, 1995; CERQUEIRA & FERNANDES, 2002). ÇOĞUN & KARGIN (2004), observaram que, em *Oreochromis niloticus* expostas a diversas concentrações de cobre, o acúmulo nos tecidos apresenta-se maior no fígado, brânquias e músculos, respectivamente, tendo relação direta ao tempo de exposição e inversa aos valores pH. Segundo esses mesmos autores, quanto maior o acúmulo de cobre nas brânquias, menor a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial e maior a indução da MT nesse tecido, dados esses que corroboram com os do presente estudo (Figuras 3 e 4, respectivamente).

Os parâmetros cardio-respiratórios apresentaram adaptações diferenciadas em cada tempo monitorado de exposição. No presente estudo, observou-se que a EO_2 no grupo contaminado com CuSO_4 diminuiu significativamente em relação ao grupo controle. Tal diminuição ocorreu a partir da terceira hora (Figura 7), provavelmente devido a um aumento da barreira água-sangue, em consequência ao espessamento da camada de muco nas brânquias para dificultar a entrada de cobre (SØRENSEN, 1991).

Assim, este mecanismo de defesa pode acarretar também um prejuízo na função respiratória, já que dificulta a difusão dos gases através do epitélio branquial (HINTON & LAURÉN, 1990; FERNANDES & MAZON, 2003), podendo levar o peixe a uma situação de hipoxemia.

No presente estudo, os animais expostos ao cobre, também deram início a uma compensação hematológica confirmada pelo aumento significativo do número de eritrócitos na circulação (tabela 1), conforme também observado por CYRIAC et al. (1989) e NUSSEY et al. (1995) em *Oreochromis mossambicus*.

O grupo T2 apresentou uma diminuição na $\dot{V}O_2$ a partir de 6 horas de exposição ao $CuSO_4$ (Figura 8). Uma redução na $\dot{V}O_2$ não indica necessariamente uma hipóxia tecidual, mas ambas podem estar relacionadas (ULTSCH et al., 1980). O suprimento de O_2 para os tecidos é que determina a taxa do metabolismo aeróbico (GRIGG, 1969). Falhas nos mecanismos cardio-respiratórios compensatórios ou uma hipoxemia podem acarretar um deslocamento da “cascata de O_2 ” para baixo e, como conseqüência, um débito no suprimento de O_2 para as mitocôndrias, causando uma situação de anaerobiose. Assim, são as vias metabólicas anaeróbicas que gerarão energia para o animal. Este fato foi corroborado, no presente estudo, pelo aumento dos níveis de lactato nos tecidos (TABELA 2).

BEAUMONT et al., (1995; 2000), observaram uma diminuição no consumo de O_2 em *Salmo trutta*, quando expuseram os animais a baixas concentrações de cobre, sendo compensado por outras alterações no sistema de transporte de O_2 , como aumento no RBC.

Observou-se no presente estudo, uma hiperventilação nos peixes do grupo T2 a partir da terceira hora de exposição ao $CuSO_4$. O aumento na \dot{V}_G ocorreu devido a aumentos tanto da f_R quanto do V_T (Figuras 6 e 10, respectivamente). Estes mecanismo tem por finalidade compensar o déficit de O_2 imposto por uma hipóxia ambiental ou por um ambiente contaminado (BEAUMONT et al., 2002). WILSON & TAYLOR (1993), observaram, em *Oncorhynchus mykiss*, que alterações na morfologia das brânquias causadas pelo efeito do Cu^{2+} podem prejudicar as trocas gasosas, mas estes autores não avaliaram as respostas respiratórias apresentadas pelos peixes durante a exposição.

Segundo IWAMA et al. (1997), a assimilação de altas concentrações de Cu^{2+} leva a alterações na liberação de catecolaminas e cortisol, sendo esses efeitos considerados efeitos primários em resposta ao estresse e que podem estimular os efeitos secundários. Esses efeitos secundários, por sua vez, alteram parâmetros fisiológicos, como a respiração. As catecolaminas aumentam a permeabilidade das membranas branquiais, alterando a perda difusiva de íons, aumentando, como consequência, a taxa de ventilação (SØRENSEN, 1991). O aumento da f_R também pode indicar uma reação do animal à hipoxemia ocasionada pelo cobre (HEATH, 1995). Assim o animal tenderia a ter uma maior oferta de O_2 ao nível dos tecidos.

No presente estudo a f_H se alterou no grupo T2 apenas a partir de 12 h de exposição ao CuSO_4 (Figura 11) RANDALL & PERRY (1992) e WENDELAAR BONGA (1997) observaram que a f_H , o débito cardíaco e a resistência vascular se elevam em *Tilápia mossambica* quando a expuseram a concentrações sub-letais de cobre ($3,2\mu\text{M}$). No entanto, BEAUMONT et al. (2002) observaram que em *Salmo trutta* exposta ao cobre, mesmo em situação de exercício, não apresentaram alteração na frequência cardíaca, possivelmente devido à baixa dosagem de cobre ($0,08\mu\text{L}$). A bradicardia é uma resposta reflexa à hipoxemia causada pelo espessamento da camada de muco que recobre as brânquias, dificultando a difusão do O_2 da água para o sangue, um aumento na viscosidade do sangue, ou o início de uma falência do animal frente à exposição ao tóxico (HEATH, 1995). Com o aumento na \dot{V}_G , a tendência é da água da corrente ventilatória passar mais rapidamente através das lamelas secundárias, diminuindo o tempo de difusão do O_2 da água para o sangue. Essa bradicardia hipóxica, além de poder ser acompanhada de um aumento do volume sistólico, o que faz com que um maior número de lamelas secundárias seja recrutado, diminui o tempo de passagem do sangue pelos sítios de troca gasosa,

melhorando a relação perfusão-difusão e, conseqüentemente, a captação do O₂ pelas brânquias.

6.0 - CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que uma concentração sub-letal de CuSO_4 ($23,57\text{mg. L}^{-1}$) provoca variadas alterações na tilápia do Nilo:

a) leva a um aumento de Hct, tanto devido a estimular a eritropoiese, verificada pelo aumento do RBC, quanto pelo aumento do VCM dado pela entrada d'água na célula;

b) aumenta a concentração de hemoglobina - Hb, provavelmente para otimizar a tomada de O_2 dificultada pelo espessamento da camada de muco das brânquias;

c) inibe a atividade da enzima Na^+/K^+ -ATPase branquial, tanto por agir diretamente no sítio ativo dessa enzima, quanto por reduzir o influxo de Na^+ ;

d) induz a síntese da MT nas brânquias, seqüestrando o Cu^+ , fato comprovado pelo acúmulo de cobre nesse tecido;

e) altera as concentrações dos intermediários metabólicos (glicose, lactato, piruvato, glicogênio), para atender a elevada demanda energética na tentativa de desintoxicação;

f) provoca uma hipoxemia tecidual, confirmado pelo acúmulo de lactato no MV

g) modifica as concentrações iônicas (Na^+ , K^+ e Cl^-) em virtude de uma provável quebra na membrana plasmática e/ou outras alterações morfológicas;

h) aumenta a concentração da amônia plasmática, por ser um fator estressante para o animal e também por inibir o seu mecanismo excretório;

i) provoca alterações dos parâmetros cardio-respiratórios, como hiperventilação (aumento da V_G devido a um maior aumento no V_T) e minimizar o déficit de O_2 , causado pelo espessamento da camada de muco nas brânquias e, conseqüentemente, aumento da barreira água-sangue e diminuição da difusão do O_2 para o sangue;

j) leva a uma bradicardia na tentativa de maximizar o tempo de passagem do sangue pelas brânquias melhorando a relação perfusão-difusão.

7.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, I., HAMID, T., FATIMA, M., CHAND, H.S., JAIN, S.K., ATHAR, M., RAISUDDIN, S., 2000. Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus*) is a biomarker of paper mill effluen exposure. *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1523, pp. 37-48.
- BEAUMONT, M.W., BUTLER, P.J., TAYLOR, E.W., 1995. Exposure of Brown trout, *Salmo trutta* to a sub-lethal copper concentration in soft acidic water and its effects upon sustained swimming performance. *Aquatic Toxicol.* 33: 45-63.
- BEAUMONT, M.W., BUTLER, P.J., TAYLOR, E.W., 2000. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. *Aquatic Toxicol.*, vol. 51, pp. 259-272.
- BEAUMONT, M.W., BUTLER, P.J., TAYLOR, E.W., 2002. Exposure of Brown trout, *Salmo trutta* to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon gas exchange and ammonia accumulation. *The Journal of Experimental Biology* 206: 153-162.
- BIDINOTTO, P.M., SOUZA, R.H.S., MORAES, G. 1998. Hepatic glycogen in eight tropical teleost fish: A procedure for field determination of microsamples. *Bol.Tec. CEPTA*, 10: pp.53-60.
- BOYD, C.E., 1990. *Water quality in ponds for aquaculture*. Bermington Publishing, Berminghan, AL, 482pp.
- BRADFORD, M.M., 2000. A rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quatities of protein utilizing the principle of protein-dye bing. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248-254.
- BRAGIGAND, V., BERTHET, B., 2003. Some methodological aspects of metallothionein evaluation. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 134: 55-61.
- CAJARAVILLE, M.P., BEBIANNO, M.J., BLASCO, J., PORTE, C., SARASQUETE, C., VIARENGO, A., 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci. Total Environ.*, vol. 247, pp. 295-311.
- CARVALHO, C.S., 2003. Influência do pH e da temperatura sobre os efeitos do cobre no sangue e fígado de curimatá, *Prochilodus scrofa* (STEINDACHNER, 1881), São Carlos – UFSCar, Tese de Doutorado, 107 p
- CARVALHO, C.S., ARAUJO, H.S., FERNANDES, M.N., 2004. Hepatic metallothioninin a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 an pH 8.0. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 137: 225-334.
- CERQUEIRA, C.C.C., FERNANDES, M.N., 2002. Gill tissue recovery after copper

- exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 52, pp. 83-91.
- ÇOĞUN , H.Y.C, KARGIN, F., 2003. Accumulation Of Copper and Cadmium in Small and Large Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71:1265–1271.
- ÇOĞUN , H.Y.C, KARGIN, F., 2004. Effects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, vol. 55, pp.277-282.
- CUSIMANO, R.F., BRAKKE, D.F., CHAPMAN, G., 1986. Effects of pH on the toxicities of cadmium, copper, and zinc to steelhead trout, *Salmo gairdneri*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*,vol.43, pp. 1497-1503.
- CYRIAC, P.J., ANTONY, A., NAMBISAN, N.K., 1989. Haemoglobin and hematócrito values in the fish *Oreochromis mossambicus* (Peters) after short term exposure to copper and mercury. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 43, pp. 315-320.
- DALZELL, D.J.B., ALTE, S., ASPICHUETA, E., DE LA SOTA, A., ETXEBARRIA, J., GUTIERREZ, M., HOFFMANN, C.C., SALES, D., OBST, U., CHRISTOFI, N., 2002. A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge. *Chemosphere*, vol. 47, pp. 535–545.
- DANG, Z., 2000. Adaptative stress responses in fish gills. PhD Thesis. University of Nijmegen, Nijmegen, Netherlands.
- DAY, N., BUTLER, P.J., 1996. Environmental acidity and white muscle recruitment during swimming in the brown trout (*Salmo trutta*). *J. Exp. Biol.*, 199: 1947-1959.
- DE BOECK, G., VLAEMINCK, A., BALM, P.H.M., LOCK, R.A.C., DE WACHTER, B., BLUST, R., 2000. Morphological and metabolic changes in common carp, *Cyprinus carpio*, during short-term copper exposure: interaction between Cu²⁺ and plasma cortisol elevation. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 374-381.
- DELAVECHIA, M.L., 1994. Respostas cardio-respiratórias da tilapias do Nilo, *Oreochromis niloticus* (SCHWARTZ, 1983) às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente. São Carlos. Tese De Doutorado Em Ciências – Programa De Pós-Graduacao em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal De São Carlos.
- DETHLOFF, G.M., BAILEY, H.C., MAIER, K.J., 2001. Effects of dissolved copper on select haematological, biochemical, and immunological parameters of wild rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol.40, pp. 371-380.
- DEVLIN, T. M., 1997. Manual de bioquímica com correlações clínicas. 4. ed. São paulo: Edgard Blucher.1007 p.
- DUBOIS, M.G., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Ana. Chem.*, 28: 350-358.

- DUTTON, M.D., STEPHENSON, M., KLAVERKAMP, J.F., 1993. Metallothionein in fish. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 12, p. 1193-1202.
- EVANS, D.H. *The physiology of fish*. Florida : CRC Press, 1993.
- FABBRI, E., CAPUZZO, A. F. AND MOON, T. W., 1998. The role of catecholamines in the regulation of fish metabolism: an overview, *Comp. Biochem. Physiol.C.* 120, 177-192.
- FERNANDES, M. N. AND MAZON, A. F., 2003. Environmental Pollution and fish gill morphology. In: Val, A. L., Kapoor, B.G. (Eds.), *Fish Adaptations*, Science Publishers, Enfield , USA, pp. 203-231.
- FERNANDES, M. N. AND RANTIN, F. T., 1989. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. *J. Fish. Biol.* 35, 509-519.
- FURTADO, J. F.R., 1995. *Piscicultura: uma alternativa rentável*. Guaíba: Agropecuária. 180 p.
- GENTZKON, C.J., MASEN, J.M., 1942. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. *J. of Biolog. Chemest.* 143: pp.531-544.
- GLASS, M. L., RANTIN, F. T., VERZOLA, R. M. M., FERNANDES, M. N., KALININ, A. L., 1991. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxia carp, *Cyprinus carpio* L. *J. Fish. Biol.* 39, 143-149.
- GOLDENFARB, P.B., BOWYER, F.P., HALL, E. 1971. Reproducibility in the hematology laboratory: The microhematocrit determination. *American Journal of Clinical Pathology*. New York, 56: p.35-39.
- GRIGG, G. C., 1969. The failure of oxygen transport in a fish at low levels of ambient oxygen. *Comp. Biochem. Physiol.*, v. 29, p.1253-1257,.
- GROSELL, M., NIELSEN, C., BIANCHINI, A., 2002. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 133: 287-303.
- GROSELL, M., WOOD, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *J. Exp. Biology*, 205: 1179-1188.
- HARRIS, J.; BIRD, D.J., 2000. Modulation of the fish immune system by hormones. *J. Vet. Immunol. and Immunopathol.* Vol 77(3-4): 163-176.
- HARROWER, J.R., BROWN, C.H., 1972. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. *J. Appl. Physiol.* 32(5): 224-228.
- HATTINGH, J., 1976. Blood sugar as an indicator of stress in the fresh water fish. *Ladeo*

- capensis* (Smith). J. Fish Biol. vol.10, pp. 191-195.
- HEATH, A.G., 1995. Water pollution and fish physiology. CRC Press Inc. Boca Raton, Lewis Publishers, 2 ed. Florida, 245p.
- HINTON, D. E., LAURÉN, D. J., 1990. Integrative histopathological approaches to detecting effects of environmental stressors on fishes In: Biological indicators of Stress in fish. Edited by S. M ADAMS. American Fisheries Society Symposium 8, Bethesda, pp. 51-66.
- HOLGSTRAND, C., WOOD, C.M., 1996. The physiology and toxicology of zinc in fish. In: Toxicology of Aquatic Pollution. (ed. E. W. Taylor), pp.61-84. Cambridge: Cambridge University Press.
- HUGHES, G. M., 1983. Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L. at 10°C and 20°C and the effects of the hypoxia. J. Fish Biol., vol. 22, pp. 613-628.
- HUGHES, G. M., SAUNDERS, R. L., 1970. Responses of respiratory pumps to hypoxia in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). J. Exp. Biol., vol. 53, pp. 529-545.
- IWAMA, G.K., PICKERING, A.D., SUMPTER, J.P., SCHRECK, C.B., 1997. Fish stress and health in aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge. 27p.
- JAGER, S., DEKKERS, W. J., 1975. Relations between gill structure and activity in fish. Netherlands J. Zool., vol. 25, pp. 276-308.
- JANSSENS, P.A. AND WATERMAN, J., 1988. Hormonal regulation of gluconeogenesis and glycogenolysis in carp (*Cyprinus carpio*) liver pieces cultured in vitro. Comp. Biochem. Physiol.A. 91, 451-455.
- JYOTHI, B., NARAYAN, G., 1999. Certain pesticide-induced carbohydrate metabolic disorders in the serum of freshwater fish *Clarias batrachus* (Linn.). Food Chem. Toxicol. 37: 417-421.
- KUBITZA, F., 1998. Qualidade da água na produção de peixes. Campo Grande, MS. 60 p.
- LARSEN, B.K., PÖRTNER, H.O., JENSEN F.B., 1997. Extra- and intracellular acid-base balance and ionic regulation in cód (*Gadus morhua*) during combined and isolated exposures to hypercapnia and copper. Mar. Biol., 128: 337-346.
- LAUREN, D.P., McDONALD, D.G., 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. comp. Physiol. B., 155: 635-644.
- LI, J., QUABIUS, E.S., WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G., LOCK, R.A.C., 1998. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na⁺/K⁺- ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Aquat. Toxicol. 43: 1-11.
- LINDE, A.R., SÁNCHEZ-GALÁN, S., VALLÉS-MOTA, P., GARCIA-VÁZQUEZ, E., 2001. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and

- brown trout. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, vol. 49, pp. 60-63.
- LU, G.D., 1939. The metabolism of pyruvic 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.
- MALLATT, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Can. J. Fish. Aquat. Sc.* 42, 630-648.
- MATEY, V.E., KOMOV, V.T., 1992. The effect of aluminum and low pH of water on gill ultrastructure and electrolyte content in blood plasma of juvenile *Salmo salar*. *J. Evol. Biochem. Physiol.*, vol. 28, n.5, pp. 453-460.
- MAYER, O.H., LEACH, A., KLING, P., OLSSON, P., HOLGSTRAND, C., 2003. Activation of the rainbow trout metallothionein – A promoter by silver and zinc. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 134: 181-188.
- MAZON, A.F., FERNANDES, M.N., 2001. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 63, pp. 797-804.
- MAZON, A.F., NOLAN, D.T., LOCK, R.A.C., FERNANDES, M.N., WANDERLAAR BONGA, S.E., 2004. A short-term in vitro gill culture system to study the effects of toxic (copper) and non-toxic (cortisol) stressors on the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Toxicol in vitro*, no prelo.
- McCARTER, J.A., ROCH, M., 1983. Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile coho salmon. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 74C, n. 1, pp. 133-137.
- McCARTER, J.A., ROCH, M., 1984. Chronic exposure of *coho salmon* to sublethal concentrations of copper -III. Kinetics of metabolism of metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 77C, n.1, p. 83-87.
- McGEER, J.C., PLAYLE, R.C., WOOD, C.M., GALVEZ, F., 2000. A physiologically based biotic ligand model for predicting the acute toxicity of waterborne silver to rainbow trout in freshwaters. *Environ. Sci. Technol.* 34: 4199-4207.
- MOMMSEN, T.P., VIAJAYAN, M.M., MOON, T.W., 1999. Cortisol in Teleosts: dynamics, mechanisms of actions and metabolics regulation. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, vol. 9, pp. 211-268.
- NEWMAN, S.G., 1993. Bacterial vaccines for fish. *Annual review of fish diseases*. New York– USA, 3: 145-185.
- NOLAN, D.T., 2000. Skin response of Tilapia stressors. Tese de Doutorado, Universidade Católica de Nijmegen, Nijmegen, Holanda, 182p.
- NOVELLI FILHO, J.L.V.B., NOVELLI, E.L.B., MANZANO, M.A., LOPES, A.M., CATANEO, A.C., RIBAS, B.O., 2000. Effect of tocopherol on superoxide radical and toxicity of cadmium exposure. *Int. J. Environ. Health. Rev.* 10: 125-134.

- NRIAGU, J.O., PACINA, J.M., 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metal. *Nature*. 333: 134-139.
- NUSSEY, G., VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H., 1995. Effects of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (CICHLIDAE). *Comp. Biochem. Physiol.C*, vol. 111, n.3, pp. 369-380.
- OLSVIK, P.A., GUNDERSEN, P., ANDERSEN, R.A., ZACHARIASSEN, K.E., 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments a run-off episode. *Aquat. Toxicol.*, vol. 50, pp. 301-316.
- PAVANELLI, G.C., EIRAS, J.C., TAKEMOTO, R.M., 1998. Doenças de Peixes: Profilaxia, Diagnósticos e Tratamentos. Editora da Universidade Estadual de Maringá. 264p.
- PELGROM, S.M.G.J., LOCK, R.A.C., BALM, P.H.M., WENDELAAR BONGA, S.E., 1995. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 32: 303-320.
- PILGAARD, L., MALTE, H., JENSEN, F.B., 1994. Physiological effects and tissue accumulation of copper in freshwater rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) under normoxic and hypoxic conditions. *Aquatic Toxicology*, vol.29, 3-4: 197-212.
- PINHEIRO, G.H.D., 2004. Respostas Fisiológicas ao estresse em *Prochilodus scrofa* durante a exposição ao cobre e subsequente recuperação em água sem cobre. São Carlos – UFSCar, Dissertação de Mestrado, 51 p.
- PLAYLE, R.C., 1998. Modelling metal interactions at fish gills. *The Science of the Total Environment* 219: 147-163
- QUARBIUS, E.S., BALM, P. H. M., WEENDELAAR BONGA, S. E., 1997. Interrenal stress responsiveness of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.* 108: 472-482.
- RANDALL, D.J., PERRY, S.F., 1992. Catecholamines. In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Farrel, A.P. (eds), *Fish Physiology*. Academic Press, San Diego, CA. pp. 255-300.
- RANTIN, F. T., 1993. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to gradual environmental hypoxia. *Env. Biol. Fish.*, v. 36, p. 93-97.
- RANTIN, F. T., JOHANSEN, K., 1984. Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to hypoxia. *Env. Biol. Fish.*, vol. 11, n. 3, pp. 221-228.
- REID, S.D., McDONALD, D.G., 1988. Effects of cadmium, copper and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 45: 244-253.

- RUS, A. S., 2000. Description of a facility for studying energy metabolism in fish: application to aquaculture. *Aquacultural Engineering*, vol. 21, pp. 169-180.
- RYU, SOO-K, PARK, JIN-SUNG, LEE, IN-SOOK, 2003. Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 134: 101-107.
- SAUNDERS, R. L., 1962. The irrigation of the gills in fishes. 2. Efficiency of oxygen uptake in relation to the respiratory flow activity and concentrations of oxygen and carbon dioxide. *Can. J. Zool.*, v. 40, p. 817-862.
- SCHERER, E., MCNICOL, R.E., EVANS, R.E., 1997. Impairment of lake trout foraging by chronic exposure to cadmium: a back-box experiment. *Aquatic Toxicol.* 37: 1-7.
- SCHLENK, D., KENNETH, B.D., GRIFFIN, B.R., 1999. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. *Aquaculture*. 177:367-397.
- SCHMITTOU, H.R. 1995. Produção de peixes em alta densidade em tanques rede de pequeno volume. Traduzido por Eduardo Ono. Ed. por Coelho, S.R. Mogiana Alimentos S/A campinas, SP, 77p.
- SIMKISS, K., TAYLOR, M., 1981. Cellular mechanisms of metal ion detoxification and some new indices of pollution. *Aquatic Toxicol.* 1: 279-290.
- SOLA, F., ISAIA, J., MASSONI, A., 1995. Effects of copper on gill structure and transport function in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Appl. Toxicol.* 15: 391-398.
- SØRENSEN, E.M., 1991. metal poisoning in fish. CRC Press, Boca Raton, FL.
- STRAUS, D. L., 2003. The acute toxicity of copper to blue tilapia in dilutions of settled pond waters. *Aquaculture* 219: 233-240
- TAYLOR, E.W., BEAUMONT, M.W., BUTLER, P.J., MUJALLID, M.S.I., 1996. Lethal and sub-lethal effects copper upon fish: a role for ammonia toxicity. In: Taylor, E.W. (Ed), *Toxicology of Aquatic Pollution: Physiological, Cellular and Molecular Approaches*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 85-113.
- TORT, L., FLOS, R., HUGHES, G. M., 1986. Métodos para el estudio de los efectos de la contaminación en la fisiología cariorrespiratoria de los peces. *Inf. Técn. Inst. Inv. Pesq.*, vol. 131, pp. 3-32.
- TREWAVAS, E., 1983. Tilapiine fishes of the genera *Sarotherodon*, *Oreochromis* and *Danakilia*. *British Mus. Nat. Hist.*, London, UK. 583 p.
- ULTSCH, G. R., OTT, M. E., HEISLER, N., 1980. Standard metabolic rate, critical tension, and aerobic scope for spontaneous activity of trout (*Salmo gairdneri*) and carp (*Cyprinus carpio*) in acidified water. *Comp. Biochem. Physiol.*, vol. 67A, pp. 329-335.

- VAN WAARDE, A., VAN DEN THILLART, G., KESBEKE, F. 1983. Anaerobic energy metabolism of the European eel, *Anguilla anguilla* L. J. Comp. Biochem. Physiol.. 149: 469-475.
- VAN WEERD, J.H., KOMEN, J., 1998 The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comp. Biochem. Physiol. A. 120: 107-112.
- VIAJAYAN, M.M., PEREIRA, C., MOON, T.W., 1994. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in Rainbow-trout following an acute handling stress. Comp. Biochem. Physiol.C., vol. 108, pp. 321-329.
- VIARENGO, A., PONZANO, E., DONDEDERO, F., FABBRI, R., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organism: an application to Mediterranean and Antarctic mollusc. Mar. Environ. Res. (44), 1: 69-84
- WANG, T., KNUDSEN, P.K., BRAUNER, C.J. BUSK, M., VIJAYAN, M.M., JENSEN, F.B., 1998. Copper exposure impairs intra- and extracellular acid-base regulation during hypercapnia in the fresh water rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Comp. Physiol. B. 168: 591-599.
- WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77: 591-625.
- WILSON, R.W., TAYLOR, E.W., 1993. The physiological response of freshwater rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during acutely lethal copper exposure. J. Comp. Physiol. B 163: 38-37.