

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

RESPOSTAS AO ESTRESSE OSMÓTICO E HIPÓXICO EM TRAÍRA, *Hoplias  
malabaricus* (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE) ASPECTOS FISIOLÓGICOS E  
ADAPTATIVOS.

MARISE MARGARETH SAKURAGUI

SÃO CARLOS-SP  
2006

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

RESPOSTAS AO ESTRESSE OSMÓTICO E HIPÓXICO EM TRAÍRA, *Hoplias malabaricus* (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE) ASPECTOS FISIOLÓGICOS E ADAPTATIVOS.

MARISE MARGARETH SAKURAGUI

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais 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.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

SÃO CARLOS-SP  
2006

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

S158re

Sakuragui, Marise Margareth.

Respostas ao estresse osmótico e hipóxico em traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) aspectos fisiológicos e adaptativos / Marise Margareth Sakuragui. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

102 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Teleósteos. 2. Hipóxia. 3. Água deionizada. 4. Cortisol. 5. Intermediários metabólicos. 6. Estresse. I. Título.

CDD: 597.5 (20<sup>a</sup>)

ORIENTADORA:

---

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes

*Dedico esse Trabalho:*

Ao José Vicente com carinho,  
À minha querida mãezinha Iracema,  
À minha querida tia Elizabeth,  
Aos meus irmãos Márcia e Marcos,  
Ao meu pai *in memoriam*...

## AGRADECIMENTOS

- Aos meus pais e querida tia Elizabeth que sempre me apoiaram em tudo e investiram em mim, sem eles eu não seria o que sou hoje;
- Ao José Vicente companheiro de jornada, apoio nas horas difíceis, fonte de carinho, compreensão e amor;
- À minha orientadora, Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes pela orientação, amizade, dedicação e confiança;
- Ao CNPq pelo apoio financeiro, pois sem ele este trabalho não seria possível;
- Aos membros da Banca examinadora Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Profa. Dra. Ana Lúcia Kalinin, Profa. Dra. Lúcia Helena de Aguiar, Profa. Dra. Cristina Ferro Corrêa Toniolo, Profa. Dra. Lícia Maria Lundstedt e Profa. Dra. Odila Rigolim de Sá, pelas sugestões e contribuições para o enriquecimento da Tese;
- Ao técnico Nelson A. Matos *in memoriam* e “Piau”, pela prestimosa ajuda com as coletas e manutenção dos peixes;
- Ao tecnólogo José Roberto Sanches pelos eventuais auxílios e amizade;
- Aos meus amigos de laboratório Guilherme, Fábio, André, Tiago, Veridiana, Helen, Mary, Vanessa, Gisele, Cleverson, Patrícia e Eliane, pela ajuda imprescindível nos experimentos;
- À Lenise por me acompanhar nessa jornada, pela convivência, pelo auxílio na imunohistoquímica e  $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ;
- À Aurélia, Fábio, Cleoni, Lenise, Eliane e Rosenil, amigos e confidentes de todas as horas;
- As minhas queridas pupilas Helen, Veridiana, Mary e Gisele pelo auxílio na Microscopia de Luz;
- Um agradecimento especial para Vanessa, Mary, Helen, Cleverson e Patrícia por me ajudarem com as quinhentas análises;
- À Araceli e Gustavo com o auxílio na técnica dos intermediários metabólicos;
- Ao Prof. Dr. Gilberto de Moraes (Giba) e Prof. Dr. Francisco Tadeu Rantin por permitirem a utilização dos seus laboratórios e equipamentos;
- Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas pela amizade e apoio;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN);
- E finalmente a Deus que sempre me estendeu a mão dando esperança, alegria, conforto espiritual e saúde para prosseguir nessa jornada tão difícil;
- E se por acaso tiver esquecido de algum nome, quero agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para que eu não percorresse esse caminho sozinha.



## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. O estresse e os peixes.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.2. Alterações morfo-fisiológicas e metabólicas.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2. Aspectos gerais e importância da espécie, <i>Hoplias malabaricus</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Objetivos específicos.....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Material.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Métodos.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.1. Procedimento cirúrgico.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.2. Protocolo experimental 1. Avaliação do estresse provocado pela exposição à água deionizada e administração de cortisol exógeno em normóxia.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2.3. Protocolo experimental 2. Avaliação do estresse provocado pela exposição à água deionizada e administração de cortisol exógeno em hipóxia.....</b>	<b>16</b>
<b>3.2.4. Tensões de oxigênio na água (PO<sub>2</sub>).....</b>	<b>18</b>
<b>3.2.5. Determinação das Variáveis Hematológicas e Plasmáticas.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.5.1. Amostras de sangue.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.5.2. pH do sangue.....</b>	<b>19</b>
<b>3.2.5.3. Hematócrito (Hct).....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.5.4. Dosagem de Hemoglobina Total ([Hb]).....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.5.5. Osmolalidade plasmática.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.5.6. Íons Plasmáticos.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.5.7. Cortisol Plasmático.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.5.8. Glicose Plasmática.....</b>	<b>21</b>
<b>3.2.6. Preparação de Extratos.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.6.1 Lactato Plasmático.....</b>	<b>22</b>
<b>3.2.6.2. Piruvato Plasmático.....</b>	<b>23</b>

3.2.6.3. Amônia Plasmática.....	23
3.2.7. Determinação de proteína.....	23
3.2.8. Análise morfo-funcional do tecido branquial.....	24
3.2.8.1. Determinação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.....	24
3.2.8.2. Densidade de células-cloreto.....	25
3.2.9. Análise Estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Exposição à água deionizada e administração de cortisol exógeno.....	27
4.1.1. Cortisol plasmático.....	27
4.1.2. Osmolalidade e íons plasmáticos.....	30
4.1.3. Intermediários metabólicos no plasma.....	35
4.1.4. Variáveis sanguíneas.....	41
4.2. Exposição à água deionizada e administração de cortisol exógeno em hipóxia....	45
4.2.1. Cortisol plasmático.....	45
4.2.2. Osmolalidade e íons plasmáticos.....	48
4.2.3. Intermediários metabólicos no plasma.....	54
4.2.4. Variáveis sanguíneas.....	60
4.3. Densidade das Células de Cloreto (CC) e Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.....	65
5. DISCUSSÃO.....	71
5.1. Cortisol Plasmático.....	71
5.2. Osmolalidade e Íons Plasmáticos.....	75
5.3. Intermediários metabólicos no plasma.....	77
5.4. Variáveis sanguíneas.....	81
5.5. Atividade específica da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e densidade das células de cloreto (CC)	84
6. CONCLUSÕES.....	88
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeito metabólico do cortisol em peixes. As setas indicam aquelas vias ou processos que ou são regulados ou são sítios potenciais da ação do cortisol. As linhas tracejadas indicam fluxo ou transporte de metabólitos. Abreviações: **AGL**, ácidos graxos livres; **HOAD**, 3-hidroxiacil-coenzima A dehidrogenase; **GDH**, glutamato dehidrogenase; **GQ**, glicerol quinase; **GNSase**, glutamina sintetase; **GFase**, glicogênio fosforilase; **GSase**, glicogênio sintetase; **G6Fase**, glicose-6-fosfatase; **G6FDH**, glicose-6-fosfato dehidrogenase; **FEP** fosfoenolpiruvato; **FEPCQ**, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (modificado de MOMNSEN *et al.*, 1999 por José Vicente Sandonato, 2006). 6
- Figura 2.** Exemplar de traíra, *Hoplias malabaricus* (foto Prof. Victor de Victor). 13
- Figura 3.** Esquema protocolo experimental 1 (tempos amostrais 0, 6, 12, 24\*, 36 e 48\* horas). 16
- Figura 4.** Esquema protocolo experimental 2 (tempos amostrais 0, 6, 12, 24\*, 36 e 48\* horas) 18
- Figura 5.** Cortisol plasmático (média ± erro) (ng/mL) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados com cortisol (C+IC) e (AD+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 29
- Figura 6.** Osmolalidade plasmática (média ± erro) (mOsmol/Kg) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação aos grupos não injetados C e AD. 31
- Figura 7.** Concentração de íons plasmáticos Na<sup>+</sup> (**A**), K<sup>+</sup> (**B**) e Cl<sup>-</sup> (**C**)(média ± erro) (meq/L) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 34
- Figura 8.** Concentração de glicose (mg/dL) (**A**), lactato (**B**) e piruvato plasmático (**C**) (nM/mL) (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (C+IC) e (AD+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 37
- Figura 9.** Concentração de amônia (nM/mL) (**A**) e proteína plasmática (g/dL<sup>-1</sup>) (**B**) (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 40
- Figura 10.** Valores médios de pH plasmático (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em todos os tratamentos. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 42

**Figura 11.** Valores médios de Hct (%) **(A)** e concentração de Hb (g/dL) **(B)** do sangue (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

44

**Figura 12.** Concentração de cortisol plasmático (ng/mL) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e injetados com cortisol (CH+IC) e (ADH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos a hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

47

**Figura 13.** Osmolalidade plasmática (mOsmol/Kg) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

50

**Figura 14.** Concentração de íons plasmáticos  $Na^+$  **(A)**,  $K^+$  **(B)** e  $Cl^-$  **(C)** (meq/L) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH, TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

53

**Figura 15.** Concentração de glicose (mg/dL) **(A)**, lactato **(B)** e piruvato plasmático **(C)** (nM/mL) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (CH+IC e ADH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

56

**Figura 16.** Concentração de amônia (nM/mL) **(A)** e proteína plasmática ( $g/dL^{-1}$ ) **(B)** (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

59

**Figura 17.** Valores médios de pH plasmático (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

61

**Figura 18.** Valores médios de Hct (%) **(A)** e concentração de Hb (g/dL) **(B)** do sangue (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

64

**Figura 19.** Valores médios (média  $\pm$  erro) de CC ( $\text{mm}^3$ ) no filamento (F-CC) e lamelas (L-CC) das brânquias de *H. malabaricus* ( $n = 5$  em cada grupo) em normóxia ( $\text{PO}_2 = 140$  mmHg) **(A)** e hipóxia severa ( $\text{PO}_2 = 25-30$  mmHg) **(B)** dos grupos não injetados (C, CH), (AD24h, ADH24h), (AD48h, ADH48h), e grupos injetados (C+IC, CH+IC), (AD24h+IC, ADH24h+IC) e (AD48h+IC, ADH48h+IC) expostos à água controle (C) ou à água deionizada (AD). **a:** ( $p < 0.05$ ) indica diferença em relação aos grupos C e CH, **b:** ( $p < 0.05$ ) indica diferença em relação aos grupos não injetados C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h e ADH48h.

67

**Figura 20.** Imunohistoquímica contra  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase das CC branquiais de *H. malabaricus* no grupo controle presentes no filamento e base da lamela **(A)**, após exposição à água deionizada **(B)** e exposição a hipóxia severa ( $\text{PO}_2 = 25-30$  mmHg) **(C)** a densidade de CC-claras ( $\rightarrow$ ) e CC-escuras ( $\blacktriangleright$ ) aumenta tanto no filamento como na lamela. Barra de escala em  $\mu\text{m}$ .

68

**Figura 21.** Valores médios (média  $\pm$  erro) da atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ( $\mu\text{mol Pih}^{-1}$   $\text{mg}$  proteína $^{-1}$ ) das brânquias de *H. malabaricus* ( $n = 5$  em cada grupo) em normóxia ( $\text{PO}_2 = 140$  mmHg) e hipóxia severa ( $\text{PO}_2 = 25-30$  mmHg) dos grupos não injetados (C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h, ADH48h), e grupos injetados (C+IC, CH+IC, ADH24h+IC, AD24h+IC, AD48h+IC, ADH48h+IC) expostos à água controle (C) ou à água deionizada (AD). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos grupos C e CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos valores em normóxia; **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos grupos não injetados C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h, ADH48h.

70

## LISTA DE TABELAS

- Tabela I.** Cortisol plasmático (média ± erro) (ng/mL) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados com cortisol (C+IC) e (AD+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 28
- Tabela II.** Osmolalidade plasmática (média ± erro) (mOsmol/Kg) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação aos grupos não injetados C e AD. 30
- Tabela III.** Concentração de íons plasmáticos Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> (média ± erro) (meq/L) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 33
- Tabela IV.** Concentração de glicose (mg/dL), lactato e piruvato plasmático (nM/mL) (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (C+IC) e (AD+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 36
- Tabela V.** Concentração de amônia (nM/mL) e proteína plasmática (g/dL<sup>-1</sup>) (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 39
- Tabela VI.** Valores médios de pH plasmático (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 41
- Tabela VII.** Valores médios de Hct (%) e concentração de Hb (g/dL) do sangue (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD. 43
- Tabela VIII.** Concentração de cortisol plasmático (ng/mL) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e injetados com cortisol (CH+IC) e (ADH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos a hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH. 46

**Tabela IX.** Osmolalidade plasmática (mOsmol/Kg) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH. 49

**Tabela X.** Concentração de íons plasmáticos Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> (meq/L) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH, TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH. 52

**Tabela XI.** Concentração de glicose (mg/dL), lactato e piruvato plasmático (nM/mL) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (CH+IC e ADH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH. 55

**Tabela XII.** Concentração de amônia (nM/mL) e proteína plasmática (g/dL<sup>-1</sup>) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH. 58

**Tabela XIII.** Valores médios de pH plasmático (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH. 60

**Tabela XIV.** Valores médios de Hct (%) e concentração de Hb (g/dL) do sangue (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH. 63

**Tabela XV.** Valores médios (média ± erro) de CC (mm<sup>3</sup>) no filamento (F-CC) e lamelas (L-CC) das brânquias de *H. malabaricus* (n = 5 em cada grupo) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg) e hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg) dos grupos não injetados (C, CH), (AD24h, ADH24h), (AD48h, ADH48h), e grupos injetados (C+IC, CH+IC), (AD24h+IC, ADH24h+IC) e (AD48h+IC, ADH48h+IC) expostos à água controle (C) ou à água deionizada (AD). **a:** (p < 0,05) indica diferença em relação aos grupos C e CH, **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação aos grupos não injetados C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h e ADH48h. 66

**Tabela XVI.** Valores médios (média ± erro) da atividade específica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (μmol Pih<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>) das brânquias de *H. malabaricus* (n = 5 em cada grupo) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg) e hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg) dos grupos não injetados (C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h, ADH48h), e grupos injetados (C+IC, CH+IC, AD24h+IC, ADH24h+IC, AD48h+IC, ADH48h+IC) expostos à água controle (C) ou à água deionizada (AD). **a:** (p < 0,05) indica diferença em relação aos grupos C e CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação aos valores em normóxia; **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação aos grupos não injetados C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h, ADH48h. 69

## RESUMO

O nível de estresse, avaliado pela alteração na concentração plasmática de cortisol e as alterações fisiológicas e metabólicas provocadas pelo choque osmótico e hipóxia e o efeito da injeção prévia de cortisol sobre essas alterações, foram investigadas em traíra, *Hoplias malabaricus*, não injetadas e injetadas com cortisol exógeno (IC) e mantidas em água similar à de seu ambiente natural (C - controle) e em água deionizada (AD) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg) e hipóxia severa (H,  $PO_2 = 25-30$  mmHg) durante 48 horas. O grupo testemunho (TEST) foi constituído por animais injetados com óleo de soja (veículo). As variáveis sanguíneas, pH, hematócrito (Hct) e concentração de hemoglobina (Hb), e as plasmáticas, osmolalidade, concentração dos íons  $Na^+$ ,  $K^+$ , e  $Cl^-$ , cortisol, glicose, lactato, piruvato, amônia e proteínas, foram determinadas após 6, 12, 24, 36 e 48h em cada condição experimental, após colheita de sangue via cânula implantada na veia ventral. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após o início dos experimentos, as brânquias de 5 animais de cada grupo foram removidas para determinação da atividade da  $Na^+/K^+$ -ATPase e da densidade das células de cloreto (CC) através da imunohistoquímica contra a enzima  $Na^+/K^+$ -ATPase. O choque osmótico resultou em uma alteração lenta do cortisol plasmático em normóxia (24h no grupo AD) e rápida quando o animal foi exposto a hipóxia (6h no grupo ADH) evidenciando que a ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Interrenal depende do estímulo estressor. A injeção de cortisol (IC) em normóxia induziu um rápido aumento na glicose plasmática em todos os grupos experimentais, com exceção do grupo AD em relação ao grupo C que mostrou uma tendência a aumentar somente após 36-48h. Em hipóxia a glicose aumentou nos grupos ADH+IC apenas nas primeiras 24h. Distúrbio no balanço hidromineral, em normóxia, foi observado com o aumento na  $[Na^+]$  e  $[K^+]$  em todos os grupos experimentais e diminuição na  $[Cl^-]$  plasmática somente para o grupo AD em 6 e 24h, retornando aos valores do grupo C após 36h, enquanto que, em hipóxia, a osmolalidade, a  $[Cl^-]$  e a  $[Na^+]$  diminuíram nas primeiras 12, 6 e 12h, respectivamente nos grupos não injetados. Um distúrbio transitório foi observado na  $[K^+]$  nos grupos ADH (6h) e CH+IC (24 e 48h). Em todos os grupos injetados a variação de lactato e glicose plasmática foi observada tanto em normóxia como em hipóxia (com exceção para o lactato no grupo CH+IC) o que evidencia o possível efeito do cortisol nestas respostas. Em normóxia, o aumento da concentração do lactato, glicose e  $Na^+$  nos grupos injetados pode ser devido mais ao cortisol exógeno e/ou ativação colinérgica do que a ativação do eixo HHI. As alterações nas concentrações da glicose, lactato, piruvato, amônia e proteína plasmática sugerem um aumento da demanda energética para manutenção da homeostase, podendo ser a consequência da variação de cortisol. O aumento significativo do pH pode ser reflexo da alcalose metabólica causada pela diminuição nos íons  $K^+$  e  $Cl^-$  que podem estimular a secreção de íons  $H^+$  para o interior do tubo renal nos grupos AD em normóxia. O aumento do pH em hipóxia pode ser explicado pela atividade da anidrase carbônica nos eritrócitos com a formação de íons  $H^+$  que se liga a Hb e de bicarbonato que deixa a célula e é trocado por íons  $Cl^-$  em ADH. A diminuição do pH, em hipóxia, no grupo ADH+IC pode ser devida ao aumento do lactato advindo do metabolismo celular (acidose metabólica). O Hct mostrou uma tendência a diminuição, em normóxia, nas primeiras 6h nos grupos C, TEST e AD e 12h no grupo C+IC e a aumentar no grupo AD+IC em 6 e 24h. Em hipóxia ocorreu diminuição do Hct nas primeiras 6 horas no grupo ADH+IC e nas primeiras 12 horas nos grupos CH, ADH e CH+ IC. Não houve alteração na [Hb] tanto em normóxia como em hipóxia. Duas populações de CC foram identificadas nos filamentos branquiais e lamelas de *H. malabaricus*; CC-claras e CC-escuras estão restritas aos filamentos branquiais e raramente aparecem nas lamelas no grupo controle. Após o estresse osmótico e hipóxico ocorreu um aumento na densidade dos dois tipos de CC no filamento e lamela. A densidade de CC-escuras (maduras e/ou ativas) aumentou com a elevação do cortisol plasmático e, conseqüentemente, a atividade específica da  $Na^+/K^+$ -ATPase acompanhou esse aumento. Os resultados do presente estudo evidenciam que níveis de cortisol acima dos níveis basais em *H. malabaricus* interferem no equilíbrio iônico e no metabolismo energético quando mantidos em ambiente semelhante ao habitat natural. Entretanto, se o animal for exposto a um estímulo estressor, os efeitos no equilíbrio iônico e metabólico podem ser amenizados quando os níveis de cortisol plasmático estão acima do nível basal.

## ABSTRACT

The stress level, via change in the plasma concentration of cortisol and the physiological and metabolic responses caused by osmotic shock and hypoxia and the effect of cortisol injection on these responses, were studied in traíra, *Hoplias malabaricus*, injected and non-injected with cortisol exogenous (IC) and maintained in water similar to its natural environment (C- control) and in deionized water (AD) in normoxia ( $PO_2 = 140$  mmHg) and severe hypoxia (H,  $PO_2 = 25-30$  mmHg) during 48h. Animals injected with soy oil consisted the sham-operated group (TEST). Blood variables, pH, hematocrit (Hct) and hemoglobin concentration (Hb), osmolality,  $Na^+$ ,  $K^+$ , and  $Cl^-$  ion concentration, cortisol, glucose, lactate, ammonium and protein concentration were determined following 6, 12, 24, 36 and 48h in each experimental condition, after blood sample obtained via implanted catheter in the ventral vein. Twenty four and forty eight hours after the beginning of experiments, the gills of 5 animals from each group were removed for determination of  $Na^+/K^+$ -ATPase activity and chloride cell (CC) density using immunohistochemistry against  $Na^+/K^+$ -ATPase enzyme. Osmotic shock resulted in slow increasing of cortisol level in normoxia until 24h in group AD and fast increasing (6h) in fish exposed to hypoxia evidencing that the activation of hypothalamus –hypophysis –interrenal axis depends on stressor agent. Cortisol injection (IC) in normoxia induced plasma glucose increasing in all experimental groups, with exception of AD group compared with controls that showed a tendency to increase only after 36-48h. During hypoxia, glucose increased in the DH+IC group only on the first 24h. Hydromineral unbalance, in normoxia, was observed with the increase of  $[Na^+]$  and  $[K^+]$  in all experimental groups and a decreasing of plasma  $[Cl^-]$  only in the AD group in 6 and 24h, returning to values of control group after 36h, meanwhile, in hypoxia, the osmolality,  $[Cl^-]$  and  $[Na^+]$  decreased on the first 12, 6 and 12h, respectively, in non-injected groups. Transitory  $[K^+]$  disturbance was observed in ADH (6h) and CH+IC (24 and 48h) groups. Changes in plasma glucose and lactate were observed in all injected groups in normoxia and hypoxia (with exception lactate concentration in CH+IC group), which evidences a possible effect of cortisol on these responses. In normoxia, the increasing of lactate, glucose and  $Na^+$  concentration in the injected groups may be related to exogenous cortisol and/or cholinergic activation instead of HHI activation axis. The changes of plasma glucose, lactate, pyruvate, ammonium and proteins suggested an increase of energy demand to homeostasis maintenance as a consequence of changes in cortisol. The significant increasing of pH may be due to metabolic alkalosis caused by a decreasing in plasma  $K^+$  and  $Cl^-$  ions, which may stimulate the secretion of  $H^+$  ions to renal tubules in AD group in normoxia, while the increasing of pH in hypoxia may be explained by carbonic anhydrase activity in the erythrocytes with  $H^+$  production that combined with  $Hb^+$  or was changed with bicarbonate ( $HCO_3^-/Cl^-$ ) in ADH. The reduction of pH, in hypoxia, in the ADH+IC group may be due to increase of lactate produced by cellular metabolism (acid metabolic). Hct showed a tendency to decrease, in normoxia, on the first 6h in C, TEST and AD groups and 12h in C+IC group, and to increase in the AD+IC group in 6 and 24h. In hypoxia, the Hct decreased on the first 6h in ADH+IC group and 12h in the CH, ADH e CH+ IC groups. Hb concentration did not change either in normoxia or hypoxia. Two chloride cell populations were identified in the gill filaments and lamellae of *H. malabaricus*; light-CC and dark-CC are restricted in the filaments and rarely in the lamellae. After osmotic and hypoxic stresses there were a density increase of CC of both types in the filament and lamella. Dark-CC density (mature and/or active) increased with the increase of cortisol levels and, consequently, the  $Na^+/K^+$ -ATPase activity followed these increasing in CC. The results of present study evidenced that the cortisol increasing above its basal level in *H. malabaricus* affect in the ionic equilibrium and energetic metabolism in fish kept in environment similar to its natural habitat. However, the effects of stress on the ionic equilibrium and metabolism may be reduced if cortisol level is above of the basal level of this species.

## 1. INTRODUÇÃO

As águas doces tropicais e subtropicais constituem-se em um complexo e interessante sistema que desperta a atenção para os estudos das adaptações de organismos aquáticos ao ambiente por apresentarem grandes oscilações diárias e sazonais. Variações na tensão de O<sub>2</sub>, temperatura, pH, níveis de amônia ionizada, nitrito, dióxido de carbono podem ocorrer estimulando a ação de mecanismos compensatórios fisiológicos e metabólicos que, até um certo limite, são capazes de restabelecer o equilíbrio interno e promover a adaptação do organismo à nova condição ambiental (HOCHACHKA e SOMERO, 1973, 1984).

A grande extensão da superfície branquial, principalmente em peixes de respiração exclusivamente aquática, a curta distância entre os meios externo e interno (3-10 µm) e o contínuo fluxo de água tornam as brânquias os primeiros órgãos a se alterarem em resposta às oscilações físico-químicas da água (FERNANDES *et al.*, 1993). As brânquias são os principais órgãos para a respiração na maioria dos peixes e tem importante papel na regulação iônica e osmótica e na manutenção do equilíbrio ácido-base, os quais são continuamente ajustados em função de oscilações internas e externas no pH, íons dissolvidos, níveis de amônia não-ionizada, dióxido de carbono e xenobióticos (FERNANDES *et al.*, 2000; FERNANDES e PERNA-MARTINS, 2002; MORON *et al.*, 2003; SAKURAGUI *et al.*, 2003; ALBERTO *et al.*, 2005; EVANS *et al.*, 2005).

Alterações na perfusão das lamelas secundárias e na superfície respiratória, alterações do epitélio branquial tais como proliferação das células mucosas e alterações nas mucossubstâncias produzidas, modificações nas microcriptas das células pavimentosas, proliferação das células-cloreto (CC) e aumento da superfície apical dessas células estão associadas a respostas fisiológicas e têm sido consideradas como mecanismos que auxiliam o restabelecimento das condições normais do indivíduo na presença de um agente estressor (WENDELAAR BONGA, 1997). A proliferação das CC no epitélio branquial ocorre via



alteração no denominado hormônio do estresse, o cortisol (WENDELAAR BONGA, 1997) e a ação de mecanismos adaptativos locais (BALM e POTTINGER, 1993).

### **1.1. O estresse e os peixes**

Os estímulos externos ou estressores que provocam mudanças fisiológicas ou morfológicas nos animais podem ser considerados como de curta duração, ou agudos ou de longa duração, ou crônicos. No estresse considerado agudo, podemos verificar respostas primárias e secundárias ao estresse seguidas das respostas terciárias ao estresse, as quais, são observadas no estresse considerado crônico. Em relação às respostas primárias ao estresse, o estímulo estressor é percebido nos peixes teleósteos desencadeando uma rápida estimulação neural com a liberação de catecolaminas (CA), adrenalina ou noradrenalina do tecido cromaffin (equivalente à medula adrenal em mamíferos) (GINGERICK e DROTTAR, 1989), via eixo hipotálamo-sistema simpático-células cromafins (eixo-HSC). Ao mesmo tempo o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo-HHI) é ativado (DONALDSON, 1981; SUMPTER, 1997) pela liberação do hormônio corticotrófico (CRH) pela hipófise e subsequente liberação do cortisol pelo tecido interrenal (equivalente ao córtex adrenal em mamíferos) (WELD *et al.*, 1987; OKAWARA *et al.*, 1992). A principal função de ambos os eixos é a mobilização de energia pela liberação de substratos energéticos na circulação sanguínea e aumento da transferência e tomada de O<sub>2</sub> pelo organismo (MAZEAUD e MAZEAUD; 1981; RANDALL e PERRY, 1992). O aumento nos níveis de cortisol circulante em resposta aos estressores é considerado como uma resposta adaptativa e importante para manter os ajustes da homeostase em relação ao estresse (WENDELAAR BONGA, 1997; MOMNSEN *et al.*, 1999; SAPOLSKY *et al.*, 2000; CHARMANDARI *et al.*, 2004).

As respostas secundárias são causadas pela elevação nos níveis circulantes de CA e

cortisol e incluem alterações na taxa de secreção de outros hormônios pituitários e hormônios da tireóide, mudanças no “turnover” dos neurotransmissores cerebrais como dopamina e serotonina, melhora na capacidade respiratória (otimização da tomada de O<sub>2</sub> resultando em aumento na oxigenação dos tecidos) via aumento do débito cardíaco e aumento do fluxo sanguíneo para as brânquias às custas de distúrbios no balanço de sais e água (RANDALL e PERRY, 1992), e mobilização de energia pela quebra das reservas de carboidratos e lipídeos e pela oxidação da proteína muscular; e alterações no equilíbrio ácido-base (FSBI, 2002). As CAs estimulam também a glicogenólise com a liberação de glicose do fígado para o sangue, resultando numa hiperglicemia no animal sob condição de estresse. As respostas denominadas terciárias ao estresse (estresse crônico) são aquelas em que o estímulo estressor é prolongado ou repetitivo (SCHRECK, 2000) e o peixe não tem como escapar das mudanças, e estas incluem alterações na função imune e na resistência as doenças, no crescimento e no status reprodutivo podendo levar o peixe à morte (FSBI, 2002).

### **1.1.2. Alterações morfo-fisiológicas e metabólicas**

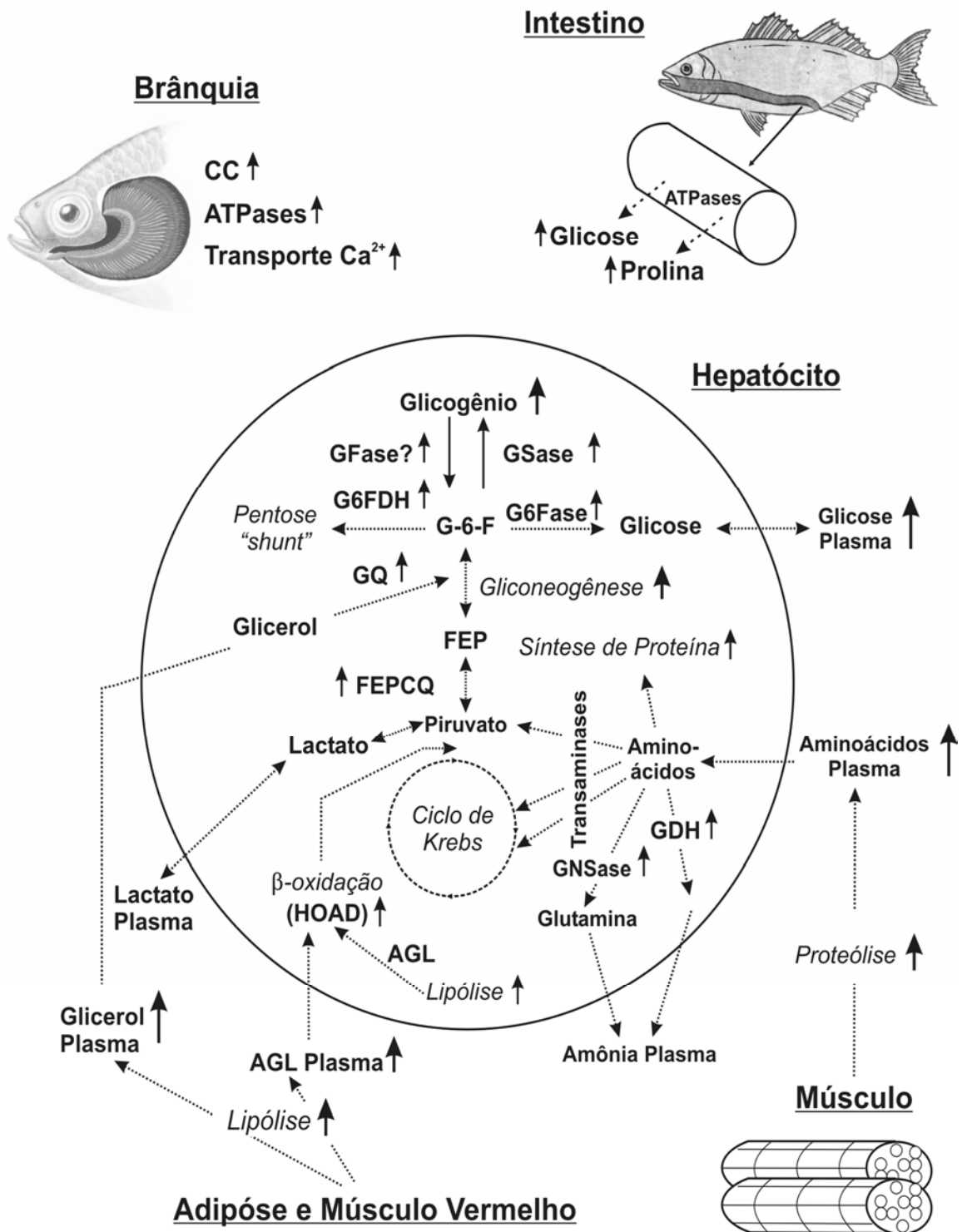
As mudanças para ambientes perturbados como água deficiente em íons (AVELLA *et al.*, 1987; LEINO *et al.*, 1987; LAURENT e HEBIBI, 1989; GRECO *et al.*, 1995); água destilada (FERNANDES e PERNA-MARTINS, 2002), água deionizada (MORON *et al.*, 2003; SAKURAGUI *et al.*, 2003) e/ou hipóxia (FERNANDES *et al.*, 2000; SAKURAGUI *et al.*, 2003) têm sido consideradas como indutores de mudanças no epitélio branquial como a diferenciação de células-cloreto (CC) em resposta ao aumento do hormônio cortisol circulante para tentar manter o equilíbrio hidromineral perdido pelo aumento das CAs. Desta forma, o cortisol pode ser considerado como um hormônio de ampla atuação em peixes porque desempenha um papel importante no metabolismo intermediário (VIJAYAN *et al.*, 1994 a, b,

1997; MOMNSEN, *et al.*, 1999), na regulação iônica e osmótica (MADSEN, 1990), na função imune (WENDELAAR BONGA, 1997) dando suporte ao argumento para um papel adaptativo ao estresse. Além do que, o cortisol tem dupla função: glicocorticóide e mineralocorticóide (WENDELAAR BONGA, 1997; MOMNSEN, *et al.*, 1999), a primeira estimula a glicogenólise no fígado, assim como, a proteólise periférica neste e em outros tecidos como o músculo branco (BARTON *et al.*, 1987), resultando numa hiperglicemia, além de promover a gliconeogênese neste mesmo órgão, como por exemplo, a síntese de glicose através de substratos não protéicos, tais como o aminoácido alanina e lactato (VIJAYAN *et al.*, 1994a, b; MOMNSEN *et al.*, 1999). O cortisol afeta também o metabolismo de carboidratos, aminoácidos e lipídios (MOMNSEN *et al.*, 1999).

Os glicocorticóides são vitais para manutenção basal e homeostase relacionada ao estresse em mamíferos. Sob tais condições, o cortisol mantém a normoglicemia e previne a hipotensão arterial. Nos estados de estresse, a elevação do cortisol é importante para ativar o sistema nervoso central, aumentando assim, a concentração de glicose no sangue e a elevação da pressão arterial (BANBERGER, *et al.*, 1996). O cortisol também é utilizado para amenizar as reações inflamatórias do sistema imune induzidas pelo estresse (BANBERGER, *et al.*, 1996). Nos peixes, o papel do cortisol em relação ao aumento da concentração de glicose no plasma e os mecanismos que os envolve estão começando a serem elucidados. O estresse é um processo que demanda energia e estudos tem demonstrado que este aumenta a taxa metabólica e a tomada de O<sub>2</sub> em peixes (BARTON *et al.*, 1987). Para lidar com a demanda energética aumentada, os peixes mobilizam substratos para abastecer os processos celulares. A glicose é um importante combustível para o metabolismo e determinados tecidos podem utilizar-se primeiramente dela (como por exemplo, cérebro, coração, células sanguíneas e brânquias; MOMNSEN, 1986). Como nos peixes, a utilização periférica da glicose ainda não está claramente compreendida; MOMNSEN *et al.*, 1999 tomando como base o efeito do

cortisol no metabolismo intermediário sugeriram um modelo esquemático resumido para tentar elucidar a função deste em relação à hiperglicemia durante o estresse em peixes (Figura 1). A elevação nos níveis de cortisol no plasma durante o estresse em peixes pode desempenhar um papel na produção imediata de glicose causada pelo aumento da glicogenólise nos hepatócitos do fígado (MOMNSEN *et al.*, 1999). A glicose-6-fosfato é mediada pela enzima glicose-6-fosfatase (que existe em grandes proporções nos hepatócitos) e convertida em glicose (Fig. 1). Esse efeito do cortisol sugere um decréscimo no conteúdo de glicogênio no fígado pós-estresse, embora isso não pareça ser o caso dos peixes (Vijayan *et al.*, 1994a). MOMNSEN *et al.*, 1999; sugeriram uma hipótese de que a reposição/manutenção do glicogênio, assim como, a manutenção da glicose plasmática após o estresse, é atribuída principalmente ao cortisol, e talvez com a ação conjunta da insulina.

Além de aumentar a capacidade da gliconeogênese, o cortisol também aumenta a mobilização/catabolismo dos aminoácidos nos peixes. O aumento da atividade proteolítica periférica parece ser acompanhado por ajustes substanciais do metabolismo dos aminoácidos, incluindo a excreção de amônia pelos peixes, atividade das transaminases e outras numerosas enzimas (glutamato: glutamina sintetase, aminotransferases e glutamato desidrogenase) envolvidas nesse processo ou subordinadas ao metabolismo dos aminoácidos no fígado. Neste caso o cortisol também desempenha um papel importante no controle de todos esses parâmetros, mesmo se não tem sido possível detectar mudanças no metabolismo dos aminoácidos, tendo em vista o seu aumento imediato na concentração do plasma. A fonte deste “pool” de aminoácidos não tem sido demonstrada claramente, mas é concebível que os aminoácidos livres originam-se das reservas do músculo, como nos estudos em mamíferos que mostram o aumento da proteólise periférica associada com a hipercortisolemia (BRILLON *et al.*, 1995). Um resumo do que seria a cascata cortisol-dependente envolvendo os aminoácidos e seu metabolismo é mostrado na Figura 1.



**Figura 1.** Efeito metabólico do cortisol em peixes. As setas indicam aquelas vias ou processos que ou são regulados ou são sítios potenciais da ação do cortisol. As linhas tracejadas indicam fluxo ou transporte de metabólitos. Abreviações: **AGL**, ácidos graxos livres; **HOAD**, 3-hidroxiacil-coenzima A dehidrogenase; **GDH**, glutamato dehidrogenase; **GQ**, glicerol quinase; **GNSase**, glutamina sintetase; **Gase**, glicogênio fosforilase; **GSase**, glicogênio sintetase; **G6Fase**, glicose-6-fosfatase; **G6FDH**, glicose-6-fosfato dehidrogenase; **FEP** fosfoenolpiruvato; **FEP\text{CQ}**, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (modificado de MOMNSEN *et al.*, 1999 por José Vicente Sandonato, 2006).

O lactato pode também ser um substrato chave para a gliconeogênese. Após o exercício, o cortisol aumenta a glicólise no músculo e concentração do lactato do plasma em truta arco-íris (EROS e MILLIGAN, 1996). O lactato é um substrato preferido pela gliconeogênese nos peixes (SUAREZ e MOMMSEN, 1987), e a gliconeogênese do lactato é estimulada pelos glicocorticóides (RENAUD e MOON, 1980; JANSSENS e WATERMAN, 1988; MOMMSEN *et al.*, 1992). Conseqüentemente, é discutível se o lactato pode ser utilizado para produção de glicose/conservação do glicogênio no fígado após o estresse nos peixes. O papel dos lipídios no processo de gliconeogênese induzida pelo cortisol ainda não está claro, mas duas linhas independentes mostram evidências que o glicerol desempenha um papel importante. Brook charr tratadas com cortisol demonstraram atividades aumentadas da glicerol quinase e da atividade da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase no fígado (VIJAYAN *et al.*, 1991); ambas as enzimas são essenciais para converter carbonos do glicerol na gliconeogênese, embora a glicerol quinase seja também importante na rota para o re-estruturação de ácidos graxos. Como mostrado acima, o cortisol aumenta a taxa de lipólise (degradação de ácidos graxos) nos peixes e o glicerol resultante poderia ser utilizado para a gliconeogênese. Entretanto, estudos adicionais são necessários para compreender o papel do cortisol na utilização do glicerol nos peixes e em dividir o potencial do glicerol entre a gliconeogênese e a síntese de lipídios. Assim, um dos papéis metabólicos importantes do cortisol durante o estresse está nos processos de regulação da glicose e da manutenção do glicogênio, os quais são vias importantes para a recuperação do estresse. Esta ação do cortisol ocorre provavelmente conjuntamente com outros hormônios glicoreguladores, tais como, a epinefrina, o glucagon e a insulina; o mecanismo de controle pôde incluir alterações dos hepatócitos responsáveis a estes hormônios. A gliconeogênese estimulada pelo cortisol e epinefrina corresponde a uma ação metabólica derivada não a um estímulo hipoglicêmico, mas por uma necessidade metabólica derivada a um estresse energético. O cortisol pode

também desempenhar um papel na mobilização periférica dos substratos, fornecendo desse modo precursores mais simples como glicerol, lactato, piruvato e aminoácidos para a gliconeogênese hepática nos peixes. Porém quando ocorre em tecidos extra-hepáticos, principalmente no músculo, a glicose formada é utilizada somente no metabolismo energético devido à ausência da enzima glicose-6-fosfatase, exclusiva do hepatócito (MOMMSEN *et al.*, 1999; Fig. 1).

Em relação à função mineralocorticóide, o cortisol atua na regulação osmótica e iônica, sendo capaz de estimular a diferenciação de CC nas brânquias e o aumento da atividade específica das enzimas relacionadas ao transporte de íons, em particular a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase (NOLAN, 2000).

LAURENT e PERRY (1990) demonstraram o aumento no número de CC nas brânquias de truta *Oncorhynchus mykiss*, tratadas com injeção intramuscular de cortisol, bem como o aumento na área de superfície apical de cada CC individual; e McCORMICK (1995) e DANG *et al.* (2000a) demonstraram que o tratamento com cortisol estimula a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e a diferenciação de CC nas brânquias de teleósteos. Conseqüentemente, o cortisol aumenta a capacidade de transporte de íons pelas brânquias, devido à ativação das bombas iônicas e pelo aumento no número de CC nestes órgãos (PERRY, 1998).

As CC presentes no epitélio branquial são a chave para os processos osmorregulatórios em teleósteos (EVANS, 1993). Estudos das CC nas brânquias de peixes têm demonstrado que a concentração de íons no meio aquático influencia a distribuição e a morfologia dessas células. LAURENT e DUNEL-ERB (1980) documentaram uma proliferação reversível das CC no filamento branquial de *Oncorhynchus mykiss* após transferência da água-doce para a água deionizada e vice-versa. Posteriormente, verificou-se que *O. mykiss* mantidas em águas com concentração muito baixa de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Ca}^{2+}$  (pobre em íons e mole) apresentavam proliferação das CC e aumento da sua área apical

(LAURENT *et al.*, 1985; AVELLA *et al.*, 1987) e que o aumento da área fracional das CC estava diretamente relacionada ao aumento da tomada de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (PERRY e LAURENT, 1989). Essas alterações morfológicas implicam na conservação total ou parcial de uma função particular (regulação iônica) das brânquias, mas pode, por sua vez, ocorrer em detrimento de uma outra função. A presença das CC no epitélio das lamelas secundárias interfere na função respiratória uma vez que aumenta a barreira água-sangue e diminui a capacidade de difusão de gases ( $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$ ) (BINDON *et al.*, 1994b, GRECO *et al.*, 1995).

Levando em conta as considerações citadas acima e que as águas continentais brasileiras são consideradas pobre em íons com exceção de algumas lagoas costeiras e regiões salinas do Pantanal sul (ESTEVES, 1998). Estudos do epitélio branquial de algumas espécies de peixes encontradas em um mesmo ambiente mostraram que há uma grande variabilidade quanto à distribuição das CC nessas espécies. Dentre as espécies estudadas, *Hoplias malabaricus* possui CC distribuídas no epitélio do filamento branquial sendo raras CC encontradas na base da lamela secundária (MORON e FERNANDES, 1997). A diluição da água (1:2 e 1:3 água laboratório: água deionizada) não causa modificações significativas no epitélio branquial de *H. malabaricus*, entretanto, quando essa espécie é mantida em água deionizada ocorre um aumento significativo no número de CC no filamento e lamelas secundárias com conseqüente aumento na distância de difusão água-sangue (MORON *et al.*, 2003).

SAKURAGUI *et al.* (2003) utilizando a exposição à água deionizada como uma forma de estimular a proliferação das CC nas lamelas secundárias mostrou que nessas condições, durante hipóxia progressiva, *H. malabaricus* foi capaz de manter a tomada de  $\text{O}_2$  do meio aquático constante, isto é, não alterou a pressão crítica de  $\text{O}_2$  ( $\text{PcO}_2$ ) quando mantida em hipóxia gradual, embora a pressão parcial de oxigênio do sangue arterial ( $\text{PaO}_2$ ) tenha sido reduzida significativamente. Os níveis iônicos plasmáticos não foram alterados em condições



de normóxia ambiental, entretanto, em condições hipóxicas, a  $[Na^+]$  e a  $[K^+]$  mostraram alterações significativas. As alterações mais drásticas ocorreram nas primeiras 48 horas após a transferência para a água deionizada, em hipóxia, concomitantemente com o período em que ocorreram significativas alterações no epitélio branquial (FERNANDES *et al.*, 2000). Esses resultados levantaram algumas questões que necessitam ser respondidas quanto aos mecanismos envolvidos nas respostas de *H. malabaricus* ao estresse não tóxico.

## 1.2. Aspectos gerais e importância da espécie, *Hoplias malabaricus*

A traíra, *Hoplias malabaricus*, (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE) (BLOCH, 1794) é um peixe adaptado a ambientes lênticos, apresenta pouca atividade, movimentando-se apenas para obtenção de alimento e atividade reprodutiva (RANTIN *et al.*, 1992; RANTIN, 1993; KALININ *et al.*, 1993).

A traíra chega a atingir 40 cm de comprimento (BRITSKI *et al.*, 1988). As fêmeas constroem ninhos onde depositam os ovos, formando uma massa irregular e o cuidado é efetuado pelos machos. A reprodução da espécie ocorre no período chuvoso com desova do tipo parcelada. É uma espécie de hábito alimentar piscívoro e insetívoro nas fases mais jovens (OYAKAWA, 2001). A falta de caracteres sexuais secundários externos dificulta a diferenciação por sexo mesmo na época reprodutiva (AZEVEDO e GOMEZ, 1943).

*H. malabaricus* é uma espécie tipicamente neotropical, com ampla distribuição geográfica. No Brasil, a espécie ocorre nas bacias do Amazonas, São Francisco, Paraíba, Doce, Paraná e nos grandes e pequenos açudes do nordeste (LEITÃO, 1947; FOWLER, 1950; PAIVA, 1972; GODOY, 1975).

Em geral, os eritrinídeos são capazes de viver em ambientes onde fatores abióticos como temperatura, pH, condutividade, concentração de O<sub>2</sub>, etc. são desfavoráveis para maioria das espécies (KRAMMER *et al.*, 1978; SILVA, 1980; SANTOS, 1980).

*H. malabaricus*, em particular, é extremamente resistente ao jejum (RIOS, *et al.*, 2006) e a redução do O<sub>2</sub> do meio aquático, apesar de ser uma espécie de respiração exclusivamente aquática (GODOY, 1975); é altamente tolerante a tensões baixas de O<sub>2</sub> do meio, tem baixo metabolismo aeróbico e apresenta baixa ventilação branquial e uma alta eficiência na extração de O<sub>2</sub> do meio aquático (RANTIN e JOHANSEN, 1984; RANTIN *et al.*, 1992; RANTIN, 1993; KALININ *et al.*, 1993, 1996; MATTIAS *et al.*, 1996), alta afinidade hemoglobina-oxigênio (JOHANSEN *et al.*, 1978), alta capacidade anaeróbica (DRIEDZIC *et al.*, 1978; HOCHACHKA *et al.*, 1978) e extensa área de superfície respiratória (FERNANDES *et al.*, 1993).

A tensão crítica de O<sub>2</sub> (PcO<sub>2</sub>) a 25°C de *H. malabaricus* foi calculada em 18mmHg (RANTIN *et al.*, 1992; KALININ *et al.*, 1993) para animais com peso entre 200 a 500 g, 27-30 mmHg para animais com peso entre 24-100g (KALININ *et al.*, 1993; MATTIAS, *et al.*, 1996) e 21,6 mmHg para animais entre 265 a 565 g quando mantidos em água deionizada (SAKURAGUI *et al.*, 2003). Nessa espécie a alta afinidade hemoglobina-oxigênio e a superfície respiratória podem facilitar o transporte de oxigênio do meio para o sangue (WOOD e LENFANT, 1979).

## **2. OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivo analisar os mecanismos envolvidos nas respostas de traíra, *Hoplias malabaricus* ao estresse osmótico e hipóxico com ênfase a possível ação regulatória do cortisol.

## 2.1. Objetivos específicos

Para analisar os mecanismos envolvidos nas respostas de *H. malabaricus* nas condições acima e o papel do cortisol nessas respostas, o presente estudo teve como objetivos específicos:

- a) Avaliar o nível de estresse, através da alteração na concentração plasmática de cortisol (eixo HHI) e alteração na concentração de glicose e lactato como indicadores de aumento na demanda energética (eixo HSC), provocada pela exposição de *Hoplias malabaricus* à água deionizada e à hipóxia;
- b) Avaliar se ocorre a manutenção do equilíbrio iônico durante exposição à água deionizada, em normóxia e em hipóxia severa e se está associado a um aumento da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no epitélio branquial e, se há correlação entre o aumento da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e a frequência e estado funcional das CC;
- c) Avaliar se a administração de cortisol exógeno pode maximizar ou minimizar as alterações morfofisiológicas em animais mantidos em água deionizada e hipóxia severa.
- d) Avaliar o metabolismo intermediário através da mobilização dos substratos energéticos como glicose, lactato, piruvato, amônia e proteína plasmática (respostas secundárias ao estresse) em água deionizada e hipóxia severa.
- e) Avaliar as alterações no equilíbrio iônico através da osmolalidade e concentração de íons plasmáticos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ ) em água deionizada e hipóxia severa.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Material

No presente estudo foram utilizados exemplares adultos (machos e fêmeas) de traíra, *Hoplias malabaricus*, (BLOCH, 1794) (Fig. 2) com peso entre 200 a 400 g, que foram

coletados na bacia do rio Tietê-Paraná Município de Itirapina São Paulo-SP. Os peixes foram transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do DCF/UFSCar, São Carlos, SP e aclimatados a condições de laboratório por 30 dias em tanque de cimento amianto (1000 L) com fluxo contínuo de água não clorada que abastece o laboratório (poço artesiano). As características são: pH =  $7,3 \pm 0,2$ ; dureza =  $24,5 \pm 0,3 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ; alcalinidade =  $23,75 \pm 1,9 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{CaCO}_3$ ; condutividade =  $8,3 \pm 0,3 \mu\text{S}$  e os íons, em  $\text{mg L}^{-1}$ ,  $\text{Na}^+ = 2,06 \pm 0,03$ ,  $\text{K}^+ = 2,52 \pm 0,004$ ,  $\text{Ca}^{2+} = 4,00 \pm 0,013$ ,  $\text{Cl}^- = 0,5 \pm 0,4$ , aeração constante, temperatura controlada ( $25 \pm 1^\circ \text{C}$ ) e foto período de 12 horas. A alimentação foi de filés de peixes duas vezes por semana.



**Figura 2.** Exemplar de traíra, *Hoplias malabaricus* (foto Prof. Victor de Victor).

### 3.2. Métodos

Após o período de aclimação em laboratório (30 dias) os peixes foram divididos em grupos e submetidos a diferentes experimentos de acordo com os objetivos a serem alcançados. Em todos os experimentos a temperatura foi mantida constante ( $25 \pm 1^\circ \text{C}$ ) por meio de um termostato modelo FAC 104 acoplado a um aquecedor. A alimentação foi suspensa 48 horas antes dos experimentos.

### **3.2.1. Procedimento cirúrgico**

Individualmente, os peixes, foram anestesiados por imersão em um aquário (10 L) contendo Benzocaína a 0,02%, durante 2 minutos. Imediatamente após anestesia, os peixes, foram pesados, colocados em uma mesa cirúrgica com fluxo de água com o mesmo anestésico (0,005%) para manutenção destes e aeração constante das brânquias. Após assepsia do local cirúrgico, uma incisão na região latero-caudal do peixe foi feita para implante de uma cânula (tubo de polietileno P10) na veia ventral. Ao término da cirurgia e sutura da incisão, os peixes, foram colocados em tubos de contenção cilíndricos e perfurados (dimensões: 12 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento), transferidos para um tanque de 80L (sistema experimental) com aeração contínua e fluxo de água constante, permanecendo em recuperação pós-cirúrgica durante 24 horas (segundo teste preliminar do ciclo circadiano do cortisol para a espécie *H. malabaricus*, SAKURAGUI, M.M. e FERNANDES, M.N; dados não publicados), sendo em seguida submetidos ao protocolo experimental.

### **3.2.2. Protocolo experimental 1. Avaliação do estresse provocado pela exposição à água deionizada e administração de cortisol exógeno em normóxia.**

Espécimes de traíra, *H. malabaricus*, após cirurgia de implante das cânulas, foram divididos em 5 grupos (n = 12 cada grupo), mantidos dentro de tubos de contenção e colocados em sistemas experimentais (80L cada) de acordo com o tratamento a ser submetido.

Inicialmente os tanques permaneceram com água que abastece o laboratório e após um período de 24 horas de recuperação cirúrgica dos peixes nesses tanques a água foi substituída por água que abastece o laboratório (com as mesmas características descritas na pág. 13) ou

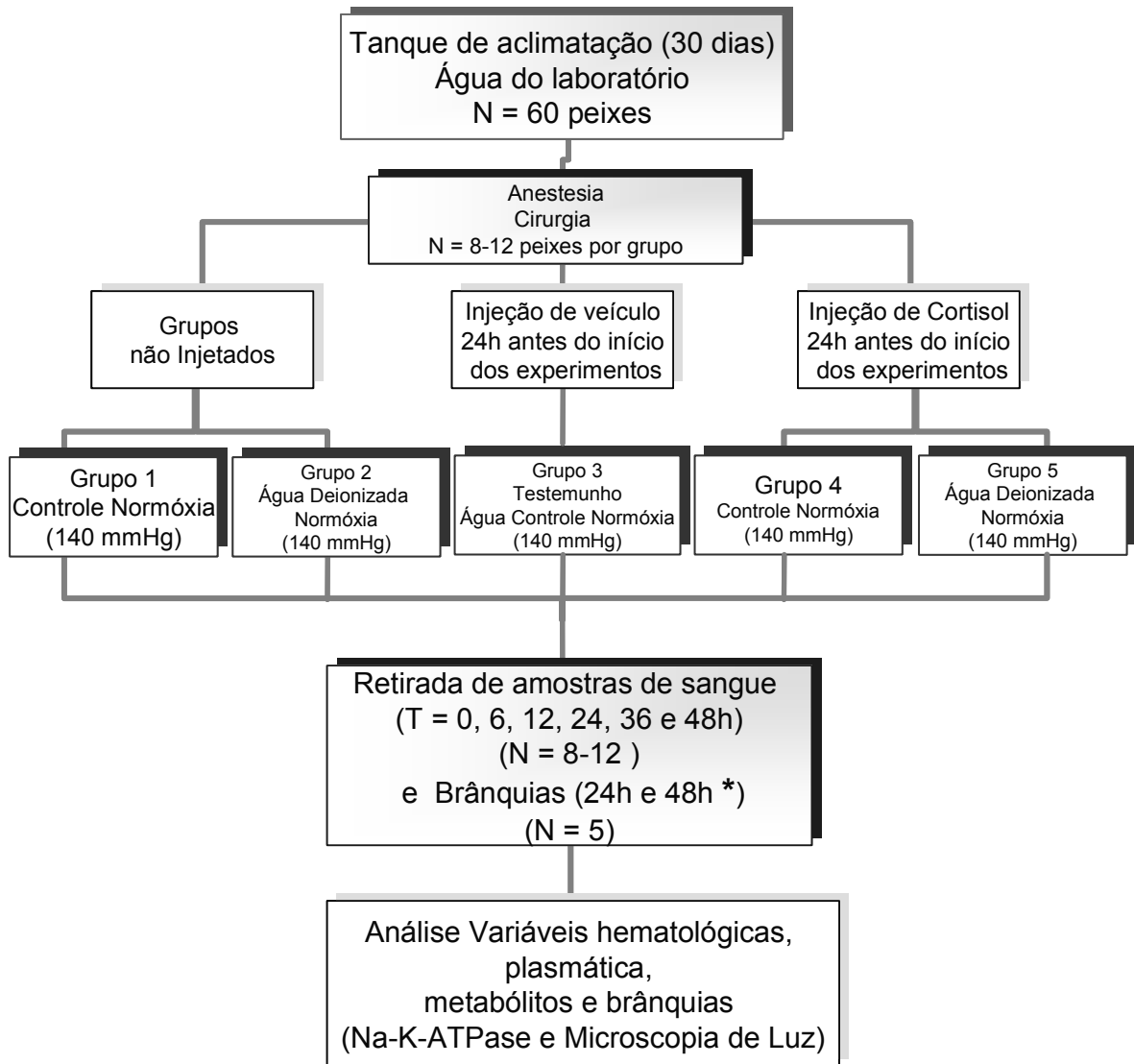
água deionizada (<sup>1</sup>ausência de íons; pH = 6,5 e condutividade máxima: 5µS) em condições normóxicas (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg) (Fig. 2). No **grupo 1 - Controle (C)**: a água foi substituída por água do laboratório; no **grupo 2 - Água deionizada (AD)**: a água do aquário foi substituída por água deionizada, no **grupo 3 - Testemunho (TEST)** no qual foi administrada injeção intraperitoneal do veículo que dissolve o cortisol (óleo de soja comercial) e no **grupo 4 - Cortisol (C+IC)** no qual foi administrada injeção intraperitoneal de cortisol (5 mg/mL por grama de massa corpórea), a água foi substituída por água do laboratório, e no **grupo 5 - Água deionizada + cortisol (AD+IC)** no qual foi administrado injeção intraperitoneal de cortisol (5 mg/mL por grama de massa corpórea) a água foi substituída por água deionizada. Nos peixes dos grupos 4 e 5 foi administrada injeção de cortisol (5 mg/mL por grama de massa corpórea, segundo ARENDS (1999) imediatamente após a cirurgia. A administração do veículo no grupo TEST foi efetuada também imediatamente após a cirurgia. Amostras de sangue de cada peixe (0,5 mL) via cânula foi coletada no tempo 0 (antes do início da substituição da água) e 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a substituição da água dos tanques.

As amostras de sangue total foram utilizadas imediatamente na análise das variáveis hematológicas (pH, hematócrito (Hct) e concentração de hemoglobina [Hb]). O restante das amostras de sangue foram centrifugadas a 12000 rpm em uma centrífuga refrigerada por 3 minutos para separação de células e plasma. O plasma foi retirado com micropipeta e armazenado em ependorfs de 500 µL que foram congelados á - 20 °C para posterior análise da osmolalidade, íons (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>), e metabólitos associados às respostas secundárias ao estresse (cortisol, glicose, lactato, piruvato, amônia e proteína). Os peixes foram dissecados 24 e 48 h após a substituição da água dos aquários e as brânquias foram retiradas para

---

<sup>1</sup> Água deionizada é uma água purificada onde são ausentes todos os componentes orgânicos e inorgânicos inclusive metais pesados. O processo de dionização é feito a partir de um purificador onde a água da torneira passa por um pré-filtro para remover as partículas em suspensão e sedimentos seguindo para uma "câmara declorinadora e removedora de materiais orgânicos". Logo em seguida todos os íons inorgânicos como cálcio, sulfato, carbonato, magnésio, sódio, amônia, nitrito, fósforo, chumbo, cobre e zinco são removidos na câmara de deionização.

determinação da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e análise morfológica em microscopia de luz (ML) através da técnica da imunohistoquímica (Fig. 3).



**Figura 3.** Esquema protocolo experimental 1 (tempos amostrais 0, 6, 12, 24\*, 36 e 48\* horas).

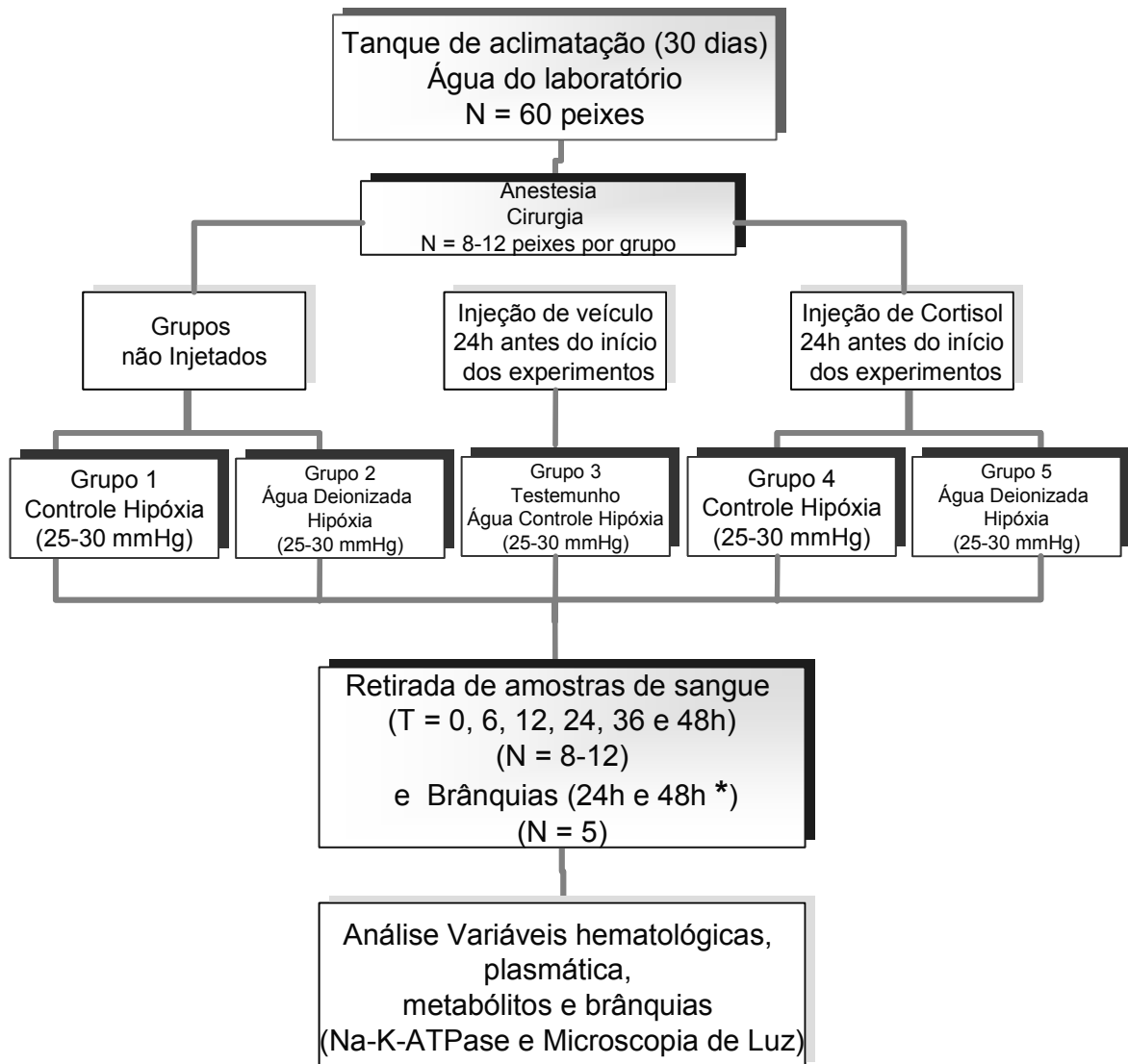
### 3.2.3. Protocolo experimental 2. Avaliação do estresse provocado pela exposição à água deionizada e administração de cortisol exógeno em hipóxia

Espécimes de traíra, *H. malabaricus* foram divididos em 5 grupos (n = 12 cada grupo), mantidos dentro de tubos de contenção e colocados em 5 sistemas experimentais (80L cada), após cirurgia descrita no item 3.2.1 de acordo com o tratamento a ser submetido.

Os tanques permaneceram com água que abastece o laboratório e após um período de 24 horas de recuperação cirúrgica dos peixes nesses tanques a água foi substituída por água do laboratório (cujas características foram citadas na pág. 13) ou água deionizada (ver pág. 15) e submetida a hipóxia cuja pressão parcial de O<sub>2</sub> (PO<sub>2</sub> ~ 25-30 mmHg) foi próxima a tensão crítica determinada para a espécie (RANTIN *et al.*, 1992, KALININ *et al.*, 1996; SAKURAGUI *et al.*, 2003) à 25 °C (Fig. 3). No **grupo 1 - Controle (C)**: a água foi substituída por água do laboratório; no **grupo 2 –Água deionizada (AD)**: a água do aquário foi substituída por água deionizada, no **grupo 3 – Testemunho (TEST)** no qual foi administrada injeção intraperitoneal do veículo que dissolve o cortisol (óleo de soja) e no **grupo 4 – Cortisol (C+IC)** no qual foi administrada injeção intraperitoneal de cortisol, a água foi substituída por água do laboratório, e no **grupo 5 - Água deionizada + cortisol (AD+IC)** no qual foi administrada injeção intraperitoneal de cortisol a água foi substituída por água deionizada (Fig. 4)

As amostras de sangue total foram utilizadas imediatamente para análise das variáveis hematológicas (pH, hematócrito (Hct) e concentração de hemoglobina [Hb]). O restante das amostras de sangue foram centrifugadas a 12000 rpm em uma centrífuga refrigerada por 3 minutos para separação de células e plasma. O plasma foi retirado com micropipeta e armazenado em ependorfs de 500 µL que foram congelados á - 20 °C para posterior análise da osmolalidade, íons (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>), e metabólitos associados às respostas secundárias ao estresse (cortisol, glicose, lactato, piruvato, amônia e proteína). Os peixes foram dissecados 24 e 48 h após a substituição da água dos aquários e as brânquias foram retiradas para determinação da atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e análise morfológica em microscopia de luz (ML) através da técnica da imunohistoquímica (Fig. 4).





**Figura 4.** Esquema protocolo experimental 2 (tempos amostrais 0, 6, 12, 24\*, 36 e 48\* horas).

### 3.2.4. Tensões de oxigênio na água ( $PO_2$ )

Os tanques dos grupos mantidos em normóxia foram continuamente aerados e nos tanques que foram mantidos em hipóxia a tensão de  $O_2$  da água foi reduzida borbulhando-se  $N_2$  na água do tanque até alcançar a  $PO_2$  desejada (25-30 mmHg) em um período de 1 hora. A tensão de  $O_2$  foi, então, monitorada durante todo o experimento, utilizando-se um analisador de  $O_2$  FAC. 204-A acoplado a um sistema regulador de  $O_2$  dissolvido que controlava, por

meio de uma válvula magnética, a fonte de ar comprimido e/ou nitrogênio conectada ao tanque. A informação sobre a  $PO_2$  da água chegava ao instrumento por intermédio de eletrodo de  $O_2$ . Uma  $PO_2$  imediatamente abaixo da que fora selecionada fazia com que fosse aberta a válvula magnética, fornecendo ar comprimido para o tanque. Ao contrário, uma  $PO_2$  imediatamente acima da selecionada, acionava o fechamento da válvula, cortando o fornecimento de  $O_2$  para o aquário.

### **3.2.5. Determinação das Variáveis Hematológicas e Plasmáticas**

#### **3.2.5.1. Amostras de sangue**

As amostras de sangue foram subdivididas e processadas de acordo com as análises que foram efetuadas posteriormente. Sub-amostras de sangue foram utilizadas imediatamente para determinação do pH, hematócrito e concentração de hemoglobina. O sangue remanescente da amostra de cada animal foi centrifugado e o plasma foi congelado e armazenado a  $-20^{\circ}C$  em tubos ependorf de 500  $\mu L$  para posterior análise da osmolalidade, íons, lactato, glicose, cortisol, piruvato e proteínas plasmáticas.

#### **3.2.5.2. pH do sangue**

O pH sanguíneo foi determinado utilizando-se eletrôdo específico para sangue acoplado a um pHmetro Micronal B375 calibrado com padrões de pH de alta precisão. Os valores foram anotados quando o marcador ficava livre de oscilações.

### **3.2.5.3. Hematócrito (Hct)**

A determinação do hematócrito (Hct = %) foi realizada em réplicas aplicando-se o método de microhematócrito com tubo capilar heparinizado de 75 mm, e centrifugado (5 min.) a 12000 rpm em uma centrífuga de microhematócrito FANEN, mod. 207/N para que os eritrócitos contidos no sangue total fossem firmemente concentrados sem hemólise. A porcentagem por volume de eritrócitos contidas numa amostra de sangue total foi medida com o auxílio de um cartão padronizado.

### **3.2.5.4. Dosagem de Hemoglobina Total ([Hb])**

A concentração de hemoglobina ([Hb] = g/100mL) foi determinada a partir de amostras de 10  $\mu$ L de sangue total segundo o método de formação de cianometahemoglobina (reagente de Drabkin) através da adição de ferrocianeto de potássio para a conversão de  $\text{Hb}^- - \text{CN}^-$ . Após agitação, a solução diluída permaneceu em repouso por 15 minutos para que ocorresse a hemólise. O conteúdo do tubo foi colocado em uma cubeta de acrílico. A leitura foi efetuada em 540 nm em um espectrofotômetro SPECTRONIC GENESYS 5.

A determinação da concentração de hemoglobina em gramas por dL de sangue foi feita através da fórmula obtida através da curva padrão.

### **3.2.5.5. Osmolalidade plasmática**

A osmolalidade plasmática foi determinada utilizando um semi-microsmômetro ( $\mu$ OSMETTE PRECISION SYSTEM) que tem como base o ponto de congelamento da solução a ser medida.

### **3.2.5.6. Íons Plasmáticos**

A concentração dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  foi determinada utilizando-se um fotômetro de Chama DIGMED DM-61, após diluição apropriada (1:100) do plasma. A concentração de íons  $\text{Cl}^-$  foi feita utilizando-se Kit Sigma nº 461-3 com absorvância de 490 nm, em uma Leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.). Os íons cloreto reagem com tiocianato de mercúrio formando cloreto mercúrio e íons tiocianato, que reagem com os íons férrico formando tiocianato férrico, de cor amarela, proporcional à concentração de cloretos na amostra. Resultado em mEq/L.

### **3.2.5.7. Cortisol Plasmático**

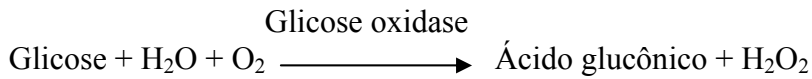
O cortisol plasmático foi determinado utilizando Kit Elisa próprio para leitora de microplaca EIA DSL -10 -2000 ACTIVE com leitura de 450 nm com meio de correção de comprimento de onda de 600 ou 620 nm em uma Leitora de microplacas (descrita acima). O procedimento segue o princípio básico de imuno-ensaio enzimático onde há competição entre um antígeno não marcado e um antígeno enzima-marcado por um número fixo de sítios que se ligam ao anticorpo. A quantidade de ligação de antígeno enzima-marcado pelo anticorpo é inversamente proporcional à concentração do analisado não marcado presente. Materiais não ligados são removidos por decantação e lavagem dos poços. Resultados calculados através de uma curva padrão em ng/mL.

### **3.2.5.8. Glicose Plasmática**

A glicose plasmática foi determinada utilizando Kit da Labteste Cat.34 GLICOSE GOD-ANA (método enzimático colorimétrico de ponto final ou cinético de 2 pontos) com

leitura de 505 nm adaptado para leitura em uma Leitora de microplacas (descrito acima).

Utilizando-se o seguinte princípio:



O peróxido de hidrogênio formado reage com 4-aminoantipirina e fenol, sob ação catalisadora da peroxidase (POD-Doador: hirogênio-peróxido oxidorreductase), através de uma reação oxidativa de acoplamento, formando uma antipirilquinonimina vermelha cuja intensidade de cor é proporcional à concentração da glicose na amostra. Resultado obtido através de fórmula da curva padrão em mg/dL.

### **3.2.6. Preparação de Extratos**

Para lactato, piruvato e amônia 100µl de plasma de cada amostra foi desproteinizada em 1 mL de TCA 20%, centrifugados em ependorfs a 12000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi removido para ser utilizado de acordo com as técnicas a seguir.

#### **3.2.6.1 Lactato Plasmático**

A concentração de lactato plasmático foi determinada nos extratos ácidos de acordo com o método descrito por HARROWER E BROWN (1972). Um volume adequado de extrato foi adicionado a 20 µL de CuSO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O 4% e 3,5 mL de ácido sulfúrico concentrado foi lentamente adicionado pelas paredes do tubo. A amostra foi agitada e posteriormente fervida por 5 minutos. Após a fervura, ela foi totalmente resfriada em banho de gelo, para então se adicionar 80 µL de p-fenilfenol (1,5 g de p-fenilfenol em solução aquosa de NaOH 2%). Após a adição, a amostra foi agitada em vortex e mantida em repouso por 1 hora. Os tubos foram então fervidos por 90 segundos, imediatamente resfriados em banhos de água e a leitura

óptica realizada em 570 nm num espectrofotômetro (BEL SP 1105). As concentrações de lactato foram estimadas através da fórmula da curva padrão. Resultados em nM/mL.

### **3.2.6.2. Piruvato Plasmático**

A determinação do piruvato plasmático nos extratos ácidos foi através do método descrito por LU (1939). Um volume adequado de extrato foi adicionado a 250 µL de dinitrofenilhidrazina 0,1% em HCL 2,0 N. Após 30 minutos de repouso a 37 °C foi adicionado a mistura de reação 3 mL de NaOH 1,3 N e a leitura óptica foi realizada em 440nm num espectrofotômetro (BEL SP 1105). A concentração de piruvato foi estimada pela fórmula da curva padrão. Resultados em nM/mL.

### **3.2.6.3. Amônia Plasmática**

A concentração de amônia foi determinada por nesslerização (GENTZKOW E MASEN, 1942), onde um volume adequado de extrato foi transferido para um tubo com água destilada em um volume final de 2,0 mL e adicionado 0,5 mL de reativo de Nessler. A leitura óptica foi realizada em 420 nm num espectrofotômetro (BEL SP 1105). As concentrações de amônia foram estimadas pela fórmula da curva padrão. Resultados em nM/mL.

### **3.2.7. Determinação de proteína**

A concentração de proteína no plasma e homogenado de tecido branquial foi determinada pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se como padrão protéico albumina sérica bovina. As concentrações foram determinadas em 595 nm em uma Leitora de

microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.) utilizando-se uma curva padrão. Resultados em  $\text{g/dL}^{-1}$ .

### **3.2.8. Análise morfo-funcional do tecido branquial**

As amostras das brânquias foram utilizadas para determinação da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e análise em microscopia de luz com ênfase às células-cloreto. Após a dissecação dos animais, as brânquias foram cuidadosamente removidas e lavadas em solução salina 0,9%. A metade direita das brânquias contendo os quatro arcos branquiais foi utilizada na análise da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, enquanto que a metade esquerda foi fixada para microscopia luz.

#### **3.2.8.1. Determinação da atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase**

Os quatro arcos branquiais foram separados e divididos em dois e escolheu-se aleatoriamente uma das metades de cada arco. Em seguida, os filamentos branquiais foram separados dos arcos e congelados ( $-20^\circ\text{C}$ ) em 1 mL de tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4) para posterior análise. Após serem descongelados, os filamentos branquiais foram homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a 10.000 rpm ( $4^\circ\text{C}$ ). O sobrenadante foi coletado para a determinação de proteína total - Método Bradford (KRUGER, 1994) e da atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. A atividade específica da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi determinada em frações de homogenados pelo método descrito por QUABIUS *et al.* (1997). Em cada poço da microplaca foi colocado 7  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da amostra onde foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de tampão Imidazol contendo 3 mM de  $\text{Na}_2\text{ATP}$  (Vanadium free), pH

7,45. Em 3 poços de cada amostra foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de tampão contendo KCl ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e nos outros 3 poços tampão contendo ouabaína ( $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As amostras com o tampão foram incubadas durante 60 minutos a 25 °C, no escuro. Após a incubação a reação foi interrompida pela adição de 200  $\mu\text{L}$  de uma mistura de 1:1 de TCA 8,6% e o reagente de cor ( $0,66\text{ mM H}_2\text{SO}_4 + 9,2\text{ mM}$  de molibdato de amônia +  $0,33\text{ mM}$  de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em todos os poços inclusive os brancos. A leitura foi feita em 595 nm em uma Leitora de microplacas MRX-HD (DYNEX TECHNOLOGIES, INC.) e a atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{M Pi/mg proteínas/h}$ .

### **3.2.8.2. Determinação da densidade de células-cloreto**

Para determinar o número de CC nas brânquias foi utilizado o método do dissector e imunocitoquímica específica para a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase para a identificação das CC. As amostras de brânquias foram cuidadosamente removidas, lavadas em solução fisiológica e fixadas em Bouin durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram desidratadas em série graduais alcoólicas, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Cortes histológicos de 8  $\mu\text{m}$  de espessura foram montados em lâminas e a parafina foi removida através de banhos consecutivos de xilol. Após hidratação, as lâminas foram lavadas em solução TBS-T (0,05M de tampão Tris em salina com 150 nM de NaCl e 1 mL Triton, pH 7.4). Para o bloqueio de ligações não-específicas, as lâminas foram incubadas durante 20 minutos em 20% NGS (soro de cabra) em TBS-T. Em seguida, foi removido o excesso de tampão com NGS e as lâminas foram incubadas “overnight” com anticorpo primário (alfa 5) para  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase diluídos em TBS-T (1:300) em câmara úmida. Após outra lavagem em TBS-T, foi aplicado o segundo anticorpo GAM (anticorpo de rato) por 1 h em câmara de incubação úmida. As lâminas foram então lavadas em TBS-T (0,05M de tampão Tris em salina com 150 nM de NaCl e 1 mL



Triton, pH 7.4) e incubadas novamente com Peroxidase Antiperoxidase (PAP) de rato em TBS-T por 1 hora em câmara úmida, em seguida lavadas em TB (0,05M de Tris em salina, pH 7.4). As lâminas foram coradas com 3-3'-diaminobenzidina (DAB) em tampão TB (1 mg/mL), durante 10 a 20 minutos. Após lavagem em água corrente e procedimento para montagem as lâminas foram analisadas utilizando um “softwer” C.A.S.T. System para Windows especializado para estereologia em um computador conectado a um microscópio biológico Olympus BX51 modificado para estereologia e acoplado a uma videocâmara.

### **3.2.9. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram apresentados como a média  $\pm$  o erro padrão da média (SEM) e a análise estatística desses dados foram efetuadas utilizando-se o programa GrapPad Instat Versão 3.0 para Windows 95. Os resultados foram avaliados utilizando análise de variância (ANOVA), para estabelecer se as médias dos grupos experimentais foram, ou não estatisticamente iguais. Este tipo de análise não permite detectar quais são as médias estatisticamente diferentes das demais. Assim, nos casos onde houve diferenças significativas entre as médias dos grupos experimentais, aplicou-se o teste de comparações múltiplas de DUNETT ou não paramétrico de KRUSKAL-WALLIS (quando o teste de BARLETT foi significativo para as diferenças entre os desvios).

## 4. RESULTADOS

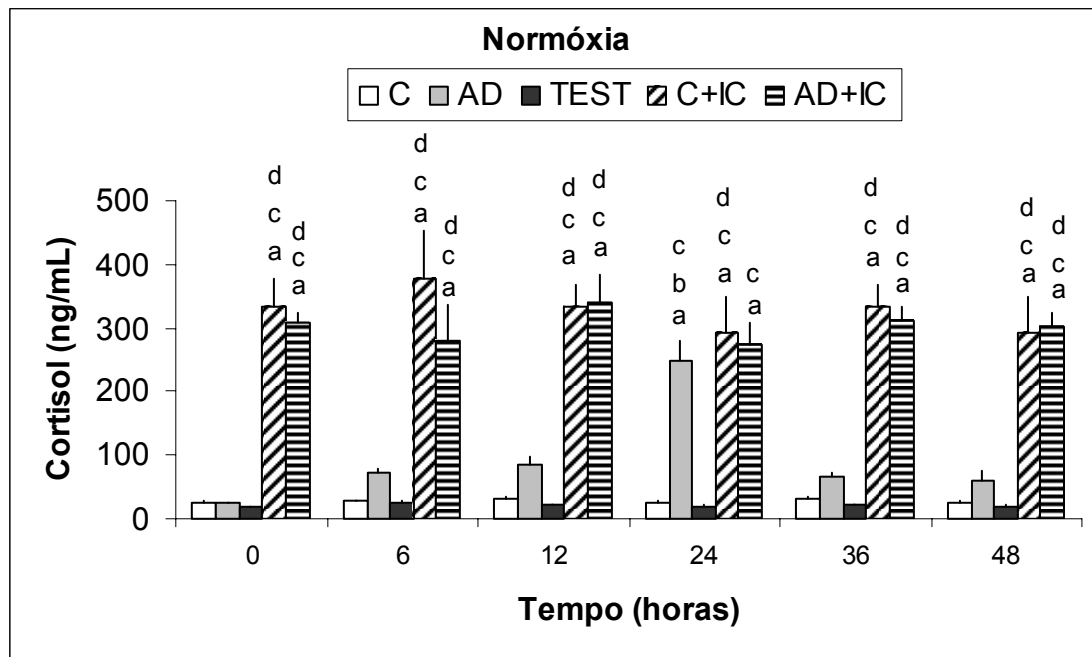
### 4.1. Exposição à água deionizada e administração de cortisol exógeno

#### 4.1.1. Cortisol plasmático

Vinte e quatro horas após implantação da cânula (Tempo 0) a concentração plasmática de cortisol em *H. malabaricus* variou de 17,66 a 24,29 ng/mL em peixes que não receberam injeção de cortisol (Tabela I e Fig. 5). A injeção de cortisol, imediatamente após a implantação da cânula manteve a concentração plasmática de cortisol significativamente maior ( $p < 0,001$ ) desde o início do experimento (24 h após injeção) e durante todo o período experimental tanto no grupo mantido em água controle (C+IC: 11,5 vezes) quanto no grupo mantido em água deionizada (AD+IC: 10,6 vezes), enquanto que a injeção de óleo de soja (veículo para a administração do cortisol) não alterou a concentração de cortisol no grupo TEST (Tabela I e Fig. 5). A concentração plasmática de cortisol, após substituição da água controle por água deionizada, resultou em um aumento de 2 vezes da concentração inicial em 6 horas de exposição (T6), de 3 vezes em 12 horas (T12), atingindo 10,3 vezes em 24h (T24) ( $p < 0,05$ ), concentração esta semelhante a dos peixes dos grupos que foram injetados com cortisol, mas retornou ao nível do grupo controle após 36h de experimento(Tabela I e Fig. 5).

**Tabela I.** Cortisol plasmático (média ± erro) (ng/mL) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados com cortisol (C+IC) e (AD+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

<b>Cortisol (ng/mL)</b>					
<b>TEMPO</b>	<b>C</b>	<b>AD</b>	<b>TEST</b>	<b>C+IC</b>	<b>AD+IC</b>
<b>0</b>	23,95±2,94	24,29±1,33	17,66±1,78	332,79±44,19 (a, c, d)	308,78±16,31 (a, c, d)
<b>6</b>	26,76±2,93	70,95±7,67	25,18±2,90	375,86±77,88 (a, c, d)	280,26±55,34 (a, c, d)
<b>12</b>	32,75±2,31	83,81±12,3	21,27±1,87	332,79±35,81 (a, c, d)	341,1±41,95 (a, c, d)
<b>24</b>	26,29±1,33	249,53±31,44 (a, b, d)	20,13±1,36	291,46±56,18 (a, c, d)	272,8±35,45 (a, c)
<b>36</b>	32,60±2,22	65,58±7,52	21,32±1,90	332,82±31,00 (a, c, d)	312,21±21,18 (a, c, d)
<b>48</b>	26,40±1,40	60,43±13,62	20,00±1,20	291,52±53,00 (a, c, d)	301,83±23,50 (a, c, d)



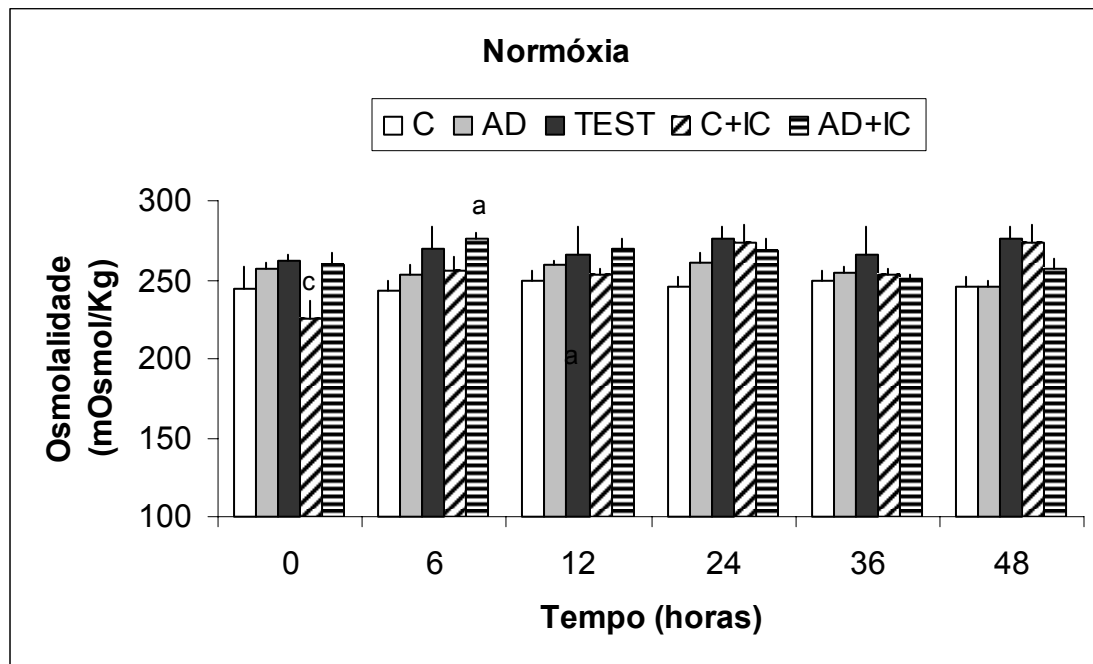
**Figura 5.** Cortisol plasmático (média  $\pm$  erro) (ng/mL) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados com cortisol (C+IC) e (AD+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

#### 4.1.2. Osmolalidade e íons plasmáticos

A osmolalidade plasmática, no grupo controle e no grupo exposto em água deionizada sem injeção de cortisol, manteve-se aproximadamente constante durante o período experimental (Fig. 6). A injeção de veículo (óleo de soja), nos peixes do grupo TEST apesar de ter causado aumento na osmolalidade plasmática, esta não foi considerada significativa. Nos grupos injetados com cortisol o aumento na osmolalidade plasmática foi significativo ( $p < 0,05$ ). Entretanto, nos animais do grupo injetado com cortisol e expostos à água deionizada, retornaram ao nível do grupo controle em 36 horas de exposição (Tabela II e Fig. 6).

**Tabela II.** Osmolalidade plasmática (média  $\pm$  erro) (mOsmol/Kg) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos grupos não injetados C e AD.

Osmolalidade (mOsmol/Kg)					
TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
0	244,00 $\pm$ 13,92	256,73 $\pm$ 4,01	262,25 $\pm$ 3,75	225,40 $\pm$ 10,78 (c)	259,00 $\pm$ 7,51
6	242,67 $\pm$ 6,89	253,27 $\pm$ 5,84	269,25 $\pm$ 14,34	255,80 $\pm$ 8,39	275,36 $\pm$ 4,00 (a)
12	248,86 $\pm$ 6,61	259,64 $\pm$ 2,94	265,25 $\pm$ 18,65	252,60 $\pm$ 4,20	269,29 $\pm$ 6,15
24	245,22 $\pm$ 6,74	260,58 $\pm$ 6,04	275,33 $\pm$ 8,57	273,00 $\pm$ 11,20	268,75 $\pm$ 6,70
36	248,90 $\pm$ 6,00	254,33 $\pm$ 3,89	265,29 $\pm$ 10,20	252,72 $\pm$ 3,98	251,25 $\pm$ 2,44
48	245,30 $\pm$ 6,20	246,17 $\pm$ 2,99	275,40 $\pm$ 7,35	273,40 $\pm$ 10,10	257,00 $\pm$ 6,42



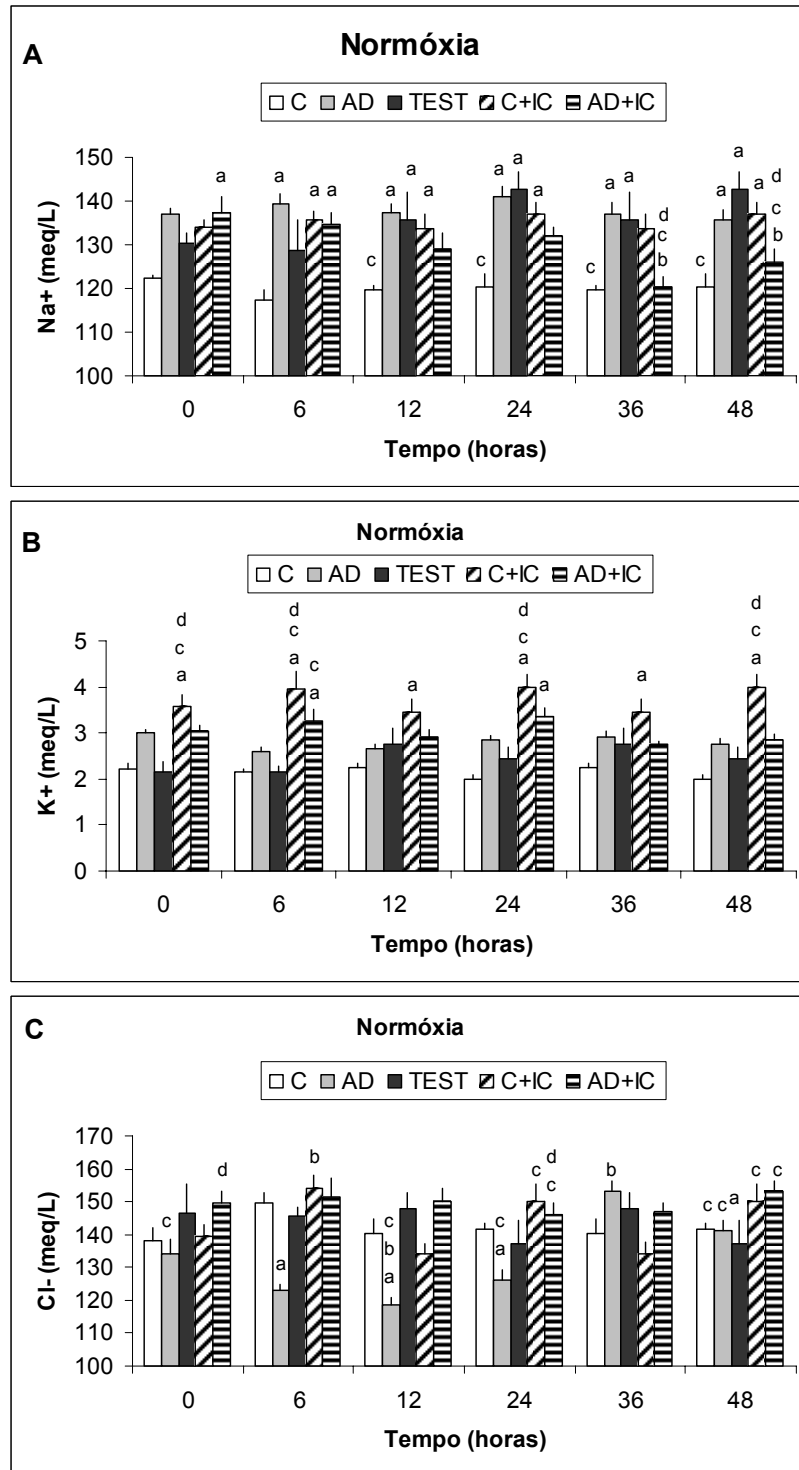
**Figura 6.** Osmolalidade plasmática (média  $\pm$  erro) (mOsmol/Kg) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos grupos não injetados C e AD.

As concentrações dos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  plasmáticos evidenciaram alteração no equilíbrio iônico dos animais expostos à água deionizada, Testemunhos e injetados com cortisol (Fig. 7). A concentração de  $\text{Na}^+$  plasmático aumentou em todos grupos e períodos experimentais em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), mas não entre os grupos expostos à água deionizada, exceto no grupo AD+IC em 36 e 48h ( $p < 0,05$ ). As respostas nos diferentes tratamentos (não injetados, injetados com veículo e com cortisol) mostraram dependência em relação ao tipo de água e em função do tempo (Tabela III e Fig. 7A). A concentração plasmática de  $\text{K}^+$  foi mais alta nos animais injetados com cortisol e mantidos em água controle (C+IC) em relação à concentração do grupo controle (C) ( $p < 0,05$ ), enquanto que, entre os animais mantidos em água deionizada (injetados ou não com cortisol, AD e AD+IC) não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela III e Fig. 7B). A concentração plasmática de  $\text{Cl}^-$  nos animais do grupo controle, AD e TEST foram semelhantes ( $p > 0,001$ ), entretanto foi significativamente menor nos animais expostos à água deionizada entre 4 a 24h de exposição (Tabela III e Fig. 7C). Nos animais injetados com cortisol não houve diferença significativa entre os mantidos em água controle e os em água deionizada (Tabela III e Fig. 7C).

**Tabela III.** Concentração de íons plasmáticos Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> (média ± erro) (meq/L) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

	TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
	<b>Na<sup>+</sup> (meq/L)</b>	0	122,30±0,76	136,86±1,57	130,40±2,29	134,06±1,73
6		117,38±2,19	139,5±2,07 (a)	128,60±7,06	135,54±2,06 (a)	134,55±2,88 (a)
12		119,71±1,02 (c)	137,36±1,88 (a)	135,75±6,41 (a)	133,77±3,19 (a)	129,13±3,46
24		120,38±2,98 (c)	140,90±2,52 (a)	142,75±4,01 (a)	137,08±2,56 (a)	131,90±2,21
36		119,76±1,04 (c)	136,90±2,73 (a)	135,77±6,38 (a)	133,79±3,10	120,20±2,47 (b, c, d)
48		120,40±2,90 (c)	135,73±2,23 (a)	142,78±3,99 (a)	137,10±2,51 (a)	126,10±2,99 (b, c, d)
<b>K<sup>+</sup> (meq/L)</b>	TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
	0	2,22±0,11	3,00±0,07	2,16±0,22	3,59±0,22 (a, c, d)	3,04±0,12
	6	2,14±0,07	2,59±0,09	2,16±0,11	3,97±0,36 (a, c, d)	3,27±0,23 (a, c)
	12	2,25±0,09	2,66±0,09	2,74±0,36	3,46±0,27 (a)	2,90±0,17
	24	2,00±0,10	2,84±0,09	2,45±0,25	3,99±0,29 (a, c, d)	3,35±0,18 (a)
	36	2,26±0,07	2,91±0,14	2,73±0,34	3,47±0,25 (a)	2,75±0,07
48	2,01±0,08	2,76±0,12	2,46±0,23	3,97±0,23 (a, c, d)	2,85±0,13	
<b>Cl<sup>-</sup> (meq/L)</b>	TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
	0	138,15±3,82	134,20±4,33 (c)	146,65±8,86	139,44±3,48	149,60±3,62 (d)
	6	149,50±3,12	122,82±2,17 (a)	145,70±2,44	153,90±4,17 (b)	151,44±5,93
	12	140,30±4,41	118,40±2,36 (a, b, c)	147,88±4,69	134,24±3,19	150,25±3,75
	24	141,62±1,66	126,29±2,90 (a, c)	137,25±6,99	150,19±4,97 (c)	145,92±3,54 (c, d)
	36	140,34±4,30	153,27±3,10 (b)	147,90±4,20	135,00±3,62	147,10±2,44
48	141,65±1,60 (c)	141,28±2,99 (c)	137,30±6,01 (a)	150,21±4,80 (c)	153,03±3,29 (c)	





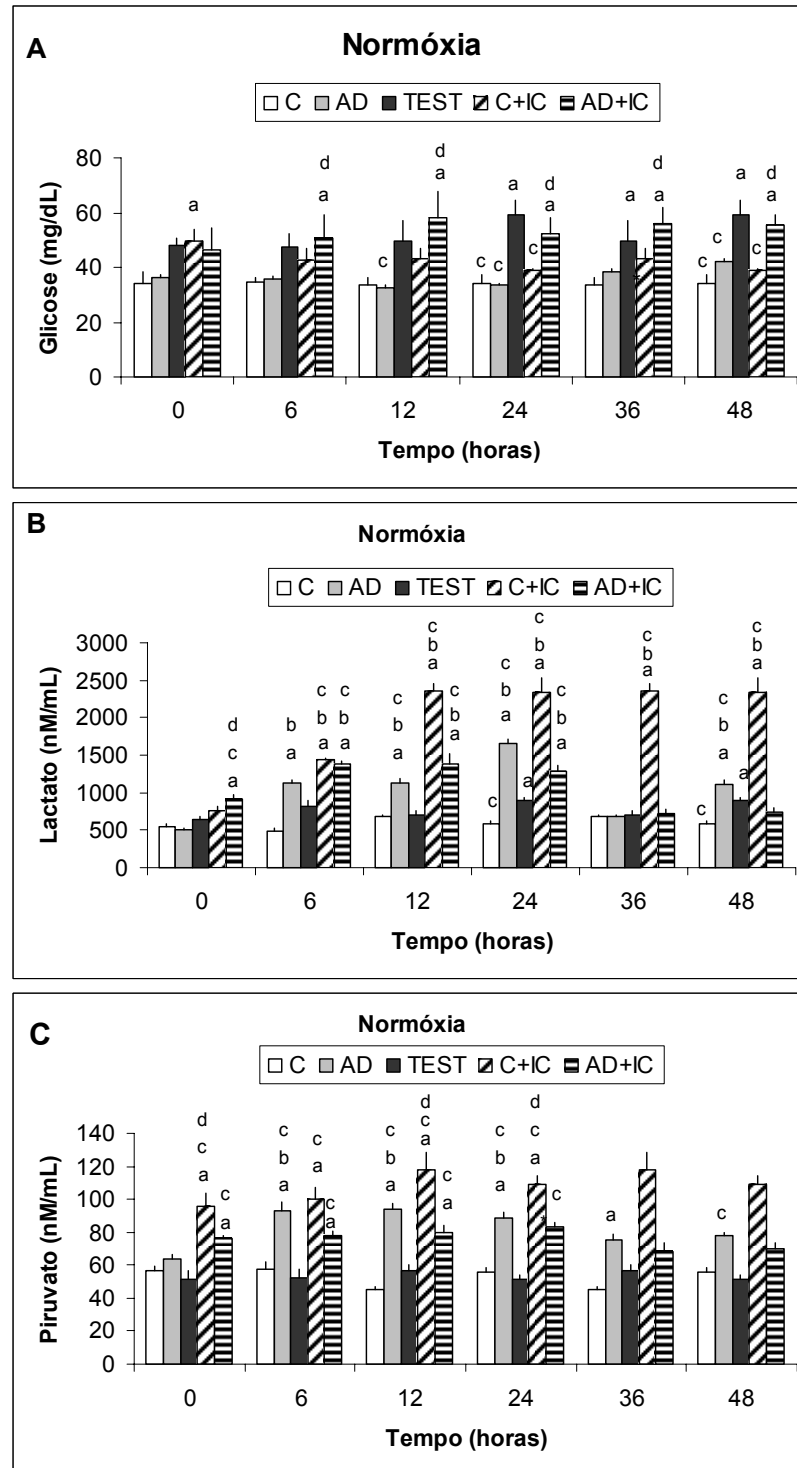
**Figura 7.** Concentração de íons plasmáticos  $\text{Na}^+$  (**A**),  $\text{K}^+$  (**B**) e  $\text{Cl}^-$  (**C**)(média  $\pm$  erro) (meq/L) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $\text{PO}_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

#### 4.1.3. Intermediários metabólicos no plasma

A concentração dos intermediários metabólicos, glicose, lactato e piruvato plasmático são mostrados na Tabela IV e figuras 8A, 8B e 8C respectivamente. Antes do início do experimento (tempo 0) a concentração de glicose dos peixes foi maior nos grupos injetados com cortisol (C+IC e AD+IC) e TEST ( $p < 0,05$ ). A exposição à água deionizada não alterou a concentração da glicose dos peixes não injetados com cortisol independentemente do tipo de água (C ou AD), porém foi significativamente maior nos peixes injetados com cortisol e mantidos em água deionizada (AD+IC) ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8A). A concentração de lactato plasmático foi maior no grupo injetado com cortisol e mantido em água controle durante todo o período experimental ( $p < 0,01$ ), nos animais do grupo injetado com cortisol e mantido em água deionizada 6 horas após o início do experimento até 24 horas ( $p < 0,05$ ), e nos animais do grupo não injetado AD após 6 horas de exposição com um pico em  $T = 24$  horas ( $p < 0,01$ ) retornando aos valores basais em  $T = 36$  horas (Fig. 8B). A concentração de piruvato não foi alterada nos animais do grupo controle e no grupo TEST, entretanto aumentou nos animais expostos à água deionizada não injetados com cortisol ( $p < 0,05$ ) (Fig. 8C). A injeção de cortisol induziu um aumento na concentração de piruvato nos animais injetados com cortisol, independentemente do tipo de água e manteve-se elevado até o final do experimento, apenas o grupo AD+IC se aproximou do valor encontrado para o grupo controle ( $p < 0,05$ ). (Fig. 8C).

**Tabela IV.** Concentração de glicose (mg/dL), lactato e piruvato plasmático (nM/mL) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (C+IC) e (AD+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

Glicose (mg/dL)					
TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
0	34,01 $\pm$ 4,18	36,32 $\pm$ 1,06	48,15 $\pm$ 2,42	49,81 $\pm$ 4,29 (a)	46,16 $\pm$ 8,02
6	34,76 $\pm$ 1,68	35,77 $\pm$ 1,16	47,56 $\pm$ 4,67	42,9 $\pm$ 4,05	50,82 $\pm$ 8,34 (a, d)
12	33,41 $\pm$ 3,00	32,78 $\pm$ 0,92 (c)	49,56 $\pm$ 7,28	43,40 $\pm$ 3,44	57,87 $\pm$ 10,07 (a, d)
24	34,18 $\pm$ 2,99 (c)	33,4 $\pm$ 0,95 (c)	59,01 $\pm$ 5,40 (a)	38,79 $\pm$ 0,67 (c)	52,33 $\pm$ 5,82 (a, d)
36	33,43 $\pm$ 2,90	38,52 $\pm$ 1,14	49,60 $\pm$ 6,00 (a)	43,47 $\pm$ 2,90	56,18 $\pm$ 5,44 (a, d)
48	34,22 $\pm$ 2,10 (c)	42,25 $\pm$ 0,77 (c)	59,12 $\pm$ 4,50 (a)	38,83 $\pm$ 0,45 (c)	55,33 $\pm$ 3,74 (a, d)
Lactato (nM/mL)					
TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
0	536,03 $\pm$ 39,53	506,34 $\pm$ 23,40	651,00 $\pm$ 29,58	754,84 $\pm$ 58,33	920,53 $\pm$ 46,88 (a, c, d)
6	490,61 $\pm$ 35,70	1124,56 $\pm$ 53,05 (a, b)	810,47 $\pm$ 82,10	1433,04 $\pm$ 25,32 (a, b, c)	1374,86 $\pm$ 39,52 (a, b, c)
12	689,85 $\pm$ 17,38	1120,94 $\pm$ 61,61 (a, b, c)	701,51 $\pm$ 59,96	2362,87 $\pm$ 89,31 (a, b, c)	1378,46 $\pm$ 133,51 (a, b, c)
24	580,42 $\pm$ 37,85 (c)	1649,84 $\pm$ 57,44 (a, b, c)	896,79 $\pm$ 46,26 (a)	2329,12 $\pm$ 197,19 (a, b, c)	1280,66 $\pm$ 86,36 (a, b, c)
36	690,00 $\pm$ 15,22	676,34 $\pm$ 31,73	701,70 $\pm$ 55,10	2363,21 $\pm$ 84,04 (a, b, c)	715,58 $\pm$ 69,45
48	580,65 $\pm$ 32,40 (c)	1101,71 $\pm$ 64,43 (a, b, c)	896,88 $\pm$ 44,02 (a)	2332,00 $\pm$ 181,22 (a, b, c)	743,67 $\pm$ 47,88
Piruvato (nM/mL)					
TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
0	56,83 $\pm$ 2,19	63,85 $\pm$ 2,32	51,70 $\pm$ 4,71	95,48 $\pm$ 7,80 (a, c, d)	76,14 $\pm$ 2,02 (a, c)
6	57,25 $\pm$ 4,85	93,08 $\pm$ 5,08 (a, b, c)	52,35 $\pm$ 5,57	100,31 $\pm$ 6,64 (a, c)	77,75 $\pm$ 3,15 (a, c)
12	45,58 $\pm$ 1,74	93,64 $\pm$ 3,99 (a, b, c)	56,83 $\pm$ 3,33	118,25 $\pm$ 9,97 (a, c, d)	79,54 $\pm$ 4,89 (a, c)
24	55,58 $\pm$ 2,50	88,5 $\pm$ 3,79 (a, b, c)	51,27 $\pm$ 2,87	108,92 $\pm$ 5,67 (a, c, d)	83,71 $\pm$ 2,42 (c)
36	45,61 $\pm$ 1,66	75,25 $\pm$ 3,87 (a)	56,87 $\pm$ 2,91	118,42 $\pm$ 5,63	67,81 $\pm$ 6,02
48	55,62 $\pm$ 2,41	77,67 $\pm$ 1,91 (c)	51,33 $\pm$ 1,99	109,01 $\pm$ 4,32	69,61 $\pm$ 3,89



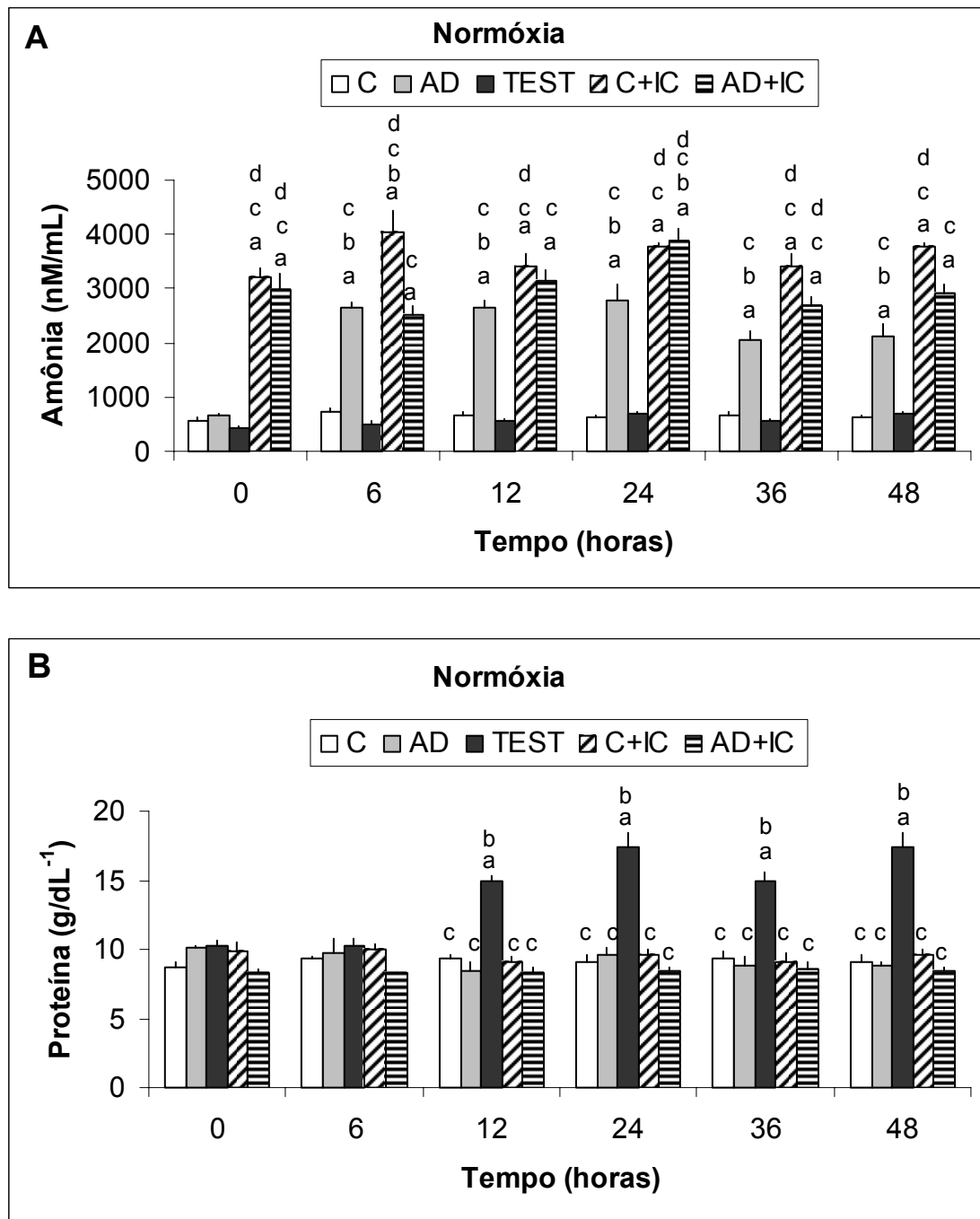
**Figura 8.** Concentração de glicose (mg/dL) (A), lactato (B) e piruvato plasmático (C) (nM/mL) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (C+IC) e (AD+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

O tipo de água presente em cada tratamento influenciou na concentração de amônia plasmática. A concentração de amônia plasmática não foi alterada nos peixes do grupo C e TEST (Tabela V e Fig. 9A). Nos peixes expostos à água deionizada houve um aumento significativo após 6 horas com uma tendência a diminuir a partir de 36 horas de experimento e esses valores foram considerados significativos em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (Fig. 9A). Nos peixes injetados com cortisol e mantidos em água controle ocorreu um aumento da amônia que permaneceu alta durante todo o experimento ( $p < 0,01$ ). Nos peixes que foram injetados com cortisol e expostos à água deionizada o aumento da amônia plasmática foi significativamente maior antes do início do experimento, ou seja, antes da substituição da água do aquário (Tempo 0), 12 e 24h após a substituição da água quando ocorre um pico. Após o pico da amônia plasmática em  $T = 24$  h esta diminui retornando, em  $t = 48$  horas ( $p < 0,05$ ), aos valores encontrados no início do experimento (Tempo 0).

A concentração de proteína plasmática (fig. 9B) não mostrou nenhuma alteração significativa exceto para o grupo TEST nos tempos de 12 a 48 horas de experimento com valores maiores do que os demais grupos C, e experimentais não injetados e injetados com cortisol, em água controle ou água deionizada ( $p < 0,01$ ).

**Tabela V.** Concentração de amônia (nM/mL) e proteína plasmática (g/dL<sup>-1</sup>) (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

<b>Amônia (nM/mL)</b>					
<b>TEMPO</b>	<b>C</b>	<b>AD</b>	<b>TEST</b>	<b>C+IC</b>	<b>AD+IC</b>
<b>0</b>	578,34±61,52	659,44±38,08	438,74±26,71	3200,50±192,41 (a, c, d)	2995,15±282,55 (a, c, d)
<b>6</b>	727,07±55,27	2645,50±101,75 (a, b, c)	509,60±37,19	4051,50±375,40 (a, b, c, d)	2509,06±156,86 (a, c)
<b>12</b>	663,82±65,10	2645,50±127,89 (a, b, c)	572,60±38,57	3408,63±243,81 (a, c, d)	3157,33±173,98 (a, c)
<b>24</b>	637,50±30,03	2791,20±274,05 (a, b, c)	698,50±37,90	3787,88±41,63 (a, c, d)	3889,63±224,06 (a, b, c, d)
<b>36</b>	663,85±55,33	2062,65±163,69 (a, b, c)	573,00±35,40	3408,65±199,30 (a, c, d)	2682,50±159,57 (a, c, d)
<b>48</b>	637,54±24,05	2130,58±205,75 (a, b, c)	698,71±33,90	3787,90±52,34 (a, c, d)	2919,92±164,36 (a, c)
<b>Proteína (g/dL<sup>-1</sup>)</b>					
<b>TEMPO</b>	<b>C</b>	<b>AD</b>	<b>TEST</b>	<b>C+IC</b>	<b>AD+IC</b>
<b>0</b>	8,68±0,37	10,16±0,05	10,29±0,35	9,90±0,62	8,31±0,31
<b>6</b>	9,30±0,21	9,76±0,64	10,29±0,36	10,03±0,39	8,27±0,46
<b>12</b>	9,36±0,51 (c)	8,49±0,57 (c)	14,99±1,02 (a, b)	9,14±0,51 (c)	8,26±0,29 (c)
<b>24</b>	9,12±0,55 (c)	9,55±0,63 (c)	17,43±0,60 (a, b)	9,55±0,55 (c)	8,44±0,50 (c)
<b>36</b>	9,38±0,49 (c)	8,87±0,21 (c)	15,00±0,90 (a, b)	9,16±0,53 (c)	8,54±0,31 (c)
<b>48</b>	9,15±0,37 (c)	8,83±0,45 (c)	17,47±0,58 (a, b)	9,57±0,54 (c)	8,44±0,29 (c)



**Figura 9.** Concentração de amônia (nM/mL) (A) e proteína plasmática (g/dL<sup>-1</sup>) (B) (média ± erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

#### 4.1.4. Variáveis sanguíneas

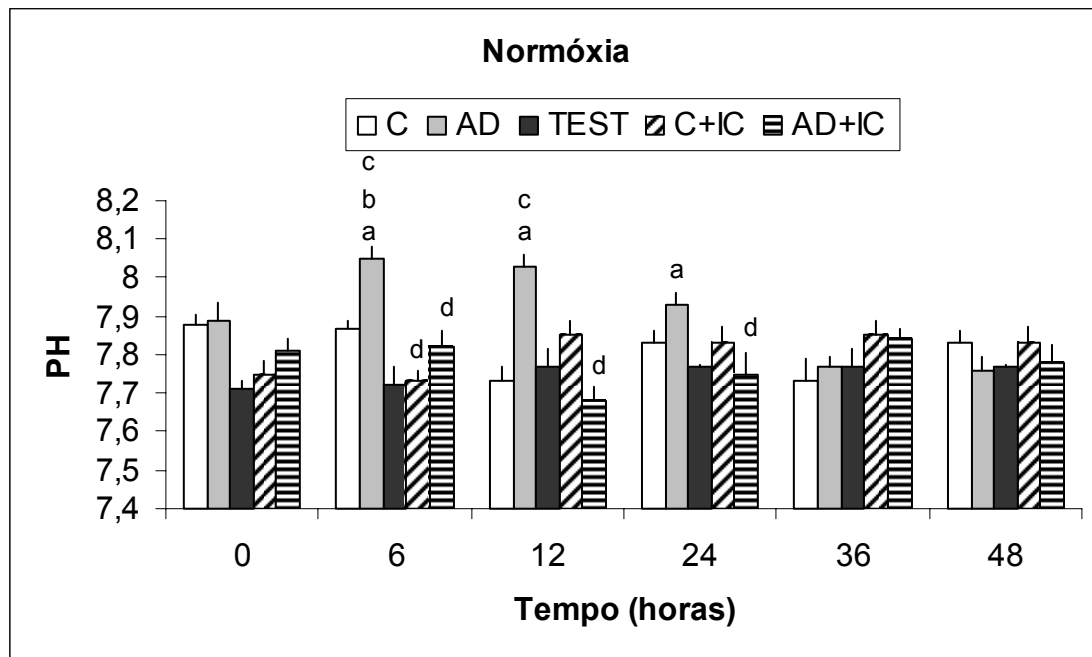
O pH é mostrado na Figura 10 e Tabela 6.

O pH sanguíneo mostrou alterações significativas em relação ao grupo C e TEST e essas alterações dependem do tipo de água e do tempo de exposição, pois em T = 6 a 24 horas os valores de pH foram maiores ( $p < 0,01$ ) no grupo AD. Em relação ao grupo injetado AD+IC nesse mesmo período (T = 6 a 24 horas), os valores de pH foram significativamente menores ( $p < 0,01$ ) do que o do grupo AD não injetado. Nos demais grupos não ocorreram variações significativas.

**Tabela VI.** Valores médios de pH plasmático (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

	TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
pH	0	7,88 $\pm$ 0,03	7,89 $\pm$ 0,04	7,71 $\pm$ 0,03	7,75 $\pm$ 0,03	7,81 $\pm$ 0,03
	6	7,87 $\pm$ 0,02	8,05 $\pm$ 0,03 (a, b, c)	7,72 $\pm$ 0,05	7,73 $\pm$ 0,03 (d)	7,82 $\pm$ 0,04 (d)
	12	7,73 $\pm$ 0,04	8,03 $\pm$ 0,03 (a, c)	7,77 $\pm$ 0,04	7,85 $\pm$ 0,04	7,68 $\pm$ 0,03 (d)
	24	7,83 $\pm$ 0,03	7,93 $\pm$ 0,03 (a)	7,77 $\pm$ 0,01	7,83 $\pm$ 0,04	7,75 $\pm$ 0,05 (d)
	36	7,73 $\pm$ 0,06	7,77 $\pm$ 0,02	7,77 $\pm$ 0,03	7,85 $\pm$ 0,03	7,84 $\pm$ 0,03
	48	7,83 $\pm$ 0,02	7,76 $\pm$ 0,03	7,77 $\pm$ 0,02	7,83 $\pm$ 0,02	7,78 $\pm$ 0,05





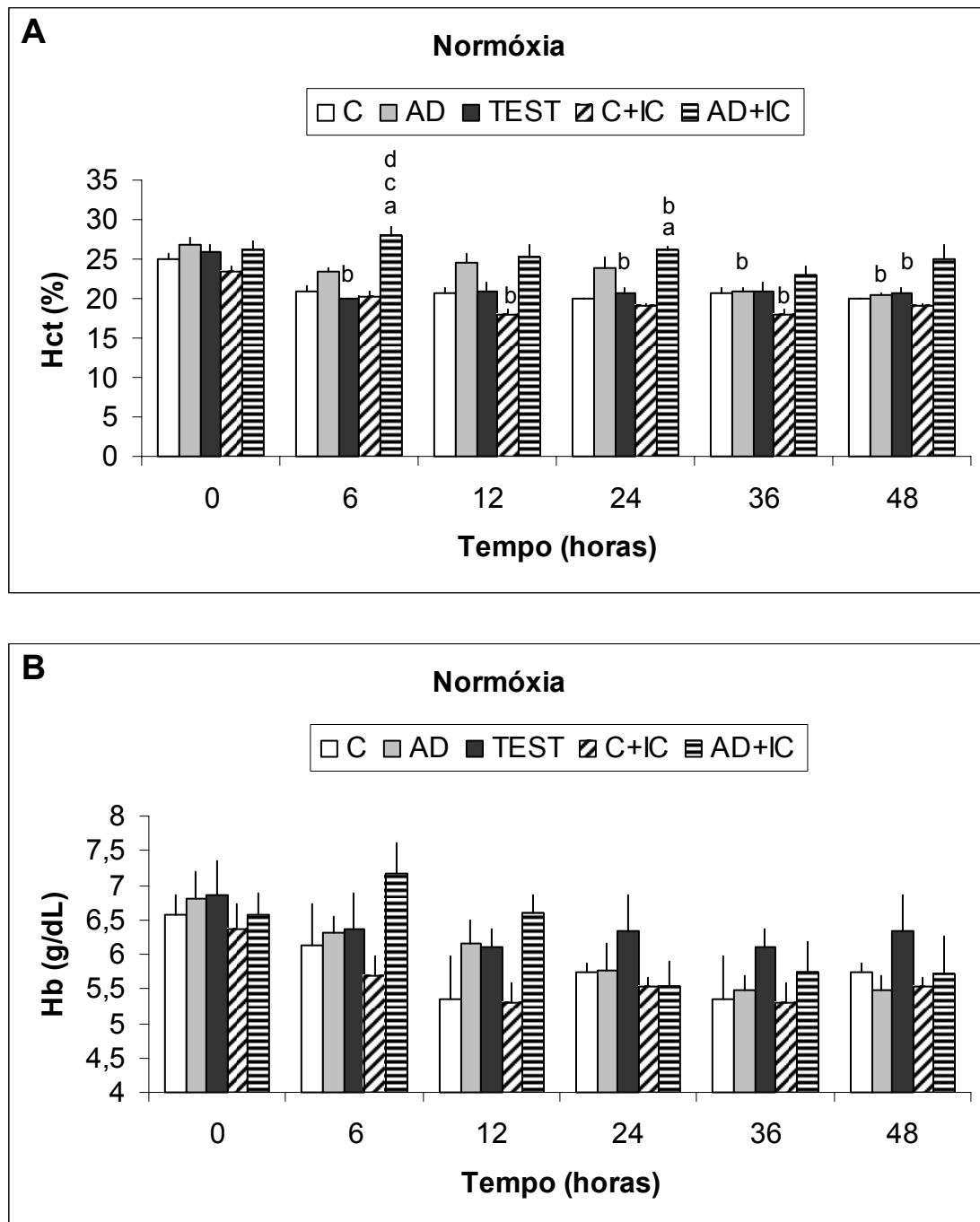
**Figura 10.** Valores médios de pH plasmático (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em todos os tratamentos. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

O Hct e a concentração de Hb são mostrados na Figura 11A e 11B respectivamente e na tabela VII. O Hct aumentou significativamente em relação ao grupo C apenas em T = 6 e 24 horas para o grupo injetado AD+IC ( $p < 0,01$ ). Apesar do Hct ser ligeiramente maior no grupo não injetado AD (T = 6 a 24 horas), essa diferença não foi considerada significativa. Os demais grupos ficam com valores próximos ao do grupo C sem alterações significativas.

A concentração de Hb está ligeiramente aumentada no grupo injetado AD+IC em T = 6 a 12 horas de exposição á AD, mas essa alteração não é considerada significativa. Os outros grupos não tiveram valores considerados significativamente diferentes ao do grupo C ao longo do experimento.

**Tabela VII.** Valores médios de Hct (%) e concentração de Hb (g/dL) do sangue (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

	TEMPO	C	AD	TEST	C+IC	AD+IC
	<b>Hct (%)</b>	0	25,00 $\pm$ 0,58	26,85 $\pm$ 0,78	26,00 $\pm$ 0,87	23,33 $\pm$ 0,73
6		21,00 $\pm$ 0,57	23,5 $\pm$ 0,29	20,00 $\pm$ 0,00 (b)	20,33 $\pm$ 0,58	28,00 $\pm$ 0,98 (a, c, d)
12		20,67 $\pm$ 0,67	24,5 $\pm$ 1,23	21,00 $\pm$ 1,00	18,00 $\pm$ 0,57 (b)	25,33 $\pm$ 1,45
24		20,00 $\pm$ 0,00	23,8 $\pm$ 1,46	20,67 $\pm$ 0,67 (b)	19,17 $\pm$ 0,17	26,22 $\pm$ 0,29 (a, b)
36		20,68 $\pm$ 0,66	20,8 $\pm$ 0,58 (b)	21,20 $\pm$ 0,93	18,50 $\pm$ 0,53 (b)	23,00 $\pm$ 1,16
48		20,05 $\pm$ 0,10	20,5 $\pm$ 0,29 (b)	20,69 $\pm$ 0,52 (b)	19,20 $\pm$ 0,23	25,00 $\pm$ 1,73
<b>Hb (g/dL)</b>		0	6,56 $\pm$ 0,31	6,80 $\pm$ 0,39	6,85 $\pm$ 0,51	6,37 $\pm$ 0,35
	6	6,14 $\pm$ 0,60	6,30 $\pm$ 0,24	6,37 $\pm$ 0,50	5,69 $\pm$ 0,27	7,18 $\pm$ 0,42
	12	5,36 $\pm$ 0,62	6,15 $\pm$ 0,35	6,10 $\pm$ 0,25	5,30 $\pm$ 0,29	6,59 $\pm$ 0,26
	24	5,73 $\pm$ 0,15	5,76 $\pm$ 0,38	6,35 $\pm$ 0,49	5,54 $\pm$ 0,20	5,54 $\pm$ 0,34
	36	5,40 $\pm$ 0,20	5,48 $\pm$ 0,22	6,15 $\pm$ 0,23	5,33 $\pm$ 0,30	5,75 $\pm$ 0,44
	48	5,75 $\pm$ 0,33	5,49 $\pm$ 0,19	6,38 $\pm$ 0,16	5,60 $\pm$ 0,15	5,71 $\pm$ 0,55



**Figura 11.** Valores médios de Hct (%) (A) e concentração de Hb (g/dL) (B) do sangue (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (C), (AD), (TEST), e grupos injetados (AD+IC) e (C+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) em normóxia ( $PO_2 = 140$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença entre os grupos C e experimentais AD, TEST, C+IC e AD+IC. **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental. **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo TEST. **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado C e AD.

## **4.2. Exposição à água deionizada e administração de cortisol exógeno em hipóxia**

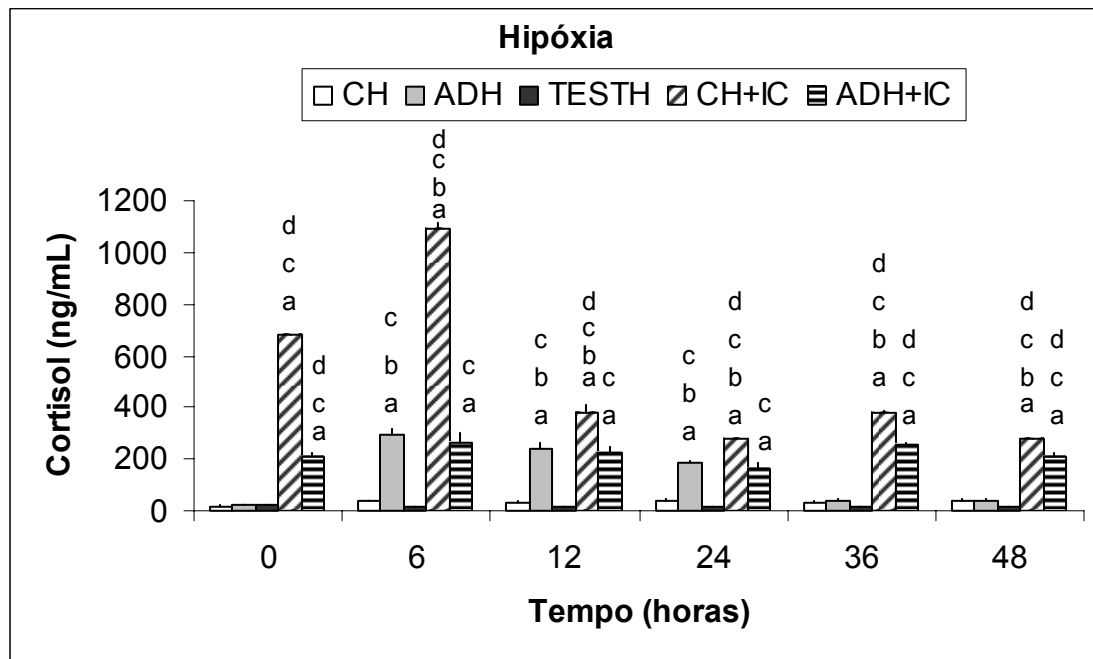
### **4.2.1. Cortisol plasmático**

Os valores médios de cortisol em T= 0 (normóxia, PO<sub>2</sub> = 140 mmHg, 24h após injeção de cortisol) foi mais alto ( $p < 0,05$ ) apenas nos animais que receberam injeção de cortisol, sendo 681,53 ng/mL no grupo CH+IC e 207,4 ng/mL no grupo ADH+IC, enquanto que, no grupo TESTH foi de 22,5 ng/mL semelhante ao do grupo controle (CH). Após a substituição da água e durante exposição a hipóxia (início do experimento) a concentração de cortisol dos grupos CH e ADH aumentaram em 2,17 (117%) e 8,67 vezes (767%), respectivamente. No grupo ADH a concentração de cortisol foi mais alta ( $p < 0,05$ ) entre 6h e 24h após o início do experimento em relação ao grupo CH e TESTH retornando aos valores basais em T = 36h (Tabela VIII e Fig. 12).

Após 6h de exposição a hipóxia ocorreu um pico de cortisol no grupo CH+IC e depois desse período a concentração de cortisol diminuiu e permaneceu estável, porém mais alta que nos animais não injetados (Tabela VIII e Fig. 12). Entretanto no grupo ADH+IC a exposição a hipóxia não modificou os níveis de cortisol após a injeção.

**Tabela VIII.** Concentração de cortisol plasmático (ng/mL) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e injetados com cortisol (CH+IC) e (ADH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos a hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

<b>Cortisol (ng/mL)</b>					
<b>TEMPO</b>	<b>CH</b>	<b>ADH</b>	<b>TESTH</b>	<b>CH+IC</b>	<b>ADH+IC</b>
<b>0</b>	16,98 $\pm$ 2,51	21,75 $\pm$ 2,82	22,50 $\pm$ 4,01	681,53 $\pm$ 90,12 (a, c, d)	207,40 $\pm$ 19,89 (a, c, d)
<b>6</b>	36,90 $\pm$ 5,39	295,60 $\pm$ 21,17 (a, b, c)	16,04 $\pm$ 2,94	1095,03 $\pm$ 131,29 (a, b, c, d)	263,20 $\pm$ 38,34 (a, c)
<b>12</b>	33,87 $\pm$ 5,63	239,50 $\pm$ 25,13 (a, b, c)	14,16 $\pm$ 1,60	382,90 $\pm$ 47,27 (a, b, c, d)	227,07 $\pm$ 19,69 (a, c)
<b>24</b>	42,24 $\pm$ 8,03	188,50 $\pm$ 6,09 (a, b, c)	15,00 $\pm$ 3,57	276,03 $\pm$ 0,00 (a, b, c, d)	164,52 $\pm$ 21,76 (a, c)
<b>36</b>	30,87 $\pm$ 5,61	37,20 $\pm$ 5,85	14,60 $\pm$ 1,30	382,97 $\pm$ 45,30 (a, b, c, d)	253,31 $\pm$ 7,98 (a, c, d)
<b>48</b>	40,24 $\pm$ 8,25	39,66 $\pm$ 4,97	14,00 $\pm$ 2,70	276,50 $\pm$ 6,50 (a, b, c, d)	212,86 $\pm$ 11,41 (a, c, d)



**Figura 12.** Concentração de cortisol plasmático (ng/mL) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e injetados com cortisol (CH+IC) e (ADH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos a hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

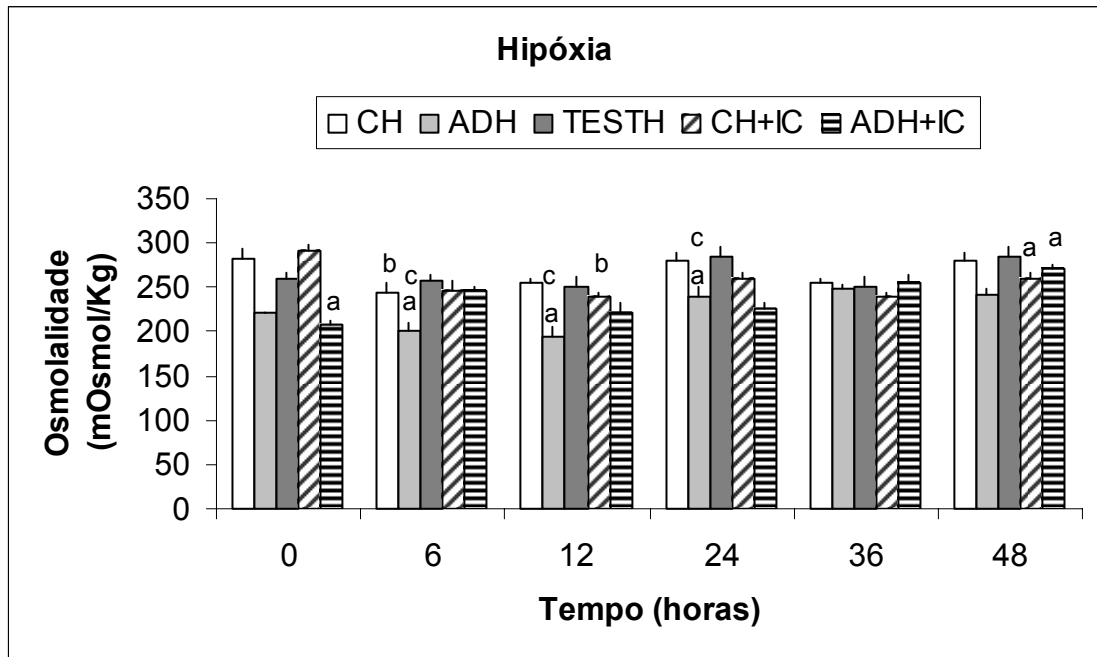
#### 4.2.2. Osmolalidade e íons plasmáticos

A osmolalidade e a concentração dos íons plasmáticos  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$  são mostrados nas Figuras 13 e 14A, B e C, respectivamente e Tabelas IX e X. Imediatamente antes do início do experimento a osmolalidade dos peixes dos grupos ADH e ADH+IC foram menores do que a dos animais do grupo CH. A exposição a hipóxia alterou significativamente a osmolalidade dos grupos experimentais não injetados com cortisol. No grupo controle ocorreu uma diminuição nas primeiras 6 horas com recuperação em 12h, a qual, foi mantida estável até o término do experimento; no grupo ADH foi observada uma diminuição da osmolalidade em 6h e 12h de exposição à água deionizada e hipóxia severa seguida do aumento desta em T = 24h embora ainda tenha permanecido mais baixa que no grupo CH. Não houve modificação da osmolalidade plasmática no grupo testemunho. A osmolalidade plasmática dos grupos que receberam a injeção de cortisol, CH+IC e ADH+IC, manteve-se relativamente constante mostrando algumas variações em relação ao grupo controle e ao tempo 0.

**Tabela IX.** Osmolalidade plasmática (mOsmol/Kg) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

<b>Osmolalidade (mOsmol/Kg)</b>					
<b>TEMPO</b>	<b>CH</b>	<b>ADH</b>	<b>TESTH</b>	<b>CH+IC</b>	<b>ADH+IC</b>
<b>0</b>	281,92 $\pm$ 11,43	220,33 $\pm$ 1,33	258,60 $\pm$ 8,26	290,92 $\pm$ 6,97	206,70 $\pm$ 4,77 (a)
<b>6</b>	243,56 $\pm$ 11,79 (b)	201,33 $\pm$ 9,30 (a, c)	257,00 $\pm$ 7,25	245,5 $\pm$ 11,01	245,60 $\pm$ 6,09
<b>12</b>	254,20 $\pm$ 4,85	193,83 $\pm$ 11,33 (a, c)	251,60 $\pm$ 10,27	239,92 $\pm$ 3,65 (b)	222,25 $\pm$ 10,90
<b>24</b>	280,90 $\pm$ 7,59	238,25 $\pm$ 11,88 (a, c)	284,00 $\pm$ 11,26	259,42 $\pm$ 6,21	226,60 $\pm$ 5,78
<b>36</b>	254,60 $\pm$ 5,95	248,13 $\pm$ 3,82	252,00 $\pm$ 11,29	240,00 $\pm$ 7,36	256,14 $\pm$ 8,38
<b>48</b>	281,00 $\pm$ 3,55	242,72 $\pm$ 5,58	284,60 $\pm$ 7,76	259,68 $\pm$ 7,22 (a)	271,57 $\pm$ 3,65 (a)





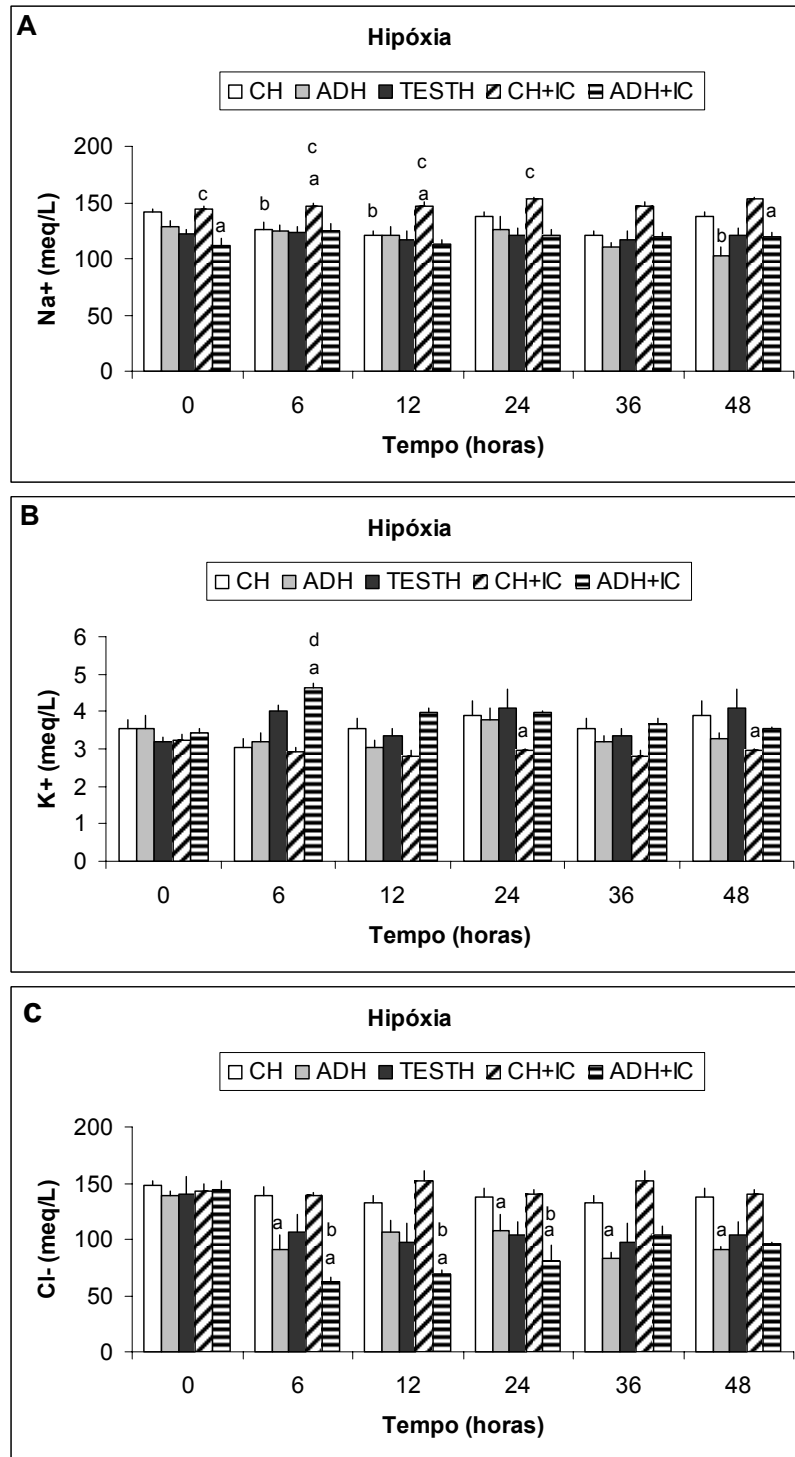
**Figura 13.** Osmolalidade plasmática (mOsmol/Kg) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

Imediatamente antes do início do experimento, a concentração do íon  $\text{Na}^+$  foi menor ( $p < 0,05$ ) em relação ao CH e maior no grupo CH+IC em relação ao grupo TESTH. Entre 6 e 24h após o início do experimento ocorreu uma diminuição da concentração de  $\text{Na}^+$  plasmático no grupo CH e após 48h no grupo ADH. A concentração de  $\text{Na}^+$  plasmático permaneceu relativamente constante nos demais grupos, sendo que no grupo CH+IC foi sempre mais alta ( $p < 0.05$ ). Quanto ao íon  $\text{K}^+$ , a exposição à água deionizada e hipóxia não alterou a concentração desse íon no plasma, exceto um aumento em 6h no grupo ADH+IC e uma diminuição no grupo CH+IC entre 24 e 48h.

A exposição a água deionizada e hipóxia resultou em uma diminuição da concentração do íon  $\text{Cl}^-$  nos grupos ADH e CH+IC nas primeiras 12 horas de experimento. O grupo ADH+IC mostrou uma redução na concentração do íon  $\text{Cl}^-$  entre 6 e 24h de experimento e em seguida os valores ficam próximos ao do grupo controle.

**Tabela X.** Concentração de íons plasmáticos Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> (meq/L) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH, TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

	TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
	<b>Na<sup>+</sup></b> (meq/L)	0	142,00±2,64	128,88±4,68	121,60±4,19	143,83±3,03 (c)
6		126,00±6,8 (b)	124,50±5,55	123,20±5,67	147,08±2,63 (a, c)	125,14±6,1
12		120,7±3,33 (b)	120,20±8,30	116,60±7,53	147,00±3,19 (a, c)	112,50±4,66
24		138,00±3,35	126,00±11,57	121,40±5,46	153,09±1,35 (c)	120,60±5,71
36		121,00±2,81	110,38±3,67	116,98±6,98	147,20±2,88	119,20±4,51
48		138,60±2,98	102,43±7,58 (b)	121,80±4,89	153,00±1,60	119,50±3,84 (a)
<b>K<sup>+</sup></b> (meq/L)	TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
	0	3,54±0,25	3,55±0,35	3,18±0,14	3,23±0,14	3,41±0,17
	6	3,02±0,25	3,18±0,24	4,03±0,14	2,92±0,12	4,64±0,37 (a, d)
	12	3,53±0,29	3,02±0,20	3,36±0,19	2,82±0,15	3,96±0,48
	24	3,88±0,42	3,78±0,31	4,10±0,49	2,96±0,05 (a)	3,96±0,39
	36	3,54±0,27	3,19±0,16	3,38±0,17	2,86±0,12	3,65±,36
	48	3,90±0,36	3,29±0,15	4,20±0,43	2,98±0,07 (a)	3,54±0,17
<b>Cl<sup>-</sup></b> (meq/L)	TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
	0	147,76±4,21	138,84±4,44	140,65±14,58	142,28±6,85	143,69±8,37
	6	138,39±8,53	90,44±13,40 (a)	106,96±15,46	138,54±3,28	62,47±3,74 (a, b)
	12	132,59±6,31	106,03±11,15	97,65±16,92	152,07±8,89 (c)	69,04±3,65 (a, b)
	24	138,18±7,54	107,80±14,27 (a)	103,85±11,83	140,56±3,13	80,88±13,96 (a, b)
	36	132,62±5,41	83,12±5,41 (a)	97,67±14,88	152,15±7,56	103,73±8,31
	48	138,33±6,33	90,79±3,12 (a)	103,92±10,34	140,60±2,59	96,37±1,60



**Figura 14.** Concentração de íons plasmáticos Na<sup>+</sup> (A), K<sup>+</sup> (B) e Cl<sup>-</sup> (C) (meq/L) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH, TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

#### 4.2.3. Intermediários metabólicos no plasma

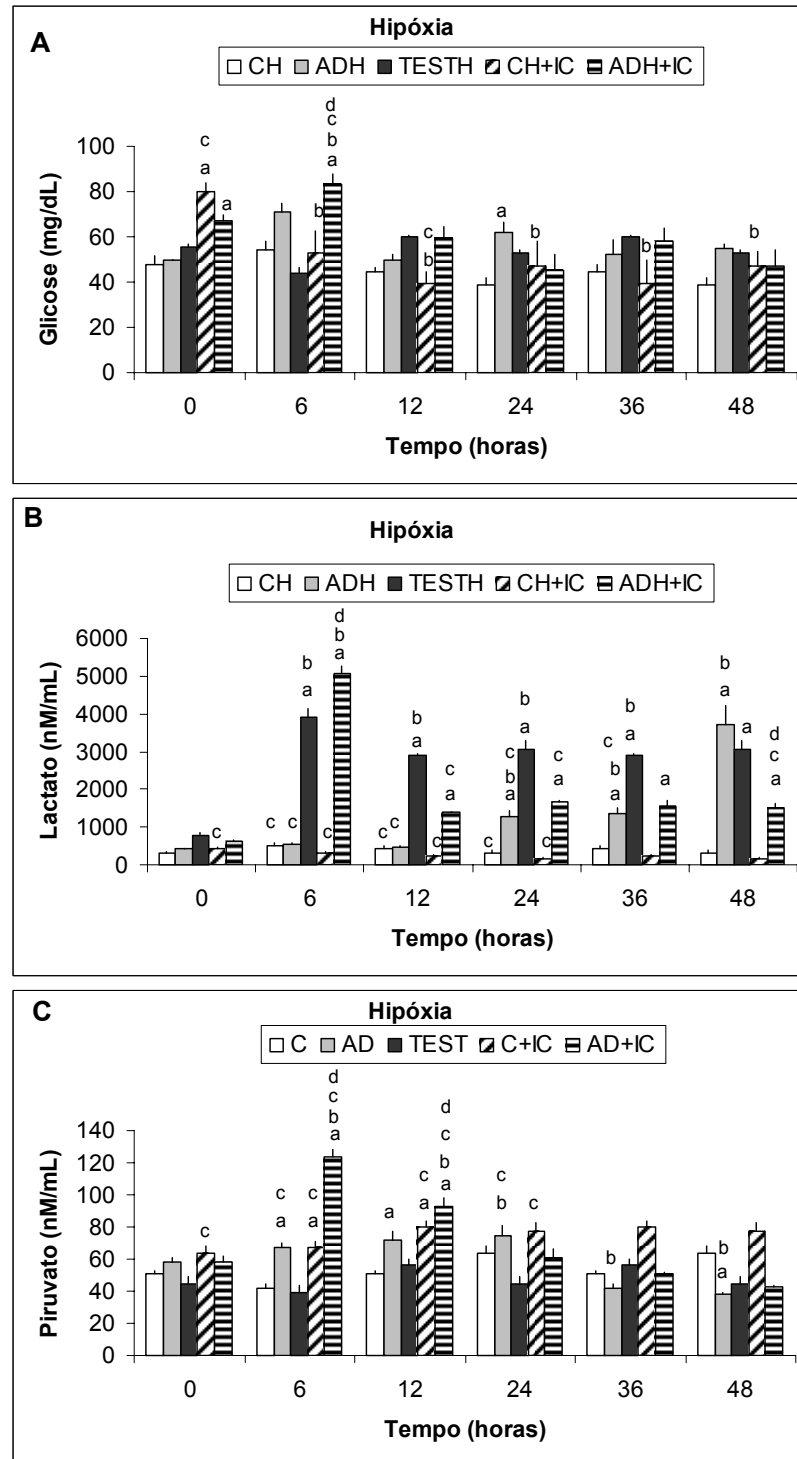
Os intermediários metabólicos: glicose, lactato e piruvato são mostrados na e Tabela XI e nas figuras 15 A, B e C, respectivamente. A concentração de glicose plasmática foi maior nos grupos CH+IC e ADH+IC imediatamente antes do início do experimento (Fig 15A). Seis horas após a substituição da água (C ou AD) e exposição a hipóxia, a glicose plasmática aumentou nos grupos ADH e ADH+IC seguida de diminuição após 12h permanecendo constante até o final do período experimental (Fig 15A). A hipóxia não induziu alteração na glicemia do grupo TESTH, entretanto, no grupo CH+IC ocorreu uma diminuição da glicemia após 12h de experimento e em seguida a glicemia foi mantida próxima aos valores do grupo controle (Fig 15A).

A concentração do lactato plasmático (Fig. 15B) teve um pico nos grupos TESTH e ADH+IC 6h após o início do experimento. No período restante ocorreu uma redução na concentração de lactato nos dois grupos embora sua concentração tenha se mantido alta ( $p < 0,05$ ) durante todo o experimento (Fig. 15B). No grupo ADH o lactato aumentou significativamente após 12 horas e permaneceu alto até o término do experimento (48h). Não houve variações significativas para os grupos CH e CH+IC durante todo o experimento (Fig. 15B).

A concentração de piruvato plasmático, antes do início do experimento, foi mais alta no grupo CH+IC em relação ao grupo TESTH ( $p < 0,05$ ) (Fig. 15C). Seis e doze horas após o início do experimento a concentração de piruvato plasmático foi maior nos grupos ADH, CH+IC e ADH+IC em relação ao controle (CH), mas não foi diferente do tempo 0, exceto o grupo ADH+IC. Após 24h, apenas o grupo ADH permaneceu mais alto em relação ao tempo 0 e mostrou uma redução significativa no período restante (Fig. 15C). Os grupos CH e TESTH não apresentaram alterações significativas durante o período experimental (Fig. 15C).

**Tabela XI.** Concentração de glicose (mg/dL), lactato e piruvato plasmático (nM/mL) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (CH+IC e ADH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

Glicose (mg/dL)					
TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
0	47,42±3,49	49,61±3,58	55,63±8,81	80,16±6,42 (a, c)	66,96±5,24 (a)
6	54,30±2,98	71,10±5,22	44,06±10,53	53,00±5,44 (b)	83,33±3,12 (a, b, c, d)
12	44,71±4,58	49,51±10,66	59,74±7,97	39,62±7,16 (b, c)	59,65±2,70
24	38,68±5,99	61,75±10,41 (a)	53,14±4,58	47,22±4,20 (b)	45,28±3,31
36	44,76±2,10	52,56±6,50	59,78±5,11	39,66±6,54 (b)	58,24±3,70
48	38,72±3,43	54,71±5,93	53,16±4,44	47,28±3,92 (b)	46,88±2,75
Lactato (nM/mL)					
TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
0	322,25±37,95	410,24±30,00	788,32±54,32	431,62±19,63 (c)	614,00±55,24
6	494,71±93,52 (c)	530,03±49,96 (c)	3920,10±232,55 (a, b)	298,85±35,37 (c)	5073,05±176,77 (a, b, d)
12	426,91±62,41 (c)	473,05±30,71 (c)	2892,60±45,23 (a, b)	250,18±16,74 (c)	1383,86±13,22 (a, c)
24	322,54±56,88 (c)	1258,57±186,16 (a, b, c)	3060,70±212,00 (a, b)	172,62±10,31 (c)	1681,18±36,16 (a, c)
36	426,94±58,20	1373,42±131,70 (a, b, c)	2893,00±47,12 (a, b)	250,00±13,42	1565,40±127,07 (a)
48	322,58±51,51	3734,18±473,00 (a, b)	3060,85±185,00 (a)	172,73±9,40	1527,43±104,90 (a, c, d)
Piruvato (nM/mL)					
TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
0	51,01±1,30	57,85±3,09	44,32±2,50	63,67±4,41 (c)	58,53±2,92
6	41,65±2,48	67,42±2,21 (a, c)	39,54±2,02	67,14±3,85 (a, c)	123,61±4,99 (a, b, c, d)
12	50,50±2,56	72,12±4,86 (a)	55,99±3,50	79,58±3,70 (a, c)	92,88±5,73 (a, b, c, d)
24	64,05±3,79	74,36±6,18 (b, c)	44,21±1,38	77,64±4,91 (c)	61,36±4,82
36	50,55±2,42	41,51±3,06 (b)	56,02±2,82	79,62±3,51	50,86±0,85
48	64,12±2,99	38,16±1,37 (a, b)	44,40±1,23	77,67±3,77	43,08±0,87



**Figura 15.** Concentração de glicose (mg/dL) (A), lactato (B) e piruvato plasmático (C) (nM/mL) (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (CH+IC e ADH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo  $t = 0$  em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

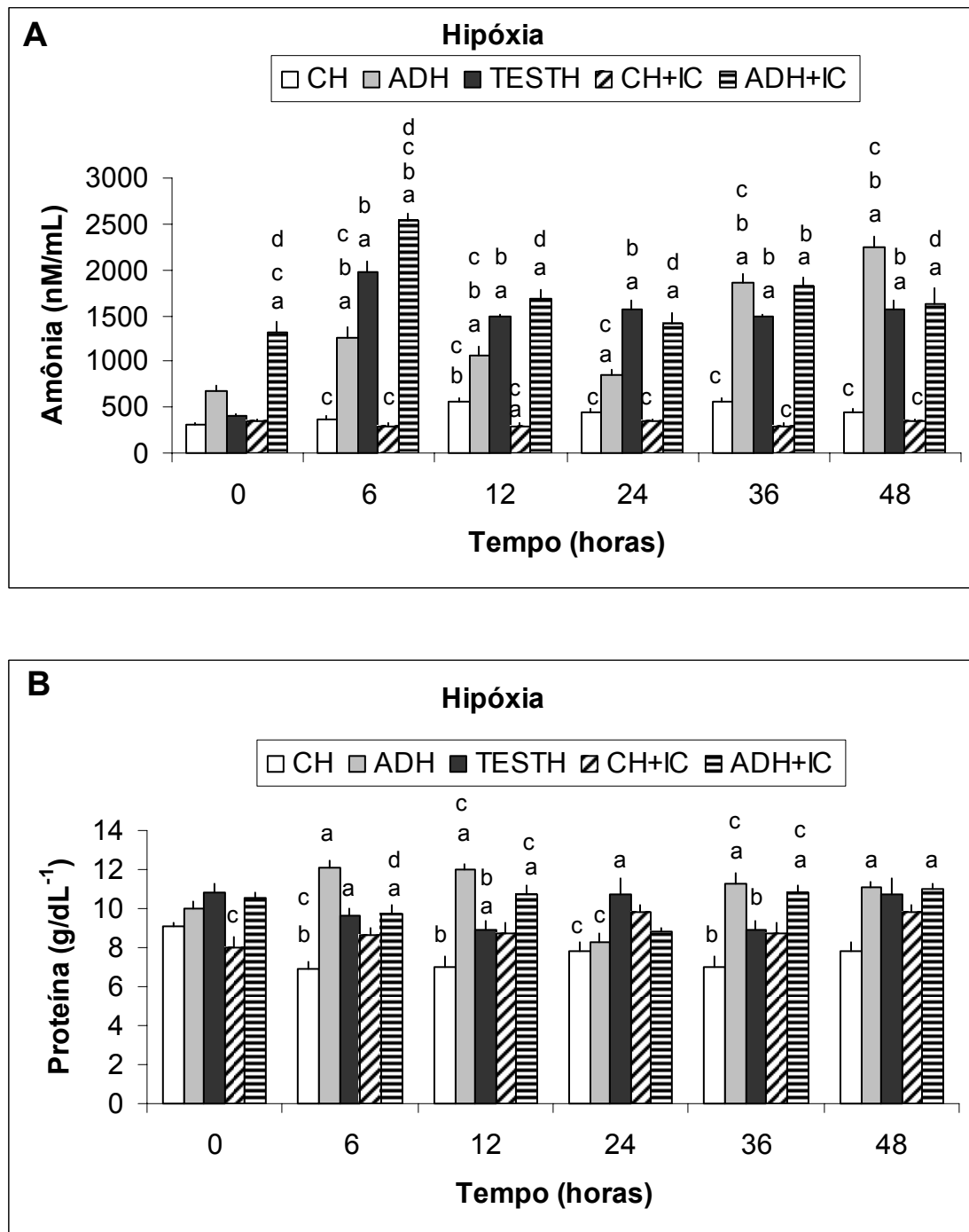
As concentrações de amônia e proteína plasmática são mostradas na Tabela XII e Figura 16 A e B, respectivamente. A concentração de amônia no plasma foi mais alta ( $p < 0,05$ ) no grupo ADH+IC antes do início do experimento e aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) nos grupos ADH, TESTH e ADH+IC nas primeiras 6 horas de experimento (16A). Em 12h, nos grupos TESTH e ADH+IC ocorreu uma diminuição na concentração de amônia, embora ainda tenha se mantido significativamente mais alta que no tempo 0 e permaneceu inalterada até o final do experimento. A concentração de amônia plasmática no grupo ADH aumentou continuamente até 48h quando o experimento foi encerrado.

A concentração de proteína plasmática em *H. malabaricus* em água controle e hipóxia severa diminuiu após 6 horas nos peixes do grupo CH e permaneceu baixa até 48h. Nos animais do grupo TESTH, CH+IC e ADH+IC a concentração de proteína plasmática variou durante todo o experimento e, em geral foi mais elevada que a do respectivo controle (CH) (Fig. 16B). O grupo CH+IC não teve variações significativas.



**Tabela XII.** Concentração de amônia (nM/mL) e proteína plasmática (g/dL<sup>-1</sup>) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

Amônia (nM/mL)					
TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
0	305,25±17,01	686,06±44,43	408,6±22,04	349,65±27,35	1323,77±107,72 (a, c, d)
6	377,40±24,19 (c)	1259,77±116,73 (a, b, c)	1972,1±108,76 (a, b)	298,64±28,38 (c)	2541,9±78,24 (a, b, c, d)
12	555,00±36,39 (b, c)	1072,5±95,23 (a, b, c)	1491,56±21,15 (a, b)	297,32±27,04 (a, c)	1688,76±86,76 (a, d)
24	449,55±26,59 (c)	854,6±64,51 (a, c)	1570,2±99,15 (a, b)	356,13±11,73 (c)	1414,11±117,44 (a, d)
36	554,98±27,08 (c)	1862,33±102,02 (a, b, c)	1492,00±33,13 (a, b)	296,99±22,32 (c)	1813±101,89 (a, b)
48	500,00±25,56 (c)	2238,5±115,33 (a, b, c)	1570,75±56,97 (a, b)	356,45±9,78 (c)	1621,83±175,86 (a, d)
Proteína (g/dL <sup>-1</sup> )					
TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
0	9,1±0,22	10,03±0,37	10,82±0,48	7,98±0,58 (c)	10,55±0,30
6	6,9±0,40 (b, c)	12,06±0,40 (a)	9,66±0,31 (a)	8,65±0,38	9,7±0,47 (a, d)
12	7,04±0,48 (b)	12,04±0,26 (a, c)	8,87±0,49 (a, b)	8,73±0,56	10,7±0,44 (a, c)
24	7,84±0,43 (c)	8,31±0,41 (c)	10,70±0,88 (a)	9,82±0,35	8,83±0,20
36	7,00±0,38 (b)	11,23±0,55 (a, c)	8,90±0,38 (b)	8,70±0,43	10,78±0,40 (a, c)
48	7,86±0,41	11,09±0,31 (a)	10,75±0,77	9,85±0,31	11,01±0,30 (a)



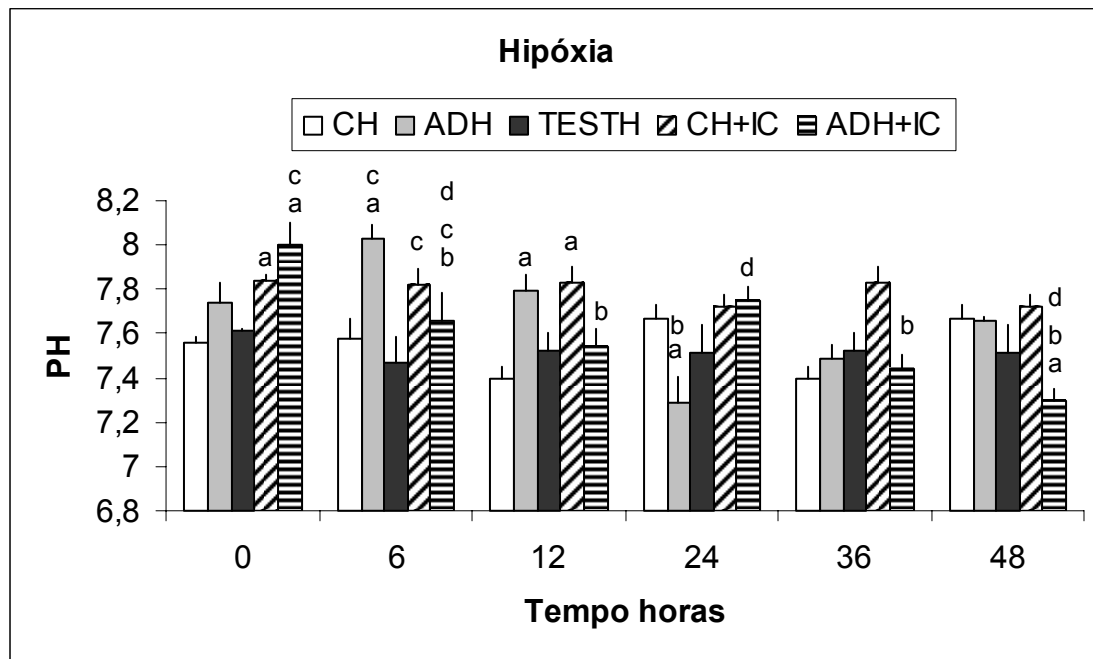
**Figura 16.** Concentração de amônia (nM/mL) (A) e proteína plasmática (g/dL<sup>-1</sup>) (B) (média ± erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg). **a:** (p < 0,05) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:** P < 0,05 indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** (p < 0,05) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

#### 4.2.4. Variáveis sanguíneas

Os valores do pH sanguíneo são mostrados na Tabela XIII e Figura 17. No Tempo 0 apenas os grupos injetados com cortisol tinham o pH sanguíneo mais alto que os demais grupos. O pH aumentou nas primeiras 6 horas de experimento no grupo ADH e após esse período diminuiu em 24h mantendo-se constante até o final do experimento. O grupo TESTH e CH+IC mantiveram os valores de pH aproximadamente constante, enquanto que, o grupo ADH+IC diminuiu o pH após 12 horas de exposição à hipóxia severa e 36 horas quando continua a diminuir novamente até o fim do experimento ( $p < 0,05$ ).

**Tabela XIII.** Valores médios de pH plasmático (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

	TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
pH	0	7,56 $\pm$ 0,03	7,74 $\pm$ 0,09	7,61 $\pm$ 0,01	7,84 $\pm$ 0,03 (a)	8,00 $\pm$ 0,10 (a, c)
	6	7,58 $\pm$ 0,08	8,025 $\pm$ 0,06 (a, c)	7,47 $\pm$ 0,11	7,82 $\pm$ 0,07 (c)	7,66 $\pm$ 0,13 (b, c, d)
	12	7,40 $\pm$ 0,05	7,79 $\pm$ 0,08 (a)	7,52 $\pm$ 0,09	7,83 $\pm$ 0,07 (a)	7,54 $\pm$ 0,08 (b)
	24	7,67 $\pm$ 0,06	7,29 $\pm$ 0,11 (a, b)	7,51 $\pm$ 0,13	7,72 $\pm$ 0,06	7,75 $\pm$ 0,06 (d)
	36	7,42 $\pm$ 0,04	7,49 $\pm$ 0,06	7,53 $\pm$ 0,06	7,82 $\pm$ 0,05	7,44 $\pm$ 0,07 (b)
	48	7,68 $\pm$ 0,05	7,66 $\pm$ 0,01	7,52 $\pm$ 0,08	7,73 $\pm$ 0,04	7,30 $\pm$ 0,05 (a, b, d)



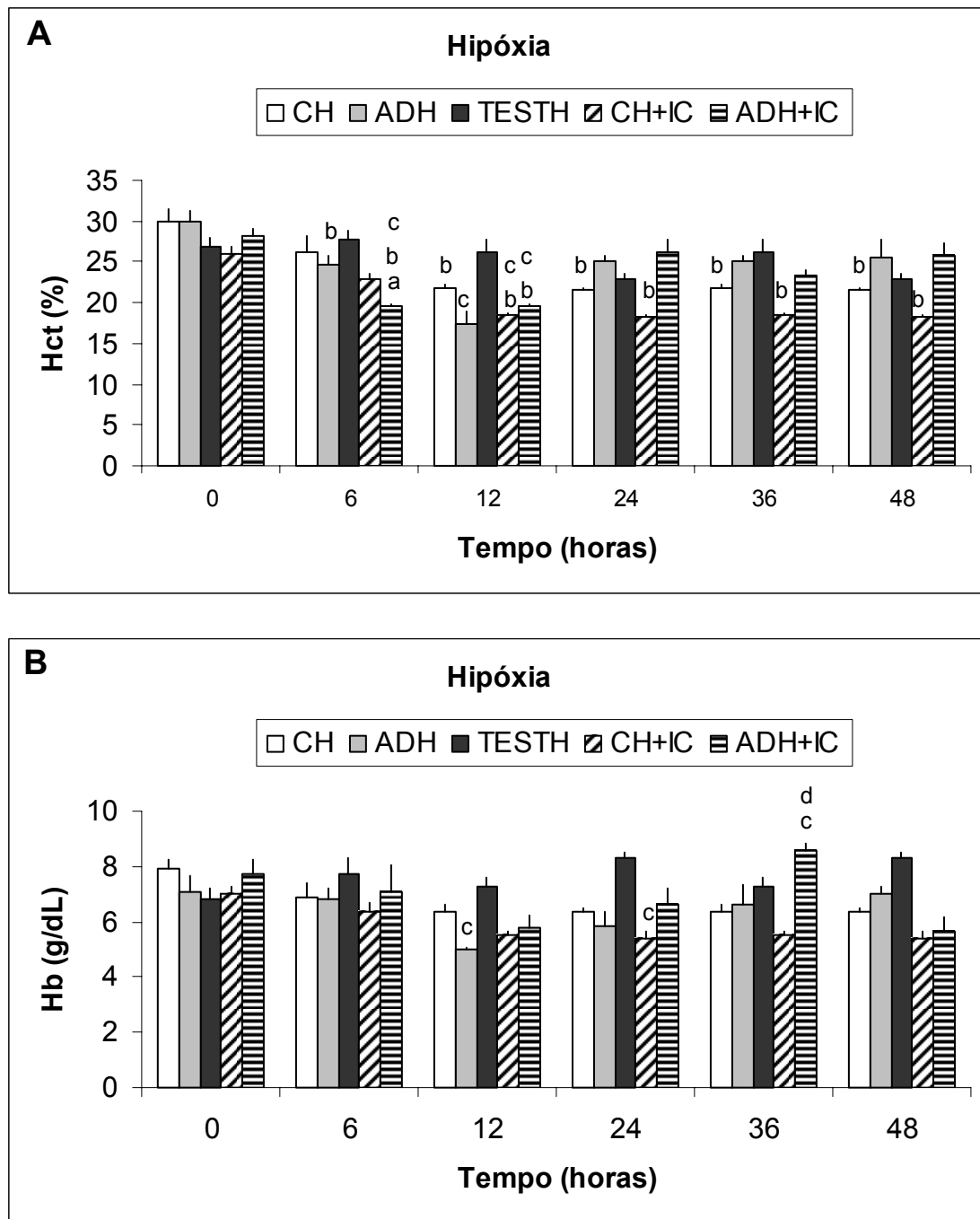
**Figura 17.** Valores médios de pH plasmático (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

O Hct (%) e concentração de Hb (g/dL) são mostrados na tabela XIV e Figura 18A e B, respectivamente. Os valores para o Hct em *H. malabaricus* dos grupos injetados e não injetados, expostos á água controle (C) ou água deionizada (AD) e hipóxia severa diminuíram nas primeiras 6 horas no grupo ADH+IC e nas primeiras 12 horas nos grupos CH, ADH e CH+ IC ( $p < 0,05$ ). Para os grupos CH e CH+IC os valores de Hct após esse período permaneceram sem alterações significativas, enquanto que nos grupos ADH e ADH+IC a tendência foi aumentar em 24h e permanecer constante até o fim do experimento. No grupo TESTH os valores de Hct permanecem sem alterações significativas.

A concentração de Hb de *H. malabaricus* apesar de ter uma tendência a diminuição em  $t = 12$  horas para os grupos CH, ADH, CH+IC e ADH+IC esta não foi considerada significativa. O grupo TESTH não teve alterações consideradas significativas apesar de ter uma tendência a aumentar.

**Tabela XIV.** Valores médios de Hct (%) e concentração de Hb (g/dL) do sangue (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos á hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

Hct (%)	TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC	ADH+IC
	0	29,96 $\pm$ 1,56	29,86 $\pm$ 1,30	26,95 $\pm$ 0,97	25,94 $\pm$ 0,89	28,22 $\pm$ 0,91
	6	26,30 $\pm$ 1,95	24,75 $\pm$ 1,03 (b)	27,80 $\pm$ 1,11	22,80 $\pm$ 0,73	19,50 $\pm$ 0,22 (a, b, c)
	12	21,75 $\pm$ 0,52 (b)	17,50 $\pm$ 1,50 (c)	26,25 $\pm$ 1,44	18,50 $\pm$ 0,29 (b, c)	19,50 $\pm$ 0,29 (b, c)
	24	21,50 $\pm$ 0,29 (b)	25,17 $\pm$ 0,60	23,00 $\pm$ 0,58	18,25 $\pm$ 0,25 (b)	26,13 $\pm$ 1,71
	36	21,77 $\pm$ 0,42 (b)	25,20 $\pm$ 0,50	26,20 $\pm$ 1,22	18,55 $\pm$ 0,23 (b)	23,40 $\pm$ 0,51
	48	21,55 $\pm$ 0,23 (b)	25,62 $\pm$ 2,14	23,30 $\pm$ 0,44	18,27 $\pm$ 0,21 (b)	25,80 $\pm$ 1,59
	Hb (g/dL)	TEMPO	CH	ADH	TESTH	CH+IC
0	7,91 $\pm$ 0,31	7,11 $\pm$ 0,55	6,83 $\pm$ 0,25	7,03 $\pm$ 0,25	7,71 $\pm$ 0,53	
6	6,87 $\pm$ 0,54	6,8 $\pm$ 0,38	7,72 $\pm$ 0,35	6,37 $\pm$ 0,35	7,11 $\pm$ 0,95	
12	6,38 $\pm$ 0,26	5,03 $\pm$ 0,06 (c)	7,30 $\pm$ 0,09	5,54 $\pm$ 0,09	5,75 $\pm$ 0,46	
24	6,34 $\pm$ 0,15	5,83 $\pm$ 0,55	8,28 $\pm$ 0,26	5,40 $\pm$ 0,26 (c)	6,64 $\pm$ 0,54	
36	6,40 $\pm$ 0,20	6,6 $\pm$ 0,76	7,33 $\pm$ 0,07	5,56 $\pm$ 0,08	8,58 $\pm$ 0,28 (c, d)	
48	6,36 $\pm$ 0,13	7,04 $\pm$ 0,26	8,30 $\pm$ 0,25	5,43 $\pm$ 0,22	5,68 $\pm$ 0,49	



**Figura 18.** Valores médios de Hct (%) **(A)** e concentração de Hb (g/dL) **(B)** do sangue (média  $\pm$  erro) dos grupos não injetados (CH, ADH e TESTH), e grupos injetados (ADH+IC e CH+IC) de *H. malabaricus* (n = 8-12 em cada grupo) expostos à água deionizada (AD) ou água controle (C) e submetidos à hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença significativa em relação ao grupo CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao tempo t = 0 em cada grupo experimental; **c:**  $P < 0,05$  indica diferença em relação ao grupo TEST; **d:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação ao grupo não injetado CH e ADH.

### 4.3. Densidade das Células de Cloreto (CC) e Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

Nas brânquias de *H. malabaricus* do grupo controle (C), em normóxia, as células imunorreativas a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, que se presumem ser as células de cloreto (CC), são encontradas normalmente no filamento branquial e raramente nas lamelas e, quando observadas nas lamelas estão geralmente localizadas na base destas (Fig. 19A e Fig. 20A). Duas populações de CC, fracamente imunorreativas (CC-claras) e fortemente imunorreativas (CC-escuras) foram identificadas no epitélio do filamento e lamela (Fig. 19A e Fig. 20A, B). A densidade das células imunorreativas a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no filamento (F) e lamelas (L) das brânquias de *H. malabaricus* mostrou grande variabilidade entre os animais nos diferentes tratamentos e são mostradas na Tabela XV e Figuras 19 A, B e 20 A, B, C.

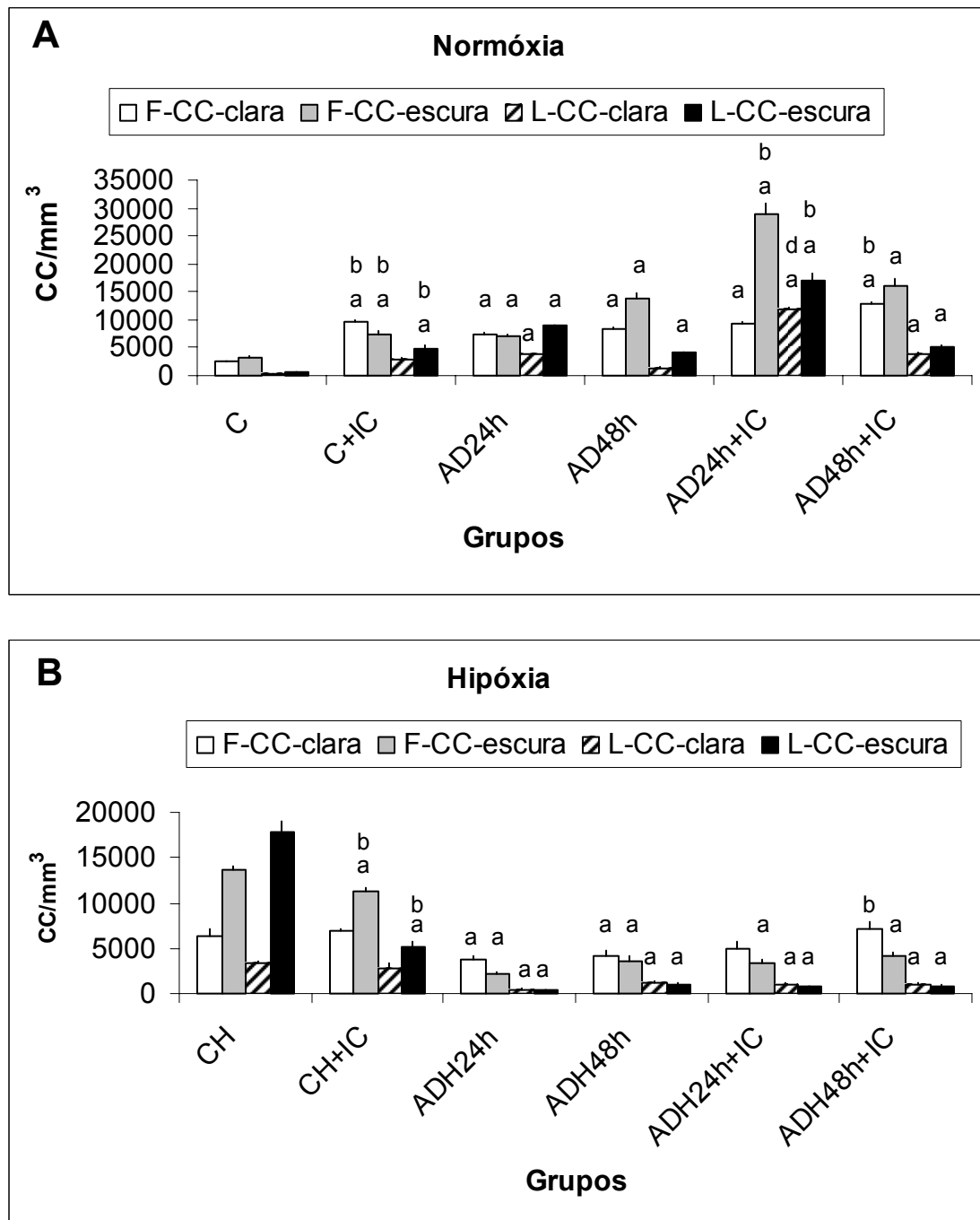
Após a exposição à água deionizada ou água controle nos grupos injetados e não injetados com cortisol a densidade das CC-claras e CC-escuras no filamento branquial (F-CC) aumentou significativamente em todos os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ), e este aumento foi maior no grupo AD24h+IC considerando as F-CC-escuras ( $p < 0,01$ ) (Fig. 20B). O aumento da densidade de CC nas lamelas foi também significativo em todos os tratamentos sendo que a densidade de CC-escuras em todos os grupos experimentais ( $p < 0,05$ ) foi maior que no grupo controle e a de CC-claras aumentam significativamente apenas nos grupos AD24h, AD24h+IC e AD48h+IC ( $p < 0,05$ ) (Fig. 20B).

Nos grupos que foram submetidos à hipóxia severa (25-30 mmHg) as duas populações de CC também foram observadas nas lamelas e filamentos branquiais. Ao contrário do que ocorreu em normóxia, os grupos experimentais CH e CH+IC apresentaram um número elevado de CC claras e escuras no filamento e lamela (Fig. 20C). Nos outros grupos a densidade de CCs foi significativamente menor tanto na lamela como no filamento ( $p < 0,01$ ) e menor nas lamelas em relação ao filamento (Fig. 19B).

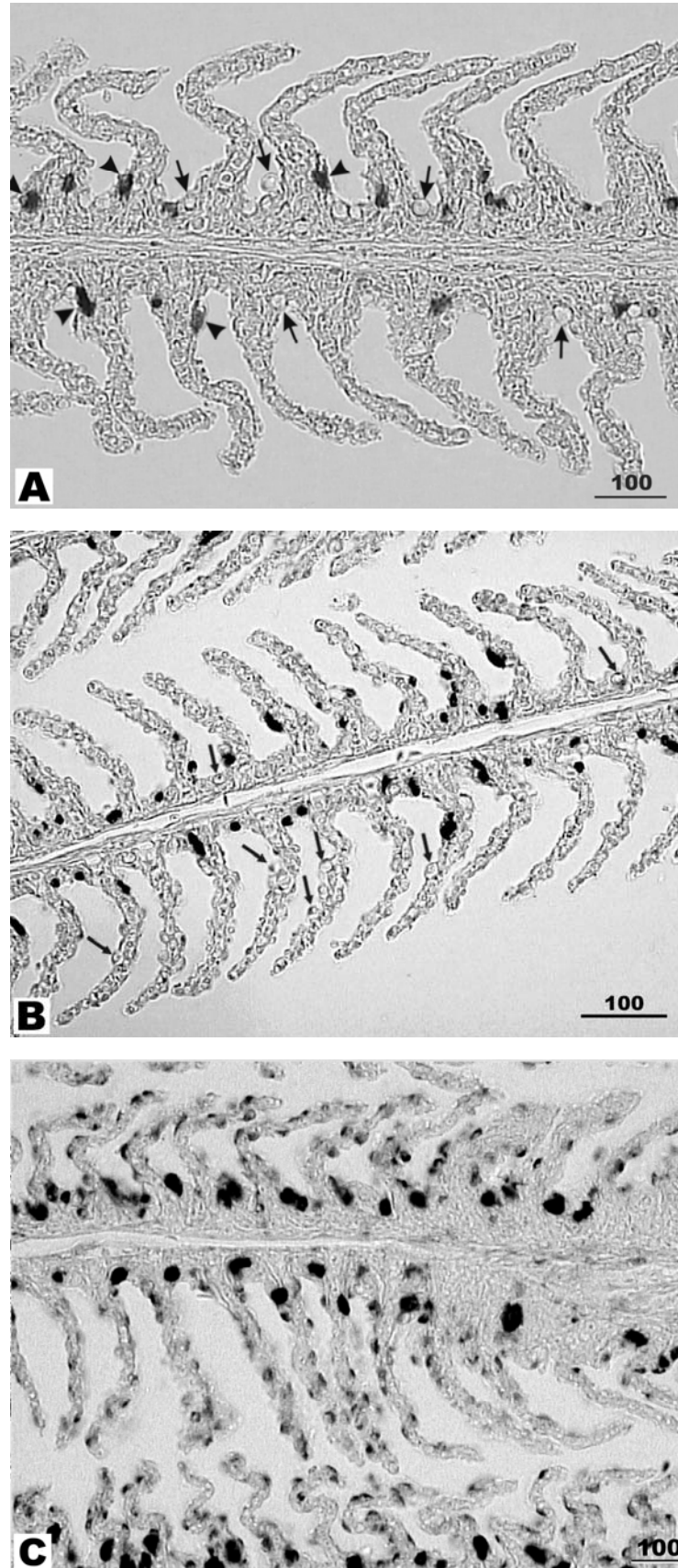


**Tabela XV.** Valores médios (média  $\pm$  erro) de CC (mm<sup>3</sup>) no filamento (F-CC) e lamelas (L-CC) das brânquias de *H. malabaricus* (n = 5 em cada grupo) em normóxia (PO<sub>2</sub> = 140 mmHg) e hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg) dos grupos não injetados (C, CH), (AD24h, ADH24h), (AD48h, ADH48h), e grupos injetados (C+IC, CH+IC), (AD24h+IC, ADH24h+IC) e (AD48h+IC, ADH48h+IC) expostos à água controle (C) ou à água deionizada (AD). **a:** (p < 0.05) indica diferença em relação aos grupos C e CH, **b:** (p < 0.05) indica diferença em relação aos grupos não injetados C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h e ADH48h.

<b>Grupos Normóxia</b>	<b>F-CC-clara</b>	<b>F-CC-escura</b>	<b>L-CC-clara</b>	<b>L-CC-escura</b>
<b>C</b>	2671,59 $\pm$ 40,09	3275 $\pm$ 224,71	342,0455 $\pm$ 32,49	534,0909 $\pm$ 57,22
<b>C+IC</b>	9607,02 $\pm$ 278,43 (a, b)	7407,12 $\pm$ 671,58 (a, b)	2794,73 $\pm$ 335,80	4945,67 $\pm$ 514,65 (a, b)
<b>AD24h</b>	7360,93 $\pm$ 406,66 (a)	7200,43 $\pm$ 68,86 (a)	3913,1 $\pm$ 0,00 (a)	8906,87 $\pm$ 73,72 (a)
<b>AD48h</b>	8447,10 $\pm$ 324,15 (a)	13957,13 $\pm$ 658,51 (a)	1424,2 $\pm$ 26,72	4202,05 $\pm$ 79,74 (a)
<b>AD24h+IC</b>	9339,79 $\pm$ 361,26 (a)	28852,69 $\pm$ 2107,20 (a, b)	11722,08 $\pm$ 585,55 (a, d)	16981,42 $\pm$ 1173,20 (a, b)
<b>AD48h+IC</b>	12839,30 $\pm$ 215,52 (a, b)	15902,91 $\pm$ 1402,80 (a)	3740,05 $\pm$ 300,96 (a)	5127,91 $\pm$ 219,65 (a)
<b>Grupos Hipóxia</b>	<b>F-CC-clara</b>	<b>F-CC-escura</b>	<b>L-CC-clara</b>	<b>L-CC-escura</b>
<b>CH</b>	6344,43 $\pm$ 836,17	13567,34 $\pm$ 399,86	3374,23 $\pm$ 1247,80	17743,07 $\pm$ 1247,80
<b>CH+IC</b>	6880,96 $\pm$ 201,73	11381,82 $\pm$ 298,71	2839,4 $\pm$ 514,89	5136,28 $\pm$ 513,20 (a, b)
<b>ADH24h</b>	3855,114 $\pm$ 279,80 (a)	2266,098 $\pm$ 198,36 (a)	454,55 $\pm$ 83,09 (a)	442,24 $\pm$ 36,60 (a)
<b>ADH48h</b>	4171,88 $\pm$ 492,07 (a)	3532,67 $\pm$ 678,15 (a)	1249,66 $\pm$ 124,17 (a)	998,58 $\pm$ 134,75 (a)
<b>ADH24h+IC</b>	5031,25 $\pm$ 692,02	3424,716 $\pm$ 311,3 (a)	1072,443 $\pm$ 89,47 (a)	740,06 $\pm$ 57,87 (a)
<b>ADH48h+IC</b>	7151,136 $\pm$ 687,03 (b)	4239,773 $\pm$ 359,73 (a)	1023,864 $\pm$ 77,18 (a)	854,32 $\pm$ 50,79 (a)



**Figura 19.** Valores médios (média  $\pm$  erro) de CC ( $\text{mm}^3$ ) no filamento (F-CC) e lamelas (L-CC) das brânquias de *H. malabaricus* ( $n = 5$  em cada grupo) em normóxia ( $\text{PO}_2 = 140$  mmHg) (A) e hipóxia severa ( $\text{PO}_2 = 25-30$  mmHg) (B) dos grupos não injetados (C, CH), (AD24h, ADH24h), (AD48h, ADH48h), e grupos injetados (C+IC, CH+IC), (AD24h+IC, ADH24h+IC) e (AD48h+IC, ADH48h+IC) expostos à água controle (C) ou à água deionizada (AD). **a:** ( $p < 0.05$ ) indica diferença em relação aos grupos C e CH, **b:** ( $p < 0.05$ ) indica diferença em relação aos grupos não injetados C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h e ADH48h.

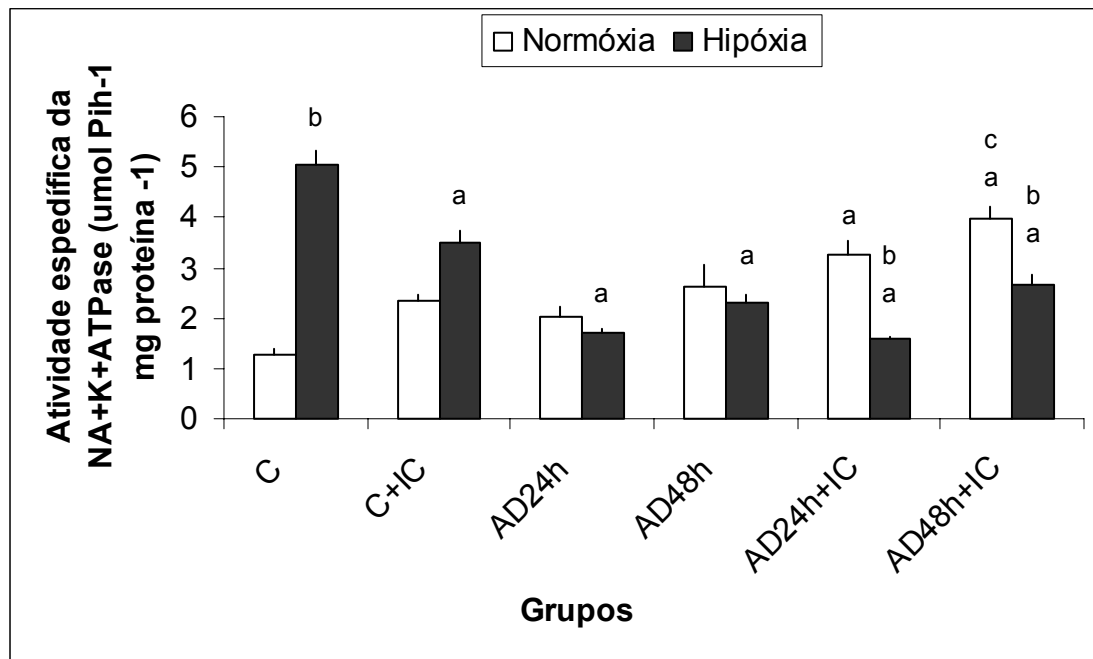


**Figura 20.** Imunohistoquímica contra Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase das CC branquiais de *H. malabaricus* no grupo controle presentes no filamento e base da lamela (A), após exposição à água deionizada (B) e exposição a hipóxia severa (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg) (C) a densidade de CC-claras (→) e CC-escuras (▶) aumenta tanto no filamento como na lamela. Barra de escala em μm.

Analisando a atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase nas brânquias de *H. malabaricus* (Tabela XVI e Fig. 20) verificou-se que foi significativamente maior nos grupos injetados com cortisol, AD24h+IC e AD48h+IC ( $p < 0,01$ ), em normóxia. Entretanto, em hipóxia severa, a atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi maior nos grupos CH e CH+IC ( $P < 0,01$ ) comparado aos seus respectivos grupos em normóxia. Para os demais grupos em hipóxia a atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase diminuiu em relação ao grupo CH ( $p < 0,01$ ) e em relação aos respectivos grupos em normóxia, neste caso, a variação foi significativa apenas para os grupos injetados ADH24h+IC e ADH48h+IC ( $p < 0,01$ ).

**Tabela XVI.** Valores médios (média  $\pm$  erro) da atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ( $\mu\text{mol Pih}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ) das brânquias de *H. malabaricus* ( $n = 5$  em cada grupo) em normóxia ( $\text{PO}_2 = 140 \text{ mmHg}$ ) e hipóxia severa ( $\text{PO}_2 = 25\text{-}30 \text{ mmHg}$ ) dos grupos não injetados (C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h, ADH48h), e grupos injetados (C+IC, CH+IC, AD24h+IC, ADH24h+IC, AD48h+IC, ADH48h+IC) expostos à água controle (C) ou à água deionizada (AD). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos grupos C e CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos valores em normóxia; **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos grupos não injetados C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h, ADH48h.

Grupos	Normóxia	Grupos	Hipóxia
<b>C</b>	1,29 $\pm$ 0,09	<b>CH</b>	5,05 $\pm$ 0,28 (b)
<b>C+IC</b>	2,35 $\pm$ 0,11	<b>CH+IC</b>	3,48 $\pm$ 0,23 (a)
<b>AD24h</b>	2,04 $\pm$ 0,19	<b>ADH24h</b>	1,69 $\pm$ 0,10 (a)
<b>AD48h</b>	2,63 $\pm$ 0,41	<b>ADH48h</b>	2,32 $\pm$ 0,13 (a)
<b>AD24h+IC</b>	3,25 $\pm$ 0,27 (a)	<b>ADH24h+IC</b>	1,59 $\pm$ 0,05 (a, b)
<b>AD48h+IC</b>	3,98 $\pm$ 0,23 (a, c)	<b>ADH48h+IC</b>	2,68 $\pm$ 0,16 (a, b)



**Figura 21.** Valores médios (média  $\pm$  erro) da atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase ( $\mu\text{mol Pih}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ ) das brânquias de *H. malabaricus* ( $n = 5$  em cada grupo) em normóxia ( $\text{PO}_2 = 140 \text{ mmHg}$ ) e hipóxia severa ( $\text{PO}_2 = 25\text{-}30 \text{ mmHg}$ ) dos grupos não injetados (C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h, ADH48h), e grupos injetados (C+IC, CH+IC, ADH24h+IC, AD24h+IC, AD48h+IC, ADH48h+IC) expostos à água controle (C) ou à água deionizada (AD). **a:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos grupos C e CH; **b:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos valores em normóxia; **c:** ( $p < 0,05$ ) indica diferença em relação aos grupos não injetados C, CH, AD24h, ADH24h, AD48h, ADH48h.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Cortisol Plasmático

O aumento na concentração do cortisol plasmático pode ocorrer em minutos ou horas dependendo do agente, intensidade e duração do estímulo estressor. A resposta difere entre as espécies e, em uma mesma espécie depende de fatores genéticos, do desenvolvimento do animal, estágio de maturação gonadal, condições fisiológicas individuais, história e criação (piscicultura ou meio ambiente natural) do animal (BARTON *et al*, 1986; POTTINGER *et al*, 1992; SALONIUS e IWAMA, 1993; SUMPTER, 1997; BARTON, 2002; IWAMA *et al.*, 2004).

A concentração de cortisol plasmático em *H. malabaricus* em normóxia mantidas em água controle, é comparável aos níveis basais de outros peixes (BARTON e IWAMA, 1991; BARTON, 2002; IWAMA *et al.*, 2004; DOYON *et al*, 2005; HEBERT E STEFFERSEN, 2005; MONTEIRO *et al*, 2005; ALURU e VIJAYAN, 2006). O aumento lento do cortisol com um pico 24h após o início do experimento nos animais expostos à água deionizada (choque osmótico), sem prévia administração de cortisol exógeno, contraria o que tem sido amplamente encontrado na literatura, quanto à velocidade de resposta frente a um estresse agudo (BARTON e IWAMA, 1991, WENDELAAR BONGA, 1997).

Três mecanismos têm sido aceitos para a ausência de um aumento imediato de cortisol plasmático quando um animal é exposto continuamente ou repetidamente a pequenos intervalos a um estímulo estressor: habituação, compensação e exaustão (SCHRECK, 2000). A combinação entre início lento e o intervalo de várias horas entre a aplicação repetida do estressor pode resultar em uma habituação ou compensação que se limita apenas a respostas fisiológicas e comportamentais, embora a compensação envolva um custo energético que, em longo prazo, pode afetar o crescimento e reprodução. A exaustão ocorre quando o eixo HHI foi estimulado a um grau no qual a concentração de cortisol é cronicamente elevada

resultando em uma retroalimentação negativa que impossibilita o peixe a responder a outro estímulo eventual.

A substituição total da água controle pela água deionizada (30 minutos) e exposição contínua durante 48h pode ter resultado em respostas fisiológicas que evitaram, até certo ponto, os efeitos agudos do agente estressor. A variação do cortisol em 2 a 3 vezes acima do nível determinado no tempo 0 (imediatamente antes da substituição da água controle por água deionizada) até 12 horas em água deionizada, seguido de um pico em 24 horas, pode indicar que o agente estressor não foi tão severo para essa espécie que vive em águas moles e pobres em íons. *H. malabaricus* não responde com aumento de cortisol plasmático e alterações iônicas a diluições (1:2 e 1:3) da água em que vive e, segundo MORON *et al.* (2003), é capaz de viver pelo menos 30 dias em água deionizada.

Os resultados obtidos sugerem que, a princípio, a exposição à água deionizada pode ter causado apenas um desconforto ao animal e a exposição continuada por 48h pode ter provocado um efeito acumulativo, de forma a resultar num pico após 24 horas de exposição a esse estressor. Coincidentemente é entre 24 e 48 horas de exposição em água deionizada que ocorre alteração na qualidade do muco produzido pelas células mucosas (MORON, 2000) e alterações profundas no epitélio branquial da espécie com a proliferação de CC nas lamelas secundárias retornando em 7 dias a condições semelhantes a do ambiente natural (MORON *et al.*, 2003; SAKURAGUI *et al.*, 2003).

Uma explicação alternativa para o aumento lento da concentração do cortisol à exposição à água deionizada, após a implantação da cânula, que envolve anestesia e ação cirúrgica 24 horas antes do estímulo água deionizada, é a exaustão ou a denominada fase de resistência. Entretanto, esta resposta está mais relacionada ao estresse crônico como observado nos trabalhos de POTTINGER e MORAN (1993) e WEENDELAAR BONGA (1997). Estudos têm mostrado que adultos *Oncorhynchus mykiss* continuam a responder com

aumento significativo de cortisol após mais de 4 meses de exposição a um estressor intermitente (CAMPBELL *et al.*, 1992) e *Sparus aurata*, submetido ao confinamento contínuo e prolongado (11 dias), mantém o nível de cortisol 10 vezes mais alto que o nível basal durante os primeiros 4 dias de confinamento (ARENDS *et al.*, 1999).

Em relação à hipóxia existem respostas consideradas interespecíficas que dependem da espécie de peixe em questão, ou seja, se é ou não tolerante a hipóxia, qual o grau de tolerância a hipóxia (tensão crítica de O<sub>2</sub> da água - P<sub>cO<sub>2</sub></sub>) e diferenças na demanda metabólica do animal (BURTON e HEATH, 1980; VAN RAAIJ *et al.* 1996 b; ISHIBASHI *et al.*, 2002; PICHAVANT *et al.*, 2002). Embora estas respostas fisiológicas e metabólicas possam diferir de acordo com a espécie, a resposta típica frente ao estresse hipóxico consiste numa resposta primária hormonal com a liberação de catecolaminas e/ou cortisol seguida das respostas secundárias ao estresse como alterações metabólicas, íon-regulatórias e ajustes cardio-respiratórios (MAZEUD *et al.*, 1977; PICKERING e POTTINGER, 1995).

A elevação do cortisol em *H. malabaricus* submetidos á hipóxia severa (25-30 mmHg) parece depender do tipo de água (AD) e da injeção de cortisol (IC). A elevação do cortisol em quase 9 vezes, de 21,75 (Tempo = 0) para 295,6 ng/mL após 6 horas de exposição a água deionizada e hipóxia severa no grupo ADH evidencia que a aplicação de dois estímulos estressores simultaneamente, no caso água deionizada e hipóxia, ativa o eixo HHI nesta espécie. Comparando a elevação do cortisol em animais expostos a água deionizada em normóxia e em hipóxia é possível sugerir que a diminuição do nível de oxigênio na água é um estímulo muito mais estressante para *H. malabaricus* do que a água deionizada. SAKURAGUI *et al.* (2003) mostrou que a disfunção respiratória verificada pela redução de aproximadamente 40% na pressão parcial de oxigênio arterial (PaO<sub>2</sub>) em relação aos valores de normóxia em animais expostos a água deionizada passa a 80% quando expostos à água deionizada + hipóxia. O aumento do nível de cortisol nos peixes do grupo injetado e mantido



em água controle corrobora, em parte, esta hipótese embora os grupos CH e TESTH não tenham mostrado aumentos significativos do cortisol plasmático, e pela ausência de resposta do grupo injetado com cortisol e mantido em água deionizada (ADH+IC). A ativação do eixo HHI resultando em aumento do cortisol plasmático têm sido observado em outras espécies submetidas a estímulos estressantes simultaneamente como *Gadus morhua* expostos à hipóxia progressiva e ao exercício de natação rápida (HEBERT e STEFFENSEN, 2005). A tensão crítica de O<sub>2</sub> (PcO<sub>2</sub>) calculada para a espécie nessas condições experimentais foi de 4,3 kPa (PO<sub>2</sub> = 32,33 mmHg) e mostrou um aumento significativo dos teores de cortisol de 25 ng/mL<sup>-1</sup> para 112,5 ng/ mL<sup>-1</sup> (HEBERT e STEFFENSEN, 2005). No caso de traíra, *Hoplias malabaricus*, a tensão crítica de O<sub>2</sub> calculada para animais expostos a água deionizada e a hipóxia foi de PO<sub>2</sub> = 21,6 mmHg (SAKURAGUI *et al.*, 2003) sendo que as traíras do presente estudo permaneceram por um período de até 48 horas em hipóxia próxima a tensão crítica (PO<sub>2</sub> = 25-30 mmHg) o que indica que o estímulo estressor “hipóxia” parece causar uma elevação dos teores de cortisol quando este é combinado com o estresse osmótico causado pela exposição à água deionizada.

Entretanto a ausência da ativação do eixo HHI tem sido observado em algumas espécies frente a estímulos simples como o estresse de captura em híbrido tambacu, *Piaractus mesopotamicos* (MARTINS *et al.*, 2002). A não liberação de cortisol plasmático tem sido explicada, em muitos casos, como autodepuração do hormônio, feed-back negativo ou exaustão, o que não se aplica ao presente estudo, e ainda há controvérsias quanto ao envolvimento de fatores ainda pouco conhecidos, como os tipos de estímulos, sua intensidade, tempo de duração e espécie de peixe (tropical) considerada (KEBUS, *et al.*; 1992; VIJAYAN e MOON, 1994; MARTINS *et al.*, 2002).

## 5.2. Osmolalidade e Íons Plasmáticos

Em geral os estressores afetam o balanço hidromineral em peixes (WENDELAAR BONGA, 1997) diretamente ou devido ao aumento das catecolaminas circulantes que aumentam a permeabilidade das brânquias aos íons e a água (MCDONALD e MILLIGAN, 1992). O  $K^+$  é o principal cátion intracelular e tem a tendência de estar aumentado no plasma durante acidose plasmática e elevado na célula durante alcalose e, portanto pequenas mudanças na concentração desse cátion podem alterar drasticamente o funcionamento do organismo. Em um animal não estressado 98% do  $K^+$  corpóreo deve estar no interior das células, principalmente pelo resultado da bomba de sódio-potássio, que mantém o potássio nas células. Os níveis de  $K^+$  normais dependem principalmente da ingestão de alimentos, do pH sérico e ação da insulina e adrenalina. A adrenalina e insulina estimulam a entrada de  $K^+$  nas células. O  $Na^+$  é o cátion mais abundante do meio extracelular e influencia o grau de retenção de água corporal e também tem papel importante no balanço ácido-básico. Os processos que tendem a aumentar ou diminuir os íons  $Na^+$  tendem respectivamente a aumentar e diminuir os íons  $Cl^-$  e quando isso não ocorre há o desequilíbrio eletrolítico. O  $Cl^-$  é um importante ânion que participa na manutenção do balanço de fluídos e eletrólitos pois geralmente também segue as alterações do íon bicarbonato, principalmente nas trocas de cloreto pelas hemoglobinas.

O choque osmótico causado pela exposição à água deionizada em normóxia resultou, como esperado, em distúrbio iônico nas primeiras 24 horas de exposição à água deionizada que foi evidenciado pelo aumento da concentração do íon sódio e redução do íon cloreto. Entretanto, as concentrações de íons  $Na^+$  e  $Cl^-$ , retornaram aos níveis semelhantes aos do grupo controle após 36h, após ter ocorrido o pico de concentração de cortisol plasmático (24h de exposição em água deionizada). A injeção prévia de cortisol parece ter reduzido o efeito da exposição à água deionizada sobre a concentração dos íons plasmáticos uma vez que manteve

alta a concentração de íons cloreto nos animais injetados com cortisol evidenciando o seu papel na regulação iônica, mas resultou em um desequilíbrio de íon  $K^+$  nos animais mantidos em água controle. Em *S. aurata*, a diminuição do  $Na^+$  e  $Cl^-$ , após a transferência da água do mar para água salobra, foi suprimida pela injeção de cortisol (MANCERA *et al.*, 1994). Estes efeitos do cortisol foram relacionados à alta afinidade dos receptores de cortisol nessas células, a um aumento do número dessas células e da atividade da  $Na^+/K^+-ATPase$  (CHAKRABORTI e WEISBART, 1987; BINDON *et al.*, 1994a, b; GRECO *et al.*, 1995; SAKURAGUI *et al.*, 2003). Em peixes de água doce as CC estão envolvidas na absorção ativa de íons  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  e  $Cl^-$ , e a proliferação destas células são consideradas como respostas morfológicas para a manutenção da homeostase iônica (PERRY e LAURENT, 1993).

Segundo WENDELAAR BONGA *et al.* (1987), os distúrbios hidrominerais observados em peixes expostos a hipóxia são similares aos verificados em outros tipos de estímulos estressores como exposição à água ácida, a metais pesados, exercício exaustivo e manuseio. Desta forma, é de se esperar que a hipóxia acarrete uma elevação da ventilação e perfusão das brânquias e num aumento da área de contato com o meio promovendo a perda de eletrólitos para a água. Em *H. malabaricus*, em hipóxia severa, a redução da osmolalidade nas primeiras 12h e na concentração de  $Cl^-$  evidenciou distúrbio iônico e osmótico como ocorreu em situação de normóxia, embora durante normóxia não houve alteração na osmolalidade. Em peixes de água salgada a resposta é, em geral oposta a de animais de água doce. Em *Gadus morhua* (peixe marinho) à medida que a  $PO_2$  da água diminuiu foi observado um aumento significativo da osmolalidade plasmática nas tensões entre 11 e 10 KPa ( $PO_2 = 78,95$  mmHg) e após essa tensão voltou a diminuir até a  $PcO_2$  ( $PO_2 = 32,33$  mmHg) ficando com valores próximos ao de normóxia.

Em relação aos íons  $Na^+$  a diminuição ocorreu nas primeiras 12 horas no grupo controle (CH) enquanto que no grupo ADH (água deionizada e a hipóxia severa) o distúrbio

de  $\text{Na}^+$  foi evidente em 48h o que significa que, neste caso, os animais não conseguiram controlar os níveis do íon  $\text{Na}^+$ . A injeção de cortisol, de certa forma, parece ter mantido a osmolalidade e os níveis constantes do íon  $\text{Na}^+$  para os grupos CH+IC e ADH+IC impedindo, neste último grupo, a queda abrupta que ocorreu no respectivo grupo não injetado. No caso do íon  $\text{K}^+$  os distúrbios transitórios nos grupos ADH (6h) e CH+IC (24 e 48h) são difíceis de explicar e podem não estar diretamente associado a injeção de cortisol porque os valores não foram significativamente diferentes do tempo 0. SAKURAGUI (2000) observou uma diminuição significativa do íon  $\text{K}^+$  em *H. malabaricus* expostos à hipóxia severa (21,6 mmHg) e a água deionizada. O distúrbio eletrolítico foi evidente principalmente devido a redução do íon  $\text{Cl}^-$  plasmático durante exposição à hipóxia nos grupos ADH e ADH+IC. A injeção de cortisol falhou em manter os níveis do íon  $\text{Cl}^-$  que pode estar relacionado as alterações do pH sanguíneo. Alterações iônicas foram também observadas em outras espécies marinhas como relatado por MAXIME *et al.* (1995) que observou um aumento de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  ao expor *Acipenser baeri* à hipóxia aguda e ARENDS *et al.* (1999) observou que o estresse de exposição ao ar por 3 minutos em *Sparus aurata* causou uma elevação rápida dos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e nenhuma alteração no nível do íon  $\text{K}^+$ .

### 5.3. Intermediários metabólicos no plasma

Estudos demonstram que a administração de glicocorticóides exógenos em mamíferos suprime a secreção de cortisol e esta declina rapidamente (CZOCK *et al.*, 2005; KONG *et al.*, 1989). O cortisol é um hormônio ativo, sintetizado pela adrenal em mamíferos e pelas células interrenais do rim anterior em peixes e em ambos é secretado após estimulação do hormônio ACTH. As catecolaminas são liberadas pelo tecido cromafín do rim anterior dos teleósteos, e também através dos terminais dos nervos adrenérgicos (RANDALL e PERRY, 1992). Em

peixes marinhos como *S. aurata* (ARENDS, 1999) expostos ao ar ou confinamento, à administração de cortisol exógeno (24 horas antes do estímulo estressor) exerceu um “feedback” de inibição abolindo totalmente os eixos HHI responsável pelo controle da secreção de cortisol e HSC responsável pela liberação das catecolaminas; enquanto que, para peixes de água doce como *H. malabaricus* as respostas que são mediadas pelas catecolaminas em resposta a estressores tóxicos e não tóxicos (WEENDELAR BONGA, 1997; VAN DER SALM *et al.*, 2006), não foram totalmente abolidas com a injeção prévia de cortisol (24 horas antes do estímulo estressor) em traíra exposta à água deionizada em normóxia, como pode ser observado com as variações nos teores de lactato e glicose plasmática.

A variação no perfil metabólico, observado pela análise do sangue ao longo de uma modificação do meio externo, pode refletir a preferência metabólica nos animais. Em geral, os vertebrados utilizam a produção de ATP pela via glicolítica utilizando a glicose e o glicogênio como substratos primários, processo que pode levar ao aumento do lactato como produto catabólico final na ausência de O<sub>2</sub> (DRIEDZIC e HOCHACHKA, 1978). As alterações nos teores de lactato e piruvato estão diretamente relacionadas à concentração de glicose resultante de sua mobilização, via glicogenólise e/ou gliconeogênese induzidas pelas catecolaminas e pelo cortisol nas situações de estresse (ver esquema metabólico na pág. 6; MOMNSEN *et al.*, 1999; IWAMA *et al.*, 2004).

Em *H. malabaricus* em normóxia nos grupos injetados e TEST as concentrações de glicose plasmática mantiveram-se elevadas durante todo experimento, em relação ao grupo controle, com exceção do grupo AD não injetado que mostrou uma tendência a aumentar os níveis de glicose após 24 h (correspondente ao pico de cortisol). Esses resultados corroboram com os encontrados na literatura (IWAMA *et al.*, 2004) em que o nível elevado de cortisol no plasma influencia nos níveis de glicose aumentando a sua concentração no plasma para manutenção da demanda energética do animal. Nos grupos submetidos a hipóxia severa a

glicose foi maior nos grupos injetados, no tempo 0 e em  $t = 6$ ; para os grupos ADH e ADH+IC que são os grupos que tiveram alterações significativas em relação ao cortisol plasmático.

O aumento do lactato em normóxia nos grupos C+IC, durante todo o experimento, em AD (em 6, 12 e com pico em 24 horas) e AD+IC entre 6 a 24 horas de exposição à água deionizada, embora tenha ocorrido aumento do piruvato em todos os grupos experimentais com exceção do TEST; pode sugerir que, os animais tenham utilizado o metabolismo anaeróbico (glicólise anaeróbica) que ocorre em tecidos hipóxicos que tem como produto final o lactato, uma vez que se fizermos a relação lactato/piruvato<sup>2</sup> esta será bem maior nesses grupos em relação ao controle. Contudo, tecidos bem oxigenados podem em certas condições gerar lactato através da glicólise aeróbica estimulada pelo aumento das catecolaminas circulantes. Quando o piruvato é produzido, as células musculares tentam utilizá-lo como energia aeróbia. Porém, se as células não são capazes de utilizar todo o piruvato produzido, nos casos em que o metabolismo é intenso (produção de piruvato de forma rápida), este se transforma quimicamente em lactato. Algumas células possuem grande capacidade de utilização de piruvato para energia aeróbia enquanto outras possuem uma capacidade limitada. No metabolismo branquial a preferência é por substratos considerados oxidativos como a glicose; nos casos em que ocorre a ativação das bombas de sódio e potássio e há o requerimento de grande energia (MOMNSEN, 1984; PERRY e WALSH, 1989).

---

<sup>2</sup> A via glicolítica produz piruvato, e este, em presença de oxigênio, é degradado no ciclo do ácido cítrico produzindo NADH e FADH<sub>2</sub> para a fosforilação oxidativa na mitocôndria. Normalmente, haverá pouco ácido láctico nessas condições. Na ausência de oxigênio (anaerobiose), o piruvato precisa ser convertido a ácido láctico, pois essa é a única reação capaz de regenerar NAD<sup>+</sup> para que a glicólise possa continuar. A necessária produção de ácido láctico em anaerobiose explica porque a relação lactato/piruvato é bem maior que 1 nas células que estão sem oxigênio, e bem menor que 1 nas que estão em presença de oxigênio (THE BIOLOGY PROJECT, 1996).

Segundo VIJAYAN *et al.*, 1996b; o cortisol em peixes de água salgada pode estar envolvido na produção de glicose para prover energia para síntese de proteína e ativação das bombas de sódio e potássio; enquanto em mamíferos a glicólise aeróbica pode ser estimulada pelas catecolaminas circulantes, as quais tem a capacidade de ativar a bomba de  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase estimulando também a produção de lactato (VITOR LOPES, 1999).

Neste caso a atividade da  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase nos grupos injetados em normóxia foi significativamente maior em relação ao grupo C tendo um aumento de 1,82 vezes (82%) e 2,52 vezes (152%) respectivamente. Os teores de lactato em hipóxia aumentaram nos grupos TESTH e ADH+IC a partir de 6 horas e no grupo ADH a partir de 24h, enquanto que o piruvato aumentou em ADH entre 6 a 24 horas, em CH+IC a partir de 6h e em ADH+IC entre 6 e 12 horas. Apesar de não ter sido possível medir as catecolaminas do plasma em traíra, estudos demonstram que esse tipo de resultado leva a evidências de que talvez houvesse a liberação das catecolaminas pela possível ativação do eixo HSC como sugerido para *S. aurata* exposto ao ar (ARENDS, 1999), e a ativação do eixo HHI para o grupo ADH, pois podemos observar o aumento significativo de cortisol endógeno em *H. malabaricus*. Os dois eixos do estresse estão envolvidos principalmente com a demanda energética do animal, ou seja, mobilização de energia através da liberação de catecolaminas e cortisol que podem interferir de certa forma no metabolismo intermediário alterando as concentrações de glicose, piruvato, lactato, proteína e amônia (VIJAYAN *et al.*, 1994b, 1996a, 1997; MOMNSEN *et al.*, 1999; IWAMA *et al.*, 2004).

Em vertebrados superiores a amônia é considerada como uma substância ativadora da glicólise e inibidora da gliconeogênese e metabolismo oxidativo (POORTMANS, 1988; SAHLIN e KATZ, 1988; LOWENSTEIN, 1990). O catabolismo de proteínas leva à formação de amônia ( $\text{NH}_3$ ), forma tóxica e não solúvel, que nos peixes teleósteos é convertida a íon amônio  $\text{NH}_4^+$  (forma solúvel em água). A  $\text{NH}_3$  é eliminada por difusão através das brânquias

e o  $\text{NH}_4^+$  é eliminado por transporte ativo e cotransporte. Segundo MOMMSEN *et al.* (1999) uma mudança pequena nos níveis de cortisol plasmático é suficiente para alterar o metabolismo dos aminoácidos (ver texto à pág. 5 e esquema metabólico à pág. 6). Desta forma o aumento da amônia plasmática em *H. malabaricus* sugere que o cortisol estimulou a mobilização de proteínas ou a utilização de aminoácidos como fonte energética como observado nos grupos C+IC e AD+IC em normóxia antes do início do experimento e durante o mesmo, enquanto em AD esse aumento foi observado a partir de 6 horas com uma pequena diminuição em 36 e 48 horas, mas a concentração ainda se manteve alta em relação a  $t = 0$  não retornando aos valores normais. No entanto, a concentração de proteína plasmática foi maior apenas no grupo TEST em normóxia entre 12 e 48 horas de experimento e talvez a injeção do veículo (óleo de soja) poderia ter causado alguma influencia nesse resultado. Nos grupos submetidos a hipóxia o aumento da amônia plasmática ocorreu nos grupos TESTH, ADH e ADH+IC a partir de 6 horas de experimento e permaneceu alto até o término do mesmo, sendo que a mobilização de proteínas ocorreu nesses mesmos grupos e, em geral foi mais elevada que o respectivo controle, resultados estes que corroboram com MOMMSEN *et al.* (1999).

#### **5.4. Variáveis sanguíneas**

Em normóxia as variações de pH foram significativas no grupo exposto em água deionizada (AD). O aumento do pH entre 6 e 24 horas pode sugerir que a redução não significativa dos íons  $\text{K}^+$  e significativa para o  $\text{Cl}^-$  possam ter estimulado a secreção de íons  $\text{H}^+$  para dentro do lúmen do túbulo renal causando uma alcalose metabólica. Uma das razões para que isso aconteça é que o  $\text{Na}^+$  intraluminal, nestas condições, é trocado no túbulo renal por  $\text{H}^+$ , uma vez que o  $\text{Na}^+$  não pode ser trocado por  $\text{K}^+$  ou ser acompanhado por  $\text{Cl}^-$  durante a



reabsorção. Apesar do aumento da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase em relação ao grupo C (1,58 vezes, 58%) não ser considerado significativo para o grupo AD, este aumento pode ter influenciado também nas trocas iônicas através das brânquias com a ativação das bombas de sódio-potássio, pois o  $\text{Na}^+$  nos tempos citados acima aumentou no plasma em relação a diminuição dos íons  $\text{K}^+$  e  $\text{Cl}^-$ . Neste caso o  $\text{K}^+$  pode ser transportado para dentro das células do epitélio branquial em troca de  $\text{Na}^+$  que é enviado através de transporte ativo (bomba de sódio-potássio) de dentro das células para o sangue, sendo que o íon  $\text{Cl}^-$  pode estar sendo perdido por difusão ou ainda sendo trocado por íons bicarbonato que são formados dentro dos eritrócitos quando o  $\text{CO}_2$  reage com a hemoglobina via atividade da anidrase carbônica e formando íons  $\text{H}^+$  e bicarbonato. O bicarbonato deixa a célula e é trocado por  $\text{Cl}^-$  enquanto o íon  $\text{H}^+$  se liga a hemoglobina da célula, contribuindo assim para o aumento do pH extracelular. Isto poderia explicar o aumento do pH no grupo que foi submetido à hipóxia severa e exposto à água deionizada (ADH) em 6 a 12 horas de experimento acompanhado com a diminuição do íon  $\text{Cl}^-$  e resultando em alcalose plasmática. A diminuição do pH no grupo ADH+IC a partir de  $t = 6$  horas quando ocorre o aumento significativo do  $\text{K}^+$  no plasma acompanhado da diminuição do íon  $\text{Cl}^-$  pode estar associado a liberação de ácido láctico advindo do metabolismo das células e/ou aumento do  $\text{CO}_2$  (GOLDBERG, 1997). Neste grupo a diminuição significativa do pH foi acompanhada com o aumento significativo do lactato plasmático (com valores médios de 2,55 vezes ou 155% em relação a  $t = 0$  em normóxia) portando resultando em uma acidose metabólica. Isso corrobora com os estudos de McDONALD e MILLIGAN (1997) no qual o mesmo tipo de situação ocorre para peixes de água doce após serem submetidos a protocolos experimentais com atividade física vigorosa.

A acidose metabólica ajuda a aumentar a afinidade da hemoglobina por  $\text{O}_2$ , assim a capacidade de transporte de  $\text{O}_2$ , após estímulo adrenérgico (provocado pela hipóxia), é maior do que em normóxia (NIKINMAA, 1986, 1990, CLAIREAUX *et al.*, 1988, VAL, 1993). A

acidose metabólica em truta arco-íris foi observada por TETENS e LYKKEBOE (1985) e considerada com uma resposta fisiológica para reduzir os efeitos da baixa  $PO_2$  no sangue arterial. O aumento da atividade de trocas  $Na^+/H^+$  é estimulada pela ação das catecolaminas liberadas na corrente sanguínea (PERRY e REID, 1992, MAXIME *et al.*, 1995). Nesses casos, os estímulos adrenérgicos operam ligando-se a  $\beta$ -receptores na membrana celular, estimulando a troca iônica, que aumenta o pH intracelular e diminui o extracelular.

Os parâmetros hematológicos são considerados bons indicadores das mudanças internas que podem afetar a homeostasia e a saúde do animal causadas por alterações no meio ambiente. Esses estímulos estressores ambientais podem ser de origem tóxica como metais pesados, pesticidas ou não tóxicos, doenças causadas por patógenos, deficiência alimentar, mudanças na qualidade da água como diminuição do  $O_2$  e variações nas concentrações de íons dissolvidos na água (JENSEN *et al.*, 1993; ROCHE e BOGÉ, 1999; MARCOM e WILHELM FILHO, 1999; VAL, 2000; MONTEIRO, *et al.*, 2001; AFFONSO *et al.*, 2002; WELLS, 2005; CARVALHO e FERNANDES, 2006).

Para os grupos que foram submetidos a hipóxia era de se esperar um aumento significativo do hematócrito (SWIFT, 1981; PETERSON, 1990; MORAES *et al.*, 1997 a, b, c.). Essa resposta pode pré-adaptar o animal a longo período em ambiente desfavorável (SWIFT, 1982), mediante aumento dos eritrócitos circulantes (RANDALL, 1982), permitindo aos peixes transportar a maior quantidade de  $O_2$  possível. Esse tipo de alteração como aumento do Hct e da concentração de Hb também é descrita para peixes que vivem em águas hipóxicas, pobre em íons ou ácidas da Amazônia (VAL *et al.*, 1990; VAL e ALMEIDA-VAL, 1995; VAL, 2000). Para *H. malabaricus* submetidas á hipóxia foi observada uma diminuição do Hct nas primeiras 6 horas no grupo ADH+IC e nas primeiras 12 horas nos grupos CH, ADH e CH+ IC. A tendência a aumentar só foi observada para os grupos ADH e ADH+IC após 24h de exposição a hipóxia severa.

A ativação da troca  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  induz a um aumento de volume do eritrócito em trutas arco-íris e essa resposta pode aumentar a afinidade da Hb pelo  $\text{O}_2$  devido à diluição da Hb e ATP dentro da célula o que reduziria a ação do ATP sobre a afinidade da Hb pelo  $\text{O}_2$  (RANDALL, 1982; NIKINMAA, 1983; TETENS e LYKKEBOE, 1985). Entretanto alguns estudos têm demonstrado que esta resposta geralmente só é observada em peixes submetidos a hipóxia por um período prolongado (TETENS e LYKKEBOE 1981, 1985; BOUTILIER *et al.*, 1988). As traíras foram expostas a um período de no máximo 48 horas em hipóxia severa e só a partir de 24h no grupo injetado e submetido à água deionizada que as alterações nesse sentido ocorrem para o Hct e nesse mesmo grupo em normóxia nos tempos 6 e 24h AD+IC.

### **5.5. Atividade específica da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e densidade das células de cloreto (CC)**

O hormônio cortisol em sua ação mineralocorticóide para manter a homeostase hidromineral, alterada por modificações causadas por estímulos estressores, induz a diferenciação de CC nas brânquias e aumenta a atividade específica de enzimas transportadoras de íons, como a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase presentes nas brânquias, intestino e rins (McCORMICK, 1995; EVANS, 2002; EVANS *et al.*, 2005) de espécies de peixes teleósteos de água doce como ciprinídeos (ABO HEGABE e HANKE, 1984), salmonídeos (RICHMAN e ZAUGG, 1987) e ciclídeos (DANGE, 1986; DANG *et al.*, 2000a). Nos peixes de água doce as CC presentes no epitélio branquial asseguram a tomada de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) da água em torno do animal (FLIK, *et al.*, 1994; PERRY, 1997).

DANG *et al* (2000b) expondo tilápias, *Oreochromis mossambicus*, ao cobre observou o aumento no número de CC branquiais e verificou que havia duas populações de CC, CC-claras e CC-escuras. Apesar do aumento no número dessas células no filamento e lamela, houve em *O. niloticus* expostas ao cobre uma diminuição da atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -

ATPase. Esta diminuição segundo os autores foi devida ao aumento maior de CC-claras no grupo exposto ao cobre e diminuição das CC-escuras, sendo que as CC-escuras foram identificadas como células ativas e maduras enquanto que as CC-claras como células jovens, ou em apoptose ou necrose.

METZ *et al* (2003) avaliaram as conseqüências da aclimação de carpas, *Cyprinus carpio*, a diferentes temperaturas comparando com a administração de cortisol exógeno. Observaram utilizando imunohistoquímica que a 15°C havia um número maior de CC branquiais contendo mais enzima específica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e que nessa mesma temperatura a osmolalidade e a concentração de íons Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> estava aumentada. Relataram que o cortisol circulante quando excede os níveis basais estimula a atividade da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase e que a administração do cortisol exógeno após uma semana aumentou a referida atividade.

Em *H. malabaricus* a atividade específica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase foi significativamente maior nos grupos injetados AD24h+IC (2,52 vezes = 152%) e AD48h+IC (3,09 vezes = 209%) em normóxia em relação ao grupo C, embora tenha aumentado em todos os grupos. Em hipóxia severa, a atividade específica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, foi maior nos grupos C (3,92 vezes = 292%) e C+IC (1,48 vezes = 48%) comparado aos seus respectivos grupos em normóxia. Para todos os grupos em hipóxia a atividade específica da Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase diminuiu em relação ao grupo C em hipóxia, e em relação aos respectivos grupos em normóxia, neste caso, a variação foi significativa apenas para os grupos injetados AD24h+IC (2,04 vezes = 104%) e AD48h+IC (1,49 vezes = 49%).

Como nos estudos de DANG *et al* (2000b), em *H. malabaricus* expostas á água deionizada ou água controle, injetadas e não injetadas com cortisol e submetidas a normóxia ou hipóxia, foram observados dois tipos de CC, CC-claras e CC-escuras sendo que antes da aplicação do estímulo estressor as CC estavam localizadas apenas no filamento e raramente

nas lamelas. Quando presentes nas lamelas localizavam-se na base destas como anteriormente descrito por MORON *et al.*, 2003, SAKURAGUI *et al.*, 2003.

Os resultados encontrados no presente estudo corroboram com aqueles apresentados por DANG *et al* (2000b) em que a atividade específica da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase aumenta de acordo com o número presente de CC-escuras e que a diminuição no número dessas células e aumento no número de CC-claras faz com que a atividade diminua. O estímulo para diferenciação dessas células em normóxia parece ser maior nos grupos AD24h+IC e AD48h+IC embora a exposição a água deionizada tenha aumentado significativamente o número de CC, enquanto que, quando exposta a hipóxia ambiental as respostas mais acentuadas foram observadas em animais dos grupos mantidos em água controle. Nos demais grupos em condições de hipóxia o número de CC foi menor tanto na lamela quanto no filamento.

Considerando os dois tipos de estresse, choque osmótico e hipóxia, há evidências de que o aumento da densidade de CC predominantemente no filamento preserva, até certo limite, a lamela no sentido de manter a cascata de  $\text{O}_2$  até os tecidos. A proliferação e hipertrofia das CC no epitélio lamelar ajuda a manter a homeostase iônica, mas o aumento da barreira água-sangue devido a essa proliferação pode reduzir a transferência de gases,  $\text{O}_2$  e  $\text{CO}_2$  (BINDON, *et al.*, 1994a, b; GRECO *et al.*, 1995; PERRY, 1998, SAKURAGUI *et al.*, 2003, EVANS *et al.*, 2005).

Semelhante ao relatado no estudo de METZ *et al* (2003), a atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase no presente estudo acompanhou o aumento no número de CC ativas ou maduras e também a elevação do cortisol plasmático acima dos níveis basais. No grupo C, em hipóxia, mesmo havendo um aumento do cortisol plasmático menor em relação aos grupos AD e injetados C+IC e AD+IC, esse aumento foi de 2,49 vezes (149%) maior que os níveis basais e suficiente para induzir a diferenciação das CC e aumento na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase.

Estudos têm demonstrado que o cortisol em níveis acima dos basais estimulam a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase como observado em trutas arco-íris aclimatadas em água doce, nas quais, foram identificados dois receptores de membrana nas CC, um receptor mineralocorticóide (MR) que possui uma alta afinidade ao cortisol e um receptor glicocorticóide (GR) com baixa afinidade a esse hormônio (DUCOURET, *et al.*, 1995; COLOMBE *et al.*, 2000, SLOMAN, *et al.*, 2001). METZ *et al* (2003), sugerem que assim como em trutas arco-íris (SLOMAN, *et al.*, 2001), as carpas possuem esses receptores, mas que o aumento da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase após a administração de cortisol exógeno, resulta de um efeito mediado pelo receptor GR do cortisol. Essa hipótese proposta por SLOMAN, *et al.*, 2001, baseada nos receptores GR e MR em estudos farmacológicos, explica que a maior sensibilidade dos receptores MR são mais intensificadas na regulação em situações quando a proliferação de CC é requerida, como no caso de águas deficientes em íons. Neste caso podemos sugerir que *H. malabaricus* expostas a água deionizada após administração de cortisol exógeno e aumento no número de CC ativas e da atividade  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, ao contrário do que foi proposto em carpas por METZ *et al*, 2003, possa ser o resultado mediado pelos receptores MR do cortisol, corroborando com o que foi observado pela hipótese de SLOMAN, *et al.*, 2001.

Em conclusão, os resultados do presente estudo evidenciam que níveis de cortisol acima dos níveis basais em *H. malabaricus* interferem no equilíbrio iônico e no metabolismo energético quando mantidos em ambiente semelhante ao habitat natural. Entretanto, se o animal for exposto a um estímulo estressor, os efeitos no equilíbrio iônico e metabólico podem ser amenizados quando os níveis de cortisol plasmático estão acima do nível basal. Estes dados corroboram os reportados por BURY *et al.* (1998) que sugerem um efeito protetor do nível aumentado de cortisol frente a um estresse.

## 6. CONCLUSÕES

- a) O aumento do cortisol endógeno liberado pela possível ativação do eixo HHI em *H. malabaricus*, pode ser devido ao estímulo estressor, nos grupos experimentais não injetados em normóxia e em hipóxia.
- b) A variação nos níveis de cortisol está relacionada com a demanda energética observada com as alterações no metabolismo intermediário em *H. malabaricus* submetidas aos estresses iônico, osmótico e hipóxico.
- c) Os níveis de cortisol acima dos níveis basais aparentemente têm efeito restritivo quando *H. malabaricus* são submetidos aos estímulos estressores como o choque osmótico através da exposição á água deionizada e a diminuição da concentração de oxigênio na água através da exposição a hipóxia severa ( $PO_2 = 25-30$  mmHg). Em outras palavras amenizam os efeitos causados pelos dois tipos de estresse.
- d) O aumento na densidade de CC tanto na lamela como no filamento em *H. malabaricus* estão relacionadas com a regulação iônica. No estresse combinado: hipóxia e choque osmótico a diminuição das CC ocorre em ambos filamento e lamela, mas é bem maior nas lamelas.
- e) Os níveis de cortisol acima dos níveis basais causou um aumento da atividade específica da  $Na^+/K^+$ -ATPase em *H. malabaricus* e, conseqüentemente foram acompanhadas pelo aumento na densidade de CC que se coram fortemente (CC-escuras) e que são consideradas como células maduras e ativas.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO HEGABE,S., HANKE, W. The significance of cortisol for osmoregulation in carp (*Cyprinus carpio*) and tilapia (*Sarotherodon mossambicus*). **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 54, p. 409-417, 1984.
- AFFONSO, E. G., POLEZ, V. L. P., CORRÊA, C.F., MAZON, A. F., ARAÚJO, M. R. R., MORAES, G., RANTIN, F. T. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Collossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. **Comp.Fish. Biochem. Physiol.** v. 141C, p.273-280, 2002.
- ALBERTO, A.; CAMARGO, A. F. M. ; VERANI, J. R. ; COSTA, O. T. F. ; FERNANDES, M. N. . Health variables and gill morphology in the tropical fish *Astyanax fasciatus* from untreated domestic sewage contaminated river. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diegi, CA, USA, v. 61, p. 247-255, 2005.
- ALURU, N., VIJAYAN, M.M. Ah receptor activation impairs cortisol response to stress in rainbow trout by disrupting the rate limiting steps in steroidogenesis. **Endocrinol.** doi: 10.1210/en.2005-1143 v.1, p. 21, 2006.
- ARENDS, R. J. Adaptation to stress in fish: studies on sea bream (*Sparus aurata* L), and carp (*Cyprinus carpio* L.). Catholic University of Nijmegen, Holland, PhD Thesis, 111 p., 1999.
- ARENDS, R. J., MANCERA, J.M., WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G. The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), to air exposure and confinement. **J. Endocrinol.** v. 163, n. 1, p. 149-157, 1999.
- AVELLA, M., MANSONI, A., BORNANCIN, M., MAXER-GOSTAN, N. Gill morphology and sodium influx in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) acclimated to artificial freshwater environments. **J. Exp. Zool.**, v. 241, p. 159-169, 1987.
- AZEVEDO, P.; GOMES, A.L. Contribuição ao estudo da traíra, *Hoplias malabaricus*, (BLOCH, 1794). **Boletim de Indústria Animal.** v. 15, p. 15-64, 1943.
- BALM, P.H.M., POTTINGER, Acclimation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to low environmental pH does not involve an action of the pituitary-interrenal axis, but evokes adjustments in branchial ultrastructure. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 50, p. 2532-2541, 1993.
- BAMBERGER, C.M., SCHULTE, H.M. AND CHROUSOS, G.P. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. **Endocr. Rev.** 17, 245–261, 1996.



- BARTON, B.A. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. **Integ. Comp. Biol.** v. 42, p. 517, 2002.
- BARTON, B.A., IWAMA, G.K. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. **Ann. Rev. Fish Dis.** v. 1, p. 3-26, 1991.
- BARTON, B.A., SCHRECK, C.B., BARTON, L.D. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. **Dis. Aquat. Org.** 2, p. 173-185, 1987.
- BARTON, B.A., SCHRECK, C.B., SIGISMONDI, L.A. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile Chinook salmon. **Trans. Amer. Fish. Soc.** v. 115, p. 245-251, 1986.
- BINDON, S.D., FENWICK, J.C., PERRY, S.F. Branchial chloride cell proliferation in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*: Implications for gas transfer. **Can. J. Zool.** v.72, p.1395-1412, 1994a.
- BINDON, S.D., GILMOUR, K.M., FENWICK, J.C., PERRY, S.F. The effect of branchial chloride cell proliferation on gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, **J. Exp. Biol.** v.197, p.47-63, 1994b.
- BOUTILIER, R.G., DOBSON, G., HOEGER, U., RANDALL, D.J. Acute exposure to graded levels of hypoxia in rainbow trout (*Salmo gairdneri*): metabolic and respiratory adaptations. **Respir. Physiol.**, v.71, p. 69-82, 1988.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v.72, p. 248-254, 1976.
- BRILLON, D.J., ZHENG, B., CAMPBELL, R.G. AND MATTHEWS, D.E. Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans. **Am. J. Physiol.** v. 268, p. E501-E513, 1995.
- BRITSKI, H.A., SATO, Y., ROSA, A.B.S. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes das bacias do rio São Francisco) 2ª ed. Brasília. Câmara dos Deputados/CODEVASF, 143 p., 1988.
- BURTON, D.T., HEATH, A.G. Ambient oxygen tension (PO<sub>2</sub>) and transition to anaerobic metabolism entry species of fresh-water fish. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** v. 37, p. 1216 – 1224, 1980.
- BURY, N.R., LI, J., LOCK, R.A.C., WENDELAAR BONGA, S.E. Cortisol protects against copper induced necrosis and promotes apoptosis in fish gill chloride cells in vitro. **Aquatic Toxicol.** v. 40, p. 193-202, 1998.

- CAMPBELL, P.M., POTTINGER, T.G., SUMPTER, J.P. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow trout. **Biol. Reproduct.** v. 47, p. 1140-1150, 1992.
- CARVALHO, C. S, FERNANDES, M. N. Effect of temperature on copper toxicity and hematological responses in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* at low and high pH. **Aquacult.** v. 251, p. 109-117, 2006.
- CHAKRABORTI, P.K., WEISBART, M. High-affinity cortisol receptor activity in the liver of the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 66, p. 323-332, 1987.
- CHARMANDARI, E., TSIGOS, C., CHROROUSUS, G. Endocrinology of the stress response. **Annu. Rev. Physiol.** v. 67, p. 259-84, 2004.
- CLAIREAUX, G., THOMAS, S., FIEVET, B., MOTAIS, R. Adaptive respiratory responses of Trout to acute hypoxia. **Respir. Physiol.** v. 74, p. 91 – 98, 1988.
- COLOMBE L., FOSTIER, A. BURY, N., PAKDEL, F., GUIGUEN, Y. A mineralocorticoid-like receptor in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: cloning and characterization of its steroid binding domain. **Steroids**, v. 65, p. 319-328, 2000.
- CZOCK, D, KELLER, F, RASCHE, MF, HÄUSSLER, U. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Systemically Administered Glucocorticoids. **Clin. Pharmacokinet.**, v. 44 (1), p. 61-98, 2005.
- DANG, Z. C., BALM, P. H. M., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E, LOCK, R.A.C. Cortisol increases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis mossambicus*. **J. Exp. Biol.** v. 203, p. 2349-2355, 2000a.
- DANG, Z. C., LOCK, R.A.C., FLIK, G., WENDELAAR BONGA, S.E. Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase immunoreactivity in branchial chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. **J. Exp. Biol.** v. 203, p. 379-387, 2000b.
- DANGE, A. D. Branchial Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in freshwater or saltwater acclimated tilapia, *Oreochromis (Sarotherodon) mossambicus*: effects of cortisol and thyroxine. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 62, p. 341-343, 1986.
- DONALDSON, E.M. The pituitary-interrenal Axis as an indicator of stress in fish. In: **Stress and Fish**, PICKERING, A.D. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, p. 11-47, 1981.
- DOYON, C., LECLAIR, J., TRUDEAU, V.L., MOON, T.W. Corticotrophin-releasing factor and neuropeptide by glucocorticoids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Gen. Comp. Endocrinol.** p. 1-10, 2005.

- DRIEDZIC, W.R., HOCHACHKA, P.W. Metabolism in fishes during exercise. In Hoar, W.S., Randal, D.J. (eds.) *Fish Physiol.* New York, Academic Press. VII, p. 503-536, 1978.
- DRIEDZIC, W.R., PHELEGER, C.F., FIELDS, J.H.A., FRENCH, C. Alterations in energy metabolism associated with the transition from water to air breathing in fish. **Can. J. Zool.**, v.56, p. 730-735, 1978.
- DUCOURET, B., TUJAGUE, M., ASHRAF, J., MOUCHEL, N., SERVEL, N., VALOTAIRE, Y., THOMPSON, E. B. Cloning of a teleost fish glucocorticoid receptor shows that it contains a deoxyribonucleic acid-binding domain different from that of mammals. **Endocrinology.** v. 136, p. 3774-3783, 1995.
- EROS, S.K., MILLIGAN, C.L. The effect of cortisol on recovery from exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): potential mechanisms of action. **Physiol. Zool.** v. 69, p. 1196–1214, 1996.
- ESTEVEES, F.A. *Fundamentos de Limnologia.* Interciência/Finep, Rio de Janeiro, p. 602, 1998.
- EVANS, D.H. Osmotic and ionic regulation. In: **The Physiology of Fishes**, EVANS, D.H., Boca Raton: CRC press, p. 315-341, 1993.
- EVANS, D.H. Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium. **J. Exp. Zool.** v. 293, p. 336-347, 2002.
- EVANS, D.H., PIERMARINI, P.M., CHOE, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiol. Ver.** v. 85, p. 97–177, 2005.
- FERNANDES M.N., PERNA-MARTINS, S.A. Chloride cell responses to long-term exposure to distilled and hard water in the gill of the armored catfish (*Hypostomus tietensis*) Loricariidae. **Acta Zool.** v. 83, p. 321-328, 2002.
- FERNANDES, M.N., RANTIN, F.T., KALININ, A.L., MORON, S.E. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory function. **Can. J. Zool.**, v. 72, p. 160-165, 1993.
- FERNANDES, M.N., SAKURAGUI, M.M., SANCHES, J.C. Gill Chloride cells and gas transfer in fish exposed to deionized water. In: **“Fish surviving in extreme conditions.”** VAL, A.L., WILSON, R., MACKINLAY, D. (Eds.). American Fisheries Society, Aberdeen. ISBN 1-894337-14-0, p. 55-66, 2000.
- FLIK, G., RENTIER-DELRUE, F. WENDELAAR BONGA, S.E. Calcitropic effects of recombinant prolactins in *Oreochromis mossambicus*. **Am. J. physiol.** v. 266, p. R1302-1308, 1994.

- FOWLER, M.A. Os peixes de água doce do Brasil. **Arq. Zool. Est. S. Paulo**, v. 6 (2), p. 205-404, 1950.
- FSBI. Fish welfare. Briefing paper 2, Fisheries Society of the British Isles, Granta Information Systems, 82A Hight Street, Sawston, Cambridge CB2 4H, p. 1-25, 2002.
- GENTZKOW, C.J., MASEN, J.M. An accurate method for the determination of blood urea nitrogen by direct nesslerization. **J. Biol. Chem.** v. 143, p. 531-544, 1942.
- GINGERICK, W. H., DROTTAR, K. R. Plasma catecholamine concentrations in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) at rest and after anaesthesia and surgery. **Gen. Comp. Endocrinol.** v 73, p. 390 – 397, 1989.
- GODOY, M.P. Família Erythrinidae. In: **Peixes do Brasil. Sub-Ordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassu.** Editora Franciscana, Piracicaba, SP, v. 3, p. 400-444, 1975.
- GOLDBERG, S. Descomplicando a Fisiologia. Porto Alegre: Artes Médicas, ISBN 85-7307-254-9, p.141, 1997.
- GRECO, A.M. GILMOUR, K.M., FENWICK, J.C., PERRY, S.F. The effects of softwater acclimation on respiratory gas transfer in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **J. Exp. Biol.**, v.198, p. 2557-2567, 1995.
- HARROWER, J.R., BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter samples. **J. Appl Physiol.** v. 32 (5), p. 224-228, 1972.
- HEBERT, N.A., STEFFENSEN, J.F. The response of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to progressive hypoxia: fish swimming speed and physiological stress. **Mar. Biol.** v. 147, p. 1403-1412, 2005.
- HOCHACHKA, P.W, SOMERO, G.N. **Strategies in biochemical adaptation**, Saunders, Philadelphia, 358 p., 1973.
- HOCHACHKA, P.W, SOMERO, G.N. Limiting oxygen availability. In: **Biochemical adaptation.** HOCHACHKA, P.W, SOMERO, G.N. (Eds.). Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey, 1984.
- HOCHACHKA, P.W., GUPPY, M., GUDERLEY, H.E., STOREY, K.B., HULBERT, W.C. Metabolic biochemistry of water vs. air-breathing fishes: muscle enzymes and ultrastructure. **Can. J. Zool.**, v.56, p.736-750, 1978.
- ISHIBASHI, Y. EKAWA, H., HIRATA, H., KUMAI, H. Stress response and energy metabolism in various tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to hypoxic conditions. **Fish Sci.** v. 68, p. 1374 – 1383, 2002.

- IWAMA, G.K., AFONSO, L.O.B., VIJAYAN, M.M. Stress in fish. Aquanet workshop on fish welfare. Campbell River, B.C. Canada, p. 1-9, 2004.
- JANSSENS, P.A. AND WATERMAN, J. Hormonal regulation of gluconeogenesis and glycogenolysis in carp (*Cyprinus carpio*) liver pieces cultured in vitro. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 91A, 451-455, 1988.
- JENSEN, F.B., NIKINMAA, M., WEBER, R. Environmental perturbations of oxygen transport in teleost fishes: causes, consequences and compensations. In: **Ecophysiology**. RANKIN, J.C., JENSEN, F.B. (Eds) Chapman & Hall, London, p. 161-179, 1993.
- JOHANSEN, K., MANGUM, C.P., LYKKEBOE, G. Respiratory properties of the blood of Amazon fishes. **Can. J. Zool.**, v.56, p. 898-906, 1978.
- KALININ, A.L., RANTIN, F.T., GLASS, M.L. Dependence on body size of respiratory function in *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) during graded hypoxia. **Fish Physiol. Biochem.**, v.12, n.1, p. 47-51, 1993.
- KALININ, A.L., RANTIN, F.T., FERNANDES M.N., GLASS, M.N. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In: **Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon**. VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F., RANDALL, D.J (Eds), INPA, Manaus, Amazonas, p. 191-202, 1996.
- KEBUS, M.J., COLLINS, M.T., BROWNFIELD, M.S., AMUNDSON, C.H., KAYES, T.B., MALISON, J.A. Effects of rearing density on the stress response and growth of rainbow trout. **J. Aquat. Anim. Health**, Bethesda, v. 4, p. 1-6, 1992.
- KONG, A.N., LUDWIG, E.A., SLAUGHTER, R.L. Pharmacokinetics and pharmacodynamic modeling of direct suppression effects of methylprednisolone on serum cortisol and blood histamine in human subjects. **Clin. Pharmacol. Ther.**; v. 46 (6), p. 616-28, 1989.
- KRAMER, D.L., LINDSEY, C.C., MODIEE, G.E.E., STEVENS, E.D. The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. **Can. J. Zool.**, v. 56, p. 717-729, 1978.
- LAURENT, P.L., DUNEL-ERB, S. Morphology of gill epithelia in fish. *Am. Physiol. Soc.* 7, 147-159, 1980.
- LAURENT, P., HEBIBI, N. Gill morphometry and fish osmoregulation. **Can. J. Zool.**, v. 67, p. 3055-3063, 1989.
- LAURENT, P.; PERRY, S.F. Effects of cortisol on gill chloride cell morphology and ionic uptake in the freshwater trout, *Salmo gairdneri*. **Cell Tissue Res.**, v. 259, p. 429-442, 1990.

- LAURENT, P., HÖBE, H., DUNEL-ERB, S. The role of environmental sodium chloride relative to calcium in gill morphology of freshwater salmonid fish. **Cell Tissue Res**, v. 240, p. 675-692, 1985.
- LEINO, R.L., MCCORMICK, J.H., JENSON, K.M. Changes in gill histology of fathead minnows and yellow perch transferred to soft water or acidified soft water with particular reference to chloride cells. **Cell Tissue Rev.**, v. 250, p. 389-399, 1987.
- LEITÃO, C.M. **Zoogeografia do Brasil**. 2º edição, Editora Nacional, São Paulo, 651p., 1947.
- LOWENSTEIN, J. M. The purine nucleotide cycle revised. **Int. J. Sports. Med.** v. 11, p. 37 – 46, 1990.
- LU, G.D. The metabolism of piruvic acid in normal and vitamin B-deficient state. I. A. Rapid especific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. **Biochem. J.** v. 33, p. 249-254, 1939.
- MANCERA, J.M., PEREZ-FIGARES, J.M., FERNANDEZ-LIEBREZ, P. Effect of cortisol on brackish water adaptation in the euryhaline gilthead sea bream (*Spaurus aurata* L.). **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 107A, p. 397-402, 1994.
- MADSEN, S. S. The hole of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo troutta trutta*). **Gen .Comp. Endochrinol.** v. 79, p. 1 – 11, 1990.
- MARCOM, J. L., WILHELM FILHO, D. Antioxidant processes of the wild tambaqui, *Colossoma macropomum* (Ostheichtyes, Serrasalmidae) from the Amazon. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 126C, p. 257-263, 1999.
- MARTINS, M. L., MORAES, F. R., FUJIMOTO, R.Y., NOMURA, D. T., FENERICK JR, J. Respostas do híbrido tambacu (*Piaractus mesopotamicus* HOLMBERG, 1887 macho X *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 fêmea) a estímulos simples ou consecutivos de captura, **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 28(2), p. 195-204, 2002.
- MATTIAS, A.T., MORON, S.E., FERNANDES, M.N. Aquatic Respiration during hypoxia of the facultative air-breathing *Hoplerythrinus unitaeniatus*. A comparison with the water-breathing *Hoplias malabaricus*. In: **Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon**. VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F., RANDALL, D.J.(Eds). INPA, Manaus, Amazonas, p. 203-211, 1996.
- MAXIME, V., NONNOTTE, G., PEYRAUD, C., WILLIOT, P., TRUCHOT, J.P. Circulatory and respiratory effects of na hypoxic stress in the Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*). **Resp. Physiol.**, v. 100, p. 203-212, 1995.

- 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.**, v. 106, p. 201-212, 1977.
- MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F. Adrenergic responses to stress in fish. In: **Stress and Fish**, PICKERING, A.D. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, p. 49-75, 1981.
- McCORMICK, S.D. Hormonal control of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell function. In: **Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation** (WOOD, C.M.; SHUTTLEWORTH, T.J.), New York: Academic Press, p. 285-315, 1995.
- MCDONALD, D.G., MILLIGAN, C.L. Chemical properties of the blood. In *Fish Physiol.* Hoar, W.S., Randal, D.J., Farrell, A.P. (eds.), Academic Press, San Diego, CA. XII, p. 55-133, 1992.
- McDONALD, G., MILLIGAN, L. Ionic, osmotic and acid base regulation in stress. In: IWAMA, G. K., PICKERING, A. D., SUMPTER, J. P. E SCHRECK, C. B. **Fish stress and health in aquaculture**. Cambridge: Cambridge University press, p. 119 – 144, 1997.
- METZ, J. R., VAN DEN BURG, E. H., WENDELAAR BONGA, S.E., FLIK, G. Regulation of branchial Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in common carp (*Cyprinus carpio* L.) acclimated to different temperatures. **J. Exp. Biol.** v. 206, p. 2273-2280, 2003.
- MOMMSEN, T.P. Metabolism of the fish gill. In Hoar, W.S. and Randall, D.J. eds. **Fish Physiology**. Academic Press, New York, pp. 203–238, 1984.
- MOMMSEN, T.P. Comparative gluconeogenesis in hepatocytes from salmonid fishes. **Can. J. Zool.** v. 64, p. 1110–1117, 1986.
- MOMMSEN, T.P., DANULAT, E., WALSH, P.J. Metabolic actions of glucagon and dexamethasone in liver of the ureogenic teleost *Opsanus beta*. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 85, p. 316–326, 1992.
- MOMMSEN, T.P., VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. **Rev. Fish Biol. Fish.** v. 9, p. 211-268, 1999.
- MONTEIRO, D., TORT, L., ROBAINA, L., VERGANA, J. M., IZQUIERDO, M. S. Low vitamin E in diet reduces resistance of gilthead seabream (*Spaurus aurata*) juveniles. **Fish. Shelfish. Immun.** v.11, p. 473-790, 2001.
- MONTEIRO, M.M., MANCERA, J.M., FONTAÍNHAS-FERNANDES, A., SOUSA, M. Cooper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of (*Oreochromis niloticus*). **Comp. Biochem. Physiol. C**, 375-383, 2005.

- MORAES, G., CATTONY, E. B., SOUZA, R. H. S. Metabolic Responses of the teleost *Hoplias malabaricus* to high levels of environmental nitrite. **Rev. Brasil. Biol.** v. 58, p. 105 – 113, 1997 (a).
- MORAES, G., CHIPPARI, A. R., GUERRA, C. D. R., GOMES, L. C. SOUZA, R. H. S. Immediate changes on metabolic parameters of the freshwater teleost fish *Piaractus mesopotamicus* (pacu) under severe hypoxia. **Bol. Tec. CEPTA**, v. 10, n. unico, p. 42 – 52, 1997 (b).
- MORAES, G., CHOUDHURI, J.V., SOUZA, R.H.S. Metabolic strategies of *Hypostomus regani* (cascudo), a freshwater teleost fish under extreme environmental hypoxia. **Bol. Tec. CEPTA**, v. 10, p. 35-44, 1997 (c).
- MORON, S.E. Efeitos das concentrações de íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$  na morfologia branquial e nos parâmetros fisiológicos de *Hoplias malabaricus* e *Hoplerythrinus unitaeniatus* (TELEOSTEI, ERYTHRINIDAE). Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. Tese de Doutorado, 90 p., 2000.
- MORON, S.E., FERNANDES, M.N. Epithelium cell changes on the gills of fresh water, *Hoplias malabaricus* (ERYTHRINIDAE) exposed to deionized and hard water. **Acta Microscópica, Suppl B.**, v.6, p. 630, 1997.
- MORON, S.E., OBA, E.T., ANDRADE, C.A., FERNANDES, M.N. Chloride cell responses to ion challenge in two tropical freshwater fish, the erythrinids (*Hoplias malabaricus*) and (*Hoplerythrinus unitaeniatus*). **J. Exp. Zool.** 298A, 93-104, 2003.
- NIKINMAA, M. Adrenergic regulation of haemoglobin oxygen affinity in rainbow trout red cells. **J. Comp. Physiol.** v. 157, p. 67 – 72, 1983.
- NIKINMAA, M. Control of red cell pH in teleost fishes. **Ann. Zool. Fenn.** v. 23, p. 223 -235, 1986.
- NIKINMAA, M. Vertebrate red blood cells. Adaptation of function to respiratory requirements. Springer-Verlag, Berlin, 262 p., 1990.
- NOLAN, D.T. Skin response of fish to stressors. Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda, 2000.
- OKAWARA, Y., KO, D., MORLEY, S.D., RICHTER, D., LEDERIS, K.P. In situ hybridization of corticotrophin-releasing factor-encoding messenger RNA in the hypothalamus of the white sucker. (*Catostomus commersoni*). **Cell Tissue Res.** v. 267, 545-549, 1992.
- OYAKAMA, O. Erythrinidae. In: (Editorial List.). **Checklist of the freshwater fishes of South and Central América.** In preparation. Website: [www.fisbase.org](http://www.fisbase.org), 2001.



- PAIVA, M.P. Fisiocologia da traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH) no Nordeste Brasileiro. Crescimento, resistência à salinidade, alimentação e reprodução. Instituto de Biociências – USP. Tese de Doutorado, 140 p., 1972
- PERRY, S. F. The chloride cells: structure and function of freshwater fishes. **Annu. Rev. Physiol.** v. 59, p. 325-347, 1997.
- PERRY, S. F. Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 119A, p. 9-16, 1998.
- PERRY, S.F., LAURENT, P. Adaptation responses of rainbow trout to lowered external NaCl concentration: contribution of the branchial chloride cell. **J. Exp. Biol.**, v. 147, p. 147-68, 1989.
- PERRY, S.F., LAURENT, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In Rankin JC, Jensen FB (Eds), *Fish Ecophysiol.* Chapman & Hall, London, pp 231-264. Pottinger, T.G., Moran, T.A., 1993. Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Fish Biol.**, London, v. 43, p. 121-130, 1993.
- PERRY, S.F., REID, S.G. Relationship between blood oxygen content and catecholamine levels during hypoxia in rainbow trout and American eel. **Am. J. Physiol.** v. 263, p. 240 – 249, 1992.
- PERRY, S.F., WALSH, P.J. Metabolism of isolated fish gill cells: contribution of epithelial chloride cells. **J. Exp. Biol.** v. 144, p. 507–520, 1989.
- PETERSON, M. S. Hypoxia – induced physiological changes in two mangrove swamp fishes: sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus* lacepede and safin molly, *Poecilia latipinna* (Lesueur), 1990.
- PICHAVANT, K., MAXIME, V., THEBAULT, M.T., OLLIVIER, H., GARNIER, J. P., BOUSQUET, B., DIOURIS, M., BOEUF, G., NONNOTTE, G. Effects of hypoxia and subsequent recovery on turbot *Scophthalmus maximus* : Hormonal changes and energy metabolism. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 225, p. 275 – 285, 2002.
- PICKERING, A. D., POTTINGER, T. G. Biochemical effects of stress. In : Hochacka, P. W., Mommsen, T. P. (eds). **Environmental and Ecological Biochemistry.** Oxford, p. 350 – 379, 1995.
- POORTMANS, J. R. Protein methabolism. In: Poortmans J. (ed.), **Medicine Sports Science.** v. 27, p. 164 – 193, 1988.

- POTTINGER, T.G., MORAN, T.A. Differences in plasma cortisol and cortisone dynamics during stress in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Fish Biol.*, London, 43, 121-130, 1993.
- POTTINGER, T.G., PICKERING, A.D., HURLEY, M.A. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, Amsterdam, 103, 275-289, 1992.
- QUABIUS, E. S., BALM, P. H. M., WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 108, p. 472 – 482, 1997.
- RANDALL, D. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.** v. 100, p. 275-288, 1982.
- RANDALL, D.J., PERRY, S.F. Catecholamines. In: **Fish Physiology** (HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; FARRELL, A.P.), San Diego: Academic Press, p. 255-300, 1992.
- RANTIN, F.T. Effects of environmental oxygen changes on cardio-respiratory function in fish. In: **The Vertebrate Gas Transport Cascade: Adaptations to Environment and Mode of Life**. Bicudo, J.E.P.W. (Ed.). CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, p. 223 – 241, 1993.
- RANTIN, F.T., JOHANSEN, K. Responses of the teleost, *Hoplias malabaricus*, to hypoxia. **Env. Biol. Fish.** v. 11 (3), p. 221-228, 1984.
- RANTIN, F.T., KALININ, A.L., GLASS, M.L., FERNANDES, M.N. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life of two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) **J. Fish. Biol.**, v. 41, p.805-812, 1992.
- RENAUD, J.M., MOON, T.W. Characterization of gluconeogenesis in hepatocytes isolated from the American eel, *Anguilla rostrata* LeSueur. **J. Comp. Physiol.** v. 135B, p. 115–125, 1980.
- RICHMAN, N. H., ZAUGG, W. S. Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre- and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 65, p. 189-198, 1987.
- RIOS, F.S. ; MORAES, G. ; OBA, E.T. ; FERNANDES, M.N. ; DONATTI, L. ; KALININ, A.L. ; RANTIN, F.T. Mobilization and recovery of energy stores in traíra, *Hoplias malabaricus* Bloch (Teleostei, Erythrinidae) during long-term starvation and after re-feeding. **Journal of Comparative Physiology B - Biochemical Systemic and Environmental Physiology**, <http://dx.doi.org/10.1007/s00360-006-0098-3>, 2006.

- ROCHE, H., BOGÉ, G. Fish blood parameters as a potencial tool for identification of stress cause by environmental factors and chemical intoxication. **Mar. Environ. Res.** v. 41, p. 27-43, 1999.
- SAHLIN, K., KATZ, A. Purine nucleotide methabolism. In: Poortmans (ed). **Medicine Sports Science.** v 27, p. 120 – 139, 1988.
- SANTOS, L.C., Estudos das populações de Cladóceras em cinco lagos naturais (Parque Florestal do Rio Doce – MG), que se encontram em diferentes estágios de evolução. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. Dissertação de Mestrado, 260 p., 1980.
- SAKURAGUI, M.M. Respostas respiratórias e adaptações fisiológicas de traíra, *Hoplias malabaricus* (Teleostei, Erythrinidae) submetidas à hipóxia durante exposição à água deionizada, Universidade Federal de São Carlos. Dissertação de Mestrado, 88 p., 2000.
- SAKURAGUI, M.M., SANCHES, J.R., FERNANDES, M.N. Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish (*Hoplias malabaricus*). **J. Comp. Physiol. B**, v. 173, p. 309-317, 2003.
- SALONIUS, K., IWAMA, G.K. Effects of early rearing environment on stress responses, immune function, and disease resistance in juvenile coho (*Oncorhynchus kisutch*) and Chinook salmon (*O. tshawytschai*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, Ottawa, v. 50, p. 759-766, 1993.
- SAPOLSKY, R.M., ROMERO, L.M., MUNCK, A.U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. **Endocr. Rev.**, v. 21, p. 55-89, 2000.
- SCHRECK, C.B. Accumulation and long-term effects of stress in fish. In **The biology of animal stress**. Basis, Principles and implications for animal welfare (Moberg, G.P., Mench, J.A., eds.), Oxon, UK, CABI Publishing, pp. 147-158, 2000.
- SILVA, V.P. Variações diurnas de fatores ecológicos de quatro lagos naturais do Pantanal Matogrossense e seus estudos comparativos com dois lagos da Amazônia Central e um lago artificial (Represa do Lobo Broa, São Carlos, SP). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, Dissertação de Mestrado, 281 p., 1980.
- SLOMAN, K. A., DESFORGES, P. R., GILMOUR, K. M. Evidence for a mineralocorticoid –like receptor linked to branchial chloride cell proliferation in freshwater rainbow trout. **J. Exp. Biol.** v. 204, p. 3953-3961, 2001.
- SUAREZ, R.K., MOMMSEN, T.P. Gluconeogenesis in teleost fishes. **Can. J. Zool.** v. 65, p. 1869–1882, 1987.

- SUMPTER, J.P. The endocrinology of stress. In Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B., **Fish stress and Health in Aquaculture**. Cambridge, Cambridge University Press, 95-117, 1997.
- SWIFT, D. J. Changes in selectal blood component concentration of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, exposed to hypoxia or sublethal concentration of phenol or ammonia. **J. P. Fish Biol.** v. 19, p. 45 – 61, 1981.
- SWIFT, D. J. Changes in selectal blood component concentration of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, following the blocking of the cortisol a stress response with betamethasone and subsequent exposure to phenol or hypoxia. **J. P. Fish Biol.** v. 21, p. 269 – 277, 1982.
- TETTENS, V., LYKKEBOE, G. Blood respiratory properties of rainbow trout, *Salmo gairdineri*: Responses to hypoxia acclimation and anoxic incubation of blood in vitro. **J. Comp. Physiol.** v. 145, p. 117 – 125, 1981.
- TETTENS, V., LYKKEBOE, G. Acute exposure of rainbow trout to mild and deep hypoxia: O<sub>2</sub> affinity and O<sub>2</sub> capacitance af arterial blood. **Respir. Physiol.** v. 61, p.221 – 235, 1985.
- THE BIOLOGY PROJECT. <http://www.biology.arizona.edu>. All contents copyright © 1996. All rights reserved. University of Arizona Tuesday, August 20, 1996.
- VAL, A.L. Adaptations of fish to extreme conditions in fresh waters. *In: The vertebrate gas transport cascade. Adaptations to environmental and mode of life*. BICUDO, J. E. P. W. (ed.). CRC Press, Boca Raton, p. 43-53, 1993.
- VAL, A.L. Organic phosphates in the red blood cells of fishe. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 125A, p. 417-435, 2000.
- VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F. **Fishes of the Amazon and their environments. Physiological and biochemical features**, Springer Verlag, Heilderberg, 1995.
- VAL, A.L., ALMEIDA-VAL, V.M.F, AFFONSO, E.G. Adaptative features of Amazon fishes: hemoglobins, hematology, intraerythrocytic phosphates and rwhole blood Boor effect of *Pterigoplichthys multiradiatus* (Siluriformes). **Comp. Biochem. Physiol.** v. 97, 435-440,1990.
- VAN DER SALM, A.L., PAVLIDIS, M., FLICK, G. WENDELAAR BONGA, S.E. The acute stress response of red porgy (*Pagrus pagrus*) kept on a red or white background. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 145, 247-253, 2006.
- VAN RAAIJ, M.T.M., PIT, D.S.S., BALM, P.H.M., STEFFENS, A.B., VAN DEN THILLART, G.E.J.M. Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. **Horm. Behav.** v. 30, p. 85-92, 1996 b.

- VIJAYAN, M.M., MOON, T.W. The stress response and the plasma disappearance of corticosteroid and glucose in a marine teleost, the sea raven. **Can. J. Zool.** Ottawa, v. 72, p. 379-382, 1994.
- VIJAYAN, M.M., BALLANTYNE, J.S., LEATHERLAND, J.F. Cortisol-induced changes in some aspects of the intermediary metabolism of *Salvelinus fontinalis*. **Gen. Comp. Endocrinol.** v. 82, p. 476-486, 1991.
- VIJAYAN, M. M., PEREIRA, C., MOON, T. W. Hormonal stimulation of hepatocyte metabolism in rainbow trout following an acute handling stress. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 108, p. 321 – 329, 1994 (a).
- VIJAYAN, M.M.; REDDY, P.K.; LEATHERLAND, J.F.; MOON, T.W. The effects of cortisol on hepatocyte metabolism in rainbow trout: a study using the steroid analogue RU486. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v. 96, p. 75-84, 1994 (b).
- VIJAYAN, M. M., PEREIRA, C., GRAU, E. G., IWAMA, G. K. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 116 C, p. 89 – 95, 1997.
- VIJAYAN, M.M., MOMMSEN, T.P., GLÉMET, H.C., MOON, T.W. Metabolic effects of cortisol in a marine teleost, the sea raven. **J. Exp. Biol.** v. 199, p. 1509-1514, 1996 (a).
- VIJAYAN, M.M., MORGAN, J.D., SAKAMOTO, T., GRAU, E.G. AND IWAMA, G.K. Food-deprivation affects seawater acclimation in tilapia: hormonal and metabolic changes. **J. Exp. Biol.** v. 199, p. 2467-2475, 1996 (b).
- VITOR LOPES, M.D. Interpretação dos níveis de lactato no sangue. CIMC-99. In: 1º Congresso Internacional de Medicina Crítica na Internet, p. 1-5, 1999.
- WELD, M.M., FRYER, J.N., RIVIER, J., LEDERIS, K. Inhibition of CRF- and Urotensin I stimulated ACTH release from goldfish pituitary cell columns by the CRF analogue  $\alpha$ -helical CRF-(9-41). **Regulatory Peptides**, v. 19, p. 273-280, 1987.
- WENDELLAR BONGA, S.E. The stress response in fish. **Physiol. Rev.**, v. 77, p. 591-625, 1997.
- WOOD, S.C., LENFANT, C. Oxygen transport and oxygen delivery. In: **Evolution of Respiratory Process. A Comparative Approach**. WOOD, S.C., LENFANT, C. (Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, Chap. IV, p. 193-223, 1979.