



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**



**RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO MATRINXÃ *Brycon amazonicus*
APÓS MUDANÇA DE AMBIENTES COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE SAIS DE CÁLCIO E DE SÓDIO**

**Fabiano Bendhack
Zootecnista**

**Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2008**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL



RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO MATRINXÃ *Brycon amazonicus*
APÓS MUDANÇA DE AMBIENTES COM DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE SAIS DE CÁLCIO E DE SÓDIO

Fabiano Bendhack
Doutorando

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo César Falanghe Carneiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura, do Centro de Aqüicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aqüicultura.

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2008

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO MATRINXÃ Brycon amazonicus
APÓS MUDANÇA DE AMBIENTES COM DIFERENTES CONCENTRA
ÇÕES DE SAIS DE CÁLCIO E DE SÓDIO.

AUTOR: FABIANO BENDHACK

ORIENTADOR: Profa. Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

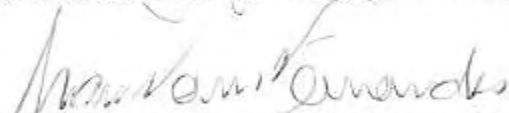
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de
DOUTOR EM AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati – Orientadora



Dra. Maria José Tavares Ranzani de Paiva



Dra. Marisa Narciso Fernandes



Dr. Sérgio Fonseca Zaiden



Dr. Levy de Carvalho Gomes

Data da realização: 22 de fevereiro de 2008.



Presidente da Comissão Examinadora

Dra. Elisabeth Criscuolo Urbinati

Coordenação do Programa de Pós-graduação – Centro de Aqüicultura da Unesp
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellani, s/n Cep 14884-900 Jaboticabal SP Brasil.
Tel (16) 3203-2110/3209-2615 ramal 214 Fax (16) 3203.2268
pgaqui@caunesp.unesp.br www.caunesp.unesp.br

Agradecimentos

À Professora Elisabeth Urbinati, pela orientação, incentivo e confiança depositada em mim. Os seus ensinamentos técnicos, a visão científica e a convivência ao seu lado proporcionaram uma nova forma de encarar desafios. Hoje também vejo que o seu otimismo, entusiasmo e forma de trabalhar foram contagiantes para eu poder transmitir os conhecimentos adquiridos junto a você.

Ao Professor e amigo Paulo Carneiro, pelas portas que abriu na minha vida profissional, orientação e valiosas sugestões neste trabalho.

Aos Professores Marisa Fernandes, Levy Gomes, Sérgio Zaiden, Maria José R. Paiva pelas valiosas contribuições como banca de defesa deste trabalho.

À Dra. Marise Sakuragui e Dr. Sérgio Zaiden pelas sugestões como banca de Exame de Qualificação deste trabalho.

À Damares pelo apoio técnico, ensinamentos, pelos bons momentos que passamos juntos e por acolher a Aninha na minha ausência.

Aos companheiros desta jornada: Léo Takahashi, Léo "Bacarin", Márcio, Jaque, Luciana, Sumo, Spinha, Mônica, Carlinha, Rafael Sabioni, Rafael Prévide, Janessa, Michele, Mari e Case, Karol, Thiago "Balboa", Felipe "Tumor" que contribuíram com este trabalho.

Ao Professor João Batista Fernandes pelos ensinamentos, amizade, e uso de seu laboratório.

Aos professores, funcionários, amigos e colegas do CAUNESP que contribuíram com este trabalho.

Aos professores, funcionários amigos e colegas do Departamento de fisiologia e morfologia animal que contribuíram com este trabalho.

Aos Professores, funcionários, bolsistas e acadêmicos da PUCPR que atuam junto ao CPPOM pela compreensão durante o período que me ausentei.

Aos meus pais, Beto e Sandra, e nossa família: Marcelo, Ju, Giulia, Júnior, Tati, Antonio, Marlene, Thais, Reinaldo, Tatiane, Sandro e João Paulo pela compreensão de eu não estar presente em muitos encontros porque me dedicava a este trabalho e pelo apoio.

Aos grandes amigos Lusiane e Benê, pelas orientações e por serem excepcional exemplo de dedicação ao conhecimento e a vida científica.

Dedicação

Dedico este trabalho à Dra. Ana Paula Baldan ou "minha Aninha" por ter apoiado a minha saída em busca de um novo desafio e pela dedicação total que teve para me auxiliar a realização deste trabalho

"Aninha, ter você ao lado é como ter uma grande equipe competente para trabalhar, os seus conhecimentos tornam a tarefa muito mais fácil e pessoalmente você tem um coração e determinação que me fazem seguir na vida me sentindo privilegiado de ter você como minha eterna namorada"

ÍNDICE

Resumo Geral.....	01
Summary.....	02
Capítulo I - Revisão da Literatura.....	03
Introdução.....	04
Referências Bibliográficas.....	13
Capítulo II - Respostas fisiológicas do matrinxã <i>Brycon amazonicus</i> após mudança de meios com diferentes concentrações de cálcio.....	16
Resumo.....	17
Abstract.....	18
Introdução.....	19
Material e Métodos.....	21
Resultados.....	26
Discussão.....	43
Referências Bibliográficas.....	47
Capítulo III - Respostas fisiológicas do matrinxã <i>Brycon amazonicus</i> após mudança de meios com diferentes concentrações de cloreto de sódio.....	51
Resumo.....	52
Abstract.....	53
Introdução.....	54
Material e Métodos.....	54
Resultados.....	61
Discussão.....	77
Referências Bibliográficas.....	80
Capítulo IV - Considerações Finais.....	83

ÍNDICE DE TABELAS E FIGURAS

Capítulo I

Figuras

- Figura 01: Modelo de célula branquial para a captação de íons em peixes adaptados a ambiente hipotônico.....07
- Figura 02: Principais eventos fisiológicos ocorridos quando trutas foram transferidas de água doce para água marinha diluída.08

Capítulo II

Tabelas

- Tabela 01: Valores médios \pm desvio padrão da média de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água antes e após a transferência de matrinxãs a diferentes concentrações de CaCl_226
- Tabela 02: Valores médios \pm desvio padrão da média de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água antes e após a transferência de matrinxãs aclimatados em diferentes concentrações de CaCl_2 para câmaras com água sem adição de sais.....35

Figuras

- Figura 01: Esquema do desenho experimental de matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L^{-1} 22
- Figura 02: Esquema do desenho experimental de matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl_2 nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L^{-1} para água sem adição de sal.....23
- Figura 03: Valores médios de glicose plasmática em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L^{-1} 27
- Figura 04: Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl_2 concentrações de 0;150; 300 e 600 mg L^{-1} 28

Figura 05: Valores médios de cloreto sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl ₂ em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹	28
Figura 06: Valores médios da atividade da enzima Na ⁺ K ⁺ ATPase nas brânquias de matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de CaCl ₂ em concentrações de 0;150; 300 e 600 mg L ⁻¹	29
Figura 07: Valores médios da excreção de amônia por matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl ₂ em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹	30
Figura 08: Valores médios de potássio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl ₂ em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹	31
Figura 09: Valores médios de cálcio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para com água com adição de CaCl ₂ em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹	31
Figura 10: Valores médios de hematócrito em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de CaCl ₂ em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹	32
Figura 11: Valores médios da contagem de eritrócitos em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de CaCl ₂ em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹	33
Figura 12: Valores médios do volume corpuscular dos eritrócitos, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de CaCl ₂	34
Figura 13: Valores médios da concentração de hemoglobina em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl ₂ em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹	34
Figura 14: Valores médios de glicose plasmática em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	36
Figura 15: Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	37
Figura 16: Valores médios de cloreto sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	37
Figura 17: Valores médios da atividade específica da enzima Na ⁺ K ⁺ ATPase nas brânquias de matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	38

Figura 18: Valores médios da excreção de amônia por matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	39
Figura 19: Valores médios de potássio sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	39
Figura 20: Valores médios de hematócrito em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	40
Figura 21: Valores médios da contagem de eritrócitos circulantes em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	41
Figura 22: Valores médios do volume corpuscular dos eritrócitos, que não diferiram entre si, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs após transferência.....	41
Figura 23: Valores médios de hemoglobina em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl ₂ nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	42

Capítulo III

Tabelas

Tabela 01: Valores médios ± desvio padrão da média de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água antes e após a transferência de matrinxãs a diferentes concentrações de NaCl.....	61
Tabela 02: Valores médios ± desvio padrão da média de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água antes e após a transferência de matrinxãs aclimatados em diferentes concentrações de NaCl para câmaras com água sem adição de sais.....	70

Figuras

Figura 01: Esquema do desenho experimental de matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	57
Figura 02: Esquema do desenho experimental de matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl nas concentrações: 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹ para água sem adição de sal.....	58

Figura 03: Valores médios de glicose plasmática em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	62
Figura 04: Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	63
Figura 05: Valores médios de cloreto sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	63
Figura 06: Valores médios da atividade da enzima Na ⁺ K ⁺ ATPase nas brânquias de matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	64
Figura 07: Valores médios da excreção de amônia por matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	65
Figura 08: Valores médios de potássio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	66
Figura 09: Valores médios de cálcio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para com água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	66
Figura 10: Valores médios da contagem de eritrócitos em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	67
Figura 11: Valores médios do volume corpuscular dos eritrócitos, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	68
Figura 12: Valores médios de hematócrito em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	68
Figura 13: Valores médios da concentração de hemoglobina em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹	69
Figura 14: Valores médios de glicose plasmática em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹ . para água sem adição de sal.....	71
Figura 15: Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹ . para água sem adição de sal.....	71
Figura 16: Valores médios de cloreto sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹ . para água sem adição de sal....	72
Figura 17: Valores médios da atividade específica da enzima Na ⁺ K ⁺ ATPase nas brânquias de matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹ . para água sem adição de sal.....	73

Figura 18: Valores médios da excreção de amônia por matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹ . para água sem adição de sal.....	73
Figura 19: Valores médios da contagem de eritrócitos circulantes em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹ . para água sem adição de sal.....	74
Figura 20: Valores médios do volume corpuscular dos eritrócitos, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs após transferência.....	75
Figura 21: Valores médios de hematócrito, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs após transferência.....	75
Figura 22: Valores médios de hemoglobina em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L ⁻¹ . para água sem adição de sal....	76

RESUMO GERAL

Na aquicultura, os peixes são freqüentemente expostos a agentes estressores como os choques osmóticos presentes principalmente nas práticas de transferência. O presente estudo analisou as respostas fisiológicas do matrinxã *Brycon amazonicus* à transferência para ambientes com diferentes concentrações de sais dissolvidos (cloreto de cálcio e cloreto de sódio). No experimento com cloreto de cálcio, num primeiro ensaio, os peixes foram aclimatados em caixas de 500 L com água sem adição de sais e após 48 horas de jejum foram transferidos para unidades individuais contendo cloreto de cálcio (0, 150, 300 e 600 mg L⁻¹). Em outro ensaio, os peixes foram aclimatados por 12 horas nas mesmas concentrações de CaCl₂ e transferidos para as unidades sem adição do sal. As amostragens foram realizadas antes, 1, 3, 6 e 12 horas após a transferência. Verificou-se os níveis de glicose plasmática, íons e parâmetros hematológicos, além da taxa de excreção de amônia e atividade da enzima Na⁺ K⁺ ATPase nas brânquias. Os peixes transferidos para água com CaCl₂ apresentaram as principais alterações no sódio sérico depois de uma hora. No outro experimento, os peixes foram submetidos aos mesmos procedimentos, porém com adição de NaCl (0, 3, 6 e 9 g L⁻¹). Neste caso, os peixes apresentaram menor resposta ao estresse de acordo com a glicemia, porém os níveis séricos de sódio se elevaram nos peixes transferidos para 9 g L⁻¹. Quando transferidos para ambiente com cálcio, apresentaram alterações moderadas, já quando submetidos ao choque da transferência para água sem sais, as respostas foram mais homogêneas sugerindo maior facilidade na adaptação. No caso do NaCl é possível sugerir que este sal possui papel importante na mitigação do estresse, entretanto, a concentração deste sal pode interferir no benefício.

SUMMARY

In aquaculture, fish are frequently exposed to stressors agents such as shocks osmotic present mainly in the practices of transfer. This study examined the physiological responses of matrinxã *Brycon amazonicus* transferred to environments with different concentrations of dissolved salts (calcium chloride and sodium chloride). In the experiment with calcium chloride, in a first assay, the fish were adapted in 1000 L aquaria, without salts, after 48 hours of fasting were transferred to individual units containing calcium chloride (0,150, 300 and 600 mg L⁻¹). In another assay, the fish were adapted for 12 hours in the same concentrations of CaCl₂ and transferred to the individual units without the addition of salts. Samples were taken before, 1, 3, 6 and 12 hours after the transfer. Plasma glucose, ionic and haematological parameters, the rate of excretion of ammonia and enzyme activity of Na⁺ K⁺ ATPase in the gills were checked. The fish transferred from water without salts to water with CaCl₂ showed the main changes in serum sodium one hour after the management. After adjusting the water with calcium, the enzyme activity of the Na⁺ K⁺ ATPase proved to be greater in the most concentrated, but equally the values of the control group after the transfer. In another experiment, the fish underwent the same procedures, but with the replacement of the calcium chloride sodium chloride (0, 3, 6 and 9 g L⁻¹). In this case, the fish had lower response to stress, according to the blood glucose, but the serum levels of sodium are raised in fish transferred to 9 g L⁻¹. When transferred to environment with calcium, showed moderate changes, as when subjected to shock transfer to the water without salt, the answers were more homogeneous suggesting greater ease in adapting. In the case of NaCl is possible to suggest that this salt has important role in mitigating the stress, however, concentration this salt may interfere on benefit.

CAPÍTULO I

REVISÃO DA LITERATURA

INTRODUÇÃO

O estresse pode ser definido como um conjunto de respostas fisiológicas generalizadas de um organismo na presença de agentes estressores. Tais agentes adversos podem ser químicos, físicos ou sociais. Convencionalmente, as respostas de estresse são classificadas em primárias (neural e neuro-endócrinas), secundárias (conseqüências fisiológicas resultantes das primárias) e terciárias (alterações comportamentais, diminuição de crescimento e aumento da suscetibilidade a doenças). Apesar da conveniência desta classificação, as respostas de um animal ao estresse são integradas, envolvendo todos os níveis (primários, secundários e terciários) (Mazeaud *et al.*, 1977; Wedemeyer & McLeay, 1981). Estas respostas evoluíram a partir de mecanismos adaptativos que permitem ao animal manter a homeostase, frente a estímulos adversos. Em termos gerais, as respostas ao estresse podem ser vistas como uma mudança do anabolismo para o catabolismo, permitindo a utilização de reservas energéticas indisponíveis em condições normais (Pickering, 1981).

Na aqüicultura, é freqüente a exposição dos peixes a procedimentos estressores, tais como captura, transporte, hipóxia e mudanças de temperatura e osmóticas. Estes estímulos iniciam uma resposta do organismo que se dá em três fases, sendo a primeira uma reação de alarme e a segunda uma fase de resistência aos efeitos negativos do estresse. Durante a segunda fase, os organismos tendem a compensar as condições adversas pela utilização de reservas energéticas, que são disponibilizadas para a modulação das funções cardio-respiratórias (Reid *et al.*, 1998) e metabólicas (Wendelaar Bonga, 1997). Representam os efeitos terciários ao estresse a diminuição do crescimento (Weil *et al.*, 2001), resistência a doenças (Robertson *et al.*, 1987) e capacidade reprodutiva (Morgan *et al.*, 1999).

Quando a capacidade de compensação por estes mecanismos, se esgota, seja pela intensidade ou pela duração dos estímulos, a saúde dos peixes pode estar comprometida (Eddy, 1981). Na resposta primária, um estímulo do sistema nervoso simpático atinge as células cromafins, do rim cefálico, que liberam as catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) com função de aumentar os batimentos operculares, estimular o fluxo de sangue nas brânquias e aumentar a capacidade de transporte de oxigênio no sangue (Fabbri et al., 1998). Outro componente da resposta primária é a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), liberado pela hipófise, e conduzido pela circulação até as células do tecido interrenal também localizado no rim cefálico. O ACTH provoca a liberação de cortisol que possui ação mantenedora do estado supressor dos efeitos negativos (Wendelaar Bonga, 1997). O cortisol também é um componente essencial na regulação osmótica em peixes (Mommsen et al., 1999; Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997).

A hiperglicemia é causada pelo aumento das catecolaminas e mantida pelos altos valores de cortisol, originada pela glicogenólise no fígado, sendo esta, importante resposta secundária ao estresse (Mommsen et al., 1999). A hiperglicemia tem o papel de proporcionar energia para os peixes na fuga ou enfrentamento da situação adversa (Wendelaar Bonga, 1997).

Além das respostas fisiológicas citadas, algumas características hematológicas podem ser utilizadas na determinação das respostas ao estresse. Mudanças nos valores da hemoglobina, no número de células vermelhas e no hematócrito, após estímulo de algum agente estressor, podem indicar hemodiluição ou hemoconcentração devido a disfunções osmorregulatórias e demanda de oxigênio.

Outro componente das respostas secundárias é o aumento da captação de oxigênio que ocorre pela alteração dos batimentos cardíacos e operculares. Ao mesmo tempo em que ocorre maior ventilação, a exposição do epitélio branquial provoca aumento na sua permeabilidade causando desequilíbrio osmótico em ambientes hipo ou hipertônicos. Distúrbios hidrominerais são importantes aspectos do estresse nos peixes e estão ligados à diferença osmótica entre o animal e o ambiente associado à permeabilidade do epitélio branquial.

Em meio hipotônico, existe a tendência dos peixes de água doce ganhar água e perderem sais. O balanço osmótico acontece com a eliminação da água através da urina, mas a perda de sais deve ser contida pelos rins, da mesma forma que acontece a modulação desses íons pelas brânquias (Evans, 2002).

Em meio hipertônico, os peixes teleósteos ingerem grandes quantidades de água. A água é absorvida pelo intestino pela absorção dos sais presentes e com isso produz um gradiente que osmoticamente retira a água do intestino para a corrente sanguínea. O excesso de sais é eliminado pelos ionócitos presentes nas brânquias.

Os ionócitos são células especializadas na troca iônica tanto em peixes de água salgada quanto em água doce. Até o presente é aceito um modelo destas células para peixes adaptados a água doce, nas quais a captação de sódio (Na^+) e de cloreto (Cl^-) são independentes e realizadas trocando estes íons por outros que precisam ser eliminados do organismo, como o íon amônio (NH_4^+), íon bicarbonato (HCO_3^-) ou hidrogênio (H^+) (Evans et al., 1999). Na membrana basolateral, há uma bomba protéica de Na^+/K^+ , que cria um gradiente favorável à entrada de sódio (membrana apical) em sistema de anti-porte, eliminando a amônia ionizada (NH_4^+) ou H^+ . O Cl^- é trocado na membrana apical pelo HCO_3^- , resultado da hidratação do

CO₂ da respiração pela anidrase carbônica (enzima catalisadora do processo). A entrada do cálcio se dá através de difusão pela formação do gradiente osmótico da bomba Na⁺/Ca²⁺ (Flik & Verbost, 1993) (Figura 1).

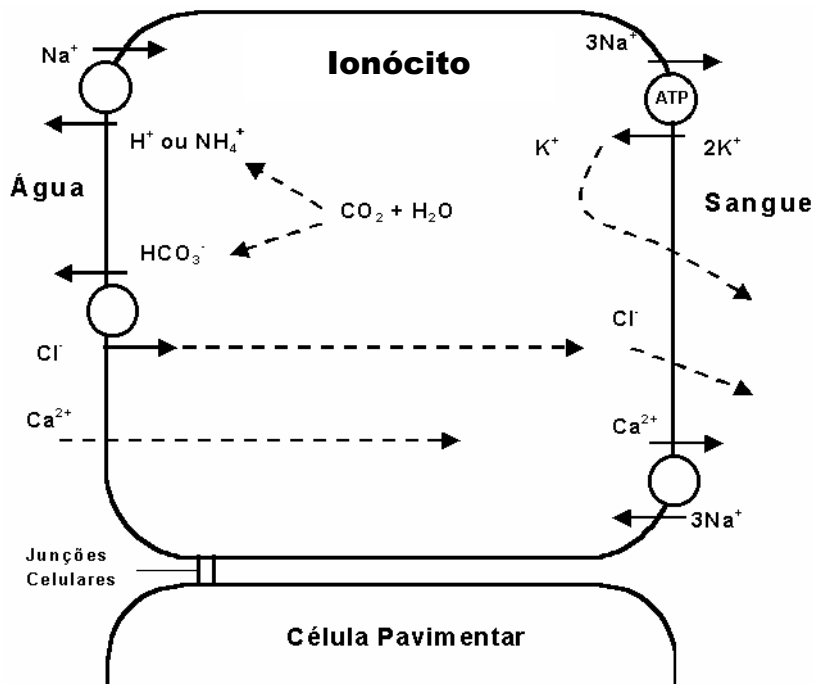


Figura 01: Modelo de célula branquial para a captação de íons em peixes adaptados a ambiente hipotônico.

Entretanto, Evans et al. (1999) sugeriram que a tomada de cloreto e sódio era realizada por células diferentes. Hwang & Lee (2007) propuseram que os íonocitos dos peixes de água doce podem se diferenciar quanto à morfologia da membrana apical quando ocorrem mudanças bruscas na salinidade da água podem ser de três tipos: 1- ondulada convexa, 2- côncava rasa e 3- côncava profunda. Estas mudanças podem ocorrer já após 3 horas da transferência como primeira forma de adaptação seguida pela proliferação ou diminuição de tipos celulares.

Baseado em estudos recentes e em ferramentas moleculares, Hwang & Lee (2007) propuseram, pelo menos 3 tipos de ionócitos com especificidades na captação iônica e regulação ácido-base. O primeiro refere-se à célula sódio cloreto co-transportadora que desempenha principalmente o co-transporte de Na^+ e Cl^- . O segundo tipo é uma célula especializada na tomada de sódio, por meio da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ e, por último, uma célula especializada na troca dos íons H^+ .

O choque de salinidade causa injúrias físicas como a elevação do epitélio branquial (Mallat, 1985), morte celular e necrose nas células deste tecido como descrito por Wendelaar Bonga (1997). Em 1979, Bath & Eddy demonstraram as respostas iônicas causadas pela transferência rápida de trutas adaptadas à água doce para água marinha diluída (2/3). Quando o gradiente foi muito elevado, os peixes não sobreviveram. Mesmo com gradientes menores, os níveis de sódio e cloreto plasmáticos apresentaram imediata elevação após a transferência com estabilização após 10 a 24 horas (Figura 2).

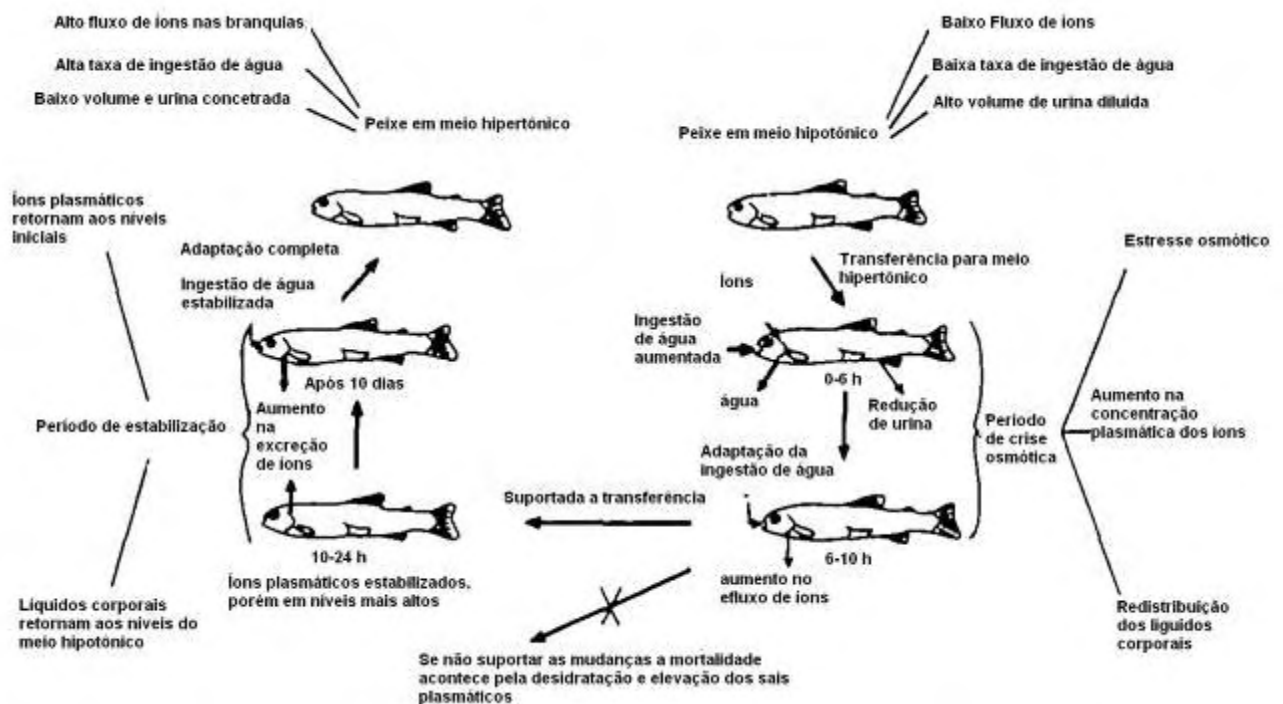


Figura 02: Principais eventos fisiológicos ocorridos quando trutas foram transferidas de água doce para água marinha diluída (2/3) (Adaptado de Bath & Eddy, 1979).

Os mecanismos de excreção de NaCl em peixes mantidos em meios hipertônicos são mais claros que os mecanismos de tomada destes íons descritos acima. O sódio plasmático entra na célula do epitélio branquial por um sistema de co-transporte e, com isso, traz o cloreto. Pelo mecanismo de uma enzima Na^+K^+ ATPase, o sódio é retirado desta célula e o cloro a sai passivamente pela membrana apical por meio do gradiente favorável. Com isso, cria-se um gradiente eletroquímico trans-epitelial que facilita a saída do sódio por uma via para-celular (Evans et al., 2005).

A amônia, outro componente importante das trocas iônicas branquiais, é o principal produto final do metabolismo do nitrogênio em peixes teleósteos. Outros produtos do metabolismo também são excretados como uréia, aminoácidos, proteínas, creatinina, creatina, ácido úrico, trimetilamina e óxido de trimetilamina, porém em quantidades menores, tendo sido pouco estudados (Kajimura et al., 2004). As proteínas fornecem aos peixes a quantidade necessária de aminoácidos. Entretanto, o excesso de nitrogênio não pode ser estocado nos tecidos por ser tóxico na forma de amônia, sendo energeticamente inviável sua conversão em formas menos tóxicas como a uréia (Evans et al., 2005).

A maior parte da produção de amônia nos peixes é realizada no fígado (50 a 70%), mas no músculo, rim e intestino também são produzidas quantidades consideráveis (Smutná et al., 2002). No fígado, a amônia é formada após a transaminação e subsequente deaminação dos aminoácidos ingeridos em excesso. Neste processo, os aminoácidos em excesso são convertidos para glutamato. O glutamato é então deaminado, resultando em alfa-cetoglutarato e amônia, a qual é liberada na circulação sanguínea (Wilkie, 1997).

A maior parte do nitrogênio metabolizado é excretado via brânquias. A amônia ocorre em duas formas nas soluções aquosas, ou como um gás NH_3 (não ionizada) ou na forma de íon amônio NH_4^+ , sendo a soma das duas formas chamada de amônia total (Tamm). A presença de uma ou outra forma está relacionada com o pH e temperatura. Wuhrmann e Woker (1949) demonstraram pela primeira vez que existe um equilíbrio dissociativo entre o íon amônio e amônia. A forma não ionizada é a mais tóxica por ser facilmente difusível pelas membranas celulares, necessitando apenas diferenças de gradientes para ser transportada (Tomasso, 1994).

Somente uma pequena parte do nitrogênio excretado pelos peixes em jejum é originária da urina ou fezes. Já em peixes recém alimentados, a quantidade de amônia excretada é maior nas fezes, causado pela não digestão de alguns ingredientes da dieta (Kajimura et al., 2004).

Além das respostas fisiológicas citadas, algumas características hematológicas podem ser utilizadas na determinação das respostas ao estresse. Mudanças nos valores da hemoglobina, no número de células vermelhas e no hematócrito, após estímulo de algum agente estressor, podem indicar hemodiluição ou hemoconcentração devido a disfunções osmorregulatórias e demanda de oxigênio (Morgan & Iwama, 1997).

Algumas medidas para amenizar os efeitos do estresse são empregadas com sucesso, entre elas a adição de sais para diminuir os gradientes interno (sangue) e externo (água) reduz as respostas de estresse, como demonstrado por Carneiro & Urbinati (2001) e Gomes et al. (2003) utilizando sal (NaCl) em concentrações próximas às plasmáticas na água de transporte de peixes tropicais. Adicionalmente, o cálcio na água reduz a permeabilidade das membranas e junções celulares,

moderando as perdas de íons nos momentos de estresse (McDonald & Robinson, 1993).

Por outro lado, a adição destes sais é realizada pelos produtores sem nenhuma adaptação dos peixes. No transporte de matrinxã, em água contendo CaSO_4 , os peixes apresentaram maiores concentrações de cortisol circulante 30 minutos após a transferência para a embalagem nos peixes transportados com adição deste sal. Na chegada este perfil se inverteu apresentando menores concentrações deste hormônio nos peixes transportados com adição de cálcio (Bendhack, 2004). A transferência rápida para diferentes salinidades provocou alterações fisiológicas em juvenis de *Stizostedion lucioperca*, espécie que vive em áreas de variação de maré (Brown et al., 2001). Weirich et al. (1992) observaram efeitos benéficos na sobrevivência de alevinos de “white bass”, um híbrido de *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, em transporte simulado com adição de CaCl_2 e NaCl , porém com adaptação gradual dos peixes às novas concentrações de sais na água.

O matrinxã, *Brycon amazonicus*, é originário da Bacia Amazônica, atualmente o seu cultivo se destaca na piscicultura nacional, dado seu rápido crescimento, aceitação pelo consumidor e esportividade na pesca. O matrinxã tem presença obrigatória nos pesqueiros, havendo portanto ligação estreita entre o mercado da piscicultura e o da pesca esportiva. O transporte de matrinxãs é um procedimento muito comum dentro da cadeia produtiva desses dois mercados, sendo muito comum a adição de sais para minimizar o estresse. Entre os mais utilizados se destacam o sal de cozinha (NaCl) e o gesso agrícola (CaSO_4) pelo seu baixo preço e facilidade de aquisição.

O objetivo deste estudo foi analisar as respostas fisiológicas, como distúrbios osmorregulatórios, hematológicos e metabólicos, do matrinxã após transferência rápida de ambientes com diferentes concentrações de cloreto de cálcio e de sódio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Reviews of Fish Disease* 1, 3-26.
- Bath, R.N., Eddy, F.B., 1979. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from fresh water to sea water. *Journal of Experimental Biologists* 83, 193-202.
- Bendhack, F. Uso de sulfato de cálcio como redutor de estresse no transporte de matrinxãs (*Brycon cephalus*) Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, 2004, 45p.
- Brown, J.A., Moore, W.M., Quabius, E.S., 2001. Physiological effects of saline waters on zander. *Journal of Fish Biology* 59, 1544-1555.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research* 32, 297-304.
- Eddy, F. B., 1981. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: *Stress and Fish*. (Ed. By A.D. Pickering), pp. 77-102. Academic Press, London.
- Evans, D.H., 2002. Osmoregulation by vertebrates in aquatic environments. In: *Encyclopedia of life sciences*. Macmillan Publishers Ltd.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogen waste. *Physiological Reviews* 85, 97-177.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transportation in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 283, 641-652.
- Fabrizi, E., Capuzzo, A., Moon, T.W., 1998. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 120, 177-192.
- Flik, G., Verbost, P.M., 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. *Journal of Experimental Biology* 184, 17-29.

- Gomes, L. C., Araújo-Lima, C. A. R. M., Roubach, R., Urbinati, E.C., 2003. Assessment on the effect of salt and density on tambaqui fish transportation. *Pesq. agropec. bras.* 38, 283-290.
- Hwang, P.-P., Lee, T.-H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 148, 479-497.
- Kajimura, M., Croke, S.J., Glover, C.N., Wood, C.M., 2004. Dogmas and controversies in the handling of nitrogenous wastes: The effect of feeding and fasting on the excretion of ammonia, urea and other nitrogenous waste products in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 207, 1993-2002.
- Mallat, J., 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 42, 630-648.
- Mazeaud, M.M., Mazeaud, F., Donaldson, E.M. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 106:201-212.
- McDonald, D.G., Robinson, J.G., 1993. Physiological responses of lake trout to stress effects of water hardness and genotype. *Transactions of American Fisheries Society* 122, 1146-1155.
- Mommsen, T.P., Vijayan, M.M., Moon, T.W., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.
- Morgan, M.J., Wilson, C.E., Crim, L.W., 1999. The effect of stress on reproduction in Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* 54, 477-488.
- Pickering, A.D. 1981. The concept of biological stress. In Pickering, A. D. (Ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press
- Reid, S.G., Bernier, N.J., Perry, S.F., 1998. The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release. *Comp. Biochem. Physiol. A* 120, 1–27.
- Robertson, L., Thomas, P., Arnold, C.R., Trant, J.M., 1987. Plasma cortisol and secondary stress responses of red drum to handling transport, rearing density, and a disease outbreak. *Progressive Fish-Culturist* 49(1), 1-12.

- Smutná, M., Vorlová, L., Svodobová, Z., 2002. Pathobiochemistry of ammonia in the internal environment of fish (review). *Acta Veterinaria Brno* 71, 169-181.
- Tomasso, J.R., 1994. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science* 2, 291-314.
- Wedemeyer, G.A., McLeay, D.J. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In Pickering, A. D. (Ed.). *Stress and Fish*. London: Academic Press, p.247-276.
- Weil, L.S., Barry, T.P., Malison, J.A., 2001. Fast growth in rainbow trout is correlated with a rapid decrease in post-stress cortisol concentrations. *Aquaculture* 193, 373-380.
- Weirich, C.R., Tomasso, J.R., Smith, T.I.J., 1992. Confinement and transport-induced stress in white bass *Morone chrysops* x striped bass *M. saxatilis* hybrids: effect of calcium and salinity. *Journal of the World Aquaculture Society* 23, 49-57.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77(3), 591-625
- Wilkie, M.P., 1997. Mechanisms of ammonia excretion across fish gills. *Comparative Biochemistry Physiology* 118A, 39-50.
- Wuhrmann, K., Woker, H., 1949. Responses of higher animals primarily fish in acute tests. In: Fourth FAO/SIDA Training Course on Aquatic Pollution, 13 – 19 Nov. 1975.

CAPÍTULO II

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO MATRINXÃ *Brycon amazonicus* APÓS MUDANÇA DE AMBIENTES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÁLCIO

RESUMO

O cálcio é um íon essencial para os processos fisiológicos dos peixes como a coagulação do sangue, formação dos ossos e escamas, contração muscular e outras reações. Em diversas situações da piscicultura as concentrações deste íon são variadas de acordo com o solo e manejo que se emprega. Este estudo avaliou respostas fisiológicas do matrinxã submetido a transferências rápidas de ambiente com diferentes concentrações de cálcio. Foram realizados dois experimentos, nos quais os peixes foram transferidos rapidamente entre diferentes ambientes. No primeiro, os peixes aclimatados em caixas (1000 L) com água sem adição de sais foram transferidos abruptamente para câmaras individuais (4 L) contendo água com diferentes concentrações de CaCl_2 (0, 150, 300 e 600 mg L^{-1}). No segundo experimento, os peixes foram aclimatados em caixas (1000 L) contendo as concentrações de CaCl_2 acima citadas e transferidos para câmaras individuais com água sem adição de sais. Os níveis iniciais de glicose plasmática encontrados foram 52 mg dL^{-1} estes valores aumentaram após as transferências, chegando a 115 mg dL^{-1} . As concentrações séricas de íons também foram alteradas pelas transferências, entretanto o cálcio demonstrou efeito protetor das membranas quando o grupo controle diminuiu a concentração de sódio e cloreto após sofrerem o estresse da transferência. A atividade da enzima Na^+K^+ ATPase e a excreção de amônia foram alteradas pela transferência, principalmente quando colocados em concentrações maiores que estavam aclimatados. Os resultados sugerem alterações fisiológicas moderadas em resposta à transferência para ambientes com concentrações de cálcio superiores. Entretanto quando transferidos para concentrações menores as respostas foram menos intensas.

ABSTRACT

Calcium is an essential ion for the physiological processes of fish such as blood coagulation, bones and scales formation, muscle contraction and other reactions. In many situations this ion concentrations were varied according to the soil and management that is employed. This study examined the physiological responses of matrixã undergone rapid transfers of environment with different concentrations of calcium. There were two experiments, in which the fish were transferred quickly between different environments. At first, the fish adapted in aquaria (1000 L) without the addition of salt were abruptly transferred to individual units (4 L) containing concentrations of CaCl_2 (0, 150, 300 and 600 mg L^{-1}). In the second experiment, the fish were adapted in aquaria (1000 L) containing the same concentration of CaCl_2 , and transferred to individual units without salts addition. The initial levels of plasma glucose were 52 mg dL^{-1} , these values increased after the transfer, reaching 115 mg dL^{-1} . Serum ions were also altered by transfers, however calcium demonstrated protective effect of the membranes when the control group decreased the concentration of sodium and chloride after stress of the transfer. The $\text{Na} + \text{K} + \text{ATPase}$ enzyme activity and ammonia excretion, have been changed by the transfer, especially when placed in higher concentrations. The results suggest moderate physiological changes in response to the transfer to higher calcium water. However when adapted to higher and transferred to lower concentrations the responses were less intense.

INTRODUÇÃO

O cálcio é um íon essencial para os processos fisiológicos dos peixes, como a coagulação do sangue, formação dos ossos e escamas, contração muscular e outras reações (Kaneko & Hirano, 1993). A presença deste íon também melhora a resistência dos peixes a substâncias tóxicas presentes na água (Perschbacher & Wurts, 1999). A permeabilidade das brânquias quanto à perda de sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-) também está relacionada a quantidade de cálcio na água (Carrier & Evans, 1976).

Ao contrário dos vertebrados terrestres que dependem exclusivamente do cálcio originário da dieta, os peixes possuem disponibilidade deste íon no ambiente aquático (Flick & Verbost, 1993). Como a concentração de cálcio na água é variável conforme o ambiente, os peixes desenvolveram um sistema de regulação de cálcio que reage rapidamente às variações do meio (Kaneko & Hirano, 1993).

Na piscicultura, a água dos viveiros possui características influenciadas pelo solo e origem da captação da água. Correções do pH e alcalinidade dos viveiros são feitas com a adição de calcário (CaCO_3), gesso agrícola (CaSO_4), cal (CaO) ou cal hidratada (Ca(OH)_2) (Queiroz & Boeira, 2006), principalmente em viveiros com alcalinidade inferior a $20 \text{ mg L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ e pH que não estejam entre 7 e 8 (Boyd, 1976). Estes produtos acabam influenciando a disponibilidade de cálcio para aos peixes.

No transporte de peixes vivos, o uso de cálcio é indicado (Kubitza, 1997). Entretanto, foi observado efeito moderado na mitigação do estresse pelo uso de CaSO_4 no transporte de matrinxã (Bendhack, 2004, Carneiro et al., 2007).

Antes e depois dos peixes serem transportados, a transferência rápida entre meios é uma prática comum, apesar de não indicada. Este procedimento pode causar estresse (Mazik et al., 1991) e distúrbios osmorregulatórios (Bath & Eddy, 1979) e prejudicar possíveis efeitos mitigadores de estresse esperados com adição de sais como NaCl, CaCl₂, CaSO₄.

Este estudo teve como objetivo avaliar a influência da aclimação do matrinxã em ambiente contendo cloreto de cálcio como redutor de estresse utilizando as respostas fisiológicas após mudanças na composição de sais do ambiente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados juvenis de matrinxã, com peso médio de $155,07 \pm 25,05$ g, provenientes de reprodução induzida. Os peixes criados em tanques de terra foram alimentados com ração comercial. Para o início do experimento os peixes foram capturados e acondicionados em caixas de 1000 L (30 peixes/caixa) com renovação contínua e alimentação a vontade durante 4 dias.

Foram realizados dois experimentos, nos quais os peixes foram transferidos rapidamente de meios. No primeiro, os peixes aclimatados em água sem adição de sais, foram transferidos abruptamente para câmaras contendo água com diferentes concentrações de cloreto de cálcio. No segundo experimento, os peixes foram acondicionados em caixas contendo concentrações diferentes de cloreto de cálcio e foram transferidos para câmaras individuais com água sem adição de sais.

Protocolo Experimental

Experimento 1

Após jejum de 48h nas caixas de aclimação, os peixes foram sedados com benzocaína (20 mg L^{-1}) e transferidos imediatamente para câmaras individuais com 4 concentrações de cloreto de cálcio (CaCl_2): 0, 150, 300 e 600 mg L^{-1} (T0, T150, T300 e T600), totalizando 20 câmaras por tratamento, com volume útil de 4 L, providas de aeração constante. As coletas de material biológico e água foram realizadas antes da transferência (nível inicial) e 1, 3, 6 e 12h após a transferência (figura 1).

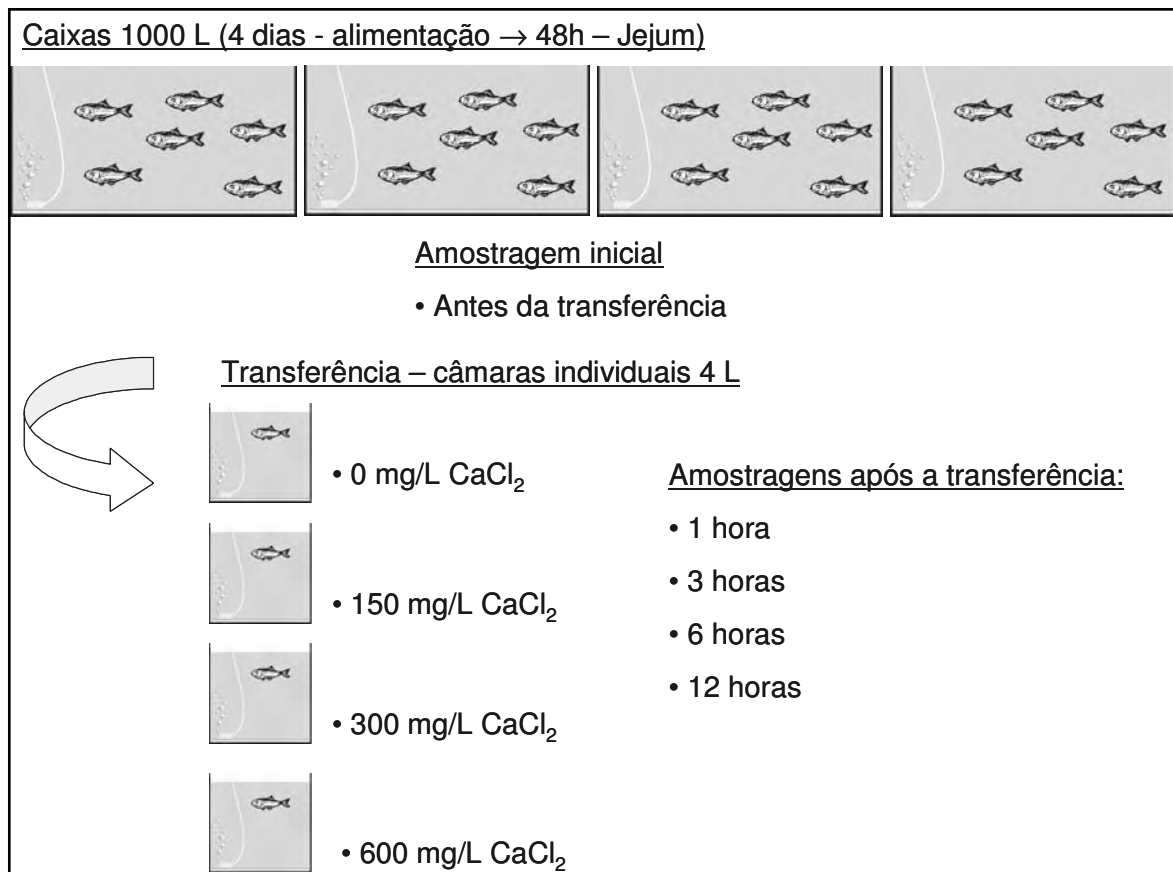


Figura 01: Esquema do desenho experimental de matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0; 150; 300 e 600 mg L^{-1} .

Experimento 2

Foram instaladas caixas de reposição sobre as caixas de aclimação. As caixas de reposição (100 L) eram abastecidas com água e cloreto de cálcio em concentrações suficientes para que depois do total esvaziamento por gotejamento (12 horas), a água das caixas de aclimação ficasse com as concentrações de 0, 150, 300 e 600 mg L^{-1} (T0, T150, T300 e T600). Após a aclimação, os peixes em jejum por 48h foram sedados com benzocaína (20 mg L^{-1}) e transferidos rapidamente para câmaras individuais abastecidas com água sem a adição de sais, totalizando 20 câmaras por tratamento, com volume útil de 4 L, providas de aeração constante. As coletas de material biológico e água foram realizadas antes da transferência (nível inicial) e 1, 3, 6 e 12h após a transferência (figura 02)

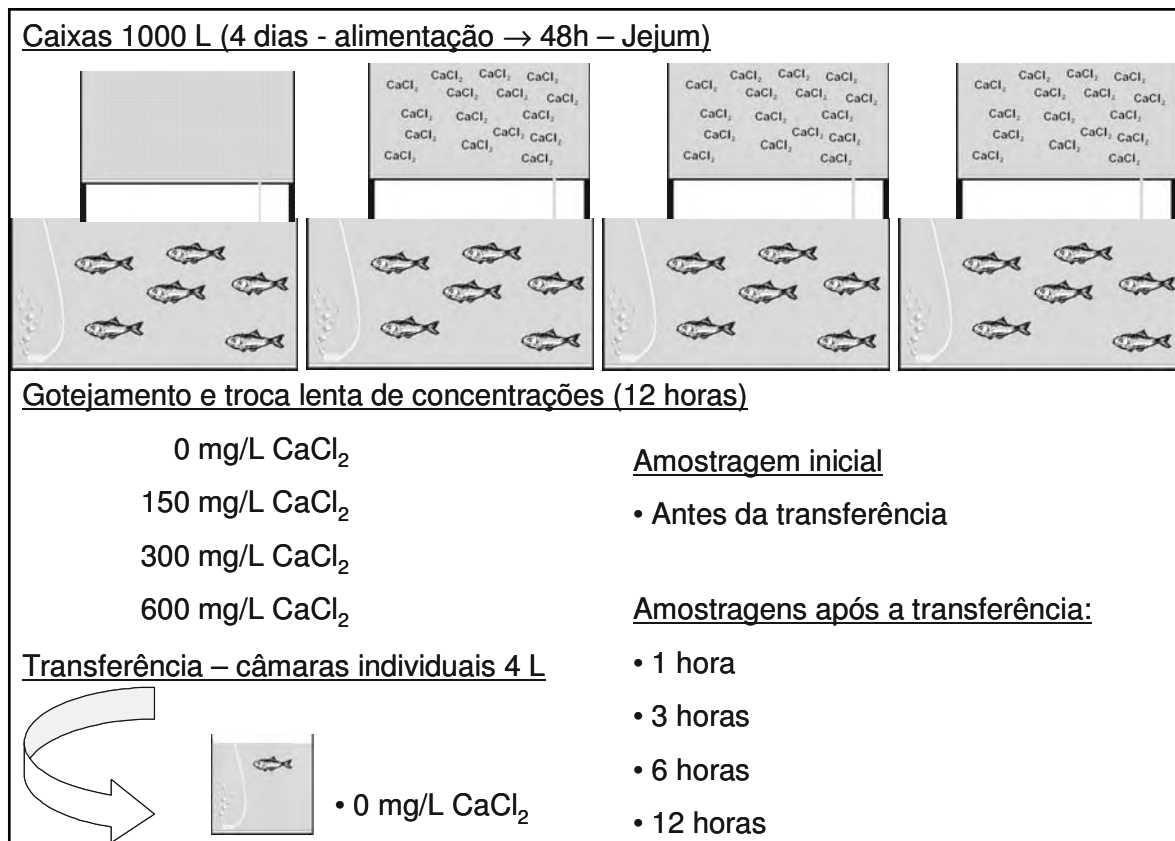


Figura 02: Esquema do desenho experimental de matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl_2 nas concentrações: 0; 150; 300 e 600 mg L^{-1} para água sem adição de sal.

Amostragens e métodos bioquímicos

Para as coletas de material biológico, os peixes foram anestesiados com benzocaína (50 mg L^{-1}) e o sangue coletado por punção caudal com seringas heparinizadas e não heparinizadas. Com o soro, foram realizadas as determinações de cloreto (Kit Labtest), sódio, potássio e cálcio (Eletrodo seletivo de íons). No sangue total, retirado com anti-coagulante, foram realizadas as determinações da concentração de glicose (King e Garner 1947), hemoglobina, contagem de eritrócitos e volume corpuscular médio dos eritrócitos (Contador de Células - CELM 550).

Após o sacrifício dos animais, as brânquias foram cuidadosamente removidas e lavadas em solução salina 0,9%. A metade das brânquias do lado direito, contendo

os quatro arcos branquiais foi utilizada na análise da atividade específica da Na⁺K⁺ ATPase, determinada em frações de homogenados pelo método descrito por Quabious et al. (1997) e adaptado para leitora de microplaca por Nolan (2000).

Os quatro arcos branquiais foram separados e divididos em dois e escolhida aleatoriamente uma das metades de cada arco para retirada dos filamentos branquiais que foram congelados em 1 mL de tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4). Depois de descongelados, os filamentos foram homogeneizados e centrifugados por 5 minutos a 10.000 RPM, 4 °C, e o sobrenadante coletado para a determinação de proteína total pelo método de Bradford (Kruger,1994) e da atividade da Na⁺K⁺ ATPase.

Nas amostras de água foram analisadas a concentração de amônia total (Golterman *et al.*, 1978) e íons de sódio e cálcio (Eletrodo seletivo de íons), e registrados o pH (medidor de pH digital), concentração de oxigênio e temperatura (medidor de oxigênio YSI-55). Com os dados de amônia na água foi calculada a taxa de excreção deste metabólito pelos peixes nos diferentes tempos e tratamentos. O cálculo da taxa de excreção ($\mu\text{g amônia total g peixe}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) foi realizado com a fórmula:

$$TE (\mu\text{g amônia total g peixe}^{-1} \text{ hora}^{-1}) = \frac{(Tam \times V.aq. \text{ inicial} - Tam \times V.aq. \text{ final}) / \text{peso do peixe (gramas)}}{\text{Intervalo entre coletas (horas)}}$$

Sendo: Tam = concentração de amônia total ($\mu\text{g/L}$), V = volume de água no aquário.

Análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5, tendo como fatores as concentrações de sal e os períodos de coleta. Foram utilizadas 5 repetições e os dados submetidos à análise de variância pelo teste F, as médias comparadas pelo teste de Tukey. Diferenças significativas foram consideradas ao nível de 5%. Os resultados apresentados como médias \pm erro padrão da média. A análise foi realizada com auxílio do SAS Software (8.0).

RESULTADOS

Experimento 1

Os valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água das caixas de aclimatação e transferência são apresentados na Tabela 1. As concentrações de cálcio dissolvido na água variaram conforme os tratamentos e apresentaram valores de $0,41 \pm 0,02$; $1,36 \pm 0,08$; $2,41 \pm 0,15$ e $4,44 \pm 0,25$ mmol L⁻¹ na adição de 0, 150, 300 e 600 mg L⁻¹, respectivamente.

Tabela 1: Valores médios \pm desvio padrão da média de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água antes (inicial) e 1, 3, 6 e 12 horas após a transferência de matrinxãs a diferentes concentrações de CaCl₂. (n=20)

	Inicial	1 hora	3 horas	6 horas	12 horas
Temperatura (°C)	23,9 \pm 0,1	22,8 \pm 0,1	23,9 \pm 0,2	24,6 \pm 0,1	23,4 \pm 0,1
Oxigênio Dissolvido (mg L⁻¹)	5,92 \pm 0,4	5,74 \pm 0,4	4,72 \pm 0,3	5,54 \pm 0,4	6,22 \pm 0,5
pH	6,89 \pm 0,1	7,94 \pm 0,1	8,18 \pm 0,1	8,25 \pm 0,1	8,16 \pm 0,1

A concentração de glicose no sangue aumentou após a transferência, em relação ao nível inicial, em peixes de todos os tratamentos, em todos os tempos de coleta (Figura 3).

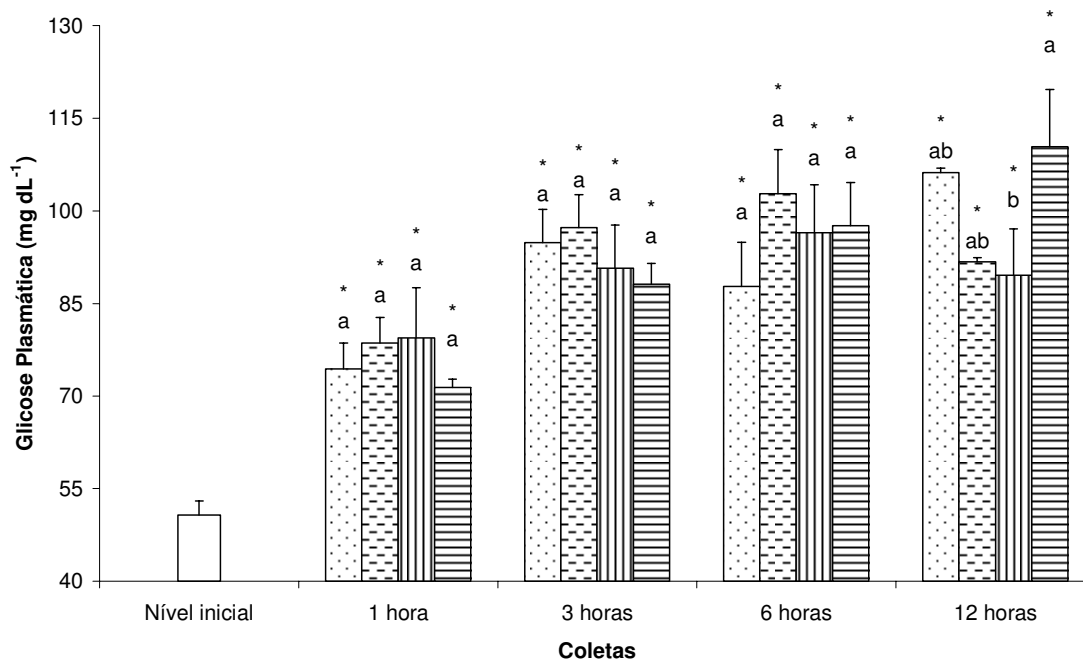


Figura 3. Valores médios de glicose plasmática em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo de coleta. Asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre cada tratamento e o nível inicial (barra aberta). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=5$).

Os peixes transferidos para as câmaras com adição de cálcio na água apresentaram alterações significativas na concentração sérica de sódio na primeira hora quando comparados com o grupo controle. Após 6 horas da transferência, os peixes do T600 não mostraram diferenças em relação aos valores iniciais deste íon, entretanto após 12 horas voltaram a apresentar diferenças (Figura 4).

O cloreto sérico elevou-se após 3 horas, nos peixes transferidos para água contendo 300 mg L^{-1} de cloreto de cálcio em comparação com os peixes dos tratamentos controle e T600, entretanto não diferiu do nível inicial. Após 12 horas, os peixes de todos os tratamentos com adição de cálcio tiveram a concentração sérica de cloreto superior à do grupo controle e à concentração inicial (Figura 5).

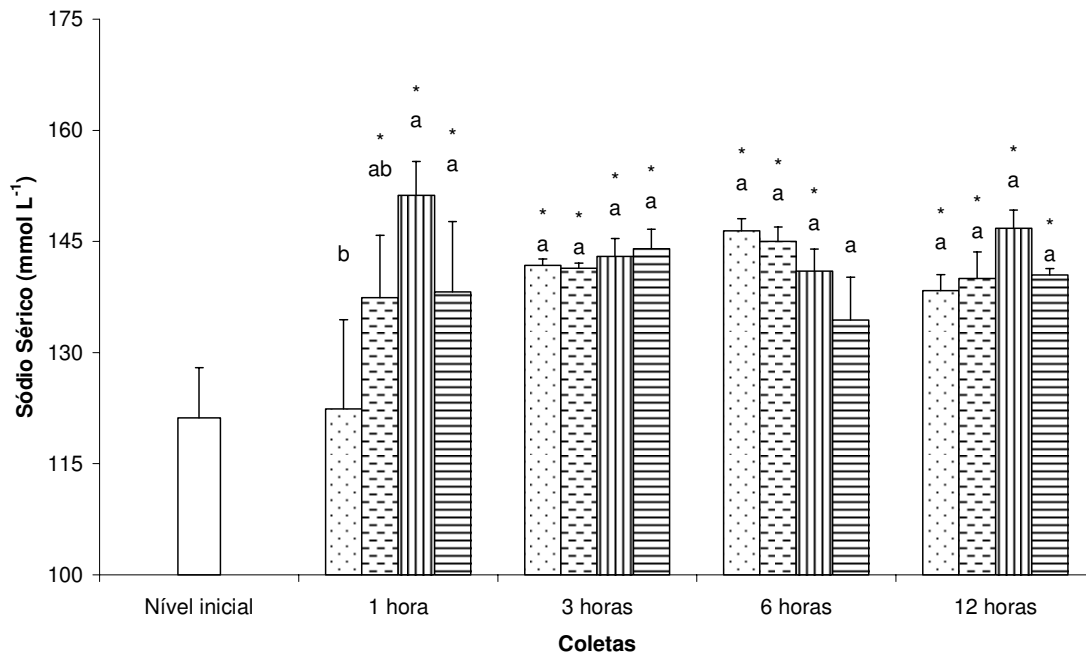


Figura 4. Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl₂ em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

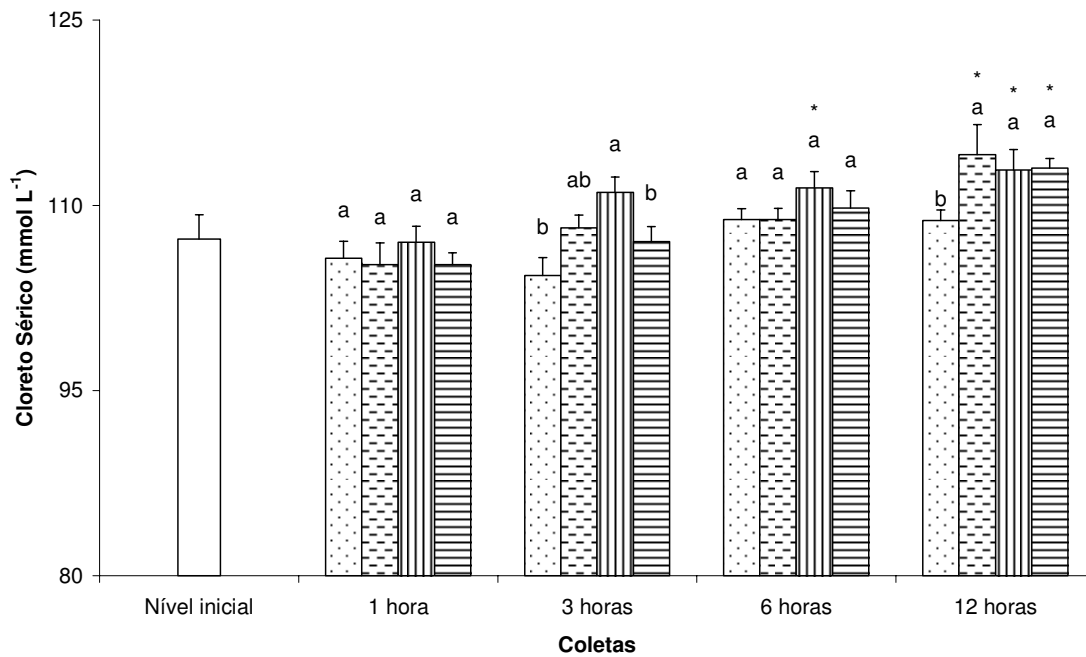


Figura 5. Valores médios de cloreto sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

A atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ nas brânquias dos peixes transferidos aumentou após 3 horas no grupo controle, 6 horas no T300 e 12 horas depois no T150 (Figura 6).

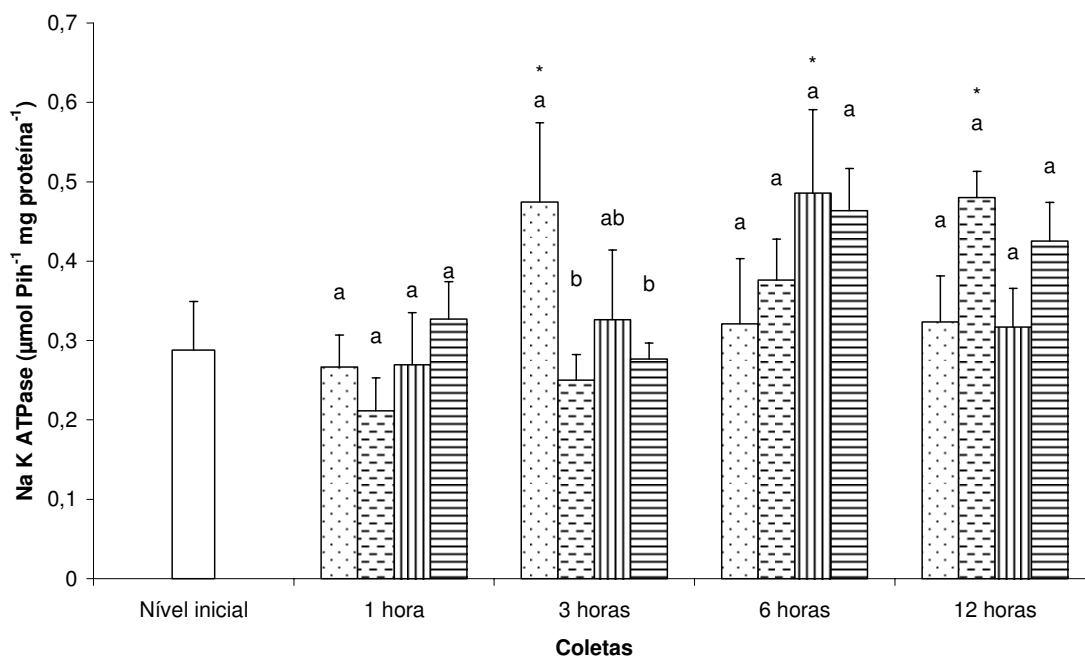


Figura 6. Valores médios da atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ nas brânquias de matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

A excreção de amônia nos peixes do grupo controle foi maior que os peixes transferidos para água com adição de 150 mg L⁻¹ entre 3 e 6 horas e em T150 e T300 entre 6 e 12 horas após o manejo (Figura 7).

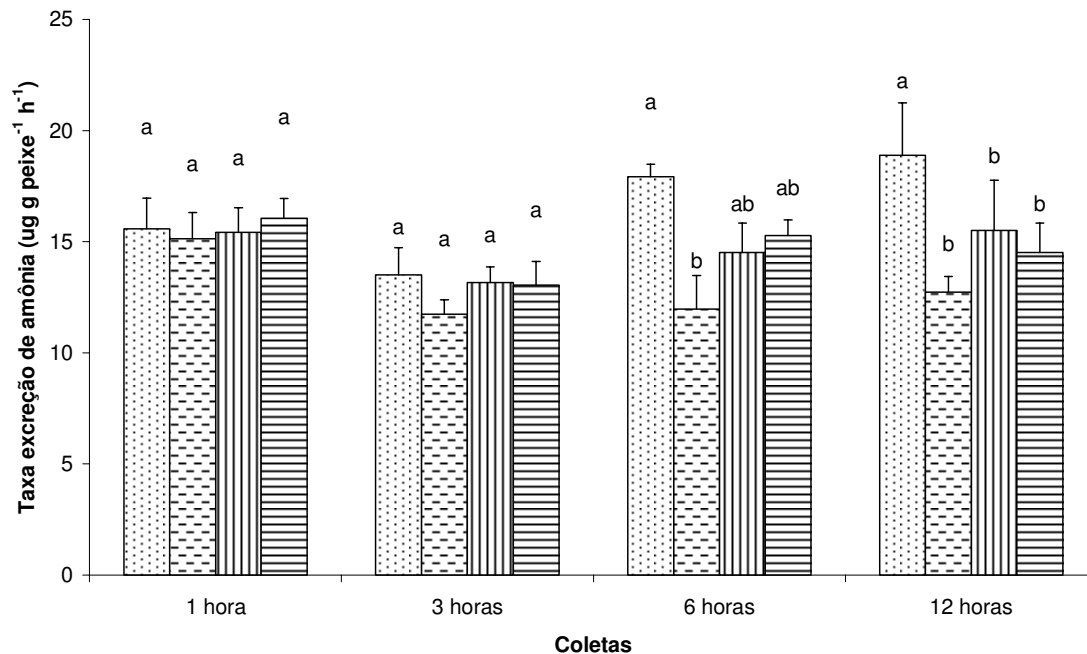


Figura 7. Valores médios da excreção de amônia por matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl₂ em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

O potássio sérico dos peixes diminuiu após 6 horas de transferência nos tratamentos T150, T300 e T600, retornando aos valores iniciais depois de 12 horas do manejo. Os peixes do grupo controle não apresentaram diferença em relação aos níveis iniciais em nenhuma amostragem (Figura 8).

Uma hora após a transferência, o cálcio sérico não se alterou em nenhum tratamento, entretanto a partir de 3 horas houve aumento gradual das concentrações

deste íon até o final da observação em todos os peixes, sendo significativo em relação aos valores iniciais nos grupos T150 e T600 em 3 horas, em T300 após 6 horas, e em peixes de todos os tratamentos após 12 horas (Figura 9).

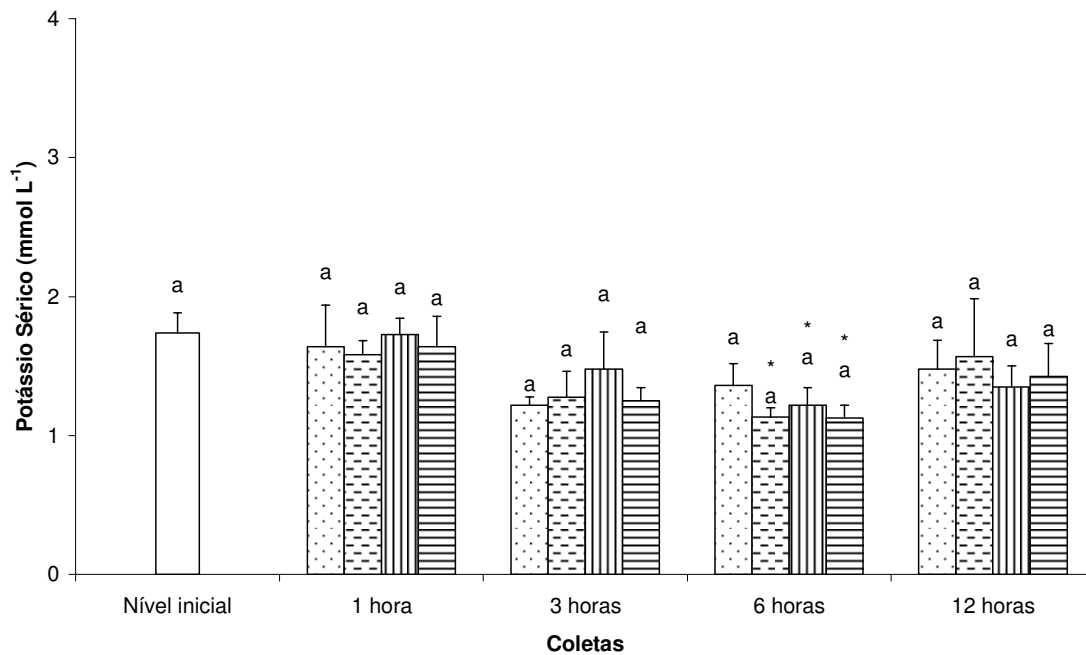


Figura 8. Valores médios de potássio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl₂ em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Fig. 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

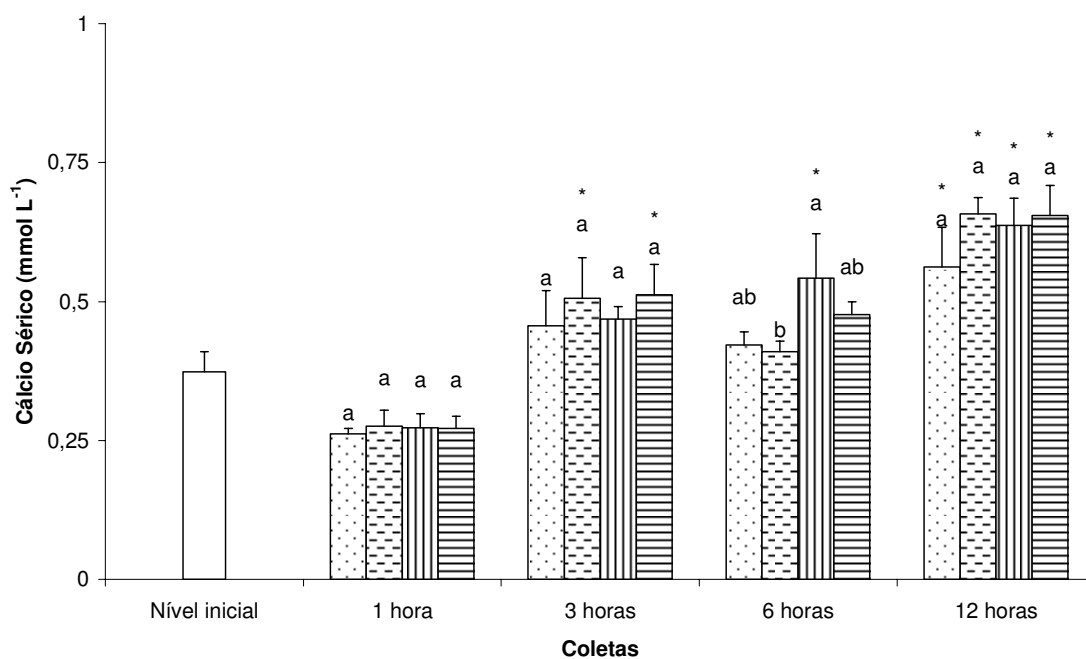


Figura 9. Valores médios de cálcio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para com água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal). Ver Fig. 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

O hematócrito dos peixes antes da transferência era 42,5% e após 12 horas do manejo os peixes T600 tiveram o menor valor para este parâmetro, ou seja 23% (Figura 10)

O número de eritrócitos nos peixes transferidos para água com adição de cloreto de cálcio diminuiu 1 hora após a transferência e após 3, 6 e 12 horas em todos os tratamentos, com maior intensidade nos peixes transferidos para água com adição de cálcio (Figura 11).

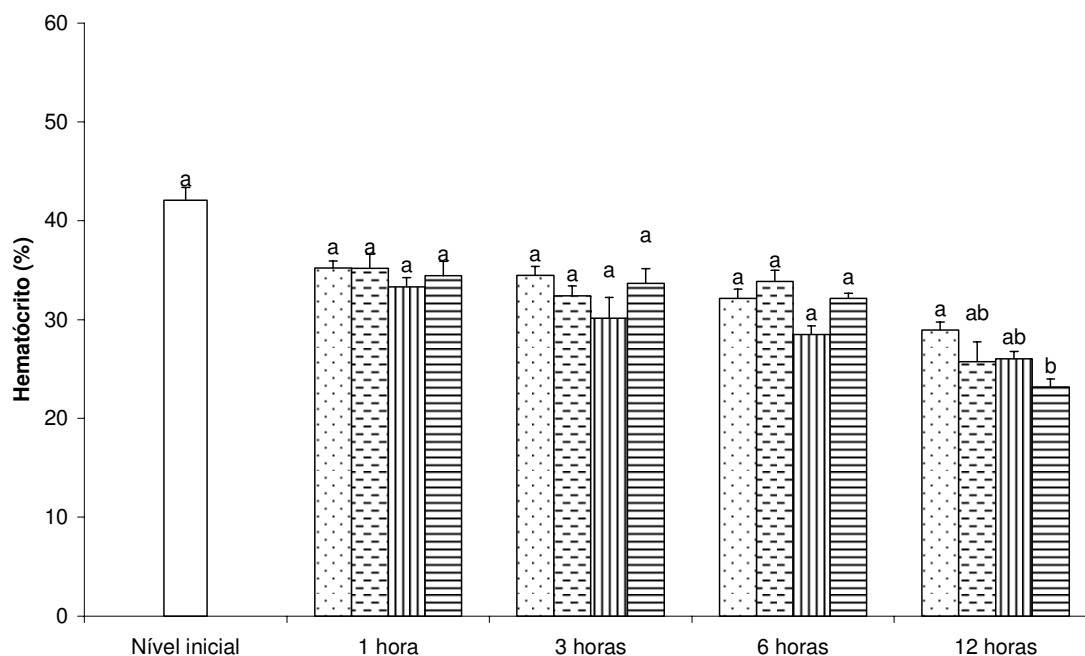


Figura 10. Valores médios do hematócrito em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

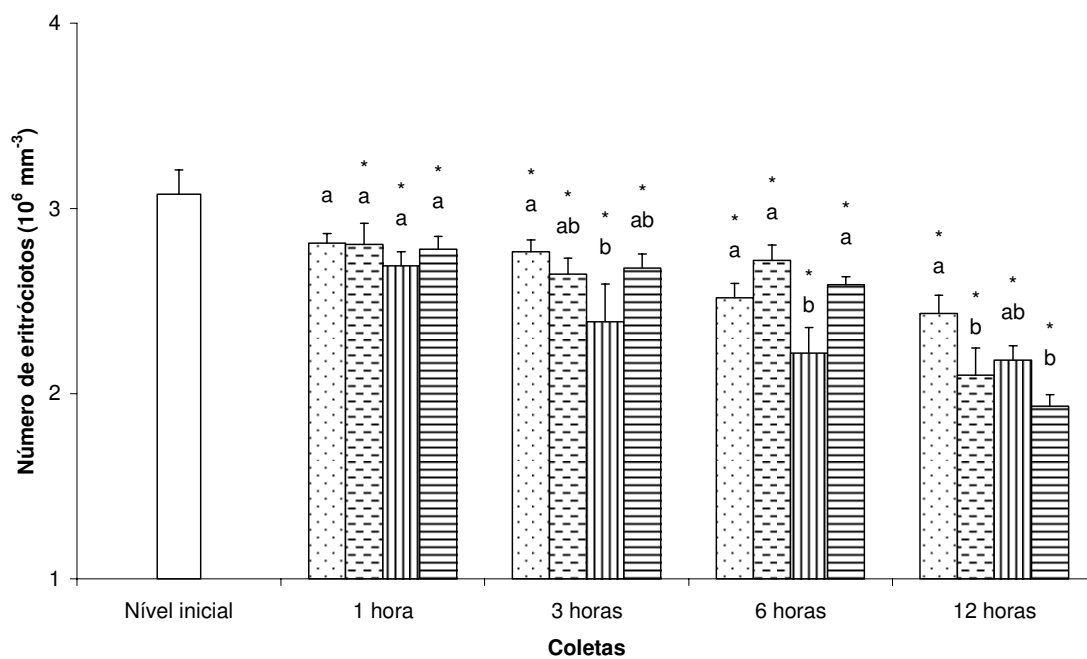


Figura 11. Valores médios da contagem de eritrócitos em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de CaCl₂ em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

Após a transferência, peixes de todos os tratamentos tiveram o volume corpuscular médio dos eritrócitos reduzidos, com valores iniciais médios de $137,0 \pm$

2,5 μm^3 e, após a transferência, valor médio de $123,5 \pm 1,2 \mu\text{m}^3$ em todos os tratamentos e tempos de amostragem (Figura 12).

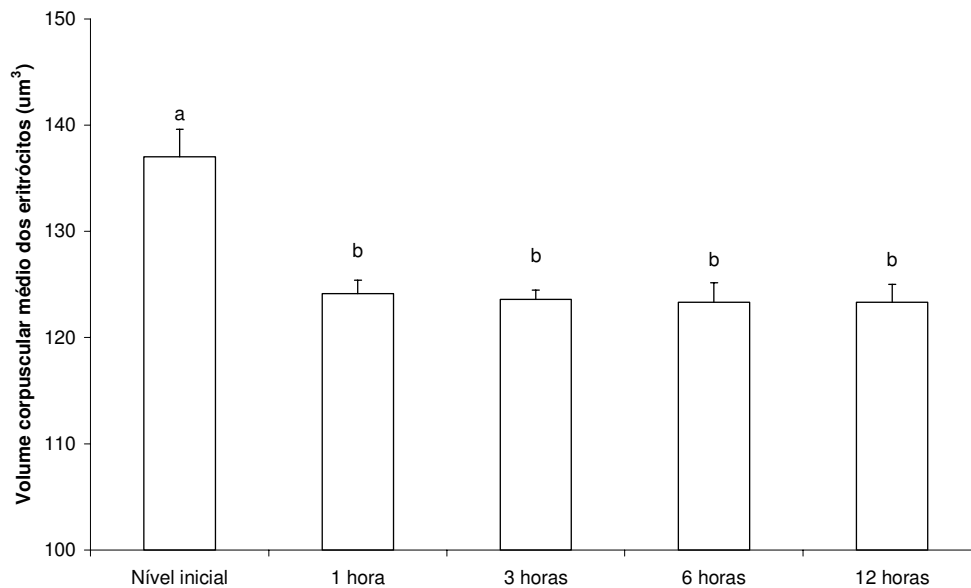


Figura 12. Valores médios do volume corpúscular dos eritrócitos, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para câmaras com água com adição de CaCl_2 . Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=20$).

A concentração sanguínea de hemoglobina diminuiu 3 horas após a transferência nos peixes dos tratamentos T150 e T300, após 6 horas em T300 e T600 e nos peixes de todos os tratamentos após 12 horas (Figura 13).

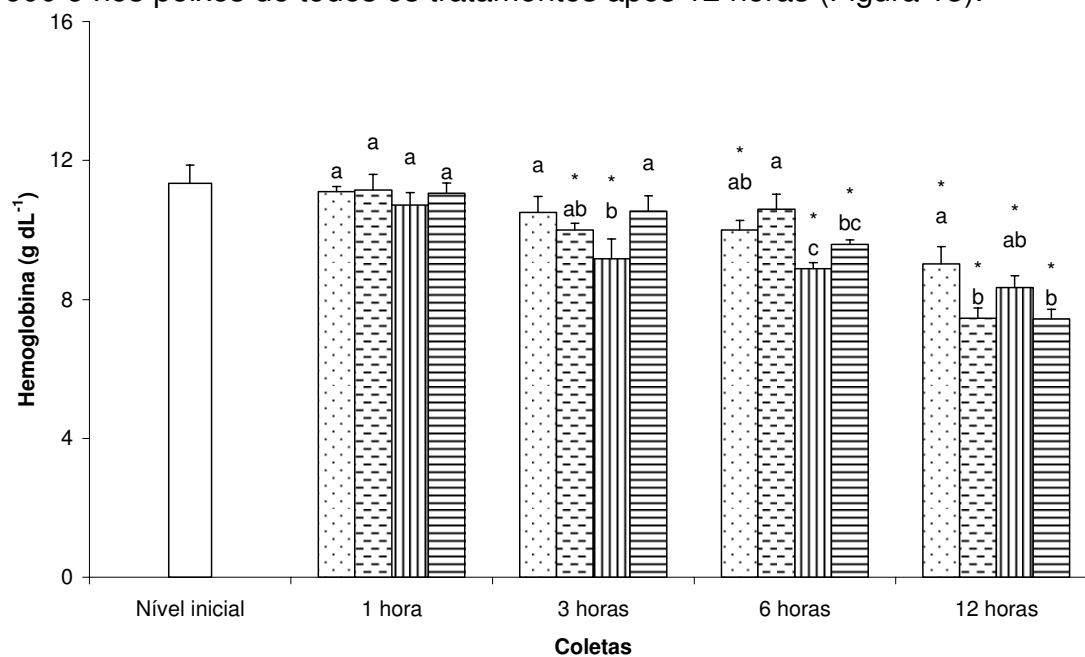


Figura 13. Valores médios da concentração de hemoglobina em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de CaCl_2 em concentrações de 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

Experimento 2

Os valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água nas caixas de aclimação e transferência são apresentados na Tabela 02. As concentrações de cálcio dissolvido na água variaram conforme os tratamentos e apresentaram valores de 0,51; 1,00; 1,77 e 3,56 mmol L^{-1} para a adição de 0, 150, 300 e 600 $\text{mg CaCl}_2 \text{ L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 02: Valores médios \pm desvio padrão da média de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água antes (inicial) e 1, 3, 6 e 12 horas após a transferência de matrinxãs aclimatados em diferentes concentrações de CaCl_2 para câmaras com água sem adição de sais (n=20).

	Inicial	1 hora	3 horas	6 horas	12 horas
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	23,7 \pm 0,1	23,6 \pm 0,1	25,4 \pm 0,3	28,2 \pm 0,2	26,6 \pm 0,1
Oxigênio Dissolvido (mg L^{-1})	5,92 \pm 0,2	6,58 \pm 0,6	6,76 \pm 0,1	4,81 \pm 0,2	5,96 \pm 0,2
pH	7,79 \pm 0,1	8,06 \pm 0,1	8,05 \pm 0,4	8,11 \pm 0,1	8,24 \pm 0,3

Após a transferência dos peixes, de modo geral, há um aumento numérico na glicemia de peixes de todos de todos os tratamentos, ocorrendo flutuações nas coletas que não seguem um padrão específico (Figura 14).

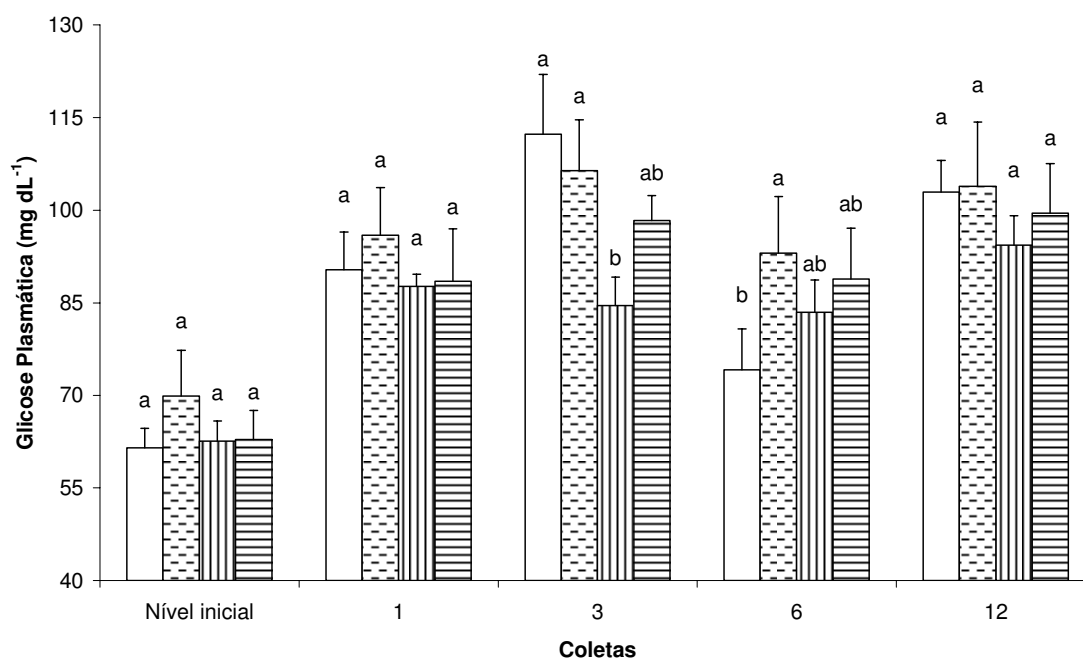


Figura 14. Valores médios de glicose plasmática em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl_2 nas concentrações: 0 (vazio); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo de coleta. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=5$).

Não houve redução na concentração de sódio que representasse algum padrão relacionado a alteração de meios. Só foi registrado um valor mais baixo na concentração de sódio 3 horas após a transferência nos peixes aclimatados sem adição de CaCl_2 em relação aos aclimatados em todas as concentrações testadas (Figura 15).

Após a aclimação a concentração sérica de cloreto nos peixes aclimatados em 300 mg L^{-1} de CaCl_2 estava significativamente mais elevada que nos peixes dos

tratamentos 0 e 150 mg L⁻¹. e numericamente em relação aos peixes aclimatados em 600 mg L⁻¹. Após 3 horas da transferência, o perfil do sódio sérico se repetiu também para o cloreto sérico (Figura 16)

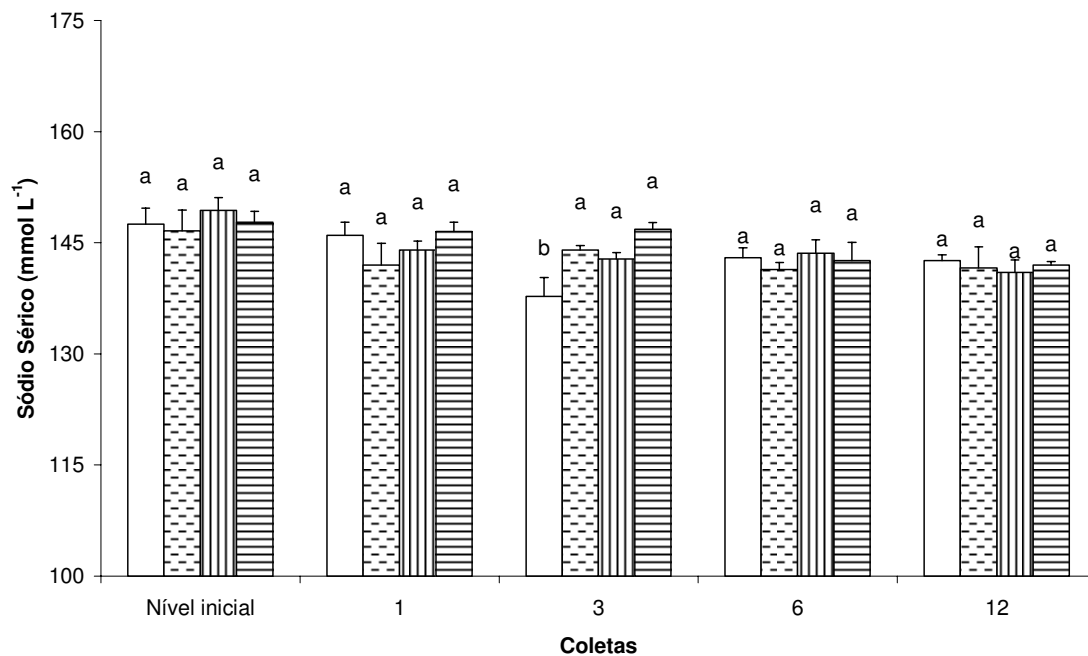


Figura 15. Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl₂ nas concentrações: 0 (vazio); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L⁻¹ (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 10 para informações sobre letras (n=5).

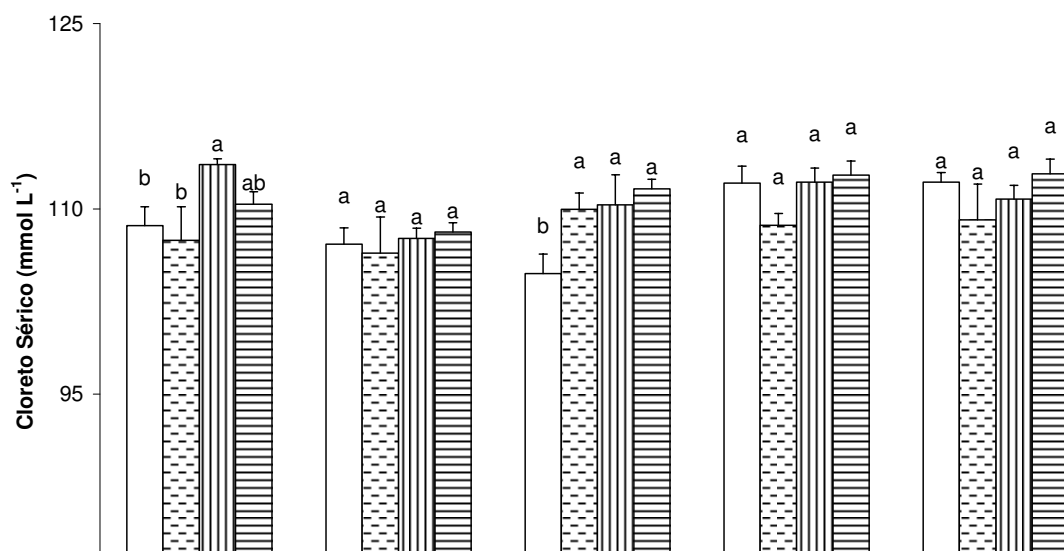


Figura 16. Valores médios de cloreto sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl_2 nas concentrações: 0 (vazio); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 10 para informações sobre letras (n=5).

Logo após a aclimação, a atividade específica da enzima Na^+K^+ ATPase das brânquias aumentou progressivamente a medida que aumentou a quantidade de cloreto de cálcio na água de aclimação. Três horas após a transferência, a atividade da enzima foi mais alta nos peixes do T150 e mais baixa nos do T300. Nos demais tempos de amostragem, não houve diferença entre tratamentos (Figura 17).

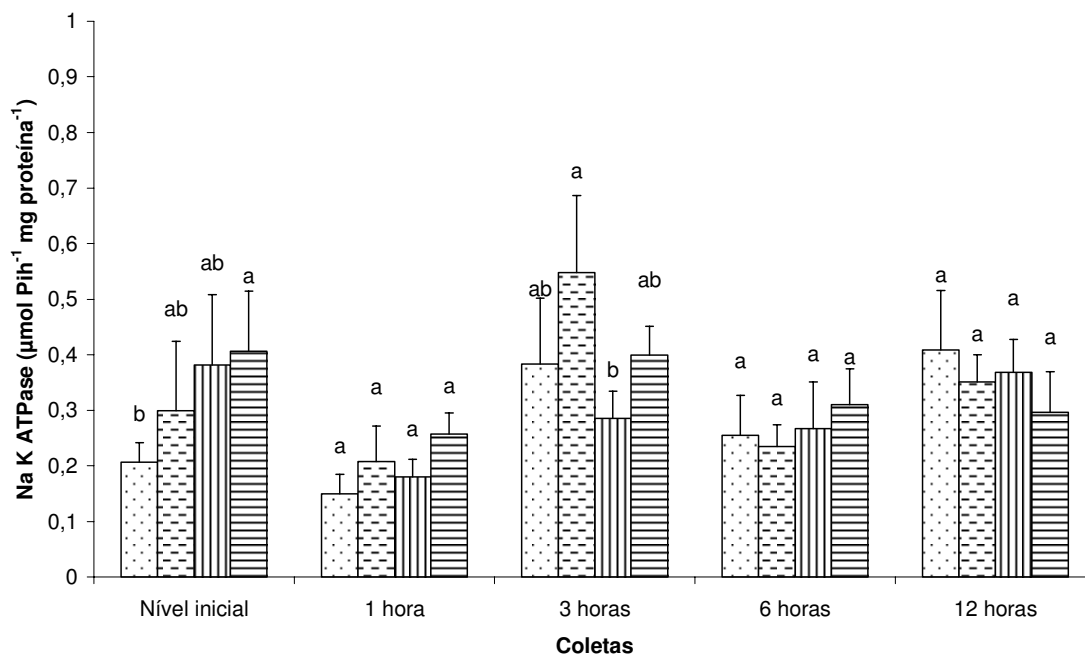


Figura 17. Valores médios da atividade específica da enzima Na^+K^+ ATPase nas brânquias de matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl_2 nas concentrações: 0 (pontilhado); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 10 para informações sobre letras (n=5).

A excreção de amônia foi igualmente mais baixa nos peixes aclimatados em todas as condições iniciais em relação à excreção registrada em todas as outras coletas. Nos peixes aclimatados em 600 mg L⁻¹ de CaCl₂ registrou-se atividade significativamente mais baixa que nos outros tratamentos 3 horas depois da transferência, menor que nos peixes do tratamento 150 mg L⁻¹ 6 horas depois. Não houve diferença significativa entre os tratamentos 12 horas após a transferência (Figura 18).

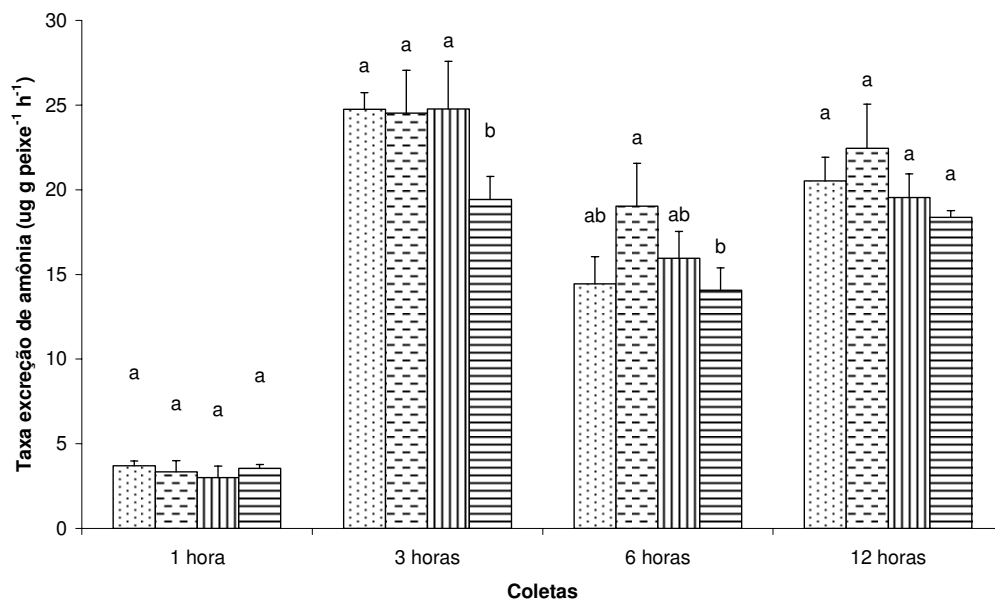


Figura 18. Valores médios da excreção de amônia por matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl₂ nas concentrações: 0 (vazio); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L⁻¹ (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 1 para informações sobre letras (n=5).

A concentração de potássio sérico não apresentou alteração ao longo do experimento, exceto por valores mais altos no grupo de peixes do tratamento sem adição de cálcio 1 hora após a transferência de meio (Figura 19).

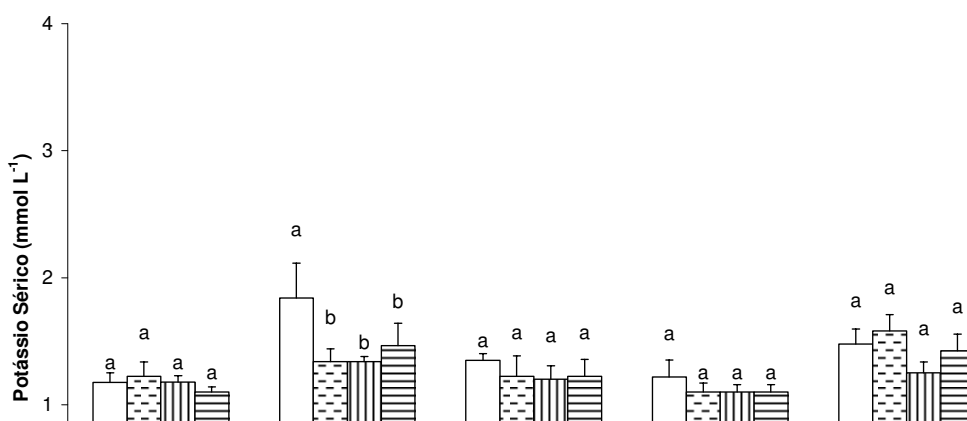


Figura 19. Valores médios de potássio sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl_2 nas concentrações: 0 (vazio); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 1 para informações sobre letras (n=5).

As concentrações de cálcio sérico nos peixes não variaram durante o experimento, apresentando valor médio de $0,45 \pm 0,03 \text{ mmol L}^{-1}$.

Nos peixes do T0 o hematócrito encontrava-se maior que os peixes do T150 antes de transferir (Figura 20). Para o número de eritrócitos circulantes no mesmo momento o tratamento sem adição de cloreto de cálcio era maior que na aclimação em 150 e 300 mg L^{-1} . Os peixes do T600 tinham a segunda maior média deste parâmetro e diferiu dos peixes de T150, que tinham a menor contagem naquele momento. Nos demais tempos de amostragem não houve diferença entre os tratamentos (Figura 21).

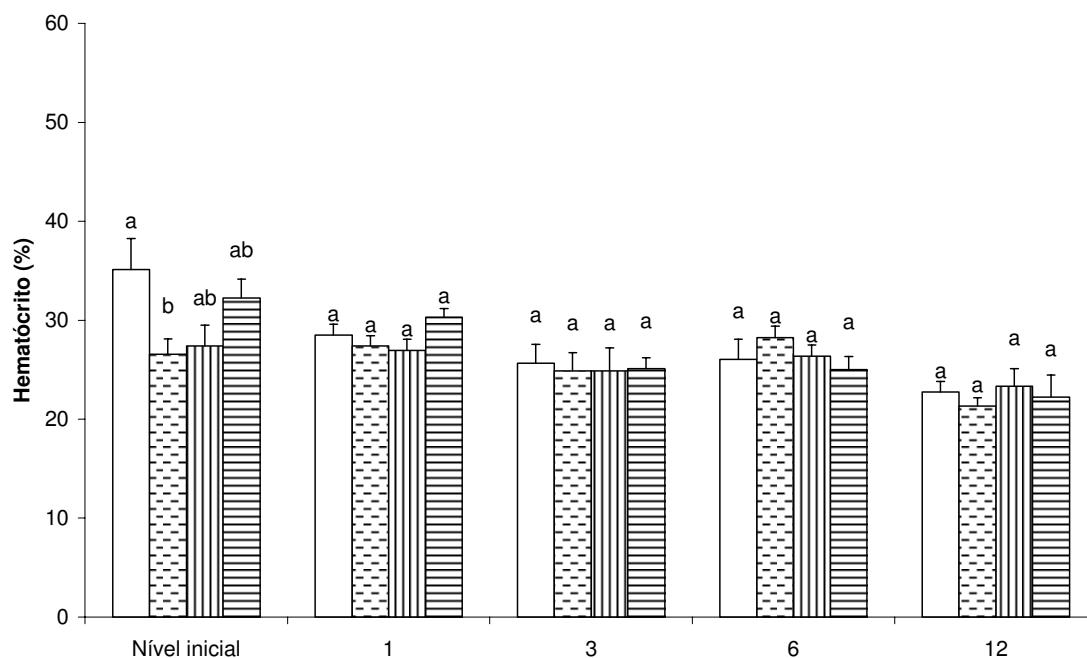


Figura 20. Valores médios de hematócrito em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl_2 nas concentrações: 0 (vazio); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 10 para informações sobre letras (n=5).

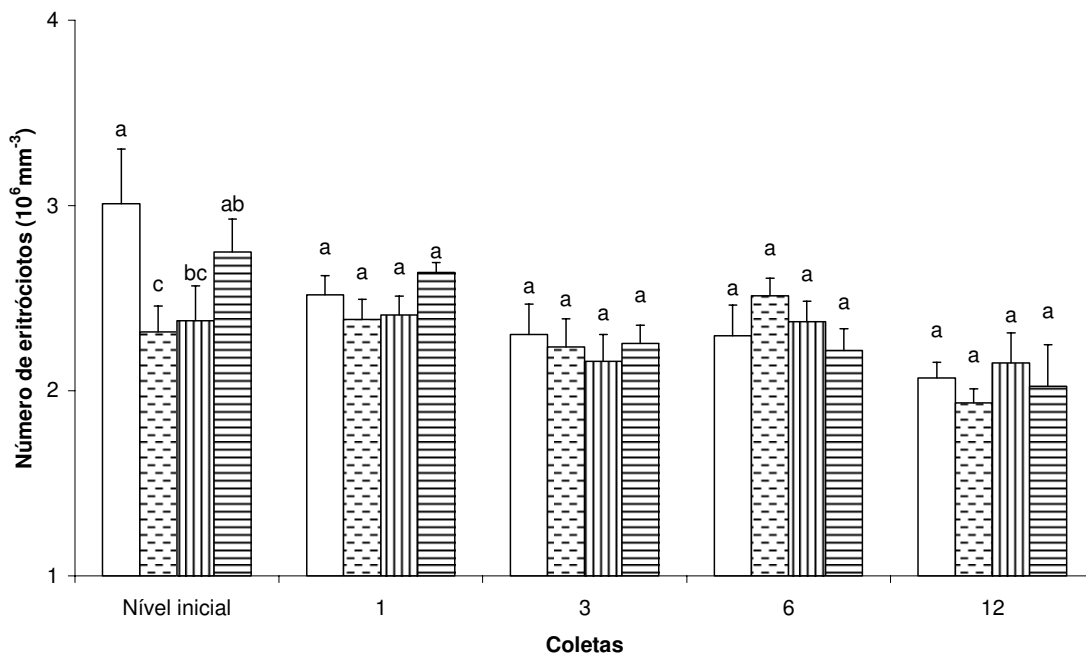


Figura 21. Valores médios da contagem de eritrócitos circulantes em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl_2 nas concentrações: 0 (vazio); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 10 para informações sobre letras (n=5).

O volume corpuscular médio dos eritrócitos não variou entre os tratamentos, mas apresentou um perfil de diminuição significativo nos tempos de amostragem

(Figura 22).

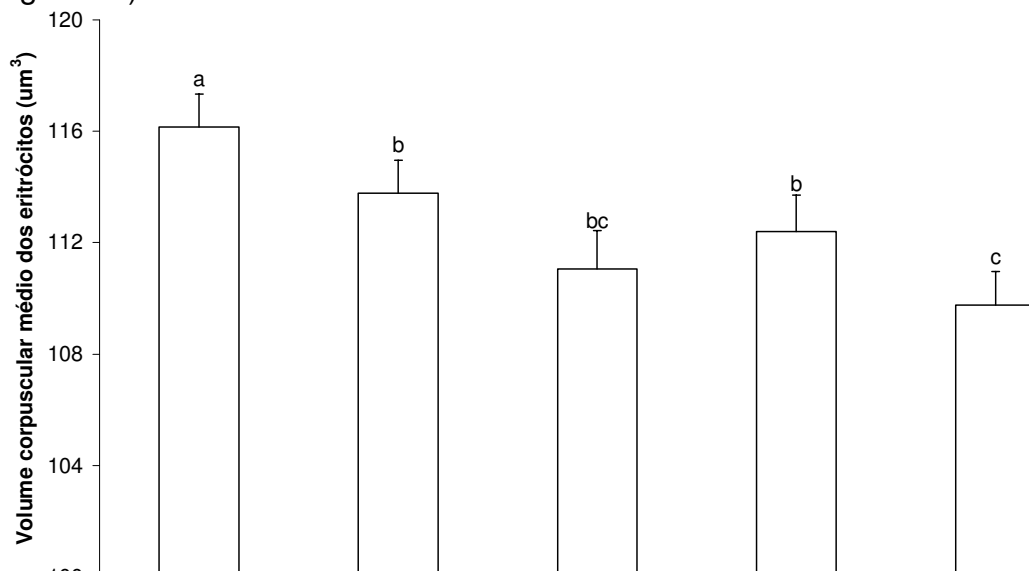


Figura 22. Valores médios do volume corpuscular dos eritrócitos, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs após transferência. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=20$).

A hemoglobina dos peixes aclimatados em água sem adição de cálcio foi maior que nos peixes do T150 e T300, antes da transferência, e semelhante nos do T600. Após a transferência de meio, os valores não diferiram entre os tratamentos (Figura 23).

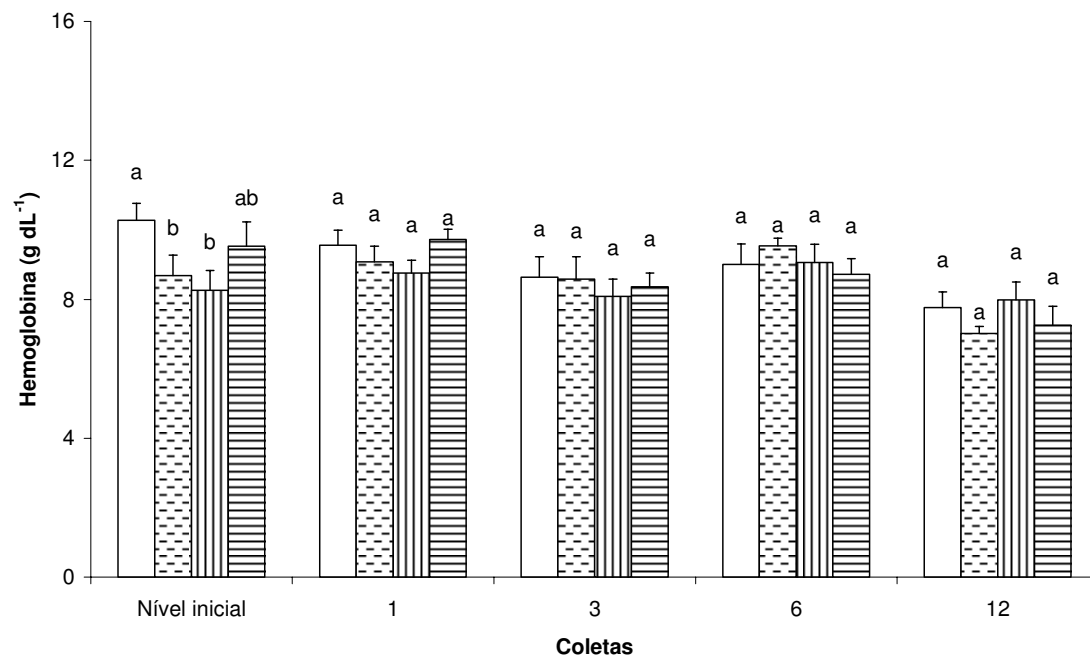


Figura 23. Valores médios de hemoglobina em matrinxãs transferidos de água com adição de CaCl₂ nas concentrações: 0 (vazio); 150 (tracejado); 300 (listrado vertical) e 600 mg L⁻¹ (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 10 para informações sobre letras ($n=5$).

DISCUSSÃO

A captura e troca de ambiente é um fator gerador de estresse para os peixes, que promove respostas compensatórias hormonais, metabólicas e iônicas. A glicose plasmática pode ser interpretada como indicador de estresse por ser fonte de energia para suportar as condições adversas, bem como as concentrações sanguíneas de sódio e cloreto e parâmetros hematológicos que refletem o equilíbrio eletrolítico e a homeostase metabólica e imunológica (Carmichael, 1983; Barton & Iwama, 1991). A alteração da homeostase iônica pode se refletir na atividade da enzima $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ presente nas brânquias (Evans et al., 1999).

Neste estudo, o aumento na concentração da glicose plasmática após a transferência sugeriu um quadro de estresse. Mesmo após 12 horas da transferência, os valores não retornaram às condições iniciais, sendo que o cálcio adicionado a água não proporcionou nenhuma ação mitigadora.

O cálcio é um importante íon no controle da permeabilidade branquial pelas junções celulares (Cuthbert & Maetz, 1972). Este íon também possui um importante papel na troca iônica $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Flick et al., 1997). Após a transferência para água com cálcio, os matrinxãs dos T300 e T600 apresentaram aumento na concentração plasmática de sódio e cloreto, provavelmente causado pela presença do cálcio. Na situação inversa, nos peixes aclimatados em cálcio, houve aumento dos níveis de cloreto. Entretanto, depois de transferidos para água sem sais não houve variações nos níveis de sódio. Já os peixes do grupo controle mostraram-se mais susceptíveis ao desequilíbrio destes íons 3 horas após a transferência, sugerindo um efeito protetor do cálcio na integridade das membranas celulares durante o estresse, como descrito por McWilliams (1982).

Na água doce, os peixes precisam captar íons para manter a homeostase. A maior parte da regulação iônica é realizada nas brânquias, principalmente nas células chamadas ionócitos. Após a entrada do sódio nos ionócitos, sua passagem para os fluídos extracelulares ocorre via $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ presente na membrana basolateral (Evans et al., 1999). A atividade branquial da $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ está relacionada com a capacidade do órgão de eliminar íons em ambientes hiperosmóticos (McCormick, 1995, 2001; Marshall, 2002) e em captar íons nos hiposmóticos (Jensen et al., 1998; Deane & Woo, 2004; Lin et al., 2004).

No Experimento 1, os matrinxãs do grupo controle transferidos tiveram aumento da atividade desta enzima após 3 horas, possivelmente na tentativa de manter os níveis de sódio após o estresse da transferência. Estas respostas são semelhantes aos resultados encontrados por Singer et al. (2003) que simularam o estresse em salmões implantando pelets de cortisol e verificaram aumento da atividade da enzima. No segundo experimento, os peixes aclimatados em diferentes concentrações de CaCl_2 apresentaram maior atividade da enzima ao final da aclimação, proporcionalmente à quantidade de cálcio adicionado na água. Esta resposta mostra o papel da troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ para manter a homeostase, como já apresentados por Flik et al. (1997).

Matrinxãs transportados em concentrações de 150 e 300 mg L^{-1} de sulfato de cálcio apresentaram maior excreção de amônia (Bendhack & Urbinati, 2006). A mesma resposta foi observada em trutas arco-íris aclimatadas em diferentes concentrações de cálcio (McDonald et al., 1983). Neste estudo, nos peixes transferidos para água com adição de cálcio houve redução da excreção de amônia entre 6 e 12 horas da transferência para água com cálcio. Esta resposta pode estar relacionada a redução do estresse causado pela transferência e permanência nas

câmaras individuais na presença de cloreto de cálcio. No caso dos peixes controle, não houve redução pela ausência do cálcio no meio. Da mesma forma, peixes induzidos ao estresse tiveram maior excreção deste metabólito (Chan & Woo, 1978). No segundo experimento, quando os matrinxãs foram aclimatados em diferentes concentrações de cálcio, a resposta da excreção de amônia ao estresse da transferência foi mais acentuada, sendo que aumentou em torno de 5 vezes depois de 3 horas, indicando um papel importante do cálcio e do estresse na excreção de amônia.

A alteração brusca de ambiente ocasiona, no peixe, respostas compensatórias para manter a homeostase hidromineral, entretanto alguns parâmetros podem ser comprometidos como foi o caso do potássio sérico nos peixes transferidos para água com cálcio adicionado. Embora o pH plasmático não tenha sido mensurado neste estudo, esta resposta pode estar associada a uma alcalose plasmática como sugerido por McDonald et al. (1980) que verificaram um aumento na excreção de íons H^+ em trutas aclimatadas em água com 10 mmol Ca^{+2} .

A concentração de cálcio no meio pode influenciar sua concentração plasmática (Flik & Verbost, 1993). Neste estudo, os peixes transferidos para água com adição de cálcio apresentaram níveis plasmáticos de cálcio aumentados a partir de 3 horas depois da transferência. Os peixes transferidos para água sem a adição do íon apresentaram alterações somente 12 horas depois da transferência que podem ter sido ocasionadas pelo estresse da permanência na unidade experimental. Estas respostas corroboram a informação de que, além da prolactina e somatolactina (Kaneko & Hirano, 1993), o cortisol também influencia a regulação da captação deste íon, promovendo ação hipercalcêmica (Flik & Verbost, 1993).

As principais respostas hematológicas verificadas no Experimento 1 ocorreram nos peixes transferidos para água com cálcio, entre elas a diminuição no número de eritrócitos circulantes e no volume dos eritrócitos após a transferência com a conseqüente diminuição na taxa de hemoglobina. Bath e Eddy (1979) observaram a diminuição no hematócrito de peixes transferidos rapidamente para água marinha e atribuíram esta resposta ao volume celular.

No Experimento 2, a aclimatação lenta dos peixes ao novo ambiente com cálcio também diminuiu o número de eritrócitos circulantes, mas após a transferência para água sem adição de sais não houve diferença. O volume das células também estava reduzido após o manejo, independente do tratamento. O hematócrito dos peixes deste estudo foi influenciado muito mais pelo número de eritrócitos que pelo volume dos mesmos, sendo que a taxa de hemoglobina acompanhou o mesmo perfil dos eritrócitos. No caso dos parâmetros hematológicos verificados, a resposta semelhante no Experimento 1 e 2, sugerem ausência de efeito do cálcio do ambiente nas alterações registradas.

Verificou-se por meio dos parâmetros testados que a transferência rápida de matrinxãs para água com concentrações mais elevadas de cálcio alterou moderadamente as respostas fisiológicas dos peixes, se comparado à transferência para água com as mesmas características. Quando aclimatados por 12 horas ao ambiente com cálcio, os peixes apresentaram respostas fisiológicas adaptativas e quando submetidos ao choque da transferência para água sem a adição de sais, as respostas foram mais homogêneas sugerindo uma facilitação na adaptação ao novo ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Reviews of Fish Disease* 1, 3-26.
- Bath, R.N., Eddy, F.B., 1979. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from fresh water to sea water. *Journal of Experimental Biologists* 83, 193-202.
- Bendhack, F., Urbinati, E.C., 2006. Ammonia excretion by matrinxã *Brycon cephalus* during transport in water containing calcium (CaSO₄) In: *Aqua 2006, Book of Abstracts*, Florença.
- Bendhack, F. Uso de sulfato de cálcio como redutor de estresse no transporte de matrinxãs (*Brycon cephalus*) Dissertação (Mestrado em Aqüicultura) – Centro de Aqüicultura da Unesp, Jaboticabal, 2004, 45p.
- Boyd, C. E., 1976. Lime requirements and application in fish ponds. In: Pillay, T. V. R., Dill, W. A. (Eds). *Advances in aquaculture*. Farham: Fishing News Books, 120-122.
- Carmichael, G.J., Wedemeyer, A., McCraren, J.P., Millard, J.L., 1983. Physiological effects of handling and hauling stress on smallmouth bass. *Progressive Fish-Culturist* 45(2), 110-113.
- Carneiro, P. C. F., Urbinati, E. C., Bendhack, F., 2007 Osmoregulation and fish transportation. In: B. Baldisserotto; J . M. Mancera; B. G. Kapoor. (Eds.). *Fish Osmoregulation*. New York: Science Publisher Inc. 527p.
- Carrier, J.C., Evans, D.H., 1976. The role of environmental calcium in freshwater survival of the marine teleost, *Lagodon rhomboides*. *Journal of Experimental Biology* 65, 539-538.
- Chan, D.K.O., Woo, N.Y.S., 1978. Effect of cortisol on the metabolism of the eel, *Anguilla japonica*. *General Comparative Endocrinology* 35, 205-215.
- Cuthbert, W., Maetz, J., 1972. The effects of calcium and magnesium on sodium fluxes through gills of *Carassius auratus*, L. *Journal of Physiology* 221, 633-643.

- Deane, E.E., Woo, N.Y.S., 2004. Differential gene expression associated with euryhalinity in sea bream (*Sparus sarba*). *American Journal of Physiology* 287, R1054-R1063.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Potts, W.T.W., 1999. Ionic transportation in the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology* 283, 641-652.
- Flik, G., Kaneko, T., Greco, A.M., Li, J., Fenwick, J.C., 1997. Sodium dependent ion transporters in trout gills. *Fish Physiology and Biochemistry* 17, 1-6
- Flik, G., Verbost, P.M., 1993. Calcium transport in fish gills and intestine. *Journal of Experimental Biology* 184, 17-29.
- Golterman, H. L.; Clymo, R. S.; Ohnstad, M. A. M., 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. Oxford: Blackwell Scientific 214 p.
- Gomes, L.C., Urbinati, E.C., 2005. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Ed. da UFSM, Santa Maria, pp 149-174.
- Jensen, M.K., Madsen, S.S., Kristiansen, K., 1998. Osmoregulation and salinity effects on the expression and activity of Na⁺,K⁺-ATPase in the gills of european sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Experimental Zoology* 282, 290-300.
- Kaneko, T., Hirano, T., 1993. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *Journal of Experimental of Biology* 184, 31-45.
- King, E. J., Garner, R.J., 1947. Colorimetric determination of glucose. *Journal of Clinical Pathology* 1, 30-33.
- Kruger, N.J. The Bradford method for protein quantification, 1994. In: *Methods in Molecular Biology*. V. 32. Basic Protein and Peptide Protocols. Humana Press, Hatfield.
- Kubitza, F., 1997. Transporte de peixes vivos. Parte 1. *Panorama da Aqüicultura* 7, 20-26.
- Lin. C.H., Tsai. R.S., Lee. T.H., 2004. Expression and distribution of Na, K-ATPase in gill and kidney of the spotted green pufferfish, *Tetraodon nigroviridis*, in response to salinity challenge. *Comparative Biochemistry Physiology* 138, 287-295.

- Marshall, W.S., 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ transport by fish gills: Retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology* 293, 264-283.
- Mazik, P.M., Simco, B.A., Parker, N. C., 1991. Influence of water hardness and salts on survival and physiological characteristics of striped bass during and after transport. *Transactions of American Fisheries Society* 120, 121-126.
- McCormick, S.D. 1995. Hormonal control of gill Na⁺,K⁺-ATPase and chloride cell function. In: *Fish Physiology, Vol. 14, Cellular and Molecular Approaches to Fish Ionic Regulation*. C.M. Wood and T.J. Shuttleworth (Eds). Academic Press, New York. pp. 285-315.
- McCormick, S.D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist* 41, 781-794.
- McDonald, D.G., Hobe, H., Wood, C.M. 1980. The influence of calcium on the physiological responses of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, to low experimental pH. *Journal of Experimental Zoology* 188, 108-131.
- McDonald, D.G., Walker, R. L. P., Wilkes R. H., 1983. The interaction of environmental calcium and low pH on the physiology of the rainbow trout, *Salmo gairdneri* II. Branchial ionoregulatory mechanisms. *Journal of Experimental Biology* 102, 141-155.
- McWilliams, P.G., 1982. The effects of calcium on sodium fluxes in the brown trout, *Salmo trutta*, in neutral and acid water. *Journal of Experimental Biology* 96, 439-442.
- Nolan, D.T. 2000. Skin response of fish to stressors Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.
- Perschbacher, P.W., Wurts, W.A., 1999. Effects of calcium and magnesium hardness on acute copper toxicity to juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Aquaculture* 172, 275-280.
- Quabius, E.S., Balm, P.H.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *General Comparative Endocrinology* 108, 472-482.
- Queiroz, J.F. Boeira, R.C., 2006. Calagem e controle da acidez dos viveiros de aqüicultura. *Circular Técnica da Embrapa*, 14, 1-8.

Singer, T.D., Finstad, B., McCormick, S.D., Wiseman, S.B., Schulte, P.M., Scott McKinley, R., 2003. Interactive effects of cortisol treatment and ambient seawater challenge on gill Na⁺K⁺-ATPase and CFTR expression in two strains of Atlantic almon smolts. *Aquaculture* 222, 15-28.

CAPÍTULO III

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DO MATRINXÃ *Brycon amazonicus* APÓS MUDANÇA DE AMBIENTES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CLORETO DE SÓDIO.

RESUMO

O manejo empregado na piscicultura muitas vezes é adverso aos animais. Esses procedimentos causam a reação de estresse. O emprego do sal comum (NaCl) em concentração isosmótica é indicado freqüentemente em situações de estresse para diminuir o gradiente entre o peixe e o meio. Entretanto a maioria dos tratamentos com cloreto de sódio aplicados na piscicultura se faz sem adaptação dos peixes ao novo meio. Este estudo avaliou respostas fisiológicas do matrinxã submetido a transferências rápidas de ambiente com diferentes concentrações de cloreto de sódio. Foram realizados dois experimentos, nos quais os peixes foram transferidos rapidamente entre diferentes ambientes. No primeiro, os peixes aclimatados em caixas (1000 L) com água sem adição de sais foram transferidos abruptamente para câmaras individuais (4 L) contendo água com diferentes concentrações de NaCl (0, 3, 6 e 9 g L⁻¹). No segundo experimento, os peixes foram aclimatados em caixas (1000 L) contendo as mesmas concentrações de NaCl, e foram transferidos para câmaras individuais com água sem adição de sais. Os peixes do tratamento 9 g L⁻¹ demonstraram menores níveis de glicose que os dos outros tratamentos. Entretanto as concentrações séricas de sódio e cloretos foram mais elevadas neste tratamento. A atividade da enzima Na⁺K⁺ ATPase, excreção de amônia e os parâmetros hematológicos analisados sugerem que a concentração, principalmente 9 g L⁻¹, e a velocidade da transferência podem causar distúrbios hidrominerais e assim comprometer o efeito benéfico do uso deste sal.

ABSTRACT

The management employed in fish farming is often adverse to the animals. These procedures may cause stress reaction. The use of common salt (NaCl) in isosmotic concentration is indicated often in situations of stress to reduce the gradient between fish and environment. However the majority of treatment with sodium chloride is applied to fish without adjusting the fish to the new environment. This study examined the physiological responses of matrinxã undergone rapid transfers of sodium chloride water concentrations. There were two experiments, in which the fish were transferred quickly between different environments. At first, the fish adapted in aquariums (1000 L) without the addition of salt were abruptly transferred to individual units (4 L) containing different concentrations of NaCl (0, 3, 6 and 9 g L⁻¹). In the second experiment, the fish were adapted in aquariums (1000 L) containing the same concentration of NaCl, and were transferred to individual chambers without salts added. The fish treatment 9 g L⁻¹ showed lower levels of glucose than that of the other treatments. Meanwhile, serum concentrations of sodium and chloride were higher in this treatment. The Na + K + ATPase enzyme activity, ammonia excretion and haematological parameters analyzed suggest that the concentration, especially 9 g L⁻¹, and the speed of the transfer can cause hydromineral disturbances and thus compromise the beneficial effect of the use of this salt.

INTRODUÇÃO

A concentração de sais no sangue de peixes adaptados à água doce é 100 vezes mais alta que a encontrada na água. A constante entrada de água e perda de íons como sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e cálcio (Ca^{++}) são compensados pela excreção de grandes volumes de urina diluída e captação dos íons perdidos por mecanismo ativo das células de cloreto (Wendelaar Bonga, 1997; Evans et al., 2005).

A manipulação dos peixes, manejo com exposição aérea, confinamento, transporte são situações comuns na aquicultura, embora sejam adversas aos animais (Donaldson, 1981). Esses procedimentos, inicialmente, causam a reação de estresse com aumento dos batimentos cardíacos e operculares, assim expondo maior volume sanguíneo à água. A disfunção osmótica é o principal distúrbio causado por esta exposição (Wendelaar Bonga, 1997). Levando as células do epitélio branquial à perda de capacidade de regular o fluxo de íons e obrigando os peixes a desviar energia para manter a homeostase (Barton & Iwama, 1991).

Algumas formas para diminuir o desequilíbrio osmótico nessas situações são utilizados com sucesso na aquicultura. O emprego do sal comum (NaCl) em concentração isosmótica é indicado freqüentemente em situações de estresse para diminuir o gradiente entre o peixe e o meio (Carneiro & Urbinati, 2001; Carneiro et al., 2002). O emprego deste sal também é comum na prevenção e tratamento de doenças (Noga, 1996). O meio iso-osmótico proporciona menor custo osmoregulatório, disponibilizando mais energia para o animal combater os agentes patogênicos, além de manter a produção de muco.

Quando os peixes são submetidos a este tratamento, ocorre uma série de mudanças para adaptação ao novo ambiente. A maioria dos tratamentos com cloreto

de sódio aplicados na piscicultura são feitos sem adaptação dos peixes ao novo meio sendo considerado um procedimento com resultado positivo quando o peixe suporta a variação de salinidade sem que o custo metabólico prejudique ainda mais o indivíduo no momento em que ele precisa mitigar os efeitos do estressor principal.

A capacidade de suportar a variação de salinidade depende da espécie e sua adaptação ao ambiente que habita (Evans, 1984). Quando a transferência é para meio iso-osmótico a necessidade de captar sais se torna mínima (Febry & Lutz, 1987). Entretanto, se a salinidade do novo meio for maior que a dos fluídos corporais, inicia-se o processo de eliminação dos sais excedentes (Bath & Eddy, 1979). No sentido inverso, após os peixes serem aclimatados, a transferência para meio hipo-osmótico causa a necessidade de captar íons para manter a homeostase.

O matrinxã é um peixe que suporta variações de salinidade dentro das necessidades de manejo citadas. E apresenta melhores respostas fisiológicas ao estresse do transporte (Carneiro & Urbinati, 2001) e doenças (Carneiro et al., 2002) na presença de NaCl em quantidades próximas às plasmáticas.

O objetivo deste trabalho foi investigar as respostas fisiológicas logo após transferências da água doce para ambientes com diferentes concentrações de cloreto de sódio e o procedimento inverso.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados juvenis de matrinxã, com peso médio de $117,6 \pm 20,3$ g provenientes de reprodução induzida. Os peixes foram mantidos em tanques de terra e alimentados com ração comercial antes do período experimental. Para o início do experimento, os peixes foram acondicionados em caixas de 1000 L (30 peixes/caixa), com renovação contínua de água, aeração permanente e alimentação *ad libitum* durante 4 dias, para padronização das condições pré-experimentais.

Este estudo foi dividido em dois experimentos, nos quais os peixes foram transferidos de meios com salinidades diferentes. No primeiro, os peixes aclimatados em água sem adição de sal foram transferidos abruptamente para água contendo diferentes concentrações de cloreto de sódio. No segundo experimento, os peixes aclimatados em diferentes concentrações de cloreto de sódio foram transferidos para câmaras individuais com água sem a adição de sal.

Protocolo Experimental

Experimento 1

Após jejum de 48h nas caixas de aclimação, os peixes foram sedados com benzocaína (20 mg L^{-1}) e transferidos para aquários individuais contendo 4 concentrações de cloreto de sódio (NaCl): 0, 3, 6 e 9 g L^{-1} (T0, T3, T6 e T9), totalizando 20 câmaras por tratamento, com volume útil de 4 L, providas de aeração constante. As amostragens de material biológico e água foram realizadas antes da transferência (nível inicial) e 1, 3, 6 e 12h após a transferência de meio.

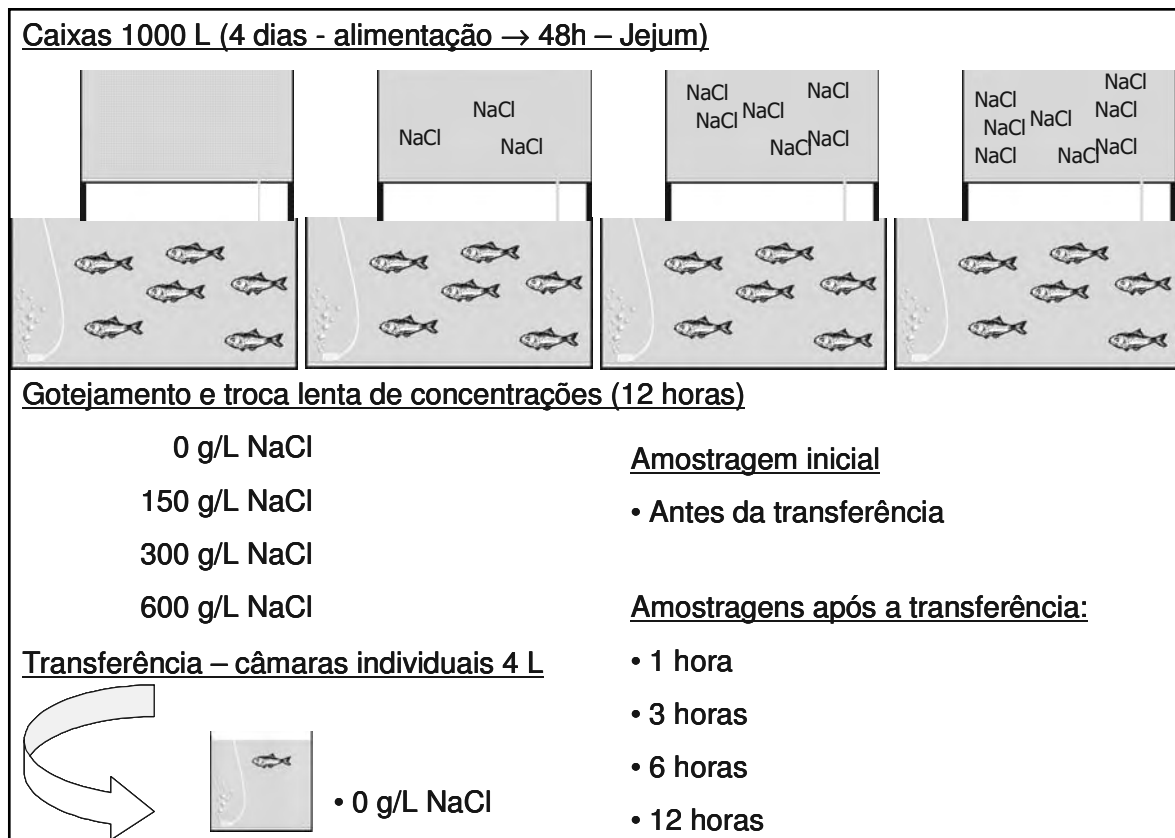


Figura 01: Esquema do desenho experimental de matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl em concentrações de 0; 3; 6 e 9 g L⁻¹.

Experimento 2

Foram instaladas caixas de reposição sobre as caixas de aclimação. As caixas de reposição (100 L) eram abastecidas com água contendo cloreto de sódio em concentração suficiente para que, após esvaziamento por gotejamento (12 horas), a água das caixas de aclimação ficassem com concentrações de 0, 3, 6 e 9 g L⁻¹ (T0, T3, T6 e T9). Após a aclimação, os peixes foram sedados com benzocaína (20 mg L⁻¹) e transferidos rapidamente para câmaras individuais abastecidas com água sem adição de sal, num total de 20 câmaras por tratamento, com volume útil de 4 L e aeração constante. As amostragens de material biológico e água aconteceram antes da transferência (nível inicial) e 1, 3, 6 e 12h após a transferência de meio e mudança de salinidade.

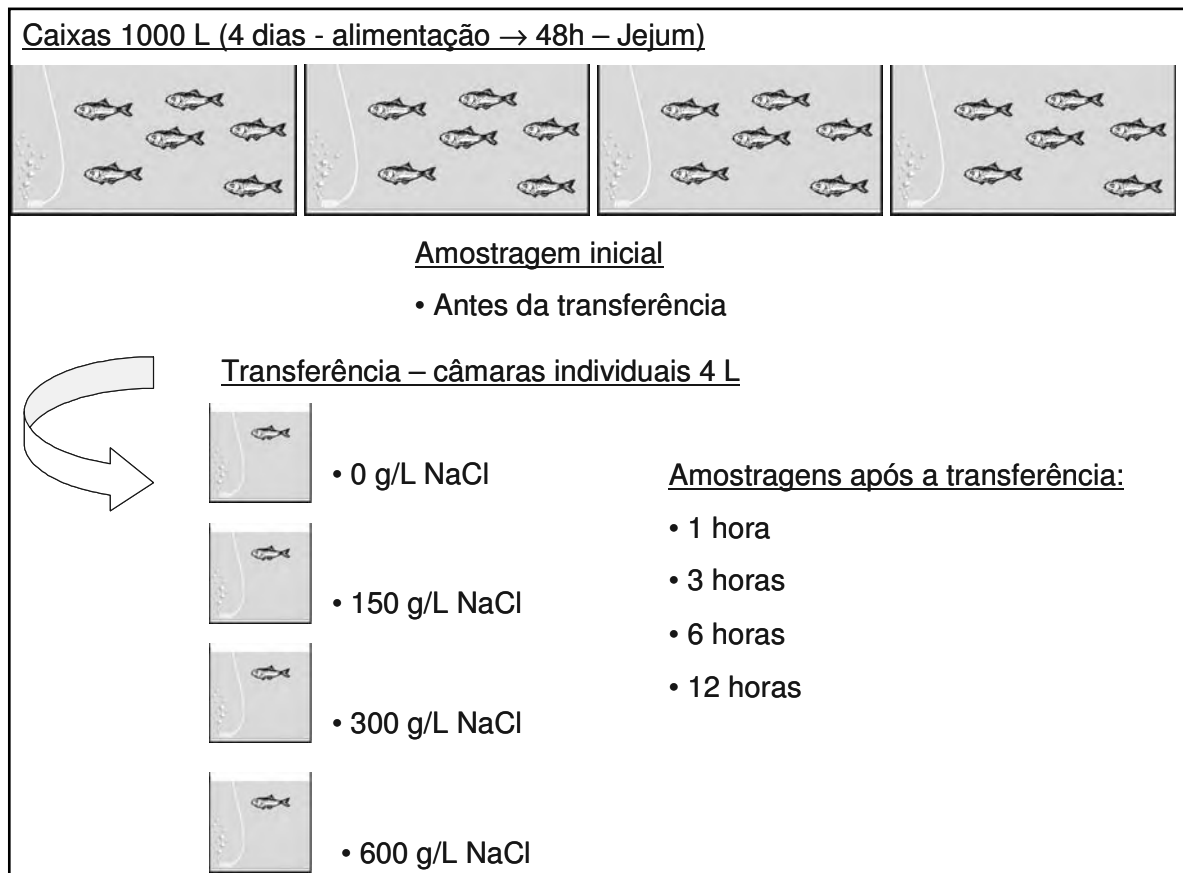


Figura 02: Esquema do desenho experimental de matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl nas concentrações: 0; 3; 6 e 9 g L⁻¹ para água sem adição de sal.

Amostragens e métodos bioquímicos

Para a coleta de material biológico, os peixes foram anestesiados (benzocaína, 50 mg L⁻¹) e o sangue retirado por punção caudal com seringas heparinizadas e não heparinizadas. No soro determinou-se cloreto (Kit Labtest), sódio, potássio e cálcio (Eletrodo seletivo de íons) e no sangue total retirado com anti-coagulante foram determinados a concentração de glicose (King e Garner 1947), hemoglobina, contagem de eritrócitos e volume corpuscular médio dos eritrócitos (Contador de Células - CELM 550).

Após sacrifício dos peixes, as brânquias removidas foram lavadas em solução salina 0,9%. A metade das brânquias do lado direito contendo os 4 arcos branquiais,

foi utilizada na análise da atividade específica da Na⁺ K⁺ ATPase, determinada em frações de homogenado pelo método de Quabious et al. (1997), modificado por Nolan (2000).

Os arcos branquiais foram separados, divididos em dois e uma das metades de cada arco escolhida ao acaso para retirada dos filamentos branquiais que foram congelados em 1 mL de tampão SEI (Sacarose-EDTA-Imidazol, pH 7,4). Depois de descongelados, os filamentos foram homogeneizados e centrifugados a 10.000 RPM, por 5 minutos, 4 °C, e o sobrenadante utilizado para a determinação da atividade da Na⁺ K⁺ ATPase e da proteína total (método de Bradford, Kruger, 1994).

Coletas de água foram realizadas nas mesmas amostragens de material biológico, sendo determinadas as concentrações de amônia total (Golterman *et al.*, 1978) e íons sódio e cálcio (Eletrodo seletivo de íons), e registrados o pH (medidor de pH digital), concentração de oxigênio e temperatura (medidor de oxigênio YSI-55). Com os dados de amônia total foi calculada a taxa de excreção deste metabólito nos diferentes tempos e tratamentos. O cálculo da taxa de excreção (μg amônia total g peixe⁻¹ hora⁻¹) foi realizado com a fórmula:

$$TE (\mu\text{g amônia total g peixe}^{-1} \text{ hora}^{-1}) = \frac{(Tam \times V.aq. \text{ inicial} - Tam \times V.aq. \text{ final}) / \text{peso do peixe (gramas)}}{\text{Intervalo entre coletas (horas)}}$$

Sendo: Tam = concentração de amônia total ($\mu\text{g/L}$), V = volume de água no aquário.

Análise estatística

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 5, tendo como fatores as concentrações de sais e os períodos de coleta. Foram

utilizadas 5 repetições e os dados submetidos à análise de variância pelo teste F, as médias comparadas pelo teste de Tukey. Diferenças significativas foram consideradas ao nível de 5%. Os resultados apresentados como médias \pm erro padrão da média. A análise foi realizada com auxílio do SAS Software (8.0).

RESULTADOS

Experimento 1

Os valores de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água nas caixas de aclimatação são apresentados na Tabela 1. As concentrações de sódio dissolvido na água variaram com os tratamentos, apresentando valores de $50,9 \pm 8,6$; $84,2 \pm 16,8$ e $114,1 \pm 25,8$ na adição de 3, 6 e 9 g L⁻¹ de NaCl respectivamente. No tratamento sem adição de sal os níveis deste íon não foram detectáveis pelo método utilizado.

Tabela 1: Valores médios \pm desvio padrão da média de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água antes (inicial) e 1, 3, 6 e 12 horas após a transferência de matrinxãs para diferentes salinidades (NaCl) (n=20).

	Inicial	1 hora	3 horas	6 horas	12 horas
Temperatura (°C)	24,40 \pm 0,1	22,95 \pm 0,1	23,09 \pm 0,2	24,95 \pm 0,1	24,62 \pm 0,1
Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹)	5,65 \pm 0,4	7,17 \pm 0,7	6,56 \pm 0,7	5,30 \pm 0,4	6,84 \pm 0,4
pH	7,12 \pm 0,1	7,57 \pm 0,1	7,48 \pm 0,1	7,55 \pm 0,1	7,48 \pm 0,1

As concentrações de glicose no sangue dos peixes do tratamento sem adição de cloreto de sódio apresentaram alterações significativas 1 hora após a mudança de salinidade em relação ao nível inicial. Nos outros tempos de coleta, todos os tratamentos diferiram do nível inicial, com exceção dos peixes transferidos para água contendo 9 g L⁻¹ (3, 6 e 12 horas) e 3 g L⁻¹ de NaCl (12 horas) (Figura 3).

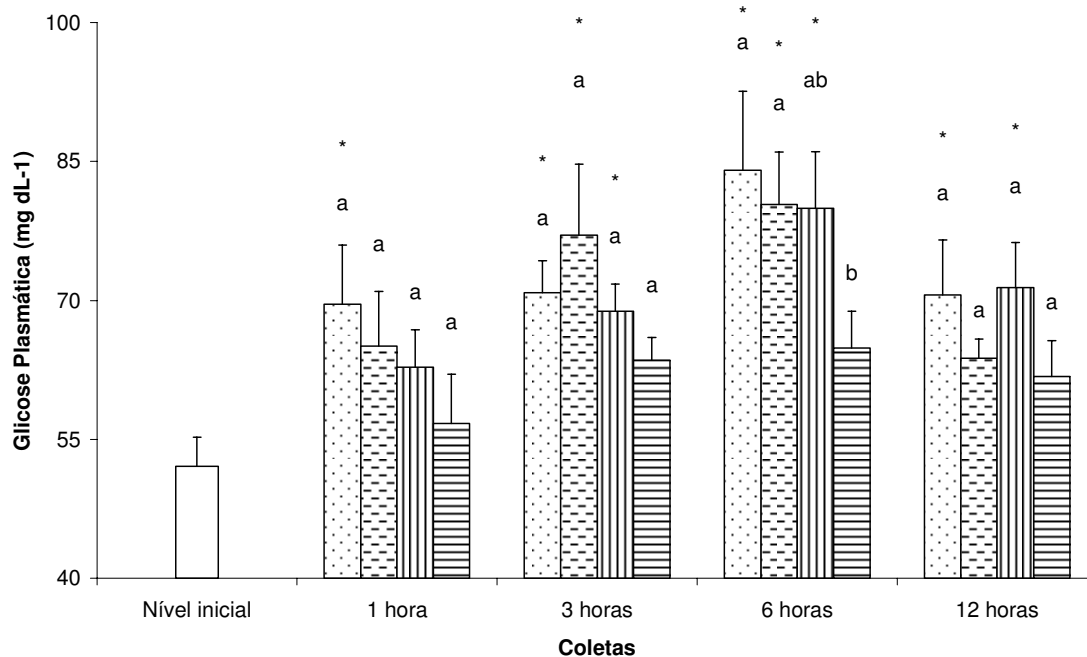


Figura 3. Valores médios de glicose plasmática em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9 g L⁻¹ (listrado horizontal). Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo de coleta. Asteriscos indicam diferenças ($p < 0,05$) entre cada tratamento e o nível inicial (barra aberta). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=5$).

Os peixes transferidos para a concentração mais alta de cloreto de sódio (9 g L⁻¹) apresentaram níveis de sódio sérico mais elevados que os níveis iniciais às 3, 6 e 12 horas após a mudança de salinidade, valores que foram mais altos também em relação aos dos outros tratamentos, os quais não diferiram entre si, nem em relação ao nível inicial em qualquer amostragem (Figura 4).

A concentração sérica de cloreto diferiu em relação aos níveis iniciais apenas nos peixes transferidos para meio contendo 9 g L⁻¹ 12 horas após a transferência, período em que se observou aumento gradual da concentração de cloreto a medida que aumentava a salinidade do meio (Figura 5).

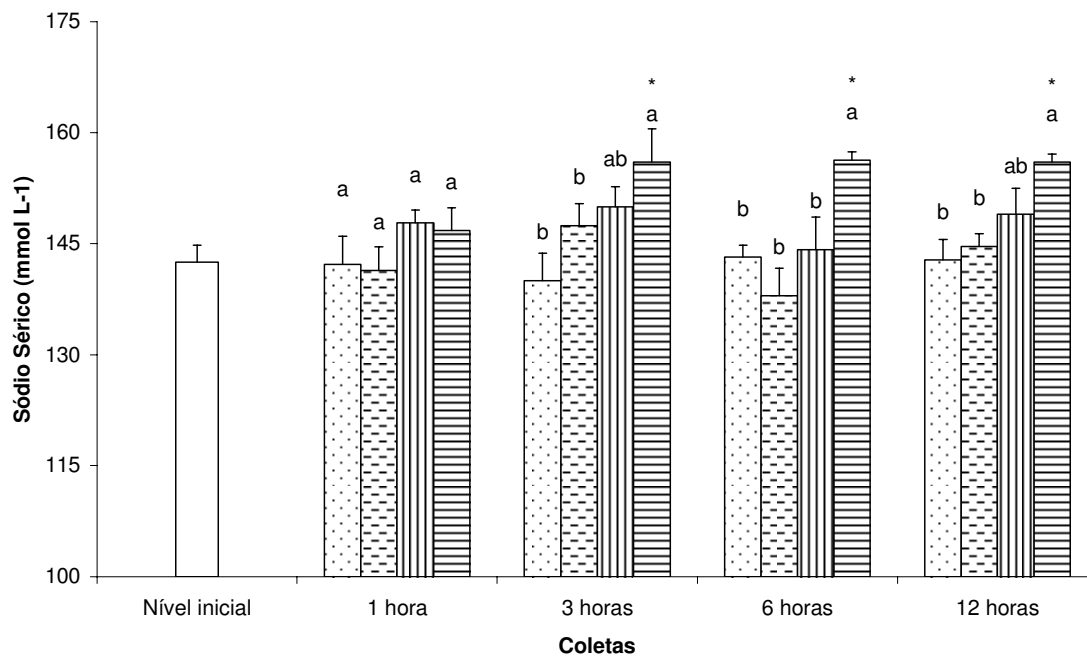


Figura 4. Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

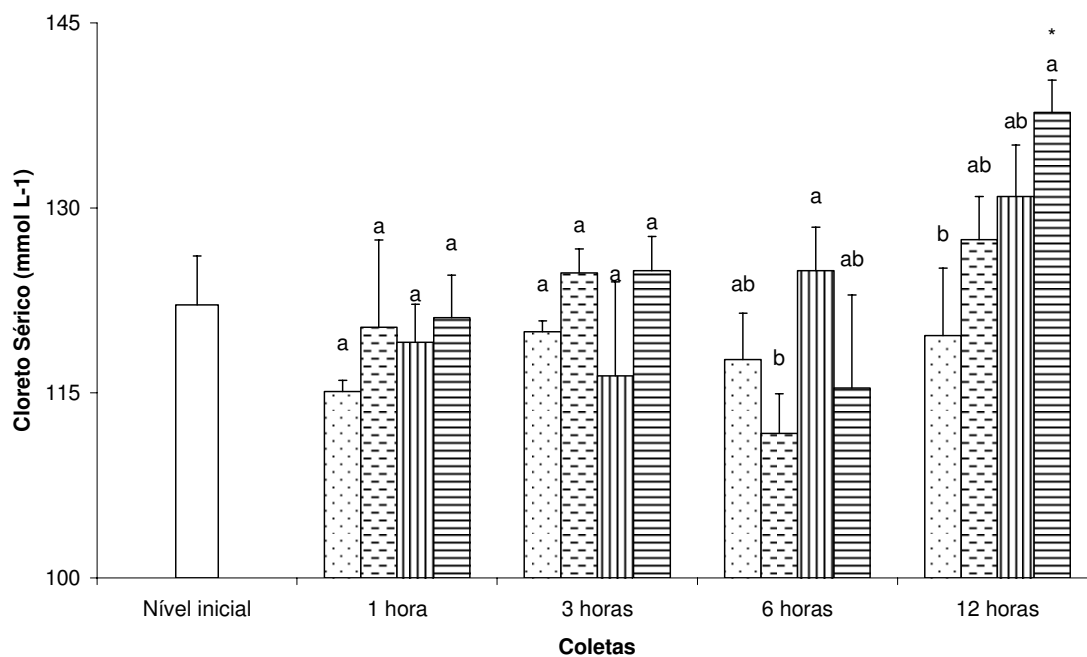


Figura 5. Valores médios de cloreto sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

A atividade específica da enzima Na⁺ K⁺ ATPase nas brânquias dos peixes T0 apresentou redução significativa quando comparada à dos peixes do T9 depois de uma hora da mudança de salinidade e tanto nestes peixes como nos peixes T3 e T6 a atividade enzimática foi numericamente inferior a da condição anterior a mudança. Três horas após, a atividade da enzima nos peixes de todos os tratamentos era numericamente menor que antes da transferência, sendo significativo apenas no T0. Após 6 e 12 horas da transferência de meio, as flutuações da atividade da Na⁺ K⁺ ATPase não apresentaram um padrão específico (Figura 6).

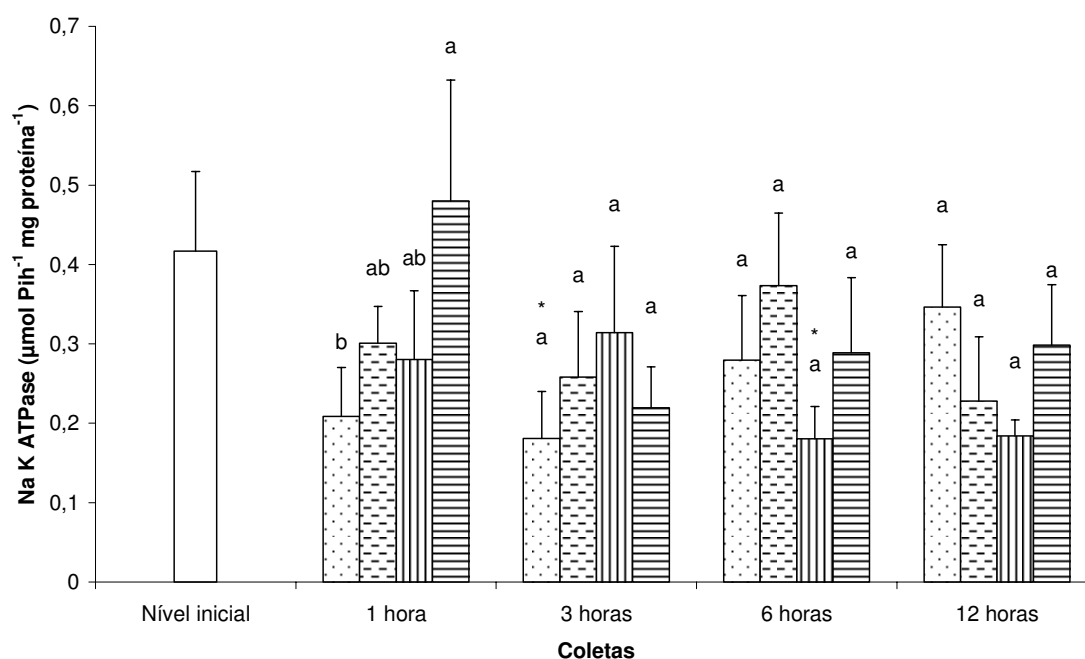


Figura 6. Valores médios da atividade da enzima Na⁺K⁺ATPase nas brânquias de matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9 g L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos (n=5).

A excreção de amônia pelos peixes T9 foi maior que nos outros tratamentos e não diferiu daqueles transferidos para água sem adição de sal na primeira hora após

mudança de salinidade. Entre a primeira e terceira hora, os peixes T3 excretaram mais amônia que os peixes dos outros tratamentos. Nos tempos subseqüentes, a taxa de excreção deste metabólito foi igual nos peixes de todos os tratamentos (Figura 7).

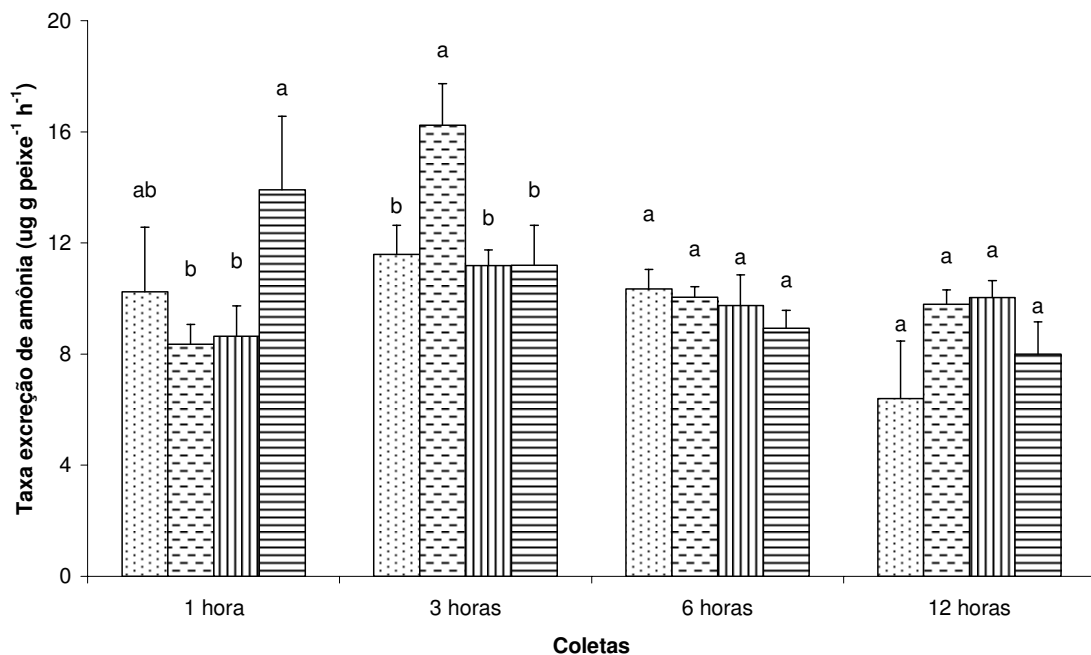


Figura 7. Valores médios da excreção de amônia por matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

A concentração de potássio sérico dos peixes transferidos não diferiu dos valores iniciais em nenhum tempo de amostragem. Somente 3 horas após a mudança de salinidade, os peixes T9 apresentaram concentrações séricas de potássio mais elevadas que os peixes T3 (Figura 8).

De modo geral, houve um aumento progressivo da concentração sanguínea de cálcio da primeira a última amostragem e, 3 horas após a mudança de salinidade, aparecem diferenças significativas em relação ao nível inicial nos peixes T0, T3 e T9. (Figura 9).

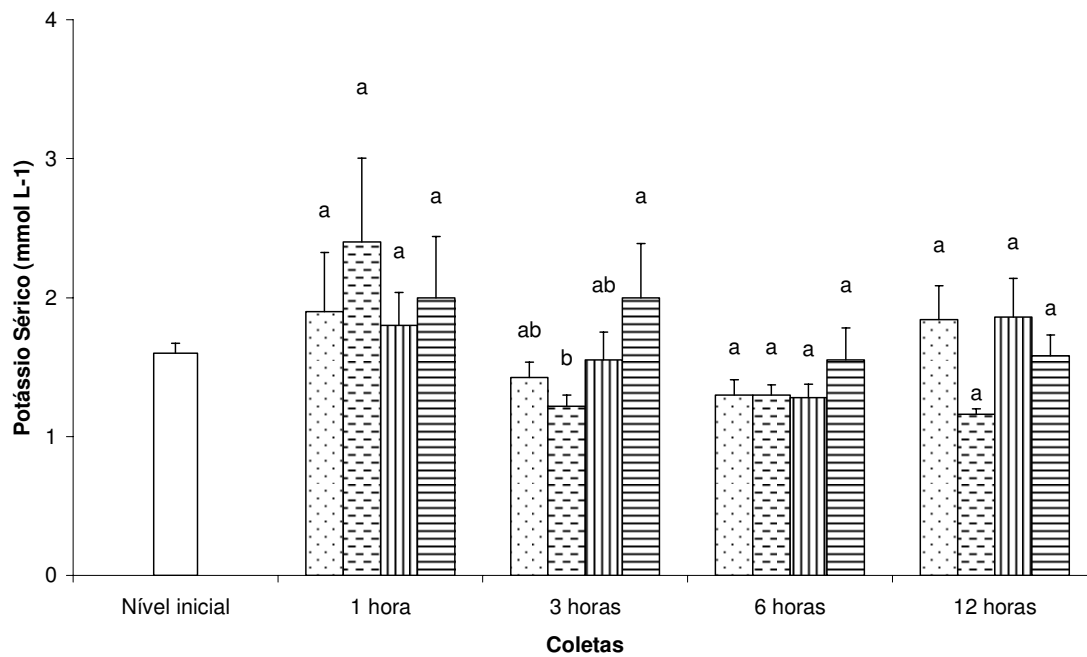


Figura 8. Valores médios de potássio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

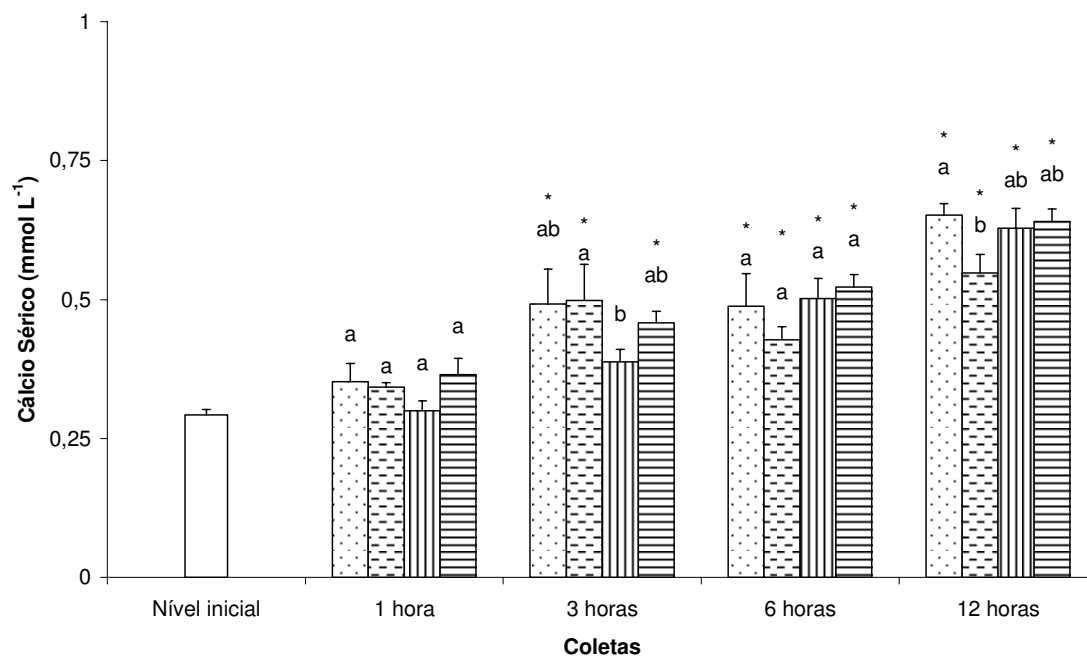


Figura 9. Valores médios de cálcio sérico em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos (n=5).

Reduções no número de eritrócitos no sangue dos peixes T0 e T6 surgem a partir de 3 horas após mudança de salinidade, sendo que os peixes do tratamento 9 g L⁻¹ foram os únicos que não apresentaram alterações significativas para este parâmetro. Após 6 horas da transferência, os peixes T0, T3 e T6 também apresentaram diminuição do número de eritrócitos circulantes. Após 12 horas, o número destas células foi restabelecido nos peixes T6 (Figura 10).

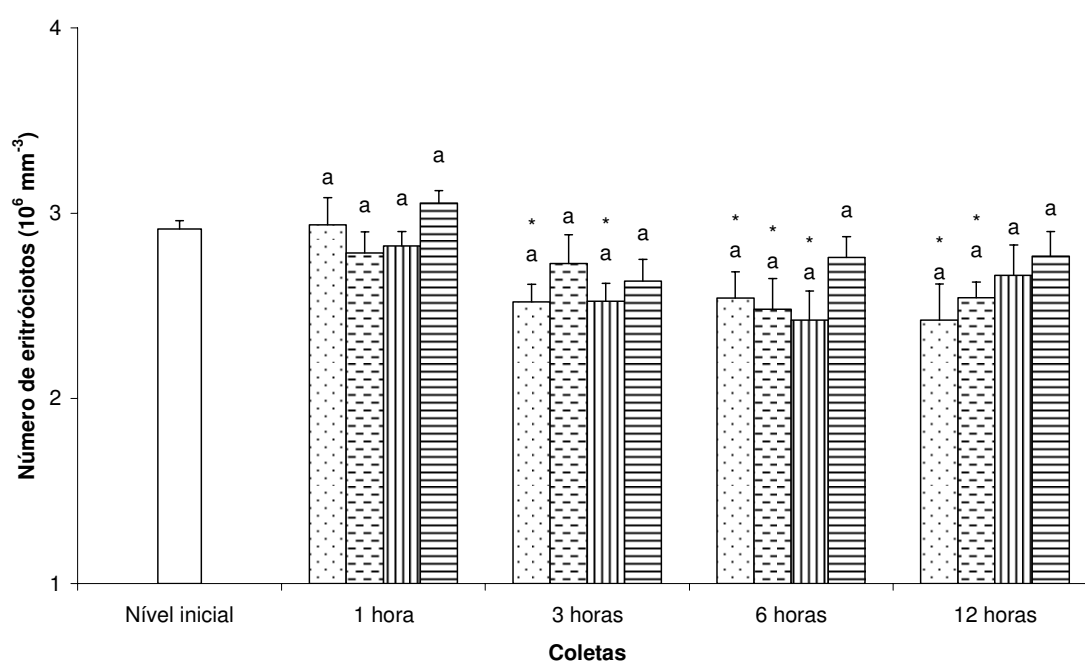


Figura 10. Valores médios da contagem de eritrócitos em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L⁻¹ (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

O volume corpuscular médio dos eritrócitos não foi afetado pelos tratamentos e apresentaram um valor médio de $134,21 \pm 3,23 \mu\text{m}^3$ (Figura 11).

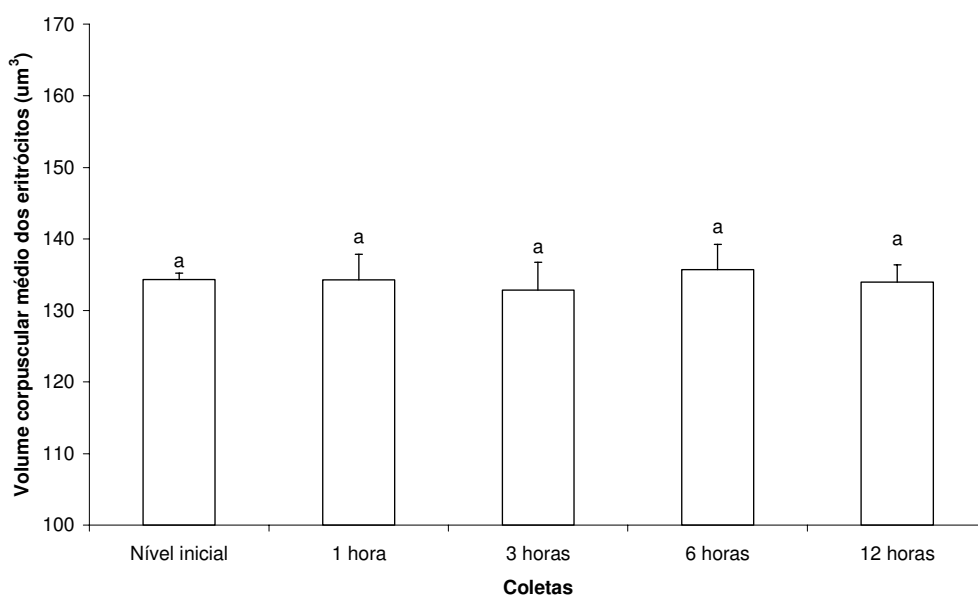


Figura 11. Valores médios do volume corpuscular dos eritrócitos, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs após transferência. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=20$).

Com relação ao hematócrito, observou-se um comportamento semelhante ao do número de eritrócitos com redução numérica na maioria dos tratamentos a partir de 3 horas (Figura 12).

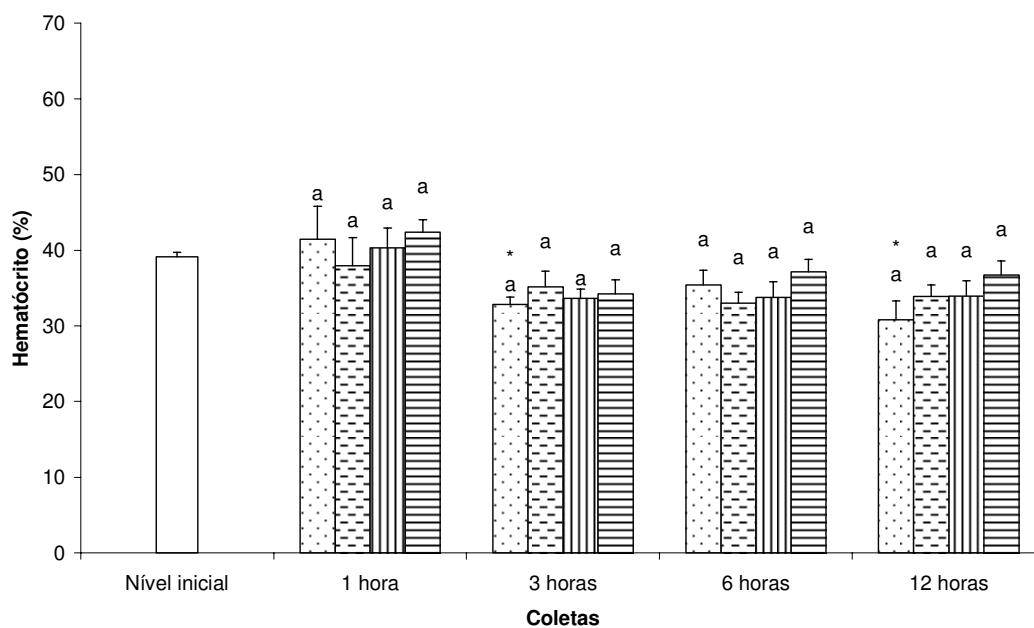


Figura 12. Valores médios de hematócrito em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L^{-1} (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

Uma tendência de redução como observado no hematócrito ocorreu na concentração de hemoglobina (Figura 13).

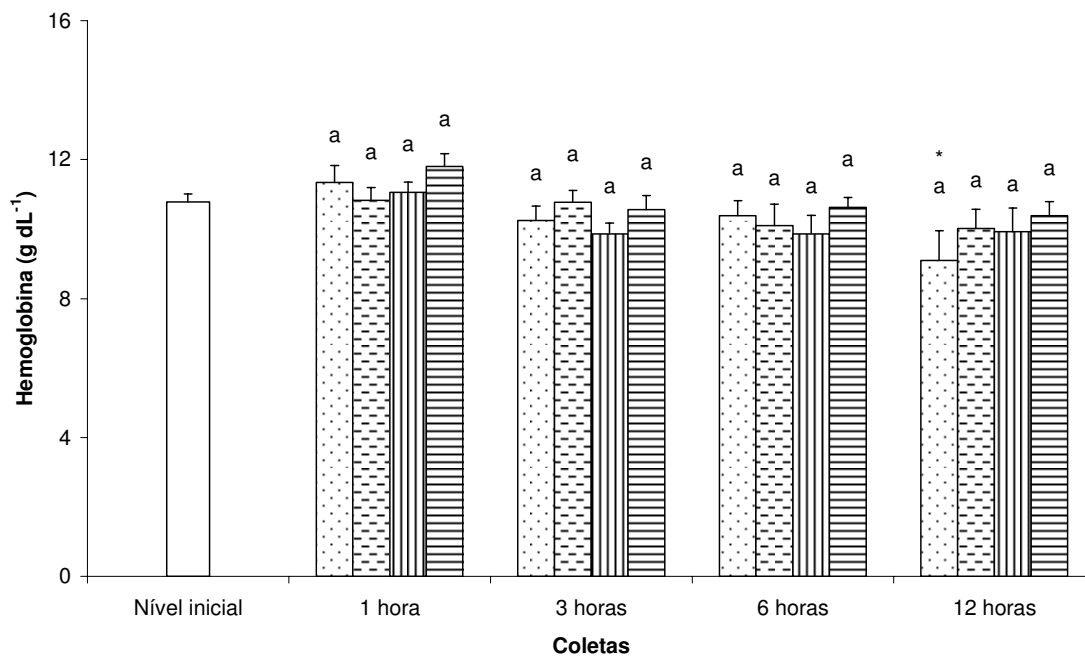


Figura 13. Valores médios da concentração de hemoglobina em matrinxãs transferidos de água sem adição de sal para água com adição de NaCl nas concentrações: 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L^{-1} (listrado horizontal). Ver Figura 1 para informações sobre letras e asteriscos. (n=5).

Experimento 2

Os valores de temperatura, pH, e oxigênio dissolvido da água nas caixas de aclimação e transferência permaneceram dentro da faixa aceitável para a espécie (Tabela 02) (Gomes & Urbinati, 2005). Os níveis de sódio na água variaram conforme os tratamentos, com valores de 40, 82 e 119 mmol L⁻¹ na adição de 3, 6 e 9 g L⁻¹, respectivamente. No tratamento sem adição de cloreto de sódio, as concentrações do íon não foram detectáveis pelo método utilizado.

Tabela 02: Valores médios ± desvio padrão da média de temperatura, oxigênio dissolvido e pH da água antes (inicial) e 1, 3, 6 e 12 horas após a transferência de matrinxãs aclimatados em NaCl para água sem adição de sal (n=20).

	Inicial	1 hora	3 horas	6 horas	12 horas
Temperatura (°C)	23,90 ± 0,1	22,95 ± 0,1	25,22 ± 0,5	28,50 ± 0,1	27,32 ± 0,1
Oxigênio Dissolvido (mg L⁻¹)	4,29 ± 0,3	7,17 ± 0,7	6,56 ± 0,2	6,10 ± 0,3	5,78 ± 0,2
pH	7,36 ± 0,1	7,57 ± 0,1	8,03 ± 0,4	8,23 ± 0,1	8,24 ± 0,1

Ao final da aclimação em cloreto de sódio, peixes de todos os tratamentos tinham a mesma glicemia. Uma hora após a transferência dos peixes a glicemia estava mais elevada nos peixes aclimatados sem adição de cloreto de sódio. Nos demais tempos de coleta, os valores deste parâmetro não diferiram entre os tratamentos, embora houvesse uma tendência a ser mais baixa nos peixes aclimatados ao cloreto de sódio (Figura 14).

Tanto o sódio quanto o cloreto, ao final do período de aclimação, estavam mais elevados nos peixes T9. Após a transferência, os valores de sódio mostraram diferença entre os tratamentos somente após 12 horas, sendo mais elevados nas

concentrações do meio mais elevadas. No caso do cloreto, 6 horas após a transferência, a concentração de cloreto nos peixes de T9 era menor que a do grupo controle e mostrou o mesmo perfil do sódio na última amostragem (Figuras 15 e 16).

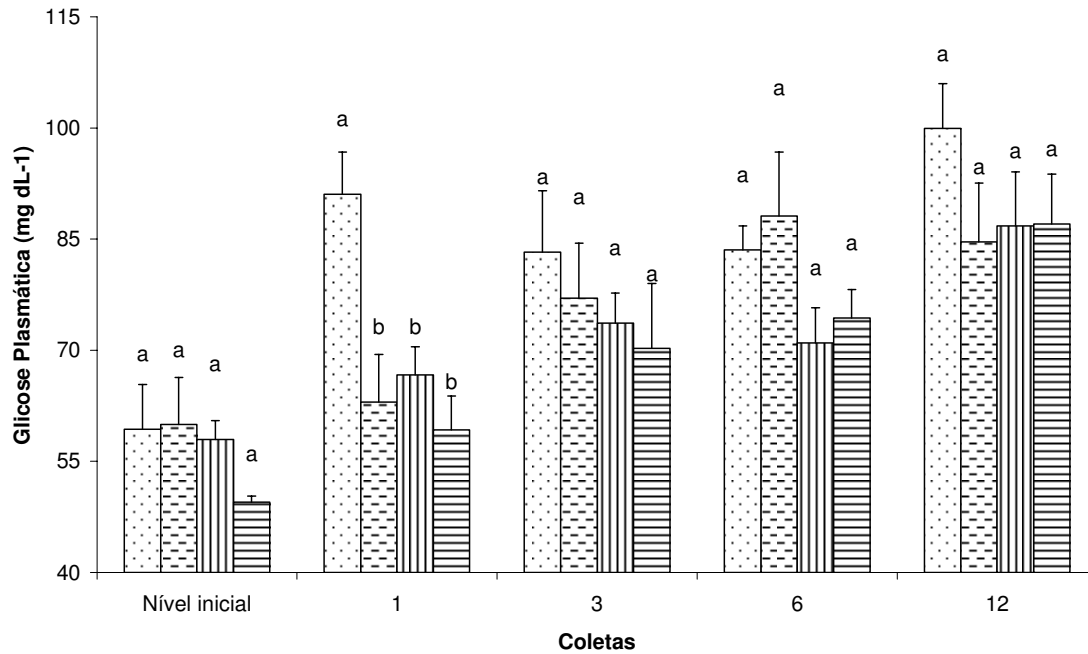


Figura 14. Valores médios de glicose plasmática em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9 g L⁻¹ (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre tratamentos no mesmo tempo. Barras verticais representam erro padrão da média ($n=5$).

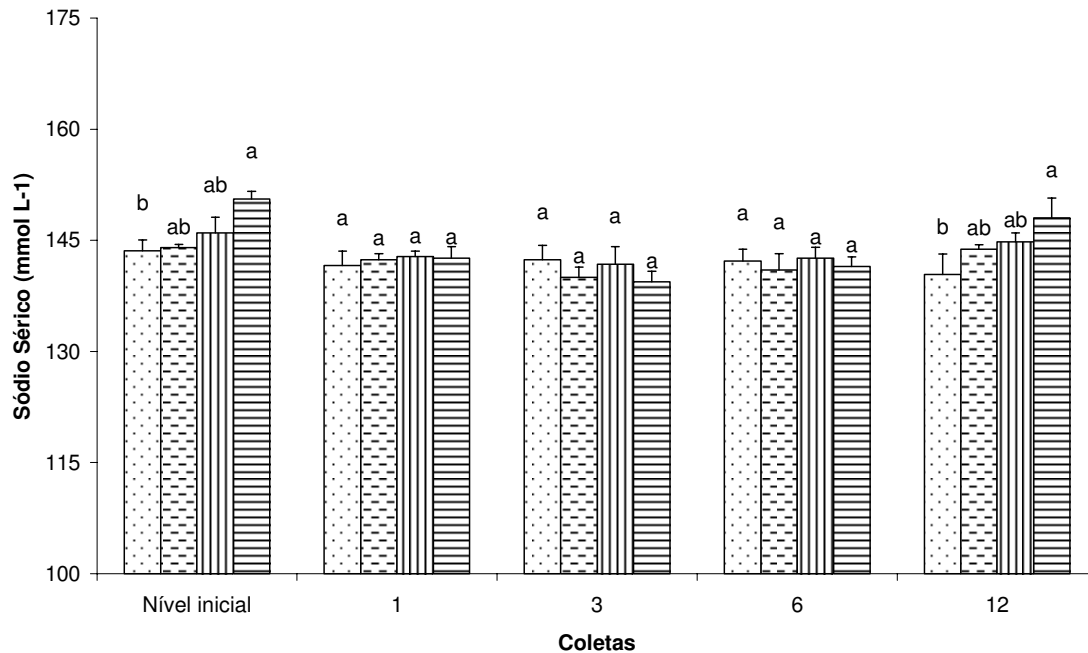


Figura 15. Valores médios de sódio sérico em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9 g L⁻¹ (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 1 para informações sobre letras ($n=5$).

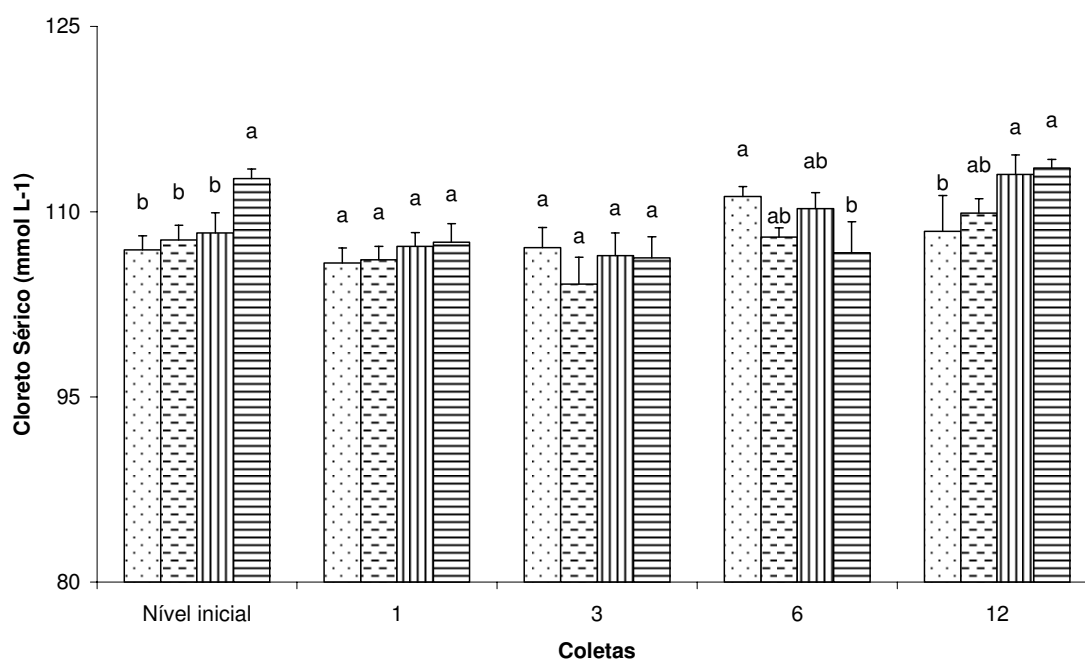


Figura 16. Valores médios de cloreto sérico em matrixãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L⁻¹ (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 1 para informações sobre letras (n=5).

Após o período de aclimação, a atividade da enzima Na⁺ K⁺ ATPase nas brânquias foi mais baixa nos peixes do grupo controle. Nos outros tratamentos e tempos de coleta, a atividade da enzima não apresentou diferença significativa (Figura 17).

A taxa de excreção de amônia dos peixes T6, entre 3 e 6 horas da transferência para água sem adição de sal, foi menor que a do grupo controle. Entre 6 e 12 horas, a taxa de excreção de amônia dos peixes de T6 e T9 foi menor que nos peixes aclimatados sem adição de sal. Nas primeiras coletas (1 e 3 horas), a excreção de amônia não diferiu entre os tratamentos (Figura 18).

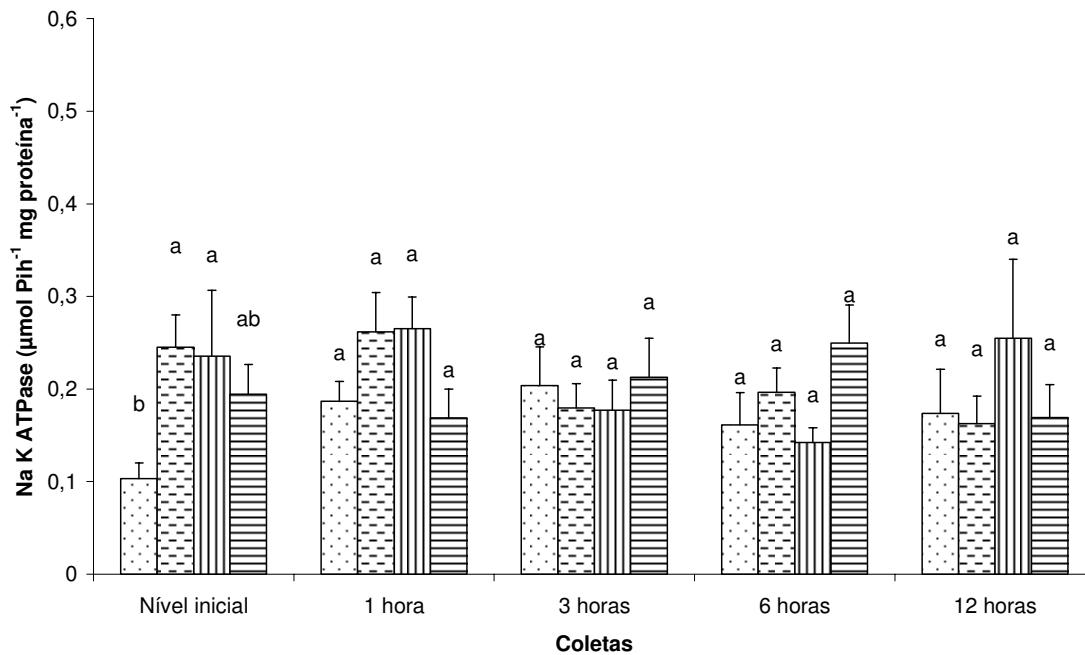


Figura 17. Valores médios da atividade da enzima Na^+K^+ ATPase nas brânquias de matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9 g L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 1 para informações sobre letras ($n=5$).

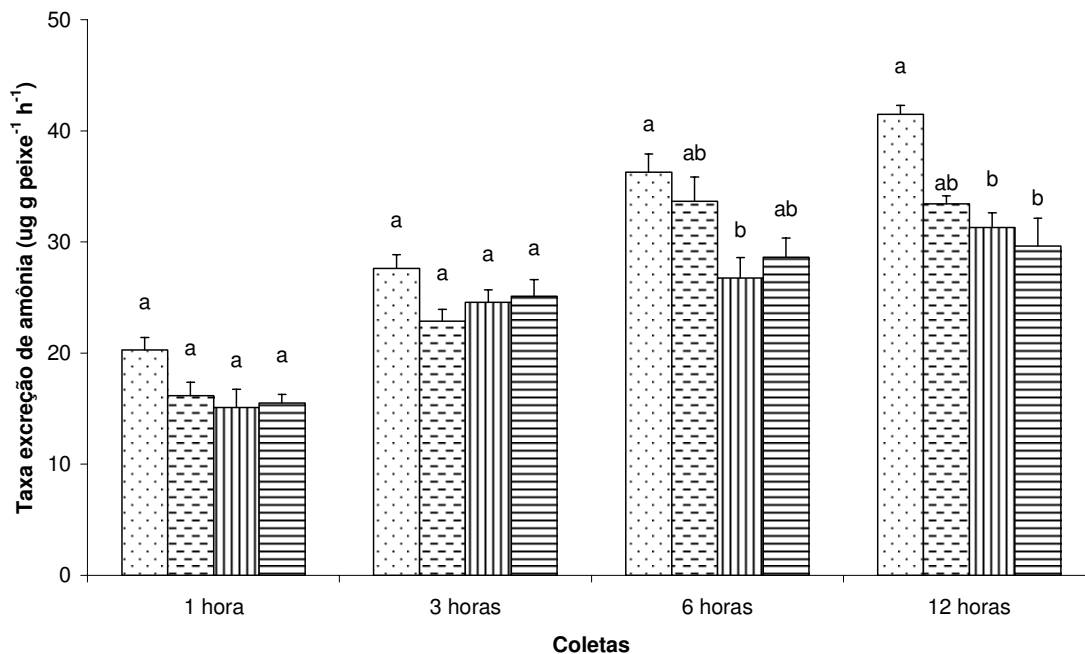


Figura 18. Valores médios da excreção de amônia em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9 g L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 1 para informações sobre letras ($n=5$).

A concentração de potássio e cálcio sérico não foi afetada pelos tratamentos e tempos de coleta e os valores médios encontrados foram $1,55 \pm 0,18 \text{ mmol L}^{-1}$, para potássio, e $0,57 \pm 0,04 \text{ mmol L}^{-1}$, para o cálcio.

No caso dos parâmetros hematológicos, o número de eritrócitos circulantes foi menor nos peixes aclimatados em água sem adição de sal em relação aos peixes do T9, 6 horas após a transferência para o novo meio. Doze horas após, o perfil se inverteu registrando-se menor quantidade de células nos peixes do T9 (Figura 19). O volume dos eritrócitos foi maior antes da transferência, com valor de $131,82 \pm 2,42 \mu^3$, quando comparados com a média de todos os outros tempos de amostragem com valor de $122,21 \pm 1,77 \mu^3$ ($p < 0,05$) (Figura 20). Os valores de hematócrito não apresentaram oscilações significativas durante o experimento (Figura 21). Já a concentração de hemoglobina sanguínea apresentou o mesmo perfil do número de eritrócitos circulantes (Figura 22).

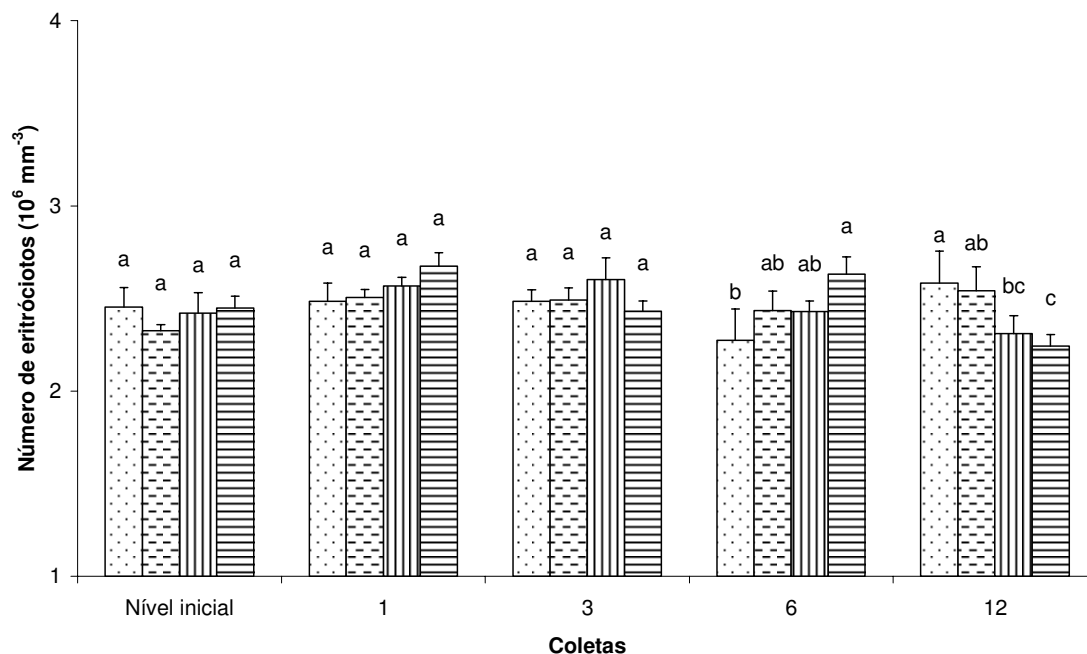


Figura 19. Valores médios da contagem de eritrócitos circulantes em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9 g L^{-1} (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 1 para informações sobre letras ($n=5$).

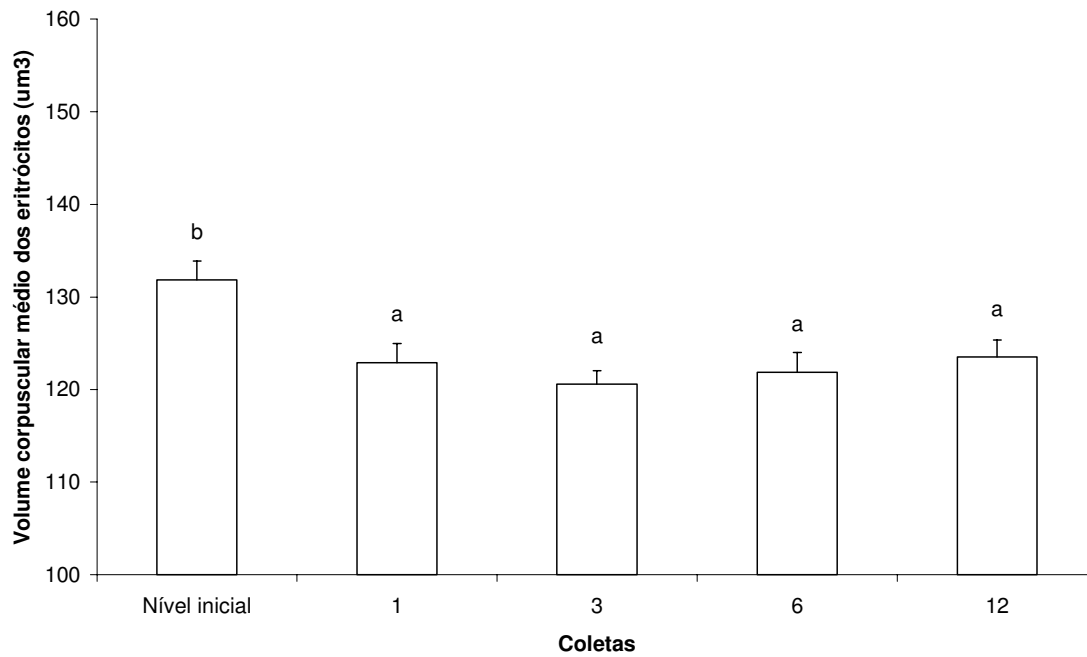


Figura 20. Valores médios do volume corpuscular dos eritrócitos, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs após transferência. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=20$).

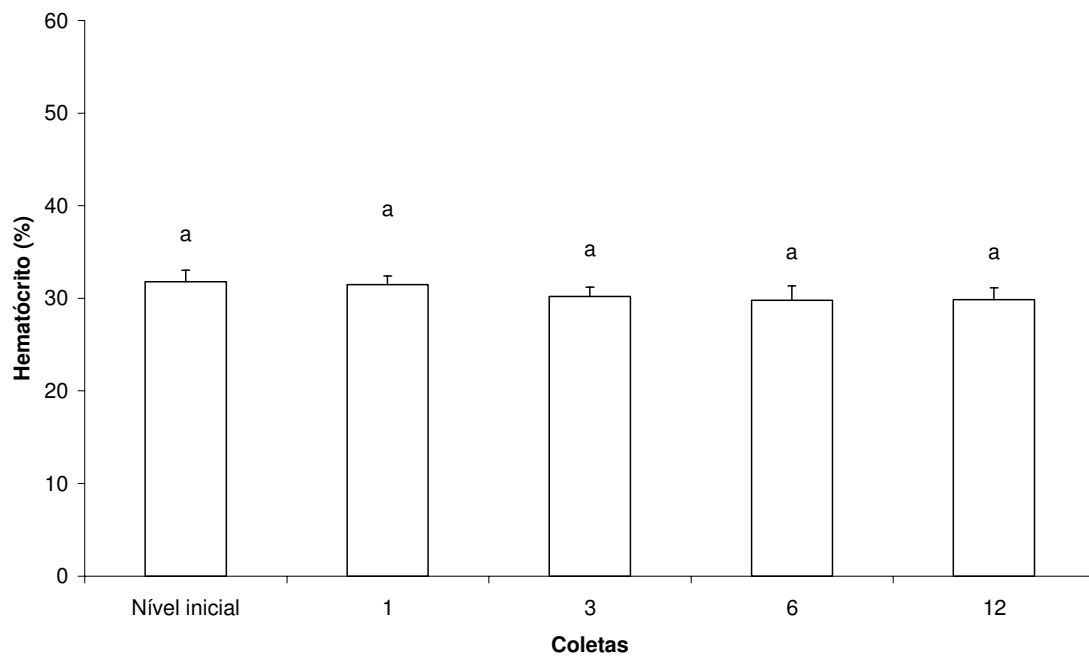


Figura 21. Valores médios do hematócrito, que não diferiram entre tratamentos, comparados entre tempos de coleta em matrinxãs após transferência. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Barras verticais representam erro padrão da média ($n=20$).

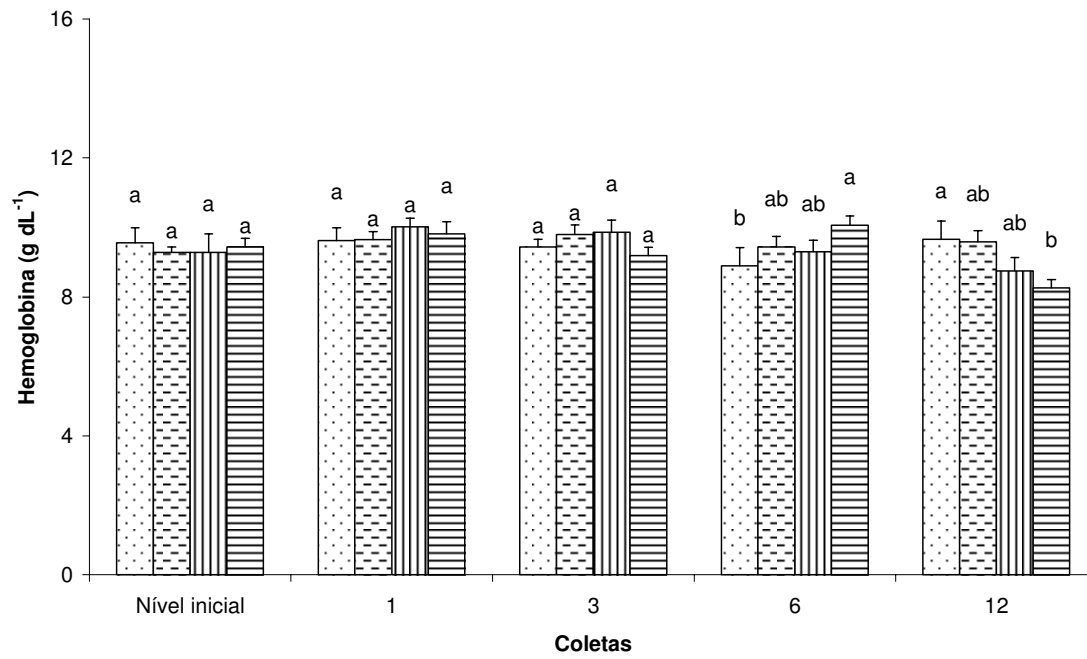


Figura 22. Valores médios da concentração de hemoglobina em matrinxãs transferidos de água com adição de NaCl em concentrações de 0 (pontilhado); 3 (tracejado); 6 (listrado vertical) e 9g L⁻¹ (listrado horizontal) para água sem adição de sal. Ver Figura 1 para informações sobre letras (n=5).

DISCUSSÃO

Neste estudo não ocorreu mortalidade e os parâmetros de qualidade da água se mantiveram dentro das condições aceitáveis para o matrinxã (Gomes & Urbinati, 2005).

Na piscicultura, é comum a adição de cloreto de sódio em procedimentos que envolvam manejos estressantes. Em matrinxã, a adição de 6 g L^{-1} de NaCl, (Carneiro & Urbinati, 2001) e em tambaqui 8 g L^{-1} (Gomes et al., 2003) manteve a glicemia em níveis similares aos iniciais logo após a chegada do transporte. Em robalo, a aclimação em salinidades próximas as plasmáticas demonstraram menor custo metabólico (Gracia-López, 2006).

Considerando a glicose plasmática um indicador de estresse, no Experimento 1 verificou-se, nos peixes transferidos para água sem adição de cloreto de sódio, resposta de maior intensidade frente ao estímulo de transferência de ambiente. Os peixes do T9, após a transferência para água com sal, apresentaram níveis de glicose plasmática similares aos iniciais, sugerindo mitigação da resposta ao manejo.

No Experimento 2, os peixes T9 tinham níveis de glicose ligeiramente inferiores ao dos demais tratamentos antes da transferência. Uma hora depois da transferência, os matrinxãs aclimatados sem adição do sal apresentaram uma hiperglicemia quando comparados com os peixes T3, T6 e T9 indicando o efeito mitigador de estresse do cloreto de sódio.

Por outro lado, tanto na transferência rápida de meios como na aclimação por 12 horas, os peixes T9 apresentaram uma elevação na concentração sérica de sódio e cloreto. Embora a adição de 9 g L^{-1} tenha levado à concentração de 114 mmol L^{-1} de sódio na água, a concentração sérica deste íon no matrinxã em condições normais, neste estudo foi de 143 mmol L^{-1} . Este peixe, mesmo aclimatado por 12 horas, apresentou um distúrbio osmorregulatório na transferência de salinidade, para 9 g L^{-1} . Estes resultados são similares aos de percas transferidas para 8 e 16 g L^{-1} de cloreto de sódio, quando o cortisol não se elevou, mas a osmolalidade e cloreto plasmáticos foram significativamente maiores que os níveis iniciais (Brown et al., 2001).

A atividade da enzima Na^+K^+ ATPase, logo após a transferência dos matrinxãs T9 para água com sal foi duas vezes maior que os peixes do grupo

controle, no primeiro experimento. Quando houve a aclimatação, a mesma resposta foi observada, mas com maior intensidade nos peixes do T3 e T6. Nas brânquias, esta enzima tem o papel de captar ou expulsar íons para manter a homeostase (McCormick & Saunders, 1987). Em diferentes espécies, a sua atividade pode ser maior ou menor dependendo da habilidade do peixe em se adaptar em novos ambientes (Hiroi & McCormick, 2007). No presente estudo, a maior atividade foi após a transferência e depois da aclimatação, demonstrando a necessidade dos peixes em expulsar o excesso de íons sódio e cloreto do plasma naquela situação.

A excreção de amônia pode ser usada como indicador de efeitos ambientais e fatores nutricionais em peixes. Informações sobre os efeitos da salinidade na excreção de amônia muitas vezes são contraditórios, provavelmente pelas espécies possuírem adaptações diferentes (Wood, 1993). Altinok & Grizzle (2004) demonstraram que, aclimatando peixes estenohalinos a salinidades próximas a plasmática, a excreção deste metabólito dobrou em peixes aclimatados em água marinha a 9 ppt. No presente estudo, tanto a transferência rápida como transferência após a aclimatação não proporcionaram alteração na excreção de amônia nos peixes após 12 horas em novo ambiente. Entretanto, logo depois da transferência rápida até uma hora, os peixes do T9 excretaram mais amônia. Associando o aumento da atividade da enzima Na^+K^+ ATPase a esta resposta, pode-se apontar para a capacidade dos íons NH_4^+ substituírem o K^+ na atividade desta enzima (Mallery, 1983). De forma inversa, a inibição desta enzima, por adição de ouabaína, reduziu a excreção de amônia pelas brânquias de trutas cultivadas em água doce (Payan, 1978).

Para a obtenção de uma completa reação da Na^+K^+ ATPase, é fundamental a presença dos íons Na^+ e K^+ e a velocidade desta reação depende da concentração destes íons no meio (Renzis & Bornacin, 1984). No Experimento 1, os níveis mais altos de potássio sérico nos peixes do T9 três horas após a transferência pode ter sido causada pela necessidade de aumento deste íon na circulação para acelerar a atividade da enzima Na^+K^+ ATPase nas brânquias.

A concentração sérica de cálcio não foi alterada pelos tratamentos, mas no Experimento 1, os níveis deste íon aumentaram progressivamente com o tempo, enquanto no Experimento 2, o mesmo não ocorreu.

Após a transferência para água com sal, os peixes do T9 mantiveram o número de eritrócitos circulantes. A diminuição ocorrida nos outros tratamentos pode

ser originada pela tendência dos peixes ganharem água durante a transferência, quando o estresse sofrido aumenta a permeabilidade das membranas e assim causa uma hemodiluição (Morgan & Iwama, 1997). No entanto, o volume dos eritrócitos não variou durante o Experimento 1, confirmando a correlação dos valores de hematócrito e hemoglobina com a contagem das células sanguíneas neste experimento. No segundo experimento, as respostas foram mais brandas, sugerindo menor interferência do choque de salinidade para meios hipotônicos nos parâmetros hematológicos.

Os principais distúrbios verificados foram a elevação nas concentrações plasmáticas de sódio e cloreto, além do aumento da atividade da enzima Na^+K^+ ATPase nas brânquias dos peixes transferidos rapidamente para a concentração de 9 g L^{-1} de cloreto de sódio. Baseado nestas observações, é possível sugerir que o NaCl tem papel importante na mitigação do estresse, assim como verificado por diversos outros autores. Entretanto, a concentração utilizada na transferência pode interferir no benefício, pois o distúrbio hidromineral decorrente da transferência pode comprometer o efeito benéfico deste sal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altinok, I., Grizzle, J.M., 2004. Excretion of ammonia and urea by phylogenetically diverse fish species in low salinities. *Aquaculture* 238, 499-507.
- Barton, B.A., Iwama, G.K., 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Reviews of Fish Disease* 1, 3-26.
- Bath, R.N., Eddy, F.B., 1979. Salt and water balance in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) rapidly transferred from fresh water to sea water. *Journal of Experimental Biologists* 83, 193-202.
- Brown, J.A., Moore, W.M., Quabius, E.S., 2001. Physiological effects of saline waters on zander. *Journal of Fish Biology* 59, 1544-1555.
- Carneiro, P.C.F., Martins, M.L., Urbinati, E.C., 2002. Effect of sodium chloride on physiological responses and the gill parasite, *Piscinoodinium* SP., in matrinxã, *Brycon cephalus*, (Teleostei: Characidae) subjected to transport stress. *Journal of Aquaculture in the Tropics* 17(4), 337-348.
- Carneiro, P.C.F., Urbinati, E.C., 2001. Salt as a stress response mitigator of matrinxã, *Brycon cephalus* (Günther), during transport. *Aquaculture Research* 32, 297-304.
- Donaldson E., 1981. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In: Pickering A.D. (Ed) *Stress and fish*. Academic Press, London. p.11-47.
- Evans, D.H., 1984. The roles of gill permeability and transport mechanisms in euryhalinity. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds) *Fish Physiology – Gills Part B – Ions and water transfer*. Academic Press, London. P 239-283.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogen waste. *Physiological Reviews* 85, 97-177.

- Febry, R., Lutz, P., 1987. Energy partitioning in fish: The activity-related cost of osmoregulation in a euryhaline cichlid. *Journal of Experimental Biology* 128, 63-85.
- Golterman, H. L.; Clymo, R. S.; Ohnstad, M. A. M., 1978. *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. Oxford: Blackwell Scientific 214 p.
- Gomes, L. C., Araújo-Lima, C. A. R. M., Roubach, R., Urbinati, E.C., 2003. Assessment on the effect of salt and density on tambaqui fish transportation. *Pesq. agropec. bras.* 38, 283-290.
- Gomes, L.C., Urbinati, E.C., 2005. Matrinxã (*Brycon amazonicus*). In Baldisserotto, B., Gomes, L.C. (Eds). *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Ed. da UFSM, Santa Maria, pp 149-174.
- Gracia-López, V., Rosas-Vázquez, C., Brito-Pérez R., 2006. Effects of salinity on physiological conditions in juvenile common snook *Centropomus undecimalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 145, 340–345.
- Hiroi, J., McCormick, S.D., 2007. Variation in salinity tolerance, gill Na⁺/K⁺-ATPase, Na⁺/K⁺/2Cl⁻-cotransporter and mitochondria-rich cell distribution in three salmonids *Salvelinus namaycush*, *Salvelinus fontinalis* and *Salmo salar*. *Journal of Experimental Biology* 210, 1015-1024.
- King, E. J., Garner, R.J., 1947. Colorimetric determination of glucose. *Journal of Clinical Pathology* 1, 30-33.
- Kruger, N.J., 1994. The Bradford method for protein quantification. In: *Methods in Molecular Biology*. V- 32. *Basic Protein and Peptide Protocols*. Humana Press, Hatfield.
- Mallery, C.H., 1983. A carrier enzyme basis for ammonium excretion in teleost gill. NH₄⁺ stimulated Na⁺ dependent ATPase activity in *Opsanus beta*. *Comparative Biochemistry Physiology* 74A, 889-897.
- McCormick, S.D., Saunders, R.L., 1987. Preparatory physiological adaptations for marine life in salmonids: osmoregulation, growth and metabolism. Common strategies of anadromous and catadromous fishes. *American Fisheries Society Symposium* 1, 211-229.

- Morgan, J.D., Iwama, G.K., 1997. Measurements of stressed states in the field. In: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.). Fish stress and health in aquaculture. Society for Experimental Biology Seminar Series 62, pp. 247-270. Cambridge University Press, New York.
- Noga, E.J., 1996. Fish Disease: diagnostic and treatment. Mosby - Year Book. Missouri. 367 p.
- Nolan, D.T. 2000. Skin response of fish to stressors. Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.
- Payan, P., 1978. A study of $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ exchange across the gill of the perfused head of trout (*Salmo gairneri*). Journal of Comparative Physiology B 124, 124-181.
- Quabius, E.S., Balm, P.H.M., Wendelaar Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. General Comparative Endocrinology 108, 472-482.
- Renzis, G., Bornacin, M., 1984. Ion transport and gill ATPases. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. (Eds). Fish Physiology, Volume X, Gills, Part B. Academic Press, London, pp. 65-104.
- Wendelaar Bonga, S.E., 1997. The stress response in fish. Physiological Reviews 77(3), 591-625.
- Wood, C.M., 1993. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: The Physiology of Fishes (Ed. Evans, D. H.), pp. 379–425. CRC Press, Boca Raton.

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A transferência rápida do matrinxã para ambientes com cálcio causou leves distúrbios osmorregulatórios. Já a passagem abrupta do ambiente com cálcio para água sem adição de sais ocasionou respostas ainda mais brandas. Assim, é possível afirmar que as transferências entre as concentrações de cálcio testadas podem ser realizadas sem prejuízo para o matrinxã.

A adição de cloreto de sódio proporcionou diminuição nas respostas de estresse no manejo da transferência de ambientes. Mesmo sendo realizada com transferências rápidas, a concentração de 6 g L^{-1} pode ser indicada para uso na piscicultura sem ocasionar distúrbios relevantes. Já a concentração de 9 g L^{-1} ocasionou alterações osmorregulatórias de maior intensidade não sendo indicada para a espécie. Da mesma forma, como verificado com o cálcio, a transferência dos peixes de ambientes com adição de NaCl para ambientes sem adição de NaCl, pode ser realizada sem alterações hidrominerais.

Na piscicultura o emprego de cloreto de cálcio e sódio vem sendo realizado como mitigadores de estresse. Baseado neste estudo, a adição de até 600 mg L^{-1} e 6 g L^{-1} de CaCl_2 e NaCl respectivamente, pode ser feita com transferência rápida para os ambientes sem ocasionar danos osmorregulatórios ao matrinxã.

Futuras pesquisas são importantes para verificar a adição de CaCl_2 em águas com baixas concentrações de cálcio e a adição concomitante dos dois sais (CaCl_2 e NaCl)