

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO PLENA UFSCAR/UNESP

**EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE PARÂMETROS  
CARDIORRESPIRATÓRIOS E BIOMARCADORES DO ESTRESSE  
OXIDATIVO DE DUAS ESPÉCIES DE TELEÓSTEOS NEOTROPICAIS,  
TRAÍRA, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) E MATRINXÃ, *Brycon  
amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829).**

**NATHAN DIAS MARTINS**

**SÃO CARLOS  
2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO PLENA UFSCAR/UNESP

**EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE PARÂMETROS  
CARDIORRESPIRATÓRIOS E BIOMARCADORES DO ESTRESSE  
OXIDATIVO DE DUAS ESPÉCIES DE TELEÓSTEOS NEOTROPICAIS,  
TRAÍRA, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794) E MATRINXÃ, *Brycon  
amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829).**

**NATHAN DIAS MARTINS**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ciências Fisiológicas.

***Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin***

**SÃO CARLOS  
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar

M386ep Martins, Nathan Dias.  
Efeitos da microcistina-LR sobre parâmetros cardiorrespiratórios e biomarcadores do estresse oxidativo de duas espécies de teleósteos neotropicais, traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) / Nathan Dias Martins. -- São Carlos : UFSCar, 2015.  
144 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Peixe. 2. Resposta cardiorrespiratória. 3. Estresse oxidativo. 4. Microcistina. 5. Traíra (Peixe). 6. Matrinxã (Peixe). I. Título.

CDD: 597 (20<sup>a</sup>)

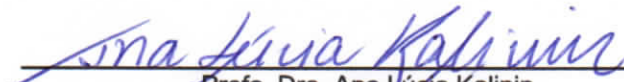



---


**Folha de Aprovação**

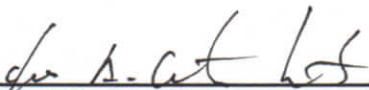
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Nathan Dias Martins, realizada em 10/03/2015:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Odete Rocha  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. David J. McKenzie  
UM2

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cleo Alcântara Costa Leite  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Dalton José Carneiro  
UNESP

*Dedico especialmente à  
minha mãe.*

*Pela luta, pelo exemplo, pela  
humildade, pela simpatia e  
pela humanidade, e  
principalmente pelo sorriso  
aberto mesmo quando tudo  
está dando errado.*

*À minha mãe, Simone, minha Vó Odete e minha tia Fábria.*

*Por todo o apoio e confiança,  
por todo o carinho, por toda a  
paciência e principalmente  
por toda a garra e fibra que  
tornaram possível esse  
momento.*

*Ào meu irmão Yuri, por toda nossa maravilhosa infância e  
pela convivência até hoje.*

*Àos meus tios Alvaro e Leonardo por estarem presentes nas  
minhas boas lembranças.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra Ana Lúcia Kalinin, pela oportunidade, confiança, pelos conselhos, pela orientação, pela enorme paciência e pelo exemplo profissional.

À amiga Ana Lúcia Kalinin ou “Patroa” como eu costumo dizer, pela simpatia, pelo carinho com que trata seus alunos, por tornar o ambiente de trabalho muito mais prazeroso, pela amizade e por sua conduta como pessoa. Faz toda a diferença se sentir bem no seu lugar de trabalho e poder dizer que se tem uma amiga como orientadora.

À minha família, Simone, Yuri, Odete, Fábria, Léo, Roy, Camille, Raíssa e Julia. Por toda a convivência e afeto. Família é a base de tudo, sem dúvida.

À minha namorada, Kátia, pela cumplicidade e companheirismo, pelo carinho e principalmente pela paciência nessa reta final do doutorado.

Um agradecimento mais do que especial para a minha amiga Diana. Pela amizade, pelo excepcional exemplo profissional, pela paciência e principalmente pela ajuda em todas as partes do meu trabalho. Aprendi muito com você.

Ao Professor Dr João Sarkis Yunes da FURG/RS por viabilizar a execução desse projeto cedendo a toxina utilizada.

À professora Dra Maria Sílvia de Assis Moura e a aluna Camila Barbosa Moraes Rodrigues do Departamento de Estatística da UFSCar pela realização das análises estatísticas utilizadas no presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin, pelo agradável convívio, pelos ensinamentos, pelo exemplo profissional e contribuições ao presente trabalho.

Ao corpo docente e funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas em especial ao Sr. Ângelo e ao José Roberto Sanches.

Ao secretário da Pós-graduação, Alexandre, por toda a ajuda. Por quebrar meus galhos e pela paciência nas centenas de vezes que apareci na secretaria.

À Piscicultura Santa Cândida pela doação dos peixes utilizados no presente estudo.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite e pelas colaborações ao presente trabalho.

Aos meus amigos do DCF pelas inúmeras risadas, brincadeiras, incentivo, ajuda com o trabalho, conselhos, churrascos do departamento, saídas depois do expediente, butecos e tudo mais. Pela amizade convívio e apoio: Rocco, Vivi, Raquel, Thiago, Lucas, Rafael Z, Eliton, Carina, Carol, Marina, Mariana, Iara, Driele, Nayara e todo o pessoal da I.C.

Aos meus amigos que fiz nesse tempo todo que vivo em São Carlos, aos amigos de república, do futebol da federal, da minha banda e os que eu não consigo

classificar em um grupo específico. Meu agradecimento mais do que especial, a amizade faz a vida ficar mais leve.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento, pelo suporte financeiro.

Ao meu cachorro bigola, pela companhia e pelas risadas e carinho que ele me proporciona todos dias.

À todos que apesar de não estarem citados aqui contribuíram para minha formação e amadurecimento, tanto pessoal quanto profissional.

***“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”***

***Isaac Newton***

*"...Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
Apesar de todos os desafios,  
Incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas  
E se tornar um autor da própria história.  
É atravessar desertos fora de si,  
Mas ser capaz de encontrar um oásis  
No recôndito da sua alma.  
É agradecer a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um "não".  
É ter segurança para receber uma crítica,  
Mesmo que injusta.  
Pedras no caminho?  
Guardo todas, um dia vou  
Construir um castelo ..."*

*Fernando Pessoa*



## RESUMO

As cianobactérias, em condições favoráveis podem formar grandes massas superficiais de coloração verde intensa, denominadas florações. Alguns gêneros de cianobactérias são produtoras de toxinas, e durante as florações, pode haver riscos de contaminação da água e conseqüentemente dos organismos dependentes desta. Dentre as toxinas produzidas pelas cianobactérias, destaca-se a microcistina. Esse tipo de toxina apresenta efeitos pronunciados sobre o fígado, embora possa exibir seus efeitos em diversos órgãos. Ademais, é a cianotoxina que se encontra mais amplamente distribuída nos mais variados tipos de ecossistemas. Além da inibição das fosfatases, as microcistinas podem também afetar os sistemas de reparo de DNA e expressão de genes, e parecem poder interagir com as mitocôndrias de tecidos animais e causar estresse oxidativo e apoptose celular. O objetivo deste estudo foi avaliar as respostas cardiorrespiratórias durante hipóxia gradual e os biomarcadores do estresse oxidativo em duas espécies de teleosteos Neotropicais, a traíra, *Hoplias malabaricus* e o matrinxã *Brycon amazonicus* em situação controle e após 48 h de injeção intraperitoneal de extrato liofilizado contendo microcistina-LR (MC-LR - 100 µg.Kg<sup>-1</sup> de massa corpórea). Os resultados indicam que a exposição à MC-LR induziu ao estresse oxidativo em fígado e brânquias, bem como alterou as respostas cardiorrespiratórias de ambas as espécies. Na traíra a exposição a MC-LR aumentou os valores de PcO<sub>2</sub>, causou hiperventilação, aumento da taxa metabólica, aumento dos valores de frequência cardíaca e redução da extração de oxigênio, também foi observado estresse oxidativo no tecido branquial. Em matrinxã foi observada hiperventilação, aumento da taxa metabólica e da PcO<sub>2</sub>, e redução na extração de oxigênio. Essa espécie se mostrou mais sensível ao efeito da MC-LR, devido a ocorrência de estresse oxidativo em ambos os tecidos analisados (brânquias e fígado) e a morte de alguns animais durante o desenvolvimento da hipóxia gradual. Portanto, nossos resultados indicam que a exposição à MC-LR tem efeitos prejudiciais sobre as duas espécies analisadas, tanto nas respostas cardiorrespiratórias, quanto no estabelecimento de estresse oxidativo, entretanto a magnitude desse efeito parece ser espécie-específica com indicação de maior susceptibilidade da espécie *Brycon amazonicus* ao efeito dessa toxina.

**Palavras-chave:** Microcistina LR. Traíra. Matrinxã. Respostas cardiorrespiratórias. Estresse oxidativo. Hipóxia.

## ABSTRACT

Cyanobacteria, under favorable conditions can form large superficial masses of green color called blooms. Some genera of cyanobacteria are toxins producers, and during the bloom, there may be risks of water bodies contamination and thus of those organisms that depends on this. Among the toxins produced by cyanobacteria, stands the microcystin. This type of toxin has pronounced effects on the liver, although it can exhibit its effects in several organs. Moreover, it is the cyanotoxin which is more widely distributed in various types of ecosystems. In addition to the phosphatases inhibition, microcystins may also affect DNA repair systems and gene expression, and appear to interact with the mitochondria of animal tissues leading to oxidative stress and apoptosis. The aim of this study was to evaluate the cardiorespiratory responses during graded hypoxia and also the biomarkers of oxidative stress in two species of Neotropical teleost, traíra, *Hoplias malabaricus*, and matrinxã, *Brycon amazonicus* in control condition and 48 h after of an intraperitoneal injection of lyophilized extract containing microcystin -LR (MC-LR - 100  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  body weight). The results indicate that exposure to MC-LR induced oxidative stress in liver and gills, and changed the cardiorespiratory responses of both species. In traíra, the exposure to MC-LR increased  $P_{\text{CO}_2}$  values, caused hyperventilation, increased metabolic rate, increased heart rate values and decreased oxygen extraction, it was also observed oxidative stress in the gill tissue. In matrinxã was observed hyperventilation, increased metabolic rate and  $P_{\text{CO}_2}$ , and reduction in oxygen extraction. This specie was more sensitive to the effects of MC-LR, due to the occurrence of oxidative stress in both tissues (gills and liver), and the death of some animals during the development of graded hypoxia. Therefore, our results indicate that exposure to MC-LR has harmful effects on the two species analyzed, both in cardiorespiratory responses, as in the establishment of oxidative stress, however the magnitude of this effect appears to be species-specific indicating major susceptibility of the specie *Brycon amazonicus* to the effect of this cyanotoxin.

**Keywords:** Microcystin LR. *Traíra*. *Matrinxã*. Cardiorespiratory responses. Oxidative stress. Hypoxia.

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I : INTRODUÇÃO GERAL

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	01
1.1. Cianotoxinas.....	02
1.2. Microcistinas.....	03
1.3 Mecanismos gerais da toxicidade da MC-LR.....	04
1.4 Considerações sobre as espécies estudadas.....	06
1.5. Função Cardio-Respiratória de Peixes.....	08
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	11
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	12

### CAPÍTULO II : EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829).

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
2.1 Animais utilizados.....	17
2.2. Delineamento experimental.....	17
2.3. Procedimentos experimentais.....	17
2.4. Variáveis ventilatórias e frequência cardíaca.....	22
2.5. Tratamento estatístico dos dados.....	23
<b>3. RESULTADOS</b> .....	24

3.1. Respostas cardiorrespiratórias de <i>Brycon amazonicus</i> à hipóxia gradual.....	24
3.1.1. Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).....	24
3.1.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ ).....	27
3.1.3. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ ).....	29
3.1.4. Frequência cardíaca de <i>Brycon amazonicus</i> submetido à hipóxia gradual.....	30
3.1.5. Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).....	31
<b>4. DISCUSSÃO.</b>	
4.1. Respostas respiratórias de <i>Brycon amazonicus</i> submetido à hipóxia gradual.....	32
4.1.1 Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de $O_2$ ( $P_cO_2$ ).....	32
4.1.2. Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume Ventilatório ( $V_T$ ).....	36
4.1.3. Extração de $O_2$ da Corrente Ventilatória ( $EO_2$ ).....	38
4.1.4. Frequência cardíaca de <i>Brycon amazonicus</i> submetido à hipóxia gradual.....	41
4.1.5. Necessidade Ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).....	42
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO III : EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE PARÂMETROS CARDIORRESPIRATÓRIOS DE TRAÍRA, <i>Hoplias malabaricus</i> (BLOCH, 1794).</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>46</b>

2.1 Animais utilizados.....	46
2.2. Delineamento experimental.....	46
2.3. Procedimentos experimentais.....	46
2.4. Variáveis ventilatórias e frequência cardíaca.....	50
2.5. Tratamento estatístico dos dados.....	50
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
3.1. Respostas cardiorrespiratórias de <i>Hoplias malabaricus</i> à hipóxia gradual.....	51
3.1.1. Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).....	51
3.1.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ ).....	53
3.1.3. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ ).....	56
3.1.4. Frequência cardíaca de <i>Hoplias malabaricus</i> submetido à hipóxia gradual.....	57
3.1.5. Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).....	58
<b>4. DISCUSSÃO.</b>	
4.1. Respostas respiratórias de <i>Hoplias malabaricus</i> submetido à hipóxia gradual.....	59
4.1.1 Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de $O_2$ ( $P_cO_2$ ).....	59
4.1.2. Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume Ventilatório ( $V_T$ ).....	63
4.1.3. Extração de $O_2$ da Corrente Ventilatória ( $EO_2$ ).....	67

4.1.4. Frequência cardíaca de <i>Hoplias malabaricus</i> submetido à hipóxia gradual.....	68
4.1.5. Necessidade Ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).....	70
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
 <b>CAPÍTULO IV : EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM MATRINXÃ, <i>Brycon amazonicus</i> (SPIX &amp; AGASSIZ, 1829).</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>73</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>75</b>
2.1 Animais utilizados.....	75
2.2. Delineamento experimental.....	76
2.3. Coleta das amostras dos tecidos.....	76
2.4. Procedimentos bioquímicos.....	76
2.5. Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes.....	77
2.5.1. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	77
2.5.2 Determinação da atividade da catalase (CAT).....	78
2.5.3 Determinação da atividade da glutathiona peroxidase selênio-dependente (Se-GPx).....	78
2.5.4 Determinação da atividade da glutathiona S-transferase (GST).....	79
2.6. Determinação do conteúdo de antioxidante Não - enzimático (Glutathiona reduzida - GSH).....	79
2.7. Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica.....	79

2.8. Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas.....	80
2.9. Determinação de Proteína Total.....	81
2.10. Tratamento estatístico dos dados.....	81
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
3.1. Análise da atividade das enzimas antioxidantes em <i>Brycon amazonicus</i> .....	81
3.2. Análise de Antioxidante Não-Enzimático (Glutathiona reduzida – GSH).....	84
3.3. Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas.....	84
3.4. Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica.....	85
<b>4. DISCUSSÃO.</b>	
4.1 Respostas do sistema de defesa antioxidante de <i>Brycon amazonicus</i> expostos ao extrato liofilizado contendo MC-LR (100 µg/Kg <sup>-1</sup> de massa corpórea).....	85
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
 <b>CAPÍTULO V : EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE BIOMARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM TRAÍRA, <i>Hoplias malabaricus</i> (BLOCH, 1794).</b>	
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>98</b>
2.1 Animais utilizados.....	98
2.2. Delineamento experimental.....	98
2.3. Coleta de Amostras, procedimentos bioquímicos, análise da atividade das enzimas Antioxidantes e tratamento estatístico dos dados.....	98
<b>3. RESULTADOS.....</b>	<b>98</b>
3.1. Análise da atividade das enzimas antioxidantes em <i>Hoplias malabaricus</i> .....	98
3.2. Análise de Antioxidante Não-Enzimático (Glutathiona reduzida – GSH).....	100

3.3. Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas.....	101
3.4. Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica.....	102
<b>4. DISCUSSÃO.</b>	
4.1 Respostas do sistema de defesa antioxidante de <i>Hoplias malabaricus</i> expostos ao extrato liofilizado contendo MC-LR (100 µg/Kg <sup>-1</sup> de massa corpórea).....	102
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>106</b>
 <b>CAPÍTULO VI : CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	108
 <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>110</b>
 <b>ANEXO.....</b>	<b>133</b>



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO GERAL**

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As cianobactérias, conhecidas como algas azuis, são organismos procariontes capazes de realizar fotossíntese, constituindo um grupo autotrófico. Estão distribuídas em diferentes ambientes, nas águas limpas e eutróficas, em fontes termais, e até geleiras (CHORUS & BARTRAM, 1999). Essas algas desenvolvem-se muito bem em ambientes com alta luminosidade, temperatura elevada da água (15-30°C), faixas de pH entre 6 e 9 e abundância de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, formando grandes massas superficiais de coloração verde intensa denominadas florações (REYNOLDS, 1984).

O aparecimento de florações está relacionado ao aumento de nutrientes na água (eutrofização), principalmente devido ao aumento de sais de nitrato e fosfato. A utilização de adubos químicos e estrume, a descarga de esgotos urbanos e efluentes de agroindústrias ou de outros setores industriais, promovem a entrada desses nutrientes e de matéria orgânica em corpos d'água (CORREIA, 2000), culminando na ocorrência dessas florações.

O desenvolvimento de florações na superfície aquática ocorre no mundo todo com uma incidência cada vez mais elevada (FALCONER et al., 1994; DUY et al., 2000), sendo considerado um risco em potencial à saúde devido à natureza tóxica de algumas dessas algas. Em geral, 50-75% das florações de cianobactérias podem produzir toxinas, sendo possível a ocorrência de mais de um tipo de toxina. Entretanto, no Brasil cerca de 82% das cepas de cianobactérias isoladas são toxigênicas (SOARES et al., 2004). Florações tóxicas e não tóxicas de uma espécie podem ser encontradas juntas (SKULBERG et al., 1993; YOO et al., 1995; CODD & BELL., 1996). É recomendável o cuidado especial quando as florações de cianobactérias ocorrem em áreas de reservatório, mananciais, represas, lagos e outros corpos d'água utilizados para consumo humano e/ou de animais, devido ao risco de intoxicação.

No Brasil, já houve alguns casos de intoxicação por cianotoxinas provenientes das florações de algas azuis (cianobactérias). Entre os casos de intoxicação conhecidos, destacam-se o do reservatório de Itaparica no Estado da Bahia, onde ocorreu a morte de 88 pessoas, entre as 200 intoxicadas pelo consumo de água do reservatório, durante os meses de março e abril de 1988, e o mais conhecido, ocorrido em 1996, onde 123 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica de Caruaru, Pernambuco, apresentaram sintomas de hepatotoxicose. Destes, 54 vieram a falecer até 5 meses após o início dos sintomas. A referida clínica, segundo Secretaria da Saúde, recebia água sem um tratamento completo e usualmente era feita uma cloração no próprio caminhão tanque utilizado

para transportar a água, em períodos de falha no abastecimento pela rede pública (AZEVEDO, 1998).

Tendo em vista estes acontecimentos, foi lançada a Portaria nº. 1469, de 29 de dezembro de 2000 pelo Ministério da Saúde, exigindo em todas as Estações de Tratamento e Abastecimento de Água, uma análise mensal da água bruta em casos onde o número de cianobactérias não exceder 10.000 células/mL, e semanal, quando o número de cianobactérias exceder este valor. Acima de 20.000 células/mL, é exigido o controle semanal de toxicidade na água de saída do tratamento e nas entradas (hidrômetros) das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis, sendo que esta análise pode ser dispensada quando não houver comprovação de toxicidade na água bruta.

A importância na análise da água em relação às cianobactérias se dá pela liberação de toxinas na água após a lise celular, prejudicando, assim, a potabilidade da água. Algumas dessas toxinas, identificadas como alcalóides organofosforados neurotóxicos, são de ação rápida, causando a morte por parada respiratória após poucos minutos de exposição. Outras, identificadas como peptídeos ou alcalóides hepatotóxicos, atuam menos rapidamente (CHORUS & BARTRAM, 1999).

### **1.1. Cianotoxinas.**

Atualmente, encontram-se identificados cerca de 150 gêneros de cianobactérias englobando cerca de 2000 espécies, dentre as quais pelo menos 40 são consideradas como produtoras de toxinas – as cianotoxinas (HITZFELD et al., 2000; JAYATISSA et al., 2006). As cianotoxinas são metabólitos secundários naturais que apresentam uma potente atividade, capazes de induzir patologias graves mesmo após curtos períodos de exposição (CHORUS, 2001). As cianobactérias produzem três tipos de toxinas: as dermatotoxinas (irritantes ao contato), as neurotoxinas e as hepatotoxinas.

As hepatotoxinas incluem as microcistinas e a nodularina. São peptídeos cíclicos, que atuam por inibição das fosfatases protéicas PP1 e PP2A (HONKANEN et al., 1990; MACKINTOSH et al., 1990; TOIVOLA & ERIKSSON, 1999; GUZMAN et al., 2003). A sua produção já foi detectada em *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis* (CARMICHAEL, 1996; DUY et al., 2000). Como o nome indica, as hepatotoxinas têm como órgão alvo o fígado. São responsáveis pela destruição da sua estrutura interna, levando, numa situação extrema, à hemorragia intra-hepática, choque hipovolêmico e morte (THEISS et al., 1988; CARMICHAEL, 1994; BRIAND et al., 2003). Os sinais observados após a ingestão dessas

hepatotoxinas são prostração, anorexia, vômitos, dor abdominal e diarreia (CARMICHAEL & SCHWARTZ, 1984; BEASLEY et al., 1989). Após a ingestão oral da toxina, ela chega ao sistema digestivo e é levada ao íleo, passando via sistema porta para o fígado (CARMICHAEL & FALCONER, 1993; NISHIWAKI et al., 1994). A exposição crônica à toxina pela ingestão de água pode aumentar o índice de câncer hepático. (CHORUS & BARTRAM, 1999).

## 1.2. Microcistinas.

As microcistinas (MCs) são as cianotoxinas mais comumente encontradas nas florações de cianobactérias de água doce (CARMICHAEL, 1994; KONDO et al., 2002). O nome microcistina deve-se ao fato de ter sido primeiramente encontrada na espécie *Microcystis aeruginosa*, embora posteriormente tenha sido descoberto que outras espécies também possuem a capacidade de produzir este tipo de toxina (CARMICHAEL et al., 1988). Entretanto, também é sabido que o gênero *Microcystis* é o que apresenta uma distribuição mais generalizada em massas de água eutróficas em diferentes partes do mundo.

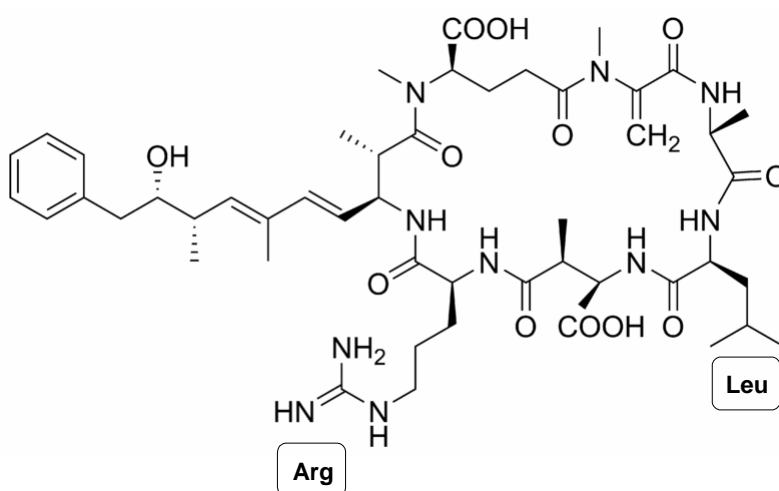
As microcistinas (MCs) são estruturalmente caracterizadas por heptapeptídeos monocíclicos, compostos por uma D-alanina (D-Ala) na posição 1, dois L-aminoácidos variáveis nas posições 2 e 4, ácido glutâmico (D-Glu) na posição 6 e três aminoácidos incomuns: um ácido D-eritro- $\beta$ -metil-aspártico (D-MeAsp) na posição 3, um ácido (2s, 3s, 8s, 9s)-3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenildeca-4,6-dienóico (ADDA) na posição 5 e uma N-metil-deidroalanina (Mdha) na posição 7 (VAN APELDOORN et al., 2007). São compostos estáveis e se mostram resistentes à temperatura, hidrólise química e oxidação.

Apesar de 70 tipos de variantes de MCs já terem sido isolados e documentados, um tipo de MC se destaca pela sua alta toxicidade e ampla distribuição, sendo considerado a mais tóxica e difundida variante de MC conhecida. Essa toxina, conhecida como MC-LR (figura 1), possui uma leucina (L) na posição 2 e uma arginina (R) na posição 4. Além desta MC, destacam-se a MC-RR, e a MC-YR por sua ampla distribuição.

Estas toxinas penetram nos hepatócitos através de um sistema de transporte ativo, conhecido como sistema de transporte multi-específico de ácidos biliares (ERIKSSON *et al*, 1990) envolvendo polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP). As microcistinas atuam na inibição das fosfatases proteicas de serina/treonina, em particular as do tipo 1 e 2A (PP1 e PP2A) (HONKANEN et al., 1990; MACKINTOSH et al., 1990; TOIVOLA & ERIKSSON, 1999; GUZMAN et al.,

2003). A interação da MC-LR com as fosfatases PP1 e PP2A foi descrita como um mecanismo de duas etapas, onde a toxina primeiro se liga a enzima inativando-a e subsequentemente forma adutos covalentes durante o decorrer do tempo de reação (MACKINTOSH et al., 1990; CRAIG et al., 1996).

A inibição destas fosfatases leva a um estado de hiperfosforilação de proteínas reguladoras da dinâmica de formação do citosqueleto, tendo como consequência a desintegração da estrutura dos hepatócitos, a perda da arquitetura hepática e sinusoidal, associada à diminuição do volume intracelular e do contato intercelular, o choque hipovolêmico e morte do indivíduo afetado (CARMICHAEL, 1994). Além da inibição das fosfatases, as microcistinas podem também afetar os sistemas de reparo de DNA e expressão de genes (DOUGLAS et al, 2001; ARIZA et al, 1996), e parecem poder interagir com as mitocôndrias de tecidos animais e causar estresse oxidativo e apoptose celular (PRIETO et al., 2009; ZHANG et al., 2008).



**FIGURA 1.** Estrutura química da MC-LR, com detalhe para as posições da leucina e arginina. Adaptado de Andrade (2007).

### 1.3 Mecanismos gerais da toxicidade da MC-LR.

As microcistinas são potentes inibidoras das proteínas fosfatases serina/treonina específicas, como a PP1 e a PP2A, através de sua ligação no sítio catalítico dessas enzimas (MACKINTOSH et al., 1990; GULLEDGEA et al., 2002). A fosforilação e desfosforilação de proteínas é um processo dinâmico e uma importante via para a regulação das atividades de muitas proteínas nas células. Esse processo é

catalisado pelas quinases e fosfatases. Portanto a inibição dessas enzimas pode ter sérios impactos na homeostase celular.

Dessa maneira, a aguda toxicidade das microcistinas pode ser explicada pelo fato de que a inibição dessas fosfatases (PP1 e PP2A) leva a uma excessiva fosforilação de proteínas e a alterações no citoesqueleto, perda da forma celular com subsequente destruição de células, principalmente as células hepáticas, o que pode causar hemorragia intra-hepática ou insuficiência hepática, com desenvolvimento de necrose no tecido hepático (VAN APELDOORN et al., 2007).

Além da inibição das fosfatases, as microcistinas podem também afetar os sistemas de reparo de DNA e expressão de genes (DOUGLAS et al., 2001; ARIZA et al., 1996), e parece poder interagir com as mitocôndrias de tecidos animais e causar estresse oxidativo e apoptose celular (PRIETO et al., 2009; ZHANG et al., 2008).

Alguns estudos demonstraram que a capacidade de penetração da MC-LR na membrana celular é baixa, indicando que a toxina requer um mecanismo ativo de captação. Fischer et al. (2005) explicaram a hepatotoxicidade da MC-LR através do transporte dessas toxinas mediado por peptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATP), uma superfamília de transportadores de membrana que são expressos principalmente nos hepatócitos. Isso explica porque geralmente o efeito da MC-LR em peixes é visto inicialmente no fígado e posteriormente em outros órgãos como brânquias e rins.

Em mamíferos, existem dois grandes sistemas de transporte de ácidos orgânicos: um sistema sódio-independente e um sistema sódio-dependente (VAN MONTFOORT, 2003). Em contraste, no fígado de peixes como a raia, *Raja erinacea* (BOYER et al., 1993; FRICKER et al., 1987), e a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, (RABERGH et al., 1994), o sistema sódio-dependente está ausente. Particularmente, o sistema de transporte sódio-independente possui um largo espectro de ação. Ele transporta, além de sais biliares, ácidos biliares, esteróides e vários peptídeos lineares e cíclicos, dentre os quais se inclui a MC-LR. Portanto, esse sistema é o provável transportador da MC-LR em peixes. A MC-LR é rapidamente captada no trato gastrintestinal e é transportada até os tecidos via corrente sanguínea (FISCHER et al., 2000).

Como dito anteriormente, os OATPs são um sistema multiespecífico que está expresso em diferentes tipos de células como enterócitos, hepatócitos e células epiteliais renais e em órgãos como coração, pulmões, baço, pâncreas, cérebro e barreira hemato-cefálica (FEURSTEIN et al., 2009), sendo que a distribuição da MC-LR nos tecidos é dependente do grau de perfusão sanguínea e do nível de expressão dos OATPs. Portanto, o primeiro fator limitante para a ação tóxica da MC-LR na célula

é a sua entrada, sendo que uma vez dentro da célula seu modo de ação será muito semelhante.

#### **1.4 Considerações sobre as espécies estudadas.**

Foram utilizados, no presente estudo, exemplares juvenis de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829) (Figura 2) e de traíra, *Hoplias malabaricus* BLOCH, 1794 (Figura 3). Ambas as espécies encontram-se distribuídas em regiões cujos corpos d'água estão sujeitos à contaminação por cianobactérias.

*Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae) é uma espécie migratória nativa das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins (HOWES, 1982). Possui hábito alimentar onívoro, o que lhe confere mais uma vantagem em sua utilização em sistemas de cultivo, pois aceita vários tipos de alimentos como iscas (VAL & HONCZARYK, 1995). Essa espécie possui grande interesse comercial, devido a excelente qualidade da carne, o rápido crescimento, fácil aceitação de rações comerciais e pela grande esportividade na pesca sendo, por isso, é um peixe muito utilizado e procurado em sistemas de cultivo do tipo "pesque e pague" (SCORVO FILHO et al., 1998).

É uma espécie migratória, ou de piracema, e sua reprodução em ambiente natural ocorre no início do período de enchente, entre dezembro e fevereiro. Os lagos de várzea e as florestas alagadas são as áreas de criação das larvas e alevinos desta espécie que completam o seu desenvolvimento aproveitando eficientemente o alimento disponível (frutos, sementes, flores, zooplâncton, restos de peixes e insetos) (PIZANGOPAIMA, 1997; LEITE, 2004). É uma espécie reofílica que prefere águas limpas e bem oxigenadas de igarapés, onde passa boa parte do seu ciclo de vida crescendo e desenvolvendo suas gônadas, para depois descer até o encontro das águas dos rios Solimões e Negro para desovar (ZANIBONI FILHO, 1985; VILLACORTA CORREA, 1987).

Segundo BRITSKI (1972), o matrinxã ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Sub-classe: ACTINOPTERYGI

Superordem: OSTARIOPHYSI

Ordem: CHARACIFORMES

Família: CHARACIDAE

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)



**Figura 2:** *Brycon amazonicus* (SPIX & AGASSIZ, 1829)

A traíra, *Hoplias malabaricus*, (Figura 3) é uma espécie tipicamente neotropical, encontrada em ambientes lóticos, e principalmente lênticos, dos sistemas hidrográficos da América do Sul (FOWLER, 1950). No Brasil, a espécie ocorre nas bacias do Amazonas, São Francisco, Paraíba, Paranaíba, Doce, Paraná (incluindo o Rio Mogi-Guaçu) e nos grandes e pequenos açudes do Nordeste (LEITÃO, 1947; PAIVA, 1972; GODOY, 1975). A espécie chega a atingir 40 cm de comprimento e no estágio adulto possui hábitos sedentários, apresentando preferência por ambientes lênticos (BARBIERI et al., 1994), especialmente em corpos d'água com pequenas profundidades e com vegetação abundante (PAIVA, 1972). Na fase larval esta espécie é planctófaga e na fase de alevino é um insetívoro voraz (AZEVEDO & GOMES, 1943). Entretanto, no estágio adulto, sua dieta é composta exclusiva ou predominantemente por pequenos peixes. É considerado um predador crepuscular-noturno, que se alimenta através da predação de emboscada (PAIVA, 1972). Geralmente fica à espreita de presas como peixes, sapos e insetos, sendo mais ativa durante a noite. É facilmente utilizado como fonte alimentar por aves piscívoras e também por mamíferos, incluindo o homem (BARROS et al., 2007).



*H. malabaricus* é capaz de resistir a altas temperaturas, baixa disponibilidade de oxigênio e longos períodos de jejum (RIOS, 2001; RIOS et al., 2002). A espécie apresenta baixo metabolismo aeróbico, ampla ventilação branquial, alta afinidade hemoglobina-oxigênio, alta capacidade anaeróbica e extensa área de superfície respiratória (DRIEDZIC et al., 1978; KALININ et al., 1993; RANTIN et al., 1993; FERNANDES et al., 1995)



**Figura 3:** *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)

Segundo BRITSKI (1972), a traíra ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Sub-classe: ACTINOPTERYGI

Superordem: OSTARIOPHYSI

Ordem: CHARACIFORMES

Família: ERYTHRINIDAE

Gênero: *Hoplias*

Espécie: *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)

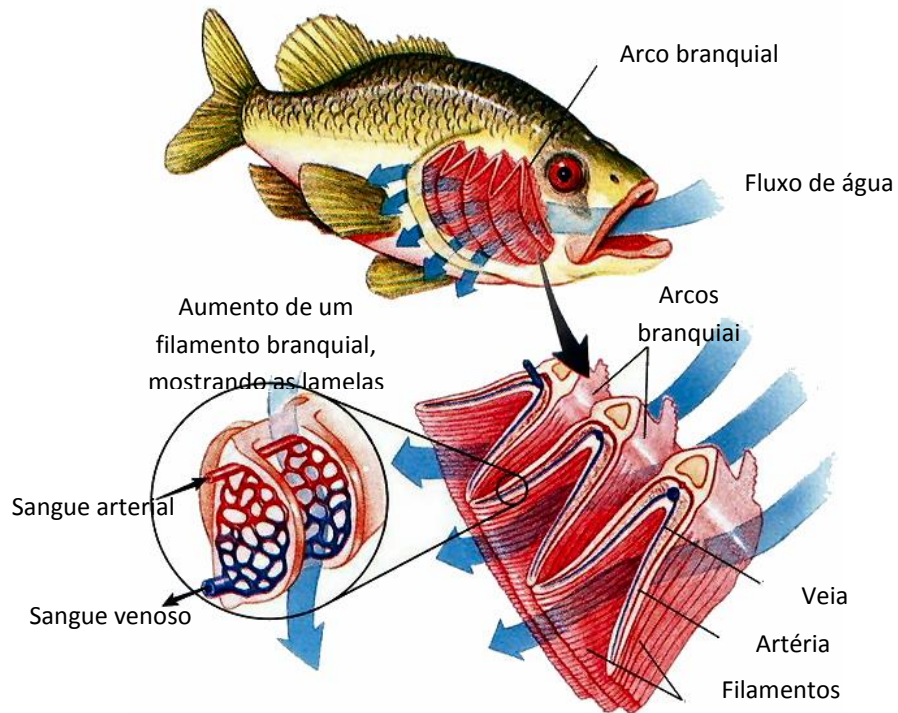
### 1.5. Função Cardio-Respiratória de Peixes

A grande maioria das espécies de peixes apresenta respiração do tipo branquial. As brânquias consistem geralmente de quatro arcos branquiais que estendem em duas fileiras de filamentos branquiais, os quais possuem várias lamelas secundárias, estruturas achatadas e densamente enfileiradas onde ocorrem as trocas gasosas. À medida que a água flui entre essas lamelas em uma direção, o fluxo sanguíneo flui em direção oposta, fluxo este denominado contracorrente. As brânquias são ventiladas com um fluxo unidirecional de água, garantido pelo bombeamento ativo por meio do trabalho da musculatura esquelética nas cavidades bucal e operculares

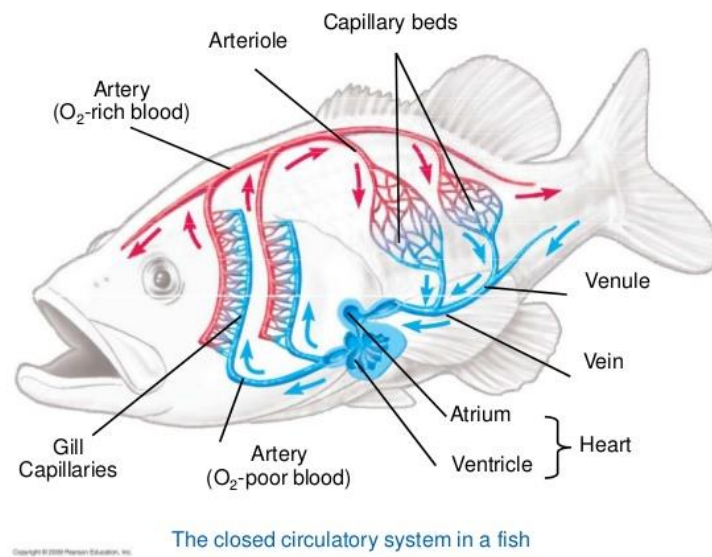
(figura 4).

De acordo com Hughes (1973), a tensão de  $O_2$  decresce gradativamente desde o momento em que é captado pelas brânquias até sua utilização na célula, evento chamado “cascata de oxigênio”. As principais barreiras à difusão são as membranas branquiais, a circulação sanguínea e as membranas celulares dos tecidos que receberão o  $O_2$  (GALIS & BAREL, 1980; FERNANDES & RANTIN, 1989; 1994). Qualquer aumento na resistência à difusão do  $O_2$  em um desses pontos pode causar um efeito hipóxico. Assim, qualquer substância que possa causar hipóxia ambiental pode reduzir a quantidade de  $O_2$  disponível às mitocôndrias e, conseqüentemente, comprometer os processos aeróbicos (ANELLI-JR, 2010).

O coração dos peixes teleósteos é formado por quatro câmaras em série: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso. O seio venoso recebe o sangue venoso da circulação. A quantidade de fibras musculares é variável, podendo aparecer como uma fina camada em algumas espécies, fibras esparsas na maioria das espécies ou estarem completamente ausentes. O átrio é um amplo saco muscular de parede fina, capaz de gerar pressão suficiente apenas para encher o ventrículo, que possui parede muscular grossa. O ventrículo é a principal câmara geradora de pressão do coração e compreende 58-85% de seu peso. A quarta câmara, o bulbo arterioso, é elástica devido à presença de elementos elásticos e músculo liso em sua parede. O sangue venoso, vindo da circulação sistêmica, passa por tais câmaras e é direcionado, via aorta ventral, para as brânquias onde ocorre a oxigenação (SATCHELL, 1981), como mostrado na figura 5.



**FIGURA 4.** Esquema do sistema respiratório de peixes teleósteos. (adaptada de CAMPBELL et al., 2008).



**FIGURA 5.** Diagrama representativo do sistema circulatório de um peixe teleósteo (Adaptado de MILLER-HARLEY, 2002).

## 2. JUSTIFICATIVA

O aparecimento de florações de cianobactérias em corpos d'água ocorre no mundo todo com uma incidência cada vez mais elevada (FALCONER et al., 1994). No Brasil, devido à eutrofização de ambientes aquáticos, essas florações de cianobactérias tornam-se cada vez mais frequentes. Estados como São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Pernambuco, Alagoas, Pará e Rio de Janeiro já apresentaram ocorrências de florações de cianobactérias, sendo que boa parte desses casos foram relatados em locais utilizados para o abastecimento público, como represas e mananciais. (LAGOS et al., 1999; CONTE et al., 2000; YUNES et al., 2003, VIEIRA et al., 2005). Intoxicações de populações humanas pelo consumo oral de água contaminada por cepas tóxicas de cianobactérias já foram descritas em países como Austrália, Inglaterra, China, África do Sul e Brasil (FALCONER et al., 1994). No Brasil, destacam-se o do reservatório de Itaparica no Estado da Bahia, onde ocorreu a morte de 88 pessoas, entre as 200 intoxicadas pelo consumo de água do reservatório, durante os meses de março e abril de 1988, e o mais conhecido, ocorrido em 1996, onde 123 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise em uma clínica de Caruaru, Pernambuco, apresentaram sintomas de hepatotoxicose. Destes, 54 vieram a falecer até 5 meses após o início dos sintomas (AZEVEDO, 1998).

Anualmente, toxinas de cianobactérias estão associadas a episódios de intoxicação de pássaros, peixes, animais selvagens, animais de criação e animais de estimação (KAMOGAE & HIROOKA, 2000).

Diversos estudos em peixes teleósteos têm demonstrado os efeitos da microcistina-LR e suas variantes sobre órgãos como fígado, brânquias, rins, coração entre outros. Prieto et al. (2006) descreveram aumentos significativos na atividade do sistema antioxidante e lipoperoxidação em brânquias, fígado e rins de *O. niloticus*, durante a exposição à MC-LR injetada intraperitonealmente. Carbis et al. (1997) verificaram necrose em células de brânquias de *Cyprinus carpio* expostas a florações de cianobactérias produtoras de microcistina e Atencio et al. (2008a), além de danos a órgãos como fígado e rins, verificaram a ocorrência de histopatologias nos miócitos cardíacos de *O. niloticus* expostos à injeções intraperitoneais de MC-LR. Entretanto, ainda é muito escasso o conhecimento sobre os efeitos dessa cianotoxina em peixes teleósteos nativos das bacias brasileiras. Ademais, até agora nenhum trabalho se propôs a avaliar as respostas cardiorrespiratórias (*in vivo*) e biomarcadores do estresse oxidativo (*in vitro*) em peixes Neotropicais expostos às microcistinas.

Martins et al. (2011) verificaram que injeções intraperitoneais de microcistina-LR reduzem a capacidade de sobrevivência de tilápias-do-nylo sujeitas à hipóxia ambiental devido aos seguintes efeitos: redução significativa da taxa metabólica e da extração de  $O_2$  da corrente ventilatória; aumento da tensão crítica de  $O_2$  (na qual o animal perde a capacidade de regular a tomada de  $O_2$  do meio e passa a se comportar como um oxiconformista); redução da capacidade de aumentar os parâmetros ventilatórios e redução acentuada da frequência cardíaca. Zhang et al. (2011) relacionaram a presença das microcistinas na água com a hipóxia ambiental decorrente da eutrofização causada pelas florações de cianobactérias.

À luz de tudo o que foi exposto, o presente projeto visa investigar o efeito dessa toxina sobre a função cardiorrespiratória *in vivo* e sobre os biomarcadores do estresse oxidativo *in vitro* de duas espécies de peixes Neotropicais, de ocorrência natural em bacias brasileiras: a traíra, *Hoplias malabaricus*, e o matrinxã, *Brycon amazonicus*.

Compreender melhor os processos fisiológicos inerentes aos peixes nativos de nossas bacias é de suma importância para o monitoramento e proteção desses animais e de seu ecossistema, bem como para um melhor desenvolvimento de atividades comerciais como a piscicultura.

### 3. OBJETIVOS

Sabendo-se que as microcistinas são as cianotoxinas mais comumente encontradas nas florações de cianobactérias de água doce, e que a intoxicação de animais aquáticos pela ação dessas toxinas vem aumentando drasticamente, o objetivo deste estudo foi avaliar as respostas cardiorrespiratórias de exemplares de *Brycon amazonicus* (matrinxã) e *Hoplias malabaricus* (traíra) expostos à cianotoxinas (microcistina-LR).

Os parâmetros descritos em 1, 2 e 3 foram avaliados em grupos controle e expostos às cianotoxinas (microcistina-LR) em condições de normóxia e durante reduções graduais na concentração de  $O_2$  do meio, sendo que os biomarcadores do estresse oxidativo descritos no item 4 foram avaliados nos mesmos grupos (Controle e exposto à MC-LR), porém sem o desenvolvimento da hipóxia gradual:

1. Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e a tensão crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ), determinadas por meio de respirometria de fluxo constante;

2. Parâmetros ventilatórios (ventilação branquial –  $\dot{V}_G$ ; frequência respiratória -  $f_R$ ; volume ventilatório –  $V_T$ ; extração de  $O_2$  da corrente ventilatória –  $EO_2$ ; necessidade ventilatória –  $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ), determinados por meio de respirometria de fluxo constante;
3. Frequência cardíaca *in vivo* ( $f_H$ ), determinada por meio de eletrocardiografia padrão.
4. Biomarcadores do estresse oxidativo no fígado e brônquias: antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT, glutathione peroxidase - GPx, glutathione S-transferase – GST); antioxidantes não-enzimáticos (glutathione reduzida – GSH); peroxidação lipídica (níveis de cumeno hidroperóxido - CHP) e oxidação proteica (níveis de proteína carbonilada);.

## **CAPÍTULO II**

**EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE PARÂMETROS  
CARDIORRESPIRATÓRIOS DE MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*  
(SPIX & AGASSIZ, 1829).**

## 1. INTRODUÇÃO

A eutrofização dos reservatórios naturais de água doce é um processo que vem ocorrendo de maneira crescente desde o final do século passado, e se intensificando cada vez mais em decorrência do crescente aumento da população humana e a consequente intensificação das atividades agrícolas e industriais. Dados coletados entre os anos de 1988 e 1993 já indicavam uma porcentagem de 53% dos lagos europeus em estado eutrófico (BARTRAM et al., 1999). No Brasil diversos estudos têm demonstrado o aumento da eutrofização dos corpos d'água, levando ao desgaste dos recursos hídricos trazendo consequências ao abastecimento (TOLEDO Jr. et al., 1983; LAMPARELLI, 2004; GOMES et al., 2010; ALVES et al., 2012; SILVA et al., 2010).

Esse aumento da eutrofização está relacionado com o crescimento massivo de cianobactérias nos corpos d'água em um fenômeno conhecido como floração de cianobactérias (MANKIEWICZ et al., 2001). Em decorrência do ritmo acelerado e sem perspectiva de melhora, o aparecimento dessas florações de cianobactérias provavelmente irá acabar ocorrendo em todos os países do mundo em um futuro próximo (SIVONEN & JONES, 1999). O desenvolvimento de florescências de cianobactérias pode trazer diversas consequências problemáticas como, alteração da transparência da água; surgimento de espuma, depleção da concentração de oxigênio dissolvido (hipóxia) e a ocorrência de cianotoxinas como a microcistina (CARMICHAEL, 1996; CODD, 2000). Alguns estudos já relacionaram o aparecimento das microcistinas na água com a hipóxia ambiental causada pelas florações de cianobactérias decorrentes da eutrofização (ZHANG et al., 2011). Esses autores ainda apontam para um efeito combinado da hipóxia e microcistinas no desenvolvimento de toxicidade celular com alterações que levam ao estresse oxidativo. Sendo assim, as microcistinas e a hipóxia ambiental coexistem, sendo desafios complementares, os quais devem ser enfrentados pelos organismos aquáticos. A superação de tais desafios requer a ação de mecanismos homeostáticos e adaptativos altamente especializados que possibilitem uma maximização na utilização do O<sub>2</sub> disponível nessas condições adversas.

A espécie estudada, *Brycon amazonicus*, encontra-se distribuída nas bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins, além de estar amplamente distribuída nas principais bacias hidrográficas brasileiras, onde a presença desses fatores (microcistina e hipóxia) já foi documentada (LAGOS et al., 1999; CONTE et al., 2000; YUNES et al., 2003, VIEIRA et al., 2005). Devido a pouca literatura relacionando as microcistinas às respostas cardiorrespiratórias de peixes, a ocorrência de relatos de efeitos das MCs



em diferentes órgãos como brânquias e coração (CARBIS et al., 1997; BEST et al., 2001) elicit dúvidas sobre seus possíveis efeitos sobre as respostas fisiológicas em animais vivos. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é analisar os efeitos da injeção intraperitoneal de extrato liofilizado contendo MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea durante 48 horas nas variáveis respiratórias (taxa metabólica; tensão crítica de  $\text{O}_2$ ; ventilação branquial; necessidade ventilatória; extração de  $\text{O}_2$ ; frequência respiratória; volume ventilatório e ventilação total) e na frequência cardíaca de matrinxã, *B. amazonicus*, tanto em normóxia (tensão de  $\text{O}_2$  de 140 mmHg) quanto em hipóxia gradual (tensões de  $\text{O}_2$  de 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais utilizados

Exemplares juvenis e de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, foram adquiridos na piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, SP. Após a coleta, os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde foram mantidos em tanques com capacidade de 1000 L, dotados de recirculação de água aerada e termostatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), por um período mínimo de 30 dias para aclimatação às condições laboratoriais. Durante esse período foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada com conteúdo proteico de 24%.

### 2.2. Delineamento experimental

Após o período de aclimatação, os exemplares de *Brycon amazonicus* foram pesados ( $W_T = 210,0 \pm 42,1$  g) divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: o grupo controle (Controle,  $n = 12$ ) e o grupo exposto à toxina (Mcis  $n = 12$ ). Os peixes do grupo Mcis receberam uma injeção intraperitoneal (0,5 mL de salina 0,9%) do extrato liofilizado da cepa RST9501 de *M.aeruginosa*, contendo a toxina MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea. Após a injeção esperou-se durante um período de 48h até serem realizadas as medidas dos parâmetros respiratórios e cardíacos. O extrato liofilizado da cepa RST9501 de *M.aeruginosa* foi cedido pelo Profº Dr João Sarkis Yunes do Laboratório de Oceanografia Química, Física e Geológica da FURG/RS.

A concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea foi baseada no trabalho de Martins et al. (2011), que estudaram o efeito de injeções intraperitoneais de MC-LR sobre as respostas cardiorrespiratórias de tilápia-do-Nilo durante a hipóxia gradual. De acordo com estes autores, esta dose ( $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ), quando injetada intraperitonealmente, foi suficiente para produzir efeitos tóxicos agudos em tilápia-do-Nilo.

O grupo controle (Ctrl) recebeu o mesmo tratamento, porém só foi inoculado com 0,5 mL de salina 0,9%.

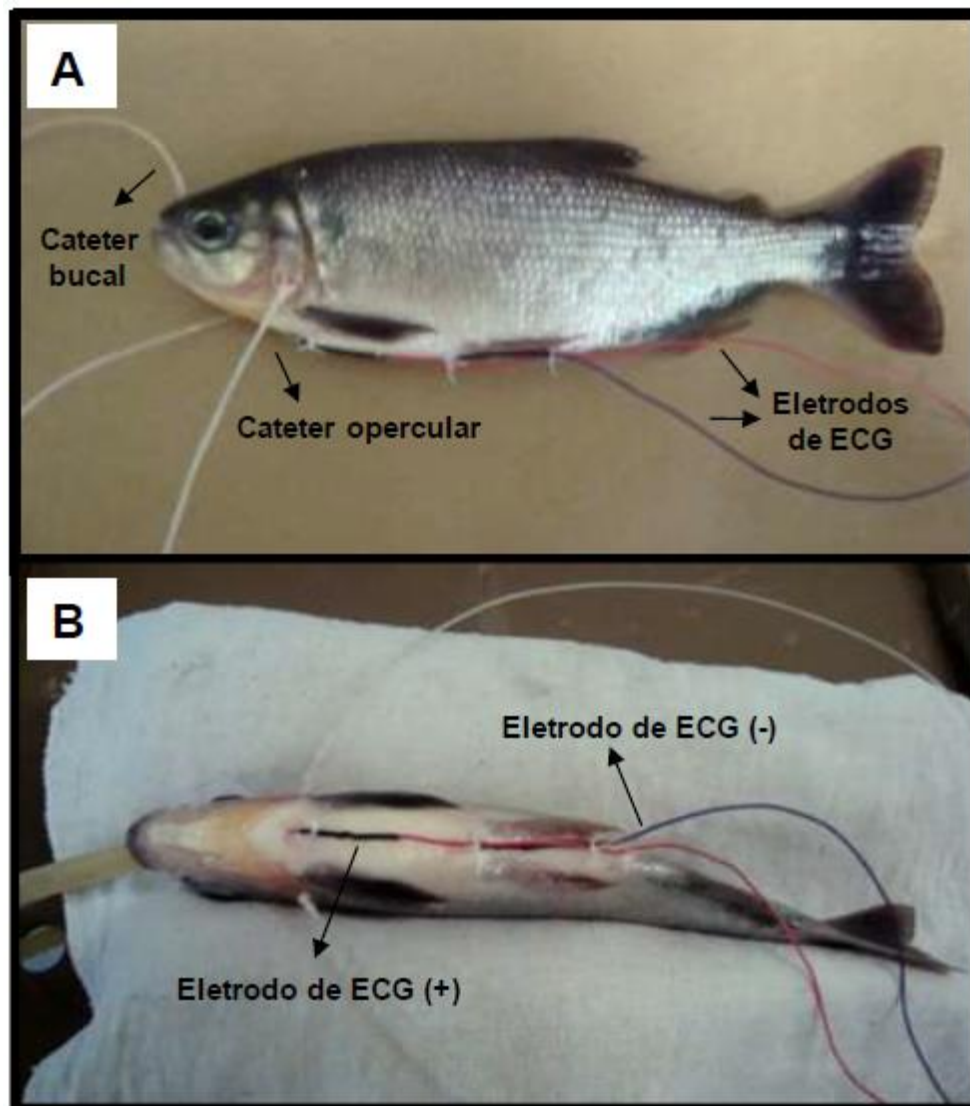
### 2.3. Procedimentos experimentais

As preparações empregadas para a obtenção dos parâmetros respiratórios e dos eletrocardiogramas (ECG) para análise da frequência cardíaca ( $f_H$ ) foram

baseadas na metodologia utilizada por Glass et al. (1991) e adaptada por Rantin et al. (1993).

As cirurgias foram precedidas de anestesia em um banho em benzocaína 0,01% (1 g de benzocaína diluída em 10 litros de água) por aproximadamente 5 minutos (ou até a cessação da atividade espontânea). Imediatamente após a anestesia, os animais foram transferidos para uma mesa cirúrgica onde se procedeu a implantação dos catéteres de polietileno para o monitoramento das tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada e expirada e a sutura de eletrodos de eletrocardiografia para o registro da atividade cardíaca.

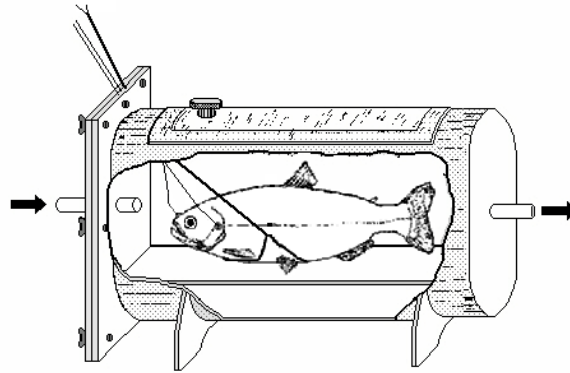
As tensões de O<sub>2</sub> da água inspirada (P<sub>i</sub>O<sub>2</sub> - mmHg) e expirada (P<sub>e</sub>O<sub>2</sub> - mmHg) e a frequência respiratória ( $f_R$  – inspirações.min<sup>-1</sup>) foram obtidas pela inserção de catéteres de polietileno (PE 60) no interior da cavidade bucal através de orifício aberto dorsalmente, próximo a boca, com o auxílio de uma broca e nas partes distais de ambos os cleitros operculares (figura 1).



**Figura 1** - Fotos mostrando em **A**: a posição de inserção dos cateteres de polietileno da boca e dos opérculos e, em **B**: os eletrodos de ECG positivo e negativo em matrinxã, *Brycon amazonicus*. (Adaptado de MONTEIRO, 2011).

Após a preparação acima descrita, os peixes foram introduzidos no respirômetro de fluxo constante (figura 2) e imediatamente transferidos para a câmara experimental, mantida em condições normóxicas, a  $25 \pm 1$  °C, onde permaneceram por um período de 24 horas para a recuperação da anestesia e restabelecimento das condições metabólicas basais (figura 3).

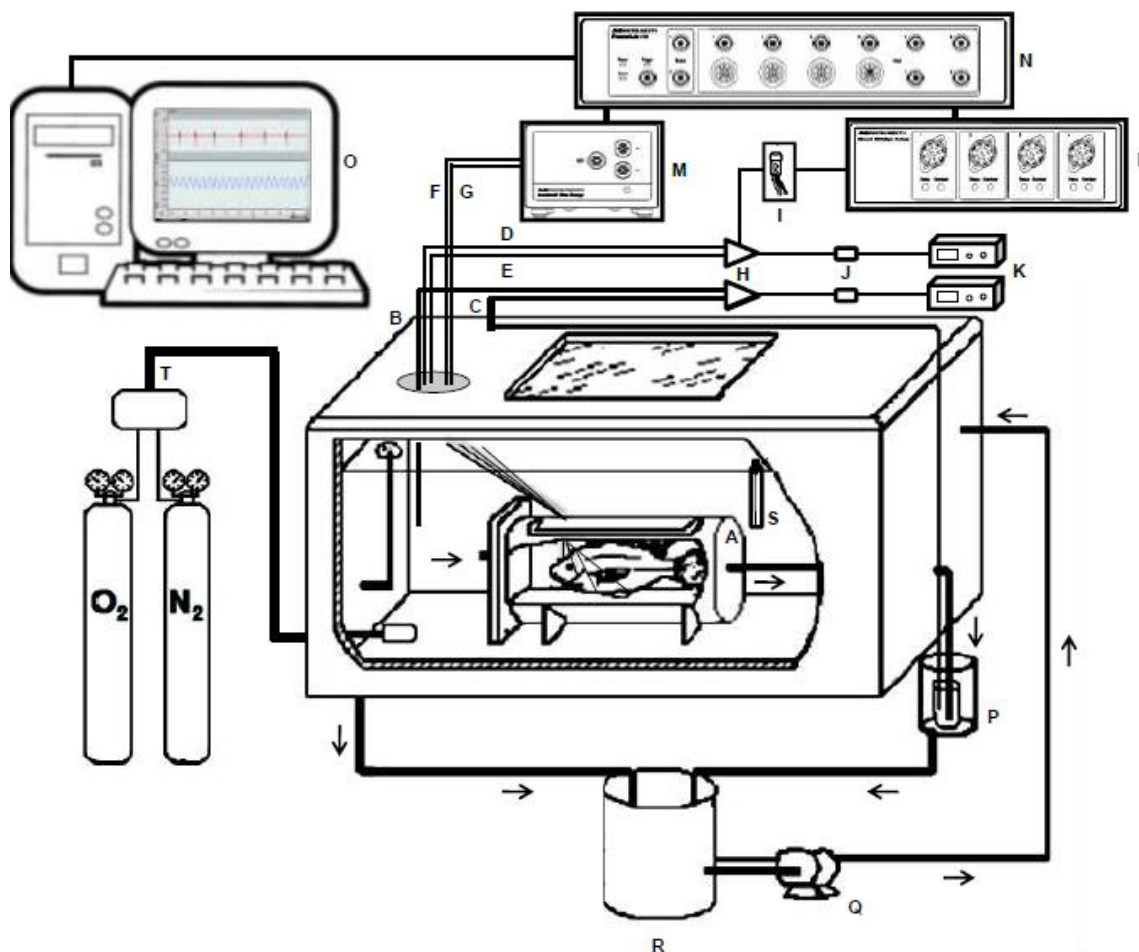
Os experimentos foram conduzidos utilizando-se um animal de cada vez e, após o período de recuperação, as medidas e registros dos parâmetros acima citados, foram realizados a intervalos de 1 hora, por um período de 5 horas.



**FIGURA 2.** Esquema do respirômetro de fluxo constante. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro (adaptada de OLLE, 2007).

As tensões de  $O_2$  (mmHg) da água de entrada ( $P_{in}O_2$ ) e de saída ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, bem como das tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ) pelos peixes foram continuamente monitoradas conectando-se os catéteres de polietileno a um sistema de torneiras de 3 vias acopladas a eletrodos de analisadores de  $O_2$ .

Para analisar a resposta do animal frente à hipóxia, a temperatura experimental foi mantida constante ( $25 \pm 1,0$  °C) por meio de um termostato localizado no interior da câmara experimental e os experimentos foram conduzidos em normóxia ( $P_{in}O_2 = 140$  mmHg) e nas seguintes tensões de  $O_2$  hipóxicas: 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg, obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de  $N_2$  e ar comprimido no interior da câmara experimental.



**Figura 3** - Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardiorrespiratórias de *Brycon amazonicus*. **A**: respirômetro; **B**, **C**: cateteres de polietileno para tomada da água que entra ( $P_{in}O_2$ ) e que sai ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, respectivamente; **D**, **E**: cateteres de polietileno para tomada da água inspirada ( $PiO_2$ ) e expirada ( $PeO_2$ ), respectivamente; **F**, **G**: eletrodos cardíacos positivo e negativo; **H**: torneiras de 3 vias; **I**: transdutor de pressão MLT0380/D; **J**:cuvetas termostalizadas com eletrodos de  $O_2$  FAC-001; **K**: analisadores de  $O_2$  FAC-204A; **L**:amplificador de pressão ML224; **M**: amplificador de ECG ML136; **N**: sistema de aquisição de dados Powerlab 8/30; **O**: computador para o registro de dados; **P**: frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; **Q**: bomba para circulação de água; **R**: balde para circulação de água; **S**: termostato para manutenção da temperatura; **T**: entrada de quantidades controladas de  $N_2$  ou ar comprimido. As setas indicam a direção do fluxo de água no sistema. (adaptado de MONTEIRO, 2011).

Após a estabilização, cada tensão de  $O_2$  foi mantida por um período mínimo de 30 minutos antes de serem efetuadas as medidas e registros dos parâmetros acima citados. Os procedimentos de tomada de medidas e registros foram efetuados, em média, dentro de 5 minutos.

## 2.4. Variáveis ventilatórias e frequência cardíaca.

A taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais foi determinada utilizando-se o sistema de respirometria de fluxo constante, pelo monitoramento das tensões de  $O_2$  da água de entrada ( $P_{in}O_2$ ) e de saída ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro. A  $\dot{V}O_2$  foi calculada por meio da equação proposta por Hughes et al. (1983):

$$\dot{V}O_2 = [(P_{in}O_2 - P_{out}O_2) \cdot \alpha O_2 \cdot \dot{V}_R] / Wt \quad , \text{ onde:}$$

$\alpha O_2$  = coeficiente de solubilidade do  $O_2$  na água ( $mLO_2 \cdot L^{-1} \cdot mmHg^{-1}$ );

$\dot{V}_R$  = fluxo de água através do respirômetro ( $L \cdot h^{-1}$ );

Wt = massa do animal (Kg). Os valores de  $\dot{V}O_2$  assim obtidos foram expressos em  $mLO_2 \cdot Kg^{-1} \cdot h^{-1}$ .

Para a determinação da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) foi empregado o método descrito por Saunders (1962). Tal método, envolvendo respirometria de fluxo constante, consiste na tomada de amostras da água de entrada ( $P_{in}O_2$ ) e de saída ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, bem como da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ) pelos peixes. A  $\dot{V}_G$  foi calculada de acordo com Kalinin et al. (1996), por meio da expressão:

$$\dot{V}_G = [(P_{in}O_2 - P_{out}O_2 / P_iO_2 - P_eO_2) \cdot \dot{V}_R] / Wt \quad , \text{ onde:}$$

$\dot{V}_R$  = fluxo de água através do respirômetro ( $mL \cdot min^{-1}$ ),

Wt = massa do animal (Kg).

Os valores finais de  $\dot{V}_G$  foram expressos em  $mLH_2O \cdot Kg^{-1} \cdot min^{-1}$ .

Para as medidas de frequência respiratória ( $f_R$ ), os catéteres de polietileno inseridos na boca e opérculos do peixe foram conectados a transdutores de pressão que enviam o sinal para um sistema computadorizado de aquisição de dados (ADInstruments - PowerLab) (figuras 3 e 5). A  $f_R$  foi obtida por meio da contagem do número de ciclos respiratórios por unidade de tempo em cada tensão experimental e seus valores, expressos em ciclos respiratórios  $\cdot min^{-1}$ .

O volume ventilatório, ou volume corrente ( $V_T$ ) foi calculado pelo quociente entre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e a respectiva frequência respiratória. O  $V_T$  foi expresso em  $mLH_2O \cdot kg^{-1} \cdot ciclo \text{ respiratório}^{-1}$ .

A extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) pelas brânquias foi calculada a partir da equação:

$$EO_2 = [(P_iO_2 - P_eO_2) / P_iO_2] \cdot 100$$

Dessa forma, a  $EO_2$  foi expressa em porcentagem (%).

A necessidade ventilatória, ou “water convection requirement” (requerimento branquial de convecção de água -  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ), em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais foi calculada pelo quociente entre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) e o respectivo valor da taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ). Os valores finais de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  foram expressos em  $mlH_2O \cdot mlO_2^{-1}$ .

Para a obtenção do ECG e análise da frequência cardíaca ( $f_H$ ), foram inseridos dois eletrodos de aço inoxidável: o positivo, posicionado ventralmente entre as brânquias e o coração; e o negativo, em posição ventro-caudal próximo às nadadeiras pélvicas, ambos suturados com pontos cirúrgicos à musculatura corpórea para evitar seu deslocamento (figura 1). Um terceiro eletrodo, de referência, foi colocado na água da câmara experimental (figura 3). Os eletrodos foram conectados ao bio-amplificador que envia o sinal para um sistema computadorizado de aquisição de dados (ADInstruments - PowerLab). Esta preparação permite que sejam obtidos registros similares àqueles observados na derivação DI da eletrocardiografia padrão. Após o período de recuperação, a  $f_H$  foi registrada, como descrito para os parâmetros respiratórios.

## 2.5. Tratamento estatístico dos dados

Os valores estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. Foram consideradas diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância. Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados no presente estudo.

Para as variáveis  $\dot{V}O_2$ ,  $EO_2$ ,  $f_R$  e  $f_H$  foram utilizadas equações de estimação generalizada, através do método da Quase-Verossimilhança.

Para as variáveis  $\dot{V}_G$ ,  $V_T$  e  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ , foram utilizados modelos lineares generalizados com distribuição Gama.

Foi utilizada uma estrutura de correlação constante estimada a partir dos dados. Dessa forma foi gerada uma unidade de medida (U) que foi utilizada para designar as diferenças significativas entre os valores analisados.

Para a realização dos testes estatísticos acima mencionados foi utilizado o software R (Software R versão 3.0.1).

Todo o tratamento estatístico dos dados do presente estudo foi realizado pela estudante do curso de estatística da UFSCar Camila Barbosa Moraes Rodrigues,



como seu projeto de conclusão de curso sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra Maria Silvia de Assis Moura.

Para o relatório completo sobre os procedimentos estatísticos adotados, bem como todos os comandos utilizados no software R, vide anexo.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Respostas cardiorrespiratórias de *Brycon amazonicus* à hipóxia gradual.

##### 3.1.1. Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).

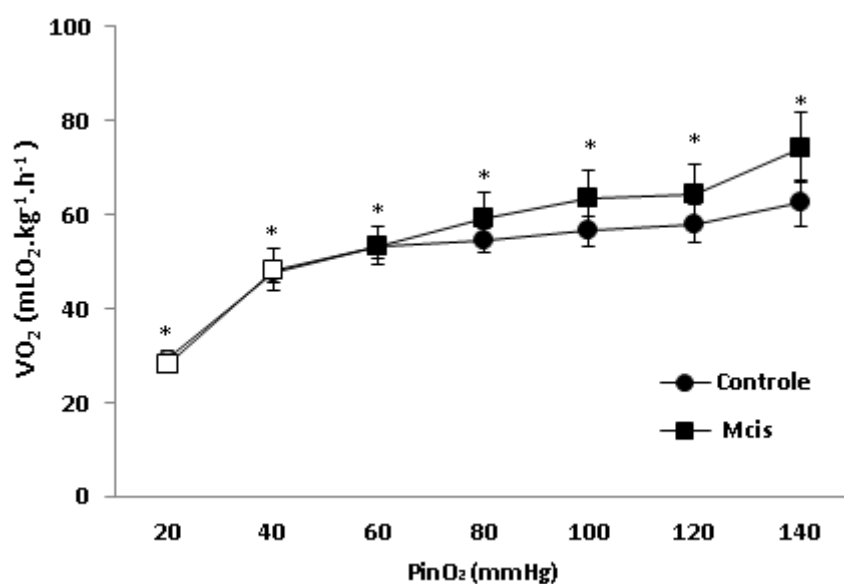
Durante o decorrer dos experimentos 4 animais do grupo Mcis morreram, todos durante a tensão de 20 mmHg de  $O_2$ . Observou-se que abaixo da tensão de 40 mmHg alguns espécimes de *Brycon amazonicus* de ambos os grupos passaram a se comportar de maneira anormal, apresentando muita inquietação e movimentação dentro do respirômetro, por vezes inviabilizando os registros do experimento. Diante dessa constatação, os dados coletados na tensão de  $O_2$  abaixo de 40 mmHg (20 mmHg) estão representados no gráfico da variável  $\dot{V}O_2$  e foram utilizados apenas para o cálculo da  $P_cO_2$ , pois sem estes valores esse cálculo não seria possível. Para os demais parâmetros como ventilação branquial, frequência respiratória, frequência cardíaca entre outros, foram considerados os valores compreendidos entre 140 mmHg e 40 mmHg. Nenhum animal do grupo controle morreu durante a realização dos experimentos.

O consumo de  $O_2$  ou taxa metabólica ( $\dot{V}O_2 - mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$ ) foi mensurado durante hipóxia gradual e sua representação gráfica para ambos os grupos pode ser vista nas figuras (4 a 6).

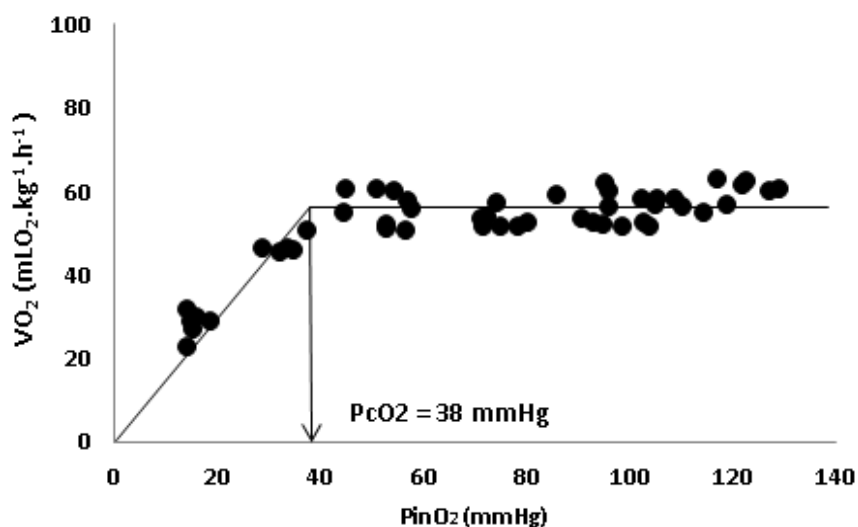
De acordo com a análise estatística empregada, a redução na pressão parcial de oxigênio (hipóxia gradual) só teve influência nos valores da taxa metabólica a partir da tensão de 40 mmHg. Dessa maneira, a  $\dot{V}O_2$  nas  $P_{in}O_2$  compreendidas entre 140 e 40 mmHg, apresentou valor médio de  $55,4 \pm 3,2 mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$  para o grupo Controle e  $60,5 \pm 5,6 mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$  para o grupo Mcis. A redução da tensão de 40 para 20 mmHg diminuiu de maneira significativa a taxa metabólica dos grupos experimentais, chegando aos seus valores mínimos ( $29,2 \pm 1,7$  e  $28,2 \pm 1,4 mL O_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$  respectivamente). Comparativamente, observou-se que no grupo Mcis os valores de

$\dot{V}O_2$  foram significativamente maiores (5,07 U) em relação ao grupo Controle, independente da tensão de  $O_2$  à qual o animal estava exposto.

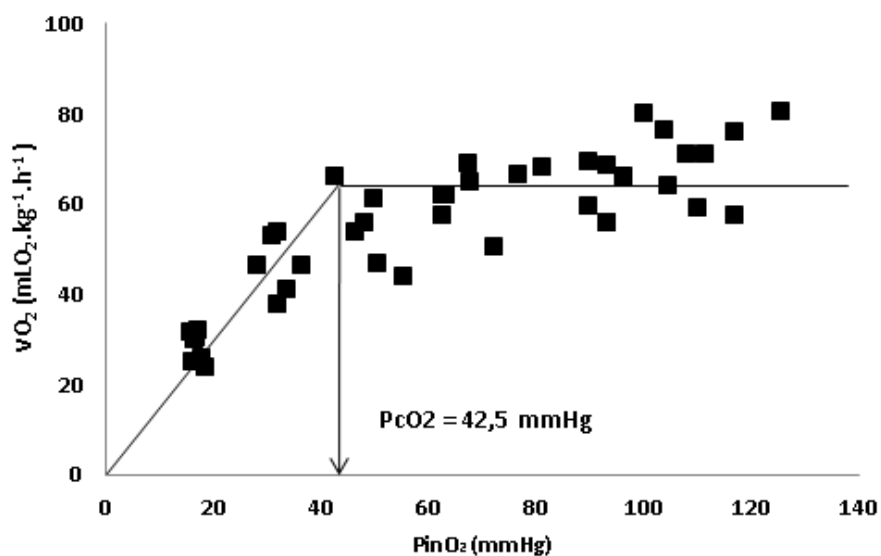
A tensão crítica de  $O_2$  ( $P_{cO_2}$ ) determina a tensão de  $O_2$  abaixo da qual o peixe não consegue mais regular eficientemente seus mecanismos de compensação à hipóxia e, dessa maneira manter seu consumo de  $O_2$  constante. Esse parâmetro foi calculado pela intersecção das retas de regressão obtida pelo método descrito por Rantin et al. (1992), a  $P_{cO_2}$  calculada para o grupo controle foi de 38 mmHg (Fig 5), e para o grupo Mcis foi de 42,5 mmHg (Fig 6) caracterizando um aumento de aproximadamente 12 % nesse parâmetro.



**FIGURA 4.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mL  $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ ) dos grupos Controle (n = 12) e exposto à microcistina, Mcis (n = 12) de *Brycon. amazonicus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 5** .Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ ) do grupo controle (n = 12) de *Brycon amazonicus*. A seta representa a  $P_{c}O_2$ .

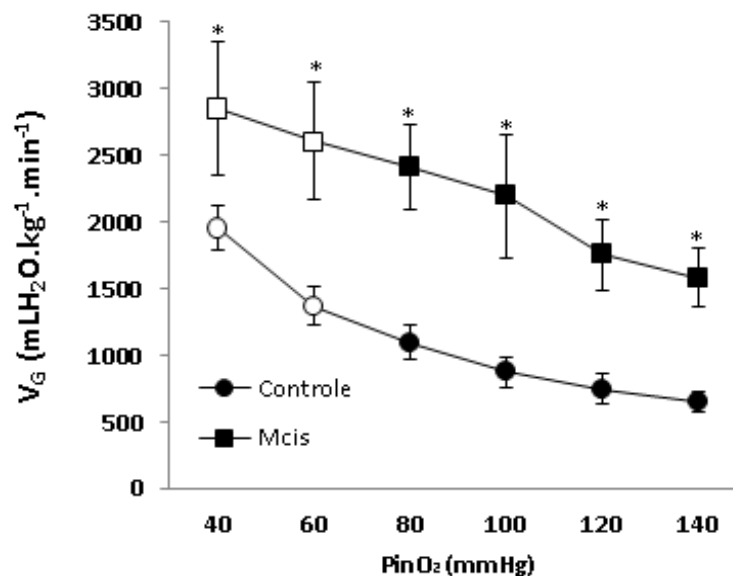


**FIGURA 6**. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mL $O_2$ .kg $^{-1}$ .h $^{-1}$ ) do grupo exposto à microcistina (n = 12) de *Brycon amazonicus*. A seta representa a  $P_{c}O_2$

### 3.1.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ ).

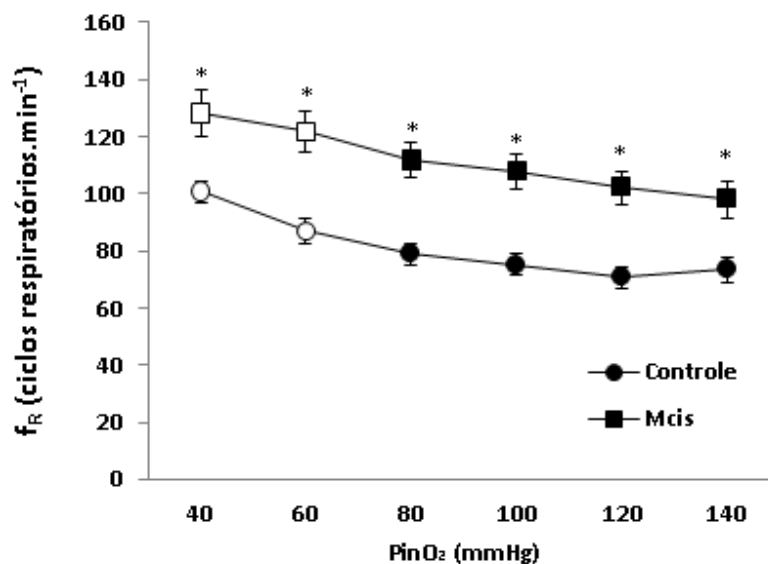
Os valores médios da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  – mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), da frequência respiratória ( $f_R$ – ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup>) e do volume ventilatório, ( $V_T$ – mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.ciclo respiratório<sup>-1</sup>) dos exemplares de *B. amazonicus* do grupo Controle e do grupo exposto à microcistina, (Mcis) submetidos à hipóxia gradual, são apresentados graficamente nas figuras 7 a 9.

Nas tensões de O<sub>2</sub> onde a exposição à hipóxia não teve efeito sobre a  $\dot{V}_G$  (140 a 80 mmHg), o grupo Controle exibiu valores médios de  $842,4 \pm 108,1$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>, enquanto que no grupo Mcis esses valores foram de  $1987,4 \pm 317,3$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>. A hipóxia gradual foi responsável por um aumento significativo (955,03 U) nos valores de  $\dot{V}_G$  dos grupos experimentais apenas durante a redução da  $P_{in}O_2$  de 60 a 40 mmHg. O grupo Controle exibiu valores médios de  $1664,3 \pm 158,7$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> e o Mcis de  $2729,7 \pm 467,8$  mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> durante essas tensões de O<sub>2</sub>. De maneira comparativa, observou-se que a presença da toxina MC-LR aumentou significativamente (1142,11 U) a  $\dot{V}_G$  do grupo Mcis independente da redução nas tensões de O<sub>2</sub> analisadas.



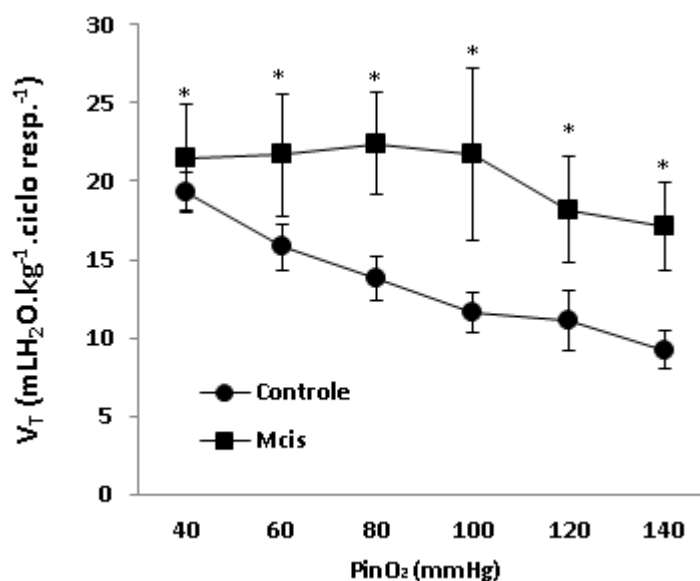
**Figura 7.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (n = 12) e Mcis (n = 12) de *B. amazonicus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água (p < 0,05).

Durante as tensões de 140 a 80 mmHg não houve alteração da frequência respiratória induzida pela hipóxia nos grupos experimentais. A frequência respiratória ( $f_R$ ) do grupo Controle durante normóxia foi de  $73,3 \pm 4,3$  ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ , enquanto que a  $f_R$  do grupo Mcis foi de  $98,0 \pm 6,6$  ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ . A partir de 60 mmHg, a  $f_R$  dos grupos Controle e Mcis exibiu aumentos significativos (24,71 U) alcançando seu valor máximo durante a  $P_{\text{inO}_2}$  de 40 mmHg, ( $100,7 \pm 3,7$  e  $128,1 \pm 8,2$  ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$  respectivamente). Comparativamente, a exposição à MC-LR induziu aumentos significativos (31,7 U) na frequência respiratória do grupo Mcis independente das  $P_{\text{inO}_2}$  analisadas.



**FIGURA 8.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{\text{inO}_2}$  – mmHg) sobre a frequência respiratória ( $f_R$  – ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ ) dos grupos Controle ( $n = 12$ ) e Mcis ( $n = 12$ ) de *B.amazonicus*. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $p < 0,05$ ).

O volume ventilatório ( $V_T$ ) do grupo Controle e Mcis não apresentou alterações significativas em resposta à hipóxia. Os valores médios para o grupo Controle foram de  $13,4 \pm 1,1$   $\text{mlH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$ , enquanto que para o grupo Mcis esses valores foram de  $20,4 \pm 3,7$   $\text{mlH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$ . Apesar dos valores dos grupos experimentais não apresentarem alterações em resposta à hipóxia, observou-se que a exposição à MC-LR aumentou significativamente os valores do  $V_T$  no grupo Mcis em relação ao Controle (6,9 U), independente da redução da pressão parcial de oxigênio na água.

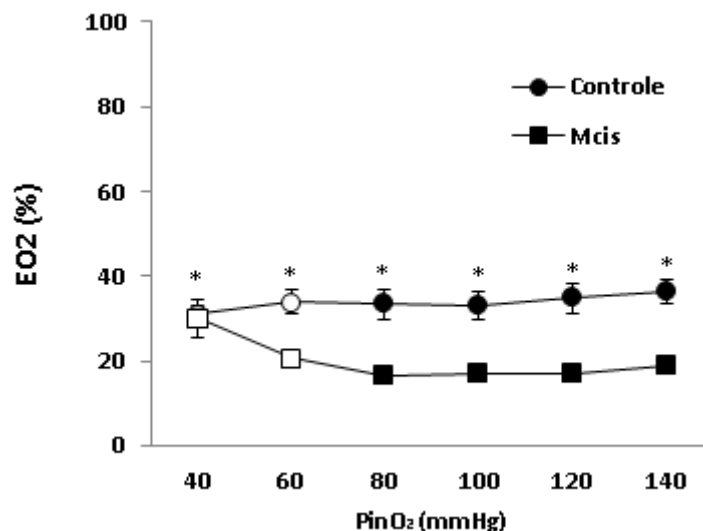


**FIGURA 9.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o volume ventilatório ( $V_T$  -  $mLH_2O.kg^{-1}.ciclo\ respiratório^{-1}$ ) dos grupos Controle e ( $n = 12$ ) e Mcis ( $n = 12$ ) de *B. amazonicus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais.

### 3.1.3. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ ).

Os valores médios da extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) dos grupos Controle e exposto à microcistina (Mcis) em resposta à diminuição da tensão de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro (hipóxia), são representados graficamente na figura 10.

Em relação ao efeito da hipóxia sobre a extração de oxigênio, os valores de  $EO_2$  do grupo Controle e Mcis não apresentaram alterações durante as tensões de  $O_2$  de 140 a 80 mmHg, com valores médios de  $34,3 \pm 3,3$  % para o Controle e  $17,3 \pm 1,3$  % para o Mcis. Observa-se que a exposição ao ambiente hipóxico só promoveu alterações significativas nos grupos Controle e Mcis quando houve a redução nas  $P_{in}O_2$  de 60 mmHg até 40mmHg. Ao se alterar as pressões parciais de  $O_2$  nesse nível de hipóxia, a extração de oxigênio teve uma queda significativa de 3,24 U. Entretanto, no grupo Mcis pode-se ver que nessa mesma situação houve um aumento nos valores de  $EO_2$  (12,0 U). Dessa maneira podemos dizer estatisticamente, que houve interação entre essas variáveis (hipóxia e exposição à MC-LR). Ademais, comparando-se os grupos foi possível observar que a exposição à MC-LR fez com que a  $EO_2$  do grupo Mcis fosse significativamente menor (16,3 Unidades de medida) em relação ao Controle independente da pressão parcial de  $O_2$ .

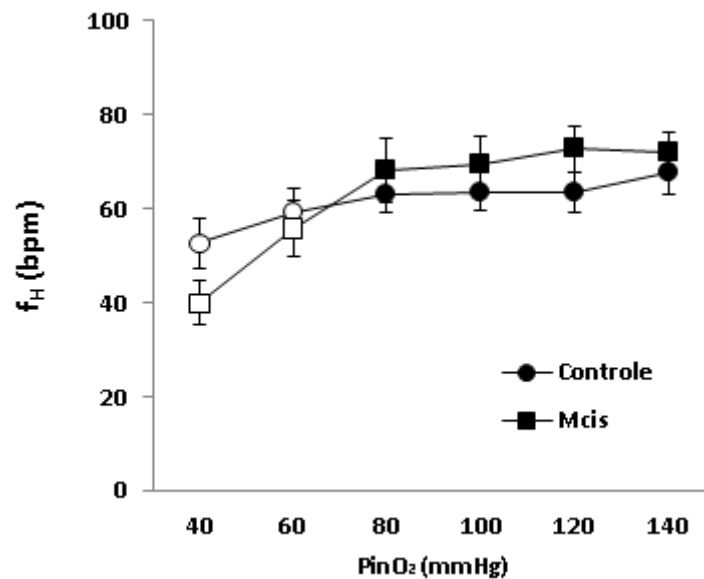


**FIGURA 10.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a extração de  $O_2$  ( $EO_2$  - %) dos grupos Controle ( $n = 12$ ) e Mcis ( $n = 12$ ) de *B. amazonicus*. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. \* indica diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4. Frequência cardíaca de *Brycon amazonicus* submetido à hipóxia gradual

Na figura 11 se encontra a representação gráfica da frequência cardíaca ( $f_H$ - bpm) dos grupos Controle e Mcis, submetidos a diferentes tensões de  $O_2$  na água.

Como visto anteriormente para outros parâmetros analisados, a exposição à hipóxia gradual não alterou de maneira estatisticamente significativa os valores médios de  $f_H$  das tensões de  $O_2$  compreendidas entre 140 e 80 mmHg. A média dos valores obtidos nessas  $P_{in}O_2$  foi de  $64,4 \pm 4,1$  bpm para o Controle e  $70,6 \pm 5,3$  bpm para o grupo Mcis. Alterações nos valores médios da  $f_H$  dos grupos experimentais só foram observadas a partir da  $P_{in}O_2$  de 60 mmHg, onde houve uma queda significativa (17,6 U) da frequência cardíaca nesses grupos. Os valores mínimos de  $f_H$  observados ocorreram durante a  $P_{in}O_2$  de 40 mmHg, com valores de  $52,6 \pm 5,4$  bpm para o grupo Controle e  $39,8 \pm 4,7$  bpm para o Mcis. Comparativamente, não houve diferença significativa entre a  $f_H$  dos dois grupos experimentais.



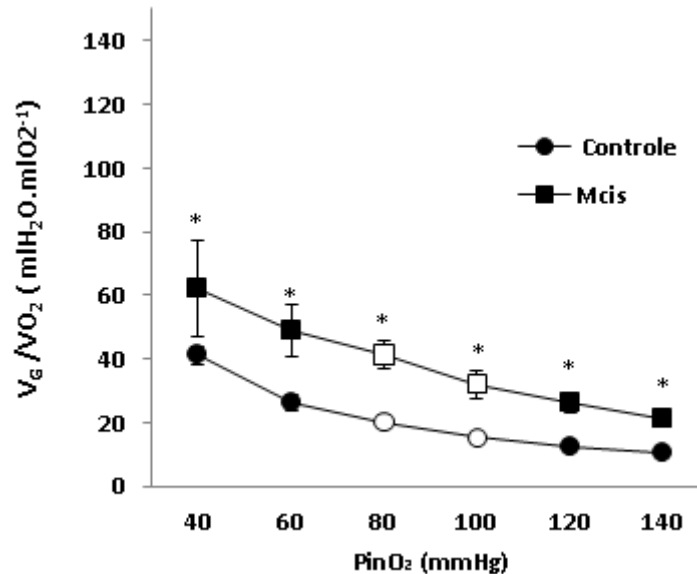
**Figura 11-** Efeito da diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água no desenvolvimento de frequência cardíaca (f<sub>H</sub> – bpm) de espécimes de *B.amazonicus*, dos grupos Controle (n = 12) e Mcis (n = 12). Valores médios ± 1 E.P.M. \* indica diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água (p < 0,05).

### 3.1.5. Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).

Os valores médios da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ) dos grupos Controle e exposto à microcistina (Mcis) de *Brycon amazonicus* (matrinxã), em resposta à hipóxia gradual, estão representados na figura 12. A hipóxia gradual aumentou significativamente (5,0 U) os valores da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ) apenas durante as P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 100 e 80 mmHg. Tanto os valores das tensões de O<sub>2</sub> acima desse nível de hipóxia (140 a 120 mmHg), quanto as tensões abaixo (60 a 40 mmHg) não apresentaram alterações significativas. Nesse caso entende-se que a pressão parcial do oxigênio, só interfere na necessidade ventilatória dos exemplares de *Brycon amazonicus* estudados, quando é reduzida na faixa de 100 a 80 mmHg. Os valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  encontrados em normóxia para o grupo Controle foram de  $10,2 \pm 1,0$  mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup> e de  $20,9 \pm 2,5$  mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup> para o grupo exposto à microcistina (Mcis). Os maiores valores encontrados para a variável necessidade ventilatória foram obtidos durante a P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 mmHg, com média de  $41,1 \pm 2,9$  mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup> no Controle e  $62,1 \pm 14,9$  mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup> no grupo Mcis.



Comparando-se os dados coletados em ambos os grupos experimentais, observou-se que os valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  do grupo Mcis foram significativamente superiores (7,36 U) em relação aos obtidos para o grupo Controle.



**Figura 12-** Efeito da diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água na necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  -mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) de espécimes de *B. amazonicus*, dos grupos Controle (n = 12) e Mcis (n = 12). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \* indica diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água (p < 0,05).

## 4. DISCUSSÃO.

### 4.1. Respostas respiratórias de *Brycon amazonicus* submetido à hipóxia gradual.

#### 4.1.1 Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de O<sub>2</sub> (P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>).

O sistema respiratório, por representar a mais extensa área de interface entre o peixe e a água, é frequentemente o primeiro sistema a ser afetado pelos poluentes dissolvidos (HEATH, 1995). Nesse contexto, Dube & Hosetti (2010) afirmam que a atividade respiratória dos peixes é uma das primeiras variáveis fisiológicas a ser afetada pela contaminação aquática, de tal maneira que a análise de respostas relacionadas às variações nos padrões respiratórios, tais como frequência de ventilação e consumo de oxigênio, podem ser bons indicadores dos efeitos advindos

da contaminação aquática. O consumo de oxigênio reflete a atividade metabólica global de um animal em resposta a fatores ambientais específicos, refletindo o gasto energético (MEHRLE & MAYER, 1984). Dessa forma, esse parâmetro é frequentemente utilizado em fisiologia como um indicador biológico.

No presente estudo, o valor médio da  $\dot{V}O_2$  observada para o grupo Controle ( $62,5 \pm 4,9 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) durante normóxia foi inferior ao descrito por Olle, 2007, de  $95,0 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  e Monteiro, 2011 ( $103 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ), porém a  $\dot{V}O_2$  de *B. amazonicus* ficou próxima a de outras espécies ativas de teleósteos tropicais, como o pacu, *P. mesopotamicus* ( $72 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; GUERRA, 1992), e o tambaqui, *C. macropomum* ( $78 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; CORRÊA, 1996).

Comparando-se os dados obtidos com alguns serrasalmídeos tropicais, o valor normóxico médio de  $\dot{V}O_2$  obtido para *B. amazonicus* foi semelhante ao verificado em espécies também migratórias, como pacu, *P. mesopotamicus* (GUERRA, 1992; RANTIN *et al.*, 1998) e o tambaqui, *C. macropomum* (CORRÊA, 1996). Essas espécies geralmente habitam ambientes sujeitos a oscilações drásticas na disponibilidade de  $O_2$  do meio em curtos períodos de tempo. Considerando-se que *B. amazonicus* é uma espécie ativa, migratória, sendo encontrada em ambientes de águas rápidas e bem oxigenadas, a forma com que regula a  $\dot{V}O_2$  se assemelha ao que é observado em espécies com características semelhantes (Monteiro, 2011).

A  $\dot{V}O_2$  dos grupos experimentais (Controle e Mcis) mostrou-se independente da concentração de  $O_2$  no meio, comportamento característico de uma espécie oxi-reguladora, capaz de manter a  $\dot{V}O_2$  constante. Em *B. amazonicus*, o consumo de  $O_2$  ficou em torno de  $55,4 \pm 3,2 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Controle) e  $60,5 \pm 5,6 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (Mcis) até a tensão de  $O_2$  na água de 40 mmHg. A partir da redução da  $P_{in}O_2$  de 40 a 20 mmHg essa espécie não foi capaz de manter a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ), tornando-se dependente da concentração de  $O_2$  na água, provavelmente devido à redução gradual na eficiência dos mecanismos homeostáticos envolvidos na tomada de  $O_2$  pelas brânquias e na difusão do gás para os tecidos (DAVIS, 1975; STEFFENSEN, 2006).

Segundo Rantin *et al.* (1984), espécies oxi-reguladoras mantêm ou até mesmo elevam consumo de  $O_2$  em resposta a hipóxia gradual até a tensão crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ) ser atingida. A  $P_cO_2$  representa o limite da capacidade da espécie em manter constante sua  $\dot{V}O_2$  em resposta à redução do  $O_2$  ambiental. Em  $P_{in}O_2$  acima da  $P_cO_2$ , a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) permanece relativamente constante, independente das alterações das tensões de  $O_2$  do ambiente. A  $P_cO_2$  calculada para os animais do grupo

Controle foi de 38 mmHg. Esse valor foi semelhante aos encontrados por Olle, (2007), 35,4 mmhg e Anelli Jr, (2010), 35 mmhg, ambos estudos realizados com *B. amazonicus*. Entretanto, Monteiro, (2011), obteve uma  $P_{cO_2}$  de 25 mmhg para a espécie referida.

De acordo com autores como Fernandes & Rantin (1989), as espécies de ambientes tropicais estão mais frequentemente sujeitas à hipóxia ambiental e os baixos valores de  $P_{cO_2}$  podem representar uma vantagem adaptativa, pois permitem uma maior capacidade de regular a tomada de  $O_2$  do meio. Dessa maneira, o alto valor da  $P_{cO_2}$  observado em *B. amazonicus* pode refletir o hábito e o habitat dessa espécie, sugerindo uma menor capacidade em manter a  $\dot{V}O_2$  em ambientes com baixas tensões de  $O_2$ . A partir da  $P_{cO_2}$  a espécie deixa de se comportar como oxi-reguladora e passa a se comportar como oxi-conformista e a  $\dot{V}O_2$  é reduzida progressivamente com a  $PO_2$  ambiental (ULTSCH et al., 1978).

A hipóxia gradual teve efeito significativo sobre os valores da  $\dot{V}O_2$  de *B. amazonicus* apenas na redução da  $P_{inO_2}$  de 40 a 20 mmHg. Durante esse período houve redução significativa dos valores da  $\dot{V}O_2$  dos grupos experimentais (Controle e Mcis) indicando que nessa faixa (40 a 20 mmHg) é onde se encontra a  $P_{cO_2}$  para esses grupos, dado que há variação da  $\dot{V}O_2$  em relação à  $PO_2$  ambiental (ULTSCH et al., 1978). Os valores de  $P_{cO_2}$  encontrados para os grupos experimentais foram de 38 mmHg para o Controle e 42,5 mmHg para o grupo Mcis, caracterizando um aumento de 12 % entre os grupos.

Aumentos nos valores da  $P_{cO_2}$ , como resposta fisiológica à exposição à poluentes, vêm sendo demonstrados em diversos experimentos utilizando teleósteos de água doce (ANELLI, 2010; MARTINS et al, 2011; MONTEIRO, 2011; OLLE, 2007; THOMAZ, 2008). Olle (2007), reportou que a exposição ao organofosforado metilparation induziu aumentos de 50% na  $P_{cO_2}$  de *Brycon amazonicus*; Thomaz (2008), observou 70% de aumento nos valores de  $P_{cO_2}$  de *O. niloticus* expostos ao organofosforado triclorfon, ao passo que Monteiro (2011) indicou aumentos de 110% nesse parâmetro em exemplares de *Brycon amazonicus* expostos a mercúrio inorgânico.

Em relação à exposição à microcistina, Martins et al. 2011, observaram aumentos da ordem de 260% na  $P_{cO_2}$  de *O. niloticus* expostas à injeções *i.p* de MC-LR na concentração de 100  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea, a mesma do presente estudo. No presente trabalho, a  $P_{cO_2}$  do grupo Mcis foi cerca de 12% maior do que a encontrada para o grupo Controle, valor esse que é muito inferior ao encontrado por Martins et al.

2011. Essa diferença de magnitude de resposta pode ser resultado da forma de exposição à MC-LR empregada por Martins e colaboradores, que utilizaram a forma purificada da MC-LR, ao passo que no presente estudo utilizou-se extrato liofilizado contendo MC-LR. Dessa maneira, possivelmente a toxina em sua forma purificada apresenta maior toxicidade em comparação ao extrato liofilizado. Ademais, essa discrepância entre o efeito sobre a  $P_cO_2$  pode ser ocasionada por susceptibilidade espécie-específica à ação da MC-LR o que, em linhas gerais, significa que *Brycon amazonicus* possa ser menos susceptível ao efeito deletério da MC-LR em comparação à *Oreochromis niloticus*.

Como citado anteriormente, de acordo com Fernandes & Rantin (1989), as espécies de ambientes tropicais, como *B. amazonicus*, estão mais frequentemente sujeitas à hipóxia ambiental e os baixos valores de  $P_cO_2$  podem representar uma vantagem adaptativa, pois permitem uma maior capacidade de regular a tomada de  $O_2$  do meio. Dessa maneira, aumentos nos valores de  $P_cO_2$  podem diminuir as chances de sobrevivência desses animais em ambientes hipóxicos, uma vez que sua  $\dot{V}O_2$  passa a ser dependente da  $PO_2$  da água em tensões de  $O_2$  mais elevadas (OLLE, 2007). No presente estudo, a exposição à MC-LR ocasionou a morte de quatro animais durante a  $P_{in}O_2$  de 20 mmHg, tal fato pode estar associado à alteração da  $P_cO_2$  nesse grupo, indicando que uma menor capacidade de tolerância a ambientes hipóxicos.

A exposição à MC-LR alterou significativamente a  $\dot{V}O_2$  de *B. amazonicus* do grupo Mcis em relação ao grupo Controle. O grupo Mcis exibiu aumento significativo (5.07 U) dos valores da  $\dot{V}O_2$  em relação ao Controle. De acordo com Fernandes & Rantin, 1989, para que a homeostase respiratória se mantenha, com propósito de preservar o gradiente de  $O_2$  entre a água e o sangue tão alto quanto possível, torna-se necessário a mobilização de mecanismos compensatórios, como o aumento da  $\dot{V}_G$  assegurando, desta maneira, a eficiência respiratória nas trocas gasosas. Como será discutido posteriormente, o grupo Mcis exibiu aumento significativo nos seus valores de  $\dot{V}_G$  em relação ao grupo Controle, de maneira que esse aumento da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) em adição a uma frequência respiratória aumentada também observada para o grupo Mcis. requerem gasto de energia para serem realizados. Dessa maneira é possível que o aumento no consumo de oxigênio observado no grupo Mcis, seja decorrente da necessidade adicional de energia para manter essas respostas respiratórias aumentadas. Adicionalmente, como será discutido adiante, a exposição à MC-LR aumentou a atividade de algumas enzimas do sistema

antioxidante em *B. amazonicus* no presente estudo. Dentre os efeitos subletais de intoxicação mais comumente observados em peixes se encontra o aumento da demanda energética para suportar os processos de desintoxicação e reparos (RAO & RAO, 1981; HEATH, 1995). Dessa forma, não podemos descartar a possibilidade do aumento da  $\dot{V}O_2$  em matrinxãs no presente estudo ser resultante, pelo menos em parte, dessa maior demanda energética por parte do sistema de defesa antioxidante.

#### 4.1.2. Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume Ventilatório ( $V_T$ ).

Os valores de  $\dot{V}_G$  de *Brycon amazonicus* em normóxia, observados no presente estudo ( $651,4 \text{ mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ), foram semelhantes aos descritos por Monteiro (2011), ( $746 \text{ mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ), entretanto foram superiores aos de Olle (2007),  $471 \text{ mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$  e Anelli, Jr. (2010), de  $475 \text{ mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ . Comparativamente, a  $\dot{V}_G$  de *Brycon amazonicus* foi inferior à encontrada para outras espécies estudadas nas mesmas condições, como cascudo *H. regani* ( $913 \text{ mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ; MATTIAS et al., 1998) e o dourado, *S. maxillosus* ( $914 \text{ mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ; SOUZA et al., 2001), espécies que habitam águas rápidas e bem oxigenadas.

De acordo com Fernandes & Rantin (1989), para que a homeostase respiratória se mantenha, com propósito de preservar o gradiente de  $O_2$  entre a água e o sangue tão alto quanto possível, torna-se necessária a mobilização de mecanismos compensatórios, como o aumento da  $\dot{V}_G$ , assegurando deste modo a eficiência respiratória nas trocas gasosas. Aumentos na ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), como resposta primária à hipóxia ambiental, foram observados em várias espécies de peixes, como pacu, *Piaractus mesopotamicus* (KALININ et al., 2000), traíra, *Hoplias malabaricus*, trairão, *Hoplias lacerdae* (RANTIN et al., 1992), carpa comum, *Cyprinus carpio* (SAUNDERS, 1962; LOMHOLT & JOHANSEN, 1979), *Oreochromis niloticus* (MARTINS et al, 2011; THOMAZ, 2008) e o próprio *Brycon amazonicus* (OLLE, 2007; MONTEIRO, 2011).

A análise da equação fundamental da fisiologia respiratória, descrita por Dejours (1981):

$$(\dot{V}_G / \dot{V}O_2) \cdot EO_2 \cdot P_{in}O_2 = 1,$$

mostra que a manutenção taxa metabólica constante quando a concentração de  $O_2$  do meio declina só é possível se ocorrer um aumento na ventilação branquial e/ou na extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ). Como a capacidade de aumento na  $EO_2$

é muito limitada em peixes, o aumento na  $\dot{V}_G$  é necessário para a manutenção da  $\dot{V}O_2$  (KALININ, 1996).

No presente estudo, o grupo Controle exibiu aumentos da ordem de 3,0 vezes na  $\dot{V}_G$  durante a  $P_{in}O_2$  de 40 mmhg em relação à normóxia. Resultados semelhantes foram registrados por Olle (2007), e Anelli Jr (2010), com aumentos na ordem de 5,5 e 5,7 vezes respectivamente. Aumentos na  $\dot{V}_G$  durante o desenvolvimento da hipóxia gradual também foram observados para outras espécies de peixes tropicais ativos. *P. scrofa*, exibiu aumento de cerca de 12 vezes (FERNANDES et al., 1995) *C. macropomum* foi capaz de aumentar a  $\dot{V}_G$  em 10,9 vezes (CORRÊA, 1996), *Hoplias lacerdae*, 8,5 vezes (KALININ et al., 1996) e *O. niloticus*, 13 vezes (MARTINS, 2010). A comparação destes resultados com os obtidos no presente estudo sugere que *B. amazonicus* tem uma reduzida capacidade de elevação da  $\dot{V}_G$ , ao contrário das espécies consideradas mais resistentes à hipóxia, que apresentam maior capacidade de aumento da  $\dot{V}_G$ . Entretanto, em seu habitat natural, *B. amazonicus* pode utilizar de uma estratégia respiratória conhecida por *ram ventilation*. Essa estratégia consiste da passagem forçada de água pelas brânquias quando o animal se posiciona contra a corrente, ou nada com a boca parcialmente aberta, o que melhoraria a eficiência da ventilação a um menor custo energético (RANDALL, 1982). É possível que os exemplares de *B. amazonicus* utilizados no presente estudo tenham lançado mão de tal estratégia, uma vez que a boca é colocada na direção do fluxo de água através do respirômetro, o que poderia explicar os menores valores de  $V_G$  obtidos. Os animais do grupo Mcis exibiram aumentos da ordem 1,8 vezes nos valores de  $\dot{V}_G$ , na  $P_{in}O_2$  de 40 mmhg em relação à normóxia. Comparativamente, esse aumento foi inferior ao encontrado para o grupo Controle (3,5 vezes). Entretanto, os valores de  $\dot{V}_G$  do grupo Mcis foram significativamente superiores aos do grupo Controle (1142,11 U) independente da  $P_{in}O_2$  analisada. Se levarmos em consideração, a equação proposta por Dejours (1981),  $(\dot{V}_G / \dot{V}O_2) \cdot EO_2 \cdot P_{in}O_2 = 1$ , podemos inferir que esse aumento nos valores da  $\dot{V}_G$  do grupo Mcis em relação ao grupo Controle, foi a estratégia fisiológica utilizada para que esses animais pudessem manter sua  $\dot{V}O_2$  constante, dado que os valores de  $EO_2$  do grupo Mcis (como veremos adiante) foram significativamente inferiores (16,3 U) em relação ao Controle. Dessa maneira, os maiores valores de  $\dot{V}_G$  observados para o grupo Mcis, possibilitaram a manutenção da homeostase

respiratória em *B. amazonicus*, compensando a diminuição na extração de  $O_2$  observada para esse grupo.

Analisando-se os gráficos de  $\dot{V}_G$ ,  $f_R$  e  $V_T$  de *Brycon amazonicus*, pode-se notar que a exposição à hipóxia não alterou de maneira significativa os valores de  $V_T$ , porém alterou significativamente (24,71 U) os valores de  $f_R$  durante a redução das tensões de  $O_2$  da água no intervalo de 60 a 40 mmHg. Tal fato indica que no presente estudo, o aumento da  $\dot{V}_G$  ocorreu principalmente devido a aumentos nos valores de  $f_R$ , do que elevações do  $V_T$ . Esse tipo de resposta ventilatória, apesar de não ser a mais comum já foi observada em outros teleósteos como a carpa, *Cyprinus carpio* e em *Lepomis macrochirus* (MARVIN & HEAT, 1968; LOMHOLT & JOHANSEN, 1979).

Segundo Di Giulio & Hinton (2008), a ventilação branquial é realizada utilizando-se um sistema de duas bombas. A primeira envolve a sucção gerada pela abertura opercular que faz com que a água entre na cavidade bucal. A segunda utiliza a pressão gerada pelos músculos que envolvem a cavidade bucal para forçar a água pelas brânquias. Os matrinxãs possuem pequenas cavidades bucal e operculares, o que limita grandes aumentos no  $V_T$  (MONTEIRO, 2011). Nesse contexto, o maior aumento na  $f_R$  para ajustar a  $\dot{V}_G$  é uma estratégia viável em *B. amazonicus*.

A resposta à hipóxia mais frequentemente observada em teleósteos baseia-se na hiperventilação através de um maior aumento do  $V_T$  do que da  $f_R$ . Esse padrão de resposta está relacionado à vantagem representada pelo menor custo energético da elevação da  $\dot{V}_G$  através de um maior aumento do  $V_T$  do que na  $f_R$ . De acordo com RANTIN et al. (1992), a utilização desta estratégia respiratória baseia-se no baixo custo para a manutenção da velocidade e constância da contração muscular, enquanto que uma alta frequência de contração é limitada pelo trabalho muscular contra uma alta viscosidade da água ventilada. Nesse contexto, o gasto adicional de energia no grupo Mcis, devido ao aumento significativo na frequência respiratória (31,7 U) para alcançar maiores valores de  $\dot{V}_G$ , poderia explicar o maior valor de  $\dot{V}O_2$  observado em relação ao Controle.

#### 4.1.3. Extração de $O_2$ da Corrente Ventilatória ( $EO_2$ ).

No presente estudo, foram observados valores de  $EO_2$  em normóxia para *B. amazonicus* da ordem de ~36%. Esses valores estão de acordo com os apresentados por Thomaz (2011), de cerca de 43%, entretanto diferem dos obtidos por Monteiro (2011) que observou valores próximos a 55%. Esses valores de  $EO_2$  são relativamente



baixos quando comparadas a outras espécies de peixes, como a tilápia, *O. niloticus*, o tambaqui, *C. macropomum*, o pacu, *P. mesopotamicus*, o curimatá, *P. scrofa*, a traíra, *H. malabaricus* e carpas, todas apresentando uma  $EO_2$  em normóxia maior que 70 % (MARTINS, 2010; KALININ, 1996; CORRÊA, 1996; GUERRA, 1992; FERNANDES et al., 1995; MATTIAS et al., 1996; SAUNDERS, 1962).

A exposição à hipóxia teve efeito significativo nos valores da extração de  $O_2$  de *B. amazonicus* somente no intervalo de 60 a 40 mmHg. Nessa tensão de  $O_2$ , ocorreu uma redução significativa (3,24U) na  $EO_2$  para ambos os grupos experimentais. Entretanto, no grupo Mcis, durante esse mesmo intervalo (60 a 40 mmHg) ocorreu um aumento significativo (12,0 U) nos valores de  $EO_2$ . A análise desses valores nos permite concluir que houve interação entre essas variáveis, ou seja, quando há a hipóxia (60 a 40 mmHg) ambos os grupos apresentam uma redução significativa (3,24 U) em seus valores de  $EO_2$ . Porém, na presença da MC-LR (Mcis) esses valores também exibem um aumento significativo (12,0 U), evidenciando essa interação entre hipóxia e MC-LR.

De acordo com Steffensen et al. (1982), o aumento na  $\dot{V}_G$  enquanto a  $EO_2$  se mantém relativamente alta e constante constitui uma das mais importantes compensações respiratórias durante reduções na  $PO_2$  ambiental.

Em comparação com o controle, o grupo Mcis exibiu valores significativamente inferiores (16,3 U) independente da  $P_{in}O_2$  analisada. Esses menores valores na  $EO_2$  do grupo Mcis podem ser resultado de efeitos deletérios da MC-LR sobre as brânquias de *B. amazonicus*. Carbis et al. (1997), por exemplo, verificaram necrose e alterações epiteliais em células de brânquias de *Cyprinus carpio* expostas a florações de cianobactérias produtoras de microcistina. Prieto et al. (2006) e Prieto et al. (2007) mostraram que a exposição de *O. niloticus* à microcistina em doses sub-letais (500  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea) causa estresse oxidativo com subsequente destruição celular (lipoperoxidação) em vários órgãos, inclusive em brânquias. No presente estudo verificou-se que a injeção *i.p* do extrato liofilizado contendo MC-LR na concentração de 100  $\mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea induziu aumentos expressivos (317%) nos níveis de oxidação proteica do tecido branquial, o que pode conduzir à lesão tecidual de *B. amazonicus*. Dessa maneira, a perda de superfície funcional das brânquias pode ser a causa da diminuição nos valores de  $EO_2$  exibida pelo grupo Mcis em comparação ao grupo Controle.

Entretanto, como dito anteriormente, no intervalo de 60 a 40 mmHg, a hipóxia interagiu com a MC-LR, modificando o padrão de resposta da  $EO_2$  no grupo Mcis. Dessa maneira, além da redução causada pela hipóxia, houve também um aumento



derivado do efeito da MC-LR. Esse aumento pode ter sido ocasionado pelo estresse causado em decorrência da ação somatória dos efeitos da MC-LR juntamente com a hipóxia.

Variação na concentração de  $O_2$  dissolvido e presença de poluentes orgânicos e inorgânicos são exemplos de agentes desencadeadores do estresse (estressores) em peixes (COSTA et al., 2004; JORGENSEN et al., 2002; CARVALHO & FERNANDES, 2006). Quando o peixe é exposto a um agente estressor, ocorre a ativação do eixo hipotálamo-sistema nervoso simpático–células cromafins (HSC), que resulta na liberação de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), como produtos finais (OBA et al, 2009).

Segundo Satchell (1991), dentre os mecanismos fisiológicos e bioquímicos adotados pelos teleósteos durante a hipóxia ambiental, para maximizar a tomada de  $O_2$  e minimizar seu gasto, destacam-se as respostas desencadeadas pela ativação, via estresse hipóxico, dos centros autonômicos que regulam a liberação de catecolaminas no sangue pelos tecidos cromafins. As catecolaminas, por sua vez, podem evocar respostas tais como mudanças adicionais no padrão do fluxo de sangue nas brânquias e na condutância difusiva de  $O_2$ , regulação da tomada de  $O_2$  pelos eritrócitos, dentre outros. As catecolaminas são mobilizadas para a circulação dos peixes durante uma grande variedade de situações geradoras de estresse (RANDALL & PERRY, 1992), que de maneira geral, requerem modulações cardiorrespiratórias ou mobilização de reservas energéticas. A magnitude da elevação plasmática dos níveis de catecolaminas pode variar de acordo com o tipo de estresse imposto, sua severidade e as espécies que estão sob o efeito estressor (REID et al., 1998).

Perry & Reid (1992) estudando trutas arco-íris e enguias, conduziram experimentos onde os animais foram submetidos a vários níveis de hipóxia aguda, a fim de se elucidar qual era o principal estímulo para a liberação de catecolaminas durante hipóxia: os níveis de  $O_2$  no sangue ou na água. Esses autores verificaram que os níveis de oxigênio no sangue são preponderantes em relação aos níveis de  $O_2$  da água para a liberação das catecolaminas durante hipóxia. Sendo assim, a hipoxemia é o estímulo imediato para a liberação de catecolaminas durante episódios de hipóxia ambiental nessas espécies.

No presente estudo, pode ser que a lesão tecidual nas brânquias, causada pela oxidação proteica observada no grupo Mcis, tenha sido a responsável pelos menores valores de  $EO_2$  observados para esse grupo em relação ao Controle. Essa redução na extração de oxigênio do grupo Mcis pode ter gerado um quadro de hipoxemia, criando o estímulo para que ocorresse a liberação de catecolaminas no sangue que, por sua vez, foram responsáveis pelo aumento dos valores de  $EO_2$  observados no grupo Mcis

durante a hipóxia (60 a 40 mmHg). Vale ressaltar ainda que durante os experimentos, alguns animais do grupo Mcis morreram. É possível que esse quadro de hipoxemia seja o responsável por essas mortes. Dessa maneira, possivelmente o efeito derivado da presença da MC-LR juntamente com o estresse hipóxico causado pela exposição às tensões de  $O_2$  abaixo de 60 mmhg, tenham elicitado respostas fisiológicas via sistema endócrino capazes de aumentar a  $EO_2$  nesses animais durante hipóxia acentuada.

#### 4.1.4. Frequência cardíaca de *Brycon amazonicus* submetido à hipóxia gradual.

Os valores médios para a  $f_H$  de *Brycon amazonicus* em normóxia foram de 67 bpm, e estão em conformidade com os observados por Olle (2007) e Monteiro (2011) (63 e 65 bpm respectivamente). Comparativamente, esses valores são maiores do que aqueles verificados para espécies de peixes tropicais como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (50 bpm; RANTIN et al., 1998) e o tambaqui, *Colossoma macropomum* (48 bpm; RANTIN & KALININ, 1996) e abaixo da  $f_H$  média de espécies ativas como o dourado, *Salminus maxillosus* (97 bpm; SOUZA et al., 2001), e os atuns *Katsuwonus pelamis* e *Thunnus albacares* (BUSHNELL & BRILL, 1992; KORSMEYER et al., 1993).

Durante a hipóxia, a resposta cardíaca usual corresponde a uma bradicardia acompanhada de um aumento do volume sistólico (ALTIMIRAS et al., 1995). Segundo Farrell (1984), o reflexo bradicárdico produzido pela hipóxia pode ser valioso para assegurar o desempenho do coração durante a hipóxia do miocárdio. Entretanto, Glass et al. (1991) questionam até que ponto a bradicardia hipóxica é apenas um reflexo compensatório e não uma consequência do sofrimento miocárdico imposto pelas baixas tensões de  $O_2$ , uma vez que abaixo da  $PcO_2$  é normalmente acompanhada de alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia miocárdica.

Todavia, dado que o débito cardíaco é mantido, a resposta bradicárdica à hipóxia pode ser analisada como uma maneira de aumentar o tempo de residência do sangue tanto nas lamelas secundárias (possibilitando maior captação de  $O_2$  da corrente ventilatória) quanto no miocárdio (possibilitando um maior tempo para tomada de  $O_2$  pelo mesmo). Tal fato é possibilitado por dois efeitos: (a) aumento do recrutamento lamelar, causado por hipertensão acompanhada de bradicardia e (b) adequada relação ventilação/perfusão (SATCHELL, 1991; ALTIMIRAS et al., 1995).

A exposição ao ambiente hipóxico reduziu significativamente (17,6 U) os valores de  $f_H$  em *B. amazonicus* durante a redução da  $P_{in}O_2$  de 60 a 40 mmhg, caracterizando

o efeito bradicárdico comumente observado em teleósteos em situação de hipóxia. Comparando-se os grupos observou-se que a MC-LR não teve efeito significativo sobre os valores de  $f_H$  durante as tensões de  $O_2$  analisadas. Alguns autores observaram efeitos da MC-LR em tecidos cardíacos. Atencio et al. (2008) submeteram exemplares de *O. niloticus* a injeções intraperitoneais de MC-LR (500  $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de massa corpórea) e, além de danos a órgãos como fígado e rins, verificaram a ocorrência de histopatologias nos miócitos cardíacos. Entretanto, em nosso estudo não foi verificada nenhuma ação da MC-LR no coração de *B. amazonicus*. Possivelmente a dose utilizada em nosso trabalho (100  $\mu\text{g} \cdot \text{Kg}^{-1}$  de massa corpórea) não seja suficiente para causar danos ao tecido cardíaco, dado que embora outros órgãos como rins, brânquias e coração exibam efeitos da toxina (RABERGH et al., 1991; CARBIS et al., 1997, ZHANG et al., 2007), o principal órgão de atuação da MC-LR é o fígado (JOS et al., 2005; FISCHER & DIETRICH, 2000; PRIETO et al., 2007).

#### 4.1.5. Necessidade Ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).

A eficiência das brânquias como órgão trocador de  $O_2$  pode ser avaliada por meio da necessidade ventilatória (“water convection requirement” -  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ), também chamada de requerimento branquial de convecção de água (DEJOURS, 1981). Segundo Kalinin (1996), aumentos na  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  em função da redução na disponibilidade de  $O_2$  do meio são indicativos da redução na eficiência de extração de  $O_2$  da corrente ventilatória, ou seja, uma maior quantidade de água deve passar pela superfície funcional respiratória para que a mesma quantidade de  $O_2$  seja obtida.

No presente estudo, a  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  de *Brycon amazonicus* só foi alterada pelo efeito da hipóxia (aumento significativo de 5,0 U) durante o intervalo que compreende as  $P_{in}O_2$  de 100 a 80mmHg. Tal padrão de resposta provavelmente deve-se ao fato de que durante as tensões de  $O_2$  de 60 a 40 mmHg houve um aumento significativo nos valores da  $EO_2$  dos animais do grupo Mcis. A equação ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ). $EO_2$ .  $P_{in}O_2 = 1$ , proposta por Dejourns (1981), mostra que elevados valores  $EO_2$  resultam em uma menor  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  (KERSTENS et al., 1979). Assim, o aumento exibido na  $EO_2$  durante as tensões de 60 a 40 mmHg, pode ter prevenido aumentos significativos nos valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  frente à hipóxia.

A despeito do efeito da hipóxia, observou-se que a exposição à MC-LR aumentou significativamente (7,36 U) os valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  em relação ao Controle. Como citado anteriormente, segundo Kalinin (1996), aumentos na  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  em função

da hipóxia ambiental, são indicativos da redução na eficiência de extração de  $O_2$  da corrente ventilatória. Essa afirmação corrobora os resultados do presente estudo, na medida em que foram observadas reduções significativas (16,3 U) nos valores da extração de  $O_2$  do grupo Mcis em relação ao Controle. Sendo assim, os maiores valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  do grupo Mcis são justificáveis, uma vez que é necessário que uma maior quantidade de água passe pelas brânquias dos animais desse grupo para que a mesma quantidade de oxigênio seja extraída.

## 5. CONCLUSÕES

A exposição por 48 horas à MC-LR via injeção intraperitoneal de extrato liofilizado contendo a toxina na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea, foi capaz de promover elevação do consumo de oxigênio para suprir o aumento da demanda energética resultante da hiperventilação observada e/ou da desintoxicação dos animais expostos.

A presença da toxina causou a morte de 1/3 dos matrinxãs durante o desenvolvimento da hipóxia severa, devido à redução na capacidade de compensação de *Brycon amazonicus* aos efeitos da hipóxia, diminuindo sua capacidade de sobreviver em ambientes com pouco oxigênio.

Esses efeitos observados durante repouso em condições laboratoriais podem ser ainda mais prejudiciais no ambiente natural, onde esses animais exibem elevadas taxas de natação e estão expostos a variações diárias nos níveis de oxigênio.

## **CAPÍTULO III**

**EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE PARÂMETROS  
CARDIORRESPIRATÓRIOS DE TRAÍRA, *Hoplias malabaricus*  
(BLOCH, 1794)**

## 1. INTRODUÇÃO

As microcistinas (MCs) apresentam diversas formas de gerar efeitos lesivos sobre os tecidos dos organismos. Dentre os principais mecanismos de toxicidade das MCs destacam-se a desintegração da estrutura dos hepatócitos, a perda da arquitetura hepática e sinusoidal (CARMICHAEL, 1994), alterações nos sistemas de reparo de DNA e expressão de genes (DOUGLAS et al, 2001; ARIZA et al, 1996), além de interação com as mitocôndrias de tecidos animais com consequente geração de estresse oxidativo e apoptose celular (PRIETO et al., 2009; ZHANG et al., 2008). Como descrito no Cap.I do presente estudo, existem evidências que relacionam o aparecimento das microcistinas na água com a hipóxia ambiental (ZHANG et al., 2011), fato que pode levar a um efeito combinado desses fatores (hipóxia e microcistina) no desenvolvimento de toxicidade celular com alterações que levam ao estresse oxidativo entre outros efeitos.

A traíra, *Hoplias malabaricus*, é um peixe adaptado a ambientes lênticos, de pouca correnteza ou mesmo águas paradas, as quais normalmente apresentam drásticas mudanças de  $O_2$  (KALININ, 1991) e que vêm sofrendo aumento no aparecimento de florações de cianobactérias produtoras de microcistina (TOLEDO Jr. et al., 1983; LAMPARELLI, 2004; GOMES et al., 2010; ALVES et al., 2012; SILVA et al., 2010). Essa espécie é conhecida por apresentar adaptações como reduzido metabolismo aeróbico, alta afinidade hemoglobina-oxigênio e extensa área de superfície respiratória (DRIEDZIC et al., 1978; FERNANDES et al., 1994) que lhe conferem uma elevada capacidade de resistência a hipóxia.

Apesar de sua elevada tolerância a hipóxia ser bem conhecida e documentada, não há conhecimento sobre o efeito da microcistina sobre as respostas cardiorrespiratórias dessa espécie sob condições de hipóxia ambiental. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho é analisar os efeitos da injeção intraperitoneal de extrato liofilizado contendo MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea durante 48 horas nas variáveis respiratórias (taxa metabólica; tensão crítica de  $O_2$ ; ventilação branquial; necessidade ventilatória; extração de  $O_2$ ; frequência respiratória; volume ventilatório e ventilação total) e na frequência cardíaca de matrinxã, *H. malabaricus*, tanto em normóxia (tensão de  $O_2$  de 140 mmHg) quanto em hipóxia gradual (tensões de  $O_2$  de 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg).

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Animais utilizados

Exemplares juvenis e de ambos os sexos de traíra, *Hoplias malabaricus*, foram adquiridos na piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, SP. Após a coleta, os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde foram mantidos em tanques com capacidade de 1000 L, dotados de recirculação de água aerada e termostatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), por um período mínimo de 30 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante esse período foram alimentados com carne de peixe (tilápia) uma a duas vezes por semana.

### 2.2. Delineamento experimental

Após o período de aclimação, os exemplares de *Hoplias malabaricus* foram pesados ( $W_T = 146,1 \pm 19,2$  g) divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: o grupo controle (Controle,  $n = 12$ ) e o grupo exposto à toxina (Mcis  $n = 12$ ). Os peixes do grupo Mcis receberam uma injeção intraperitoneal (0,5 mL de salina 0,9%) do extrato liofilizado da cepa RST9501 de *M.aeruginosa*, contendo a toxina MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea. Após a injeção esperou-se durante um período de 48h até serem realizadas as medidas dos parâmetros respiratórios e cardíacos. O extrato liofilizado da cepa RST9501 de *M.aeruginosa* foi cedido pelo Profº Dr João Sarkis Yunes do Laboratório de Oceanografia Química, Física e Geológica da FURG/RS.

A concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea foi baseada no trabalho de Martins et al. (2011), que estudaram o efeito de injeções intraperitoneais de MC-LR sobre as respostas cardiorrespiratórias de tilápia-do-Nilo durante a hipóxia gradual. De acordo com estes autores, esta dose ( $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ ), quando injetada intraperitonealmente, foi suficiente para produzir efeitos tóxicos agudos em tilápia-do-Nilo.

O grupo controle (Ctrl) recebeu o mesmo tratamento, porém só foi inoculado com 0,5 mL de salina 0,9%.

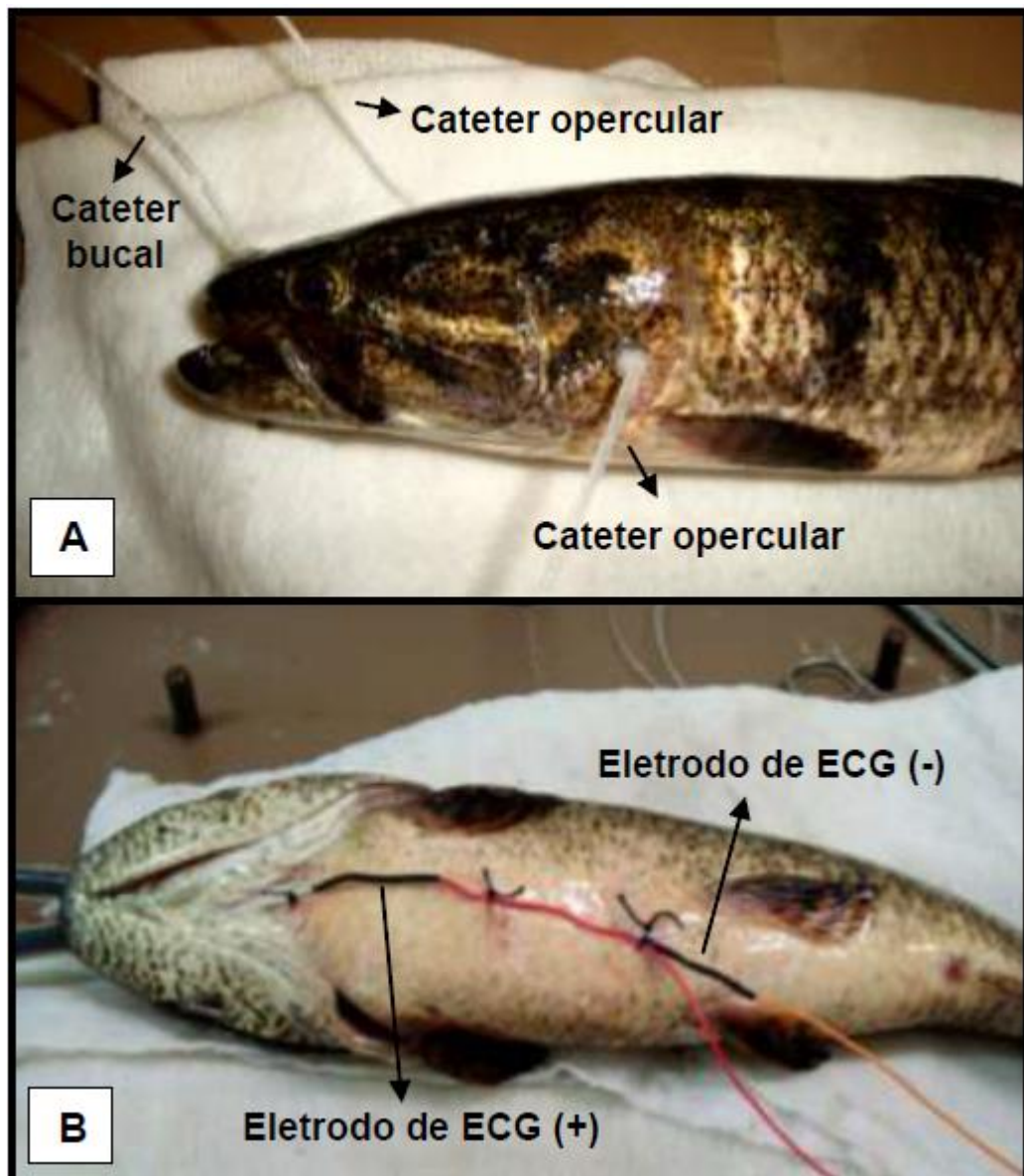
### 2.3. Procedimentos experimentais

As preparações empregadas para a obtenção dos parâmetros respiratórios e dos eletrocardiogramas (ECG) para análise da frequência cardíaca ( $f_H$ ) foram

baseadas na metodologia utilizada por Glass et al. (1991) e adaptada por Rantin et al. (1993). Todos os procedimentos experimentais bem como todos os parâmetros analisados foram descritos com maiores detalhes no capítulo anterior (ver Capítulo II, item 2.3).

Em resumo, após a anestesia em benzocaína 0,01%, os peixes foram submetidos a uma cirurgia de implantação de cateteres de polietileno na cavidade bucal e nos opérculos e de eletrodos na região ventral do corpo para o registro do ECG (Fig. 1). Para *H. malabaricus*, o melhor sinal elétrico para o registro do ECG foi obtido posicionando-se o eletrodo positivo na região ventral exatamente onde as margens inferiores dos opérculos se unem. Após a cirurgia, os peixes foram introduzidos no respirômetro de fluxo constante e imediatamente transferidos para a câmara experimental, mantida a 25°C, onde permaneceram, por um período de 12 horas, para a recuperação (Fig. 2).



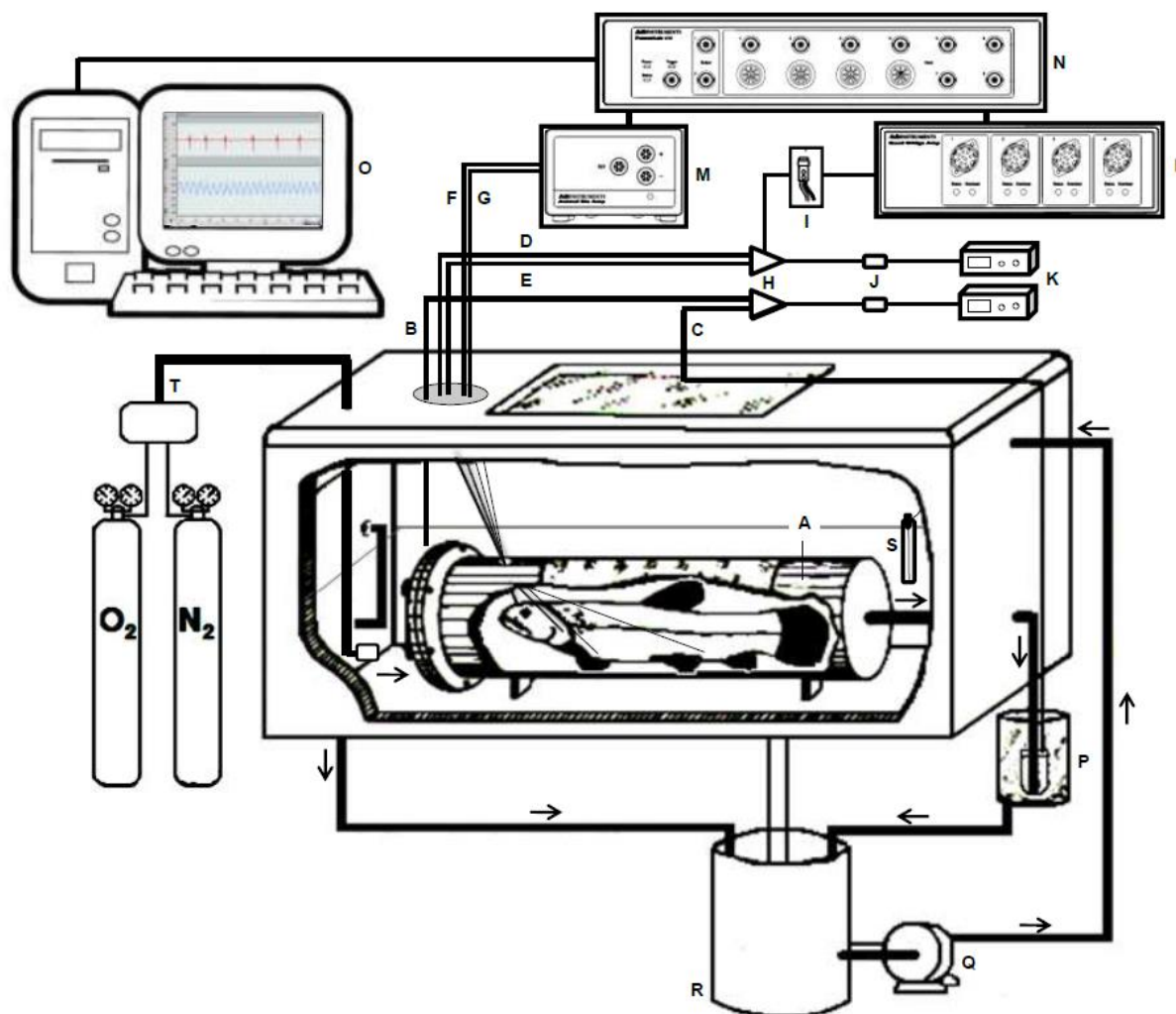


**Figura 1** - Fotos mostrando em **A**: a posição de inserção dos cateteres de polietileno da boca e dos opérculos e, em **B**: os eletrodos de ECG positivo e negativo em traíra, *Hoplias malabaricus*. (Adaptado de MONTEIRO, 2011).

As tensões de  $O_2$  (mmHg) da água de entrada ( $P_{in}O_2$ ) e de saída ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, bem como das tensões de  $O_2$  da água inspirada ( $P_iO_2$ ) e expirada ( $P_eO_2$ ) pelos peixes foram continuamente monitoradas conectando-se os cateteres de polietileno a um sistema de torneiras de 3 vias acopladas a eletrodos de analisadores de  $O_2$ .

Para analisar a resposta do animal frente à hipóxia, a temperatura experimental foi mantida constante ( $25 \pm 1,0$  °C) por meio de um termostato localizado no interior da câmara experimental e os experimentos foram conduzidos em normóxia ( $P_{in}O_2 = 140$

mmHg) e nas seguintes tensões de  $O_2$  hipóxicas: 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg, obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de  $N_2$  e ar comprimido no interior da câmara experimental.



**Figura 2** - Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardiorrespiratórias de *Hoplias malabaricus*. **A**: respirômetro; **B**, **C**: cateteres de polietileno para tomada da água que entra ( $P_{in}O_2$ ) e que sai ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro, respectivamente; **D**, **E**: cateteres de polietileno para tomada da água inspirada ( $PiO_2$ ) e expirada ( $PeO_2$ ), respectivamente; **F**, **G**: eletrodos cardíacos positivo e negativo; **H**: torneiras de 3 vias; **I**: transdutor de pressão MLT0380/D; **J**: cuvetas termostatizadas com eletrodos de  $O_2$  FAC-001; **K**: analisadores de  $O_2$  FAC-204A; **L**: amplificador de pressão ML224; **M**: amplificador de ECG ML136; **N**: sistema de aquisição de dados Powerlab 8/30; **O**: computador para o registro de dados; **P**: frasco de ajuste de fluxo de água através do respirômetro; **Q**: bomba para circulação de água; **R**: balde para circulação de água; **S**: termostato para manutenção da temperatura; **T**: entrada de quantidades controladas de  $N_2$  ou ar comprimido. As setas indicam a direção do fluxo de água no sistema. (adaptado de MONTEIRO, 2011).

Após a estabilização, cada tensão de  $O_2$  foi mantida por um período mínimo de 30 minutos antes de serem efetuadas as medidas e registros dos parâmetros acima

citados. Os procedimentos de tomada de medidas e registros foram efetuados, em média, dentro de 5 minutos.

#### **2.4. Variáveis ventilatórias e frequência cardíaca.**

A taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ), ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), frequência respiratória ( $f_R$ ), o volume ventilatório ( $V_T$ ), extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) e a frequência cardíaca ( $f_H$ ), em cada uma das tensões de  $O_2$  experimentais foi determinada utilizando-se o sistema de respirometria de fluxo constante, pelo monitoramento das tensões de  $O_2$  da água de entrada ( $P_{in}O_2$ ) e de saída ( $P_{out}O_2$ ) do respirômetro conforme detalhado no capítulo anterior (vide Capítulo II; item 2.4)

#### **2.5. Tratamento estatístico dos dados**

Os valores estão apresentados como média  $\pm$  E.P.M. Foram consideradas diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância. Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados no presente estudo.

Para as variáveis  $\dot{V}O_2$ ,  $EO_2$ ,  $f_R$  e  $f_H$  foram utilizadas equações de estimação generalizada, através do método da Quase-Verossimilhança.

Para as variáveis  $\dot{V}_G$ ,  $V_T$  e  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ , foram utilizados modelos lineares generalizados com distribuição Gama.

Foi utilizada uma estrutura de correlação constante estimada a partir dos dados. Dessa forma foi gerada uma unidade de medida (U) que foi utilizada para designar as diferenças significativas entre os valores analisados.

Para a realização dos testes estatísticos acima mencionados foi utilizado o software R (Software R versão 3.0.1).

Todo o tratamento estatístico dos dados do presente estudo foi realizado pela estudante do curso de estatística da UFSCar Camila Barbosa Moraes Rodrigues, como seu projeto de conclusão de curso sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dra Maria Silvia de Assis Moura.

Para o relatório completo sobre os procedimentos estatísticos adotados, bem como todos os comandos utilizados no software R, vide anexo.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Respostas cardiorrespiratórias de *Hoplias malabaricus* à hipóxia gradual.

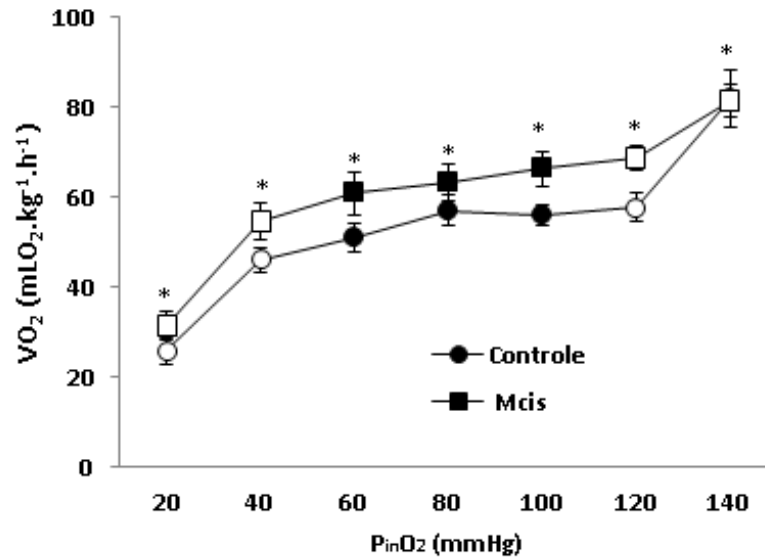
##### 3.1.1. Taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de oxigênio ( $P_cO_2$ ).

Nenhum animal de ambos os grupos morreu durante a realização dos experimentos, bem como não foi notada nenhuma diferença acentuada no comportamento dos dois grupos analisados.

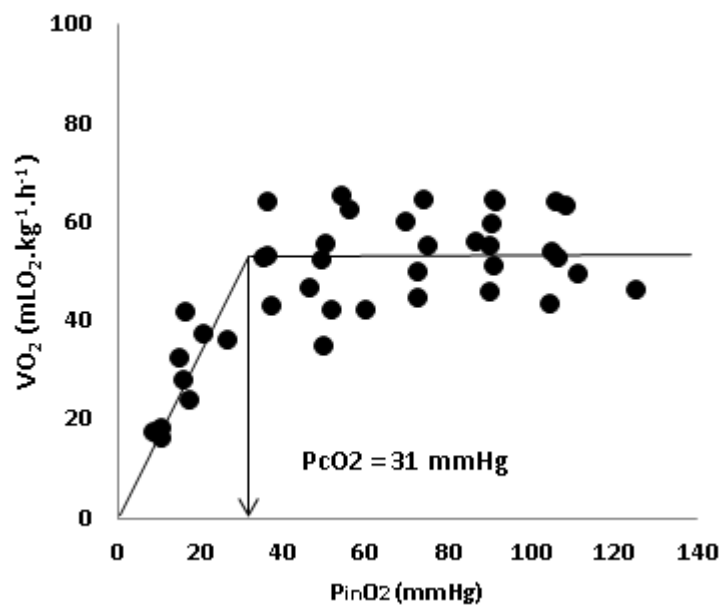
A figura 3 mostra os valores médios da  $\dot{V}O_2$  dos grupos Controle e Mcis de *Hoplias malabaricus*, frente às diferentes tensões de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ ).

Os maiores valores encontrados para a taxa metabólica foram observados durante a normóxia (140mmHg) em ambos os grupos, com valores médios de  $81,8 \pm 6,3 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para o grupo Controle, e  $81,3 \pm 3,8 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  para o grupo Mcis. A  $\dot{V}O_2$  observada para os animais dos grupos experimentais sofreu alterações significativas em resposta à diminuição das pressões parciais de oxigênio em duas situações, nas  $P_{in}O_2$  de 140 a 120 mmHg, onde essa redução nas tensões de  $O_2$  provocou diminuição significativa (23,03 U) na  $\dot{V}O_2$  dos grupos Controle e Mcis, e também durante o intervalo de 40 a 20 mmHg onde a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) apresentou queda significativa de 29,06 U. Dessa maneira entende-se que a redução nas tensões de  $O_2$  analisadas (hipóxia gradual) só interfere nos valores da  $\dot{V}O_2$  de *Hoplias malabaricus* quando esta se dá de 140 a 120 mmHg e de 40 a 20 mmHg, nas demais  $P_{in}O_2$  analisadas a hipóxia não interfere significativamente nos valores apresentados. Ademais, foi observado que a exposição à MC-LR (grupo Mcis) aumentou significativamente (7,23 U) os valores de  $\dot{V}O_2$  em relação ao Controle, independente da redução nas tensões de oxigênio.

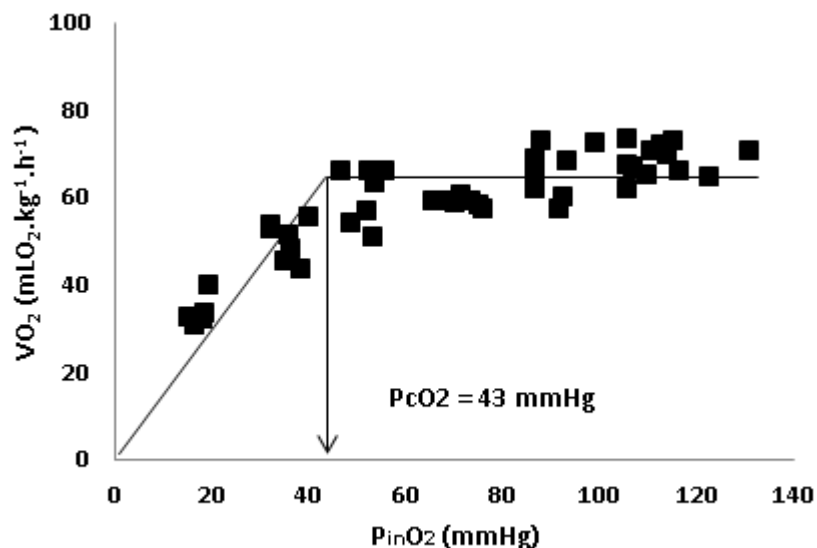
A tensão crítica de  $O_2$  ( $P_cO_2$ ) representa a tensão de  $O_2$  abaixo da qual o peixe não consegue mais manter de maneira eficiente seus mecanismos de compensação à hipóxia e, dessa maneira sustentar seu consumo de  $O_2$  constante. Como descrito anteriormente, esse parâmetro é calculado pela intersecção das retas de regressão linear obtida pelo método descrito por Rantin *et al.* (1992). O valor de  $P_cO_2$  calculada para o grupo Controle foi de 31 mmhg (Fig 4), e para o grupo Mcis foi de 43 mmhg (Fig 5) caracterizando um aumento de aproximadamente 38 % entre os grupos.



**FIGURA 3.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mLO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) dos grupos controle, Controle (n = 12) e exposto à microcistina, Mcis (n = 12) de *Hoplias malabaricus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $p < 0,05$ ).



**FIGURA 4.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mLO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) do grupo controle (n = 12) de *Hoplias malabaricus*. A seta representa a  $P_{cO_2}$ .



**FIGURA 5.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$  – mL $O_2$ ·kg $^{-1}$ ·h $^{-1}$ ) do grupo exposto à microcistina (n = 12) de *Hoplias malabaricus*. A seta representa a  $P_cO_2$

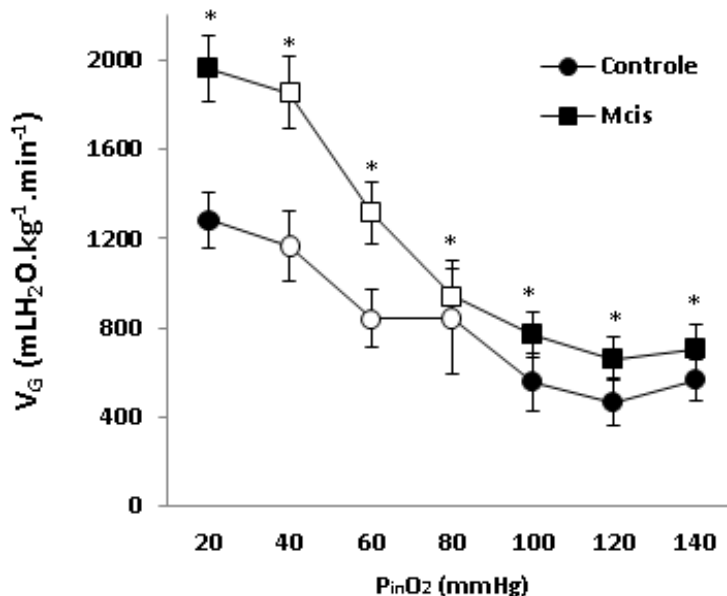
### 3.1.2. Ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência respiratória ( $f_R$ ) e Volume ventilatório ( $V_T$ ).

A representação gráfica dos valores médios da ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  – mL $H_2O$ ·kg $^{-1}$ ·min $^{-1}$ ), da frequência respiratória ( $f_R$  – ciclos respiratórios·min $^{-1}$ ) e do volume ventilatório, ( $V_T$  – mL $H_2O$ ·kg $^{-1}$ ·ciclo respiratório $^{-1}$ ) dos exemplares de *H. malabaricus* do grupo Controle e do grupo exposto à microcistina (Mcis), submetidos à hipóxia gradual, pode ser observada nas figuras 6 a 8.

A redução nas tensões de  $O_2$  no intervalo compreendido entre 140 e 100 mmHg e de 40 a 20 mmHg não resultou em alterações significativas nos valores de  $\dot{V}_G$  dos grupos Controle e Mcis. Durante o período de 140 a 100 mmHg os valores médios observados foram de  $528,4 \pm 111,6$  mL $H_2O$ ·kg $^{-1}$ ·min $^{-1}$  para o Controle e de  $709,4 \pm 103,4$  mL $H_2O$ ·kg $^{-1}$ ·min $^{-1}$  para o grupo Mcis, enquanto que na faixa entre 40 e 20 mmHg os valores da  $\dot{V}_G$  foram de  $1225,0 \pm 141,1$  mL $H_2O$ ·kg $^{-1}$ ·min $^{-1}$  para o Controle e  $1908,7 \pm 153,4$  mL $H_2O$ ·kg $^{-1}$ ·min $^{-1}$  para o Mcis.

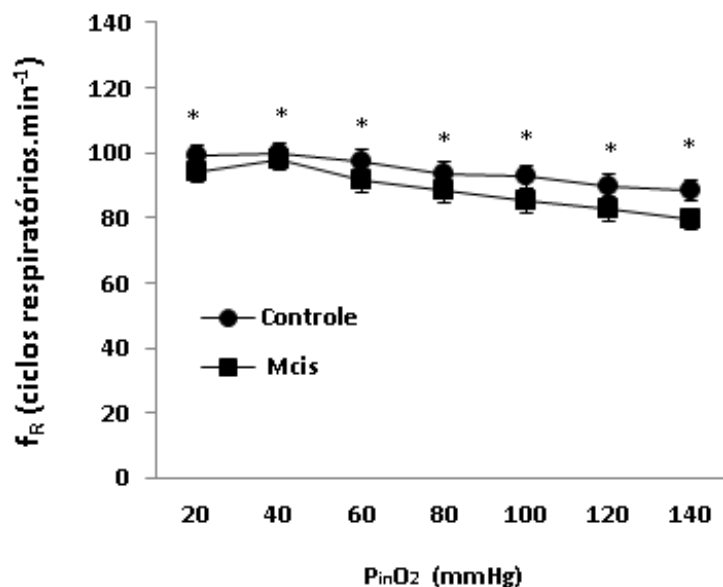
Alterações significativas nos valores da ventilação branquial em resposta à hipóxia gradual foram observadas nas  $P_{in}O_2$  compreendidas entre 80 e 40 mmHg. Na redução das tensões de oxigênio de 80 a 60 mmHg houve um aumento de 393,6 U nos valores de desse parâmetro, enquanto que durante a redução de 60 a 40 mmHg

esse aumento foi de 501,2 U. Comparando-se os valores da  $\dot{V}_G$  entre os grupos foi visto que o grupo Mcis exibiu aumento significativo (296,8 U) em relação ao Controle, independente da redução nas  $P_{in}O_2$ .



**FIGURA 6.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a ventilação branquial ( $\dot{V}_G$  - mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>) dos grupos Controle (n = 12) e Mcis (n = 12) de *H. malabaricus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água (p < 0,05).

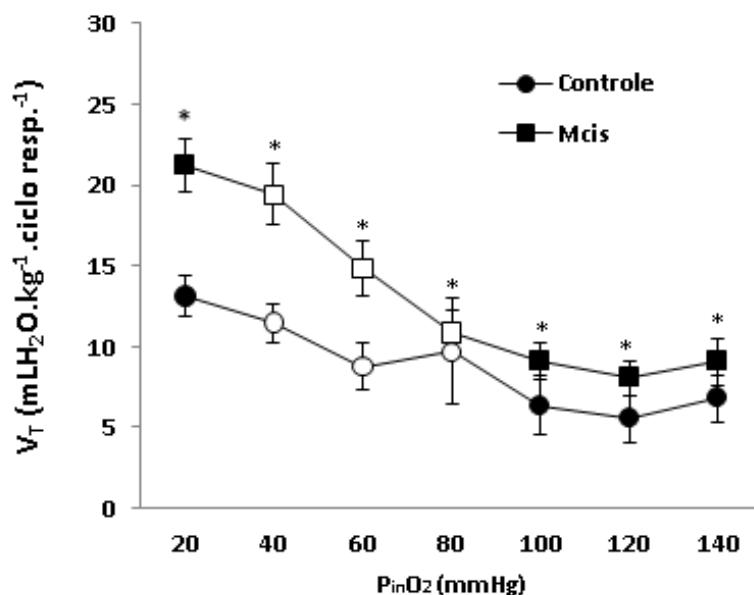
Os valores da frequência respiratória ( $f_R$ ) de *H. malabaricus* não apresentaram mudanças significativas decorrentes da redução das tensões de O<sub>2</sub> (hipóxia gradual) em nenhum dos níveis hipóxicos a que os animais foram submetidos, ou seja, a exposição à hipóxia gradual não interferiu na frequência respiratória desses animais. Os valores médios do grupo Controle e Mcis foram  $94,2 \pm 4,8$  e  $88,4 \pm 3,4$  ciclos respiratórios.min<sup>-1</sup> respectivamente. Em relação à exposição à MC-LR, foi observado que o grupo Mcis apresentou diminuição significativa (5,3 U) em seus valores de  $f_R$  quando comparado ao grupo Controle.



**FIGURA 7.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{inO_2}$  – mmHg) sobre a frequência respiratória ( $f_R$  – ciclos respiratórios. $\text{min}^{-1}$ ) dos grupos Controle ( $n = 12$ ) e Mcis ( $n = 12$ ) de *H. malabaricus*. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $p < 0,05$ ).

A redução nas tensões de  $O_2$  não provocou alterações significativas nos valores do volume ventilatório ( $V_T$ ) no intervalo de 140 a 100 mmHg e 40 a 20 mmHg. Os valores médios durante as tensões de  $O_2$  de 140 a 100 mmHg foram de  $6,2 \pm 1,5$   $\text{mlH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$  para o Controle e  $8,7 \pm 1,2$   $\text{mlH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$  para Mcis, enquanto que durante o intervalo de 40 a 20 mmHg os valores médios obtidos foram de  $12,3 \pm 4,3$   $\text{mlH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$  para o grupo Controle e  $20,3 \pm 1,8$   $\text{mlH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$  para o grupo Mcis. Mudanças significativas relativas ao efeito da hipóxia sobre os valores do volume ventilatório ocorreram nas  $P_{inO_2}$  compreendidas entre 80 e 40 mmHg. A redução na tensão de  $O_2$  de 80 a 60 mmHg resultou em um aumento de 3,6 U nos valores do  $V_T$ , enquanto que de 60 a 40 mmHg o aumento foi de 5,0 U. Em comparação ao Controle, a exposição à MC-LR aumentou significativamente (4,0 U) os valores do volume ventilatório do grupo Mcis.



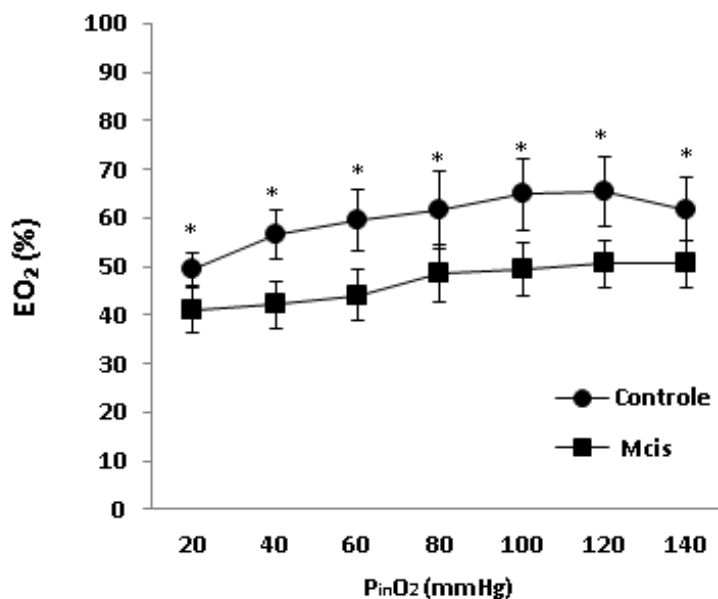


**FIGURA 8.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre o volume ventilatório ( $V_T$  -  $mLH_2O.kg^{-1}.ciclo\ respiratório^{-1}$ ) dos grupos Controle e ( $n = 12$ ) e Mcis ( $n = 12$ ) de *H.malabaricus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.3. Extração de oxigênio da corrente ventilatória ( $EO_2$ ).

Os valores médios da extração de  $O_2$  da corrente ventilatória ( $EO_2$ ) dos grupos Controle e exposto à microcistina (Mcis) em resposta à diminuição da tensão de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro, são representados graficamente na figura 9.

Como podemos ver na figura 9, os valores da extração de  $O_2$  de *H. malabaricus* não apresentaram alterações significativas em resposta à hipóxia gradual em nenhuma das  $P_{in}O_2$  analisadas. Os valores médios da  $EO_2$  durante o intervalo de 140 a 20 mmHg foram de  $59,9 \pm 6,2$  % para o Controle e  $46,6 \pm 5,0$  % para o grupo exposto à MC-LR. Os valores de  $EO_2$  apresentaram diferenças significativas na comparação entre os grupos experimentais, de modo que a exposição à MC-LR (Mcis) reduziu significativamente (11,8 U) a extração de oxigênio no grupo Mcis em comparação aos valores do Controle, independente da tensão de  $O_2$  analisada.



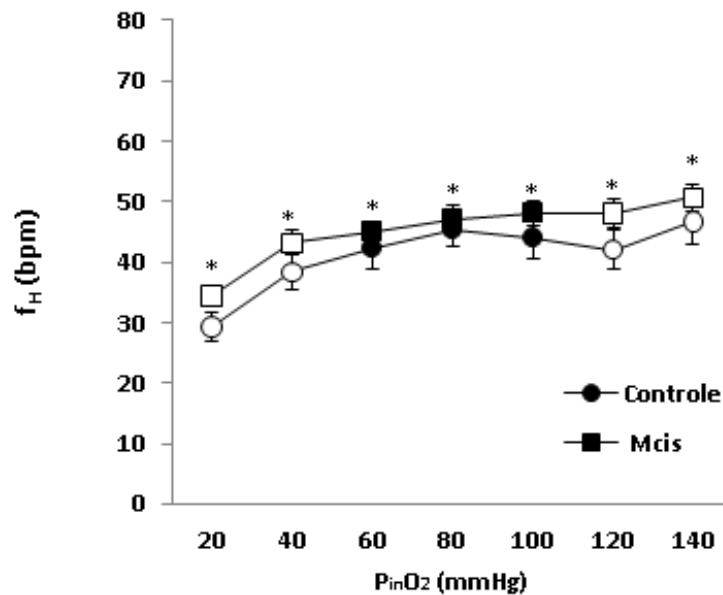
**FIGURA 9.** Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $P_{in}O_2$  – mmHg) sobre a extração de  $O_2$  ( $EO_2$  - %) dos grupos Controle ( $n = 12$ ) e Mcis ( $n = 12$ ) de *H. malabaricus*. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4. Frequência cardíaca de *Hoplias malabaricus* submetido à hipóxia gradual

A figura 10 mostra a representação gráfica dos valores médios da frequência cardíaca ( $f_H$  - bpm) dos grupos Controle e Mcis de *Hoplias malabaricus*, frente às diferentes tensões de  $O_2$  da água de entrada do respirômetro ( $P_{in}O_2$ ).

A redução gradual nas tensões de  $O_2$ , alterou significativamente os valores da  $f_H$  dos grupos experimentais durante dois momentos distintos, o primeiro durante o intervalo inicial de 140 a 100 mmHg e posteriormente de 40 a 20 mmHg. No período que compreende as  $P_{in}O_2$  de 140 a 120 mmHg, essa redução no oxigênio disponível fez com que os valores de  $f_H$  tivessem uma redução significativa de 4,3 U. Durante o intervalo que corresponde a redução de 40 a 20 mmHg, a diminuição dos valores da frequência cardíaca (bradicardia) foi de 12,3 U.

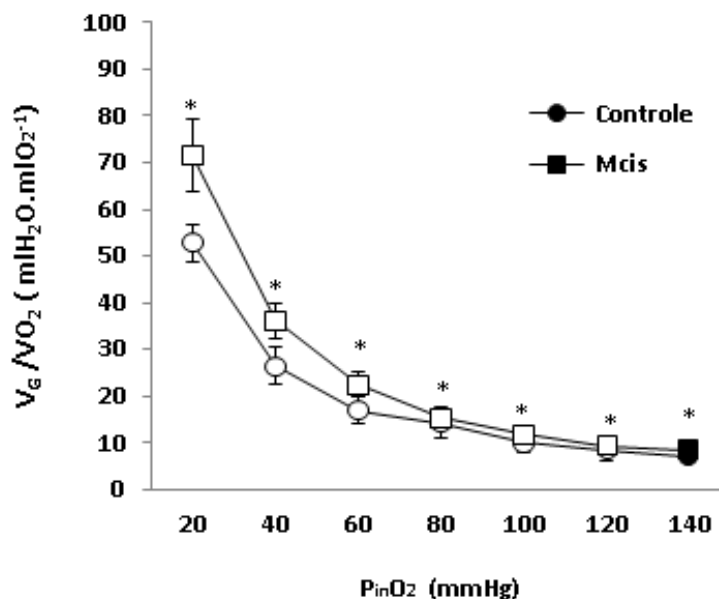
Em uma análise comparativa, ainda pode-se observar que o grupo exposto à MC-LR (Mcis) apresentou valores significativamente maiores (3,9 U) em relação ao grupo Controle, independente do nível de hipóxia ao qual os animais estavam submetidos.



**Figura 10-** Efeito da diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água no desenvolvimento de frequência cardíaca (f<sub>H</sub> – bpm) de espécimes de *H.malabaricus*, dos grupos Controle (n = 12) e Mcis (n = 12). Valores médios ± 1 E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água (p < 0,05).

### 3.1.5. Necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).

Os valores médios da necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ) dos grupos Controle e exposto à microcistina (Mcis) de *Hoplias malabaricus* (traíra), em resposta à diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água de entrada do respirômetro, estão representados na figura 11. A redução nas tensões de oxigênio da água alterou de forma significativa os valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  de todas as P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> analisadas, com exceção do intervalo inicial, de 140 a 120 mmHg (valor médio de 7,7 ± 1,6 mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup> para o Controle e 8,9 ± 1,1 mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup> para o grupo Mcis). Nas demais P<sub>in</sub>O<sub>2</sub>, a exposição à hipóxia aumentou de maneira significativa e gradual, os valores da necessidade ventilatória em *Hoplias malabaricus*. O aumento significativo nos valores da  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  durante a redução gradual nas P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> analisadas foi de 3,0 U (120 a 100mmHg); 3,9 U (100 a 80 mmHg); 4,9 U (80 a 60mmHg); 11,6 U (60 a 40 mmHg) e 31,2 U (40 a 20 mmHg). Em relação à exposição à MC-LR, foi observado que a presença da toxina no grupo Mcis aumentou significativamente (2,3 U) os valores da  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  nesse grupo quando comparado ao Controle.



**Figura 11-** Efeito da diminuição da tensão de O<sub>2</sub> da água na necessidade ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  -mlH<sub>2</sub>O.mlO<sub>2</sub><sup>-1</sup>) de espécimes de *H. malabaricus*, dos grupos Controle (n = 8) e Mcis (n = 8). Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: diferença significativa entre os grupos experimentais. Os símbolos vazios indicam diferenças significativas decorrentes da redução gradual das tensões de oxigênio da água ( $p < 0,05$ ).

#### 4. DISCUSSÃO.

##### 4.1. Respostas cardiorrespiratórias de *Hoplias malabaricus* submetido à hipóxia gradual.

###### 4.1.1 Consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) e tensão crítica de O<sub>2</sub> ( $P_cO_2$ ).

O consumo de O<sub>2</sub> resume o intervalo metabólico e outras atividades do animal e em que extensão são afetados pela disponibilidade de O<sub>2</sub> do ambiente (HUGHES et al., 1983). Estudos fisiológicos utilizam frequentemente o consumo de oxigênio como um indicador biológico, dado que esse parâmetro reflete a atividade metabólica global de um animal em resposta a fatores ambientais específicos, refletindo seu gasto energético (MEHRLE & MAYER, 1984).

O valor médio da  $\dot{V}O_2$  observada para o grupo Controle nesse estudo ( $81,8 \pm 6,3$  mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) durante normóxia foi superior ao descrito por Monteiro (2011) ( $64$  mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) e Kalinin (1991) ( $36,8 \pm 2,1$  mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Esses valores aumentados na  $\dot{V}O_2$  do presente trabalho podem ser decorrentes de diferenças entre as massas dos

animais utilizados nesses estudos distintos. Kalinin (1991) observou que o consumo de oxigênio exibe uma correlação com a massa corpórea em *H. malabaricus*. A autora mediu o consumo de O<sub>2</sub> em 2 grupos de animais com massa corpórea diferente, um grupo (grupo I) com média de massa de 39,3 g e outro (grupo II) com massa média de 364,7 g. Os animais do grupo I exibiram valores de consumo de O<sub>2</sub> de  $110,5 \pm 16,7$  mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, enquanto que o grupo II teve seus valores de  $\dot{V}O_2$  próximos a  $36,8 \pm 2,1$  mlO<sub>2</sub>.kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Outros estudos utilizando *H. malabaricus* tiveram respostas semelhantes (RANTIN & JOHANSEN, 1984), evidenciando que existe uma possível correlação entre a  $\dot{V}O_2$  e a massa corpórea dos animais, sendo que quanto maior a massa do animal menor seu consumo de oxigênio. Nesse contexto a diferença entra as massas dos animais utilizados nos estudos de Kalinin (1991) (39,3 g grupo I e 364,7 g grupo II), Monteiro (2011) ( $W_T = 313,72 \pm 15,64$  g) e os utilizados no presente trabalho ( $W_T = 146,1 \pm 19,2$  g) possivelmente expliquem essa diferença nos valores da  $\dot{V}O_2$  em normóxia.

Vários trabalhos demonstraram que *Hoplias malabaricus* é uma espécie que apresenta comportamento oxi-regulador no que tange a sua capacidade de manter sua  $\dot{V}O_2$  constante independente da pressão parcial de O<sub>2</sub> no meio (KALININ, 1991; RANTIN & JOHANSEN, 1984; MONTEIRO, 2011; RANTIN et al., 1993). No presente estudo, *H. malabaricus* apresentou um comportamento distinto durante normóxia.

A  $\dot{V}O_2$  dos grupos Controle e Mcis sofreu efeito significativo da hipóxia em dois momentos distintos, durante a redução da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 140 a 120 mmHg (diminuição de 23,03 U) e durante a redução nas tensões de O<sub>2</sub> de 40 a 20 mmHg (diminuição de 29,06 U). Durante as P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> compreendidas entre 120 e 40 mmHg, os valores da  $\dot{V}O_2$  mostraram-se independentes da concentração de O<sub>2</sub> no meio, corroborando com o comportamento característico de uma espécie oxi-reguladora. De acordo com Rantin et al. (1984), espécies oxi-reguladoras mantêm o consumo de O<sub>2</sub> em reposta a hipóxia gradual até a tensão crítica de O<sub>2</sub> (P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>) ser atingida. Em tensões de O<sub>2</sub> acima da P<sub>c</sub>O<sub>2</sub>, a taxa metabólica ( $\dot{V}O_2$ ) permanece relativamente constante, independente das alterações das tensões de O<sub>2</sub> do ambiente. Como discutiremos adiante, a redução significativa dos valores de  $\dot{V}O_2$  em *H. malabaricus* durante as P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 40 a 20 mmHg está de acordo com a P<sub>c</sub>O<sub>2</sub> calculada para essa espécie no presente trabalho. Dessa maneira o comportamento da espécie estudada, durante as P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> de 120 a 20 mmHg, assemelha-se ao de uma espécie oxi-reguladora, como descrito anteriormente por diversos estudos (KALININ, 1991; RANTIN & JOHANSEN, 1984; MONTEIRO,

2011; RANTIN et al., 1993). Entretanto, como já citado, durante a diminuição das tensões de  $O_2$  de 140 a 120 mmHg houve uma redução significativa na  $\dot{V}O_2$  de *Hoplias malabaricus*, o que de certa maneira contraria os resultados prévios disponíveis na literatura.

Essa redução na  $\dot{V}O_2$  pode ter sido uma resposta imediata à hipóxia. No período precedente à realização da hipóxia gradual, os animais ficam aclimatados à tensão de  $O_2$  de 140 mmHg por um período de aproximadamente 12 horas. Durante o desenvolvimento da primeira redução na  $P_{in}O_2$  (140 a 120 mmHg) pode ser que essa diminuição inicial na pressão parcial de  $O_2$  (20 mmHg) seja percebida pelos quimiorreceptores de oxigênio localizados nas brânquias (SUNDIN et al., 1999) e leve a uma resposta imediata, a redução nos valores de  $\dot{V}O_2$ , que apesar de incomum, pode ter ocorrido. Como será discutido adiante, resposta semelhante foi observada para os valores da frequência cardíaca no presente estudo.

É sabido que *Hoplias malabaricus* é uma espécie adaptada a ambientes lênticos, de pouca correnteza ou de águas paradas, comumente encontrada em fundos lodosos de pequenos corpos d'água, também alguns rios e lagoas marginais (PAIVA, 1972; GODOY, 1975). Trata-se de um animal extremamente resistente a hipóxia, podendo ser encontrado em fundos lodosos de ambientes aquáticos secos, sendo a única espécie a sobreviver nessas condições (GODOY, 1975). Existem evidências bioquímicas que sugerem uma grande capacidade anaeróbia que possibilita a sobrevivência desta espécie em condições de hipóxia (KALININ, 1991).

O baixo valor de  $\dot{V}O_2$  pode indicar uma necessidade de energia relativamente baixa para manter o metabolismo em traíras (MONTEIRO, 2011). Yang & Somero (1993) sugerem que a baixa taxa metabólica é uma adaptação exibida por algumas espécies às condições ambientais em que vivem, caracterizadas pela baixa disponibilidade de  $O_2$  e de alimento. As diferenças observadas nos valores da  $\dot{V}O_2$  e da  $P_cO_2$  para traíra pode ser devido ao fato de que os peixes utilizados nos diferentes trabalhos foram coletados em regiões distintas. Segundo Monteiro (2011), embora *H. malabaricus* seja considerada uma única espécie nominal, encontram-se padrões cariotípicos diversos entre populações isoladas nas diferentes bacias hidrográficas, ou até mesmo entre populações habitantes da mesma localidade. Estudos citogenéticos nesse complexo de espécies vêm demonstrando vasta diversidade cromossômica, com variações no número de cromossomos ( $2n=39$  a  $2n=42$ ), na estrutura e na existência de diferentes sistemas de cromossomos sexuais, o que permitiu a identificação de sete citótipos distintos (BERTOLLO et al., 2000).

A  $P_{cO_2}$  representa o limite da capacidade da espécie em manter constante sua  $\dot{V}O_2$  em resposta à redução do  $O_2$  ambiental (RANTIN et al., 1984). O valor calculado para esse parâmetro nos animais Controle foi de 31 mmHg, e está de acordo com valores observados por Rantin et al. (1984), de 35 mmHg. Entretanto esses valores diferem dos encontrados por Monteiro (2011), que em seu estudo calculou a  $P_{cO_2}$  em *H. malabaricus* com valores em torno de 20,8 mmHg. Kalinin (1991) aponta para uma possível relação entre massa corpórea e  $P_{cO_2}$ , de maneira que animais com maior massa corpórea possuem menores valores de  $P_{cO_2}$ , indicando uma provável menor capacidade de regulação da tomada de  $O_2$  por animais de menor massa corpórea. Os resultados do presente trabalho corroboram essa hipótese, ao passo que os animais utilizados por Monteiro (2011) cuja  $P_{cO_2}$  foi de 20,8 mmHg, eram significativamente maiores ( $313,72 \pm 15,64$  g) do que os utilizados em nosso estudo ( $146,1 \pm 19,2$  g) cuja  $P_{cO_2}$  foi de 31 mmHg.

Os teleósteos mostram uma considerável variação nas  $P_{cO_2}$ , mas na maioria dos oxi-reguladores os valores da  $P_{cO_2}$  estão entre 40 e 20 mmHg (RANTIN & JOHANSEN, 1984). Fernandes & Rantin (1989), afirmam que as espécies de ambientes tropicais estão mais frequentemente sujeitas à hipóxia ambiental e os baixos valores de  $P_{cO_2}$  podem representar uma vantagem adaptativa, pois permitem uma maior capacidade de regular a tomada de  $O_2$  do meio. Dessa forma, aumentos nos valores de  $P_{cO_2}$  tendem a dificultar a sobrevivência desses animais em ambientes hipóxicos.

A exposição à MC-LR aumentou a  $P_{cO_2}$  de *Hoplias malabaricus* em 38% (de 31 mmHg Controle para 43 mmHg no Mcis). Efeitos semelhantes sobre os valores da  $P_{cO_2}$  de teleósteos de água doce vêm sendo observados em várias classes de poluentes aquáticos, tais como organofosforados (OLLE, 2007; THOMAZ, 2008), glicinas (ANELLI, 2010), metais pesados (MONTEIRO, 2011) e cianotoxinas (MARTINS et al, 2011). No que concerne às cianotoxinas, é muito escassa na literatura a descrição de seus efeitos sobre parâmetros *in vivo*, quanto mais sobre efeitos cardiorrespiratórios em peixes. No presente estudo observamos aumento de 12 % nos valores de  $P_{cO_2}$  de *B. amazonicus* no grupo exposto à MC-LR. Comparativamente, o aumento exibido na  $P_{cO_2}$  de *Hoplias malabaricus* exposto à microcistina foi maior, com cerca de 38% em relação ao Controle. Apesar desse valor indicar talvez uma maior susceptibilidade de *H malabaricus* ao efeito da MC-LR, não ocorreram mortes durante os experimentos realizados em ambos os grupos de traíras, diferente do que foi observado em matrinxã. Tal fato pode indicar que mesmo com alterações proporcionalmente maiores em sua tensão crítica de oxigênio, *H*

*malabaricus* conseguiu compensar os efeitos da MC-LR durante hipóxia, provavelmente por exibir adaptações como alta afinidade hemoglobina–oxigênio (JOHANSEN et al., 1978), alta capacidade anaeróbica (DRIEDZIC et al., 1978; HOCHACHKA et al., 1978) e extensa área de superfície respiratória (FERNANDES & RANTIN, 1985) que lhe conferem sua já atestada capacidade de sobrevivência em ambientes com pouca quantidade de oxigênio.

A exposição à MC-LR aumentou significativamente (7,23 U) a  $\dot{V}O_2$  de *H. malabaricus* do grupo Mcis em relação ao grupo Controle. De acordo com Fernandes & Rantin, 1989, para que a homeostase respiratória se mantenha, torna-se necessário a mobilização de mecanismos compensatórios como o aumento da  $\dot{V}_G$  assegurando, desta maneira, a eficiência respiratória nas trocas gasosas. Assim como observado nos matrinxãs do presente estudo, o grupo Mcis de traíra exibiu aumento significativo nos seus valores de  $\dot{V}_G$  em relação ao grupo Controle. Sabe-se que aumentos na ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) requerem gasto de energia para serem realizados (HOCHACHKA, 1980), sendo assim, é possível que o aumento no consumo de oxigênio observado no grupo Mcis, seja decorrente da necessidade adicional de energia para o desenvolvimento da hiperventilação exibida por esse grupo. Como já indicado em matrinxãs no presente estudo, a exposição à MC-LR induziu aumentos na atividade de algumas enzimas do sistema de defesa antioxidante em *H. malabaricus*. Segundo autores como Rao & Rao (1981) e Heat (1995), é comumente observado como um efeito subletal da intoxicação em peixes, um aumento da demanda energética para suportar os processos de desintoxicação e reparo. Nesse cenário é possível que parte do aumento exibido na  $\dot{V}O_2$  em traíras do grupo Mcis, possa advir da maior necessidade energética por parte do sistema de defesa antioxidante.

#### 4.1.2. Ventilação Branquial ( $\dot{V}_G$ ), Frequência Respiratória ( $f_R$ ) e Volume Ventilatório ( $V_T$ ).

Os valores de  $\dot{V}_G$  encontrados para *Hoplias malabaricus* em normóxia, observados no presente estudo (561,9 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>), foram superiores aos descritos por Monteiro (2011), Rantin et al. (1992) e Kalinin et al. (1993; 1996) para a mesma espécie. Entretanto esses valores de  $\dot{V}_G$  são equivalentes aos encontrados para espécies que habitam águas rápidas e bem oxigenadas como pacu, *P. mesopotamicus* (546 mLH<sub>2</sub>O.kg<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>; GUERRA, 1992), curimatá, *P. scrofa* (451



$\text{mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ; FERNANDES et al., 1995), dourado, *S. maxillosus* ( $914 \text{ mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ; SOUZA et al., 2001) e matrinxã ( $746 \text{ mlH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ; MONTEIRO, 2011). Os resultados do presente trabalho destoam da maioria dos dados acerca da  $\dot{V}_G$  de *H. malabaricus* disponíveis na literatura. Como descrito anteriormente, a traíra é uma espécie sedentária que habita geralmente águas paradas e com pouco oxigênio. Seus valores de  $\dot{V}_G$  em normóxia no presente trabalho se assemelharam mais com espécies de hábito ativo e habitats de águas rápidas e oxigenadas.

Alguns autores realizaram estudos morfológicos e morfométricos das brânquias de muitos peixes, demonstrando possíveis adaptações dessas estruturas básicas ao modo de vida do animal (HUGHES & SHELTON, 1962; HUGHES, 1966; 1984). De acordo com esses autores, peixes ativos possuem maior área branquial por unidade de massa corpórea do que peixes mais lentos e de fundo. Ainda segundo os autores, peixes ativos têm filamentos branquiais mais longos, bem como maior número de lamelas secundárias, resultando em grande superfície funcional respiratória que satisfaria sua maior necessidade de oxigênio em função de seu maior consumo. Em contrapartida, peixes sedentários teriam menor superfície respiratória funcional (menores filamentos branquiais com lamelas menos numerosas e mais espaçadas) devido a menor exigência no consumo de  $\text{O}_2$ . Entretanto, Fernandes & Rantin (1985), estudando a morfometria branquial de traíras em relação ao tamanho corpóreo observaram que *Hoplias malabaricus* contradiz essa hipótese de que peixes ativos possuem uma maior área para a respiração em relação aos peixes lentos. Comparativamente os autores constataram que *H. malabaricus* possui área média das lamelas secundárias similar à de peixes ativos como a cavala (*Scomber scombrus*) e cerca de 1,6 a 2,8 vezes superior a de peixes ativos de água doce como a perca (*Stizostedion vitreum vitreum*) e a truta, (*Salmo gairdneri*). Nesse cenário, pode ser que ao ser exposta à tensão de  $\text{O}_2$  de 140mmHg durante a aclimatação (cerca de 12 horas) as traíras do presente estudo tenham apresentado um comportamento ventilatório semelhante aos de peixes ativos que habitam esse tipo de ambiente com água bem oxigenada, exibindo assim maiores valores de ventilação branquial, acompanhados de menor  $\text{EO}_2$  em normóxia. Tal comportamento é possível para a referida espécie pois, como descrito por Fernandes & Rantin (1985), *H. malabaricus* não possui as limitações morfológicas que parte dos peixes de hábito sedentário e de ambiente lântico possuem, pelo contrário, *Hoplias malabaricus* tem potencial ventilatório maior do que algumas espécies ativas.

Diversos estudos têm descrito aumentos na ventilação branquial ( $\dot{V}_G$ ) como resposta primária à hipóxia ambiental, em várias espécies de peixes, como pacu,

*Piaractus mesopotamicus* (KALININ et al., 2000), traíra, *Hoplias malabaricus*, trairão, *Hoplias lacerdae* (RANTIN et al., 1992; MONTEIRO, 2011), carpa comum, *Cyprinus carpio* (SAUNDERS, 1962; LOMHOLT & JOHANSEN, 1979), *Oreochromis niloticus* (MARTINS et al., 2011; THOMAZ, 2008) *Brycon amazonicus* (OLLE, 2007; MONTEIRO, 2011).

De acordo com o que descreve Dejours (1981), na equação fundamental da fisiologia respiratória (referida acima), a manutenção de uma taxa metabólica constante frente à hipóxia ambiental, só é possível, se ocorrer um aumento na ventilação branquial e/ou na extração de O<sub>2</sub> da corrente ventilatória (EO<sub>2</sub>). Como a capacidade de aumento na EO<sub>2</sub> é muito limitada em peixes, o aumento na  $\dot{V}_G$  é necessário para a manutenção da  $\dot{V}O_2$  e constitui a mais efetiva compensação durante reduzidas disponibilidades de O<sub>2</sub> na água (KALININ, 1996).

No presente estudo, ambos os grupos exibiram aumentos na  $\dot{V}_G$  na tensão de O<sub>2</sub> de 40 mmHg em relação à normoxia (aumentos de 2,0 vezes no grupo Controle e de 2,6 vezes no grupo Mcis). Tais aumentos foram inferiores aos descritos por Monteiro (2011) e Kalinin (1991), de 7,3 e 5,7 vezes respectivamente. Essa diferença na magnitude dos aumentos da  $\dot{V}_G$  observada no presente estudo em relação a esses autores é provavelmente derivada dos altos valores normóxicos observados para esse parâmetro em nosso estudo. Foram observados aumentos na ventilação branquial para outras espécies de peixes tropicais em resposta à hipóxia, tais como *P. scrofa*, (12 vezes), *C. macropomum* (10,9 vezes), *Hoplias lacerdae*, (8,5 vezes), *O. niloticus*, com 13 vezes de aumento (FERNANDES et al., 1995; CORRÊA, 1996; KALININ et al., 1996; MARTINS, 2010). As respostas ventilatórias desempenham um papel fundamental na permanência de peixes em águas pobres em O<sub>2</sub>, pois são respostas imediatas enquanto que vários dias podem ser necessários para o completo ajuste da capacidade de transporte de O<sub>2</sub> do sangue (WEBER, 1982).

Os valores de  $\dot{V}_G$  do grupo exposto à MC-LR (Mcis) foram significativamente superiores aos animais do grupo Controle (296,8 U) independente da P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> analisada no experimento. De maneira análoga a que foi vista anteriormente em *Brycon amazonicus*, na aplicação da equação proposta por Dejours (1981), podemos constatar que o aumento nos valores da  $\dot{V}_G$  do grupo Mcis em relação ao grupo Controle foi a estratégia fisiológica utilizada para que esses animais pudessem manter sua  $\dot{V}O_2$  constante, dado que os valores de EO<sub>2</sub> do grupo Mcis foram significativamente inferiores (11,8 U) em comparação ao Controle. Possivelmente, a hiperventilação observada para o grupo Mcis permitiu que os animais desse grupo

mantivessem a homeostase respiratória sendo capazes de compensar a redução na extração de  $O_2$  exibida por esse grupo.

Diversas espécies de teleósteos utilizam diferentes estratégias para o desenvolvimento da hiperventilação em resposta à hipóxia. Em animais como a carpa, *Cyprinus carpio* e em *Lepomis macrochirus*, o aumento da  $\dot{V}_G$  é devido à maior elevação da  $f_R$  do que no  $V_T$  (MARVIN & HEAT, 1968; LOMHOLT & JOHANSEN, 1979), enquanto que em tilápia, *Oreochromis niloticus*, o aumento da  $\dot{V}_G$  ocorre com a elevação simultânea da  $f_R$  e do  $V_T$  (FERNANDES & RANTIN, 1989). Entretanto, a resposta à hipóxia mais frequentemente observada em teleósteos baseia-se na hiperventilação através de um maior aumento do  $V_T$  do que da  $f_R$ . Esse padrão de resposta está relacionado à vantagem representada pelo menor custo energético da elevação da  $\dot{V}_G$  através de um maior aumento do  $V_T$  do que na  $f_R$  (KALININ, 1991). De acordo com RANTIN et al. (1992), a utilização desta estratégia respiratória baseia-se no baixo custo para a manutenção da velocidade e constância da contração muscular, enquanto que uma alta frequência de contração é limitada pelo trabalho muscular contra uma alta viscosidade da água ventilada.

De acordo com os as respostas observadas para os parâmetros  $\dot{V}_G$ ,  $f_R$  e  $V_T$ , nota-se que os valores da frequência respiratória não apresentaram alterações em relação à hipóxia, enquanto que os valores do  $V_T$  foram significativamente alterados durante as  $P_{in}O_2$  de 80 a 60 mmHg (aumento de 3,6 U) e 60 a 40 mmHg (aumento de 5,0 U). Dessa forma, pode-se concluir que a estratégia respiratória utilizada por *Hoplias malabaricus* em resposta á hipóxia ambiental no presente estudo é a de uma hiperventilação decorrente de maiores elevações no  $V_T$  do que na  $f_R$ , semelhante ao que ocorre com outras espécies como tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (FERNANDES & RANTIN, 1989), curimatá, *Prochilodus scrofa* (FERNANDES et al., 1995) e o cascudo, *Hypostomus regani* (MATTIAS et al., 1998).

A exposição à MC-LR diminuiu significativamente a  $f_R$  do grupo Mcis (5,3 U), porém os valores do  $V_T$  exibiram aumento significativo em resposta à exposição à MC-LR (4,0 U). Apesar da diminuição na  $f_R$  observada no grupo Mcis, seus valores de  $\dot{V}_G$  foram mais elevados em comparação ao grupo Controle, devido principalmente aos aumentos exibidos pelo  $V_T$  frente à exposição à microcistina, o que corrobora que a estratégia respiratória utilizada por *Hoplias malabaricus* no presente estudo foi maior aumento no  $V_T$  do que na  $f_R$ .

#### 4.1.3. Extração de O<sub>2</sub> da Corrente Ventilatória (EO<sub>2</sub>).

Os valores de EO<sub>2</sub> observados em normóxia para *Hoplias malabaricus* no presente estudo ficaram em torno de 62%. Apesar desses valores representarem uma boa extração de oxigênio, estão bem abaixo do que geralmente é exibido por essa espécie. Como exemplo podemos citar estudos como o de Kalinin (1991) e Monteiro (2011) que encontraram valores significativamente superiores (83 e 85 % respectivamente) para esse parâmetro em traíras. Tais discrepâncias podem ser resultado de diferenças metodológicas como a posição dos cateteres inseridos no opérculo (STEFFENSEN, 1989).

O aumento da ventilação é frequentemente acompanhado por uma diminuição na EO<sub>2</sub> da corrente ventilatória. Essa reduzida eficiência na troca de gases pode ter várias causas inter-relacionadas, como, por exemplo, a aumentada velocidade da água reduz o tempo de difusão e provavelmente altera a geometria das brânquias ou pode ocorrer equiparação abaixo do ótimo entre a ventilação e a perfusão de sangue nas lamelas secundárias (KALININ, 1991; STEFFENSEN et al., 1982).

Como descrito anteriormente, no presente estudo *H. malabaricus* exibiu altos valores de  $\dot{V}_G$  em normóxia, talvez esse aumento na ventilação possa ter colaborado para a menor EO<sub>2</sub> em relação aos valores comumente observados para a espécie em questão. Comparativamente, os valores de EO<sub>2</sub> encontrados para traíra no presente trabalho, são semelhantes aos observados para espécies ativas como o pacu, *P. mesopotamicus* com uma EO<sub>2</sub> de 61% (GUERRA, 1992), o curimatá, *P. scrofa* de 63% (FERNANDES et al., 1995), a carpa, *C. carpio* de 72% (SAUNDERS, 1962) e o matrinxã, *B. amazonicus* de 55% (MONTEIRO, 2011).

A exposição à hipóxia gradual não teve efeito significativo nos valores da extração de O<sub>2</sub> de *Hoplias malabaricus* em nenhuma das P<sub>in</sub>O<sub>2</sub> analisadas no presente trabalho, ou seja, os valores da EO<sub>2</sub> de traíras não sofreram influencia significativa da hipóxia, mantendo-se praticamente constantes durante todos os níveis hipóxicos contemplados nesse estudo. Autores como Steffensen et al, (1982), descrevem a importância desse tipo de resposta, como uma estratégia ventilatória à hipóxia em que o aumento na  $\dot{V}_G$  enquanto a EO<sub>2</sub> se mantém relativamente alta e constante constitui uma das mais importantes compensações respiratórias durante reduções na PO<sub>2</sub> ambiental.

A exposição à MC-LR reduziu significativamente (11,8 U) os valores da EO<sub>2</sub> de *Hoplias malabaricus* em relação ao Controle, independente do nível de hipóxia analisado. Essa redução na extração de oxigênio exibida pelo grupo Mcis pode estar

relacionada à perdas na superfície respiratória funcional, ocasionadas por lesões branquiais decorrentes dos efeitos da microcistina nesse tecido. Como já descrito anteriormente, alguns autores apontam para a ocorrência de alterações no tecido branquial de teleósteos expostos à microcistinas, tais como necrose e alterações epiteliais (CARBIS et al., 1997), estresse oxidativo com subsequente destruição celular por lipoperoxidação (PRIETO et al., 2006; PRIETO et al., 2007). Adicionalmente aos resultados obtidos na literatura, em nosso estudo analisamos o efeito da MC-LR (extrato liofilizado contendo MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea) sobre alguns parâmetros bioquímicos de *Hoplias malabaricus*. Observamos que a exposição à microcistina induziu aumentos da ordem de 53% nos níveis de peroxidação lipídica nas brânquias do grupo Mcis em relação ao Controle. Esse aumento na peroxidação lipídica pode levar à lesão tecidual e consequente perda de superfície funcional, que como descrito anteriormente é a possível causa da redução nos valores de  $\text{EO}_2$  observados no grupo Mcis quando comparado ao Controle.

#### **4.1.4. Frequência cardíaca de *Hoplias malabaricus* submetido à hipóxia gradual.**

A  $f_H$  média observada em *Hoplias malabaricus* durante normóxia foi de 47 bpm, esse valor ficou abaixo dos verificados por Rantin et al. (1993; 1995) e Monteiro (2011) para a mesma espécie. Como citado anteriormente, pode ser que as diferenças entre os valores de  $f_H$  observados no presente trabalho sejam decorrentes de linhagens variantes de traíras (BERTOLLO, 2010), dado que os animais utilizados nos estudos citados tiveram procedências geográficas distintas. Entretanto, a  $f_H$  exibida está próxima à verificada para espécies de peixes tropicais como o pacu, *Piaractus mesopotamicus* (50 bpm; RANTIN et al., 1998) e o tambaqui, *Colossoma macropomum* (48 bpm; RANTIN & KALININ, 1996) e abaixo da  $f_H$  média de espécies ativas como o dourado, *Salminus maxillosus* (97 bpm; SOUZA et al., 2001), e os atuns *Katsuwonus pelamis* e *Thunnus albacares* (BUSHNELL & BRILL, 1992; KORSMEYER et al., 1993).

Durante a hipóxia, a resposta cardíaca usual corresponde a uma bradicardia acompanhada de um aumento do volume sistólico (ALTIMIRAS et al., 1995). Esse reflexo bradicárdico produzido pela hipóxia pode ser valioso para assegurar o desempenho do coração durante a hipóxia do miocárdio (FARREL, 1984). A  $f_H$  dos grupos Controle e Mcis sofreu efeito significativo da hipóxia (bradicardia) em dois momentos distintos, durante a redução da  $P_{in}\text{O}_2$  de 140 a 120 mmHg (4,3 U) e durante a redução nas tensões de  $\text{O}_2$  de 40 a 20 mmHg (12,3 U).

A frequência cardíaca em teleósteos é determinada pelo ritmo intrínseco do marca-passo sinoatrial, estando envolvidos nesta regulação as próprias células marca-passo, hormônios e fibras nervosas colinérgicas e adrenérgicas (FARRELL & JONES, 1992). Apesar da existência de participação adrenérgica, o controle colinérgico vagal tem um papel inibitório fundamental, sendo que a modulação do tônus vagal é apontada como o principal mecanismo de controle da  $f_H$  (LAURENT et al., 1983), ademais a bradicardia reflexa a hipóxia é controlada por receptores branquiais sensíveis a mudanças de  $O_2$  e mediada por fibras do vago (FARREL, 2007). Nesse contexto, a resposta bradicárdica observada durante a redução na tensão de  $O_2$  de 140 a 120 mmHg pode estar relacionada à uma resposta reflexa na modulação da frequência cardíaca via sistema nervoso. Após o animal ter sido aclimatado durante um período de 12 horas aproximadamente a altos níveis de oxigênio (140 mmHg), ocorre a primeira redução na tensão de oxigênio (140 a 120 mmHg). É possível que essa pequena diferença (20mmHg) nos níveis de oxigênio, tenha sido percebida pelos quimiorreceptores branquiais, o que elevou o tônus vagal levando conseqüentemente à bradicardia observada, sendo que após essa resposta inicial, se restabelece o tônus vagal, o qual se manteve estável até os valores próximos à  $P_cO_2$ . O segundo episódio de bradicardia reflexa à hipóxia ocorreu durante a redução das  $P_{in}O_2$  de 40 a 20 mmHg, onde houve diminuição significativa (12,3 U) da  $f_H$  de *H. malabaricus* caracterizando dessa forma o efeito bradicárdico usualmente observado em teleósteos em situação de hipóxia.

Existem poucos trabalhos na literatura, acerca dos efeitos das microcistinas sobre a função cardíaca de peixes. Destacam-se os trabalhos de Martins et al. (2011) observaram redução na frequência cardíaca de *O. niloticus* expostos à injeções intraperitoneais de MC-LR purificada e Atencio et al. (2008) que verificaram a ocorrência de histopatologias nos miócitos cardíacos de *O. niloticus* submetidos à injeções i.p de MC-LR (500  $\mu\text{g}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de massa corpórea).

Em nosso estudo, a exposição à MC-LR aumentou significativamente os valores de  $f_H$  do grupo Mcis (3,9 U) em relação ao grupo Controle, independente do nível hipóxico analisado. Best et al. (2001) expuseram alevinos de *Salmo trutta* à extratos de cianobactérias contendo microcistinas nas concentrações de 5, 50 e 500  $\mu\text{g}$  MC-LR equivalentes/  $\text{l}^{-1}$ . Os autores observaram aumentos de frequência cardíaca em todas as concentrações estudadas. É possível que a maior frequência observada no grupo Mcis possa ser uma resposta adrenérgica ao estresse causado pela ação da MC-LR, assim como ocorre em mamíferos (ECKERT et al., 1988). Embora possam ser levantadas várias explicações acerca do papel da MC-LR sobre a frequência cardíaca

*in vivo* de peixes, são necessários maiores estudos para que possamos elucidar melhor esses mecanismos e sair do campo das especulações.

#### 4.1.5. Necessidade Ventilatória ( $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ).

Segundo Dejours (1981), a eficiência das brânquias como órgão trocador de  $O_2$  pode ser avaliada por meio da necessidade ventilatória (“water convection requirement” -  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ ), também conhecido como requerimento branquial de convecção de água. Segundo Kalinin (1996), aumentos na  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  em função da redução na disponibilidade de  $O_2$  do meio são indicativos da redução na eficiência de extração de  $O_2$  da corrente ventilatória, ou seja, uma maior quantidade de água deve passar pela superfície funcional respiratória para que a mesma quantidade de  $O_2$  seja obtida.

A hipóxia gradual a qual a espécie *Hoplias malabaricus* foi submetida alterou de maneira significativa os valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  em todas as  $P_{in}O_2$  analisadas, com exceção ao intervalo 140 a 120 mmHg. No grupo Controle os valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  aumentaram cerca de 7,5 vezes enquanto que no grupo Mcis esse aumento foi de 8,4 vezes.

Em relação ao efeito da microcistina, foi observado que a exposição à MC-LR aumentou significativamente (2,3 U) os valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  em relação ao grupo Controle. Na ciência de que aumentos na  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  em função da hipóxia ambiental, são indicativos da redução na eficiência de extração de  $O_2$  da corrente ventilatória (KALININ, 1996), é possível atestar que as reduções causadas pela exposição à MC-LR nos valores de  $EO_2$  são responsáveis pelo aumento exibido nos valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  do grupo Mcis no presente estudo. Nesse contexto, é razoável admitir que o grupo Mcis necessitou de maiores valores de  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  pois era preciso que esses animais ventilassem uma maior quantidade de água para que a mesma quantidade de oxigênio fosse extraída. Ademais, esse aumento nos valores da  $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$  indica maior gasto de energia por parte do grupo Mcis, reforçando a hipótese de que o maior consumo de oxigênio ( $\dot{V}O_2$ ) observado no grupo Mcis esteja relacionado com esses gastos energéticos relacionados à elevações nas respostas ventilatórias.

## 5. CONCLUSÕES

Podemos concluir que a exposição por 48 horas à MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea aumentou a demanda energética de *Hoplias malabaricus* através do desenvolvimento da hiperventilação e possivelmente do aumento da atividade do sistema de desintoxicação.

Apesar da exposição à MC-LR ter alterado as respostas cardiorrespiratórias frente à hipóxia, bem como diminuído o limiar de regulação da taxa metabólica, o que indicaria maior susceptibilidade aos baixos níveis de  $\text{O}_2$  na água, essa espécie se mostrou capaz de compensar os efeitos deletérios da microcistina sobre suas funções vitais, o que impediu a ocorrência de mortes durante a realização dos experimentos.

A presença da MC-LR causou taquicardia em *H. malabaricus*, possivelmente tal efeito seja devido a uma resposta adrenérgica frente à exposição a essa cianotoxina.



## **CAPÍTULO IV**

**EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE BIOMARCADORES DO  
ESTRESSE OXIDATIVO EM MATRINXÃ, *Brycon amazonicus*  
(SPIX & AGASSIZ, 1829)**

## 1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas de oxigênio (ERO), comumente conhecidas como radicais livres, são átomos, moléculas ou íons que possuem um ou mais elétrons não-pareados em seus orbitais mais externos, o que lhes confere a sua alta reatividade característica. Em geral são formadas por absorção de radiação, reações redox, processos de catálise enzimática e exposição a xenobióticos. Estas espécies reativas de oxigênio incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas: o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), o oxigênio “singlet” ( $^1O_2$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o radical hidroperoxil ( $HO_2^{\bullet}$ ), entre outros.

Estas espécies químicas, formadas por elétrons livres ou não-pareados têm uma instabilidade elétrica muito grande, e por esta razão, mesmo tendo meia vida curta, apresentam grande capacidade reativa. A fim de captar um elétron para sua estabilização, estes radicais podem reagir com qualquer composto que esteja próximo, como açúcares, proteínas, lipídios, DNA entre outros e, a partir daí, ocorrem reações em cadeia que podem culminar em lesão e morte celular (SLATER, 1984; HALLIWELL, 1987; JORDÃO JUNIOR et al., 1998). Por ser resultante de um processo contínuo e natural, a formação de ERO é controlada por sistemas antioxidantes enzimáticos existentes nas células, a fim de controlar seus níveis de formação dentro da faixa onde esses não são tóxicos (SIES;1993).

Por definição, uma substância antioxidante é aquela capaz de diminuir ou inibir os processos de oxidação, mesmo quando presentes em baixas concentrações (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Do ponto de vista biológico, podemos definir antioxidantes como aqueles compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (ANDRADE JUNIOR et al., 2005).

As células possuem sistemas antioxidantes que visam proteger sua integridade perante a ação das ERO. As enzimas respondem pelo sistema antioxidante enzimático, onde se destacam a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), a glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx), dentre outras. Existe também o sistema antioxidante não-enzimático, do qual fazem parte a glutathione reduzida (GSH), algumas vitaminas como a vitamina E, carotenóides, dentre outros (HALLIWELL, 1996; SCHLENK et al., 1999).

A SOD catalisa a dismutação do radical  $O_2^{\bullet-}$  em  $H_2O_2$  e  $O_2$  enquanto que a CAT é responsável pela redução do  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . A SOD e a CAT são consideradas as defesas antioxidantes primárias responsáveis pela neutralização das

primeiras ERO geradas (PANDEY et al., 2003; REGOLI et al., 2003; VAN der OOST et al., 2003).

A GST faz parte de uma família de isoenzimas que desempenha um papel importante na resposta ao estresse oxidativo. É considerada uma enzima de desintoxicação por metabolizar uma grande variedade de substratos hidrofóbicos e eletrofílicos, como os xenobióticos, por meio da conjugação destes com a glutatona reduzida (GSH), formando conjugados solúveis em água, reduzindo sua toxicidade e facilitando sua excreção (WILCE & PARKER, 1994; VAN der OOST et al., 2003). Além disso, algumas isoformas da GST apresentam atividade de peroxidase, atuando na desintoxicação de hidroperóxidos de lipídio. A GPx é uma enzima antioxidante endógena que catalisa a redução do  $H_2O_2$  e de hidroperóxidos de ácidos graxos (LOOH, L é um lipídio), convertendo-os em água e seus correspondentes alcoóis não-tóxicos, respectivamente (NORDBERG & ARNER, 2001), por oxidação da glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG). A GPx é extremamente específica para a GSH e é capaz de desintoxicar rapidamente o  $H_2O_2$  e certos hidroperóxidos (LIEBLER & REED, 1997).

A glutatona é um tripeptídeo que contém um grupo sulfidril (-SH) presente na cisteína, o que confere a esta molécula grande capacidade redutora (MEISTER & ANDERSON, 1983). Sua forma varia entre o tiol reduzido (GSH) e oxidado (GSSG), na qual dois tripeptídeos de glutatona estão unidos por uma ligação dissulfeto. O grupo sulfidril interage com um radical livre para formar um radical glutatona, que dimeriza para formar a glutatona oxidada (GSSG). A glutatona oxidada é então reciclada (reduzida) outra vez em glutatona reduzida (GSH) para reutilização por meio da enzima glutatona redutase (GR) (MONTEIRO, 2006, 2011).

Na eliminação das ERO, estes sistemas antioxidantes de defesa atuam com elevada sincronia e de forma altamente cooperativa, de modo que quaisquer distúrbios, como a contaminação por microcistinas, podem levar ao excesso de produção da ERO e indução de estresse oxidativo, implicando em inúmeros danos celulares. (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Os radicais livres são formados dentro das condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos de defesas celulares (antioxidantes). Ocorre o estresse oxidativo quando há um distúrbio no equilíbrio dinâmico entre a produção de agentes oxidantes e a concentração de antioxidantes, causando danos celulares. Portanto, na defasagem de sistemas antioxidantes, no excesso da produção de ERO ou na conjugação de ambos os fatores, o meio celular fica sujeito ao estresse oxidativo que, por sua vez, pode levar à morte celular (BIESALSKI, 2000).

Dentre os mecanismos de lesão decorrente do estresse oxidativo, podemos destacar dois em especial: a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) e a oxidação proteica. A LPO consiste na oxidação da camada lipídica da membrana celular, gerando falência dos mecanismos das trocas metabólicas e, numa condição extrema, à morte celular. Trata-se de uma reação em cadeia, pois se propaga continuamente, levando à formação de lipoperóxidos e à destruição e morte celular (BENZIE, 1996). Já a oxidação proteica pode ser caracterizada pela formação de proteínas carboniladas. A formação de derivados carbonilados é irreversível, o que causa alterações conformacionais nas proteínas, alterando a atividade catalítica das enzimas e/ou aumentando a susceptibilidade das proteínas à ação de proteases, ocasionando quebra de cadeias polipeptídicas (ALMROTH et al., 2005).

O mecanismo clássico da toxicidade das microcistina envolve a inibição das fosfatases proteicas de serina/treonina, em particular as do tipo 1 e 2A (PP1 e PP2A) (HONKANEN et al., 1990; MACKINTOSH et al., 1990; TOIVOLA & ERIKSSON, 1999; GUZMAN et al., 2003), entretanto a despeito desses efeitos, muitos estudos vêm demonstrando que a exposição à essas cianotoxinas é capaz de gerar EROs podendo levar a um estabelecimento de estresse oxidativo (PAVAGADHI & BALASUBRAMANIAN, 2013). Vários trabalhos confirmam o fato de que o dano oxidativo decorrente da geração excessiva de EROs está relacionado à toxicidade das MCs tanto em ambiente natural (QIU et al., 2007; ADAMOYSKY et al., 2007) quanto sob condições laboratoriais (LI et al., 2003; JOS et al., 2005; Prieto et al., 2006). Alguns autores sugerem que o mecanismo pelo qual as microcistinas podem gerar as EROs ocorre através da interrupção na cadeia de transporte de elétrons que ocorre na mitocôndria (DING et al., 2002).

De maneira complementar às evidências na participação das EROs na toxicidade atribuída às microcistinas, diversos estudos vêm relatando alterações no sistema de defesa antioxidante de organismos aquáticos expostos às MCs. Em peixes, esse tipo de resposta tem sido observada em diversos órgãos como fígado, brânquias, coração, rins, entre outros (ATENCIO et al., 2008; JOS et al., 2005; PRIETO et al., 2006; PRIETO et al., 2007; LI et al., 2003; PFLUGMACHER et al., 1998).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais utilizados**

Exemplares juvenis e de ambos os sexos de matrinxã, *Brycon amazonicus*, foram adquiridos na piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, SP. Após a

coleta, os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde foram mantidos em tanques com capacidade de 1000 L, dotados de recirculação de água aerada e termostatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), por um período mínimo de 30 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante esse período foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada com conteúdo proteico de 24%.

## **2.2. Delineamento experimental**

Após o período de aclimação, os exemplares de *Brycon amazonicus* foram pesados ( $W_T=210,0 \pm 42,1$  g) divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: o grupo controle (Controle,  $n = 8$ ) e o grupo exposto à toxina (Mcis  $n = 8$ ). Os peixes do grupo Mcis receberam uma injeção intraperitoneal (0,5 mL de salina 0,9%) do extrato liofilizado da cepa RST9501 de *M.aeruginosa*, contendo a toxina MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea. Após a injeção esperou-se durante um período de 48h até a coleta das amostras de tecidos. Durante esse período os animais ficaram separados em tanques com capacidade de 1000 L, dotados de recirculação de água aerada e termostatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

## **2.3. Coleta das amostras dos tecidos**

Ao final das 48 horas de exposição à MC-LR os animais foram coletados dos tanques e sacrificados por transecção da coluna espinal para sacrifício imediato. Não foi utilizado qualquer tipo de anestésico durante a coleta de tecidos pelo fato destas drogas causarem alterações na atividade de algumas enzimas antioxidantes, em especial a superóxido dismutase e a glutatona peroxidase (WDZIECZAK et al., 1982; GODIN & GARNETT, 1994). Após o sacrifício dos animais, o fígado e as brânquias foram coletados e devidamente dissecados em placas de vidro mantidas sob gelo a fim de se obter o fígado sem gordura e vesícula biliar e os filamentos branquiais separados de seus arcos branquiais. Os tecidos foram lavados em salina 0,9% para retirada de impurezas, secos superficialmente em papel filtro, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  para posterior análise dos parâmetros bioquímicos.

## **2.4. Procedimentos bioquímicos.**

Os tecidos congelados foram rapidamente amostrados sobre superfície gelada e pesados em quantidades apropriadas para as determinações enzimáticas. Para

todas as determinações bioquímicas, o fígado e as brânquias em tampão de homogeneização na proporção de 1:5 (w/v).

Para as análises das atividades das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) e para determinação dos níveis de LPO medidas pelo ensaio de FOX os tecidos foram homogeneizados a 18.000 rpm (Homogeneizador Turratec TE 102, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) em dois "strokes" de 30 segundos, sob banho de gelo, em tampão fosfato de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  0,1 M pH 7,0, conforme descrito em MONTEIRO et al. (2006). Após a homogeneização, os extratos foram centrifugados a 14 000 g por 30 minutos a 4°C para a obtenção do sobrenadante (AHMAD et al., 2000), que foi usado para as determinações bioquímicas descritas acima bem como para a determinação do conteúdo de proteína total.

Para a quantificação dos níveis de glutathione reduzida (GSH) os sobrenadantes dos homogeneizados dos tecidos foram tratados com TCA 12% na proporção 1:1 para a desproteinização. Após o tratamento com TCA, as amostras foram centrifugadas a 11.000 g durante 10 a 4°C, para precipitar as proteínas, e os sobrenadantes foram usados para análise do conteúdo de GSH.

Para a análise do conteúdo de proteína carbonilada (PC), os tecidos foram homogeneizados a 13. 000 g em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,4) contendo 1 mM de EDTA e PMSF 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (REZNICK & PACKER, 1994). Os homogeneizados ficaram por 15 minutos a temperatura ambiente e, em seguida, foram centrifugados 8 000 g por 10 minutos. Os sobrenadantes foram utilizados para as dosagens dos grupamentos carbonil das proteínas.

Todas as leituras espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro Spectronic Genesys 5. (Milton Roy Co., Rochester, NY, USA) a 25 °C. Para cada uma das análises descritas a seguir, as amostras foram realizadas em duplicata.

## **2.5. Análise da Atividade das Enzimas Antioxidantes**

### **2.5.1. Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)**

A atividade da SOD (E.C. 1.15.1.1) foi determinada segundo o método McCORD & FRIDOVICH (1969), descrito por FLOHÉ & ÖTTING (1984), com base na inibição da velocidade de redução do citocromo c pelo radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) gerado no sistema xantina/xantina oxidase. A reação é catalisada pela xantina oxidase

que promove a transformação da xantina em ácido úrico e transfere um elétron para o  $O_2$  molecular produzindo  $O_2^{\bullet-}$ . Paralelo a esta reação, ocorre a redução do citocromo c pelo  $O_2^{\bullet-}$ , que é medida pelo aumento de absorbância em 550 nm. A adição da SOD inibe a velocidade de redução do citocromo c, uma vez que a SOD compete com este citocromo pelo  $O_2^{\bullet-}$ , dismutando-o a  $H_2O_2$ . A reação ocorreu em um meio contendo tampão fosfato de  $Na^+/K^+$  50 mM pH 7,8 com 0,1 mM de EDTA, citocromo c 20 mM, xantina 0,05 mM, extrato enzimático (sobrenadante dos homogenados) contendo a SOD e xantina oxidase  $\sim 0,2 U.mL^{-1}$ . A quantidade de SOD adicionada foi suficiente para manter a taxa de referência (que contém os itens citados acima, exceto o extrato enzimático) em 0,025 abs./min a 550 nm. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir, em 50%, a redução do citocromo c. Os valores de SOD foram expressos em  $U.mg\ prote\acute{a}na^{-1}$ .

### **2.5.2 Determinação da atividade da catalase (CAT)**

A atividade da CAT (E.C. 1.11.1.6.) foi determinada pela avaliação contínua do decréscimo da concentração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a 240 nm (AEBI, 1974). A diminuição na absorbância foi registrada em cubeta contendo uma solução recém preparada de  $H_2O_2$  15 mM em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,0 e amostra do extrato enzimático. A reação foi iniciada com a adição da solução de  $H_2O_2$ . Os valores da CAT foram expressos em Unidades de Bergmeyer (U.B. - quantidade de catalase que libera a metade do oxigênio de uma solução de peróxido de hidrogênio de qualquer concentração no intervalo de tempo de 100 segundos a 4°C) por mg de proteína ( $U.B.mg\ prote\acute{a}na^{-1}$ ).

### **2.5.3 Determinação da atividade da glutaciona peroxidase selênio-dependente (Se-GPx)**

A atividade da Se-GPx (E.C. 1.11.1.9) foi determinada através da oxidação do NADPH em presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), de acordo com o método descrito por NAKAMURA et al. (1974) com algumas modificações. A mistura de reação continha tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 com 2 mM de EDTA, NADPH 0,2 mM, azida sódica ( $NaN_3$ ) 1mM, GSH 1 mM, glutaciona redutase (GR)  $1 U.mL^{-1}$  e extrato enzimático contendo GPx (sobrenadante dos homogenados). A reação foi iniciada pela adição de 0,2 mM de  $H_2O_2$ . A taxa de oxidação do NADPH foi avaliada pelo decaimento da absorbância a 340 nm. A taxa de oxidação não enzimática foi medida

substituindo-se o extrato enzimático por água destilada. Essa taxa de referência foi extraída da taxa das amostras para determinar somente a atividade enzimática. A atividade da GPx foi calculada através do coeficiente de extinção molar do NADPH  $\epsilon_{340\text{nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  e expressa como nmoles de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína ( $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ).

#### **2.5.4 Determinação da atividade da glutathiona S-transferase (GST)**

A atividade da GST (E.C. 2.5.1.18) foi medida de acordo com HABIG et al. (1974) usando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. A reação ocorreu em um meio contendo 1 mM de CDNB em etanol, 1mM de GSH, tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0 e extrato enzimático (sobrenadante dos homogenados). A formação do aducto glutathiona-2,4- dinitrobenzeno foi monitorada pelo aumento da absorbância em 340 nm contra um branco. Uma unidade da GST foi expressa como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 nmol de produto por minuto por mg de proteína ( $\text{mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ).

#### **2.6. Determinação do conteúdo de antioxidante Não - enzimático (Glutathiona reduzida - GSH).**

A concentração de glutathiona reduzida nos tecidos foi medida de acordo com a metodologia de BEUTLER et al. (1963), usando o reativo de Elmann (ácido 5,5'-ditio di-2-nitrobenzoico – DTNB) adaptada por WILHELM-FILHO (1996) e WILHELM-FILHO et al. (2005). Aos sobrenadantes dos extratos ácidos obtidos após a desproteíntização, foram adicionados 0,25 mM de DTNB em tampão fosfato 0,1 M pH 8,0 na proporção de 1:1 para os tecidos. A formação do ânion tiolato, que resulta da reação da GSH com o reativo de Elmann, foi determinada em espectrofotômetro a  $\lambda = 412 \text{ nm}$ . O coeficiente de extinção molar de  $13,6 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$  da GSH nessas condições foi utilizado no cálculo da concentração da GSH nos tecidos ( $\text{nmol} \cdot \text{mg proteína}^{-1}$ ).

#### **2.7. Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica.**

A peroxidação lipídica dada em hidroperóxido de lipídio foi quantificada pelo método FOX (“ferrous oxidation-xylene orange”) como descrito por JIANG et al. (1992). O método FOX é baseado na oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  pelos hidroperóxidos em meio ácido na presença de um pigmento complexador de Fe (III), o alaranjando de xilenol que tem pico de absorção a 560 nm. As amostras (previamente tratadas com



TCA 10%) foram incubadas durante 40 minutos, à temperatura ambiente, com mistura reativa contendo 100 mM de alaranjado de xilenol, 250 mM de  $\text{FeSO}_4$  (sulfato ferroso amoniacal), 25 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e 4 mM de butilato hidroxitolueno (BHT) em metanol 90% (v/v). Os resultados foram expressos em equivalentes de cumeno hidroperóxido ( $\text{nmol.mg de proteína}^{-1}$ ).

## 2.8. Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas

Os danos oxidativos em proteínas foram mensurados pela determinação do conteúdo de proteína carbonilada (PC) baseada na reação com dinitrofenilhidrazina (DNPH) (REZNICK & PACKER, 1994). Os sobrenadantes dos homogenizados dos tecidos foram incubados em 10mM DNPH preparada em HCl 2,5M, no escuro e sob agitação a cada 10 minutos. Em seguida, essas amostras foram tratadas com TCA 50%, colocadas em banho de gelo por 10 minutos e centrifugadas a 8 000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi lavado 3 vezes com solução etanol:acetato de etila 1:1 (v/v). Após a última lavagem, 1 mL de guanidina 6 M foi adicionado a cada uma das amostras, que foram agitadas e colocadas em banho-maria por 30 min. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 8 000 g por 10 minutos para retirada de partículas insolúveis e os sobrenadantes lidos em 370 nm. Para cada amostra foram feitos controles simultâneos contendo o mesmo volume de amostra e somente HCl 2,5 M sem DNPH. Cada um desses controles foi utilizado como próprio branco da respectiva amostra. O conteúdo de grupamentos carbonil nas proteínas foi calculado usando o coeficiente de extinção molar da DNPH  $\epsilon_{370\text{nm}} = 22.000 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ . Os valores de PC foram expressos em  $\text{nmol.mg de proteína}^{-1}$ .

## 2.9. Determinação de Proteína Total

O teor de proteína total nos tecidos foi determinado segundo o método clássico de BRADFORD com Coomassie Brilliant Blue G-250 (BRADFORD, 1976) adaptado para leitura em microplate conforme descrito por KRUGER (1994), utilizando-se albumina bovina como padrão. A absorvância das amostras foi medida a 595 nm.

## 2.10. Tratamento estatístico dos dados

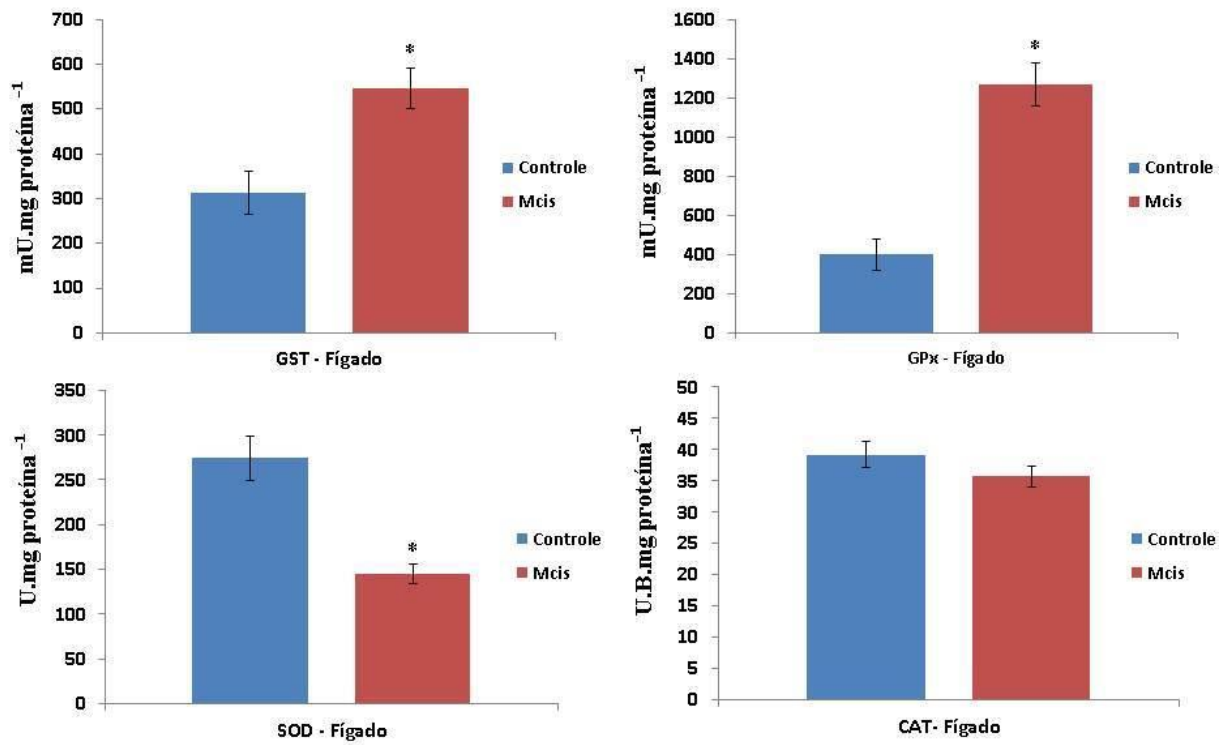
Os valores de todas as determinações foram expressos em média  $\pm$  E.P.M (erro padrão da média) e somente diferenças estatísticas ao nível de 5% de significância foram consideradas. O teste-t de Student não-pareado ou seu correspondente não-paramétrico Mann-Whitney, de acordo com os critérios de normalidade, homogeneidade e homocedasticidade foi aplicado para verificar a ocorrência de possíveis diferenças significativas entre pontos correspondentes de diferentes grupos experimentais (Controle e Mcis) (GraphPad InStat v. 3.0, GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Análise da atividade das enzimas antioxidantes em *Brycon amazonicus*.

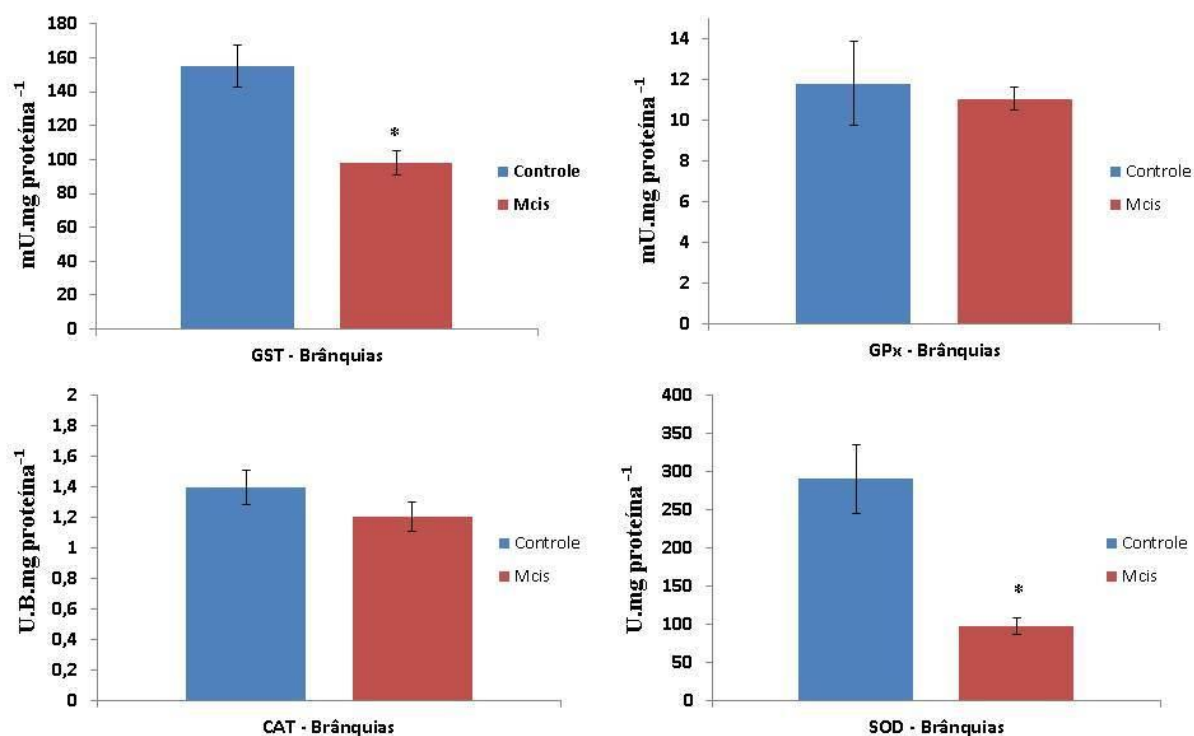
Os resultados apresentados graficamente a seguir, discriminam sobre as respostas das enzimas antioxidantes frente à exposição, via injeção intraperitoneal, ao extrato liofilizado contendo MC-LR na dose de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea durante o período de 48 horas.

A exposição à MC-LR induziu no fígado, aumentos significativos nas atividades das enzimas GST (74%) e GPx (217%), e diminuição de 47% na atividade da enzima SOD. Todavia, a exposição à MC-LR não alterou de maneira significativa a atividade da enzima CAT nesse órgão (Fig 1)



**FIGURA 1.** Atividades das enzimas antioxidantes no fígado dos grupos Controle (n = 8) e exposto à microcistina, Mcis (n = 8) de *Brycon. amazonicus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. (p < 0,05).

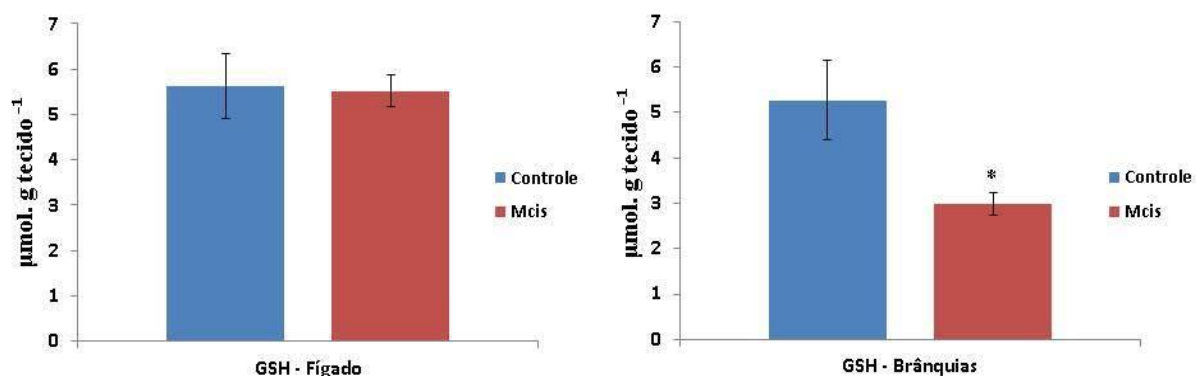
Nas brânquias de *Brycon amazonicus*, a exposição à MC-LR não alterou as atividades das enzimas CAT e GPx em comparação aos valores observados no grupo Controle. Entretanto, as enzimas GST e SOD do grupo Mcis exibiram reduções significativas em suas atividades, na ordem de 37% e 66% respectivamente. Esses resultados podem ser observados na figura 2.



**FIGURA 2.** Atividades das enzimas antioxidantes das brânquias dos grupos Controle (n = 8) e exposto à microcistina, Mcis (n = 8) de *Brycon. amazonicus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. (p < 0,05).

### 3.2. Análise de Antioxidante Não-Enzimático (Glutaciona reduzida – GSH)

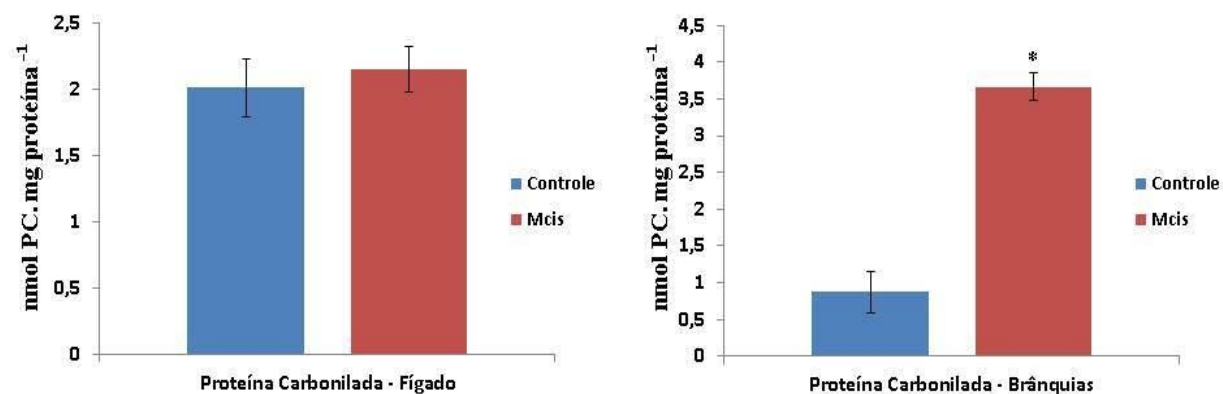
Em comparação ao controle, os níveis de glutaciona reduzida observados no fígado não apresentaram alterações significativas, embora nas brânquias o nível de GSH observado tenha sido 43% menor. Na figura 3 estão representados graficamente esses dados.



**FIGURA 3.** Níveis de glutaciona reduzida (GSH -  $\mu\text{mol. g tecido}^{-1}$ ) no fígado e brânquias dos grupos Controle (n = 8) e exposto à microcistina, Mcis (n = 8) de *Brycon. amazonicus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. (p < 0,05).

### 3.3. Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas

Não foi observada oxidação proteica no fígado dos matrinxãs analisados, uma vez que os valores encontrados para proteína carbonilada (PC) não apresentaram diferenças significativas para esse tecido. Nas brânquias, entretanto, houve um aumento expressivo nos níveis de PC, da ordem de 317%, como podemos observar na Figura 4.

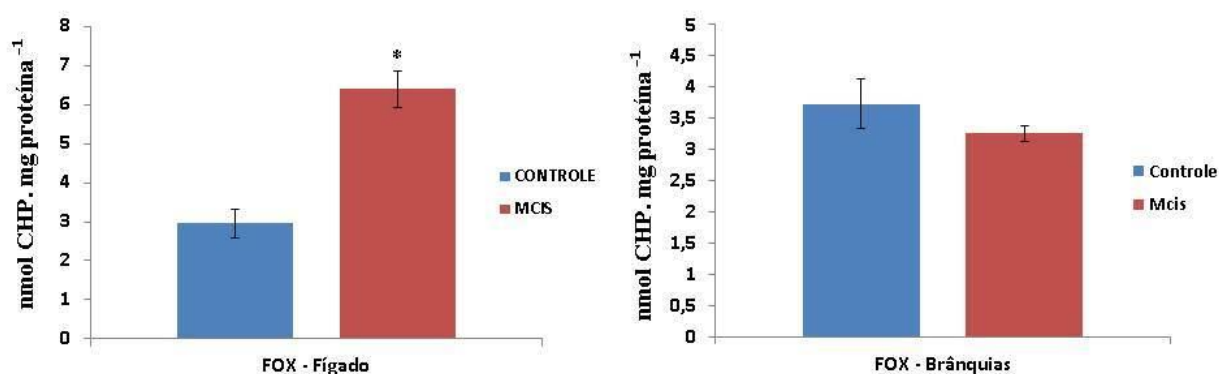


**FIGURA 4.** Níveis de proteína carbonilada (PC –  $\text{nmol. mg proteína}^{-1}$ ) no fígado e brânquias

dos grupos Controle (n = 8) e exposto à microcistina, Mcis (n = 8) de *Brycon. amazonicus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. (p < 0,05).

### 3.4. Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica, avaliados pela variação nos níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP), foram superiores no fígado dos animais do grupo Mcis. Esse grupo apresentou um aumento de 116% nesse parâmetro em relação aos valores obtidos no grupo Controle para esse órgão. Contudo não foram observadas alterações nesses níveis quando se analisaram os valores obtidos para as brânquias (Fig 5)



**FIGURA 5.** Níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP – nmol. mg proteína<sup>-1</sup>) no fígado e brânquias dos grupos Controle (n = 8) e exposto à microcistina, Mcis (n = 8) de *Brycon. amazonicus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. (p < 0,05).

## 4. DISCUSSÃO.

### 4.1 Respostas do sistema de defesa antioxidante de *Brycon amazonicus* expostos ao extrato liofilizado contendo MC-LR (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ de massa corpórea).

A toxicidade das microcistinas é usualmente associada com sua ligação irreversível e inibição das proteínas fosfatases 1 e 2 A (MACKINTOSH et al., 1990). A despeito do efeito das MCs sobre as proteínas fosfatases, vários estudos têm demonstrado que as microcistinas podem gerar estresse oxidativo através do aumento da concentração das espécies reativas de oxigênio (ERO) com geração de produtos do dano oxidativo como os lipoperoxídicos (DING et al., 1998; DING & ONG, 2003; WENG et al., 2007). Essas EROs formadas nos tecidos são neutralizadas através da ação do sistema de defesa antioxidante, que tem por função a prevenção da formação dos radicais livres e interceptação da propagação oxidativa (BAINY et al, 1996). Dessa

forma, esse sistema protege as células contra quebra dos filamentos de DNA, oxidação proteica, peroxidação lipídica (WINSTON & DIGIULIO, 1991) entre outros.

Como parte desse sistema de defesa antioxidante destacam-se algumas enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase e glutathione S-transferase (GST) e também antioxidantes não-enzimáticos como a glutathione reduzida (GSH) (LIVINGSTONE, 2001). Mudanças nos mecanismos bioquímicos antioxidantes catalisados pelas enzimas desse sistema vêm sendo empregadas como biomarcadores da susceptibilidade celular a danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas enzimas podem alterar sua expressão e/ou atividade em resposta a condições de estresse oxidativo, sendo que esse mecanismo pode ser uma importante adaptação ao estresse induzido pelos mais diversos poluentes (LIVINGSTONE, 2001; ZHANG et al, 2004).

No presente trabalho observamos que a exposição à MC-LR via injeção intraperitoneal de extrato liofilizado contendo MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$  de massa corpórea induziu estresse oxidativo no fígado e brânquias de *B. amazonicus*. No fígado houve aumento na atividade das enzimas GST e GPx, redução na atividade da enzima SOD e aumento nos níveis de lipoperoxidação (LPO) indicando quadro de estresse oxidativo, embora a atividade da CAT e os níveis de GSH e oxidação proteica não tenham se alterado.

Como descrito anteriormente, a GPx é uma enzima do sistema antioxidante de defesa que atua catalisando a redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e de hidroperóxidos de ácidos graxos, convertendo-os em água ou seus correspondentes alcoóis não tóxicos através da oxidação da glutathione reduzida (GSH) em glutathione oxidada (GSSG) (NORDBERG & ARNER, 2001; SHAN et al., 1990). No fígado de *Brycon amazonicus* no presente trabalho a exposição à MC-LR induziu aumentos de 217% na atividade dessa enzima. Essa elevação na atividade da GPx pode indicar que houve formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nesse tecido, e dessa maneira foi necessário que a glutathione peroxidase atuasse na catálise desse peróxido, uma vez que a enzima CAT que também atua catalisando  $\text{H}_2\text{O}_2$  não exibiu alterações em sua atividade. Monteiro (2006, 2011), afirma que apesar de diferenças quanto às suas características cinéticas em relação ao metabolismo do  $\text{H}_2\text{O}_2$ , onde a GPx atuaria preferencialmente no metabolismo do  $\text{H}_2\text{O}_2$  em menores concentrações, enquanto a CAT teria maior participação em maiores concentrações desse substrato, existe na verdade a indicação de que estas enzimas são igualmente importantes na manutenção dos níveis basais de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , apresentando uma interdependência funcional.

No presente estudo a CAT não apresentou alterações em sua atividade, o que pode indicar que o aumento na atividade da GPx conseguiu suprir a demanda pelo

metabolismo de  $H_2O_2$ . Entretanto, é possível que a CAT tenha tido o aumento em sua atividade inibido pela presença de grandes quantidade de ânion superóxido (CHANCE, 1952; KONO & FRIDOVIC, 1982), dado que no fígado dos matrinxãs do grupo Mcis houve redução de 47% na atividade da enzima SOD, que como será discutido, tem como sua principal função a dismutação do ânion superóxido. Dessa forma, com a atividade da SOD diminuída pode ter ocorrido acúmulo de ânion superóxido que por sua vez inibiu aumentos significativos na atividade da CAT, fazendo com que a GPx aumentasse sua atividade para combater o acúmulo de peróxido de hidrogênio. A atividade enzimática da GPx é um importante meio de controle dos níveis de  $H_2O_2$  e de hidroperóxidos lipídicos derivados do ataque de espécies radicalares (COHEN & HOCHSTEIN, 1963; MEISTER & ANDERSON, 1983). Dessa maneira, não podemos descartar a possibilidade desse aumento na atividade enzimática da GPx ser devida ao seu papel no combate a hidroperóxidos de lipídios que foram formados devido ao quadro de estresse oxidativo observado nesse tecido. Prieto et al. (2006) observaram aumentos na atividade da GPx em rins de *Oreochromis niloticus* expostas à injeção *i.p* de MC-LR purificada ( $500 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$  de massa corpórea), bem como aumentos nos níveis de LPO, de maneira similar ao presente estudo. Jos et al. (2005) também observaram aumentos na atividade da GPx em fígado de tilápias expostas à doses diárias de MCs na dieta. Entretanto, Prieto et al. (2007) trabalhando com *O. niloticus* descreveram que a atividade da GPx em fígado e brânquias não mostrou alterações significativas, enquanto que o rim sofreu reduções dos valores da GPx em resposta à exposição aguda a uma dose oral de MC-LR ( $120 \mu\text{g}/\text{peixe}$ ).

A SOD dismuta o ânion superóxido em  $H_2O$  e  $H_2O_2$ , sendo que este último é metabolizado pela ação da CAT, dessa maneira existe uma relação funcional entre essas enzimas dentro das células. As referidas enzimas formam o sistema SOD-CAT, que por exibir um efeito inibitório sobre a formação de EROs proporciona uma defesa primária frente à toxicidade do oxigênio, e por esse fato é usualmente utilizado como um importante biomarcador da produção das ERO (PANDEY et al., 2003; REGOLI et al., 2003; VAN der OOST et al., 2003).

No tecido hepático analisado, houve redução de 47% na atividade da SOD, o que possivelmente levou a um acúmulo de ânion superóxido com decorrente inibição da atividade da CAT, como discutido anteriormente. Atencio et al. (2008) e Prieto et al. (2007) observaram reduções na atividade da SOD em fígado e rins de *Tinca tinca* e *Oreochromis niloticus* respectivamente, em experimentos de exposição aguda à MC-LR (oral e intraperitoneal respectivamente). Esses autores sugerem que a resposta enzimática possa estar relacionada à via, tempo e variante de MCs ao qual o animal



foi exposto, sendo que de maneira geral, diversas doses de MCs durante um período de tempo levam preferencialmente à indução de uma resposta defensiva, ao passo que doses agudas causam inibição da atividade antioxidante. De fato, em ratos expostos a uma única dose intraperitoneal de MC-LR purificada, ocorreu inibição da atividade de diversas enzimas antioxidantes, como CAT, SOD, GR e GPx (MORENO et al., 2005). Nesse cenário, pode ser que a dose aguda aplicada em nosso experimento tenha tido esse efeito inibitório sobre a atividade da SOD descrito pelos autores. Adicionalmente, sabe-se que a SOD tem sua atividade inibida pela presença de altos níveis de  $H_2O_2$ , devido a alterações cúpricas ( $Cu^{2+}$ ) e cuprosas ( $Cu^{1+}$ ) em sua estrutura, levando a uma inativação irreversível (TARHAN & TÜZMEN, 2000). Portanto, pode ser que a inibição da SOD esteja relacionada com o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio em um cenário onde a CAT não está atendendo à demanda de conversão do  $H_2O_2$ .

As glutathione S-transferases são uma família de enzimas de detoxificação que catalisam a conjugação da glutathione (GSH) a uma grande variedade de compostos eletrofílicos endógenos e exógenos, tais como drogas terapêuticas, toxinas ambientais e produtos do estresse oxidativo (HAYES et al., 2005; LEAVER et al., 1997). No fígado de *Brycon amazonicus* expostos à MC-LR (Mcis) foi observado aumento de 74% na atividade da GST. Esse aumento observado no tecido hepático pode ser interpretado como uma resposta à intoxicação causada pela MC-LR. Sabe-se que as MCs são transportadas para dentro dos hepatócitos através de transportadores multi-específico de ácidos biliares (ERIKSSON et al., 1990) e são detoxificadas no fígado através da conjugação com a glutathione pela GST (KONDO et al., 1996; PFLUGMACHER et al., 1998; TAKENAKA, 2001) sendo transportadas para os rins e intestino para excreção (ITO et al., 2002). Na ciência de que a principal via de detoxificação das MCs é através de sua conjugação à GSH pela ação da GST (PFLUGMACHER et al., 1998), é possível que o aumento na atividade da GST no fígado seja resultante de sua função na conjugação da MC-LR com GSH, a fim de formar compostos solúveis e assim diminuir a toxicidade da microcistina, prevenindo lesões celulares. Existem algumas isoformas da GST que ainda possuem atividade de GPx (selênio-independente) por atuarem sobre hidroperóxidos orgânicos, com exceção ao  $H_2O_2$  (BARLING et al., 1993). Dessa forma, é possível também que parte do aumento da atividade da GST possa refletir o papel desta enzima na desintoxicação de hidroperóxidos de lipídios resultantes do processo de peroxidação lipídica.

O fígado é o principal órgão de detoxificação para as MCs, uma vez que esse tecido contém grandes quantidades de GSH que forma complexos solúveis com as MCs, podendo assim ser eliminados pelas vias de excreção (PFLUGMACHER et al.,

1998). Uma considerável parte da ação da GSH é obtida através da indução de atividade das enzimas que a usam como substrato (GST e GPx), sendo necessária a manutenção do nível de GSH para a funcionalidade catalítica dessas enzimas (JONES, 1995). No presente estudo tanto a GST quanto a GPx exibiram aumentos em suas atividades no fígado de matrinxãs expostos à MC-LR. Apesar dessas enzimas utilizarem a GSH como substrato não foram observadas reduções nos níveis hepáticos de glutathiona no presente trabalho. Alguns autores como Qiu et al. (2007); Atencio et al. (2008) e Malbrouck et al. (2004) observaram efeito semelhante em outras espécies de teleosteos como Tenca (*Tinca tinca*) e o goldfish (*Carassius auratus*) expostos à doses orais e intraperitoneais de MCs em extrato e purificadas, respectivamente. Segundo Atencio et al. (2008) a não alteração dos níveis hepáticos de GSH pode ser atribuída a um alto nível basal na concentração da GSH, o que pode possibilitar a sua coexistência com MCs (LI et al., 2007). Alguns estudos detectaram altos níveis de GSH em fígados de goldfish, carpa prateada e tenca. Os altos níveis de GSH hepático encontrados sugerem que a detoxificação das MCs pela via da glutathiona não tenha sido capaz de exaurir suas reservas (ATENCIO et al., 2008; LI et al., 2007). Dessa forma, é possível que no presente estudo apesar da grande utilização de GSH devida ao aumento das atividades da GST e GPx, além de sua conjugação direta com as MCs, os níveis de GSH não se alteraram devido ao seu alto nível basal hepático.

A peroxidação lipídica (LPO) tem sido descrita como o maior contribuinte para a perda das funções celulares sob o estresse oxidativo (STOREY, 1996), além de ser talvez o mais estudado componente do dano oxidativo aos sistemas biológicos (TOCHER et al., 2002). Atua através da promoção de alterações na estrutura das membranas celulares, levando a transtornos de permeabilidade, alteração do fluxo iônico e de outras substâncias, perda de seletividade para o trânsito de nutrientes e substâncias tóxicas à célula, mudanças no DNA e oxidação das LDL (lipoproteínas de baixa densidade) (BABER & HARRIS, 1994) o que pode levar a formação de produtos citotóxicos com culminante morte celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). Os níveis de LPO no fígado dos matrinxãs expostos à MC-LR foram 116% maiores em relação ao Controle, considerando que a reação típica durante o dano oxidativo causado pelas ERO envolve a peroxidação de ácidos graxos insaturados, esse aumento indica um quadro de estresse oxidativo estabelecido no tecido hepático de *B. amazonicus*. A exposição à MC-LR purificada ( $500 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$  via *i.p*) aumentou significativamente a LPO em fígado de *O. niloticus* durante 7 dias de exposição (PRIETO et al., 2006). De maneira semelhante Prieto et al. (2007) verificaram que a exposição oral a uma dose de  $120 \mu\text{g}/\text{peixe}$  de células contendo MC-LR induziu aumentos nos níveis da LPO de *O. niloticus*, durante 24 horas de exposição, bem

como Atencio et al. (2008) que constataram peroxidação lipídica em exemplares de tenca expostos a uma dose oral de células contendo MC-LR na concentração de 25 e 55 µg/peixe.

Apesar dos autores terem analisado outros órgãos além do fígado, em todos os estudos o tecido hepático foi o mais afetado pela LPO, resultado também encontrado no presente estudo. De acordo com Fischer et al. (2005), a grande hepatotoxicidade das MCs é decorrente da maior quantidade de polipeptídeos transportadores de ânions orgânicos (OATPs) presentes no fígado. Uma vez que esses transportadores são responsáveis pela captação das MCs, maiores quantidades de transportadores em um tecido resultam em maior toxicidade. Nos estudos de Atencio et al. (2008) e Prieto et al. (2007) adicionalmente ao aumento da LPO no fígado, foram observadas reduções nas atividades da SOD e CAT, o que indica que a inibição dessas enzimas deve ter gerado um quadro de formação de grandes quantidades de EROs que acabaram por levar à peroxidação lipídica. Em nosso trabalho, a SOD teve sua atividade inibida e a CAT não se alterou em resposta à MC-LR. É possível, que a falha na resposta antioxidante do sistema SOD-CAT tenha contribuído para a formação de EROs que levaram ao quadro de estresse oxidativo observado no tecido hepático de matrinxãs, dado que esse sistema é, devido ao efeito inibitório sobre a formação das ERO, a primeira linha de defesa contra a toxicidade do oxigênio (PANDEY et al., 2003). Mesmo com o aumento na atividade da GPx, esse tecido não foi capaz de deter a ocorrência de peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento nos níveis de LPO.

De maneira contrária, a exposição à MC-LR não alterou os níveis de proteína carbonilada no fígado, ou seja, não ocorreu oxidação proteica nesse tecido. A observação da ocorrência de LPO com a concomitante ausência de oxidação proteica sugere que a LPO é um indicador mais sensível da hepatotoxicose em *Brycon amazonicus* (ATENCIO et al., 2008).

Durante condições normais, o sistema de defesa antioxidante é capaz de promover a eliminação das ERO produzidas pelo metabolismo basal, dessa forma protegendo contra lesões oxidativas (OLIVEIRA et al., 2004). No tecido branquial de matrinxãs injetados intraperitonealmente com extrato liofilizado contendo MC-LR na concentração de 100 µg/Kg<sup>-1</sup> de massa corpórea, foram observadas reduções na atividade das enzimas GST e SOD (37 e 66% respectivamente), bem como redução de 43% nos níveis de GSH. As enzimas CAT e GPx não apresentaram alterações significativas e também não foi verificada peroxidação lipídica nesse tecido, entretanto os níveis de proteína carbonilada que refletem a oxidação proteica tiveram um aumento massivo (317%), caracterizando dessa maneira um cenário de estresse oxidativo nas brânquias.

A glutathione S-transferase está relacionada na desintoxicação de xenobióticos, e vem sendo apontada como um bom biomarcador na avaliação de impacto ambiental causado por poluentes geradores de estresse oxidativo (RODRIGUEZ-ARIZA et al., 1991; LIVINGSTONE, 1998). É uma enzima importante na defesa celular mesmo não atuando de maneira direta contra os radicais livres, pois sua atividade está associada a biotransformação de herbicidas, inseticidas, agentes carcinogênicos (MONTEIRO, 2006) e também das microcistinas (PFLUGMACHER et al., 1998). A redução na atividade da GST nas brânquias de matrinxãs no presente estudo pode estar relacionada à depleção nos conteúdos de GSH observados nesse tecido. Sabe-se que a principal via de detoxificação das MCs é através de sua conjugação à GSH pela ação da GST (PFLUGMACHER et al., 1998) e que uma considerável parte da ação da GSH é obtida através da indução de atividade das enzimas que a usam como substrato (GST e GPx), sendo necessária a manutenção do nível de GSH para a funcionalidade catalítica dessas enzimas (JONES, 1995). Se os níveis de GSH encontram-se diminuídos no tecido branquial, é possível que a redução da atividade da GST seja decorrente da falta desse substrato, que acaba sendo fator limitante para a ação da GST como agente detoxificante.

De maneira semelhante ao que foi observado no fígado de *B. amazonicus*, a MC-LR induziu redução na atividade da SOD nas brânquias. Como já discutido, autores como Atencio et al. (2008) e Prieto et al. (2007) sugerem que diferentes respostas enzimáticas possam estar relacionada a diferentes vias, tempo e as diversas variantes de MCs analisadas nos trabalhos. Existe segundo os autores uma tendência de que exposições realizadas por meio de diversas doses de MCs durante um período levam à indução de uma resposta defensiva, sendo que exposição à doses agudas tende a causar inibição da atividade antioxidante. Pode ser que da mesma maneira que foi observada no fígado, a aplicação de uma dose aguda tenha tido efeito inibitório sobre a atividade da SOD. Pode ser considerada também a possibilidade de que a SOD tenha sido inibida pela presença de altos níveis de  $H_2O_2$  (como já discutido acima).

No tecido branquial, as principais enzimas que atuam na dismutação do  $H_2O_2$  não apresentaram mudanças em suas atividades, portanto pode ser que a inibição da SOD esteja relacionada com o aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio em um cenário onde a CAT e GPx não estejam conseguindo agir de modo eficaz na conversão do  $H_2O_2$ . A SOD, juntamente com a catalase e a glutathione peroxidase, constituem uma das principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Tanto a CAT quanto a GPx não exibiram alterações em suas atividades no tecido branquial. É sabido, que o excesso

de ânion superóxido pode inibir a atividade de ambas (CAT e GPX) (MONTEIRO 2006, 2011), sendo possível que devido à inibição observada na atividade da SOD (principal catalisadora do superóxido) tenha ocorrido um acúmulo dessa ERO, o que levou à inibição do aumento de atividade de ambas as enzimas. Ainda, é possível que o peróxido de hidrogênio formado nas brânquias esteja sendo excretado diretamente para a água, de maneira semelhante à excreção da amônia, em um mecanismo aparentemente comum como possível rota de desintoxicação do  $H_2O_2$  em peixes (MONTEIRO, 2006). Wilhelm-Filho et al. (1994) demonstraram essa capacidade de excreção do  $H_2O_2$  pelas brânquias no guarú, *Poecilia velliifera*. Dessa forma, essa via de excreção do  $H_2O_2$  poderia explicar a não alteração das atividades de CAT e GPX nas brânquias de matrinxã, uma vez que o  $H_2O_2$  que estaria sendo formado seria excretado diretamente pelas brânquias diminuindo sua toxicidade sem atividade do sistema de defesa antioxidante. Ademais, a GPx é uma das enzimas que dependem da GSH como substrato, dessa forma, no contexto das brânquias, onde os níveis de GSH se encontram reduzidos, essa enzima fica com sua atividade limitada devido a falta de substrato. Prieto et al. (2006) e Prieto et al. (2007) verificaram resultados semelhantes em *O. niloticus* expostos a doses agudas via intraperitoneal e oral de MC-LR (500  $\mu$ g/Kg e 120  $\mu$ g/peixe respectivamente). Esses autores não observaram mudanças na atividade da GPx no tecido branquial, embora no fígado sua atividade tenha exibido elevações significativas. Essa observação vai de encontro a Nakamura et al. (1974) que afirma que a GPx exibe diferentes níveis de atividade em órgãos distintos, sendo as maiores atividades exibidas no fígado.

A GSH desempenha um papel de central importância na desintoxicação de compostos eletrofílicos e na prevenção do estresse oxidativo celular (HASSPIELER et al., 1994; SIES, 1999). A principal fonte de GSH plasmática é o fígado (KAPLOWITZ et al., 1985). A redução nos níveis de GSH encontrados nas brânquias dos matrinxãs do grupo Mcis pode estar relacionada com a utilização dos conteúdos hepáticos de GSH. No fígado foi observado que a atividade das enzimas antioxidantes GST e GPx, (ambas dependentes da GSH como substrato) exibiram aumentos significativos (74 e 217% respectivamente) contribuindo de maneira acentuada para a utilização das reservas de GSH hepáticas. Portanto, com a utilização da GSH na detoxificação do fígado, é possível que uma menor quantidade desse antioxidante seja exportada para o plasma, diminuindo assim a disponibilidade da GSH para outros tecidos, como no caso, as brânquias. Dessa maneira, o conteúdo de GSH do tecido branquial é levado à depleção (MONTEIRO, 2006). O estresse oxidativo severo pode reduzir os níveis de GSH por prejudicar os mecanismos de adaptação, ao passo que o estresse moderado induz elevações nos níveis de GSH através de respostas que culminam com aumento

de síntese desse composto (ZHANG et al., 2004). A diminuição dos níveis de GSH assim como observado nas brânquias de matrinxã do presente estudo, pode impor limites à capacidade da célula em combater radicais livres, aumentando o potencial de oxidação geral (ELIA et al., 2003).

Apesar de não ter sido analisada no presente trabalho, há a possibilidade da depleção nos níveis de GSH ser devida a uma ineficiência na reciclagem da glutatona oxidada (GSSG) de volta a glutatona reduzida (GSH) por parte da enzima glutatona redutase (GR) (ATENCIO et al., 2008). Estudos como de Jos et al. (2005) observaram que não houve aumentos significativos na atividade da GR em brânquias de tilápias expostas à doses diárias de MCs na dieta, bem como Prieto et al. (2007) trabalhando com *O. niloticus* descreveram que não foram observadas elevações na atividade da GR em brânquias em resposta à exposição aguda a uma dose oral de MC-LR (120 µg/peixe). Dessa forma, a reciclagem da GSH pode estar sendo insuficiente para manter níveis normais no tecido branquial frente à exposição à MC-LR.

No presente estudo constatou-se a redução do conteúdo de GSH branquial em 43%. Segundo Liebler & Reed (1997) a redução de 20 a 30 % dos níveis normais de GSH prejudica o sistema de defesa das células contra ações tóxicas das ERO e de outros intermediários biológicos reativos, podendo levar a um quadro de injúria e morte celular. Li et al. (2003) observaram reduções significativas nos conteúdos de GSH dos hepatócitos de carpa comum expostas a 10 µg MC-LR/L, entretanto Atencio et al. (2008) não observaram diferenças entre os níveis de GSH após 96 h de exposição à doses orais de MC-LR em várias concentrações (5, 11, 25 e 55 µg MC-LR/peixe) no peixe tenca (*Tinca tinca*).

Como já descrito anteriormente, a peroxidação lipídica (LPO) tem sido descrita como o maior contribuinte para a perda das funções celulares sob o estresse oxidativo (STOREY, 1996), além de ser talvez o mais estudado componente do dano oxidativo aos sistemas biológicos (TOCHER et al., 2002). Apesar de alguns estudos indicarem que as brânquias são o tecido mais sensível à indução de LPO por xenobióticos devido à sua menor capacidade antioxidante em comparação a outros órgãos (SAYEED et al., 2003), no presente estudo não foram observadas alterações nos níveis de LPO das brânquias de *B. amazonicus*. Embora não tenha ocorrido LPO no tecido branquial, houve um aumento massivo (317%) nos níveis de proteína carbonilada, o que indica que houve oxidação proteica, mostrando um cenário de estresse oxidativo nas brânquias. Aumentos no número de grupos carbonil tem relação com o dano proteico causado pelo estresse oxidativo (SHAETER et al., 1994). Esse grupamento carbonil pode ser adicionado a proteínas por várias vias diferentes, dentre elas pela ação das ERO (GRUNE, 2000; REQUENA et al., 2003). A ação das

ERO pode levar à formação de derivados carbonilados, em um processo que é irreversível, levando a alterações conformacionais nas proteínas, diminuindo a atividade catalítica das enzimas e/ou aumentando a susceptibilidade das proteínas à ação de proteases, resultando em quebra de cadeias polipeptídicas (ALMROTH et al., 2005). As proteínas exercem os mais diversificados papéis em praticamente todos os tecidos, de maneira que danos oxidativos podem afetar as suas principais funções, como receptores, enzimas, anticorpos, proteínas de transporte, dentre outras, causando alterações funcionais na célula (GARCEZ et al., 2004, NYSTRÖM, 2005). A análise dos efeitos das MCs sobre a oxidação proteica em peixes na literatura é muito escassa, e os poucos trabalhos se concentram na dosagem hepática somente, de maneira que pelo que temos conhecimento esse é o primeiro estudo que analisa esse efeito em brânquias. Dentre os trabalhos que têm mostrado diferentes respostas nos níveis de oxidação proteica frente à exposição à MC-LR no fígado, destaca-se o de Atencio et al. (2008) que não observou danos proteicos ao fígado do ciprinídeo *Tinca tinca* após 96 h de exposição à doses orais de MC-LR em várias concentrações (5, 11, 25 e 55 µg MC-LR/peixe) e o de Prieto et al. (2007) que constataram aumentos de 1,5 e 1,3 vezes no conteúdo de proteína carbonilada no fígado de tilápias expostas a 120 µg MC-LR/peixe sacrificadas a 24 e 72 horas respectivamente. O aumento expressivo no conteúdo de proteína carbonilada da ordem de 317%, juntamente com a falta de observação do aumento na LPO do tecido branquial do grupo exposto à MC-LR pode indicar que a oxidação proteica seja um indicador mais sensível ao dano oxidativo exercido pelas microcistinas sobre as brânquias de *Brycon amazonicus*.

## 5. CONCLUSÕES

Diante do que foi exposto durante este capítulo podemos concluir, que a exposição à MC-LR ( $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea) pelo período de 48 horas foi capaz de induzir estresse oxidativo em ambos os tecidos analisados, agindo de forma diferente em cada órgão amostrado. No fígado o dano oxidativo se deu pela peroxidação das membranas lipídicas, evidenciada pelo aumento nos níveis de LPO nesse tecido, enquanto que no tecido branquial a oxidação proteica foi a maneira preferencial pelo qual o excesso na produção das EROs levou ao dano oxidativo.

O tecido hepático dos animais expostos à MC-LR apresentou aumento na atividade das enzimas GST e GPx, entretanto, essa resposta não foi capaz de conter a peroxidação lipídica desse tecido. A resposta antioxidante das brânquias parece ter sido inibida pela exposição à MC-LR, visto que as enzimas SOD e GST, bem como os níveis de GSH diminuíram nesse tecido, incapacitando-o de combater a formação das EROs, o que levou à oxidação proteica observada nas brânquias.

Essas observações nos indicam que a brânquia é o tecido mais sensível aos efeitos da MC-LR em *Brycon amazonicus*.



## **CAPÍTULO V**

**EFEITOS DA MICROCISTINA-LR SOBRE BIOMARCADORES DO  
ESTRESSE OXIDATIVO EM TRAÍRA, *Hoplias malabaricus*  
(BLOCH, 1794)**

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos recentes tem indicado a capacidade das MCs de alterar o sistema de defesa antioxidante e/ou produzir estresse oxidativo em diversas espécies aquáticas (AMADO & MONTSERRAT, 2010). A exposição às microcistinas (MCs), como já citado, vem sendo referida como indutora da produção de EROs, levando à peroxidação lipídica, oxidação proteica, dano no DNA, danos mitocondriais, mudanças nas atividades das enzimas antioxidantes, entre outros (LI et al., 2003; JOS et al., 2005; PRIETO et al., 2007; DING & ONG, 2003). Entretanto são relativamente escassos os estudos relacionando as MCs com o estresse oxidativo em peixes Neotropicais como a traíra e o matrinxã.

No ambiente natural, sabe-se que as florações de cianobactérias podem induzir a formação de EROs nos organismos aquáticos, simplesmente por gerar ciclos de hiperoxia/anoxia através dos processos de respiração e fotossíntese, fato já observado em florações de cianobactérias dos gêneros *Anabaena* e *Microcystis* (SEKI et al., 1980). De maneira análoga ao que ocorre no meio natural, podem ocorrer dentro dos organismos processos de isquemia e reperfusão. Nesses processos, subsequente a uma queda no fluxo de oxigênio, ocorre a reperfusão, que é o retorno do sangue trazendo oxigênio novamente ao tecido. A própria reperfusão causa um aumento na geração de EROs devido à alterações no transporte de elétrons na mitocôndria, levando à oxidação proteica, LPO, dano mitocondrial dentre outros (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

O matrinxã é um peixe típico das bacias Amazônica e do Araguaia-Tocantins (HOWES, 1982), enquanto que a traíra habita as bacias do Amazonas, São Francisco, Paraíba, Paranaíba, Doce, Paraná (incluindo o Rio Mogi-Guaçu) e nos grandes e pequenos açudes do Nordeste (PAIVA, 1972; GODOY, 1975). Trata-se de dois animais de grande dispersão dentro do território nacional e também de alguns territórios fronteiriços. A ocorrência de florações de cianobactérias já foi identificada em diversos rios componentes das bacias hidrográficas que servem de habitats dessas espécies. Estados como São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Pernambuco, Alagoas, Pará e Rio de Janeiro já apresentaram ocorrências de florações de cianobactérias (LAGOS et al., 1999; CONTE et al., 2000; YUNES et al., 2003, VIEIRA et al., 2005). Nesse contexto, a exposição dessas espécies às MCs em seu habitat natural tem sido cada vez mais recorrente, e a necessidade de se entender o funcionamento dos mecanismos fisiológicos de defesa desses animais a essa exposição, visando uma prevenção de danos às espécies, deve crescer na mesma proporção.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Animais utilizados**

Exemplares juvenis e de ambos os sexos de matrinxã, *Hoplias malabaricus*, foram adquiridos na piscicultura Santa Cândida, Santa Cruz da Conceição, SP. Após a coleta, os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, onde foram mantidos em tanques com capacidade de 1000 L, dotados de recirculação de água aerada e termostatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), por um período mínimo de 30 dias para aclimação às condições laboratoriais. Durante esse período foram com carne de peixe (tilápia) de uma a duas vezes por semana.

### **2.2. Delineamento experimental**

Após o período de aclimação, os exemplares de *Brycon amazonicus* foram pesados ( $W_T = 167,2 \pm 51,3$  g) divididos aleatoriamente em dois grupos experimentais: o grupo controle (Controle,  $n = 8$ ) e o grupo exposto à toxina (Mcis  $n = 8$ ). Os peixes do grupo Mcis receberam uma injeção intraperitoneal (0,5 mL de salina 0,9%) do extrato liofilizado da cepa RST9501 de *M.aeruginosa*, contendo a toxina MC-LR na concentração de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea. Após a injeção esperou-se durante um período de 48h até a coleta das amostras de tecidos. Durante esse período os animais ficaram separados em tanques com capacidade de 1000 L, dotados de recirculação de água aerada e termostatizada ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

### **2.3. Coleta de Amostras, procedimentos bioquímicos, análise da atividade das enzimas Antioxidantes e tratamento estatístico dos dados.**

Todos os procedimentos e parâmetros analisados bem como a análise dos dados encontram-se descritos com maiores detalhes no capítulo anterior (Capítulo IV).

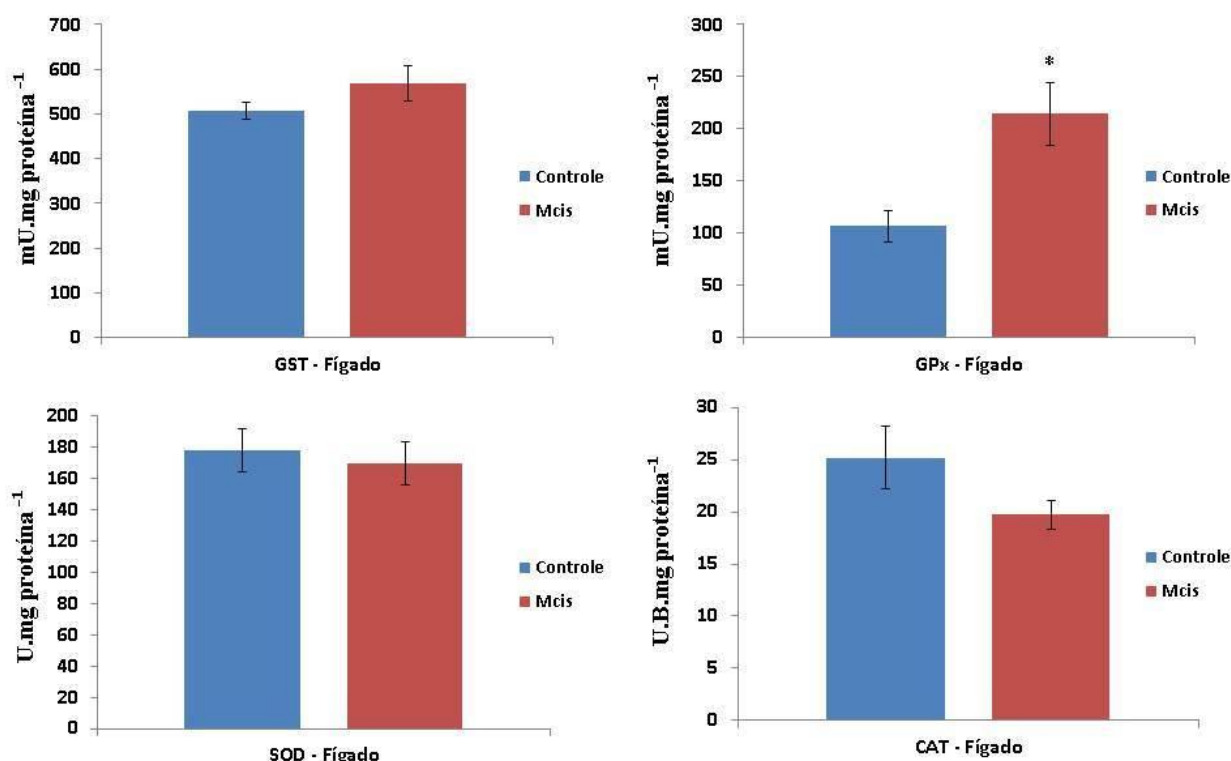
## **3. RESULTADOS**

### **3.1. Análise da atividade das enzimas antioxidantes em *Hoplias malabaricus*.**

A seguir são apresentados graficamente os resultados obtidos na análise das respostas das enzimas antioxidantes frente à exposição (via injeção intraperitoneal) ao

extrato liofilizado contendo MC-LR na dose de  $100 \mu\text{g.Kg}^{-1}$  de massa corpórea durante o período de 48 horas.

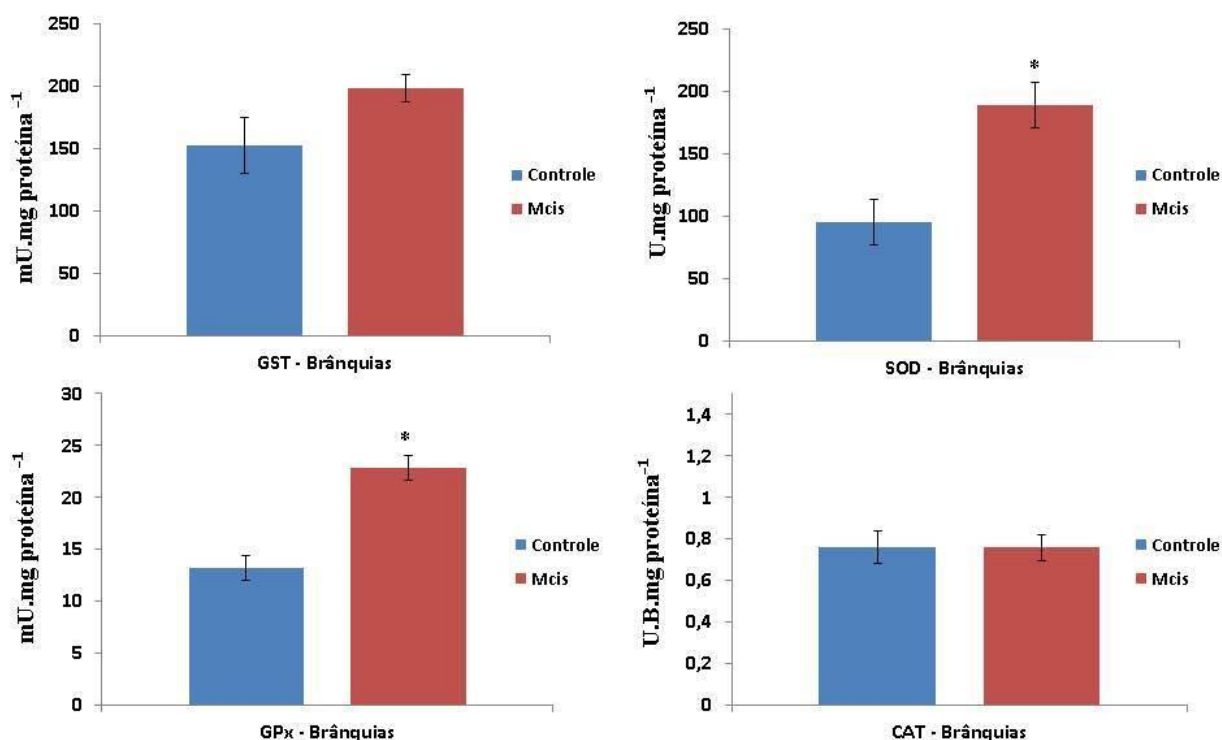
No fígado de *Hoplias malabaricus*, a exposição à MC-LR induziu aumento significativo apenas na atividade da enzima GPx, sendo que tal aumento foi de 100% em relação aos valores do grupo Controle. Entretanto, como pode ser observado na figura 1, as enzimas SOD, CAT e GST não apresentaram alterações em suas atividades nesse tecido.



**FIGURA 1.** Atividades das enzimas antioxidantes no fígado dos grupos Controle (n = 8) e exposto à microcistina, Mcis (n = 8) de *Hoplias malabaricus*. Valores médios  $\pm$  1 E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. ( $p < 0,05$ ).

As atividades das enzimas SOD e GPx aumentaram significativamente nas brânquias do grupo Mcis (98% e 73% respectivamente), embora CAT e GST não tenham mostrado diferenças significativas em suas atividades em comparação ao grupo Controle.

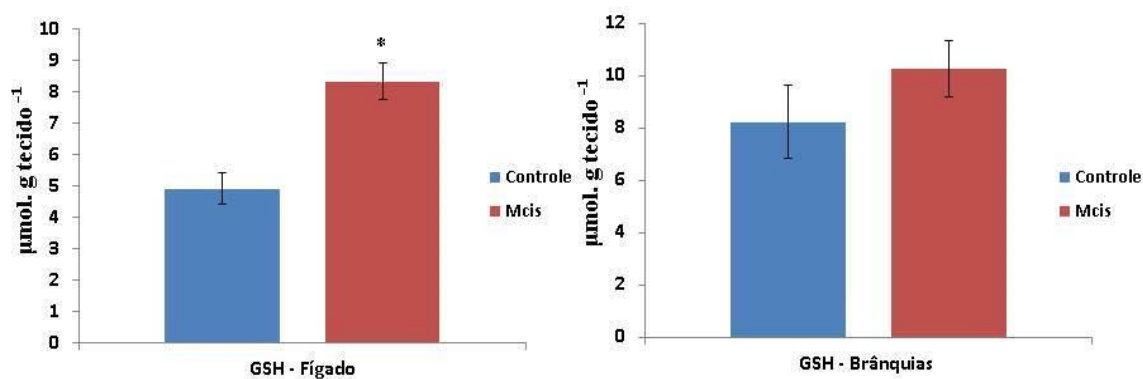
Esses resultados podem ser observados na figura 2.



**FIGURA 2.** Atividades das enzimas antioxidantes das brânquias dos grupos Controle (n = 8) e exposto à microcistina, Mcis (n = 8) de *Hoplias malabaricus*. Valores médios ± 1 E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. (p < 0,05).

### 3.2. Análise de Antioxidante Não-Enzimático (Glutathiona reduzida – GSH)

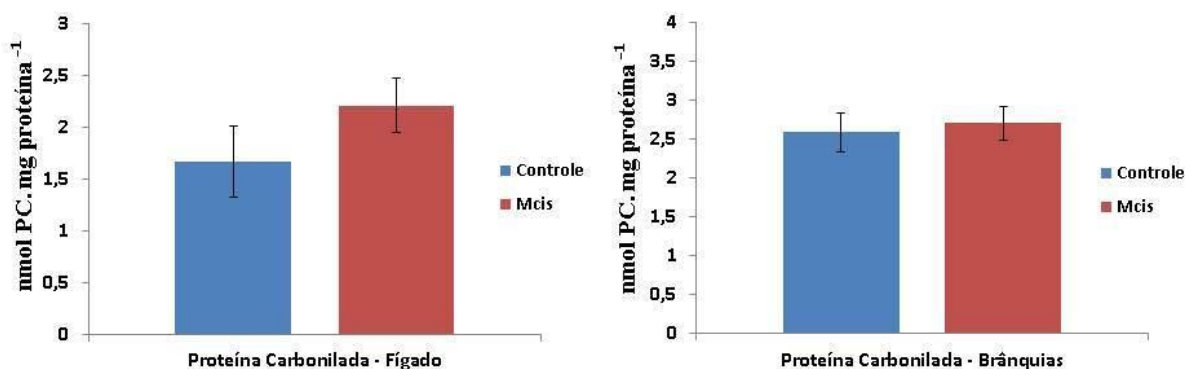
O nível de glutathiona reduzida observado no fígado do grupo Mcis foi 70 % maior em comparação ao Controle, porém nas brânquias não houve diferença significativa entre os grupos. Na figura 3 estão representados graficamente esses dados.



**FIGURA 3.** Níveis de glutatona reduzida (GSH -  $\mu\text{mol. g tecido}^{-1}$ ) no fígado e brânquias dos grupos Controle ( $n = 8$ ) e exposto à microcistina, Mcis ( $n = 8$ ) de *Hoplias malabaricus*. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. ( $p < 0,05$ ).

### 3.3. Análise dos Níveis de Oxidação de Proteínas

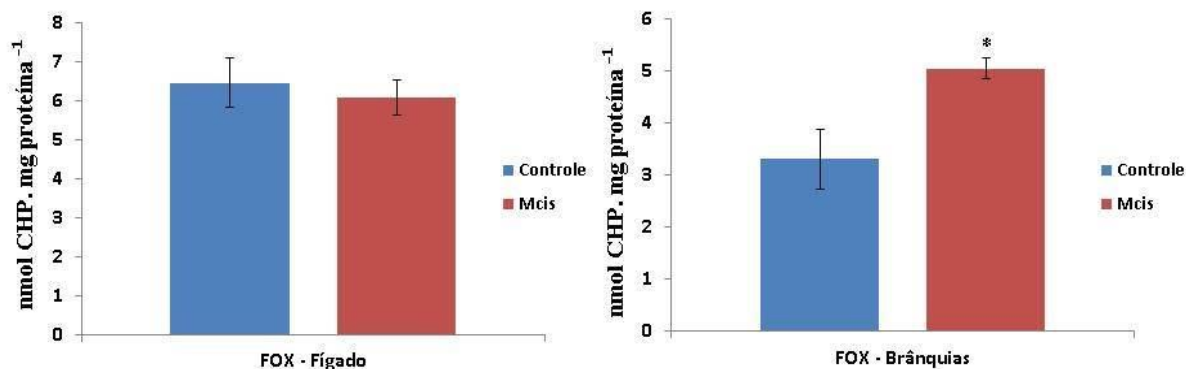
Como podemos observar na figura 4, não ocorreram alterações significativas nos níveis de proteína carbonilada em nenhum dos tecidos analisados (fígado e brânquias) de ambos os grupos, Controle e Mcis.



**FIGURA 4.** Níveis de proteína carbonilada (PC –  $\text{nmol. mg proteína}^{-1}$ ) no fígado e brânquias dos grupos Controle ( $n = 8$ ) e exposto à microcistina, Mcis ( $n = 8$ ) de *Hoplias malabaricus*. Valores médios  $\pm 1$  E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. ( $p < 0,05$ ).

### 3.4. Análise dos Níveis de Peroxidação Lipídica

Os níveis de peroxidação lipídica, avaliada pela variação nos níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP), não sofreram alterações no fígado de *Hoplias malabaricus*. Todavia, foi observado que os valores da peroxidação lipídica nas brânquias do grupo Mcis foram 53% maiores do que os encontrados para o grupo controle nesse tecido (Fig 5).



**FIGURA 5.** Níveis de equivalentes de cumeno hidroperóxido (CHP – nmol. mg proteína<sup>-1</sup>) no fígado e brânquias dos grupos Controle (n = 8) e exposto à microcistina, Mcis (n = 8) de *Hoplias malabaricus*. Valores médios ± 1 E.P.M. \*: indica diferença significativa entre os grupos experimentais. (p < 0,05).

## 4. DISCUSSÃO.

### 4.1 Respostas do sistema de defesa antioxidante de *Hoplias malabaricus* expostos ao extrato liofilizado contendo MC-LR (100 µg/Kg<sup>-1</sup> de massa corpórea).

A geração das ERO está envolvida na etiologia de várias doenças humanas (HALLIWELL, 1987), e é provável que exerça mesmo papel em peixes (WINSTON & DI GIULIO, 1991). Entretanto, as ERO formadas nos tecidos são neutralizadas pelo sistema de defesa antioxidante que nos organismos aquáticos é formado por algumas enzimas específicas (SOD, CAT, GPx, entre outras) e moléculas orgânicas como o GSH (LIVINGSSTONE, 2001). Como descrito anteriormente, as MCs vêm sendo descritas como formadoras de ERO e produtos do dano oxidativo (DING *et al.*, 1998; DING & ONG, 2003; WENG *et al.*, 2007) em diversos tecidos de peixes (ATENCIO *et al.*, 2008; PRIETO *et al.*, 2006; PRIETO *et al.*, 2007; JOS *et al.*, 2005).

No fígado das traíras do presente estudo, a exposição ao extrato liofilizado contendo MC-LR induziu aumentos na atividade da GPx (100%) e nos níveis de GSH (70%), enquanto que SOD, CAT e GST não exibiram alterações em suas atividades. O aumento na resposta antioxidante evidenciada pelo aumento da GPx e GSH foi

suficiente para neutralizar os efeitos das ERO, dado que não foram observadas oxidação proteica e peroxidação lipídica. A atividade da GPx é de suma importância no combate à LPO, dado que essa enzima está envolvida diretamente na remoção de peróxidos orgânicos (ZHANG et al., 2004), de maneira que aumentos em sua atividade refletem provavelmente uma adaptação às condições oxidativas as quais o peixe foi exposto (LENARTOVA et al., 1997). Essa resposta adaptativa caracterizada por aumentos na atividade da GPx em resposta à formação de ERO decorrente da exposição à microcistinas, já foi descrita em alguns estudos com teleósteos em diferentes fases do desenvolvimento (JOS et al., 2005; LI et al., 2003; WIEGAND et al., 1999) e parece ser condizente com o que foi observado em nosso estudo.

A GSH está envolvida em um número grande de funções celulares de extrema importância como neutralização de ERO, detoxificação de compostos eletrofílicos, manutenção da relação tiol-dissulfeto e transdução de sinais (DROGE, 2002). De acordo com Zhang et al. (2004), o estresse oxidativo moderado pode elevar os níveis de GSH como resposta adaptadora por meio de indução de sua síntese. Estudos como de Blaha et al. (2004) verificaram aumentos nos níveis hepáticos de GSH de carpas prateadas expostas à florações de cianobactérias, observação que está de acordo com o aumento dos níveis de GSH exibido no presente trabalho. A elevação no conteúdo de GSH pode estar relacionada ao aumento da atividade da GPx exibido no fígado, dado que essa enzima, como descrito anteriormente, utiliza esse tripeptídeo como substrato para sua atividade catalítica. Ademais, a despeito da detoxificação das MCs através da conjugação com a GSH mediada pela GST (descrito anteriormente), sabe-se que a GSH pode desenvolver um importante papel detoxificante através de sua ação direta em processos como neutralização de EROs, restauração de moléculas pela doação de hidrogênio, redução de peróxidos e manutenção dos grupamentos tióis das proteínas em estado reduzido (NOVELLI, 2005). Li et al. (2003) sugerem que a GSH tem participação na eliminação direta de EROs em fígado de carpa comum (10 µg MC-LR/peixe). De maneira complementar Xu et al. (2000) verificaram que a injeção intraperitoneal de GSH teve efeito preventivo no fígado do ciprinídeo *Ctenopharyngodon idellus* exposto à injeção *i.p* de MC-LR (100 µg MC-LR/Kg). Esses autores observaram que na ausência da dose de GSH o tecido hepático exibia graves lesões que foram abolidas após a administração da glutatona. Outros autores constataram efeito protetor semelhante em camundongos e outros animais (HERMANSKY et al., 1991; TAKENAKA & OTSU, 1999).

Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante é capaz de garantir a manutenção do estado redox celular, promovendo de maneira eficiente a eliminação das ERO produzidas pelo metabolismo basal e, conseqüentemente protegendo a



célula contra as lesões oxidativas (OLIVEIRA et al., 2004). Nesse contexto, é possível que mesmo sem alterações na atividade de SOD, CAT e GST, o sistema de defesa antioxidante foi capaz de evitar danos celulares (LPO e oxidação proteica) de maneira eficiente, preferencialmente através da ação da GPx, trabalhando na detoxificação de peróxidos orgânicos e  $H_2O_2$ , e da GSH atuando tanto como substrato da GPx quanto através de sua ação direta na eliminação das ERO e das microcistinas.

No tecido branquial de *Hoplias malabaricus* a exposição à MC-LR foi responsável por induzir resposta antioxidante através do aumento na atividade das enzimas GPx (73%) e SOD (98%). As enzimas CAT e GST não apresentaram alterações, bem como os níveis de GSH que permaneceram semelhantes aos do grupo Controle. A resposta antioxidante exibida por SOD e GPx não foi suficiente para conter a propagação da peroxidação lipídica (LPO), que aumentou significativamente estabelecendo um quadro de estresse oxidativo nesse tecido.

A SOD, juntamente com CAT e a GPx, constituem uma das principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). A indução simultânea do sistema SOD-CAT é uma resposta usualmente observada após a exposição a poluentes (DIMITROVA et al., 1994), embora no presente estudo essa relação não tenha sido observada nas brânquias de traíra. A superóxido dismutase apresenta alta especificidade para o ânion superóxido, não sendo conhecido nenhum outro substrato para essa enzima (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989). Dessa forma, os aumentos de atividade exibidos pela SOD foram provavelmente para atender à demanda na dismutação do ânion superóxido gerado pela exposição à MC-LR. Corroborando nosso estudo, respostas semelhantes relacionando aumento na atividade da SOD com a exposição à MCs foram observadas em tilápias expostas à MC-LR em diferentes doses e vias de exposição (PRIETO et al., 2006; JOS et al., 2005). O aumento na atividade da SOD tem como efeito direto elevação na produção de  $H_2O_2$ , um peróxido que possui uma meia vida longa sendo capaz de atravessar as camadas lipídicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997) podendo assim exibir efeito oxidante em tecidos distintos de onde foi formado. No presente estudo é possível que o aumento na atividade da enzima GPx tenha sido uma resposta a essa elevação na produção de  $H_2O_2$ , dado que essa enzima exerce papel fundamental na detoxificação de  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos (ZHANG et al., 2004). As microcistinas atuam na inibição das fosfatases protéicas de serina/treonina, em particular as do tipo 1 e 2A (PP1 e PP2A) (HONKANEN et al., 1990; MACKINTOSH et al., 1990), sendo que a inibição destas fosfatases leva a um estado de hiperfosforilação de proteínas (CARMICHAEL, 1994). Alguns estudos tem demonstrado que esse estado de hiperfosforilação gerado pela ação das MCs nos

tecidos é um dos mecanismos pelos quais as microcistinas induzem aumentos na atividade de enzimas como a GPx (GEHRINGER et al., 2004; LO et al., 2004; OKAMURA et al., 2009; CAO et al., 2003). Dessa forma, o aumento na GPx observado no tecido branquial pode ser resultante da hiperfosforilação causada pela MC-LR, da resposta ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pela SOD e também de sua atuação sobre lipoperóxidos.

A CAT não apresentou alterações em sua atividade, o que pode indicar que o aumento na atividade da GPx conseguiu suprir a demanda pelo metabolismo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou mesmo que essa enzima teve seu aumento inibido pela ação da MC-LR, em um mecanismo já descrito anteriormente neste estudo (MORENO et al., 2005).

Embora já descrita como enzima atuante no principal mecanismo de detoxificação das MCs em uma grande variedade organismos aquáticos (PFLUGMACHER et al., 1998; TAKENAKA et al., 2001), a atividade da GST não exibiu aumentos no tecido branquial do presente trabalho. Sabe-se que para a manutenção da atividade catalítica da GPx e GST é necessário o controle do nível de GSH (JONES, 1995). Sendo assim, é possível que a GST tenha tido o aumento em sua atividade inibido pela escassez de substrato (GSH), dado que além do aumento da GPx, não foram observados aumentos nos níveis de GSH nas brânquias avaliadas. Dessa maneira, pode ser que a ausência de GSH em grandes quantidades no tecido branquial não tenha possibilitado um aumento da atividade detoxificante da GST frente à exposição à MC-LR. Como citado acima, no presente estudo não foram observados aumentos nos níveis de GSH no tecido branquial de *H. malabaricus*. Sabe-se que a principal fonte de GSH no plasma é o tecido hepático (KAPLOWITZ et al., 1985), de tal maneira que é possível que a GSH plasmática tenha sido capaz de fornecer quantidades suficientes para a atividade da GPx nas brânquias, entretanto, é provável que esse aporte de GSH via plasma não tenha sido suficiente para promover concomitantemente aumentos na atividade da GST, que acabou por apenas manter seus níveis basais de atividade.

Aumentos no nível de proteína carbonilada está geralmente correlacionado com o dano proteico causado pelo estresse oxidativo (SHAETER et al., 1994), dessa maneira, a quantificação do níveis de proteína carbonilada (PC) é usada como avaliação do dano oxidativo em proteínas (FAGAN et al., 1999). Entretanto, não foram observadas alterações nos conteúdos de PC nas brânquias do presente estudo. Sayeed et al. (2003) sugere que as brânquias estão mais sujeitas à ocorrência de danos oxidativos por meio da LPO, essa afirmação corrobora o que foi observado nas brânquias de *H. malabaricus* do presente estudo e talvez indique uma predisposição maior ao dano oxidativo via LPO em detrimento da oxidação proteica nesse tecido para essa espécie.

Diversos estudos têm observado aumento nos níveis de LPO nas brânquias de peixes expostos às MCs (JOS et al., 2005; PRIETO et al., 2006; PRIETO et al., 2007). As respostas antioxidantes elicitadas pela exposição à MC-LR no tecido branquial de *Hoplias malabaricus*, através do aumento da SOD e GPx, não foram capazes de conter a peroxidação lipídica, levando ao estresse oxidativo. É notório que algumas isoformas da GST também apresentam atividade de GPx, por atuarem diretamente na desintoxicação de hidroperóxidos de lipídio (BARLING et al., 1993). As enzimas GST e GPx tem papel importante em minimizar o acúmulo de produtos tóxicos da peroxidação lipídica como malondialdeído, hidroxinonenal e hidroperóxidos lipídicos (HERMES-LIMA et al., 1998; PROHASKA JR, 1980). Nesse contexto, GPx e GST teriam a potencialidade de desintoxicar o tecido branquial dos produtos da LPO contendo seu avanço e impedindo o estresse oxidativo observado. Entretanto, a atividade da GPx possivelmente ficou direcionada à conversão do peróxido de hidrogênio formado pela SOD, já que a CAT não exibiu aumentos em sua atividade. Por sua vez a GST, que poderia atuar diretamente na desintoxicação de hidroperóxidos de lipídios também não teve alterações em sua atividade. Dessa forma, é provável que esse cenário tenha possibilitado a propagação da LPO gerando o dano oxidativo observado na superfície branquial das traíras analisadas no presente estudo.

## 5. CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem concluir que a exposição à MC-LR via injeção intraperitoneal, induziu resposta antioxidante no tecido hepático de *Hoplias malabaricus*, através do aumento da atividade da enzima GPx e do conteúdo de GSH hepático. Essa resposta exibida pelo fígado foi capaz de conter a propagação da peroxidação lipídica e impedir a oxidação de proteínas, neutralizando os efeitos da MC-LR na formação das EROs e prevenindo assim o dano oxidativo.

Nas brânquias das traíras expostas à MC-LR também houve indução de resposta antioxidante, observada através da atividade elevada das enzimas GPx e SOD. Entretanto, esses aumentos não foram capazes de conter a formação das EROs e de lipoperóxidos, o que levou ao estabelecimento de um quadro de estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento da lipoperoxidação do tecido branquial.

Diante dos dados obtidos, é possível que em *Hoplias malabaricus* as brânquias sejam um indicador mais sensível do dano oxidativo gerado pela exposição à MC-LR do que o fígado.

## **CAPÍTULO VI**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora nas últimas décadas tenha havido um expressivo aumento na preocupação e debate em relação à preservação do meio ambiente, principalmente no quesito qualidade e disponibilidade de água, a contaminação aquática derivada da ação antrópica tem tomado proporções epidêmicas. As atividades industriais, agropecuárias e sanitárias tem contribuído sobredemanda para o aumento de episódios de eutrofização em fontes de água indispensáveis à vida humana e animal. Esse quadro tem favorecido o surgimento cada vez maior de episódios de intoxicação por toxinas derivadas das florações de cianobactérias.

Em nosso país, a legislação que discorre sobre os limites da exposição às cianobactérias é recente e foi criada em resposta a acontecimentos desastrosos nos quais seres humanos foram vitimados devido à ação das cianotoxinas. Apesar de toda a importância de se proteger a vida humana contra quaisquer problemas advindos da exposição a contaminantes aquáticos, se faz necessária uma abordagem mais integrativa a fim de se proteger também a vida animal, inclusive para que possamos utilizar seu bem estar como indicador de qualidade do sistema hídrico do qual dispomos. Dessa forma, estudos como o presente servem de modelo para manter a qualidade e integridade dos representantes da ictiofauna brasileira, uma vez que os peixes, além de sua extensa importância ecológica possuem grande potencial comercial, sendo em diversos países a principal fonte de proteína utilizada por uma vasta população.

Este trabalho apresenta uma abordagem inovadora, dado que analisa a função cardiorrespiratória em normóxia e frente à hipóxia gradual após a exposição à microcistina-LR, além de estudar os efeitos dessa toxina sobre biomarcadores do estresse oxidativo estabelecendo uma ligação entre mecanismos lesivos da toxina nos tecidos, com as respostas cardiorrespiratórias que os animais utilizam para compensar a diminuição da disponibilidade de oxigênio em um ambiente eutrofizado. Dessa maneira foi possível obter uma visão abrangente das alterações fisiológicas que a microcistina pode causar em duas espécies representativas de nossa vasta ictiofauna. Essa forma de estudar esses efeitos nos possibilitou a realização de um estudo pioneiro e muito elucidativo, que abre caminho para outras abordagens em estudos futuros que venham a desvendar aspectos que não foram investigados em nosso trabalho.

Em relação à contribuição científica, nossos dados fornecem indícios relevantes para posteriores estudos com as espécies *Brycon amazonicus* e *Hoplias malabaricus*, além de suscitarem novas questões acerca dos efeitos espécie-

específicos das microcistinas, os quais merecem aprofundamento. De maneira complementar, esta tese busca esclarecer quais são os efeitos da microcistina-LR em duas espécies ecologicamente distintas, com o intuito de estabelecer um panorama sobre a ictiofauna brasileira, objetivando ser relevante na preservação de uma gama maior de espécies.

A exposição à microcistina-LR em dose aguda via intraperitoneal, induziu estresse oxidativo e alterou as respostas cardiorrespiratórias em ambas as espécies. A maior contribuição dessa tese é reconhecer que há claros indícios de que os efeitos da microcistina são espécie-específicos e se manifestam de maneira distinta quanto ao mecanismo de lesão tecidual nas espécies estudadas. De maneira geral a espécie *Brycon amazonicus* se mostrou mais sensível ao efeito da MC-LR, uma vez que houve mortes durante a realização dos experimentos cardiorrespiratórios e indução de estresse oxidativo em todos os tecidos avaliados nos peixes contaminados. Embora tenha se mostrado mais resistente em comparação ao matrinxã, *Hoplias malabaricus* exibiu alterações importantes em suas respostas fisiológicas, as quais podem diminuir sua capacidade de sobrevivência em situações adversas. Tomadas em conjunto, as alterações observadas em ambas as espécies podem reduzir a capacidade compensatória desses animais a variações que naturalmente ocorrem no decorrer do seu ciclo de vida, diminuindo suas chances de sobrevivência, sua capacidade de migração durante o período reprodutivo e até mesmo predação.

Em um contexto ecológico, a exposição de uma população a tais efeitos pode ter consequências drásticas sobre a diversidade de espécies dentro de um ecossistema. Dentro de um cenário onde não há perspectivas de diminuição da ocorrência de eutrofização nos corpos d'água faz-se necessário o monitoramento para que seja possível evitar grandes prejuízos ambientais. Estudos como o presente podem ser realizados em um maior número de espécies gerando informações que venham a elucidar de maneira cada vez mais abrangente os mecanismos de ação das microcistinas sobre a vasta ictiofauna de nosso país.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMOVSKY, et al. Microcystin kinetics (bioaccumulation and elimination) and biochemical responses in common carp (*Cyprinus carpio*) and silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) exposed to toxic cyanobacterial blooms. *Environ. Toxicol. Chem.* v. 26, p. 2687–2693, 2007.

AEBI, H. Catalase. In: Bergmayer, H.U. (Ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. London, New York: Academic Press, 1974. p. 671-684.

AGUIAR, L. H.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. The effects of temperature on the cardiorespiratory function of the neotropical fish *Piaractus mesopotamicus*. *J. Therm. Biol.*, v. 27, p. 299-308, 2002.

ALMROTH, B.C.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FORLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparous*), measured as protein carbonyl and TBARS, as biomarkers. *Aquatic Toxicol.*, v. 73, p. 171-180, 2005.

ALTIMIRAS, J.; AISSAOUI, A.; TORT, L. Is the short-term modulation of heart rate in teleost fish physiologically significant? Assessment by spectral analysis techniques. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, n. 28, p. 1197-1206, 1995.

ALVES, I.C.C.; EL-RABRINI, M.; SANTOS, M. de L.S.; MONTEIRO, S. de M.; BARBOSA, L.P.F.; GUIMARÃES, J.T.F. **Qualidade das águas superficiais e avaliação do estado trófico do Rio Arari**. 2012.

L.L. AMADO.; J.M. MONSERRAT. Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how. *Environment International*. v. 36, p. 226–235, 2010.

ANDRADE JÚNIOR, D.R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J. Bras. Pneumol.*, v. 31, p. 60-68, 2005.

ANDRADE, M.S.B. **Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultraestruturais de microcistinas em células Vero**. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

ANELLI-Jr, L.C. **Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup® sobre a função cardiorespiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae)**. Doutorado (tese). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, 92 p, 2010.

ARIZA, R.R.; KEYSE, S.M.; MOGGS, J.G.; WOOD, R.D. Reversible protein phosphorylation modulates nucleotide excision repair of damaged DNA by human cell extracts. *Nucl. Acid. Res.*, v. 24, p. 433–440, 1996.

ATENCIO et al. Acute Effects of Microcystins MC-LR and MC-RR on Acid and Alkaline Phosphatase Activities and Pathological Changes in Intraperitoneally Exposed Tilapia Fish (*Oreochromis sp.*) **Toxicologic Pathology**, v. 36, p. 449-458, 2008<sup>a</sup>.

ATENCIO et al. Dose-dependent antioxidant responses and pathological changes in tenca (*Tinca tinca*) after acute oral exposure to *Microcystis* under laboratory conditions. **Toxicicon** v. 52 p. 1-12, 2008b.

AZEVEDO, S.M.F.O. Toxinas de Cianobactérias: Causas e Consequências para a Saúde Pública. **Medicina On - Line**, v. 1. n. 3, 1998.

AZEVEDO, P.; GOMES, A.L. Contribuição ao estudo da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Bol. Ind. Animal**, v. 5, p. 15-64, 1943.

BABER, A.D.; HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Am. Pharm.**, v. 34, p. 26-35, 1994.

BARBIERI, G.; PERET, A.C.; VERANI, J.C. Notas sobre a adaptação do trato digestivo ao regime alimentar em espécies de peixes da região de São Carlos (SP). I. quociente intestinal. **Ver. Bras. Biol.**, v. 54, p. 63-69, 1994.

BARLING, D. et al. A glutathione S-transferase with glutathione peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. **Europ. J. Biochem.**, v. 216, p. 579-586, 1993.

BARROS, L.A.; MORAES FILHO, J.; OLIVEIRA, R.L. Larvas de nematóides de importância zoonótica encontradas em traíras (*Hoplias malabaricus* Bloch, 1794) no município de Santo Antonio do Leverger, MT. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, p. 533-535, 2007.

BARTRAM, J.; CARMICHAEL, W.W.; CHORUS, I.; JONES, G.; SKULBERG, O.M. Introduction. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic Cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. Londres: St Edmundsbury Press, cap. 1, p. 1-14, 1999.

BAINY, A.C.D. Oxidative stress as biomarker of polluted aquatic sites. In: VAL, A.L.; ALMEIDA-VAL, V.M.F.; RANDALL, D.J. (Eds.). **Physiology and biochemistry of the fishes of the Amazon**. Manaus: INPA, 1996. p. 101-110.

BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A. VALENTINE, W.M. Intoxication in livestock and water flow. Clinical Toxicology - Veterinary Clinics of North America. **Food Animal Practice**, v. 5, p. 345-361, 1989.

BEST, J.H.; EDDY, F.B.; CODD, G.A. Effects of purified microcystin-LR and cell extracts of *Microcystis* strains PCC 7813 and CYA 43 on cardiac function in brown trout (*Salmo trutta*) alevins. **Fish Physiol. Biochem.** v. 24, 171-178, 2001.



BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 47, p. 233-261, 1996.

BERTOLLO, L.A.C. et al. A biodiversity approach in the neotropical Erythrinidae fish, *Hoplias malabaricus*. Karyotypic survey, geographic distribution of cytotypes and cytotaxonomy considerations. **Chromosome Res.**, v. 8, p. 603-613, 2000.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B.M. Improved method for the determination of blood glutathione. **J. Lab. Clin. Méd.**, v. 61, p. 882-888, 1963.

BIESALSKI, H.K. The role of antioxidants in nutritional support. **Nutrition**, v. 16, p. 593-596, 2000.

BLAHA, L.; KOPP, R.; SIMKOVA, K.; MARES, J. Oxidative stress biomarkers are modulated in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val) exposed to microcystin-producing cyanobacterial water bloom. **Acta Vet. Brno**. 73, 477–482, 2004.

BOYER, J.L.; HAGENBUCH, B.; ANANTHANARAYANAN, M.; SUCHY, F.; STIEGER, B.; MEIER, P.J. Phylogenic and ontogenic expression of hepatocellular bile acid transport. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 435–438, 1993.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 1469. Norma de qualidade da água para consumo humano. **Diário Oficial da União**, 18p. Brasília, DF, 29 DEZ. 2000.

BRIAND, J.F.; JACQUET, S.; BERNARD, C.; HUMBERT, J.F. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. **Veterinary Research.**, v. 34, p. 361-377, 2003.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: sistemática. In: BRANCO, S. M. (Ed). **Poluição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública e Instituto de Pesca da USP, 1972. p. 79-108.

BUSHNELL, P.G.; BRILL, R.W. Oxygen transport and cardiovascular responses in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) exposed to acute hypoxia. **J. Comp. Physiol.**, 162B, n. 2, p. 131-143, 1992.

CAMPBELL, N.; REECE, J.; TAYLOR, M.; SIMON, E.; DICKEY, J. **Biology: Concepts and Connections**, Benjamin Cummings, 6th Edition. 928p, 2008.

CAO, C. et al. Glutathione peroxidase 1 is regulated by the c-abl and arg tyrosine kinases. **J Biol Chem** 2003a;v. 278, p. 39609–39614, 2003.

CARBIS, C.R.; RAWLIN, G.T.; GRANT, P.; MITCHELL, G.F.; ANDERSON, J.W.; MacCAULEY. A study of feral carp *Cyprinus carpio* L., exposed to *Microcystis aeruginosa* at Lake Mokoan, Australia, and possible implication on fish health. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, v.20, n.2, p.81-91, 1997.

CARMICHAEL, W.W.; BRIGGS, D.F.; GORHAM, P.R. Toxicology and pharmacology action of *Anabaena flos-aquae* toxin. **Science**, v.187, p. 542-544, 1975.

CARMICHAEL, W.W.; SCHWARTZ, L.D. Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. **Farmers Bulletin** 2275, Washington, DC: US Dept. of Agriculture, 1984.

CARMICHAEL, W.W.; BEASLEY, V.R.; BUNNER, D.L.; ELOFF, J.N.; FALCONER, I.; GORHAM, P.; HARADA, K.I.; KRISHNAMURTHY, T.; YU, M.J.; MOORE, R.E.; RINEHART, K.; RUNNEGAR, M.; SKULBERG, O.M.; WATANABE, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). **Toxicon**, v. 26, p. 971-973, 1988.

CARMICHAEL, W.W.; FALCONER, I.R. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: I.R. Falconer, Editor, **Algal Toxins in Seafood and Drinking Water**, Academic Press, London, p. 187–209, 1993.

CARMICHAEL, W.W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, v. 270, p. 78-86, 1994.

CARMICHAEL, W.W. Toxic microcystis and the environment. In WATANABE, M.F.; HARADA, K.; CARMICHAEL, W.W.; FUJIKI, H. (Eds). **Toxic Microcystis**. CRC Press, USA, 1996.

CARVALHO, C.S.; FERNANDES, M.N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the Neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquaculture**. v. 251, p. 109-117, 2006.

CHANCE, B.; GREENSTEIN, D.S.; ROUGHTON, F.J.W. The mechanism of catalase action. I. Steady-state analysis. **Arch. Biochem.**, v. 37, p. 301-321, 1952.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health, monitoring and management**, London: Spon Press, 416p., 1999.

CHORUS, I. **Cyanotoxins: Occurrence, causes and consequences**. Springer, Germany, 2001.

CODD, G.A.; BELL, S.G. The occurrence and fate of the blue-green algal toxins in freshwaters. **National Rivers Authority R and D report 29**, London: Her Majesty's Stationery Office, 1996.

CODD, G.A. Cyanobacterial toxins, the perception of water quality, and the prioritisation of eutrophication control. **Ecological Engineering**, v.16, p. 51-60, 2000.

COHEN, G.; HOCHSTEIN, P. Glutathione peroxidase: the primary agent for the elimination of hydrogen peroxide in erythrocytes. **Biochem.**, v. 2, p. 1420-1428, 1963.

CONTE S.M; RABELO I.M.M; GIORDANI A.T; DEWES W. Ocorrência de *Cylindrospermopsis raciborskii* nas bacias hidrográficas dos rios dos Sinos e Caí, RS-Brasil. In: **Anais do XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental**; 2000; Porto Alegre, Brasil.

CORRÊA, C.F. **Efeitos das reduções graduais do oxigênio ambiental sobre a função cárdio-respiratória de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) (Teleostei, Serrasalmidae)**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, 109p, 1996.

CORREIA, F.; DELGADO, P.; CASTRO, V. Impacto do Desenvolvimento e Toxicidade das Cianobactérias. **Ecotoxicologia**. Lisboa, 2000.

COSTA, O.F.T.; FERREIRA, D.J.S.; MENDONÇA, F.L.P.; FERNANDES, M.N. Susceptibility of the Amazonian fish, *Colossoma macropomum* (Serrasalminae), to short-term exposure to nitrite. **Aquaculture**. v. 232, p. 627-636, 2004.

CRAIG, M.; LUU, H.A.; MCCREADY, T.L.; WILLIAMS, D.; ANDERSEN, R.J.; HOLMES, C. F. Molecular mechanisms underlying the interaction of motuporin and microcystins with type-1 and type-2A protein phosphatases. **Biochem. Cell Biol.**, v. 74, p. 569–578, 1996.

DAVIS, J.C. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. **J. Fish. Res. Board Can.**, v. 32, n. 12, p. 2295-2332, 1975.

DEJOURS, P. **Principles of comparative respiratory physiology**. New York: Elsevier, 265 p., 1981.

DIAL, N.A. Methylmercury: some effects on embryogenesis in the Japanese medaka *Oryzias latipes*. **Teratology**, v. 17, p. 83-92, 1978

Di GIULIO, R.T.; HINTON, D.E. **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008. 1071 p.

DIMITROVA, M.S.T.; TSINOVA, V.; VELCHEVA, V. Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase–catalase system in carp (*Cyprinus carpio*). **Comp. Biochem. Physiol.** Part C. v. 108, p. 43–46, 1994.

DING, W-X.; SHEN, H-M.; ONG, C-N. Calpain activation after mitochondrial permeability transition in microcystin-induced cell death in rat hepatocytes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 291, p. 321–331, 2002.

DING, et al. Microcystic cyanobacteria causes mitochondrial membrane potential alteration and reactive oxygen species formation in primary cultured rat hepatocytes. **Environ. Health Persp.** v. 106, p. 409–413, 1998.

DING, W.X.; ONG, C.N. Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity. **FEMS Microbiol. Lett.** v. 220, p. 1–7, 2003.

DOUGLAS, P.; MOORHEAD, G.B.; YE, R.; LEES-MILLER, S.P. Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 50, 2001.

DRIEDZIC, W.R. et al. Alterations in energy metabolism associated with the transition from water to air breathing in fish. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 730-735, 1978.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Phys. Rev.** v. 82, p. 47–95, 2002.

DUBE, P.N.; HOSETTI, B.B. Behaviour surveillance and oxygen consumption in the freshwater fish *Labeo rohita* (Hamilton) exposed to sodium cyanide. **Biotechnol. Animal Husbandry**, v. 26, p. 91- 103, 2010.

DUY, T.N.; LAM, P.K.S.; SHAW, G.R.; CONELL, D.W. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. **Reviews of Environmental. Contamination and Toxicology.**, v. 163, p. 113-186, 2000.

ECKERT, R.; RANDALL, D.; AUGUSTINE, G. **Animal Physiology** 3ed. W.H. Freeman & Co., New York.

ELIA, A.C. et al. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 55, p. 162-167, 2003.

ERIKSSON, J.E. et al. Hepatocellular uptake of 3-H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1025, n. 1, p. 60-66, 1990.

FAGAN, J.M.; SLECZKA, B.G.; SOHAR, I. Quantification of oxidative damage to tissue proteins. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 31, p. 751-757, 1999.

FALCONER, I.R. et al. Toxicity of the blue-green alga (*Cyanobacterium*) *Mycrocistis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury risk and assessment, **Environmental toxicology and water quality**, v.9, n.2, p.131-139, 1994.

FARRELL, A.P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation, **Can. J. Zool.**, v. 62, p. 523-536, 1984.

FARREL, A.P. Tribute to P.L. Lutz: a message from the heart – why hypoxic bradycardia in fishes? **J. Exp. Biol.**, v. 210, p. 1415-1725, 2007.

FARREL, A.P.; JONES, D.R. The heart. In: HOAR, W.S., RANDALL, D.J., FARREL, A.P. **Fish physiology, v. XII (A): The cardiovascular system**. New York: Academic Press Inc., 1992. p. 1-88.

FERNANDES, M.N.; BARRIONUEVO, W.R.; RANTIN, F.T. Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a South American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. **J. Fish Biol.**, v. 46, p. 123-133, 1995.

FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Gill morphometry of the teleost *Hoplias malabaricus* (Bloch). **Bol. Fisiol. anim.** São Paulo, v. 9, p. 274-280, 1985.

FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish. Biol.**, v. 35, p. 509-519, 1989.

FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Aquacultural consequences. **Aquaculture**, v. 127, p. 339-346, 1994.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FEURSTEIN, D.; HOLST, K.; FISCHER, A.; DIETRICH, D.R. Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 234, p. 247-255, 2009.

FISCHER, W. J., ALTHEIMER, S., CATTORI, V., MEIER, P. J., DIETRICH, D. R., and HAGENBUCH, B. Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 203, p. 257-263, 2005.

FISCHER, W.J.; DIETRICH, D.R. Pathological and Biochemical Characterization of Microcystin-Induced Hepatopancreas and Kidney Damage in Carp (*Cyprinus carpio*). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 164, p. 73-81, 2000.

FISCHER, W.J; HITZFELD, B.C; TENCALLA, F.; ERIKSSON, J.E; MIKHAILOV, A.; DIETRICH, D.R. Microcystin-LR Toxicodynamics, Induced Pathology, and Immunohistochemical Localization in Livers of Blue-Green Algae Exposed Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Toxicological Sciences.**, v. 54, p. 365-373, 2000.

FLOHÉ, L., ÖTTING, F. Superoxide dismutase assays. **Met. Enzymol.**, v. 105, p. 93-105, 1984.

FOWLER, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. **Arq. Zool. São Paulo**, v. 6, p. 205-404, 1950.

FRICKER, G.; HUGENTOBLE, G.; MEIER, P.J.; KURZ, G.; BOTER, J.L. Identification of a single sinusoidal bile salt uptake system in skate liver. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.** v. 253, p. 816–822, 1987.

GALIS, F.; BAREL, C. D. N. Comparative functional morphology of the gills of African lacustrine Cichlidae (Pisces, Teleostei). An eco-morphological approach. **Neth. J. Zool.**, v. 30(2), 392-430. 1980.

GARCEZ, M. et al. Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M., HENRIQUES, J.A.A. (Eds). **Radicaís livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. CANOAS: Editora ULBRA, 2004. p 13- 33.

GEHRINGER M.M. et al. An investigation into the detoxification of microcystin-LR by the glutathione pathway in Balb/c mice. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 36 p. 931–941, 2004.

GLASS, M.L.; RANTIN, F.T.; VERZOLA, R.M.M.; FERNANDES, M.N.; KALININ, A.L. Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp (*Ciprinus carpio* L.). **J. Fish. Biol.**, v. 39, p. 143-149, 1991.

GODIN, D.V.; GARNETT, M.E. Effects of various anesthetic regimens on tissue antioxidant enzyme activities. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 83, p. 93-101, 1994.

GODOY, M.P. Família Erythrinidae. In: GODOY, M.P. (Ed.). **Peixes do Brasil. Sub-Ordem Characoidei Bacia do Rio Mogi Guassu**. Piracicaba, SP: Editora Franciscana, 1975. p. 400-444.

GOMES, D.P.P.; BARROS, F.M.; BARRETO, L.V.; ROSA, R.C.C.; TAGLIAFERRI, C. Avaliação do estado trófico para o rio Catolé-BA em diferentes épocas do ano. Centro Científico Conhecer - **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.6, n.11, 2010.

GRUNE, T. Oxidative stress, aging and the proteasomal system. **Biogerontology**, v. 1, p. 31–40, 2000.

GUERRA, C.D.R. **Respostas cardio-respiratórias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente**. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos naturais. Universidade Federal de São Carlos, 114p, 1992.

GULLEDGEA, B.M.; AGGENA, J.B.; HUANGB, H.B.; NAIRNC, A.C.; CHAMBERLIN, A.R. The microcystins and nodularins: Cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. **Curr. Med. Chem.** 2002, v. 9, 1991–2002.

GUZMAN, R.E.; SOLTER, P.F.; RUNNEGAR, M.T. Inhibition of nuclear protein phosphatase activity in mouse hepatocytes by the cyanobacterial toxin microcystin-LR. **Toxicon**, v. 41, p. 773-781, 2003.

HABIG, W.H. et al. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **J. Biol. Chem.**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HALLIWELL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.**, v. 1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B. Oxidative stress nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutrition antioxidant intake in humans. **Free. Rad. Res.**, v. 25, p. 25-57, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2. ed. Oxford: Clarendon Press, 1989. 469 p.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3.ed. UK: Oxford University Press, 2000. 936 p.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE J.C, **Free radicals in biology and medicine**. 4 ed. New York: Oxford University Press; 2007.851 p.

HASSPIELER, B.M.; BEHAR, J.V.; DI GIULIO, R.T. Glutathione dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 28, p. 82-90, 1994.

HAYES, J.D.; FLANAGAN, J.U.; JOWSEY, I.R. Glutathione transferases. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 45, p. 51–88, 2005.

HEAT, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Second Edition. Lewis Publishers, CRC Press, 359p, 1995.

HERMANSKY, S.J. et al. Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. **J. Appl. Toxicol.** v. 11, p. 65–73, 1991.

HERMES-LIMA, M.; STOREY J.M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol**. v.120, p. 437–448, 1998.

HITZFELD, B.C.; HÖGER, S.J.; DIETRICH, D.R. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment and human risk assessment. **Environmental Health Perspectives Supplements**, v.108, p.113-122, 2000.

HOCHACHKA, P.W. **Living without oxygen**. Close and open systems in hypoxia tolerance. Massachusetts: Harvard University Press, 1980. 181 p.

HOCHACHKA, P.W.; GUPPY, M.; GUDERLEY, H.E.; STOREY K.B.; HULBERT, W.C. Metabolic biochemistry of water vs. air-breathing fishes; muscles enzymes and ultrastructure. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 736-750, 1978.

- HONKANEN, R.E. et al. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265(32), p. 19401-19404, 1990.
- HOWES, G.J. Review of the genus *Brycon* (Teleostei: Characoidei). **Bull. Br. Mus. Nat. Hist. Zool.**, v.43, p. 1-47, 1982.
- HUGHES, G.M. The dimensions of fish gills in relation to their function. **J. Exp. Biol.** v. 45, p. 177-195, 1966.
- HUGHES, G.M. General anatomy of the gills. In :Hoar, W.S. and Randall, D.J (ed.) **Fish Physiology**. Vol.X. Gills. Part A: Anatomy, Gas transfer, and Acid-Base regulation.. Academic Press, Inc. Orlando, Florida, 1984, p. 1-72.
- HUGHES, G.M. Respiratory Responses to Hypoxia in Fish. **Am. Zool.** v. 13(2). p. 475-489, 1973.
- HUGHES, G. M.; ALBERS, C.; MUSTER, D.; GOETZ, K.H. Respiration of the carp, (*Cyprinus carpio* L.) at 10 and 20°C and the effects of hypoxia. **Journal of Fish Biology**, v.22, p. 613-628, 1983.
- HUGHES, G.M.; SHELTON, G. Respiratory mechanisms and their nervous control in fish. In: O. Lowenstein (ed.) **Advances in Comparative Physiology and Biochemistry**. Vol1, Academic Press, London. 1962, p. 275-364.
- ITO, E. et al. Comparison of protein phosphatase inhibitory activity and apparent toxicity of microcystins and related compounds. **Toxicol.** v. 40, p.1017–1025, 2002.
- JAYATISSA, L.P.; SILVA, E.I.L.; McELHINEY, J.; LAWTON, L.A. Occurrence of toxigenic cyanobacterial blooms in freshwaters of Sri Lanka. **Systematic and Applied Microbiology**, v.29, p. 156-164, 2006.
- JIANG, Z.Y. et al. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. **Anal. Biochem.**, v. 202, p. 384-389, 1992.
- JOHANSEN, K.; LENFANT, C.; GRIGG, G. C. Respiratory control in lungfish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 20A, p. 835-854, 1967.
- JOHANSEN, K.; MANGUM, C.P; LYKKEBOE, G. Respiratory properties of the blood of Amazon fishes. **Can. J. Zool.** v. 56, p. 898-906, 1978.
- JONES, D.R. The effect of hypoxia and anemia on the swimming performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Exp. Biol.** v. 55, p.541–551, 1971.
- JONES, D.P. Glutathione distribution in natural products: absorption and tissue distribution. **Meth. Enzymol.**, v. 252, p. 3-13, 1995.



JORDÃO JÚNIOR, A.A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JORGENSEN, E.H.; VIJAYAN, M.M.; ALURU, N.; MAULE, A.G. Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose and lactate responses to a handling disturbance in *Arctic charr*. **Comp. Biochem, Physiol.** v. 132C, p. 235-245, 2002.

JOS, A. et al. Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints, **Aquatic Toxicology**, v.71. p. 183-192, 2005.

KALININ, A.L. **Função respiratória de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes condições de O<sub>2</sub> ambiental: tomada de O<sub>2</sub> branquial e cutânea, medidas diretas e determinações indiretas dos parâmetros ventilatórios.** Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos naturais. Universidade Federal de São Carlos, 101p, 1996.

KALININ, A.L., **Respostas respiratórias de traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH), em diferentes fases de crescimento às reduções do oxigênio dissolvido no ambiente. aspectos fisiológicos e adaptativos.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos, 177p, 1991.

KALININ, A.L.; GLASS, M.L.; RANTIN, F.T. A comparison of directly measured and estimated gill ventilation in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 122A, p. 207-211, 1999.

KALININ, A.L.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N.; GLASS, M.L. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon** (Val, A. L., Almeida-Val, V. M. F. & Randall, D. J., eds), p. 191–202. Manaus: Editora do INPA, 1996.

KALININ, A. L.; RANTIN, F.T.; GLASS, M L. Dependence on body size of respiratory function in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during hypoxia. **Fish Physiol. Biochem.**, v. 12, p. 47-51, 1993.

KALININ, A.L.; SEVERI, W.; GUERRA, C. D. R.; COSTA, M.J.; RANTIN, F.T. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus* during normoxia and exposed to graded hypoxia. **Rev. Brasil. Biol.**, v. 60, n. 2, p. 249-254, 2000.

KAMOGAE, M.; HIROOKA, E. Y. Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas. **Acta Scientiarum** (UEM), Maringá, v. 5, n.22, p. 1189-1200, 2000.

KAPLOWITZ, N.; AW, T.Y.; OOKHTENS, M. The regulation of hepatic GSH. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 25, p. 714–744, 1985.

- KERSTENS, A.; LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. The ventilation, extraction and uptake of oxygen in undisturbed flounders, *Platichthys flesus*: responses to hypoxia acclimation. **J. Exp. Biol.**, v. 83, p. 169-179, 1979.
- KONDO, F. et al. Detection and identification of metabolites of microcystins formed *in vivo* in mouse and rat livers. **Chem. Res. Toxicol.** v. 9, p. 1355–1359, 1996.
- KONDO, F. et al. Determination of microcystins in lake water using reusable immunoaffinity column. **Toxicol.**, v. 40, p. 893-899, 2002.
- KONO, Y.; FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 5751-5754, 1982.
- KORSMEYER, K.E. et al. Cardiovascular function in swimming yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). **Am. Zool.**, v. 33, p. 33-44, 1993.
- KRUGER, N.J. The Bradford method for protein quantification. **Meth. Mol. Biol.**, v. 32, p. 9-15, 1994.
- LAGOS, N. et al. The first evidence of paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii*, isolated from Brazil. **Toxicol.** V. 37, p.1359-1373, 1999.
- LAMPARELLI, M. C. **Grau de trofia em corpos d'água do Estado de São Paulo: avaliação dos métodos de monitoramento.** Tese (Doutorado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 207p. 2004.
- LAURENT, P.; HOLMGREN, S.; NILSSON, S. Nervous and humoral control of the fish heart: structure and function. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 76A, p. 525-542, 1983.
- LEAVER, M.J., WRIGHT, J., GEORGE, S.G., 1997. Structure and expression of a cluster of glutathione S-transferase genes from a marine fish, the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Biochem. J.** v. 321, p. 405–412, 1997.
- LEITÃO, C.M. **Zoogeografia do Brasil.** 2. ed. São Paulo: Editora Nacional, 1947. 416p.
- LEITE, R.G. A alimentação de juvenis de matrinxã, *Brycon amazonicum* (Pisces, Characidae), em áreas inundadas da ilha de Marchantaria, Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 34, p. 56-67, 2004.
- LENARTOVA, V. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers or river pollution. **Biomarkers.** v. 2, p. 247–252, 1997.
- LI, X., LIU, Y., SONG, L., LIU, J., 2003. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of microcystin-LR. **Toxicol.** v. 42, p. 85–89, 2003.

LI, L. et al. Sequential ultrastructural and biochemical changes induced in vivo by the hepatotoxic microcystins in liver of the phytoplanktivorous silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. **Comp. Biochem. Physiol.** Part C v. 146, p. 357–367, 2007.

LIEBLER, D.C.; REED, D.J. Free-radical defense and repair mechanisms. In: WALLACE, K.B. (Ed.). **Free Radical Toxicology**. USA: Taylor & Francis, 1997. p. 141-171.

LILLEHEIL, G.; ANDERSEN, R.A.; SKULBERG, O.M.; ALEXANDER, J. Effects of a homoanatoxin- $\alpha$ -containing extract from *Oscillatoria Formosa* (Cyanophyceae/Cyanobacteria) on neuromuscular transmission. **Toxicon**, v. 35, p.1275-1289, 1997.

LIVINGSTONE, D.R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120, p. 43-49, 1998.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 42, p. 656-666, 2001.

LO H-W.L.; ANTOUN G.R.; ALI-OSMAN, F. The human glutathione S-transferase P1 protein is phosphorylated and its metabolic function enhanced by the Ser/Thr protein kinases, cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C, in glioblastoma cells. **Cancer Res** 2004; v. 64, p. 9131–9138, 2004.

LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp: how it affects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. **Physiol. Zool.**, v. 52, p. 38-49, 1979.

MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P.; CODD, G.A. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. **FEBS Letters**, v. 264, p. 187-192, 1990.

MALBROUCK, C. et al. Effect of microcystin-LR on protein phosphatase activity in fed and fasted juvenile goldfish *Carassius auratus* L. **Toxicon**. v. 43, p. 295–301, 2004.

MANKIEWICZ, J. et al. Apoptotic effect of cyanobacterial extract on rat hepatocytes and human lymphocytes. **Environ. Toxicol.** v. 16, 225–233, 2001.

MARICONDI-MASSARI, M. **Avaliação das respostas cardio-respiratórias de tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus* (Schwartz, 1983), às variações da temperatura ambiental e recuperação subsequente.** Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, 87p, 1993.

MARTINS, N.D. **Efeitos da Microcistina-LR (*Microcystis aeruginosa*) sobre parâmetros cardio-respiratórios de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).** Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 44p, 2010.

MARTINS, N.D.; COLVARA, W.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.K. Microcystin-LR: How it affects the cardio-respiratory responses to hypoxia in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Chemosphere**. v. 84, p. 154–159, 2011.

MARVIN, D.E.; HEAT, A.G. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 27A p. 349-355, 1968.

MATTIAS, A.T.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N. Gill respiratory parameters during progressive hypoxia in the facultative air-breathing fish, *Hypostomus regani* (Loricariidae). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120A, p. 311-315, 1998.

MATTIAS, A.T.; MORON, S.E.; FERNANDES, M.N. Aquatic respiration during hypoxia of the facultative air-breathing *Hoplerythrinus unitaeniatus*. A comparison with the water-breathing *Hoplias malabaricus*. In: Val, A.L., Almeida-Val, V.M.F., Randall, D.J. (eds.). **Physiology and Biochemistry of the Fishes of The Amazon**. Manaus: INPA, p. 203-211, 1996.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. **J. Biol. Chem.**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MONTEIRO, D.A. **Efeitos do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600®) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce Matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta.** Tese (Doutorado), Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, Universidade Federal de São Carlos, 163p, 2006.

MONTEIRO, D.A. **Impacto de diferentes vias de contaminação por mercúrio inorgânico sobre os biomarcadores de estresse oxidativo, a função cardiorrespiratória e o potencial de bioconcentração e biomagnificação em matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829) e em traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794).** Tese (Doutorado), Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP, Universidade Federal de São Carlos, 423p, 2011.

MONTEIRO, D.A. et al. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion) **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 143, p. 141-149, 2006.

MORENO et al. Antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in liver and kidney of rats exposed to microcystin-LR administered intraperitoneally. **Toxicol.** v. 45, p. 395–402, 2005.

MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MEHRLE, P. M.; MAYER, F.L. Biochemistry/physiology. In: RAND, G. M; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and application**. New York: Hemisphere, p 264-274, 1984.

MILLER, S.A.; HARLEY, J.P. **Zoology**. McGraw-Hill Science/Engineering/Math; Fifth Edition, 540 p, 2002.

NAKAMURA, W. et al. Purification and properties of rat liver glutathione peroxidase. **Biochem. Biophys. Acta.**, v. 358, p. 251-261, 1974.

NISHIWAKI, R.; OHTA, T.; SUEOKA, E.; SUGAMUNA, M., K.; WATANABE, M. F.; FUJIKI, H. Two significant aspects of microcystin-LR: Specific binding and Liver Specificity. **Cancer Lett**, v. 83, p. 283-289, 1994.

NYSTRÖM, T. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. **EMBO J.**, v. 24, p. 1311-1317, 2005.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

NOVELLI, E.L.B. Radicais livres e estresse oxidativo. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Nutrição e vida saudável. Estresse oxidativo e metabolismo energético**. Ribeirão Preto: Tecmedd Editora, 2005. p. 93-113.

OBA, E.T.; MARIANO, W.S.; SANTOS, L.R.B. Estresse em peixes cultivados: agravantes e atenuantes para o manejo rentável, in: Tavares Dias, M. (Eds.) **Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo**. Embrapa Amapá, Macapá, p. 226-247, 2009.

OKAMURA, T. Tyrosine phosphorylation of the human glutathione S-transferase p1 by epidermal growth factor receptor. **J Biol Chem**, 2009.

OLIVEIRA, E.M.; RAMIRES, P.R.; LANCHA JUNIOR, A.H. Nutrição e bioquímica do exercício. **Rev. Paul. Educ. Fís.**, v. 18, p. 7-19, 2004.

OLLE, C.D. **Efeito do inseticida organofosforado metilparation (Folisuper 600BR®) sobre a função cardio-respiratória do peixe teleósteo matrinxã, *Brycon cephalus***. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de São Carlos, 130p, 2007.

OTT, M. E.; HEISLER, N.; ULTSCH, G. R. A re-evaluation of the relationship between temperature and the critical oxygen tension in freshwater fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 27A, p. 349-355, 1980.

PAIVA, M. P. **Fisioecologia da Traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch ,1794), no Nordeste Brasileiro.**1972. 140f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

PANDEY, S. et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). **Sci. Total Environ.**, v. 309, p. 105-115, 2003.

PARK, H.D. et al. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese freshwaters. **Natural Toxins**, v.1, p. 353-360, 1993.

PAVAGADHI, S.; BALASUBRAMANIAN, R. Toxicological evaluation of microcystins in aquatic fish species: Current knowledge and future directions. **Aquatic Toxicology**, v. 142, p. 1-16, 2013.

PERRY S.F.; REID S.D. Relationship between blood oxygen content and catecholamine levels during hypoxia in rainbow trout and American eel. **Am J Physiol**; v. 263, p. 240–249, 1992.

PFLUGMACHER et al. Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin- LR: the first step of detoxication. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1425, p. 527–533, 1988.

PIZANGO-PAIMA, E.G. **Estudo da alimentação e composição corporal do matrinxã (*Brycon cephalus*) (Günther, 1869) (Characiformes, Characidae), na Amazônia central. Manaus, AM.** 1997. 138 f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA/FUA, Manaus, 1997.

PRIETO, A.I. et al. Time-dependent protective efficacy of Trolox (vitamin E analog) against microcystin-induced toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environ. Toxicol.**, v. 24, p. 563–579, 2009.

PRIETO, A.I. et al. Differential oxidative stress responses to microcystins LR and RR in intraperitoneally exposed tilapia fish (*Oreochromis* sp.). **Aquatic Toxicology**., v.77, p. 314–321, 2006.

PRIETO, A.I. et al. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 337-345, 2007.

PROHASKA JR. The glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases. **Biochim Biophys Acta**. v.11, p.87–98, 1980.

QIU, T.; XIE, P.; KE, Z.; LI, L.; GUO, L. In situ studies on physiological and biochemical responses of four fishes with different trophic levels to toxic cyanobacterial blooms in a large Chinese lake. **Toxicon**. v. 50, p. 365–376, 2007.

RABERGH, C.M.I.; BYLUND, G.; ERIKSSON, J.E. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa*, on common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 20, p. 131-146, 1991.

RABERGH, C.M., ZIEGLER, K., ISOMAA, B., LIPSKY, M.M., ERIKSSON, J.E., 1994. Uptake of taurocholic acid in isolated hepatocytes from rainbow trout. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 267. p. 380–386, 1994.

RANDALL, D. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.**, v. 100, p. 275-288, 1982.

RANDALL, D.J.; PERRY, S.F. Catecholamines. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; FARRELL, A.P., **Fish Physiology**. San Diego: Academic Press, p.255-300, 1992.

RANTIN, F.T.; JOHANSEN, K. Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to hypoxia. **Environ. Biol. Fishes**, v. 11, p. 221-228, 1984.

RANTIN, F.T.; KALININ, A.L.; GLASS, M.L.; FERNANDES, M.N. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life in two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish. Biol.**, v. 41, p. 805-812, 1992.

RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N.; SANCHES, J.R. Tensões críticas de oxigênio de traira, *Hoplias malabaricus*, em diferentes temperaturas de aclimação. IV Seminario Regional de Ecologia. São Carlos, SP, **Resumos** p. 364, 1984.

RANTIN, F.T.; GLASS, M.L.; KALININ, A.L.; VERZOLA, R.M.M. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environmental Biology of Fishes**, v. 36, p. 93-97, 1993.

RANTIN, F.T. et al. Electrocardiographic characterization of myocardial function in normoxic and hypoxic teleosts. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, p. 1277-1289, 1995.

RANTIN, F.T., GUERRA, C.D.R., KALININ, A.L., GLASS, M.L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 119, pp. 991-997, 1998.

RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Cardiorespiratory function and aquatic surface respiration in *Colossoma macropomum* exposed to graded and acute hypoxia. In: Val, A.L., Randall, D.J., MacKinley, D. (eds.). **The Physiology Of Tropical Symposium Proceedings. International Congress On The Biology Of Fishes. Am. Fisheries Society – Physiology Section**. San Francisco State University, 141p, 1996.

RAO, G.G.; RAO, G.R. Pigment composition & chlorophyllase activity in pigeon pea (*Cajanus indicus* Spreng) & Gingelley (*Sesamum indicum*.) under NaCl salinity. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.19, p.768-770, 1981.

REGOLI, F. et al. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 22, p. 2120-2129, 2003.

REID, S.G.; BERNIER, N.J.; PERRY, S.F. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 120C, p. 1-27, 1998.

REQUENA, J.R.; LEVINE, R.L.; STADTMAN, E.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. **Amino Acids**, v. 25, p. 221-226, 2003.

REZNICK, A.Z., PACKER, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. **Met. Enzymol.**, v. 233, p. 357-363, 1994.

REYNOLDS, C.S. 1984. **The ecology of freshwater phytoplankton**. Cambridge Univ. Press, 367 p, 1984.

RIOS, F.S. **Metabolismo energético de *Hoplias malabaricus* (Boch, 1794) (Erythrinidae) submetida à privação de alimento e à realimentação**. 2001. 104 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais), Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

RIOS, F.S.; KALININ, A.L.; RANTIN, F.T. The effects of long-term food deprivation on respiration e hematology of the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **J. Fish Biol.**, v. 61, p. 85-95, 2002.

RODRIGUEZ-ARIZA, A. et al. Biochemical effects of environmental pollution in fishes from Spanish South-Atlantic littoral. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 19, 301S, 1991.

SATCHELL, G.H. **Physiology and form of fish circulation**. Cambridge, Great Britain, Cambridge University Press, 235p. 1981.

SAUNDERS, R.L. The irrigation of the gills of fishes. II. Efficiency of oxygen uptake in relation to respiratory flow, activity and concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Canadian Journal of Zoology**. v. 40, p. 817-62, 1962.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 56, 295-301, 2003.

SCHLENK, D.; DAVIS, K. B.; GRIFFIN, B. R. Relationship between expression of hepatic metallothionein and sublethal stress in channel catfish following acute exposure to copper sulphate. **Aquaculture**, v. 177, p. 367-379, 1999.

SCORVO-FILHO, J.D. et al. Piscicultura em São Paulo: custos e retornos de diferentes sistemas de produção na safra de 1996/1997. **Inform. Econom.**, v. 28, p. 41-60, 1998.



SEKI H.; TAKAHASHI M.; HARA Y.; ICHIMURA S. Dynamics of dissolved oxygen during algal bloom in lake Kasumigaura, Japan. *Water Res* 1980; v. 14, p. 179–183, 1980.

SHAETER, E. et al. Differential susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by western blot immunoassay. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 17, p. 429-437. 1994.

SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.*, v. 47, p. 61-71, 1990.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.*, v. 215, p. 213-219, 1993.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular function. *Free Rad. Biol. Med.*, v. 27, p. 916-921, 1999.

SILVA, G.S.; MIOLA, S.; SILVA, G.S.; SOUSA, E.R. Avaliação da qualidade das águas do rio São Francisco Falso, **Tributário do reservatório de itaipu**, Paraná. 2010.

SIVONEN, K.; JONES, G. Cyanobacterial toxins. *In: Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management* (Chorus I, Bartam J, eds.). E & FN Spon, London, New York, p. 55-124, 1999.

SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; CODD, G.A.; SKULBERG, R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (cyanobacteria). *In: FALCONER, I.R. Algal toxins in sea food and drinking water*. London: Academic Press, p. 145-164, 1993.

SLATER, T.F. Free radical mechanisms in tissue injury. *Biochem. J.*, v. 222, p. 1-15, 1984.

SOARES, R. M.; MAGALHAES, V. F.; AZEVEDO, S. M. Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (*Cichlidae*) under laboratory conditions. *Aquatic Toxicology*, Amsterdam, v.70, n.1, p.1-10, 2004.

SOCCOL, M.C.H. **Otimização da vida útil da tilápia cultivada (*Oreochromis niloticus*), minimamente processada e armazenada sob refrigeração**. Dissertação (Mestrado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 124p., 2002.

SOLOMON, H.M.; WEIS, J.S. Abnormal circulatory development in medaka caused by the insecticides carbaryl, malathion, and parathion. *Teratology.*, v. 19, p. 51-62, 1979.

SOUZA, R.H.S. et al. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. *J. Comp. Physiol.*, v. 171B, n. 6, p. 483-489, 2001.

STEFFENSEN, J.F. Oxygen consumption of fish exposed to hypoxia: Are they all oxyregulators or are any oxyconformers? *Fish Physiology, Toxicology, and Water*

**Quality.** U.S. Environmental Protection Agency. Proceedings of the Ninth International Symposium, Capri, Italy, p. 239-250, 2006.

STEFFENSEN, J.F.; LOMHOLT, J.P.; JOHANSEN, K. Gill ventilation and O<sub>2</sub> extraction during graded hypoxia in two ecologically distinct species of flatfish, the flounder (*Platichthys flesus*) and the plaice (*Pleuronectes platessa*). **Env. Biol. Fish.** v. 7. p. 157-163, 1982.

STEFFENSEN, J.F. Some errors in respirometry of aquatic breathers: How to avoid and correct for them. **Fish Physiol Biochem.** v. 6, p. 49-59, 1989.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptation in nature. **Braz. J. Med. Res.**, v. 29, p. 1715-1733, 1996.

STOSS, F.W., HAINES, T.A., The effects of toluene on embryos and fry of the Japanese medaka *Oryzias latipes* with a proposal for rapid determination of maximum acceptable toxicant concentration. **Environ. Pollut.**, v. 13, p. 139-148, 1979.

SUNDIN, L.I. et al. Cardiovascular and respiratory reflexes: the tropical fish, traíra (*Hoplias malabaricus*) O<sub>2</sub> chemoresponses. **Resp. Physiol.**, v. 116, p. 181-199, 1999.

TAKENAKA, S. Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. **Environ. Toxicol. Pharmacol.** 9, 135-139, 2001.

TAKENAKA, S., OTSU, R. Effects of L-cysteine and reduced glutathione on the toxicities of microcystin-LR: the effect for acute liver failure and inhibition of protein phosphatase activity. **Aquat. Toxicol.** 48, 65-68, 1999.

TARHAN, L.; TUZMEN, M.N. Some properties of Cu, Zn-superoxide dismutase from sheep erythrocyte. **Turk. J. Chem.**, v. 24, p. 109-116, 2000.

TEUSCHLER, L.K.; GENNINGS, C.; HARTLEY, W.R.; CARTER, H., THIYAGARAJAH, A.; SCHOENY, R.; CUBBISON, C. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, v. 58, p. 1283-1291, 2005.

THEISS, W.C.; CARMICHAEL, W.W.; WYAMAN, J.; BRUNER, R. Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. **Toxicol.** v. 26, n. 7, p. 603-613, 1988.

THOMAZ, J.M. **Efeito do organofosforado triclorfon (Neguvon®) sobre a função cardio-respiratória da tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*).** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, 116p, 2008.

THOMAZ, J.M. **Habitat, hábito e morfologia cardíaca: Influências desses fatores sobre as respostas cardiorrespiratórias à hipóxia e alterações térmicas em duas espécies ecologicamente distintas.** Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, 189p, 2011.

TOCHER, D.R. et al. Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus* L.) halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). **Aquacult. Nutr.** 8, 195–207, 2002.

TOIVOLA, D.M.; ERIKSSON, J.E. Toxins affecting cell signaling and alteration of cytoskeletal structure. **Toxicology in Vitro**, v. 13, p. 521-530, 1999.

TOLEDO Jr.; A.P.; TALARICO, M.; CHINEZ, S.J.; AGUDO, E.G.A. A aplicação de modelos simplificados para a avaliação de processo da eutrofização em lagos e reservatórios tropicais, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA, 12. **Anais Camboriú**, 1983.

ULTSCH, G.R. et al. Metabolism, critical oxygen tension, and habitat selection in darters (*Etheostoma*). **Ecology**, v. 59, n. 1, p. 99-107, 1978.

VAL, A.L.; HONCZARYK, A. **Criando peixes na Amazônia.** Manaus, AM: Editora do INPA, 1995. 160p.

VAN APELDOORN, M.E.; VAN EGMOND, H.P.; SPEIJERS, G.J.; BAKKER, G.J. Toxins of cyanobacteria. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 51, p. 7–60, 2007.

VAN der OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 13, p. 57-149, 2003.

VAN MONTFOORT, J.E.; HAGENBUCH, B.; GROOTHUIS, G.M.; KOEPESELL, H.; MEIER, P.J.; MEIJER, D.K. Drug uptake systems in liver and kidney. **Current drug metabolism.** v. 4, p 185-211, 2003.

VIEIRA, J.M.S.; AZEVEDO, M.T.P.; AZEVEDO, S. M. F. O.; HONDA, R.Y.; CORREA, B. Toxic cyanobacteria and microcystin concentrations in a public water supply reservoir in the Brazilian Amazonia region. **Toxicon**, v. 45, n. 7, p. 901-909, 2005.

VILLACORTA CORREA, M.A. **Crescimento do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei, Characidae) no rio Negro, seus afluentes e no baixo rio Solimões.** 1987. 124 f. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA/FUA, Manaus, Amazônia.

VILLALOBOS, S.A.; HAMM, J.T.; TEH, S.J.; HINTON, D.E. Thiobencarb-induced embryotoxicity in medaka (*Oryzias latipes*): stage-specific toxicity and the protective role of chorion. **Aquatic Toxicol.**, v. 48, p. 309-326, 2000.

WDZIECZAK, J. et al. Comparative studies on superoxide dismutase, catalase and peroxidase levels in erythrocytes and livers of different freshwater and marine fish species. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 73, p. 361-365, 1982.

WEIS, P.; WEIS, J.S. Cardiac malformations and other effects due to insecticides in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Teratology**, v. 10, p. 263-268, 1974.

WEBER, R.E. Intraspecific adaptation of hemoglobin function in fish to environmental oxygen availability. In: ADDINK, A.D.F.; SPRONK, N. **Exogenous and endogenous influences on metabolic and neural control**, vol.1, Biochemistry. Oxford: Pergamon Press, 1982. p. 87-102.

WENG, et al. The role of ROS in microcystin-LR-induced hepatocyte apoptosis and liver injury in mice. **Toxicology**. v. 232, p. 15–23, 2007.

WIEGAND, C. et al. Uptake and effects of MC-LR on detoxification enzymes of early life stages of the zebra fish (*Danio rerio*). **Environ Toxicol.** v. 14, p. 89–95, 1999.

WILCE, M. C.; PARKER, M. W. Structure and function of glutathione S-transferases. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1205, p. 1-18, 1994.

WILHELM-FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, p. 349- 357, 2005.

WILHELM-FILHO, D. et al. Influence of season and pollution on the antioxidant defenses of the cichlid fish acará (*Geophagus brasiliensis*). **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 34, p. 719-726. 2001.

WILHELM-FILHO, D.; GONZALEZ-FLECHA, B.; BOVERIS, A. Gill diffusion as a physiological mechanism for hydrogen peroxide elimination by fish. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 27, p. 2879-2882, 1994.

WINSTON, G.W.; DI GIULIO, R. T. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organisms. **Aquatic Toxicol.**, v. 19, p. 137-161, 1991.

XU, L. et al. In vivo protein phosphatase 2A inhibition and glutathione reduction by MC-LR in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **Proceedings**, Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms, Hobart, Australia, February 7–11, 2000, p 399–402.

YANG, T.H.; SOMERO, G.N. Effects of feeding and food deprivation on oxygen consumption, muscle protein concentration and activities of energy metabolism enzymes in muscle and brain of shallowliving (*Scorpaena guttata*) and deep-living (*Sebastolobus alascanus*) Scorpaenid fishes. **J. Exp. Biol.**, v. 181, p. 213-232, 1993.

YOO, R.S.; CARMICHAEL, W.W.; HOEHN, R.C.; HRUDEY, S.E. **Cyanobacterial (blue-green algal) toxins a resource guide # 925**. Denver: AWWA Research Foundation and American Water Works Association, 1995.

YUNES, J.S.; CUNHA, N.T.; BARROS, L.P.; PROENÇA, L.A.O.; MONTSERRAT, J.M. Cyanobacterial neurotoxins from Southern Brazilian freshwaters. *Comments on toxicology*, v. 9, p 103-105, 2003.

ZANIBONI FILHO, E. **Biologia da reprodução do matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Teleostei, Characidae)**. 1985. 138 f. Tese (Doutorado em Biologia de Água Doce e Pesca Interior), Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA/FUA, Manaus, 1985.

ZHANG, J. et al. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 55, p. 167-174, 2004.

ZHANG, H.; ZHANG, J.; CHEN, Y.; ZHU, Y. Microcystin-RR induces apoptosis in fish lymphocytes by generating reactive oxygen species and causing mitochondrial damage. **Fish Physiol. Biochem.** v. 34, p. 307–312, 2008.

ZHANG, M.; WANG, Z.; XU, Z.; LIU, Y.; NI, L.; CAO, T.; XIE, P. Ammonium, microcystins, and hypoxia of blooms in eutrophic water cause oxidative stress and C–N imbalance in submersed and floating-leaved aquatic plants in Lake Taihu, China. **Chemosphere**. v. 82, p. 329–339, 2011.

**ANEXO**  
**DETALHAMENTO DOS PROCEDIMENTOS ESTATÍSTICOS**  
**Metodologia**

A primeira tentativa de como resolver este problema foi aplicar técnicas de análise de perfis, a qual possibilita saber se existe ou não efeito do grupo, do oxigênio, e da interação entre estas duas variáveis.

Após a análise exploratória, foi investigado se os dados seguem normalidade multivariada e se possuem matriz de variância-covariância constante, que são suposições necessárias para fazer uma análise de perfis.

Porém, mesmo utilizando métodos alternativos de transformações de dados, estas suposições não foram atendidas e não foi possível definir uma distribuição para as medidas de interesse.

Isso ocorre devido à existência de superdispersão dos dados, ou seja, os dados apresentam uma dispersão maior do que a da distribuição ajustada pela média. Devido ao fato do tamanho da amostra utilizada ser pequena, tornou-se inviável a utilização de técnicas multivariadas.

Logo, uma solução foi trabalhar com cada medida de forma univariada e utilizar equações de estimação generalizada, através do método da Quase-Verossimilhança, em que não é necessário conhecer a distribuição da variável de interesse. Este método leva em consideração a dependência entre as observações (referente ao mesmo peixe nas diferentes tensões de oxigênio) e, para estimar os parâmetros, utiliza-se apenas a média e variância. Para este trabalho, foi utilizada uma estrutura de correlação constante estimada a partir dos dados.

Além disso, o teste bilateral utilizado para verificar a significância das variáveis considera a distribuição Normal para definir a região crítica, na qual rejeita-se a hipótese nula. A hipótese nula, neste caso, indica que o parâmetro da variável que está sendo testada é nulo.

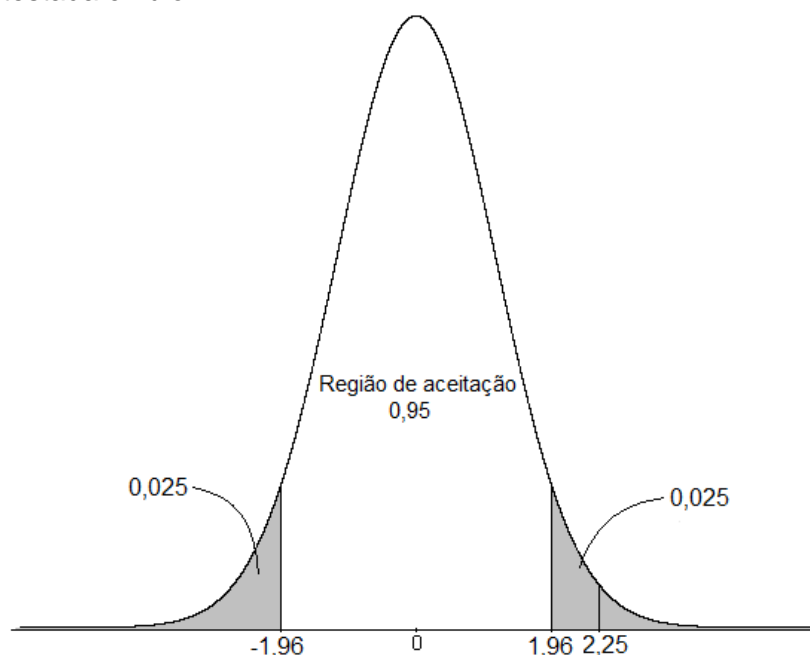


Figura 2 - Região Crítica para Normal bilateral

Para as variáveis  $V_G$ ,  $V_T$  e  $V_G/VO_2$ , o método de Quase-Verossimilhança não se adequou bem aos dados. Logo, ao observar que a distribuição destas variáveis sugeria uma Gama, foi possível utilizar modelos lineares generalizados com distribuição Gama, que, embora também não seja o modelo mais adequado para este tipo de dados, apresentou resultados compatíveis com o esperado e visto na análise descritiva.

### **Resultados para a espécie Traíra Variável Taxa Metabólica ( $VO_2$ )**

O modelo proposto para esta variável é dado por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 D_{1i} + \beta_3 D_{2i} + \beta_4 D_{3i} + \beta_5 D_{4i} + \beta_6 D_{5i} + \beta_7 D_{6i} + \varepsilon_i$$

Em que  $Y$  é a variável resposta ( $VO_2$ ),  $X_1$  é variável indicadora da covariável grupo ( $X_1=1$  indica grupo experimental),  $D_1, \dots, D_7$  são variáveis indicadoras da covariável “concentração” de oxigênio,  $\beta$ 's são os parâmetros desconhecidos que deseja-se estimar e  $i$  representa cada observação,  $i=1, \dots, 216$ .

As variáveis indicadoras da covariável “concentração” de oxigênio foram criadas de forma com que  $D_1$  representa o quanto a variável  $VO_2$  altera ao mudar de 140 para 120 a pressão parcial do oxigênio,  $D_2$  representa o quanto a variável  $VO_2$  altera ao mudar de 120 para 100 a pressão parcial do oxigênio, e assim por diante, até que a variável  $D_6$  representa o quanto a variável  $VO_2$  altera ao mudar de 40 para 20.

Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $VO_2$  dado pela equação:

$$\hat{Y}_i = 77,56 + 7,23X_{1i} - 23,03D_{1i} - 29,86D_{6i}$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio só interfere na taxa metabólica do peixe quando é reduzida de 140 para 120 e de 40 para menos. Ao alterar essa pressão parcial de 140 para 120, a taxa metabólica reduz em 23,03 unidades de medida. Se for alterada de 40 para 20, a taxa metabólica reduz em 29,86 unidades de medida.

Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a taxa metabólica aumenta em 7,23 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

### **Variável Extração de Oxigênio ( $EO_2$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 D_{1i} + \beta_3 D_{2i} + \beta_4 D_{3i} + \beta_5 D_{4i} + \beta_6 D_{5i} + \beta_7 D_{6i} + \varepsilon_i$$

Em que  $Y$  agora representa a variável resposta  $EO_2$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $EO_2$  dado pela equação:

$$\hat{Y}_i = 58,21 - 11,81X_{1i}$$

Isto significa que, para esta medida fisiológica não há evidências estatísticas suficientes para afirmar que a redução na pressão parcial do oxigênio interfere nesta medida nos peixes da espécie Traíra.

Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a extração de oxigênio diminui 11,81 unidades de medida.

### **Variável Ventilação Branquial ( $V_G$ )**

Neste caso, optou-se por utilizar um modelo linear generalizado com distribuição Gama (como sugere o histograma da variável resposta). Com isso, a função de ligação que apresentou melhor ajuste foi a própria identidade. Logo, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$\mu = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2D_1 + \beta_3D_2 + \beta_4D_3 + \beta_5D_4 + \beta_6D_5 + \beta_7D_6$$

Em que  $\mu$  representa a média da variável resposta  $V_G$  e os demais elementos são definidos da mesma forma que em modelos de estimação generalizada.

Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $V_G$  dado pela equação:

$$\hat{\mu} = 521,74 + 296,88X_1 + 393,6D_4 + 501,24D_5$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio só interfere na ventilação branquial do peixe quando é reduzida de 80 para 60 ou de 60 para 40. Ao alterar essa pressão parcial de 80 para 60, a ventilação branquial aumenta em 393,6 unidades de medida. Já se for alterada de 60 para 40, a ventilação branquial aumenta em 501,24 unidades de medida.

Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a ventilação branquial aumenta em 296,88 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

### **Variável Frequência Respiratória ( $F_R$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1X_{1i} + \beta_2D_{1i} + \beta_3D_{2i} + \beta_4D_{3i} + \beta_5D_{4i} + \beta_6D_{5i} + \beta_7D_{6i} + \varepsilon_i$$

Em que  $Y$  agora representa a variável resposta  $F_R$ .



Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $F_R$  dado pela equação:

$$\hat{Y}_i = 93,89 - 5,31X_{1i}$$

Isto significa que, para esta medida fisiológica não há evidências estatísticas suficientes para afirmar que a redução na pressão parcial do oxigênio interfere nesta medida nos peixes da espécie Traíra.

Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a frequência respiratória diminui em 5,31 unidades de medida.

### **Variável Volume Ventilatório ( $V_T$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, no caso do modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$\mu = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2D_1 + \beta_3D_2 + \beta_4D_3 + \beta_5D_4 + \beta_6D_5 + \beta_7D_6$$

Em que  $\mu$  agora representa a média da variável resposta  $V_T$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $V_T$  dado pela equação:

$$\hat{\mu} = 5,96 + 4,05X_1 + 3,59D_4 + 5,08D_5$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio só interfere no volume ventilatório do peixe quando é reduzida de 80 para 60 ou de 60 para 40. Ao alterar essa pressão parcial de 80 para 60, o volume ventilatório aumenta em 3,59 unidades de medida. Já se for alterada de 60 para 40, o volume ventilatório aumenta em 5,08 unidades de medida.

Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, o volume ventilatório aumenta em 4,05 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

### **Variável Frequência Cardíaca ( $F_H$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1X_{1i} + \beta_2D_{1i} + \beta_3D_{2i} + \beta_4D_{3i} + \beta_5D_{4i} + \beta_6D_{5i} + \beta_7D_{6i} + \varepsilon_i$$

Em que  $Y$  agora representa a variável resposta  $F_H$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $F_H$  dado pela equação:

$$\hat{Y}_i = 46,69 + 3,95X_{1i} - 4,38D_{1i} - 12,35D_{6i}$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio interfere na frequência cardíaca do peixe quando é reduzida de 140 para 120 e de 40 para menos. Ao alterar essa pressão parcial de 140 para 120, a frequência cardíaca reduz em 4,38 unidades de medida, ao alterar essa pressão parcial de 40 para 20, a frequência cardíaca reduz em 12,35 unidades de medida.

Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a frequência cardíaca aumenta em 3,95 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

### **Variável Necessidade Ventilatória ( $V_G/VO_2$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, no caso do modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$\mu = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2D_1 + \beta_3D_2 + \beta_4D_3 + \beta_5D_4 + \beta_6D_5 + \beta_7D_6$$

Em que  $\mu$  agora representa a média da variável resposta  $V_G/VO_2$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $V_G/VO_2$  dado pela equação:

$$\hat{\mu} = 6,64 + 2,43 X_i + 3,01D_{2i} + 3,92D_3 + 4,9D_4 + 11,69D_5 + 31,29D_6$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio interfere na necessidade ventilatória do peixe, exceto quando é reduzida de 140 para 120. Ao alterar essa pressão parcial de 120 para 100, a necessidade ventilatória aumenta em 3,01 unidades de medida. Se for alterada de 100 para 80, a necessidade ventilatória aumenta em 3,92 unidades de medida. Se for alterada de 80 para 60, a necessidade ventilatória aumenta em 4,9 unidades de medida. Se for alterada de 60 para 40, a necessidade ventilatória aumenta em 11,69 unidades de medida. Se for alterada de 40 para 20, a necessidade ventilatória aumenta em 31,29 unidades de medida.

Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a necessidade ventilatória aumenta em 2,43 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

## **Resultados para a espécie Matrinxã**

### **Variável Taxa Metabólica ( $VO_2$ )**

O modelo proposto para esta variável é dado por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1X_{1i} + \beta_2D_{1i} + \beta_3D_{2i} + \beta_4D_{3i} + \beta_5D_{4i} + \beta_6D_{5i} + \varepsilon_i$$

Em que  $Y$  é a variável resposta ( $VO_2$ ),  $X_1$  é variável indicadora da covariável grupo ( $X_1=1$  indica grupo experimental),  $D_1, \dots, D_5$  são variáveis indicadoras da covariável “concentração” de oxigênio,  $\beta$ 's são os parâmetros desconhecidos que deseja-se estimar e  $i$  representa cada observação,  $i=1, \dots, 180$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $VO_2$  dado pela equação:

$$\hat{Y}_i = 55,44 + 5,07X_{1i}$$

Isto significa que quando a toxina está presente no peixe, a taxa metabólica aumenta em 5,07 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

### **Variável Extração de Oxigênio ( $EO_2$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1X_{1i} + \beta_2D_{1i} + \beta_3D_{2i} + \beta_4D_{3i} + \beta_5D_{4i} + \beta_6D_{5i} + \varepsilon_i$$

Em que Y agora representa a variável resposta  $EO_2$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $EO_2$  dado pela equação:

$$Y_i = 34,26 - 16,3X_{1i} - 3,24D_{5i} + 15,24X_{1i}D_{5i}$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio interfere na extração de oxigênio do peixe quando é reduzida de 60 para 40. Ao alterar essa pressão parcial de 60 para 40, a extração de oxigênio reduz em 3,24 %. Porém, com a presença da toxina, a mesma aumenta em 12 % nesta mesma situação. Ou seja, neste caso, há presença de interação entre essas variáveis.

Além disso, verificou-se que, apenas pelo fato da presença da toxina, a extração de oxigênio também se altera, reduzindo em 16,3 %.

### **Variável Ventilação Branquial ( $V_G$ )**

Neste caso, optou-se por utilizar um modelo linear generalizado com distribuição Gama (como sugere o histograma da variável resposta). Com isso, a função de ligação que apresentou melhor ajuste foi a própria identidade. Logo, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$\mu = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2D_1 + \beta_3D_2 + \beta_4D_3 + \beta_5D_4 + \beta_6D_5$$

Em que  $\mu$  representa a média da variável resposta  $V_G$  e os demais elementos são definidos da mesma forma que em modelos de estimação generalizada.

Feito o ajuste do modelo utilizando modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $V_G$  dado pela equação:

$$\hat{\mu} = 950,87 + 1.142,11X_1 + 955,03D_5$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio só interfere na ventilação branquial do peixe quando é reduzida de 60 para 40. Ao alterar essa pressão parcial de 60 para 40, a ventilação branquial reduz aumenta em 955,03 unidades de medida. Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a ventilação branquial aumenta em 1.142,11 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

### **Variável Frequência Respiratória ( $F_R$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 D_{1i} + \beta_3 D_{2i} + \beta_4 D_{3i} + \beta_5 D_{4i} + \beta_6 D_{5i} + \varepsilon_i$$

Em que Y agora representa a variável resposta  $F_R$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $F_R$  dado pela equação:

$$\hat{Y}_i = 76,78 + 31,7X_{1i} + 24,71D_{5i}$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio só interfere na frequência respiratória do peixe quando é reduzida de 60 para 40. Ao alterar essa pressão parcial de 60 para 40, a ventilação branquial reduz aumenta em 24,71 unidades de medida. Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a ventilação branquial aumenta em 31,7 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

### **Variável Volume Ventilatório ( $V_T$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, no caso do modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$\mu = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 D_1 + \beta_3 D_2 + \beta_4 D_3 + \beta_5 D_4 + \beta_6 D_5$$

Em que  $\mu$  agora representa a média da variável resposta  $V_T$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $V_T$  dado pela equação:

$$\hat{\mu} = 13,46 + 6,99X_1$$

Isto significa que, quando a toxina está presente no peixe, o volume ventilatório aumenta em 6,99 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

Além disso, não há evidências estatísticas suficiente para afirmar que a redução na pressão parcial do oxigênio interfere nesta medida nos peixes da espécie Matrinxã.

### **Variável Frequência Cardíaca ( $F_H$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1i} + \beta_2 D_{1i} + \beta_3 D_{2i} + \beta_4 D_{3i} + \beta_5 D_{4i} + \beta_6 D_{5i} + \varepsilon_i$$

Em que Y agora representa a variável resposta  $F_H$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando estimação generalizada, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $F_H$  dado pela equação:

$$\hat{Y}_i = 65,14 - 17,61 D_{5i}$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio interfere na frequência cardíaca do peixe quando é reduzida de 60 para 40.

Além disso, não há evidências estatísticas suficiente para afirmar que a presença da toxina interfere nesta medida nos peixes da espécie Matrinxã.

### **Variável Necessidade Ventilatória ( $V_G/VO_2$ )**

Da mesma forma como já foi definido anteriormente, no caso do modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo proposto para esta variável é dado por:

$$\mu = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 D_1 + \beta_3 D_2 + \beta_4 D_3 + \beta_5 D_4 + \beta_6 D_5$$

Em que  $\mu$  agora representa a média da variável resposta  $V_G/VO_2$ .

Feito o ajuste do modelo utilizando modelo linear generalizado com distribuição Gama, o modelo que melhor se ajustou aos dados e satisfaz todas as suposições resultou em um valor predito para a variável  $V_G/VO_2$  dado pela equação:

$$\hat{\mu} = 10,84 + 7,36 X_1 + 5 D_3$$

Isto significa que a pressão parcial do oxigênio só interfere na necessidade ventilatória do peixe quando é reduzida de 100 para 80. Ao alterar essa pressão parcial de 100 para 80, a necessidade ventilatória aumenta em 5 unidades de medida.

Além disso, verificou-se que, quando a toxina está presente no peixe, a necessidade ventilatória aumenta em 7,36 unidades de medida, independente da pressão parcial do oxigênio.

### **Referências Bibliográficas**

[1] Paula, G. A. **Modelos de regressão: com apoio computacional**. 245p. Author, Publisher, IME-USP, 2004.

[2] Wedderburn, R.W.M. **Quasi-likelihood functions, generalized linear models, and the Gauss—Newton method**. 1974.

[3] Oliveira, S. **Inferência e análise de resíduos e de diagnóstico em modelos lineares generalizados**. 68p. Programa de Pós-Graduação em Estatística,UFJF, Juiz de Fora, 2013.

### Comandos Utilizados no Software R

```

dados = read.table(file.choose(), header=T)
attach(dados)
dados

*** Análise – Traíra ***

# Equações de estimação generalizada
library(gee)

#VO2
hist(vo2,xlab="vo2",ylab="frequência",main="Histograma - VO2")
fit.vo2=gee(vo2~factor(grupo)+factor(oxigenio)+grupo*factor(oxigenio),id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit.vo2)
fit1.vo2 = gee(vo2~factor(grupo) + d120 + d100 + d80 + d60 + d40 + d20 +
d10,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit1.vo2)
fit2.vo2 = gee(vo2~factor(grupo) + d120 + d20 + d10,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit2.vo2)
plot(fit2.vo2$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")

#EO2
hist(eo2,xlab="eo2",ylab="frequência",main="Histograma - EO2")
fit1.eo2 = gee(eo2~factor(grupo)+ d120 + d100 + d80 + d60 + d40 + d20 +
d10,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit1.eo2)
fit2.eo2 = gee(eo2~factor(grupo),id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit2.eo2)
plot(fit2.eo2$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")

#FR
hist(fr,xlab="fr",ylab="frequência",main="Histograma - FR")
fit1.fr = gee(fr~factor(grupo)+d120 + d100 + d80 + d60 + d40 + d20 + d10,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit1.fr)
fit2.fr = gee(fr~factor(grupo),id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit2.fr)
plot(fit2.fr$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")

#FH
hist(fh,xlab="fh",ylab="frequência",main="Histograma - FH")
fit1.fh = gee(fh~factor(grupo) + d120 + d100 + d80 + d60 + d40 + d20 +
d10,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit1.fh)
fit2.fh = gee(fh~factor(grupo) + d120 + d20 + d10,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit2.fh)
plot(fit2.fh$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")

```

```
# Modelos lineares generalizados com distribuição Gama
```

```
#VT
```

```
hist(vt,xlab="vt",ylab="frequência",main="Histograma - VT")
m1=glm(vt~factor(grupo)+d120 + d100 + d80 + d60 + d40 + d20 + d10,family=(Gamma(link="identity")))
```

```
# feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m1)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(m1)
```

```
m2=update(m1,subset=-c(37))
```

```
summary(m2)
```

```
m3=glm(vt~factor(grupo)+d60 + d40,family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m3)
```

```
m4=update(m3,subset=-c(37))
```

```
summary(m4)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(m4)
```

```
#VG
```

```
hist(vg,xlab="vg",ylab="frequência",main="Histograma - VG")
```

```
m1=glm(vg~factor(grupo)+d120 + d100 + d80 + d60 + d40 + d20 + d10,family=(Gamma(link="identity")))
```

```
# feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m1)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(m1)
```

```
m2=update(m1,subset=-c(37))
```

```
summary(m2)
```

```
m3=glm(vg~factor(grupo)+d60 + d40,family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m3)
```

```
m4=update(m3,subset=-c(37))
```

```
summary(m4)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(m4)
```

```
#VG/VO2
```

```
hist(razao,xlab="vg/vo2",ylab="frequência",main="Histograma - VG/VO2")
```

```
m1=glm(razao~factor(grupo)+d120 + d100 + d80 + d60 + d40 + d20 + d10,family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m1)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(m1)
```

```
m2=update(m1,subset=-c(13))
```

```
summary(m2)
```

```
m3=glm(razao~factor(grupo) + d100 + d80 + d60 + d40 + d20 + d10,family=(Gamma(link="identity"))) #  
feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m3)
```

```
m4=update(m3,subset=-c(13))
```

```
summary(m4)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(m4)
```

```
*** Análise - Matrxã ***
```

```
# Equações de estimação generalizada
```

```
library(gee)
```

```
#VO2
```

```
hist(vo2,xlab="vo2",ylab="frequência",main="Histograma - VO2")
```

```

fit.vo2=gee(vo2~factor(grupo)+factor(oxigenio)+factor(grupo)*factor(oxigenio),id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit.vo2)
fit1.vo2 = gee(vo2~factor(grupo) + d120 + d100 + d80 + d60 + d40,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit1.vo2)
fit2.vo2 = gee(vo2~factor(grupo),id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit2.vo2)
plot(fit2.vo2$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")

#EO2
hist(eo2,xlab="eo2",ylab="frequência",main="Histograma - EO2")
fit.eo2=gee(eo2~factor(grupo)+factor(oxigenio)+factor(grupo)*factor(oxigenio),id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit.eo2)
fit1.eo2 = gee(eo2~factor(grupo)+factor(grupo)*d120 + factor(grupo)*d100 + factor(grupo)*d80 +
factor(grupo)*d60 + factor(grupo)*d40,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit1.eo2)
fit2.eo2 = gee(eo2~factor(grupo)+factor(grupo)*d40,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit2.eo2)
plot(fit2.eo2$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")

#FR
hist(fr,xlab="fr",ylab="frequência",main="Histograma - FR")
fit.fr=gee(fr~factor(grupo)+factor(oxigenio)+factor(grupo)*factor(oxigenio),id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit.fr)
fit1.fr = gee(fr~factor(grupo)+d120+ d100 + d80 + d60 + d40,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit1.fr)
fit2.fr = gee(fr~factor(grupo)+ d40,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit2.fr)
plot(fit2.fr$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")
identify(fit2.fr$res,pos=T)
fit3.fr=update(fit2.fr,subset=-c(172))
summary(fit3.fr)
plot(fit3.fr$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")

#FH
hist(fh,xlab="fh",ylab="frequência",main="Histograma - FH")
fit.fh=gee(fh~factor(grupo)+factor(oxigenio)+factor(grupo)*factor(oxigenio),id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit.fh)
fit1.fh = gee(fh~factor(grupo) + d120 +d80 + d60 + d40,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit1.fh)
fit2.fh = gee(fh~ d40,id=px,corstr="exchangeable")
summary(fit2.fh)
plot(fit2.fh$res,ylab="resíduos",xlab="", main="Gráfico dos Resíduos")

# Modelos lineares generalizados com distribuição Gama

#VT
hist(vt,xlab="vg",ylab="frequência",main="Histograma - VT")
m1=glm(vt~factor(grupo)+d120 + d100 + d80 + d60 + d40,family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
summary(m1)
m2=glm(vt~factor(grupo),family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
summary(m2)
par(mfrow=c(2,2))

```



```
plot(m2)
```

```
#VG
```

```
hist(vg,xlab="vg",ylab="frequência",main="Histograma - VG")
```

```
m1=glm(vg~factor(grupo)+d120 + d100 + d80 + d60 + d40,family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m1)
```

```
m2=glm(vg~factor(grupo)+ d40,family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m2)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(m2)
```

```
#VG/VO2
```

```
hist(razao,xlab="vg/vo2",ylab="frequência",main="Histograma - VG/VO2")
```

```
m1=glm(razao~factor(grupo)+d120 + d100 + d80 + d60 + d40,family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m1)
```

```
m2=glm(vt~factor(grupo)+ d80 ,family=(Gamma(link="identity"))) # feito para VT, VG e VG/VO2
```

```
summary(m2)
```

```
par(mfrow=c(2,2))
```

```
plot(m2)
```