

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação Interinstitucional UFSCar/UNESP em Ciências
Fisiológicas Laboratório de Bioquímica Adaptativa

**Efeito do nado sustentado sobre o metabolismo intermediário e
antioxidante de matrinxã (*Brycon amazonicus*)**

Fernando Fabrizzi

**São Carlos – SP
2015**

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-graduação Interinstitucional UFSCar/UNESP em Ciências
Fisiológicas Laboratório de Bioquímica Adaptativa

**Efeito do nado sustentado sobre o metabolismo intermediário e
antioxidante de matrinxã (*Brycon amazonicus*)**

Aluno: Fernando Fabrizzi

Orientador: Prof. Dr. Gilberto Moraes

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

São Carlos – SP

2015

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

F129en Fabrizzi, Fernando.
 Efeito do nado sustentado sobre o metabolismo intermediário e antioxidante de matrinxã (*Brycon amazonicus*) / Fernando Fabrizzi. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
 102 f.

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

 1. Fisiologia comparada. 2. Matrinxã. 3. Natação - aspectos fisiológicos. 4. Estresse oxidativo. 5. Metabolismo. I. Título.

CDD: 591.1 (20^a)




Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Fernando Fabrizzi, realizada em 05/02/2015:



Prof. Dr. Gilberto Moraes
UFSCar



Prof. Dr. Rodrigo Yamakami Camilo
IFSP



Prof. Dr. Luis Antônio Kipshi Aoki Inoue
Embrapa



Profa. Dra. Lucia Helena de Aguiar Vieira
UNICEP



Profa. Dra. Ana Claudia Garcia de Oliveira Duarte
UFSCar

Orientador
Prof. Dr. Gilberto Moraes

Aos meus pais e irmã queridos, minha prova de que Deus se faz presente. Do mineral ao animal, em cada inspirar e expirar. A cada onda e em todos os planos. Determinando o sentido ordenado da desordem coordenada a qual todos estão intimamente condenados.

Jamais esqueçam suas raízes, pois seus frutos sempre dependeram delas.

Fernando Fabrizzi

Independente do Universo o entendimento da completude; independente dos cientistas a descoberta da onisciência, da mesma forma que independente do outro a sua felicidade.

Fernando Fabrizzi

Não há sentido a busca de símbolos (bem visíveis e concretos como já apresentado por Jung), pois não somos nada além de transformações (como foi bem posto por Lavoisier). Talvez se tivéssemos ao menos ideia de quem somos em essência, à evolução Darwiniana não seria apenas "coincidência".

Fernando Fabrizzi

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador e mestre Professor Doutor Gilberto Moraes, pela orientação e principalmente pela oportunidade que me dera, a qual jamais sera esquecida. Lembrarei eternamente e terei sempre o mais sincero e perpétuo respeito e admiração.

Agradeço aos meus pais e mestres Clarindo Fabrizzi e Luzia Ivone Rugoni Fabrizzi por fazerem parte da minha vida verdadeiramente, de forma a marcar eternamente minha alma. Por me ensinarem que independente de sua condição sócio-econômica e de suas descendências raciais as pessoas merecem respeito e sentimento de irmandade pela pureza de suas almas. Confesso com imenso orgulho que minha garra (incessante e honesta) em busca desta conquista foi adquirida por meio de observa-los e te-los como exemplos em minha vida. Por meio de vocês, aprendi a observar, perceber e sentir o que realmente é belo e merecedor de respeito e admiração no universo em que vivemos.

Agradeço a minha irmã Daiane, por fazer parte de minha vida, e me fazer espelhar-se na sua força e garra. Por me aguentar nos momentos de chatice. Por me fazer ver o mundo de uma forma um tanto diferente e muito semelhante. Sua vitória já está traçada, tenho certeza disso!!!!

Agradeço os meus amigos, Anselmo, Angélica, Daniel, Ricardo (Ricas) pela amizade verdadeira, que sempre foi importantíssima e que devo meu eterno respeito e sentimento de irmandade. Por me acolher sempre de forma indescritível que por mim jamais será esquecido. Obrigado por fazerem parte de minha vida a todo momento.

Agradeço aos meus amigos do laboratório por sempre atenderem minhas necessidades quando necessário, pelo companheirismo, por me aturarem e principalmente pelo sincero sentimento de amizade. Sem vocês essa conquista não seria possível. Vocês fizeram e farão parte da minha vida para sempre!!!!

Agradeço a todos meus amigos conquistados em São Carlos, que formidavelmente me acolheram de forma tão agradável, vocês sempre farão parte de minha vida.

Agradeço ao CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

O significativo aumento no consumo de peixes nas últimas décadas, tem levado a uma exploração extrativista considerável, podendo trazer assim consequências danosas ao meio ambiente e a comunidade que vivem da exploração sustentável de pescado. Torna-se, portanto, fundamental a busca de meios que amenizem essa condição. O desenvolvimento da piscicultura surge como alternativa capaz de contribuir para a solução desse problema, uma vez que seria assim possível manter a demanda social pelo pescado. Como forma estratégica, o exercício vem se destacando pelos efeitos que produz diretamente sobre a fisiologia animal. Em peixes, existem evidências que a prática de natação sustentada traz melhorias nos parâmetros hematológicos, no perfil metabólico dos animais, podendo leva-los a terem grandes benefícios em saúde e no bem estar. No estudo foram avaliados os parâmetros hematológicos e metabólicos e a resposta antioxidante de *Brycon amazonicus* sob regime ou não de natação sustentada, submetidos ou não ao estresse por excesso de nitrito. Atualmente um dos maiores problemas em sistemas de recirculação enfrente na piscicultura em seus filtros biológicos. Os animais submetidos à atividade de natação sustentada tiveram um ajuste metabólico indicativo de atenuação do estresse causado pelo nitrito. Os animais sob o efeito da natação sustentada aperfeiçoam a oxidação de carboidratos como objetivo de produção de energia, minimizando assim a oxidação de aminoácidos para esse fim. Da mesma forma, os peixes que foram submetidos à natação sustentada apresentaram valores diminuídos de peroxidação lipídica, indicando que a essa atividade de natação pode ser uma ótima ferramenta contra o estresse oxidante. Em conclusão, matrinxãs adaptados à natação sustentada são mais aptos para enfrentar o estresse oxidativo causado pelo nitrito ambiental, promovendo alterações hematológicas, bioquímicas e do metabolismo, capazes de melhorar os processos metabólicos oxidativos.

Palavras-chave: natação sustentada, matrinxã, estresse oxidativo.

ABSTRACT

The significant increase in fish consumption in recent decades has led to considerable extractive exploitation that can bring harmful consequences to the environment and the community living the fishing sustainable exploitation. Therefore, it is essential the search for ways to mitigate this condition. The fish farming development appears as an alternative capable of contribute to the solution of this problem, since it would be possible to maintain the social demand for fish. In a strategic way, the exercise have been standing out by the effects produced directly on animal physiology. On fish, there is sustained evidence that swimming practices brings improvements in hematological parameters, in the metabolic profile of the animals and that may lead them to have great benefits into health and well-being. In study was evaluated the hematological and metabolic parameters and antioxidant response of Brycon amazonicus under control or not of sustained swimming and submitted or not to nitrite excess stress. Currently a major problem in recirculation systems face in fish farming in their biological filters. The submitted animals to sustained swimming activity had an attenuation indicative metabolic adjustment on the stress caused by nitrite. The animals on sustained swimming effects optimizes the carbohydrates oxidation aiming the energy production, thereby minimizing amino acids oxidation for this purpose. Similarly, the fish that were submitted to sustained swimming had produced reduced FOX values, indicating that this swimming activity can be a great tool against oxidative stress. In conclusion, Matrinxãs adapted to sustained swimming have a better ability to face oxidative stress caused by environmental nitrite, making changes hematological, biochemical and metabolism, which can improve oxidative metabolic processes.

Keywords: Sustained swimming, matrinxã, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Exemplar de matrinxã (*Brycon amazonicus*). Fonte: Moraes (2013a).....22
- Figura 2.** Ataque da membrana celular por ERO ou ERN.....39
- Figura 3:** Principais produtos da oxidação dos aminoácidos e proteínas por ERO e ERN.....41
- Figura 4:** Principais produtos da oxidação de DNA por ERN e ERO.....42
- Figura 5:** A variação da concentração de Hb em torno da média foi calculada subtraindo-se o valor médio da concentração de Hb em cada condição pela média das concentrações de Hb de todas as condições.....63
- Figura 6:** Glicose plasmática de matrinxã mantido nado sustentado (NS) após 90 dias de aclimação (Ta) *versus* animais não aclimatados (SN) mantidos em água sem movimento forçado. Ambas as condições acima após submeter os animais ao desafio de exposição a 1ppm de nitrito por 24h (Te).....66
- Figura 7:** Glicogênio muscular de matrinxã mantido nado sustentado (NS) após 90 dias de aclimação (Ta) *versus* animais não aclimatados (SN) mantidos em água sem movimento forçado. Ambas as condições acima após submeter os animais ao desafio de exposição a 1ppm de nitrito por 24h (Te).....67
- Figura 8:** Mapa metabólico de matrinxã criado em regime sedentário e exposto ao estresse por 1 ppm de nitrito ambiental.....81
- Figura 9:** Mapa metabólico de matrinxã criado em regime de nado sustentado e exposto ao estresse por 1 ppm de nitrito ambiental.....82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Perfil hematológico de *Brycon amazonicus* submetidos a atividade de natação e exposição de nitrito.....63
- Tabela 2.** Perfil proteico de *Brycon amazonicus* submetidos à atividade de natação e exposição de nitrito.....65
- Tabela 3.** Perfil glicídico de *Brycon amazonicus* submetidos à atividade de natação e exposição de nitrito.....68
- Tabela 4.** Metabolismo Oxidante de *Brycon amazonicus* submetidos a atividade de natação e exposição de nitrito.....70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

•NO - óxido nítrico

•NO₂ - Dióxido de nitrogênio

•OH - hidroxila

°C – graus Celsius

µL – microlitros

µmol - Micromol

8OHdA - 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina

8OHdG - 5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina

ADP - Difosfato de Adenosina

ATP - Trifosfato de Adenosina

BHT - butilhidroxitolueno

C₆ H₁₂ O₆ - Glicose

CA - Conversão Alimentar

CAT - Catalase

CC seg-1 - comprimentos corporais por segundo

CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

CHP - hidroperóxido de cumeno

cm - centímetros

CO₂ - Gás Carbônico

CO₃ •- - carbonato

CuSO₄ - Sulfato de Cobre

CuZnSOD - SOD encontrada no núcleo e nos lisossomos

dGuo – desoxiguanosina

DNA - ácido desoxirribonucleico

ECSOD - SOD extracelular

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERRO - Espécies Reativas de Oxigênio

FAOOH - hidroperóxidos de ácidos graxos

Fe²⁺ - ferro na forma ferrosa

Fe³⁺ - ferro na forma férrica

FOX - Ferrous Oxidation/ Xylenol

G6PDH - glicose-6-fosfato desidrogenase

GPX - glutaciona peroxidase

GPx1 - GPX clássica

GPx2 - GPX gastrointestinal

GPx3 - GPX plasmática

GPx4 - GPX que promove a redução de LOOH ligados às membranas

GR - glutaciona redutase

GSH - glutaciona

GSSG - glutaciona dissulfeto

H₂O - Molécula de água

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

Hb - Hemoglobina

HCL 2,0 - Ácido Clorídrico

HCM - Hemoglobina Corpuscular Média

Hct - hematócrito

HNO₂ - ácido nitroso

HO₂• - ácido hidroperoxila

HOCl - ácido hipocloro

K₂SO₄ - Sulfato de Potássio

K₃[Fe(CN)₆] - ferricianeto de potássio

kcal/kg - quilocalorias/grama

KCN - cianeto de potássio

KOH - Hidróxido de Potássio

L - litros

L• - radicais alquila

LOO• - radical peroxila

LOOH - hidroperóxido de lipídio

LPO - peroxidação lipídica

Methb - metahemoglobina

mg - miligramas

mgL-1 - miligramas por litro

ml - mililitro

mm - milímetros

mM - Milimol

MnSOD - SOD encontrada na mitocôndria;

N_2O_3 - óxido nitroso

NAD+ - Nicotinamida

NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADP+ - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato

NADPH - Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato-Hidrogênio

NaOH - Hidróxido de Sódio

NH_3 - Amônia

nm - nanômetro

nmols – nanomois

NO_2 - Nitrito

NO_3 - Nitrato

O_2 - Gás Oxigênio

$\text{O}_2^{\bullet-}$ - ânion superóxido

OONO- - peroxinitrito

p-fenilfenol - polifenilfenos

pH - potencial hidrogênio iônico

Pi - fosfato inorgânico

$\text{R}_2\text{N-N=O}$ - *N*-nitrosaminas

RBC - Conteúdo de Eritrócitos

RNA - ácido ribonucleico

RO• - alcóxil

RO_2^{\bullet} - peróxil

R-S-N=O - S-nitrosotíols

-SH - grupo tiol

SOD - superóxido dismutase

TBARs - ácido tiobarbitúrico

TCA – ácido tricloracético

TEP - Taxa de Eficiência Protéica

t_f - tempo em que o peixe nadou durante o último intervalo de tempo

t_i - tempo total de intervalos (5 min)

Ucrit - velocidade crítica de natação

$U_{máx}$ - velocidade máxima

$U_{máx}$ - velocidade máxima alcançada

VCM - Volume Corpuscular Médio

ΔU - velocidade de fluxo incrementada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1. Matinxã (<i>Brycon cephalus</i> (GÜNTHER, 1869)).....	22
2.2. Atividade de natação em peixes.....	23
2.2.1 Tipos de Atividade de natação.....	25
2.2.1.1 Atividade de natação explosiva.....	26
2.2.1.2 Atividade de natação prolongada.....	26
2.2.1.2 Atividade de natação aeróbica de longa duração, ou sustentada.....	27
2.3. Benefícios na Atividade de natação sustentada.....	28
2.4. Nitrito.....	32
2.5. Metabolismo Oxidante e antioxidante.....	35
2.6. Exercícios Físicos X Metabolismo Oxidante.....	45
3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
4.1. Delineamento experimental.....	50
4.1.1. Experimento1.....	50
4.1.2. Experimento 2.....	51
4.2. Metodologia.....	51
4.2.1. Determinações hematimétricas.....	52
4.2.1.1. Hematócrito.....	52
4.2.1.2. Hemoglobina.....	52
4.2.1.3. Contagem de eritrócitos (RBC).....	52

4.2.1.4. Metahemoglobina.....	52
4.2.2. Preparação dos extratos ácidos.....	53
4.2.3. Preparação dos extratos neutros.....	54
4.2.4. Preparação dos extratos alcalinos.....	54
4.2.5. Metabolismo intermediário.....	54
4.2.5.1. Glicogênio.....	54
4.2.5.2. Glicose.....	55
4.2.5.3. Lactato.....	55
4.2.5.4. Piruvato.....	56
4.2.5.5. Proteína.....	56
4.2.5.6. Aminoácidos livres.....	56
4.2.5.7. Amônia.....	57
4.2.7. Peroxidação lipídica tecidual – LPO.....	57
4.2.8. Enzimas antioxidantes.....	58
4.2.8.1. Catalase (CAT).....	58
4.2.8.2. Glutaciona peroxidase (GPx).....	59
4.2.8.3. Superóxido dismutase (SOD).....	60
4.3. Análises Estatísticas.....	61
5. RESULTADOS.....	62
5.1. Perfil Hematológico.....	62
5.2. Perfil metabólico proteico.....	64
5.3. Perfil metabólico glicídico.....	65
5.4. Metabolismo Antioxidante.....	69
6. DISCUSSÃO.....	71
6.1. Perfil hematológico.....	71
6.2. Alterações metabólicas.....	74
6.3. Metabolismo Antioxidante.....	83
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1. INTRODUÇÃO

Dado o significativo aumento no consumo de peixes nas últimas décadas, sua exploração extrativista pode trazer consequências danosas ao meio e prejuízos irreversíveis a espécies de interesse comercial. Além disso, a base alimentar de comunidades que vivem da exploração sustentável de pescado pode estar ameaçada por sua redução nos últimos anos. Torna-se, portanto fundamental a busca de meios que amenizem essa condição. O desenvolvimento da piscicultura surge como uma das alternativas capazes de contribuir para a solução desse problema, uma vez que seria assim possível manter a demanda social pelo pescado. A piscicultura no Brasil é uma alternativa com grande potencial de sucesso tendo em vista a grande variedade de espécies cultiváveis e as condições climáticas do país.

Para isso deve-se investir em uma política efetiva de organização e promoção do desenvolvimento não só da piscicultura, mas da aquicultura como alternativa de produção de alimentos (RESENDE, 2003). Segue-se a isso, a necessidade de informações técnicas sobre as espécies nativas, que serviria de indicativo de potencial de exploração sustentável. Os dados relativos aos benefícios da produção, associados ao entendimento da necessidade do bem-estar dos peixes em criação, vêm crescendo paulatinamente. Nesse contexto, o conhecimento e a preocupação com o estresse causado por situações comuns nas práticas de criação e manejo (INOUE; MORAES, 2003; ROJAS et. al., 2011) a agressão causada por xenobióticos (AVILEZ et. al., 2004; AVILEZ et. al., 2013), e as necessidades nutricionais (ALMEIDA et. al., 2006; ALMEIDA et. al., 2011) são fundamentais ao desenvolvimento da aquicultura e da

piscicultura em particular, uma vez que contemplam as condições ambientais e procedimentos relacionados à saúde e bem estar animal.

Uma estratégia bastante promissora e cujo conhecimento dos parâmetros essenciais ao seu sucesso vêm sendo avaliados na última década, é a natação sustentada. Este tipo de manejo tem se mostrado altamente benéfico, tanto sobre os parâmetros fisiológicos, quanto metabólicos dos peixes, permitindo que estes obtenham aumento da taxa de sobrevivência (DAVISON, 1997; SHANGAVI; WEBER, 1999, YOGATA; OKU de 2000, AZUMA et. al., 2002; ARBELÁEZ-ROJAS; MORAES, 2009; MORAES et. al., 2009; KIEFFER et. al., 2009). Quando aplicado de forma moderada, a natação sustentada mostra melhoras nos parâmetros hematológicos: Ht (hematócrito), Hb (hemoglobina), RBC (contagem de células vermelhas do sangue), VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular), aumentando consequentemente a oferta de oxigênio aos tecidos periféricos (LOWE; WELLS, 1997; ARBELÁEZ-ROJAS; MORAES, 2009; MORAES et al, 2009; FABRIZZI et. al., 2013).

Os resultados advindos dessa prática de manejo sugerem que os peixes criados sob condições de exercício sustentado apresentam melhor desempenho otimizando a produção de energia por meio do metabolismo oxidativo de carboidratos e lipídeos, preservando assim os aminoácidos para a conversão em proteínas. No entanto, esses benefícios estão diretamente ligados à intensidade de nado aplicada aos animais, a qual tem relação direta com características morfofuncionais das diversas espécies (DAVISON, 1997; AZUMA et. al., 2000; RICHARDS et. al., 2002; HACKBARTH; MORAES, 2006; ARBELÁEZ-ROJAS, 2007; MORAES et. al., 2009). Por exemplo, matrinxã

(*Brycon amazonicus*) mantido em exercício sustentado apresenta maiores taxas de crescimento quando as velocidades de nado são mantidas entre 1,0 e 1,5 Comprimentos Corporais (CC) seg^{-1} (ARBELÁEZ-ROJAS, 2007). Ainda, estudos com a mesma espécie mantida em natação sustentada de forma intermitente, com períodos de atividade e recuperação 12/12h, mostram alterações benéficas sobre os parâmetros hematológicos e metabólicos, quando a velocidade de nado foi mantida a 1,0 (CC)/seg (FABRIZZI et. al. 2013).

Entre os fatores geradores de estresse nas atividades de criação de peixes podemos destacar a produção de nitrito, quando os sistemas entram em desequilíbrio. É sabido que altas concentrações de nitrito no meio aquático resultam em quadros indesejáveis ao metabolismo e fisiologia normais do animal (AVILEZ et. al., 2013). Entre estes, a transformação da hemoglobina em metahemoglobina, decorrente da oxidação do grupo heme da forma ferrosa (Fe^{2+}) para a forma férrica (Fe^{3+}), o que impede o transporte de oxigênio (CAMERON, 1971; BATH; EDDY, 1980; WILLIAMS; EDDY F.B. (1986); DOBLANDER et. al., 1996). No presente trabalho, esse fator ambiental indesejável, porém passível de ser encontrado principalmente em sistemas de criação intensiva, foi selecionado como forma de desafio a animais treinados, na expectativa de que a prática de nado sustentado como forma de manejo fosse uma atenuadora do estresse oxidante. Com base nessa hipótese, a natação sustentada poderia ser uma ferramenta importante para atenuar os aspectos prejudiciais das formas de estresse presentes na atividade de criação de peixes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Matinxã (*Brycon amazonicus* (GÜNTHER, 1869)).

A espécie matrinxã, pertence à família Characidae e à subfamília Bryconinae (ZANIBONI et al, 1988)(Figura 1), origina-se da bacia Amazônica (HOWES, 1982), e se encontra bem distribuída no Prata e São Fransisco (GOULDING, 1980; 1981). Podendo atingir 5 kg e um comprimento de 50 cm, tem um porte médio e um período de vida curto, em torno de 3,5 anos na natureza (SAINT-PAUL, 1986; VILLACORTA-CORREA, 1987). Em cativeiro matrinxã pode alcançar entre 1,2 kg em 10 meses (GRAEF, 1995; VILAS BOAS, 2001).



Figura 1. Exemplar de matrinxã (*Brycon amazonicus*). Fonte: Moraes (2013a).

É uma espécie bastante interessante para o cultivo, pois, é uma espécie bastante procurada para a prática da pesca esportiva, suporta altas densidades de estocagem, responde bem a atividade de natação sustentada (CYRINO,

1986; ARBELAÉZ-ROJAS et al, 2002; URBINAT; CARNEIRO, 2004; BRANDÃO et al., 2005) e tem um alto valor comercial (VILLACORTA CORREA, 1987; SAINT-PAUL, 1989; HONCZARYK, 1994; SCORVO FILHO et al., 1998).

2.2. Atividade de natação em peixes.

A natação em peixes é conhecida pela capacidade de acarretar muitos benefícios aos animais, sendo uma ferramenta de grande valia para o cultivo, bem estar e saúde destes, re-induzindo ajustes que permitem aos animais desenvolverem várias capacidades, entre elas, transportar melhor o oxigênio e utiliza-lo de forma eficaz no metabolismo energético e oxidante.

Mesmo os peixes tendo um metabolismo bastante similar aos animais terrestres, entretanto apresentam particularidades adaptativas, que os permitem viver em variados meios aquáticos. Assim, é evidenciado mais uma vez que o conhecimento no âmbito dos processos fisiológicos, do metabolismo intermediário e da nutrição desses animais é bastante importante. Dessa forma, a prática de atividades que aumentem o gasto energético (dos lipídeos e carboidratos) do animal se torna uma estratégia muito interessante, assim, é conhecido que a natação promove esse aumento do gasto energético e conseqüentemente uma variedade de respostas fisiológicas e metabólicas que irão resultar em melhora no crescimento e no comportamento dos peixes. (MORAES et al., 2009; (DAVISON, 1997; SHANGAVI; WEBER, 1999, YOGATA; OKU de 2000, AZUMA et. al., 2002; ARBELÁEZ-ROJAS; MORAES, 2009; MORAES et. al., 2009; KIEFFER et. al., 2009).).

Nos peixes, embora o nado seja a atividade com características inatas, a atividade de nado se dá por meio de um sistema complexo de movimentos, os quais eles realizam numerosas atividades relacionadas à sua sobrevivência em diversos habitats (EVANS, 1993).

Entretanto, em ambientes controlados as atividades de nado acontecem por meio da natação sustentada que deve sempre ser muito bem ajustada, uma vez que seus benefícios tem uma correlação direta com a intensidade dessa atividade, a qual tem uma especificidade determinada a cada espécie (DAVISON, 1997; AZUMA et. al., 2000; RICHARDS et. al., 2002; HACKBARTH; MORAES, 2006; ARBELÁEZ-ROJAS, 2007). Segundo JOBLING (1994) e HOLK & LYKKEBOE (1998) a atividade de natação sustentada pode ser classificadas principalmente pela intensidade imposta (velocidade de nado) e pelas reações metabólicas responsáveis pela manutenção energética durante a atividade, assim, inferindo em função do tempo e intensidade, o tipo de fibras musculares recrutadas no momento de atividade.

Altas intensidades de nado a velocidade alta podem ser sustentadas por curtos períodos, pois promove fadiga aos peixes, rapidamente, o que pode acarretar no comprometimento da saúde e do seu crescimento desses animais. Entretanto, quando realizada a uma intensidade entre moderada a leve, pode ser sustentada por períodos longos, permitindo que os animais obtenham maiores taxas de crescimento, principalmente por aproveitarem melhor seu alimento e por diminuírem seu comportamento agressivo (TAYLOR et al., 1995; DAVISON, 1997; HOLK; LYKKEBOE, 1998; AZUMA et al., 2002; BUGEON et al., 2003).

Como foi descrito acima, a determinação da velocidade de nado é fundamental e um parâmetro ideal para que se possa ajustar essa variável e a velocidade crítica de natação (U_{crit}). Esse parâmetro, foi desenvolvido por BRETT em 1964, e permite determinar a velocidade máxima que o peixe é capaz de se sustentar até atingir a fadiga (momento em que o peixe perde sua posição de nado natural). A velocidade crítica corresponde a velocidade máxima ($U_{m\acute{a}x}$) em que o animal consegue se sustentar durante o aumento da velocidade de fluxo incrementada (ΔU) em um período de tempo de 5 minutos (t_i). Dada pela seguinte fórmula:

$$V_{crit} = U_{m\acute{a}x} + (t_f/t_i) \times \Delta U$$

Onde: $U_{m\acute{a}x}$ representa a velocidade máxima alcançada; t_f representa o tempo em que o peixe nadou durante o último intervalo de tempo; t_i representa o tempo total de intervalos (5 min); ΔU representa a velocidade incrementada. E a velocidade é expressa em CC/seg (Comprimento Corporal por segundo).

Além da intensidade de nado (determinada pela velocidade de natação), a velocidade de natação determina também o dispêndio respiratório e metabólico utilizado pelos animais para atender as demandas energéticas impostas pelos diferentes tipos de natação (HOCHACHKA, 1985; JOBLING, 1994; HOLK; LYKKEBOE, 1998). São classificadas segundo JOBLING (1994) e HOLK; LYKKEBOE (1998) em: atividade de natação explosiva; atividade de natação prolongada; atividade de natação aeróbica (natação sustentada).

2.2.1 Tipos de Atividade de natação

2.2.1.1 Atividade de natação explosiva

A atividade de natação explosiva é caracterizada por intensidades extremamente altas, os peixes são forçados a nadarem a uma velocidade bastante grande, devido a isso os animais conseguem permanecer em atividade por um tempo curto, atingindo a fadiga muscular rapidamente (JOBILING, 1994; TAYLOR et al., 1995). Em atividade de natação explosiva os peixes permanecem em exercício por um tempo aproximado de apenas 20 segundos. Dessa forma, nos animais são recrutadas fibras musculares glicolíticas, também conhecidas como fibras musculares do tipo II. Essas fibras tem como característica realizarem contrações rápidas, no entanto, possuem também alta fadigabilidade e utilizam preferencialmente como fonte geradora de energia o metabolismo anaeróbico. Esse tipo de atividade de natação, por ser de alta intensidade podem comprometer o metabolismo, promover distúrbios hidroeletrolíticos e queda do pH, acarretando assim em diminuição do crescimento dos animais (WOOD, 1991; POSTLETHWAITE; McDONALD, 1994; HOLK; LYKKEBOE, 1998; LACKNER et al, 1988; MOYES; WEST, 1995; TAYLOR et al, 1995; MILLIGAN, 1996; RICHARDS et al, 2002).

2.2.1.2 Atividade de natação prolongada

A atividade prolongada de natação apresenta um tempo de duração de aproximadamente 20 segundos a 200 minutos, podendo acarretar em fadiga ao final.

Para que os animais possam manter-se em atividade, o metabolismo utilizado é o metabolismo aeróbico suplementado pelo anaeróbico, uma vez que a demanda metabólica imposta pela intensidade do exercício é grande, promovendo assim o acúmulo de lactato para ressíntese de nicotinamida dinucleotídeo (NAD⁺), molécula esta fundamental para o funcionamento da enzima Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, peça indispensável para a via glicolítica (BERG, 2008; LEHNINGER, 2004; MAUGHAN, 2000). Ocorre neste tipo de atividade de natação o recrutamento inicial de fibras musculares do tipo I, porém, devido ao tempo de atividade e a característica de contração (determinada pela intensidade da atividade de natação), são recrutadas também, posteriormente, fibras musculares do tipo II (MOYES; WEST, 1995).

2.2.1.3 Atividade de natação *aeróbica de longa duração, ou sustentada*.

A atividade de natação sustentada também pode ser chamada de atividade de natação de longa duração. Isso se deve ao fato de que esse tipo de atividade tem como principal característica sua baixa intensidade, o que permite aos peixes realizá-la por um período longo de tempo, acima de 200 minutos. Neste tipo de atividade de natação os peixes conseguem permanecer em atividade por um tempo prolongado, sem desenvolverem fadiga muscular. Para que os peixes possam gerar energia para esse tipo de atividade, utilizam metabolismo oxidativo, utilizando como combustível lipídeos (ácidos graxos e triacilgliceróis) (TOTLAND et al., 1987; YOUNG & CECH JR, 1994; VAN DEN THILLART; VAN RAAJI, 1995; WEBER; HAMAN, 1996; FORSTER & OGATA, 1996; BERNARD et al., 1999; YOGATA; OKU, 2000; OGATA & OKU, 2000) e

carboidratos (glicose e glicogênio), poupando proteína para o crescimento (DAVISON, 1997; WOOD, 2001). As fibras recrutadas preferencialmente pelos peixes neste tipo de atividade de natação são fibras do tipo I, as quais têm como características principais contrações lentas, são metabolicamente oxidativas e baixa fadigabilidade e contrações mais fracas, quando comparada as outras (MOYES; WEST, 1995).

2.3. Benefícios na Atividade de natação sustentada

O método de natação sustentada age de forma benéfica nos peixes, promovendo diminuição no comportamentamento agressivo, otimiza o metabolismo de forma a minizar a degradação de proteínas, melhora a captação e transporte de oxigênio, resultando aos animais uma melhor taxa de conversão alimentar, aumentando seu crescimento e sobrevivência (FABRIZZI et al., 2013; Nunes et al., 2013; DAVISON, 1997; SHANGAVI; WEBER, 1999; YOGATA; OKU, 2000; AZUMA et al., 2002).

Vários estudos que avaliaram o efeito da atividade de natação sustentada de espécies como, salmonídeos, (DAVISON; GOLDSPINK, 1977; LEON, 1986; TOTLAND et al., 1987; HOULIHAN; LAURENT, 1987; DAVISON, 1987; CHRISTIANSEN; JOBLING, 1990; JOBLING et al., 1993; YOUNG; CECH, 1994) *catfish (Ictalurus punctatus)*, *striped bass (Morone saxatilis)*, *whiting (Merlangius merlagus)*; trutas (*Oncorhynchus mykiss*), “striped bass” (*Morone saxatilis*), “red sea bream” (*Pagrus major*), *yellowtail (Seriola quinqueradiata)* e matrinxã (*Brycon amazonicus*) (YOUNG; CECH, 1993a; YOUNG; CECH JR., 1994; JABOE; GRANT, 1996; HAMMER, 1996; DAVISON,

1997; YOGATA; OKU, 2000; AZUMA et al., 2002; HACKBARTH; MORAES, 2006; ARBELÁEZ-ROJAS, 2007) influenciava de forma positiva o crescimento dos animais.

Outras respostas benéficas obtidas através dessa atividade de natação também foram detectadas, tais como mudanças no comportamento alimentar dos peixes, os quais passam a ter melhor taxa de conversão alimentar acompanhada de aumento em peso (CHRISTIANSEN; JOBLING, 1990; HALLER, 1991a,b; JORGENSEN; JOBLING, 1993). Além disso, o fluxo de água forçado faz com que a ração seja melhor distribuída nos tanques, promovendo a remoção de compostos tóxicos como amônia e Nitrito, resultando em crescimento mais uniforme dos peixes (JOBLING, 1994; WOOD, 2001; HACKBARTH; MORAES, 2006; ARBELÁEZ-ROJAS, 2007).

Em um estudo com matrinxã (*Brycon amazonicus*) exercitado aerobiamente por 30 dias à velocidade de 1CC/seg, observou-se melhores taxas de conversão alimentar e de crescimento, com ganho em peso superior a 38 % em relação aos peixes não exercitados (HACKBARTH; MORAES, 2006). Da mesma forma, pacus (*Piaractus mesopotamicus*) exercitados aerobicamente a uma intensidade de 1 a 2 CC/seg apresentaram melhores taxas de ganho em peso, comprimento, altura, conversão alimentar (CA) e taxa de eficiência proteica (TEP) (HACKBARTH, et al., 2007). No mesmo estudo, exemplares de pacu que praticaram atividade a 2CC/seg cresceram mais de 50% em peso em relação aos peixes não exercitados e apresentam os melhores valores de CA e TEP. Os autores concluíram que este tipo de atividade de natação estimula o crescimento, bem como uma melhora no aproveitamento dos nutrientes da dieta (HACKBARTH et al., 2007).

No músculo, a atividade de natação forçada aeróbica ocasiona em peixes um aumento no tamanho das fibras do músculo vermelho e do músculo branco (hipertrofia), devido a maiores taxas de síntese proteica nestes tecidos (HOULIHAN; LAURENT, 1987). Como o músculo representa de 50 a 60 % do peso corporal dos peixes, mudanças neste tecido influenciam o crescimento do corpo como um todo (DAVISON; GOLDSPINK, 1977; JOHNSTON; MOON, 1980 a; TOTLAND et al., 1987; DAVISON, 1989).

Além dos benefícios supra citados, os parâmetros hematológicos são ferramentas úteis na avaliação das condições dos peixes submetidos ao exercício, uma vez que essa atividade acarreta mudanças no fluxo sanguíneo e no diâmetro dos vasos, além de promover aumento na entrega de oxigênio. Dessa forma, são esperadas alterações na concentração de hematócrito (Hct), no conteúdo de eritrócitos (RBC), e no conteúdo de hemoglobina (Hb) (MARTINEZ et al., 1994; SATCHELL, 1991). Da mesma forma, a atividade de natação também promove alteração no parâmetro Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), o qual nos indica a concentração de hemoglobina em cada eritrócito e mostrando como está a capacidade respiratória do animal. Além disso, os parâmetros Volume Corpuscular Médio (VCM) e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) estão envolvidos com o fluxo sanguíneo e a dinâmica cardíaca (HOUSTON, 1990).

Sabe-se que peixes submetidos ao exercício de intensidade alta, apresentam alterações nas variáveis hematológicas e que o mesmo quadro não é visto em peixes submetidos a atividade de intensidade moderada ou leve (FRANKLIN et al, 1993; WOOD, 1991; HOLK; LYKKEBOE, 1998). Além de avaliar o impacto da atividade imposta sobre o transporte e aporte de oxigênio,

os índices hematológicos são utilizados também nos estudos de controle de patologias e de estresse de qualquer natureza (MARTINEZ et al., 1994).

Atividade de natação em peixes reorganiza seu metabolismo de forma a diminuir a mobilização proteica para fins energéticos, com aumento consequente do catabolismo de lipídios e carboidratos, permitindo assim maior síntese de proteína e maior taxa de crescimento (DAVISON, 1997; MOYES; WEST, 1995; WOOD, 2001; RICHARDS et al., 2002; HACKBARTH; MORAES, 2006; ARBELÁEZ-ROJAS, 2007). Matrinxãs exercitados aerobiamente apresentam maior capacidade para oxidar lipídios e carboidratos, com taxa catabólica superior a 40 e 15 %, respectivamente. Além disso, observa-se aumento de 30 % na síntese de proteína muscular (ARBELÁEZ-ROJAS, 2007). Visto que a atividade de natação de longa duração favorece o crescimento ao permitir que os peixes metabolizem melhor o alimento ofertado, sua execução poderia contribuir para diminuição do problema de gastos com fontes proteicas, usualmente enfrentado na piscicultura. Os nutrientes proteicos representam de 50 a 70 % dos custos de produção, e a redução desta porcentagem pode ser alcançada por meio da utilização de ingredientes de alta qualidade, do uso de técnicas eficazes de processamento das rações e da aplicação de estratégias na alimentação e na criação (KUBITZA, 1998). A atividade de natação aeróbica poderia, desta forma, aumentar o aproveitamento da dieta resultando em maiores taxas de crescimento devido à melhor utilização de fontes não proteicas. Todavia, todas as respostas fisiológicas apresentadas acima dependem da velocidade de natação a que os peixes são submetidos. E este valor geralmente se encontra entre um e dois comprimentos corporais/segundo (cc/s) (DAVISON, 1997; AZUMA et al, 2000; RICHARDS et al, 2002;

HACKBARTH & MORAES, 2006; ARBELÁEZ-ROJAS, 2007). Em matrinxã (*B. amazonicus*), a velocidade ideal observada foi de 1,0 CC/seg. Esse valor foi obtido baseado em parâmetros de desempenho da espécie (ARBELÁEZ-ROJAS, 2007).

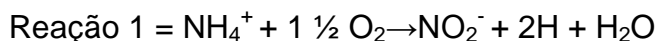
Dessa forma pode-se destacar a importância do presente estudo, visto que a atividade de natação traz benefícios ao bem estar animal. Além disso, a aplicação da atividade de natação em sistemas de cultivo pode acarretar minimização de gastos para os produtores se forem aplicados intervalos regulares de repouso. Essa estratégia, entretanto, demanda o conhecimento do intervalo de tempo ideal de repouso para a recuperação do animal após a atividade de natação imposta, otimizando as respostas metabólicas aumentando a mobilização de proteínas para o crescimento.

2.4. Nitrito

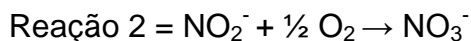
Peixes confinados em sistemas de criação intensiva recebem ração comercial com elevados níveis de proteína. Parte dessa proteína é consumida e absorvida pelos animais, favorecendo dessa forma o seu desenvolvimento e crescimento. Contudo, uma porção da proteína que é ingerida pelos peixes pode não ser metabolizada, sendo assim excretada nas fezes como nitrogênio orgânico ou amônia. A porção de proteína que não é consumida pelo animais, somado à adição de fertilizantes e adubos orgânicos (muito comum em pisciculturas), podem promover um aumento de nitrogênio na água (BALDISSEROTO, 2002; ATWOOD et al., 2001; BOYD, 1982; URBINATI; CARNEIRO, 2004), podendo atingir níveis bastante elevados, o que torna um

fator limitante para a criação de peixes (HILMY et al., 1986; SVOBODOVA et al., 2005a).

Em ambiente aquático, a amônia (NH_3) é oxidada à nitrito (NO_2^-) por meio de bactérias nitrificantes quimiossintéticas (*Nitrosomonas* e *Nitrosococcus*), como apresentado na reação 1:



O NO_2^- pode ser oxidado a nitrato (NO_3^-), por ação de bactérias *Nitrobacter*, conforme apresentado na reação 2:



Ambos os processos acima se dão em condições aeróbicas e são denominados nitrificação. A reação inversa, de nitrito a amônia, é denominada desnitrificação e pode ocorrer em ambientes eutrofizados, devido à decomposição de matéria orgânica (ARANA, 1997; GROSELL e JENSEN, 2000).

O nitrato é tóxico aos peixes apenas em altas concentrações, entretanto a amônia e o nitrito são tóxicos a estes animais em baixas concentrações (BALDISSEROTO, 2002). Em casos de sistemas de recirculação de água (sistemas fechados), altas concentrações de nitrato podem ser alcançadas por meio da nitrificação da amônia (ARANA, 1997). Em condições de baixos teores de oxigênio, a ação das bactérias do tipo *Nitrobacter* é prejudicada, permitindo que ocorra um acúmulo de nitrito (LATONA, 2002).

Em altas concentrações, o nitrito promove danos aos peixes (BIANCHINI et al., 1995; DOBLANDER; LACKNER, 1995; LEWIS; MORRIS, 1986), como

lesões no epitélio branquial, alterações nos fluidos corporais e outros distúrbios bioquímico-fisiológicos (JENSEN, 2003).

No epitélio gástrico, o excesso de nitrito pode ser mutagênico e carcinogênico (BRUNING-FANN; KANEENE 1993b), principalmente por ação de nitrosaminas (substância formada por meio de reações entre nitrito e proteínas) (WENG et al., 1992).

Segundo Brunning-Fann; Kaneene (1993), além dos efeitos deletérios promovidos no epitélio gástrico, o excesso de nitrito pode causar alterações na atividade elétrica, motora e cerebral.

Uma das consequências indesejáveis causadas pelo nitrito em peixes é a oxidação de hemoglobina em metahemoglobina. Essa reação é decorrente da oxidação do ferro do grupo heme da hemoglobina, no qual a forma ferrosa (Fe^{2+}) é oxidada para a forma férrica (Fe^{3+}), trazendo grande prejuízo no transporte de oxigênio dos animais (KOSAKA; TYUMA, 1987; CAMERON, 1971). A formação de metahemoglobina provoca deficiência no transporte de oxigênio, uma vez que leva a diminuição de hemoglobina e hematócrito por meio de hemólise (VAN LEEUWEN 2000; SCARANO & SAROGLIA, 1984; ARILLO et al., 1984; AVILEZ et. al., 2013).

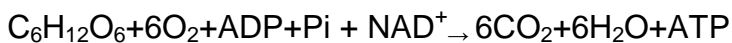
Dessa forma, o excesso de nitrito pode promover alterações tanto em nível metabólico, quanto estrutural nos peixes, gerando assim mudanças na captação e no transporte de oxigênio, além de modificar o metabolismo. Portanto, a busca de ferramentas que possam minimizar essas respostas indesejadas é de grande interesse não apenas comercial, mas também para a melhoria da saúde e do bem estar animal.

2.5. Metabolismo Oxidante e antioxidante

A oxidação biológica é fundamental para os animais, pois é o principal processo pelo qual esses seres vivos obtêm energia. Esse processo ocorre por meio da oxidação das biomoléculas, gerando ATP (trifosfato de adenosina), molécula considerada moeda energética para as células. A hidrólise do ATP promove a liberação de energia para a realização de trabalhos, como contração muscular, transporte de membrana, síntese de biomoléculas, entre outros. Para tal os organismos aeróbicos consomem O₂ e geram CO₂, como apresentado de forma geral na *reação 3* (VOET, 2006).

Reação 3:

(Oxidação da glicose):



Na cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria, embora o processo de redução do oxigênio à água seja bastante eficiente e preciso, às vezes, esse mecanismo não é completado, promovendo assim a geração de moléculas com elétrons desemparelhados, chamada de espécies reativas de oxigênio (ERO), com funções muitas vezes prejudiciais, pois promovem oxidação das membranas, das proteínas e do DNA, levando a morte celular (VOET, 2006).

Das moléculas derivadas de oxigênio, podemos destacar o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o carbonato ($CO_3^{\bullet-}$), o ácido hidroperoxila (HO_2^{\bullet}), o peroxil (RO_2^{\bullet}) e o alcoxil (RO^{\bullet}), a hidroxila ($^{\bullet}OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloro ($HOCl$), hidroperóxidos de ácidos graxos ($FAOOH$), aldeídos reativos, oxigênio *singlete* e outros compostos (JEZEK; HLAVATÁ, 2005). O $O_2^{\bullet-}$ é fracamente reativo, entretanto o $^{\bullet}OH$ é extremamente reativo e capaz de provocar danos às células (DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011). O H_2O_2 , mesmo tendo uma característica óxido/redutora, penetra na célula com facilidade principalmente por ser uma molécula apolar, além disso, é uma forte precursora do $^{\bullet}OH$ (HABER; WEISS, 1934; DI GIULIO; MEYER, 2008).

Além das espécies reativas de oxigênio, também são conhecidas as espécies reativas de nitrogênio (ERN), das quais podemos destacar o óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), peroxinitrito ($OONO^{\bullet}$), óxido Nitroso (N_2O_3), dióxido de nitrogênio ($^{\bullet}NO_2$), *N*-nitrosaminas ($R_2N-N=O$), *S*-nitrosotíols ($R-S-N=O$) (JEZEK; HLAVATÁ, 2005; DI GIULIO; MEYER, 2008), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) (HALLIWELL, 1999).

O radical óxido nítrico (NO^{\bullet}) é produzido no organismo por meio da enzima óxido nítrico sintetase a partir do aminoácido arginina, O_2 e NADPH (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato-Hidrogênio), gerando como subproduto o $NADP^+$ (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato) e o aminoácido citrulina (TAMIR; TANNENBAUM, 1996). Conforme já exposto anteriormente, o nitrato pode gerar nitrito e este pode interagir com ácidos do suco gástrico gerando o ácido nitroso (HNO_2). Outra forma de geração de HNO_2 é por meio da reação entre óxido nitroso (N_2O_3) e H_2O . O produto HNO_2

age sobre o DNA promovendo a desaminação das bases nitrogenadas citosina, adenina e guanina, promovendo a formação de uracila hipoxantina (BERGER, et al., 1999) e xantina, respectivamente (SCHÖNEICH et al., 1999).

Muitos mecanismos são responsáveis por gerar as ERO na célula. A cadeia transportadora de elétrons, que se encontra na membrana interna da mitocôndria, é a principal fonte de ERO, sendo que os principais produtores de ERO na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial são a Coenzima Q e o complexo III, local onde o O_2 da origem ao $O_2^{\bullet-}$ (JEZEK; HLAVATÁ, 2005; LUSHCHAK, 2011).

O estresse oxidante pode resultar em efeitos bastante danosos para as biomoléculas constituintes da célula (lipídeos de membrana celular, proteínas e o DNA) podendo leva-la a morte (apoptose celular) (GUTTERIDGE, 1995; JEZEK; HLAVATÁ, 2005).

As ERO podem agir sobre os lipídeos de membrana causando sua oxidação e formando hidroperóxidos, mecanismo conhecido como peroxidação lipídica (LPO). Assim, a detecção de LPO é um importante marcador de lesão na membrana celular e estresse oxidante (GUTTERIDGE, 1995; BUETTNER, 1993).

O processo de LPO ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação dá-se no momento em que os ácidos graxos encontrados na membrana da célula (poli-insaturados) e organelas são metabolizados, formando assim radicais alquila (L^{\bullet}), que quando em contato com O_2 forma o radical peroxila (LOO^{\bullet}) (figura 2). O LOO^{\bullet} pode reagir com o hidrogênio alélico de outro ácido graxo, promovendo a formação de um

hidroperóxido de lipídio (LOOH) (produtos primários da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados, podem ser quantificados colorimetricamente pelo método FOX (Ferrous Oxidation/Xylenol) (JIANG et al., 1992) e outro L[•], promovendo assim a etapa de propagação. A etapa de terminação ocorre pela aniquilação dos radicais formados originando produtos não radicalares (GUTTERIDGE, 1995; LIMA; ABDALLA, 2001).

A LPO pode promover uma desestabilização da membrana celular, redução de sua fluidez e inibição das enzimas nela inseridas (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008).

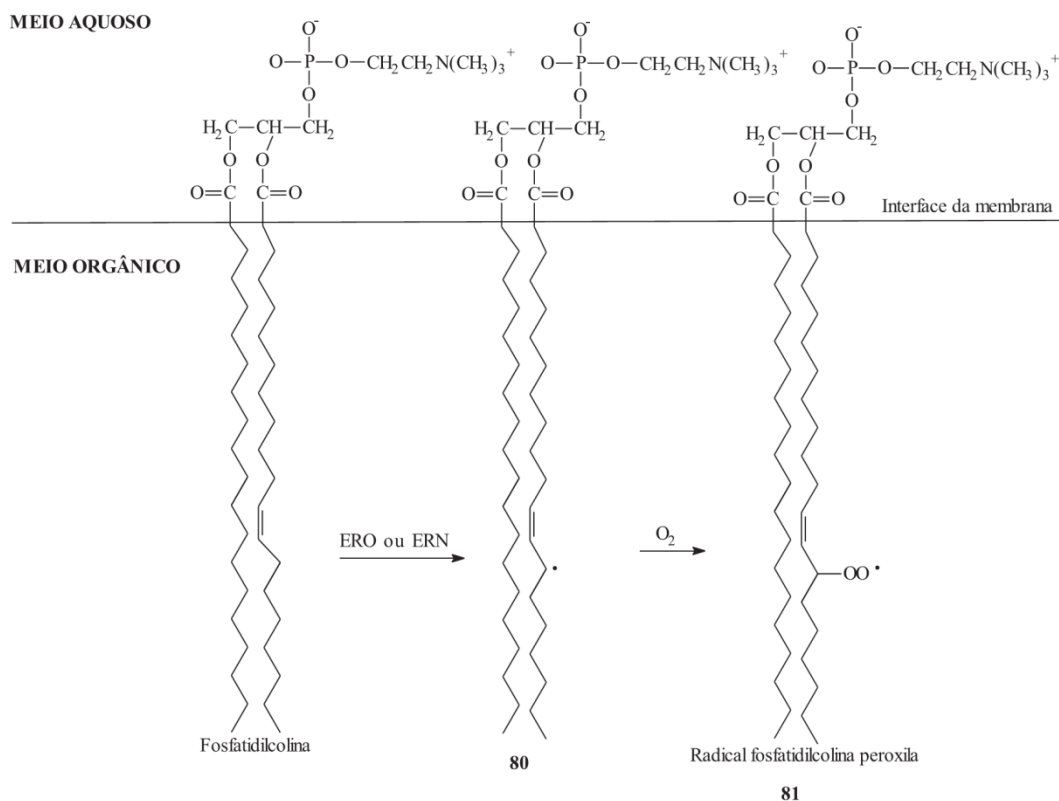


Figura 2. Ataque da membrana celular por ERO ou ERN. Fonte: modificada de Buettner, 1993. ERO e ERN oxidam fosfatidilcolina, formando o radical lipídico (80), que ao adicionar O₂ forma radicais lipídio-peroxila (81), permitindo o acúmulo de lipídios nessas paredes e, conseqüentemente, seu entupimento.

Segundo Lesser (2012), o DNA é muito sensível à ação de ERO, já que suas bases nitrogenadas podem ser oxidadas pelas espécies reativas.

Um modelo de ataque do HO• ao DNA e RNA, que pode ser ocasionado pela retirada de um dos átomos de hidrogênio, gerando quase sempre à ruptura da cadeia da molécula, formando assim a 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina 8OHdA e 5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina 8OHdG (BERGER, 1999)

As quebras de fitas do DNA podem estar diretamente associadas à presença de radicais livres na célula. As ERO podem oxidar as bases nitrogenadas das purinas e pirimidinas, levando a formação de quebra de fitas simples ou duplas (BERRA et al., 2006). O radical •OH, por exemplo, pode ser adicionado na posição 8 da desoxiguanosina (dGuo), cujo produto final oxidado

é a 8-oxodGuo. Além disso, os produtos da LPO são altamente reativos com o DNA, podendo gerar adutos, que são modificações covalentes no DNA que envolvem os sítios das bases, os quais estão envolvidos nas pontes de hidrogênio, que mantém a estrutura de dupla hélice (CARVALHO, 2001)(**Figura 4**).

A oxidação de proteínas por radicais livres pode resultar em alterações estruturais dos aminoácidos e inativação catalítica, caso ela tenha função enzimática (LESSER, 2012) (**Figura 3**).

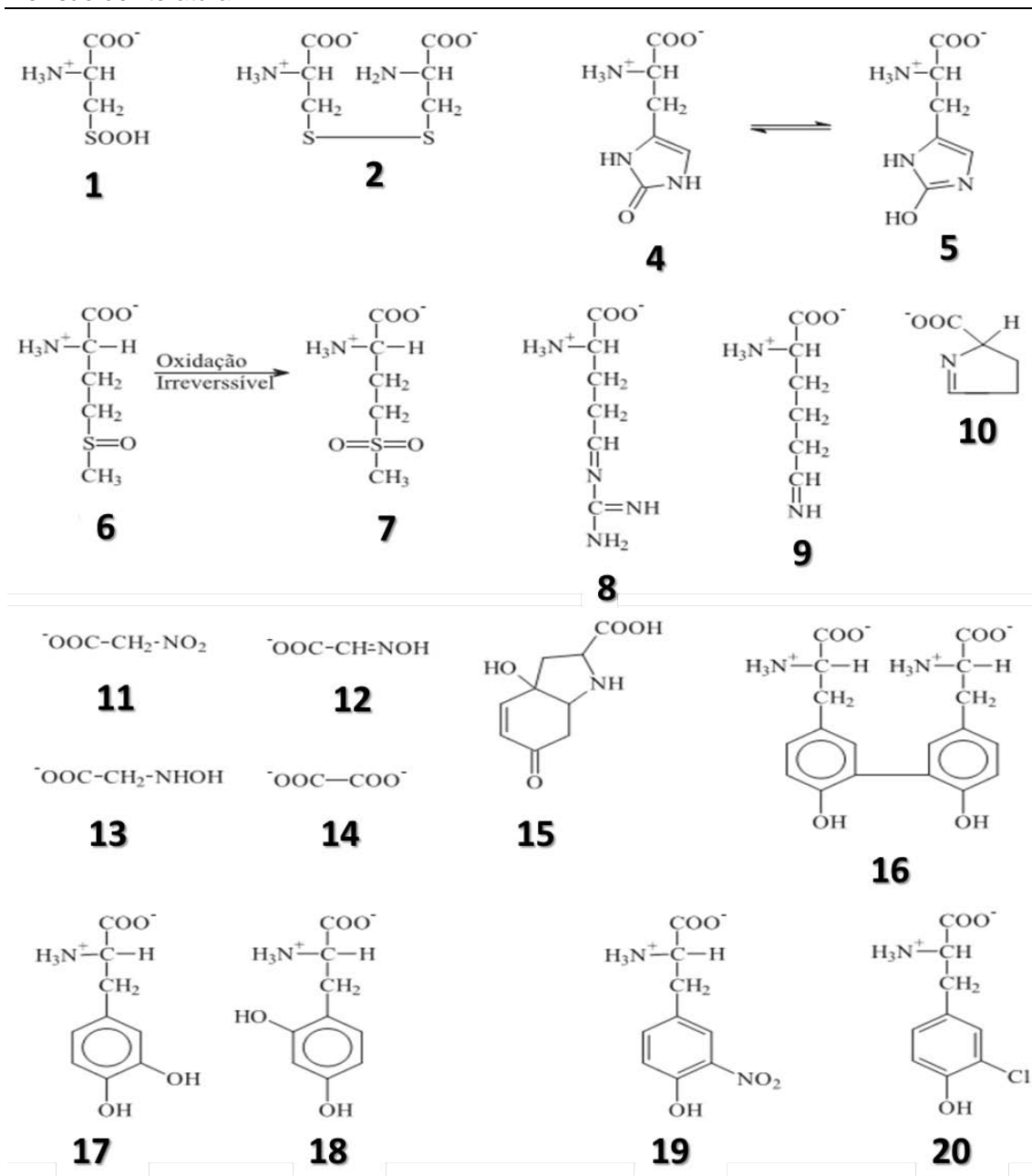


Figura 3: Principais produtos da oxidação dos aminoácidos e proteínas por ERO e ERN. Fonte, modificada de Barreiros (2006). Apresenta os principais produtos das reações de degradação de aminoácidos por ERN e ROS (tiohidroperóxido (1), cistina (2), 2-oxo-histidina (3) em equilíbrio com a 2-hidroxi-histidina (4), metionina sulfóxido (5), metionina sulfona (6) 14, derivados da arginina, lisina e prolina (7, 8 e 9), nitroacetato (10), oxima (11), hidroxilamina (12), oxalato (13) e derivados da tirosina (15-20).

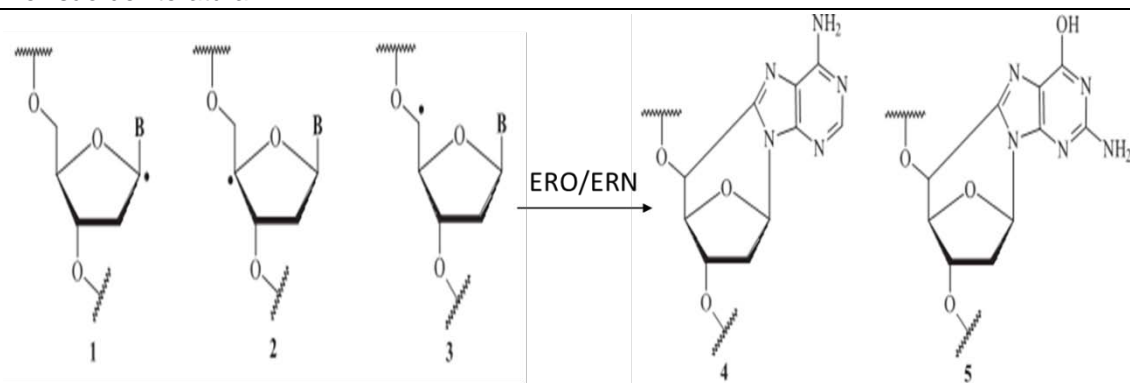


Figura 4: Principais produtos da oxidação de DNA por ERN e ERO. Fonte: modificada de Barreiros (2006) A figura 4 apresenta um modelo de ataque do HO• ao DNA e RNA, que pode ser ocasionado pela retirada de um dos átomos de hidrogênio (1-3), gerando quase sempre à ruptura da cadeia da molécula, formando assim a 5'-8-ciclo-2'-desoxiadenosina 8OHdA (4) e 5'-8-ciclo-2'-desoxiguanosina 8OHdG (5).

Outro local importante para a formação de ERO é o retículo endoplasmático, local que tem como objetivo a metabolização de tóxicos, pelo citocromo P450. A metabolização dos xenobióticos (substâncias exógenas com características tóxicas) ocorre por enzimas como a xantina oxidase e o NADPH-citocromo P450 redutase, transferindo o elétron da substância para o O₂, produzindo com isso o O₂^{•-} e regenerando, assim uma única molécula de composto pode gerar vários oxirradicais. (DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011).

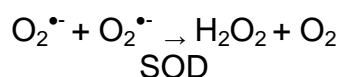
A produção de ERO nem sempre está associada aos danos celulares. Algumas células, como os leucócitos, possuem um sistema de produção específica de ERO. Este sistema é regulado pela NADPH-oxigenase e as ERO produzidas por este sistema são utilizadas para atacar microrganismos invasores, conferindo à célula um papel protetor (LUSHCHAK, 2011).

Entretanto, as ERO podem ser removidas e quem tem a função de promover essa regulação é o sistema antioxidante, que são assim nomeados pelo fato de combater ou inibir danos oxidantes. (ABDOLLAHI et al., 2004; DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011).

Os antioxidantes podem ser tanto hidrofílicos, como a glutathione (GSH) e o ácido ascórbico, quanto hidrofóbicos como os carotenóides, o retinol e o α -tocoferol. Em pH fisiológico, o ácido ascórbico (ou vitamina C) é encontrado principalmente como ascorbato e é altamente solúvel em água. A GSH é um tripeptídeo (γ -glutamil-cisteinil-glicina) que tem inúmeras funções celulares, entre elas a função antioxidante, participando da reação acoplada com a glutathione peroxidase (GPX), metabolizando assim os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) e hidroperóxidos de lipídios (LOOH). Além disso, a GSH pode agir de forma direta em ERO ($O_2^{\bullet-}$, $^{\bullet}OH$), por meio do seu grupo tiol ($-SH$) (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008).

O sistema antioxidante enzimático é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A SOD possui três isoformas: SOD CuZnSOD, que aparece predominantemente no citosol nos lisossomos e no núcleo; a MnSOD, encontrada principalmente na mitocôndria; e a SOD extracelular (ECSOD), bastante encontrada nos espaços extracelulares de vasos sanguíneos. O substrato da SOD é a molécula de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (reação 4).

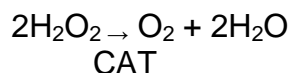
Reação 4



A CAT é encontrada geralmente nos peroxissomos, organela responsável pela degradação de ácidos graxos. Para que ocorra a dessaturação de ácidos graxos em ácidos graxos insaturados (n β -oxidação de ácidos graxos), ocorre a liberação de uma molécula de H_2O_2 como

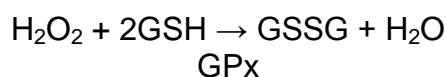
subproduto, a CAT tem uma atuação direta sobre o substrato H_2O_2 desta forma pode agir sobre ele também fora do peroxissoma (reação 5).

Reação 5

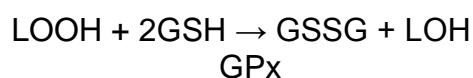


A GPx além de agir metabolizando a H_2O_2 , como a CAT, age também sobre hidroperóxidos de lipídeos, reduzindo assim radicais como os LOOH, como apresentado nas reações, 6 e 7 respectivamente. Foram descritas quatro isoformas de GPx em mamíferos, são elas: GPx1 (clássica), GPx2 (gastrointestinal), GPx3 (plasmática) e a GPx4 (que promove a redução de LOOH ligados às membranas) (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008).

Reação 6:



Reação 7:



As enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e a enzima glutationa redutase (GR) apresentam funções específicas no sistema antioxidante. As glutationa redutase promove por meio da glutationa dissulfeto, a regenera da glutationa (GSH) (molécula fundamental na reação da GPx) a partir de glutationa dissulfeto (GSSG) e da molécula de NADP(nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). A enzima glicose-6-fostato desidrogenase

participa das reações da via das pentoses, que tem como um dos principais objetivos, a produção de NADPH, molécula fundamental no funcionamento das vias do anabolismo (GUTTERIDGE, 1995; DI GIULIO; MEYER, 2008; LUSHCHAK, 2011; BERG, 2008).

Na tentativa de minimizar os efeitos causados pelo estresse oxidante em sistemas de criação de peixes, estudos no âmbito da nutrição e das respostas fisiológicas associadas ao exercício físico têm aumentado gradativamente, uma vez que se tem mostrado ser uma ferramenta importantíssima.

2.6. Exercícios Físicos X Metabolismo Oxidante

Uma vez que relatos sobre exercício físico e estresse oxidante em peixes é muito escasso, o levantamento bibliográfico feito neste capítulo foi por meio de estudos com mamíferos.

Em repouso, o musculo esquelético gasta em torno de 13 kcal/kg de músculo/dia (ELIA, 1991), porem quando em exercício pode atingir um gasto 100 vezes maior, necessitando assim de um fluxo de oxigênio muito maior para a mitocôndria, para suprir a necessidade do metabolismo aeróbico (SAHLIN et al., 1998), o que determina um aumento da produção de ROS durante o exercício físico (DAVIES et al., 1982; KNIGHT, 1999; RADAK, 1999; RADAK, 2001; RADAK et al., 2008; SEN, 1995). Outros fatores como a enzima NADPH-oxidase (MCHUGH et al., 1999; BABIOR 2004; ORTENBLAD et al., 2003) e a via da xantina oxidase (CHEVION et al., 2003, GOMES et al., 2005; DRÖGE, W., 2002; DUARTE et al., 1993) também promovem aumento da produção de ROS durante o exercício físico.

Entretanto, estresse oxidante é a condição pela qual as células excedem a produção fisiológica de moléculas oxidantes (ERO e ERN, e Radicais livres) (GOLDFARB, 1999; SIES, 1991).

No entanto, é sabido que o exercício físico promove a diminuição de doenças crônicas (RADAK, 2003). Assim, fica claro que a prática regular de exercício físico promove adaptações benéficas, que permite uma melhor resposta ao aumento de ERO, minimizando ou inibindo oxidação celular por esse meio.

Acredita-se que tanto a produção de ERRO, quanto o desenvolvimento de estresse oxidante tem uma relação direta com a intensidade do exercício. Estudos comprovaram que exercícios exaustivos promovem aumento de indicadores de estresse oxidante como as atividades das enzimas glutatona (JI et al., 2004) e superóxido dismutase, além de peroxidação lipídica em endotélio de ratos submetidos ao exercício exaustivo em esteira (RADAK et al., 1995).

Outros estudos mostraram que o exercício físico, quando praticado de forma exaustiva, promove um aumento bastante significativo na produção de EROS nos complexos I e III da cadeia transportadora de elétrons (em torno 187% e 138%, respectivamente), do tecido muscular de ratos (SABORIDO et al., 2011).

Haja visto que o exercício físico promove o aumento de ERO, qual seria então sua relação com o benefício causado na prevenção, na minimização e na cura de doenças crônicas?

Uma vez que o estresse oxidante tem uma relação direta entre a produção de ER e a defesa antioxidante do organismo, parece claro que, quando realizado de forma exaustiva, o exercício físico acarreta um balanço positivo de ER. Entretanto, quando praticado de forma moderada o exercício

físico promove grandes benefícios, como, aumento da atividade das enzimas antioxidantes (SOD e GPx), em cérebro de ratos (SOMANI; HUSAIN, 1996).

Outro estudo demonstrou que ratos fêmeas e machos idosos tiveram aumento a atividade das enzimas SOD, GPx e CAT em cérebro, coração, fígado e rins após 52 semanas de exercício moderado. Além disso, foi apresentado nesse mesmo estudo diminuição dos equivalentes de lesão oxidantes, ácido tiobarbitúrico (TBARs) e proteína carbonilada em todos os tecidos, cérebro, coração, fígado e rins (NAVARRO et al., 2004).

Também foi observado redução de estresse oxidante em cérebro de ratos submetidos ao treinamento de esteira de forma moderada por 15 semanas, nesse estudo, os autores descreveram em seus achados que os animais tiveram aumento da atividade das enzimas SOD e GPx e diminuição de proteínas carboniladas no hipocampo desses animais (MAROSI et al., 2012).

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Sabendo-se que os peixes mantidos em natação sustentada usufruem de inúmeros resultados fisiológicos, bioquímicos e comportamentais entre outros benefícios aos animais, a utilização desta prática de manejo como estratégia na melhora do seu desempenho de crescimento e do seu bem estar frente aos estressores presentes nas atividades de criação, pode ser bastante promissora. Assim, a avaliação do perfil metabólico em matrinxã desafiados por agentes estressores após período de criação em natação sustentada foi a ferramenta considerada confiável e de escolha na avaliação dos efeitos desta prática de manejo sobre as condições fisiológicas dos peixes.

O objetivo do presente estudo foi avaliar as respostas bioquímicas ao estresse oxidante além das respostas hematológicas e do metabolismo intermediário em matrinxãs juvenis adaptados à natação sustentada usando como desafio a exposição aguda ao nitrito.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Matrinxã juvenis da fazenda São Geraldo (Sertãozinho, SP) foram transportados para as instalações de laboratório e mantidos em tanques de 2000L com fluxo contínuo de água e com controles de temperatura, pH e aeração. A água era filtrada através de um sistema de bio-beds e retornada aos tanques. Os peixes permaneceram nesse sistema por uma semana para aclimação às novas condições ambientais. Após o período de aclimação, 72 peixes pertencentes à mesma classe de peso e tamanho foram amostrados e submetidos a um banho de anestésico contendo 40 mgL^{-1} de eugenol (INOUE et. al., 2003) por 30 segundos. Após a anestesia leve, os peixes foram avaliados quanto à biometria. O peso médio dos animais variou de 28 a 29mg e o comprimento médio entre 13 e 14 cm. Depois da biometria, os peixes foram distribuídos aleatoriamente ($n=12$) em seis tanques circulares de 200L em fibra de vidro. Nesses tanques experimentais a água chegava por injeção forçada por meio de bomba de $\frac{1}{4}$ HP através de um tubo em L imersos na coluna d'água de cada tanque. Os tubos em L eram perfurados em toda sua extensão ao longo de uma face com furos de $5/32''$ dispostos a cada 1,5 cm e lacrados na extremidade da haste vertical. A haste vertical mantinha o fluxo circular da coluna d'água, auxiliado pela haste horizontal na superfície do tanque, através da qual entrava a água injetada. A região central dos tanques, onde a água tem velocidades escalares menores, tinha o acesso impedido por um cilindro de rede de nylon, restringindo a coluna d'água em movimento a uma largura de 20 cm na região mais periférica do tanque. A água dos tanques era escoada por um esgoto central no fundo de cada tanque e filtrada, antes do seu retorno pelo sistema em L, em um Filtro de Rotação Biológico com rede de aço de

porosidade de 0,2mm. A velocidade da água era controlada por uma torneira de registro antes de chegar às hastes horizontais em L através de um medidor de fluxo (GO Ambiental, Mecânica Medidores de vazão, modelo 2030 Series) Contador de Rotação Biológico (RBC -system). O sistema experimental era assim mantido sempre filtrado e a água era aerada durante a filtração e pela própria penetração no sistema através das hastes em L. A qualidade da água foi preservada ao longo do período experimental e mantida em: $26,4 \pm 1,3$ °C; pH - $7,3 \pm 0,2$; DO - $5,6 \pm 0,4$ mg L⁻¹; NH₄⁺ - $0,95 \pm 0,09$ mg.mL⁻¹ , NO⁻ - $1,78 \pm 0,22$ mg L⁻¹. Os peixes permaneceram nestas condições durante uma semana e a primeira etapa experimental foi iniciada.

4.1. Delineamento experimental

4.1.1. Experimento1

Duas condições experimentais foram previamente estabelecidas: condição controle SN (peixes mantidos sem atividade de natação sustentada) e condição experimental NS (peixes mantidos em natação sustentada). Os seis tanques experimentais foram nomeados aleatoriamente como SN e NS de tal forma que as condições fossem realizadas em triplicata. Na condição NS a velocidade da água foi ajustada para 1,0 CC seg⁻¹. Esta velocidade foi previamente estabelecida como ideal para matrinxã (ARBELÁES-ROJAS, 2007). Os 12 peixes por caixa (n = 72) permaneceram nessas condições experimentais por 90 dias e eram alimentados até a saciedade duas vezes ao dia com ração comercial contendo 36% de proteína bruta. Após o período experimental, seis

peixes de cada tanque (n = 36) foram amostrados, anestesiados conforme descrito anteriormente e o sangue foi puncionado da veia caudal com seringas heparinizadas. Em seguida, os peixes foram submetidos à eutanásia por meio de um corte no tronco medular. Após a coleta do sangue, os peixes foram dissecados sobre placa de vidro gelada e o fígado e uma amostra de músculo branco foram excisadas e transferidas para tubos plásticos e guardadas em nitrogênio líquido para análises posteriores. Esses animais foram considerados controle e foram usados para comparação com os animais posteriormente desafiados pela exposição ao nitrito; denominados SNNi e NSNi(experimento 2).

4.1.2. Experimento 2

Os seis peixes restantes por caixa, oriundos do experimento 1, foram mantidos em suas caixas originais para realização do desafio. Decorridas vinte e quatro horas do experimento 1, esses peixes remanescentes foram expostos a uma concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de nitrito por 24 horas a (concentração máxima permitida ambiental pelo CONAMA - Resolução nº 357,-.2005). Após a exposição ao nitrito, os peixes foram anestesiados e o sangue e tecidos, coletados como descrito acima. Estes peixes foram designados como SNNi (peixes mantidos sem atividade de natação sustentada por 90 dias e expostos ao NO^{-2}) e NSNi (peixes submetidos à natação sustentada por 90 dias e expostos ao NO^{-2}).

4.2. Metodologia

4.2.1. Determinações hematimétricas:

4.2.1.1. Hematócrito

Amostras de sangue eram transferidas para tubos de microhematócrito heparinizados e posteriormente fechados com massa apropriada, centrifugados em centrífuga de microhematócrito por 3 minutos a $12.000 \times g$, e a porcentagem de sedimentação dos eritrócitos era lida em cartão padronizado.

4.2.1.2. Hemoglobina

O teor de hemoglobina foi determinado em alíquotas de $10\mu\text{L}$ de sangue adicionadas em 2mL de solução de Drabkin (KCN , KH_2PO_4 , $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ em água destilada). A densidade óptica era determinada em 540nm (DRABKIN, 1948).

4.2.1.3. Contagem de eritrócitos (RBC)

Para contagem de eritrócitos eram diluídas alíquotas de $10\mu\text{L}$ de sangue em 2mL de solução de citrato formol (isotônica). Desta mistura, $10\mu\text{L}$ eram transferidos para uma câmara de Neubauer e as células eram contadas sob microscopia óptica (LIMA et al, 1969).

Foram calculados, o Volume Corpuscular Médio (VCM) por meio dos valores de hematócrito e da contagem de eritrócitos, Hemoglobina Corpuscular Média (HCM) através dos valores de hemoglobina total e da contagem de eritrócitos, e Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM) por meio dos valores de hemoglobina total e de hematócrito.

4.2.1.4 Metahemoglobina

A percentagem de metahemoglobina (MetHb) foi determinada como descrito por Matsuoka (1997). Resumidamente, 6µL de sangue total eram adicionados a 1,2 ml de água destilada e deixado por 2 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 600µL de tampão PO₄²⁻ pH 6,8 era adicionado e a mistura era centrifugada a 500 x g por dois minutos. O sedimento era descartado e a MetHb era determinada no sobrenadante a 563nm de densidade óptica (PS, sonda de solução) em quatro passos: 1) (OD1) de 600µL de PS lida contra H₂O dest.; 2) (OD2) depois da adição de 4µL de KCN 0.9M ao PS, seguido por agitação durante 30 segundos e lida contra H₂O dest.; 3) (OD3) densidade óptica de 600µL de PS mais 60 µL de K₃[Fe₂(CN)₆] 0,9 M lido dois minutos após a adição de ferro cianeto contra um solução contendo 600µL de água e 60µl de K₃[Fe₂(CN)₆] 0,9 M 4) (OD4) densidade óptica da solução do passo 3 ao qual era adicionado 4µL de KCN após a leitura DO3 e deixado por 30 seg. para reagir. As concentrações de MetHb foram calculadas de acordo com a expressão: $\text{MetHb \%} = [(D2 - D1) \times 100] \times [(D4 - D3) \times 1,1]^{-1}$.

4.2.2. Preparação dos extratos ácidos

Em 100µL de plasma eram adicionados 1mL de ácido tricloroacético (TCA) 20% e centrifugado por três minutos a 12.000 x g. O sobrenadante era utilizado como extrato celular. Fígado e músculo branco eram pesados em quantidades apropriadas para as determinações dos intermediários metabólicos, mantendo-se a proporção de 100mg de tecido para 1,0mL TCA 20 %. Os tecidos eram homogeneizados a 1.000 rpm e homogeneizador rotativo

(Turrax® T10 Ika), sob banho de gelo, seguido de centrifugação por três minutos a 12.000 x *g*, e os sobrenadantes eram utilizados como extratos celulares.

4.2.3. Preparação dos extratos neutros

Alíquotas de plasma, fígado e músculo branco eram diluídas na proporção de 1/10 com água destilada. O processo era feito como descrito na preparação de extratos ácidos, substituindo-se o TCA por água destilada.

4.2.4. Preparação dos extratos alcalinos

Nos extratos alcalinos, as amostras de tecido eram pesadas e colocadas em tubos de ensaio, aos quais era adicionado 1 ml de KOH 6,0 N. Em seguida, os tubos eram fervidos em Banho-Maria por 5 minutos e posteriormente agitados para a dissolução completa dos tecidos.

4.2.5. Metabolismo intermediário

4.2.5.1. Glicogênio

As determinações de glicogênio foram realizadas em homogeneizados alcalinos como descrito por Bidinotto e colaboradores (1997). Amostras de fígado e músculo branco eram homogeneizadas em meio alcalino e 250µL de extrato eram transferidos para um tubo rigorosamente limpo onde eram

adicionados 3 mL de etanol e 100 μ L de K₂SO₄ 10%, seguidos de agitação. As amostras serão centrifugadas a 3.000 x g por três minutos e o precipitado ressuspenso em 2,5mL de água destilada, seguido de agitação. Um volume adequado desta dissolução era avaliado quanto ao seu teor de açúcares (DUBOIE et al, 1956). A leitura óptica era realizada em 480nm. A concentração de açúcares totais foi estimada contra um padrão de glicose 1mM e o valor foi expresso em μ mol de glicosil-glicose/mg de tecido.

4.2.5.2. Glicose

A análise de glicose foi feita pelo método de Glicose Oxidase LABTEST (teste enzimático-TRINDER, 1969). Neste método, a glicose reage com o oxigênio e com a água, liberando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio reage com 4- aminoantipirina e fenol sob a ação catalisadora da peroxidase, através de uma reação oxidativa de acoplamento que forma uma antipirilquinonímia vermelha. A leitura do produto de reação era feita em 525nm.

4.2.5.3. Lactato

Os teores de lactato no plasma e nos extratos ácidos foram estimados de acordo com Harrower; Brown (1972). Um volume adequado de extrato era adicionado a 20 μ L de solução de CuSO₄.H₂O 4%, 3,5mL de ácido sulfúrico concentrado e 80 μ L de p-fenilfenol (1,5g de p-fenilfenol em solução aquosa de NaOH 2%). Após uma hora, os tubos eram fervidos por 90 segundos e

imediatamente resfriados em banho de água. Era utilizado um padrão de lactato contendo 20 nmols e a leitura óptica, realizada em 570nm.

4.2.5.4. Piruvato

A determinação de piruvato era realizada em extratos ácidos, segundo Lu (1939). Um volume adequado de extrato era adicionado a 250µL de dinitrofenilhidrazina 0,1% em HCL 2,0N. Após 30 minutos de repouso, a 37° C, eram adicionados 3,0mL de NaOH 1,3N e a leitura óptica era efetuada em 440nm contra um padrão de piruvato contendo 100nmols.

4.2.5.5. Proteína

O conteúdo de proteína total nos tecidos foi determinado em alíquotas de plasma, músculo branco e fígado. As amostras eram pipetadas nos poços de uma microplaca e em seguida 200µl do reagente de Bradford eram adicionados (BRADFORD et al., 1976). Esse reagente consiste de uma mistura do pigmento Comassie Brilliant Blue diluído em Etanol P.A e ácido fosfórico. Em cada placa, juntamente com as amostras, era realizada uma curva padrão de caseína 1%. A concentração de proteína foi determinada espectrofotometricamente em 520 nm em um leitor de microplacas, e está expressa em mg/g de tecido.

4.2.5.6. Aminoácidos livres

Uma alíquota de plasma ou de extrato neutro de músculo branco ou fígado era transferida para um tubo de vidro e em seguida era adicionado 2mL de ninhidrina 0,1% em propanol. Os tubos eram vedados e então colocados em banho-maria a 40° C, por 40 minutos. Após este período, a leitura óptica era realizada em 570nm contra um padrão de ácido aminoacético 10mM (COPLEY, 1941).

4.2.5.7. Amônia

Uma alíquota de plasma ou de extrato ácido de músculo branco ou fígado era transferida para um tubo de vidro com água destilada para um volume final de 2,0mL e então adicionado 0,5mL de reativo de Nessler (GENTZKOW & MASEN, 1942). A leitura óptica era realizada em 420nm contra um padrão contendo 100nmols de amônia.

4.2.6. Peroxidação lipídica tecidual - LPO

O nível de peroxidação lipídica foi determinado em fígado e músculo pela oxidação do Fe^{2+} na presença de xilenol laranja, conhecido como ensaio FOX - Ferrous Oxidation/Xylenol - (JIANG et al., 1992). Uma amostra de 200mg de tecido era homogeneizada em 1 ml de tampão K_2HPO_4 0,1M pH 7,0, em homogeneizador (Turrax® T10, Ika) sob velocidade média. Os homogeneizados eram centrifugados a 14000 × g por 30 min a 4 °C. Em 100 µL de sobrenadante eram adicionados 100 µL de TCA 10% (1:1); esta mistura era centrifugada a 5000 × g por 10 min a 4 °C. Uma alíquota de 100 µL do

sobrenadante era utilizada para a quantificação de LPO. Ao sobrenadante eram adicionados 900 µL da seguinte mistura de reação: 0,1 mM de xilenol laranja, 4 mM butilhidroxitolueno (BHT), 25 mM de ácido sulfúrico, 0,25 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ em metanol 90%. Esta mistura era incubada no escuro por 30 min. A concentração de hidroperóxidos era então determinada a 560 nm, contra um padrão de 100 nmol de hidroperóxido de cumeno (CHP). A concentração foi expressa em µmol de CHP por grama de tecido.

4.2.8. Enzimas antioxidantes.

As atividades da Glutathione peroxidase (GPx) e Catalase (CAT) foram determinadas segundo os métodos de BEUTLER (1984). Os homogeneizados de tecidos eram preparados em tampão de homogeneização de fosfato de potássio 0,1 M pH 7,0 contendo sacarose 0,25 M. As amostras eram homogeneizadas em homogeneizadores tipo Turrax em banho de gelo e em baixa velocidade. Em seguida, as amostras eram centrifugadas por 10 minutos a 1500 x g a 4 °C. Os sobrenadantes, contendo concentrações conhecidas de proteínas, eram utilizados para as determinações enzimáticas.

4.2.8.1. Catalase (CAT).

Alíquotas dos tecidos eram homogeneizadas em tampão de homogeneização (fosfato-sacarose) e diluídas apropriadamente, quando necessário, no mesmo tampão. Aos homogeneizados diluídos eram adicionados 20 µL de etanol 95% para impedir a reversão da atividade da

enzima. Para confecção da solução de peróxido de hidrogênio era necessária a determinação da concentração exata do estoque. Para isso, era adicionado a uma cubeta de passo óptico de 1 cm, 1,8 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0 e realizada uma leitura óptica em 230 nm, (DO_1). Após essa leitura, era adicionado à mesma cubeta 200 μ L da H_2O_2 estoque, diluída 100 vezes, e uma nova leitura óptica era feita (DO_2). O Cálculo da concentração foi baseado na subtração $DO_2 - DO_1$ multiplicada por 141, dado que o ξ da H_2O_2 é 0,071/mM.cm e o volume final na cubeta foi de 2 mL.

A atividade específica da CAT foi então determinada adicionando-se em uma cubeta de passo óptico de 1 cm, 100 μ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,0; 900 μ L de H_2O_2 50 mM e água destilada para completar 1950 μ L. A mistura era incubada por 2 minutos com um volume apropriado de homogeneizado e a variação de DO_{230} era registrada a cada 10 segundos. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi o mesmo acima.

4.2.8.2. Glutathione peroxidase (GPx).

A atividade específica da GPx foi determinada através da reação da glutathione redutase (GSH) e da oxidação do NADPH, utilizando-se hidroperóxido como substrato. Alíquotas dos tecidos eram homogeneizadas em tampão de homogeneização (fosfato-sacarose) e, em seguida, os homogeneizados eram devidamente diluídos no mesmo tampão. Para a determinação enzimática eram adicionados à cubeta de passo óptico de 1,0 cm: 100 μ L de Tris-EDTA 1 M pH 8,0; 20 μ L GSH 0,1 M; 100 μ L glutathione

redutase 10 U/mL; 100 μ L de NADPH 2 mM; 380 μ L de azida sódica 2,6 μ M; volume apropriado de homogeneizado diluído e um volume de água destilada para completar 970 μ L. Esta amostra era pré-incubada por 2 minutos. Em seguida eram adicionados 30 μ L de t-butil hidroperóxido 7 mM.

A oxidação do NADPH era determinada por 2 minutos com registros a intervalos de 15 segundos. O decréscimo da densidade óptica era determinado contra um branco a 340 nm. O valor do coeficiente de extinção molar utilizado para os cálculos foi $\xi = 6,20/\text{nM.cm}$.

4.2.8.3. Superóxido dismutase (SOD).

A determinação da atividade da SOD foi realizada a partir do princípio de auto-oxidação de pirogalol, que é inibido na presença da SOD. Alíquotas de tecido foram homogeneizadas em tampão de homogeneização (fosfato-sacarose) e diluídas apropriadamente no mesmo tampão.

A determinação da SOD foi realizada em uma cubeta de 3 mL, onde foram adicionados 200 μ L de Tris HCL-EDTA 1M, pH 7,5; e um gradiente de volumes do homogeneizado diluído, completando-se o volume para 1960 μ L com água destilada. As amostras foram então pré-incubadas a 25°C por 2 minutos. Em seguida, foram adicionados 40 μ L de pirogalol 10 mM (em HCl 10 mM). As variações de densidade óptica foram determinadas em 420 nm, em reações cinéticas de 2 minutos, com registros a cada 10 segundos. O Cálculo da atividade da SOD foi feito sabendo-se que uma unidade (U) de SOD inibe 50% da auto-oxidação do pirogalol.

4.3. Análises Estatísticas

Os valores obtidos dos parâmetros: concentração de intermediários metabólicos, atividades enzimáticas e índices hematológicos foram avaliados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As comparações entre as médias obtidas dos parâmetros estudados foram comparadas por um teste paramétrico (teste t de Student) com intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$). As variáveis estão expressas em média \pm DP.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil Hematológico

Os valores relativos de metahemoglobina dos peixes submetidos ao desafio de estresse oxidativo causado por exposição ao nitrito não variaram significativamente estando todos os valores entre 5,51 e 1,41 %.

Apesar de não terem sido estatisticamente comparados, observou-se um decréscimo dos valores de hematócrito nos peixes submetidos à natação sustentada (NS), quando comparados aos animais do grupo sem exercício (SN). A concentração de hemoglobina nos peixes não aclimatados ao nado sustentado aumentou após a exposição ao nitrito (SNNi), observando-se o mesmo padrão de resposta nos aclimatados à natação sustentada. A amplitude de variação de Hb nos peixes mantidos em NS foi de 1,18 enquanto que entre os peixes mantidos na condição SN essa variação foi de 1,20 sendo, portanto praticamente a mesma tanto nos peixes adaptados ao nado sustentado, quanto aos não (**Figura. 5**). A contagem de glóbulos vermelhos (RBC) não se alterou em qualquer condição. Os índices hematimétricos VCM, HVM e CHCM, sendo reflexos das variações observadas nos parâmetros hematológicos, não se alteraram nos peixes de qualquer das condições estudadas. Os valores dos parâmetros hematológicos e índices hematimétricos estão mostrados na **tabela 1**.

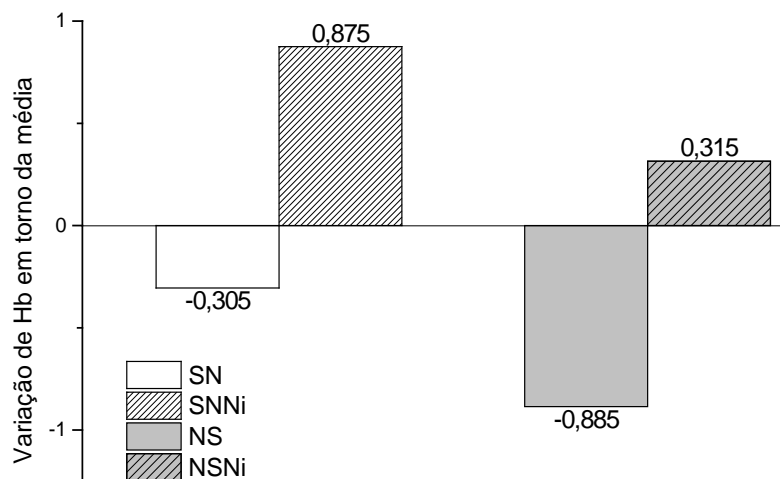


Figura 5. A variação da concentração de Hb em torno da média foi calculada subtraindo-se o valor médio da concentração de Hb em cada condição pela média das concentrações de Hb de todas as condições.

Tabela 1. Perfil hematológico de *Brycon amazonicus* submetidos a atividade de natação e exposição de nitrito.

Perfil Hematológico	Condição			
	SN	SNNi	NS	NSNi
Ht (%)	38±5	36± 2	34±3,4	36±3,4
Hb (g/100 mL)	10,75±1,45 B	12±1,26 A	10,17±1,15 B	11,37±0,58 A
RBC (106/mm ³)	0,58±0,21	0,56±0,1	0,61±0,13	0,53±0,17
VCM (μ ³)	599±96	604±125	669±134	616 ±157
HCM (μg)	186±40	185±47	218±59	201±46
CHCM (%)	31±3	31±3	28±3 B	33±4 A

Juvenis de matrinxá foram submetidos a atividade de natação a velocidade de 1CC seg⁻¹ por período experimental de 90 dias. SN – sem natação sustentada; NS – natação sustentada; SNNi - sem natação sustentada exposto ao nitrito; NSNi - natação sustentada e exposição ao nitrito. Ht – hematócrito; Hb – hemoglobina; RBC – número de eritrócitos; VCM – volume corpuscular médio; HCM – hemoglobina corpuscular média; CHCM – concentração de hemoglobina corpuscular média. As letras mostram diferenças significativas entre as condições para $p < 0,05$. As variáveis estão expressas em média ± DP.

5.2. Perfil metabólico proteico

Com relação ao metabolismo proteico de todos os tecidos não foram observadas diferenças significativas nos teores de proteína entre os animais de ambos as condições, SNNi e NSNi. Os peixes submetidos ao nado sustentado e expostos ao desafio pela exposição ao nitrito apresentaram um aumento no teor de aminoácidos livres hepáticos. Entretanto, os peixes que foram mantidos sem exercício não apresentaram o mesmo efeito, tendo sua concentração de aminoácidos livres inalterada. Os teores de aminoácidos plasmáticos e musculares aumentaram apenas nos peixes submetidos a estresse por nitrito nos peixes não mantidos em nado sustentado. Os teores de amônia foram significativamente maiores no fígado dos peixes desafiados com nitrito e treinados em nado sustentado. Entretanto, no plasma e no músculo branco desses animais não se observou nenhuma alteração desse parâmetro. Os teores de amônia plasmática e muscular dos peixes criados fora do regime de nado sustentado apresentaram aumento quando submetidos ao desafio oxidativo por nitrito. Este conjunto de valores está apresentado na **tabela 2**.

Resultados

Tabela 2. Perfil proteico de *Brycon amazonicus* submetidos à atividade de natação e exposição de nitrito.

Tecido	Condição			
	SN	SNNi	NS	NSNi
Fígado				
Proteína	43±4	38±7	42±10	37±7
Aminoácidos	11±3	10±5	12±2 B	15.7±4 A
Amônia	96±23	123±56	73±35 B	136±36 A
Plasma				
Proteína	29±6	28±5	27±4	31±3
Aminoácidos	0.2±0.1 B	0.3±0.1 A	0.2±0.1	0.3±0.04
Amônia	0.7±0.1 B	1.5±0.5 A	1±0.1	1±0.3
Músculo				
Proteína	37±13	38±13	30±5	36±5
Aminoácidos	6.4±1 B	10.7±3.2 A	7.4±1.6	6.5±1
Amônia	26±2.5 B	30.6±3.4 A	27.5±1	28±3

Juvenis de matrinxã foram submetidos à atividade de natação a velocidade de 1CC seg-1 por período experimental de 90 dias. SN – sem natação sustentada; NS – natação sustentada; SNNi - sem natação sustentada exposto ao nitrito; NSNi - natação sustentada e exposição ao nitrito. Os valores apresentados nos tecidos estão expressos em: Proteína (mg g^{-1}); Aminoácidos ($\mu\text{mol g}^{-1}$); Amônia ($\mu\text{mol g}^{-1}$) para os tecidos (Fígado e Músculo), e Proteína (mg ml^{-1}); Aminoácidos (nmol ml^{-1}); Amônia (nmol ml^{-1}) para o plasma. Os valores estão apresentados como média \pm DP. As letras mostram diferenças significativas entre as condições para $p < 0,05$. As variáveis estão expressas em média \pm DP.

5.3. Perfil metabólico glicídico

No fígado de matrinxã submetido ou não ao nado sustentado e desafiado pela exposição ao nitrito, não foram observadas alterações significativas nos teores de glicogênio, piruvato e lactato. Os teores de glicose plasmática aumentaram nos peixes expostos ao nitrito, tanto nos animais previamente submetidos ao nado sustentado, quanto naqueles mantidos na condição sem exercício. Porém, em peixes mantidos em regime sedentário as

concentrações de glicose foram maiores que naqueles mantidos em regime de nado sustentado (**Figura. 6**). As concentrações de lactato plasmático não se alteraram em qualquer das condições. O músculo branco de matrinxãs não submetidos previamente à condição de nado sustentado mostrou redução nos teores de glicogênio quando os peixes foram expostos ao nitrito. Entretanto, nos peixes adaptados ao nado sustentado esses teores apresentaram aumento (**Figura. 7**). As concentrações de lactato e piruvato não se alteram nos tecidos hepático e muscular em qualquer das condições. Estes dados estão mostrados na **Tabela 3**.

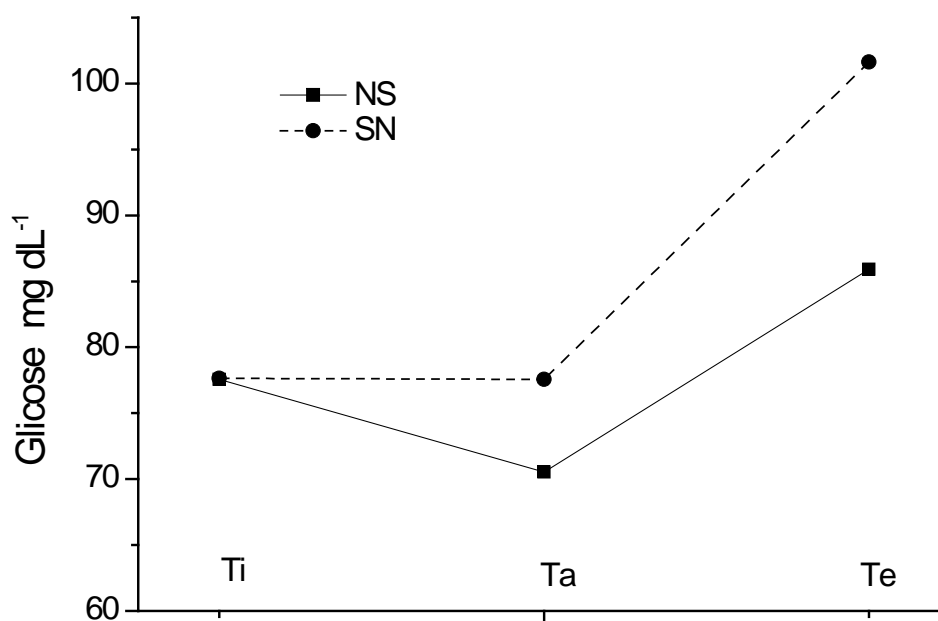


Figura 6. Teor de glicose plasmática de matrinxã mantido nado sustentado (NS) inicial (Ti), após 90 dias de aclimação (Ta) *versus* animais não aclimatados (SN) mantidos em água sem movimento forçado. Ambas as condições acima após submeter os animais ao desafio de exposição a 1ppm de nitrito por 24h (Te).

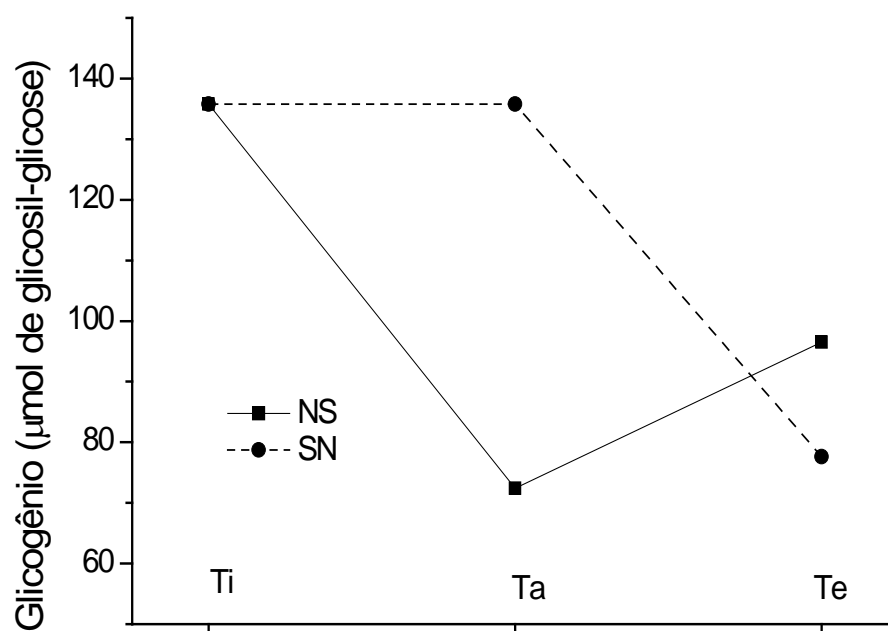


Figura 7. Teor de glicogênio muscular de matrinxã mantido nado sustentado (NS) inicial (Ti), após 90 dias de aclimação (Ta) *versus* animais não aclimatados (SN) mantidos em água sem movimento forçado. Ambas as condições acima após submeter os animais ao desafio de exposição a 1ppm de nitrito por 24h (Te).

Tabela 3. Perfil glicídico de *Brycon amazonicus* submetidos à atividade de natação e exposição de nitrito.

Tecido Parâmetro	Condição			
	SN	SNNi	NS	NSNi
Fígado				
Glicogênio	104±17	52±44	100±76	87±19
Piruvato	0.9±0.1	1.1±0.3	1±0.4	1.2±0.1
Lactato	5.1±1	4.6±1	4.7±1	4±1
Plasma				
Glicose	77±15 B	101±18 A	70±16 B	86±22 A
Lactato	0.3±0.2	0.3±0.1	0.2±0.1	0.3±0.1
Músculo				
Glicogênio	136±47 A	77±43 B	72±31 B	96±47 A
Piruvato	0.5±0.1	0.6±0.2	0.6±0.2	0.4±0.05
Lactato	48±11	49±4	47±7	34±2

Juvenis de matrinxá foram submetidos a atividade de natação sustentada a uma velocidade de 1CC seg^{-1} por período experimental de 90 dias e expostos à concentração de 1ppm de nitrito por 24hs. SN – sem natação sustentada; NS – natação sustentada; SNNi - sem natação sustentada exposto ao nitrito; NSNi - atividade de natação e exposição ao nitrito. Os valores estão expressos em: glicogênio (μmol de glicosil-glicose g proteína $^{-1}$); piruvato (nmol g^{-1}); lactato (μmol g^{-1}) nos tecidos (hepático e muscular), e glicose (mg dL^{-1}); lactato (nmol mL^{-1}) no plasma. Os valores estão apresentados como média \pm DP. As letras mostram diferenças significativas entre as condições para $p < 0,05$. As variáveis estão expressas em média \pm DP.

5.4. *Metabolismo Antioxidante*

As atividades das enzimas GPx e CAT hepática e muscular não sofreram alteração em nenhuma das duas condições experimentais. A atividade de SOD hepática foi determinada em fígado, não se registrando alterações significativas em quaisquer das condições; em músculo foram registrados apenas traços dessa atividade enzimática. Entretanto, os valores de lipoperóxido hepático aumentaram significativamente nos peixes não adaptados ao nado sustentado e expostos ao estresse oxidativo por exposição ao nitrito. No tecido muscular houve aumento significativo nos teores de lipoperóxido dos peixes expostos ao desafio por nitrito tanto naqueles não adaptados ao nado sustentado quanto nos adaptados. Esses dados estão todos representados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Atividade das enzimas do metabolismo Oxidante de *Brycon amazonicus* submetidos a atividade de natação e exposição de nitrito.

Tecido Parâmetro	Condição			
	SN	SNNi	NS	NSNi
Fígado				
GPx	192± 82	243± 125	225 ± 69	287 ± 194
CAT	223 ± 158	340 ± 166	286 ± 125	238 ± 108
SOD	4 ± 3	7 ± 3	6 ± 3	8 ± 4
FOX	1 ± 0,5 B	1.6 ± 0,5 A	1,7 ± 0,4	1,8 ± 0,4
Músculo				
GPx	0,03 ± 0,01	0.02 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
CAT	0,7 ± 0,4	0.5 ± 0,5	0,32 ± 0,3	0,6 ± 0,2
FOX	7 ± 0,8 B	14 ± 12 A	8,1 ± 1,2 B	9,9 ± 1,4 A

Juvenis de matrinxá foram submetidos a atividade de natação sustentada a uma velocidade de 1CC seg⁻¹ por período experimental de 90 dias e expostos à concentração de 1ppm de nitrito por 24hs. SN – sem natação sustentada; NS – natação sustentada; Ni - sem natação sustentada exposto ao nitrito; NSNi - natação sustentada e exposição ao nitrito. GPx – Glutathione Peroxidase (μmol/min/mg.prot); CAT – Catalase (μmol/min/mg.prot); FOX – Lipoperóxido (nmol CHP/ mg.prot) . As letras mostram diferenças significativas entre as condições para p<0,05. As variáveis estão expressas em média ± DP.

6. DISCUSSÃO

6.1. Perfil hematológico

Apesar de neste estudo não termos comparado todos os grupos entre si, mas apenas os grupos de peixes desafiados com seus respectivos controles, pode-se observar diferença marcante nos valores de hematócrito entre os animais dos grupos controle, valores menores de Ht em peixes adaptados ao nado sustentado são perfeitamente compreensíveis. O Ht de quaisquer dos animais em estudo deve ser maior do que aquele que se observaria na situação teórica de coleta de sangue, sem qualquer distúrbio estressante. Todavia, na situação experimental esse estresse existe e aparece como um valor de fundo praticamente impossível de ser eliminado ou mesmo descontado. A otimização se dá no momento, em que o estresse da coleta de sangue é minimizado ao máximo e se pretende que tenha o mesmo nível de intensidade para todos os animais. Isso é o que se espera no presente caso. Assumindo-se que os dois grupos de peixes apresentam valores de Ht de animais sem perturbações ambientais, exceção àquela imposta pela coleta, é possível afirmar que aqueles adaptados à natação sustentada suportam o estresse de coleta melhor que aqueles mantidos sem atividade ou sem nado sustentado, uma vez que seus valores Ht foram menores. Como é sabido, o estresse ativa o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, promovendo a liberação de catecolaminas, as quais disparam a um aumento de hematócrito (MAZEAUD, 1977). Esse aumento pode ser considerado resultado do aumento da contração esplênica realizada pelo baço, a qual é considerada um efeito secundário de

estresse (BARTON & IWAMA, 1991). A concordar com o fato de que a atividade de natação sustentada diminui os níveis de estresse dos animais, Huntingford (2010), apresenta que peixes submetidos a esta condição de nado apresentam valores menores de cortisol. Desta forma, é possível admitir que a atividade de natação contribua para atenuar o nível de estresse em *B. amazonicus* causado pela manipulação. Apesar disto, os efeitos causados pelo desafio a um estresse oxidativo gerado pela exposição ao nitrito parecem não terem sido atenuados em animais aclimatados ao nado sustentado, visto que não se observou alterações significativas de Ht entre os animais desafiados e seus respectivos controles. Foi observado o mesmo tipo de resposta dos peixes não aclimatados ao nado sustentado. Efeitos semelhantes aconteceram em dois estudos com pacu submetidos à natação sustentada a um BL/s (HACKBARTH et al., 2006; NUNES et al., 2013), a mesma velocidade empregada neste trabalho. Também foi observado uma mesma resposta em animais da mesma espécie sob condição de nado sustentado a mesma velocidade, porém com intermitência de 12 e 12 horas (FABRIZZI et al., 2013).

Apesar dos aumentos significativos observados nas concentrações de Hb dos animais expostos ao estresse oxidante, causado por nitrito, suas amplitudes foram praticamente iguais (1,19). Assim, mesmo com variação significativa neste parâmetro sanguíneo é possível concluir que não houve diferenças entre as respostas hematológicas de ambas as condições experimentais. Essa conclusão é corroborada pela estabilidade do número de células vermelhas em ambas as condições. Em consequência, os outros três índices derivados dos parâmetros sanguíneos (VCM, HCM, CHCM) permaneceram inalterados. Mesmo assim, pode-se afirmar que *B. amazonicus* submetido à exposição aguda ao nitrito aumenta a síntese da hemoglobina

quer adaptado ou não ao nado sustentado. Essa resposta seriam esperada, uma vez que o nitrito ambiental em excesso pode se ligar à hemoglobina das hemácias, resultando na oxidação do ferro de seu grupo heme do estado de Fe^{2+} a Fe^{3+} e levando a formação de metahemoglobina. Esse efeito acarretaria em um prejuízo no transporte de oxigênio (SCARANO; SAROGLIA 1984; KROUPOVA et al., 2008; AVILEZ et al., 2013).

No presente estudo, não se observou mudanças dos níveis de metahemoglobina. Esse resultado não significa que não tenha havido aumento na formação dessa molécula, mas mostra que *B. amazonicus* deve apresentar mecanismos eficazes no restabelecimento da hemoglobina oxidada. Não foi ensaiada a atividade de metahemoglobina redutase, entretanto. Esta atividade deve ter aumentado, justificando a constância nos níveis de metahemoglobina, como já descrito por outros autores (AVILEZ et al., 2004; YILDIZ et al., 2007). Portanto, a manutenção do transporte regular de oxigênio nos peixes expostos ao nitrito demandou o aumento da síntese de hemoglobina. Os peixes expostos ao nitrito e adaptados à natação sustentada não apresentaram concentrações de hemoglobina menores que as observadas em peixes não adaptados ao exercício, como era de se esperar. Esse resultado sugere que a atividade natatória sustentada, que se esperaria levar a um aumento da capacidade de transporte de oxigênio por outros mecanismos fisiológicos não ligados unicamente à concentração de Hb, tais como aumento da irrigação sanguínea, não deve ter ocorrido de maneira significativa. Esta conclusão pode ser melhor observada quando comparamos a variação de Hb entre os peixes expostos ao nitrito e seus controles, nas duas condições experimentais. Nessa comparação, as amplitudes de ambas as variações nas concentrações de hemoglobina são praticamente iguais ($1,09 \pm 0,10$), o que sugere ser a necessidade de

hemoglobina para enfrentar o estresse oxidativo praticamente a mesma em ambas as condições. Entretanto, cabe ressaltar que, embora não tenhamos por fim a comparação entre os peixes das condições SN e NS, o valor de Ht dos animais adaptados ao nado sustentado foi menor que o dos não adaptados. Considerando-se que o número de células vermelhas não sofreu alteração pela condição de nado sustentado, observou-se uma redução no tamanho das células (microcitose). Efeitos similares já foram relatados para a mesma espécie, adaptada por 72 dias ao nado sustentado (Hackbarth, 2006). Essa microcitose é acompanhada da variação natural dos índices hematimétricos correspondentes, e em consequência temos células sanguíneas com concentrações de Hb pouco mais elevadas nos peixes adaptados ao nado sustentado. Esse quadro fisiológico, ainda que mantida constante a concentração de Hb, deve facilitar a mobilização vascular das hemácias através da microvascularização e incrementar a distribuição de oxigênio aos tecidos. Fato clássico de resposta a adaptação da atividade de natação sustentada, uma vez que os animais sob essa condição passam a utilizar mais energia para a contração muscular, aumentando predominantemente o metabolismo aeróbico para suprir essa necessidade, dessa forma a mobilização e o transporte de oxigênio passa ser otimizado (FABRIZZI et al., 2013; HACKBARTH; MORAES, 2006; MORAES et al., 2009; ARBELÁEZ-ROJAS; MORAES, 2010). Entretanto, essa adaptação não parece ter sido suficiente para suprir a demanda causada pelo estresse oxidativo.

6.2. Alterações metabólicas

Aumentos de glicose, lactato e amônia de plasma são considerados respostas de estresse, consequência à liberação de catecolaminas e cortisol (PICKERING; POTTINGER, 1995; MILLIGAN, 2003; BARTON; IWAMA, 1991; TAVARES-DIAS et. al, 2001). As concentrações inalteradas de lactato plasmático em matrinxãs submetidos ao estresse por nitrito poderiam sugerir níveis insignificantes de estresse. Uma vez que já é sabido que esse tipo de substância quando em estresse promove aumento de lactato em matrinxãs (AVILEZ et al., 2013). No entanto, glicose e amônia aumentaram significativamente indicando que a alteração ambiental imposta foi suficiente para causar estresse. O lactato não está ligado somente à liberação de cortisol na corrente sanguínea como resposta ao estresse, mas, também a características particulares da espécie e ou a alterações metabólicas resultantes da deficiência tissular de oxigênio. Além disso, algumas espécies são sabidamente liberadoras de altos níveis de lactato, enquanto outras, mesmo após estresse prolongado ou intenso, não aumentam significativamente sua lactemia. Os valores inalterados de lactato no plasma podem, portanto indicar que o matrinxã não sofreu anaerobiose significativa em consequência da exposição ao nitrito e ou que se trata de uma espécie pouco produtora de lactato. Os valores constantes de metemoglobina observados após a exposição ao nitrito sugerem que o estresse oxidativo não foi suficientemente alto para elevar os níveis de lactato, como descrito também em truta (ARILLO et al., 1984). Os valores constantes da metemoglobina devem estar relacionados com a eficácia de metahemoglobina redutase na espécie, característica anteriormente sugerida por Avilez (2004), e que deve ser intrínseca à espécie e não diretamente relacionada à adaptação desenvolvida pela natação sustentada. Outro fator que devemos admitir é o possível aumento de ciclo de

cori, que permite a otimização do uso do lactato como fonte neoglicogênica (JØRGENSEN; MUSTAFA 1980; HOCHACHKA; SOMERO 1984, 2002; YU; WOO, 1987; WOO; CHIU 1997; MORAES et al., 1998, 2002), esse fato foi observado em um estudo com a mesma espécie porém sobre a condição de natação sustentada com intermitência de 12 horas de nado por 12 horas de repouso, por um período de 30 dias (FABRIZZI et al., 2013).

A observação dos perfis metabólicos de matrinxã expostos ao nitrito mostra algumas diferenças significativas entre os peixes adaptados ao nado sustentado e os não adaptados. A glicemia dos animais de ambas as condições apresentou-se aumentada pelo estresse ao nitrito, entretanto os peixes aclimatados têm um nível glicêmico mais baixo e conseqüentemente uma elevação glicêmica menor. Esta redução natural da glicemia basal oriunda do exercício nos parece positiva tendo em vista os benefícios metabólicos naturais ligados a esses valores reduzidos, tais como as alterações que implicam na síntese de compostos como glicogênio e Lipídeos e todas as suas conseqüências. Além disso, observa-se uma redução da ordem de 20% na hiperglicemia proveniente do estresse causado pela exposição ao nitrito, observado também em outro estudo com a mesma espécie sob exposição ao excesso de nitrito (AVILEZ et al., 2013). Essa redução marcante da glicemia frente ao agente estressante é sugestiva de que os animais adaptados ao nado sustentado suportam as adversidades do estresse com menor gasto de energia. Além disso, considerando-se que os teores elevados de glicose sanguínea, neste caso em particular, são uma resposta secundária aos níveis de catecolaminas e cortisol (principais agentes em resposta ao estresse), pode-se supor que o efeito estressante do nitrito foi menor em peixes adaptados ao nado sustentado. Um aspecto que corrobora esta suposição é que a glicemia

observada nas duas condições parece ter consequências e ou razões distintas. Enquanto a glicemia aumentada nos peixes não exercitados vem acompanhada de uma glicogenólise muscular, a hiperglicemia em peixes adaptados ao nado sustentado acompanha uma síntese de glicogênio. Esses dois quadros devem ter razões fisiológicas distintas. Em peixes não aclimatados ao nado sustentado, a demanda energética do músculo seria maior que aquela observada em peixes aclimatados ao nado sustentado. A hiperglicemia nos peixes aclimatados ao nado sustentado seria uma resposta secundária do estresse oxidativo. Entretanto, a hiperglicemia nos peixes não adaptados ao nado sustentado seria, além disso, para manutenção energética aumentada pelo estresse causado pelo nitrito. O aumento de catecolaminas causado pelo estresse elevaria a neoglicogênese com consequente aumento de glicogênio; quadro esse observado em animais adaptados ao exercício. Entretanto, o efeito deste suposto aumento de catecolaminas em animais não exercitados não foi suficiente para sobrepor ao desgaste energético causados pelo nitrito em animais não exercitados, levando a uma redução do glicogênio muscular. Efeito apresentado também em outras espécies submetidas a exposição ao nitrito (bass Lates calcarifer (WOO; CHIU, 1997) e traíra *Hoplias malabaricus* (MORAES; CATTONY; SOUZA 1998)).

Apesar do aumento no metabolismo glicídico em consequência da demanda energética causada pela exposição ao nitrito, não se observou aumento nos teores de lactato plasmático ou muscular. Isso é sugestivo, tal como já discutido anteriormente que, apesar de gerador de estresse, o teor de nitrito ambiental não foi suficiente para gerar uma condição de hipóxia intracelular. Estes níveis de hipóxia gerados pela exposição ao nitrito teriam gerado níveis elevados de metahemoglobina, o que não se observou. As

defesas celulares que preveniram essa condição metabólica (atividade de metahemoglobina redutase) certamente contribuíram para manter a demanda energética por meio de processos catabólicos aeróbicos.

O aumento de amônia plasmática observada em peixes não aclimatados ao exercício e expostos ao nitrito é um indicativo seguro de estresse. Esse é um índice clássico e esta é uma resposta observada em um grande número de situações estressantes. Neste caso em particular, o aumento de amônia não foi apenas observado no plasma, mas no tecido muscular. Este dado faz supor que a hiperamonemia observada foi, muito provavelmente, devido a um aumento da degradação muscular de aminoácidos. Mesmo assim, não se pode descartar a origem, ainda que parcial, da amônia gerada no fígado em função de provável gliconeogênese hepática, como discutido acima. Esse aumento da degradação de aminoácidos teria um papel metabólico inquestionável, principalmente tendo-se em consideração o aumento da demanda energética já discutida anteriormente. Neste caso, vê-se que o atendimento da demanda energética não se deu apenas pelo aumento do catabolismo de carboidratos, mas também de aminoácidos, condição metabólica bem conhecida e apresentada por outros autores (PICKERING, 1981; VIJAYAN et al., 1991; WENDELAAR BONGA, 1997; CASTRO; FERNANDES, 2009).

O aumento de aminoácidos observado em paralelo aos níveis de amônia no tecido hepático deve-se provavelmente ao seu catabolismo aumentado. O aumento do catabolismo de carboidratos em matrinxã causado pelo estresse de exposição ao nitrito não foi suficiente para atender às necessidades metabólicas sendo, portanto necessária a degradação de aminoácidos. Fica dúvida a utilização de proteínas neste momento fisiológico, visto que os níveis de proteínas permaneceram inalterados. É plausível que a demanda pelo

catabolismo nitrogenado seja mais por conta do pool de aminoácidos musculares do que pela degradação de suas proteínas, visto que seus níveis permanecerem constantes. A redução dos níveis de proteína hepática justifica a suposição de que o fígado tenha utilizado aminoácidos em um processo de neoglicogenese na formação de glicose para os tecidos periféricos. Apesar de não significativo, a tendência de aumento na concentração de amônia hepática reforça essa proposição.

O quadro de catabolismo nitrogenado observado nos peixes não aclimatados ao nado sustentado e expostos ao estresse por nitrito não foi observado em peixes mantidos em nado sustentado. Ainda assim, observou-se um aumento nos teores de aminoácidos livres sugerindo um aumento no catabolismo nitrogenado a partir de aminoácidos. Dada a menor redução de proteínas hepáticas nos peixes mantidos em nado sustentado do que em peixes sedentários, é mais provável que apenas os aminoácidos do pool hepático tenham contribuído para esse perfil. Isso é provavelmente consequência de menor demanda metabólica nesses peixes. A degradação dos aminoácidos do pool hepático deve-se ao processo aumentado de gliconeogênese. Esse quadro ocorreu ou para manter a demanda de glicose pelos tecidos periféricos ou mais provavelmente como consequência natural de níveis mais elevados de catecolaminas e cortisol oriundo do estresse, tal como discutido acima. Desta forma, fica claro por meio das respostas metabólicas que os níveis de estresse por nitrito são menores ou menos efetivos em peixes criados em nado sustentado que em peixes mantidos em sistemas sem fluxo de água. Esses resultados fortalecem a ideia já proposta por outros autores de que, a atividade de natação sustentada desenvolve um ajuste metabólico benéfico à saúde e ao bem estar dos peixes (FABRIZZI et al, 2013; ARBELÁEZ

et al., 2011; ARBELÁEZ-ROJAS; MORAES, 2009; HACKBARTH; MORAES, 2006; NUNES et al., 2013). Os perfis metabólicos dos peixes submetidos ao estresse de exposição ao nitrito e mantidos em regime sedentário ou de nado sustentado estão representados nas **figuras 8 e 9** respectivamente.

Animais não adaptados à natação sustentada expostos ao nitrito

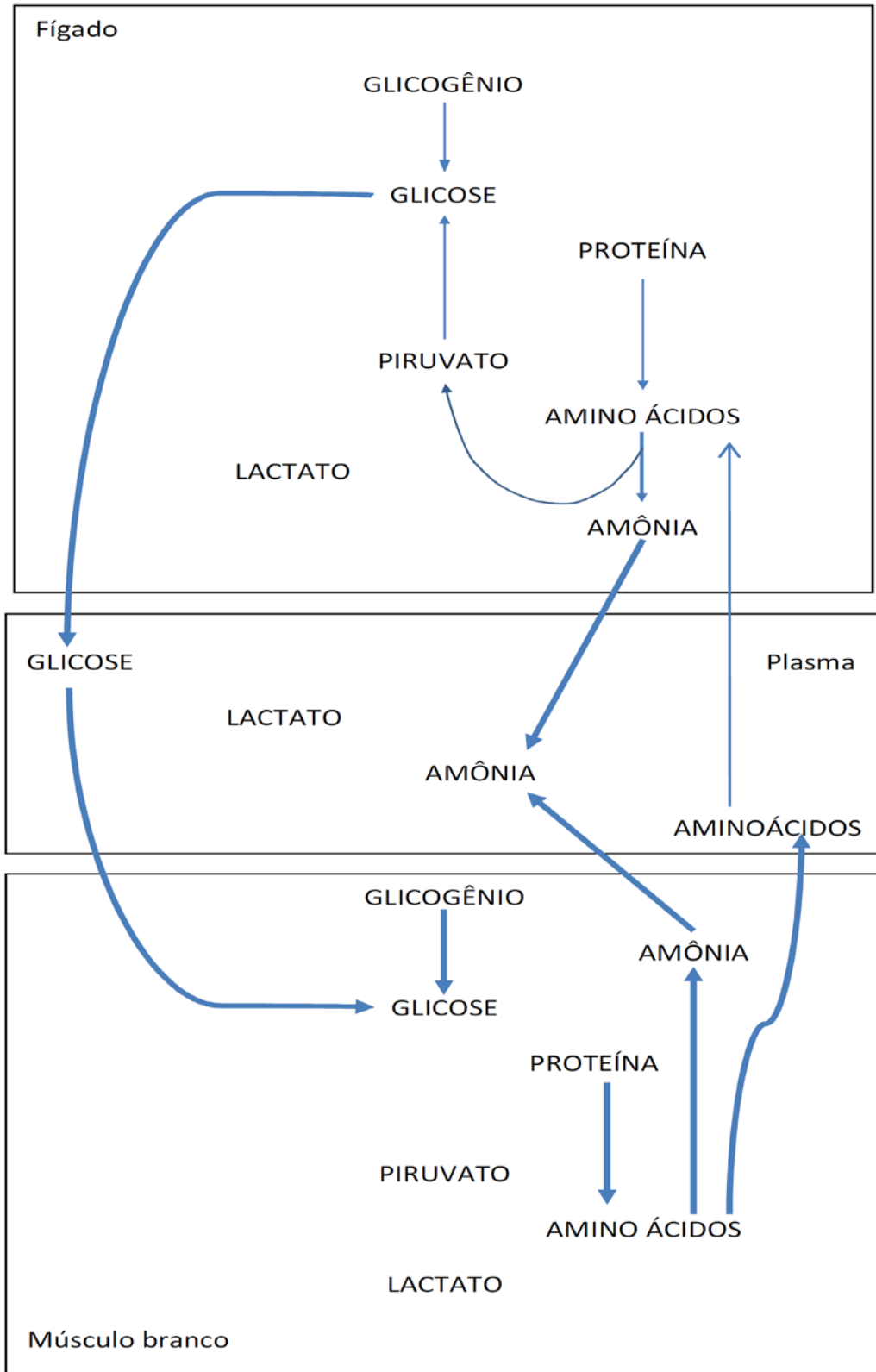


Figura 8. Mapa metabólico de matrinxã criado em regime sedentário e exposto ao estresse por 1 ppm de nitrito ambiental.

Animais adaptados à natação sustentada expostos ao nitrito

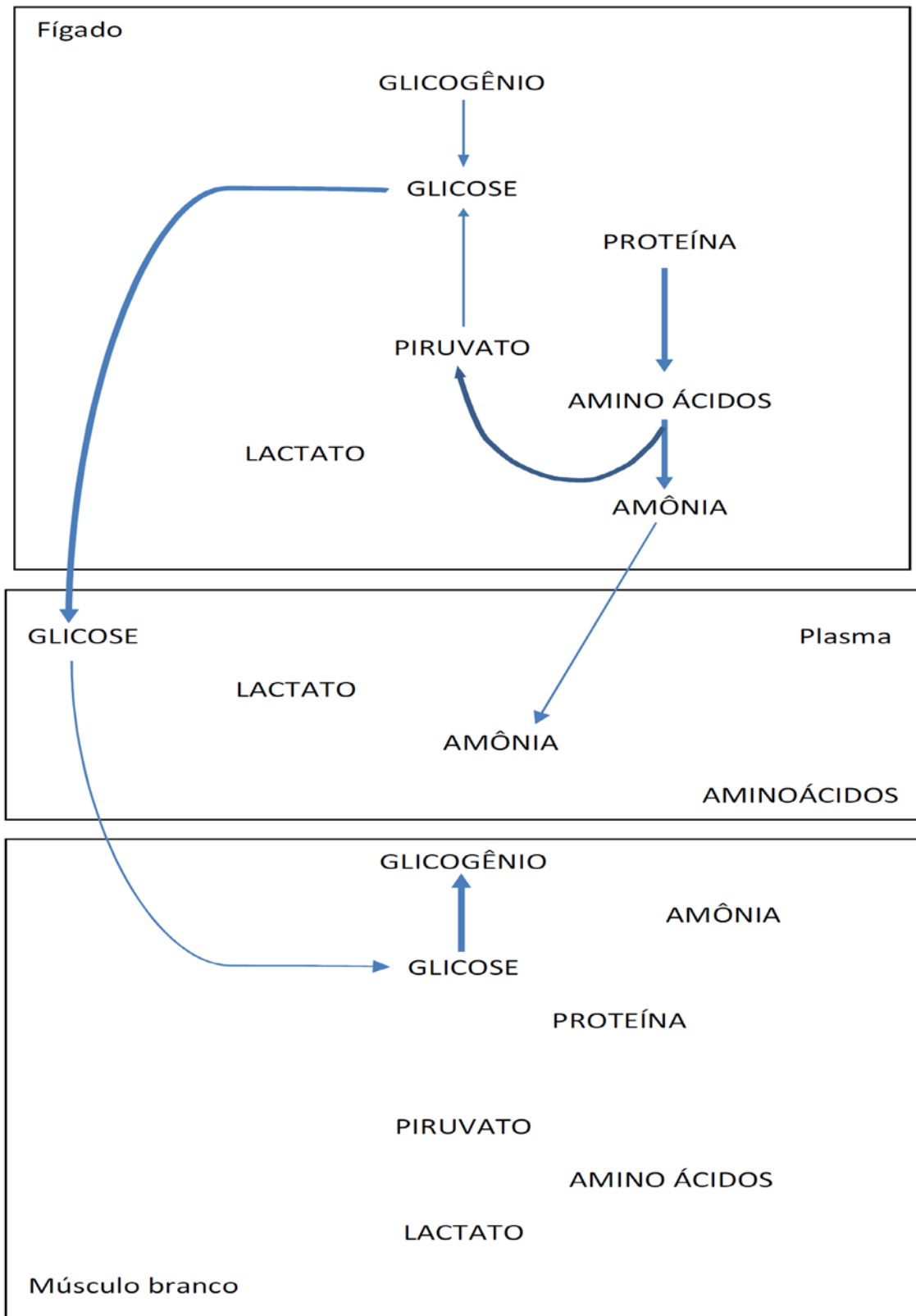


Figura 9. Mapa metabólico de matrinxã criado em regime de nado sustentado e exposto ao estresse por 1 ppm de nitrito ambiental.

6.3 Metabolismo Antioxidante

Os dados hematológicos e, mesmo os de metabolismo intermediário, são muito sugestivos de que a exposição ao nitrito foi bem compensada pelos matrinxãs expostos, tanto aqueles mantidos em condições sedentárias quanto aqueles em nado sustentado, reduzindo significativamente o estresse oxidativo. Desta forma, não foram observadas diferenças significativas nas atividades de CAT e GPx tanto em músculo quanto em fígado de ambas as condições experimentais. Mesmo assim, observou-se aumento nos níveis de peroxidação lipídica, evidenciados pelo teste de FOX, tanto nos peixes submetidos ao nado sustentado, quanto nos sedentários expostos ao nitrito. Apesar de ocorrer peroxidação lipídica em ambas as condições experimentais pôde-se observar que nos peixes mantidos em nado sustentado as variações nos valores de FOX muscular foram menores que nos animais sedentários. Além disso, a peroxidação no tecido hepático foi observada apenas nos peixes sedentários, sendo insignificante a variação nos peixes mantidos em nado sustentado. Mais uma vez, as alterações fisiológicas induzidas pela atividade de nado sustentado foram benéficas ao matrinxã, reduzindo a peroxidação lipídica em tecido hepático, ainda que essa não tenha atingido magnitude suficiente para induzir a atividade das enzimas do estresse oxidante. É bem sabido que o exercício físico causa adaptações antioxidantes benéficas em mamíferos (PERRY et al., 2005; RADAK et al., 2005; MATTSON; MAGNUS, 2006; MATTSON; WAN, 2005; YU; CHUNG, 2006), entretanto não foi encontrado nenhum estudo que relaciona a atividade de natação sustentada em peixes, estando eles expostos ou não ao nitrito.

7. CONCLUSÕES

Matrinxãs adaptados à natação sustentada são mais aptos para enfrentar o estresse oxidante, causado pelo nitrito ambiental. A atividade de natação sustentada promove alteração das respostas hematológicas capazes de melhorar os processos metabólicos oxidativos. A natação sustentada altera a capacidade de mobilizar os carboidratos para fins energéticos, facilitando os processos de desintoxicação dependentes de energia e minimizando a mobilização de aminoácidos para este fim. A natação sustentada promove inibição da peroxidação lipídica hepática causada pela exposição ao nitrito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDOLLAHI, M. et al. Pesticides and oxidative stress: a review. **Medical Science Monitor**, v.10, n.6, p.141-147, 2004.

ALMEIDA, L. C. et al. Crescimento e respostas metabólicas do tambaqui (*Colossoma macropomum*) alimentados com diferentes níveis de proteína e lipídio. **Aquaculture Nutrition**. 17; e253–e262, 2011.

ALMEIDA, L. C., LUNDSTEDT, L. M., MORAES, G. Digestive enzyme responses of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed on different levels of protein and lipids. **Aquaculture Nutrition** 12, 443-450, 2006.

ANSARI, R. A., et al. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish. *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p.150-156, 2011.

ARBELAEZ ROJAS, G. A., INOUE L. A. K. A. & MORAES, G. Atividade proteolítica e crescimento de matrinxã em natação sustentada e alimentado com dois níveis de proteína. **Pesquisa Agropecuária Brasileira. Brasília**. 46: 1521-1529, 2011.

ARBELÁEZ-ROJAS, G. A. Efeitos da natação sustentada no crescimento, na densidade de estocagem e na composição corporal em juvenis de *Brycon amazonicus*. Aspectos adaptativos e respostas metabólicas. Tese (Doutorado,

Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais) Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

ARBELÁEZ-ROJAS, G. A. & MORAES G. Optimization of sustaining swimming speed of 'matrinxã' *Brycon amazonicus*: performance and adaptive aspects. **Scientia Agricola**, 67: 253-258, 2010.

ARBELÁEZ-ROJAS, G. A. & MORAES, G. Interação do exercício de natação sustentada e da densidade de estocagem no desempenho e na composição corporal de juvenis de matrinxã (*Brycon amazonicus*). **Ciência Rural**, 39: 201-208, 2009.

ARILLO A., GAINO E., MARGIOCCO C., MENSI P. & SCHENOME G. Biochemical and ultra-structural effects of nitrite in rainbow trout: liver hypoxia as of the acute toxicity mechanism. **Environmental Research**, 34, 135–154, 1984.

AVILEZ I. M., AGUIAR L. H., HORI T. S. & MORAES G. Metabolic responses of matrinxã , *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), exposed to environmental nitrite. **Aquaculture Research**, 44, 596–603, 2013.

AVILEZ I. M., ALTRAN A. E. & MORAES G. Hematological responses of the teleost matrinxã, *Brycon cephalus* to environmental nitrite. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 139C, 135–139, 2004.

AZUMA, T. et al. Profiles in growth, smoltification, immune function and swimming performance of 1-year-old masu salmon *Onchorhynchus masou masou* reared in water flow. **Fisheries Science**, 68, 1282-1294, 2002.

BABIOR BM. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol**, 16: 42–47, 2004.

BARTON, B. A., IWAMA, G. K. Physiological Changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response effects of corticosteroids. **Ann.Rev.Fish Dis.**, 1:3-26, 1991.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID J. M.; DAVID J. P. ESTRESSE OXIDATIVO: RELAÇÃO ENTRE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E DEFESA DO ORGANISMO. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BATH R.N. & EDDY F.B. Transport of nitrite across fish gills. *Journal of Experimental Zoology* 214, 119–121, 1980.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L; STRYER, L. Bioquímica. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

BERGER, P. et al. **Water Res**, 33, 433, 1999.

BEUTLER, E. Red Cell Metabolism: manual of Biochemical Methods. 3. Ed., Grune & Stratton, INC, 187p, 1984.

BIANCHINI, A, WASIELESKY JR, W., MIRANDA FILHO, K. C., Toxicity of compounds to juveniles of Flatfish *Paralichthys orbignyanus*. **Buli. Environ**, 1995.

BIDINOTTO, P. M., SOUSA R. H. S. & MORAES G. Hepatic glycogen in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinants of microsamples. **Boletim Técnico do CEPTA - Pirassununga**, 10: 53-60, 1998.

BOYD, C.E. Water quality management for pond fish culture. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 9. Amsterdam: Elsevier **Science Publishers B**. 317p, 1982.

BRADFORD, M . M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.

Brunning-Fann CS & Kaneene JB The effects of nitrate, nitrite, and N-nitroso compounds on animal health. **Vet. Hum. Toxicol**, 35(3): 237–253, 1993a.

BUETTNER GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, a-tocopherol, and ascorbate. **Arch Biochem Biophys**, 300:535-543, 1993.

CAMERON J.N. Methemoglobin in erythrocytes of rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 40A, 743–749, 1971.

CASTRO, F. J.; FERNANDES, M. N. Efeitos da infestação por parasitosargulídeos na fisiologia e mecanismos de defesa inata em peixescultivados. In: TAVARES-DIAS, M. (Org). **Manejo e sanidade de peixes emcultivo. Macapá: Embrapa**, p. 361-388, 2009.

CHEVION S, et al. Plasma antioxidant status and cell injury after severe physical exercise. **Proc Natl Acad Sci USA**, 100(9): 5119-5123, 2003.

Conselho nacional do meio ambiente-conama, resolução no 357, de 17 de março de 2005. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.

Contam. Toxicol. 56: 453-459.

COPLEY, N.G. Alloxan and ninhydrin test. **Analyst**. 66, 492-493, 1941.

CROW, M. T., AND M. J. KUSHMERICK. Chemical energetics of slow and fast twitch muscles of the mouse. **J. Gen. Physiol.** 79: 147-166, 1982.

DAVIES, K. J.; QUINTANILHA, A. T.; BROOKS, G. A.; PACKER, L. Free radicals and tissue damage produced by exercise. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 107:1198–1205; 1982.

DAVISON, W. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. **Comparative Biochemistry and Physiology A**, 117: 67-75, 1997.

Di Giulio, R.T.; Meyer, J.N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: Di Giulio, R.T.; Hinton, D.E. (Ed.). **The toxicology of fishes. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group**, 2008. p. 273-326.

DOBLANDER C. & LACKNER R. Metabolism and detoxification of nitrite by trout hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta** 1289, 270–274, 1996.

DRABKIN, D. The standardization of hemoglobin measurement. **The American Journal of the Medical Sciences**, 215(C): 110- 111, 1948.

DUARTE J, et al. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. **Int J Sports Med**. 14(8): 440-443, 1993.

ELIA, M. Energy expenditure in the whole body. In: Kinney, J. M., Tucker, H. N., eds. Energy metabolism. **New York: Raven Press**:19–59; 1991.

ENSIBI, C., et al. D. Effects of deltamethrin on biometric parameters and liver biomarkers in common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.36, n. 2, p. 384-391, 2013.

FABRIZZI, F., et al. Intermittent sustained swimming in ‘matrinxã’ *Brycon amazonicus* (Bryconidae: Bryconinae): hematological and metabolic responses. **Neotropical Ichthyology**, v.11, p.425-432, 2013.

GERBER, J.M. Nutrition and migraine: Review and recommended strategies **JNMS-J. Neuromusc. Sys**, 5(3): 87–94, 1997.

GENTZKOW, C.J., MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Chem**, 143, 531-544, 1942.

GOLDFARB, A.H. Nutritional antioxidants as therapeutic and preventive modalities in exercise-induced muscle damage. **Can. J. Appl. Physiol**, 24(3):249–266. 1999.

GOMEZ-CABRERA M, et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. **J Physiol**, 567(Pt 1): 113-120, 2005.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v.41/42, p.1819-1828, 1995.

HACKBARTH, A. & MORAES, G. Biochemical responses of 'matrinxã', *Brycon cephalus* (Günther, 1869) after sustained swimming. **Aquaculture Research**, 37: 1070-1078, 2006.

HALLIWELL B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, Vol. 141, pp. 312–322, 2006.

HARROWER, J. R. & C. H. B. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. **Journal of Applied Physiology**, 32(C): 224-228, 1972.

HOCHACHKA P.W. & SOMERO G.N. **Biochemical Adaptation**, pp. 537. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, USA, 1984.

HOCHACHKA, P.W. Fuels and pathways systems for support os muscle work. **J. Exp. Biol.** 115:149-164, 1985.

HOCHACHKA P.W. & SOMERO G.N. **Biochemical Adaptation: Mechanisms and Processes in Physiology Evolution**, pp. 466. Oxford Univ. Press, New York, NY, USA, 2002.

HUNTINGFORD, F.A. Exercise and welfare. In: **Proceedings of the FitFish workshop on the swimming physiology of fish, Barcelona, 2-3 2010 July**, p 29, 2010.

INOUE, L. A. K. A., SANTOS, N., C. & G. MORAES. Clove oil as anaesthetic for juveniles of 'matrinxã' *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). **Ciência Rural**, 33: 943-947, 2003.

JENSEN F.B. Nitrite disrupts multiple physiological functions in aquatic animals. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**, 135, 9–24, 2003.

JEZEK, P.; HLAVATÁ, L. Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.37, p.2478-2503, 2005.

JI, L. L.; GOMEZ-CABRERA, M. C.; STEINHAFEL, N.; VINA, J. Acute exercise activates nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in rat skeletal muscle. **FASEB J.**18:1499–1506; 2004.

JIANG, Z.Y. WOOLLARD, A.C.S., WOLF, S. Lipid Hydroperoxide measurement by oxidation of Fe²⁺ in the presence of xylenol orange – Comparison with TBA assay and on iodometric method. **Lipids**, 26: 853-856, 1991.

JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V.; WOLFF, S.P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low-density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

JIN, Y., et al. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v.82, p.398-404, 2011.

JØRGENSEN J.B. & MUSTAFA T. The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in flounder (*Platichthys flesus*L.) I: utilization of glycogen and accumulation of glycolytic and products in various tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology** 67B, 243–248, 1980.

KIEFFER, J. D., L. M. ARSENAULT & M. K. LITVAK. Behaviour and performance of juvenile shortnose sturgeon *Acipenser brevirostrum* at different water velocities. **Journal of Fish Biology**, 674-682,

2009.

KNIGHT, J.A. Free Radicals, Antioxidants, Aging, and Disease. **Washington, DC: American Association for Clinical Chemistry Press**, 1999.

KOSAKA H., TYUMA I. Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhaemoglobin by nitrite. **Environmental Health Perspectives**, 73, 147–151, 1987.

KROUPOVA, H., MACHOVA, J., PIACKOVA, V., BLAHOVA, J., DOBSIKOVA, R., NOVOTNY, L. & SVOBODOVA, Z. Effects of subchronic nitrite exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 71, 813–820, 2008.

KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. Vol. 32: Pp. 9-16. In: Walker, J.M. (Ed.), *Methods in Molecular Biology, Basic Protein and Peptide Protocols*. **Human Press Inc., Totowa, NJ**, 1994.

LATONA, N. Fertilizing Sport Fish Ponds. *Southern Ponds e Wildlife, USA*, 1(2): 28-31, 2002.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*, 4a. Edição, Editora Sarvier, 2007.

LESSER, M. P. Oxidative stress in tropical marine ecosystems. In: Abele, D., Vázquez-Medina, J.P.; Zenteno-Savín, T. (Ed.). Oxidative stress in aquatic ecosystems. 1ed, Chichester, UK: Blackwell-Wiley Publishing LTd. 2012.

LEWIS W.M., MORRIS D.P. Toxicity of nitrite to fish: A Review. Transactions of the American Fisheries Society, 115, 183–195, 1986.

LIMA, A.O. et al. Métodos de laboratório aplicados à clínica - Técnica e Interpretação. Pp. 664. 8ª ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1969.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurement with phenol reagent. **J.Biol. Chem. Vol.** 193, p. 265-275, 1951.

LU, G.D. The metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.**, Vol. 33, p. 249-254, 1939.

LUSHCHAK, V.I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic Toxicology**, v.101, p.13-30, 2011.

MAROSI K, BORI Z , N HART , SÁRGA L , KOLTAI E , RADAK Z , NYAKAS

C. Long-term exercise treatment reduces oxidative stress in the hippocampus of aging rats. **Neuroscience**. Dec 13; 226: 21-8, 2012.

MATSUOKA T. Determination of methemoglobin and carboxyhemoglobin in blood by rapid colorimetry. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 20, 1208–1211, 1997.

MAUGHAN, R., J., GLEESON, M., GREENHAFF, P., L. Bioquímica do Exercício e do Treinamento. Editora, Manole. 1º edição, 2000.

MAZEAUD, M. M., MAZEAUD, F., DONALDSON, E. M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Trans. Am.Fish. Soc.**, 106:201-212, 1977.

MEYER, F.P. Aquaculture disease health management. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4201-4208. 1991.

MEYER, R. A., AND R. L. TERJUNG. AMP deamination and IMP adenylate metabolism in contracting fast and slow twitch muscle. **Am. J. Physiol.** 237 (Cell Physiol. 6): C111-C118, 1979.

MCHUGH, M.P., D.A.J. CONNOLLY, R.G. ESTON, AND G.W. GLEIM. Exercise-induced muscle damage and potential mechanisms for the repeated bout effect. **Sports Med.** 27:157–170. 1999.

MILLIGAN, C. L. A regulation role of cortisolin muscle glycogen metabolism in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss walbaum*. **J. Exp. Biology**, 206:3167-3173, 2003.

MORAES G., CATTONY E.B. & SOUZA R.H.S. Metabolic responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to high levels of environmental nitrite. *Revista Brasileira de Biologia* 58, 105–113, 1998.

MORAES, G. et al. Adaptações bioquímicas à natação sustentada em peixes com alto potencial para piscicultura. Pp. 269-294. In: Tavares-Dias, M. (org.). *Manejo e Sanidade de Peixes em Cultivo*. Amapá: Embrapa Amapá, 2009.

NAVARRO A. et al. Beneficial effects of moderate exercise on mice aging: survival, behavior, oxidative stress, and mitochondrial electron transfer. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 286: R505–R511, 2003.

NEUBAUER, O. et al. Antioxidant Responses to an Acute Ultra-endurance Exercise: Impact on DNA Stability and Indications for an Increased Need for Nutritive Antioxidants in the Early Recovery Phase. *British Journal of Nutrition*, p. 1129–1138, 2010.

NUNES, C. S., et al. Growth and hematology of pacu subjected to sustained swimming and fed different protein levels. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.48, n.6, p.645-650, 2013.

ORTENBLAD N, et al. Reactive oxygen species are important mediators of taurine release from skeletal muscle cells. **Am J Physiol Cell Physiol** **284**: C1362–C1373, 2003.

PICKERING, A. D. Stress and fish. London: Academic Press.

PICKERING, A. D., POTTINGER, T. G. 1995. Biochemical effects of stress. In: HOCHASCHKA, P. W., MOMMSEN, T. P. (ed). **Environmental and ecological biochemistry**. Amsterdam: Elsevier, p.349-379, 1981.

PINER, P., ÜNER, N. Oxidative and apoptotic effects of lambda-cyhalothrin modulated by piperonyl butoxide in the liver of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.33, p.414-420, 2012.

RADAK, Z. et al. Superoxide dismutase derivative reduces oxidative damage in skeletal muscle of rats during exhaustive exercise. **J. Appl. Physiol.**79:129–135; 1995.

RADAK, Z. et al. Muscle soreness-induced reduction in force generation is accompanied by increased nitric oxide content and DNA damage in human skeletal muscle. **Free Radic. Biol. Med.**26:1059–1063; 1999.

RADAK, Z. et al. Adaptation to exercise-induced oxidative stress: from muscle to brain. **Exerc. Immunol. Rev.** 7:90–107; 2001.

RADAK, Z., ED. EXERCISE AND DISEASES, AACHEN: MEYER & MEYER VERLAG. CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Toxicology rethinks its central belief. **Nature** 421:691–692; 2003.

RADAK Z, CHUNG HY, and GOTO S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. **Free Radic Biol Med** 44: 153–159, 2008.

RADAK, Z, et al. Oxygen Consumption and Usage During Physical Exercise: The Balance Between Oxidative Stress and ROS-Dependent Adaptive Signaling. **ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING**, Volume 18, Number 10, 2013.

RESENDE, E. K.; RIBEIRO, R. O.; LEGAT, A. P.; BENITES, C. Melhoramento genético em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. **Boletim SBI**, 94:5-6, 2009.

RICHARDS, J.G. et al. Substrate utilization during graded aerobic exercise in rainbow trout. **Experimental Biology** 205, 2067-2077, 2002.

SABORIDO A, et al. Stanozolol treatment decreases the mitochondrial ROS generation and oxidative stress induced by acute exercise in rat skeletal muscle. **J. Appl Physiol** 110: 661–669, 2011.

SAHLIN, K.; TONKONOGLI, M.; SODERLUND, K. Energy supply and muscle fatigue in humans. **Acta Physiol. Scand.** 162:261–266; 1998.

SAYEED, I. et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. **Ecotoxicology and Environment Safety** 56, 295–301, 2003.

SCARANO, G. & SAROGLIA, M.G. Recovery of fish from functional and haemolytic anaemia after brief exposure to a lethal concentration of nitrite. **Aquaculture** 43, 421–426, 1984.

SCHLENK, D. et al. Biomarkers. In: DI GIULIO, RT.; HINTON D.E. (Eds). **The toxicology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis. p. 684-713, 2008.

SHANGAVI, D.S., WEBWE, J.M. Effects of sustained swimming on hepatic glucose production of rainbow trout. **J. Exp. Biol.** 202, 2161-2166 , 1999.

SIES, H. Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress. Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, p. 291-295, 1997.

SEN CK. Oxidants and antioxidants in exercise. **J Appl Physiol** 79: 675–686, 1995.

SCHÖNEICH, C. Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach. **Exp Gerontol.** Jan;34(1):19-34, 1999.

SIES H. Oxidative stress: Introduction. In: Sies H, editor. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. London: Academic Press. pp 213–224, 1991.

SOMANI, S. M.; HUSAIN, K. Exercise training alters kinetics of antioxidant enzymes in rat tissues. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 38:587–595; 1996.

TAMIR, S.; TANNENBAUM, S. R.; *Biochim. Biophys. Acta*, 1288, F31, 1996.

TAVARES L.H.S. Limnologia aplicada a aquicultura. **Boletim Técnico do CAUNESP, n. 1: Jaboticabal, FUNEP. SP. Brasil** 70pp, 1994.

TRINDER P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry** 6, 24–27, 1969.

VAN LEEUWEN FXR Safe drinking water: The toxicologist's approach. **Food Chem. Toxicol.** 38: S51–S58, 2000.

VIJAYAN, M. M.; BALLANTYNE, J. S.; LEATHERLAND, J. F. Cortisolinduced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. **Gen. Comp. Endocrinol.** , 82:476-486, 1991.

WENDELAAR BONGA, S. E. 1997. The stress response of fish. **Physiol. Rev.** ,77:591-625.

WILLIAMS E.M. & EDDY F.B. Chloride uptake in freshwater teleosts and its relationship to nitrite uptake and toxicity. **Journal of Comparative Physiology** 156B, 867–872, 1986.

YOGATA, H., OKU, H. The effects of swimming exercise on growth and whole-body protein and fat contents of fed and unfed fingerling yellowtail. **Fisheries science** 66, 1100-1105, 2000.

YU K.L. & WOO N.Y.S. Change in blood respiratory properties and cardiovascular function during acute exposure to hypoxic water in an air-breathing teleost, *Channa maculata*. **Journal of Fish Biology** 30, 749–760, 1987.

ZIERATH, J. AND J. A. HAWLEY. Skeletal muscle fiber type: influence on contractile and metabolic properties. **PLoS Biol.** 2(10): e348, 2004.