

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL**

**PARÂMETROS METABÓLICOS E ÍONS
PLASMÁTICOS DE PIAVAS (*Leporinus
obtusidens*) EXPOSTAS A DIFERENTES
NÍVEIS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO E
AMÔNIA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Keidi Carolina dos Santos Bolner

Santa Maria, RS, Brasil

2007

**PARÂMETROS METABÓLICOS E ÍONS
PLASMÁTICOS DE PIAVAS (*Leporinus
obtusidens*) EXPOSTAS A DIFERENTES NÍVEIS
DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO E AMÔNIA**

por

Keidi Carolina dos Santos Bolner

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal, Área de Concentração em Bioecologia de Peixes, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Biologia.**

Orientador: Professor Dr. João Radünz Neto

2007

Santa Maria, RS, Brasil

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE ANIMAL

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

PARÂMETROS METABÓLICOS E ÍONS
PLASMÁTICOS DE PIAVAS *Leporinus obtusidens*
EXPOSTAS A DIFERENTES NÍVEIS DE
OXIGÊNIO DISSOLVIDO E AMÔNIA

elaborada por

Keidi Carolina dos Santos Bolner

Como requisito para obtenção do grau de
Mestre em Biologia

COMISSÃO EXAMINADORA

João Radünz Neto (UFSM)

Bernardo Baldisserotto (UFSM)

Maria Amália Pavanato (UFSM)

Dedico ao Felipe,
pela compreensão, companheirismo,
apoio e incentivo em qualquer decisão que faço,
mas acima de tudo ao teu amor a mim compartilhado.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Prof. Dr. Bernardo Baldisserotto, um exemplar orientador e exímio professor, que sabe exigir e extrair o máximo de seus alunos, puxando a orelha e elogiando nas horas certas, seriedade e bom humor juntos, que fazem de um ambiente de trabalho e pesquisa algo agradável, e não um martírio diário. E ao Prof. Dr. João Radünz Neto por ter aceito me orientar após a saída do prof. Bernardo do corpo de orientadores do Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Animal.

Aos colegas de laboratório e professores do Departamento de Farmacologia e Fisiologia, sempre apoiando, tanto com um ombro amigo como com alguma dica que com certeza fez a diferença. Aos eternos amigos: Rafael B. da Cunha, por me mostrar um novo caminho e me fazer enxergar as dificuldades por outro; Rafael Tarabal e Mariana Fantinel, por me tirarem da rotina nas horas certas e perceber que a vida é curta e não podemos desperdiçá-la; Vinícius Prates Soares, a ti e tua família agradeço pelo apoio nas horas boas e ruins, vocês estiveram presentes nos principais momentos desta nova etapa concluída; Ricardo Cassol, os muitos conselhos que te dei também serviram pra mim, esqueci de contar às vezes que perdi o sono pensando como tu estavas e se conseguirias superar certas provações, tu és único; Karine Braga, pela amizade incondicional, por compartilhar momentos emocionantes e choramingantes em diversos filmes nas tardes de sábados e domingos, pelo papel de irmã mais velha e às vezes mais nova, bom humor, muitas risadas que até tua mãe acha que fomos trocadas na maternidade e que na verdade somos irmãs, te amo muito e tu sabes disso. Enfim, a todos pelo total apoio em minhas decisões, compreensão de longas ausências em saídas, cinema ou jogos de RPG, e principalmente pela oportunidade de poder fazer parte da vida de vocês como amiga. Contem comigo até o fim meus amores!

Agradeço também à família que escolhi antes vir, foi e sempre será uma eterna provação de minha capacidade de compreender e perdoar. E à família que meu eterno amor me deu: Rosane e Antônio, pais maravilhosos, que compreendem e apóiam o é certo e que fará feliz os seus filhos; Daniel e Willian, irmãos sempre unidos, seja pra proteger o mais novo, ou aconselhar o mais velho, vocês são demais. Obrigada por me deixarem fazer parte da vida de vocês, amo a todos.

Felipe, nós conseguimos, e podemos qualquer coisa se estivermos juntos e unidos!

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUÇÃO GERAL	9
OBJETIVOS GERAIS	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
ARTIGO 1: PARÂMETROS METABÓLICOS E ÍONS PLASMÁTICOS DE PIAVAS <i>Leporinus obtusidens</i> EXPOSTAS A DIFERENTES NÍVEIS DE AMÔNIA.	17
Resumo	17
Introdução	18
Metodologia	19
Resultados	21
Discussão	22
Referências	25
Figuras	28
ARTIGO 2: PARÂMETROS METABÓLICOS E ÍONS PLASMÁTICOS DE PIAVAS <i>Leporinus obtusidens</i> EXPOSTAS A DIFERENTES NÍVEIS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO.	36
Resumo	36
Introdução	37
Metodologia	38
Resultados	40
Discussão	40
Referências	43
Tabelas	47
Figuras	48
CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Animal

Universidade Federal de Santa Maria

PARÂMETROS METABÓLICOS E ÍONS PLASMÁTICOS DE PIAVAS (*Leporinus obtusidens*) EXPOSTAS A DIFERENTES NÍVEIS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO E AMÔNIA

Autora: Keidi Carolina dos Santos Bolner

Orientador: João Radünz Neto

Data e Local da Defesa: 13 de dezembro de 2007, UFSM.

Juvenis de piava (7-13 cm; 25-30 g) foram expostas a diferentes níveis de NH_3 (em mg L^{-1}): 0,003 (controle); 0,1; 0,3; 0,7; 1,4, e oxigênio dissolvido: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 6,0 $\text{mg O}_2 \text{L}^{-1}$, por 4 dias (96h). Foram analisados os níveis plasmáticos de Na^+ , K^+ , Cl^- e NH_4^+ , bem como metabólicos e enzimas nos tecidos (fígado, rim, brânquias e músculo esquelético). A $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ para a piava foi de 0,27 (0,21 - 0,34) $\text{mg L}^{-1} \text{NH}_3$, as concentrações plasmáticas de Na^+ e NH_4^+ aumentaram com a crescente concentração de NH_3 na água, já o K^+ diminuiu e o Cl^- manteve-se estável. A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias aumentou com a elevação da concentração de NH_3 na água, enquanto que no rim houve redução da atividade. Os níveis de glicose no fígado e músculo reduziram proporcionalmente com o aumento da concentração de NH_3 . Os níveis de NH_4^+ nos tecidos tiveram correlação positiva em relação à concentração de NH_3 na água. Em piavas expostas a diferentes níveis de oxigênio dissolvido, as concentrações plasmáticas de Na^+ , Cl^- , K^+ e NH_4^+ diminuíram e a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias aumentou com a redução do oxigênio na água. Os níveis de glicose no fígado, rim e músculo aumentaram de acordo com a redução do oxigênio dissolvido na água. Porém os níveis de glicogênio reduziram. A concentração de amônia aumentou em todos os tecidos de acordo com a redução do oxigênio dissolvido na água. Na piava, a hipóxia provocou mudanças fisiológicas, tanto na osmorregulação como nos parâmetros metabólicos, após a exposição a diferentes níveis de oxigênio dissolvido. Portanto, o experimento confirmou que a amônia é um agente estressor para o peixe, inclusive em baixas concentrações, causando acumulação de amônia no plasma e em outros tecidos.

ABSTRACT

Master Dissertation

Post-Graduation course in Animal Biodiversity

Universidade Federal de Santa Maria

Metabolic parameters and plasma ions of piavas (*Leporinus obtusidens*) exposed to different ammonia and dissolved oxygen levels

Author: Keidi Carolina dos Santos Bolner

Adviser: João Radünz Neto

Place and date of defense: December 13th, 2007, UFSM.

Piava juveniles (7-13 cm; 25-30 g) were exposed to different NH_3 (mg L^{-1}): 0.003 (control), 0.1, 0.3, 0.7, 1.4, and dissolved oxygen levels (mg L^{-1}): 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, and 6.0, for 4 days (96h). Na^+ , K^+ , Cl^- , and NH_4^+ plasma levels were measured, as well as metabolics and enzyme activity in tissues (liver, kidney, gills, and muscle). The lethal concentration ($\text{LC}_{50-96\text{h}}$) for piava was 0.27 (0.21 – 0.34) mg L^{-1} NH_3 , and Na^+ and NH_4^+ plasma levels increased and K^+ decreased with the increase of waterborne NH_3 levels. Na^+ , K^+ -ATPase activity increased in the gills and decreased in the kidney with the increase of waterborne NH_3 levels. Glucose levels in the liver and muscle decreased as waterborne NH_3 concentrations raised. NH_4^+ levels in the tissues presented a positive correlation with waterborne NH_3 levels. Na^+ , Cl^- , K^+ and NH_4^+ plasma levels and Na^+ , K^+ -ATPase activity in the gills increased with dissolved oxygen reduction in the water. Glucose levels in the liver and muscle and ammonia in all tissues also increased with the reduction of dissolved oxygen levels in the water, but glycogen levels decreased. Consequently, ammonia is a stressor agent for this species, leading to an accumulation of ammonia in plasma and other tissues. In piava, hypoxia led to physiological changes in both osmoregulatory and metabolic parameters.

INTRODUÇÃO GERAL

Estudos envolvendo estresse têm sido freqüentemente realizados no campo da fisiologia de peixes. No ambiente, a resposta ao estresse pode ser vista como a capacidade dos peixes mobilizarem as reservas de energia de forma a evitar ou vencer imediatamente situações de ameaça. Em piscicultura intensiva, a situação de estresse está constantemente presente e pode afetar o desempenho produtivo dos peixes, prejudicando o estado de saúde e aumentando a suscetibilidade a doenças.

O estresse segue com o desencadeamento de respostas fisiológicas e comportamentais para a adaptação. A resposta primária, ou neuroendócrina, é caracterizada por um significativo aumento dos hormônios corticosteróides (cortisol) e da concentração de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina), que estimulam a hidrólise das reservas de glicogênio no fígado, aumentando os níveis de glicose no sangue, diminuição da proteína muscular, aumento do batimento cardíaco, marcando o início da resposta secundária. Os corticosteróides estimulam um aumento da permeabilidade da membrana celular. A resposta terciária é marcada pela diminuição da resistência dos peixes às doenças, pois ocorre uma diminuição no número de leucócitos, ocorrendo linfocitopenia (diminuição do número de linfócitos) e neutrofilia (aumento do número de neutrófilos circulantes) (Mazeaud *et al.*, 1977).

Atenção tem sido dada aos distúrbios osmoregulatórios induzidos pelo estresse, o qual desordena o balanço aquoso e mineral. O estresse afeta o peso do peixe, ocorrendo perda de peso em espécies marinhas e ganho de peso em peixes de água doce (Kirk, 1974). A perda ou ganho de água pode influenciar na variação de peso através da taxa de diurese, que pode ser explicada pela ação da adrenalina nas funções branquiais, resultando em um aumento na permeabilidade da membrana à água. O estresse também afeta o balanço de Na⁺ em peixes, pois trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) submetidas a exercício apresentaram perda de Na⁺ através das brânquias (Mazeaud *et al.* 1977).

Apesar do estresse no cultivo intensivo ser proveniente de várias fontes, muitas delas podem ser manipuladas para melhorar a saúde e as condições fisiológicas dos peixes. Dentre os fatores que afetam a sobrevivência dos peixes após o estresse de captura, confinamento, pesagem, carregamento, transporte e descarregamento, estão: espécie, qualidade da água nos tanques de produção

(temperatura, CO₂, oxigênio dissolvido, amônia), estado nutricional dos peixes, existência de alguma doença, estratégia de despesca e transporte e intensidade e duração do estresse (Moyle & Cech, 1998).

A espécie em estudo, piava, *Leporinus obtusidens* Valenciennes (1847), pertence à família Anostomidae e pode ser encontrada principalmente nas Bacias do São Francisco, Paraná (Garavello, 1979) e do Uruguai (Zaniboni Filho & Schulz, 2003). No baixo Rio Uruguai esta é uma espécie de elevada importância comercial e recreativa. É uma espécie onívora, pois entre os principais itens alimentares apresentam destaque as sementes, insetos aquáticos, crustáceos e moluscos (Zaniboni Filho *et al.*, 2002). A primeira maturação sexual ocorre, relativamente ao tamanho, com cerca de 20 cm de comprimento total. O período reprodutivo se concentra nos meses de dezembro e janeiro, apresentando desova total. Possuem migração reprodutiva e não desenvolvem cuidado parental (Vazzoler, 1996).

Dentre os diversos parâmetros físico-químicos da água, dois deles certamente têm grande importância para a sobrevivência e crescimento dos peixes: a amônia e o oxigênio dissolvido. A amônia pode ser originada de várias fontes que incluem efluentes de água de esgotos, descargas industriais, resíduos agrícolas e como um natural produto do catabolismo de proteínas dos peixes. Enxurradas de dejetos urbanos e da agricultura e muitos resíduos biológicos são geralmente liberados para rios e oceanos. Assim, a maior preocupação quanto à toxicidade da amônia é em relação ao ambiente aquático, particularmente em regiões com alta densidade populacional e/ou grande número de criadouros de animais como suínos e ovelhas. A amônia pode levar a uma diminuição da densidade populacional e até da biodiversidade (Barimo & Walsh, 2005). O desenvolvimento agrícola e industrial ocorrido nos últimos anos resultou no aumento de compostos poluentes lançados no ambiente aquático. O nitrogênio é um dos elementos mais importantes no metabolismo de ecossistemas aquáticos. Esta importância deve-se principalmente a sua participação na formação de proteínas, um dos compostos básicos da biomassa. Quando presente em baixas concentrações, pode atuar como fator limitante na produção primária de ecossistemas aquáticos. A chuva, o material orgânico e inorgânico de origem alóctone e a fixação biológica por bactérias e algas cianofíceas são as principais fontes naturais de nitrogênio que o ambiente aquático pode ter. A função fisiológica do nitrogênio é a formação de proteínas, ácidos nucléicos e coenzimas.

A principal fonte de compostos nitrogenados incorporados à água, na piscicultura intensiva, é a alimentação. No início das criações, quando a biomassa é menor, são observados baixos níveis de amônia – composto resultante do catabolismo das proteínas – que aumentam proporcionalmente à quantidade de alimento fornecido e ao aumento da biomassa (Pickering, 1993). No caso da criação de peixes carnívoros, esta situação pode ser agravada em virtude dos elevados níveis de proteína usados nas rações. A amônia na forma não-ionizada (NH_3) e em concentração excessiva pode prejudicar a transformação da energia alimentar em ATP, com isso inibindo o crescimento dos peixes e provocando a desaminação dos aminoácidos, o que, por sua vez, impossibilita a formação de proteínas, essencial no crescimento (Arana, 1997).

Os compostos nitrogenados aparecem sob três formas no ambiente aquático. O nitrato (NO_3^-) é a principal forma de nitrogênio encontrada nas águas e, quando em elevadas concentrações, pode conduzir a um processo de produção exagerada, denominado de eutrofização. A amônia pode ser tóxica em baixas concentrações como NH_3 , e menos tóxica aos peixes como forma ionizada (NH_4^+) (Tomasso, 1994). O nitrito (NO_2^-) é uma forma química do nitrogênio normalmente encontrada em quantidades diminutas nas águas superficiais, pois é instável na presença do oxigênio, ocorrendo como uma forma intermediária no processo de nitrificação, no qual a amônia é transformada (oxidada) por bactérias para nitrito, e logo para nitrato, em sistemas aquáticos. O íon nitrito pode ser utilizado pelas plantas como uma fonte de nitrogênio, e sua presença na água indica processos biológicos ativos influenciados por poluição orgânica (Pickering, 1993). Segundo Arana (1997), a amônia quando dissolvida na água encontra-se em equilíbrio entre NH_3 e NH_4^+ , sendo este equilíbrio influenciado pelo pH, temperatura e salinidade. Alterações destes parâmetros resultam na variação da concentração das diversas formas de nitrogênio, que podem atingir concentrações tóxicas para os peixes. A forma NH_3 difunde-se facilmente através das membranas respiratórias, causando danos ao epitélio branquial e, como conseqüência, dificulta as trocas gasosas entre o animal e a água, desestabilizando o sistema de osmorregulação. O nitrito em altas concentrações provoca a oxidação do átomo de ferro da molécula da hemoglobina do sangue, convertendo-a em meta-hemoglobina, molécula incapaz de transportar oxigênio, estabelecendo-se um quadro de hipóxia e cianose. Segundo Baldisserotto

(2002), muitos autores supõem que a principal causa de toxicidade do nitrito não é a hipóxia, e sim o efeito hepatotóxico do nitrito.

No caso da NH_3 , existem dados sobre concentração letal (50% de mortes) para várias espécies. Por exemplo, a concentração letal de NH_3 (48 h) para *Lophosilurus alexandri* (pacamã) é de $1,09 \text{ mg L}^{-1}$ para larvas e $0,92 \text{ mg L}^{-1}$ para alevinos (Cardoso, 1993), e para alevinos de “guadalupe bass” (*Micropterus treculi*) (96 h) é de $0,56 \text{ mg L}^{-1}$ (Tomasso & Carmichael, 1986). Alguns autores mencionam que a partir deste dado é possível calcular a concentração “segura” para o crescimento da espécie, ou seja, qual o nível máximo de amônia que pode existir na água sem alterar o crescimento. O valor seguro seria em torno de 10% da concentração letal. Contudo, trabalhos recentes indicam que não há uma relação constante entre concentração letal e a concentração segura para crescimento. Ela varia de espécie para espécie, podendo ser em torno de 3% da concentração letal para *Ictalurus punctatus* e 12% para *Pimephales promelas* (Tomasso, 1994). Concentrações subletais de amônia reduzem o crescimento porque podem causar modificações fisiológicas e histológicas nos rins, fígado, baço, tecidos tireóides e sangue (Wood, 2001).

Existem registros de espécies de peixes que toleram altos níveis de amônia na água como *Opsanus beta*, *Opsanus tau* e *Porichthys notatus*, todos da família Batrachoididae (Wang & Walsh, 2000). Essa tolerância pode estar associada a diversas adaptações ou estratégias desenvolvidas pelos peixes ao longo de sua evolução, como o fato de minimizarem a ação da amônia produzindo compostos derivados como a uréia em *Clarias batrachus* (Saha *et al.*, 2002), ou glutamina, em *Oncorhynchus mykiss* (Wicks & Randall, 2002).

A amônia é a principal excreta do peixe e de muitos organismos aquáticos. O balanço entre sua produção e excreção pode ser quebrado por vários fatores endógenos e exógenos, como por exemplo, o aumento dos níveis de NH_3 na água (Wood, 1993). Como resultado, ocorre aumento dos níveis de amônia no sangue e conseqüente autointoxicação por esta (Svobodová *et al.*, 1986). A maior parte da amônia é produzida no fígado do peixe e então transportada pelo sistema sangüíneo até as brânquias para excreção. Uma parte da amônia é também produzida pelas brânquias, rins e músculos. A produção no tecido muscular é maior quando o peixe é exposto ao estresse (Jobling 1994). Neste último caso, ocorre elevação dos níveis internos de amônia. Muitas membranas biológicas são permeáveis para a amônia,

mas relativamente impermeáveis para os íons amônio. A toxicidade, expressada pela amônia total (a soma de NH_3 e NH_4^+) no ambiente, aumenta com o pH da água, pois a amônia entra nos organismos como NH_3 , e a proporção de NH_3 aumenta com o pH da água (Randall & Tsui, 2002). As brânquias, sempre expostas ao ambiente, estão envolvidas em muitas funções fisiológicas (respiração, regulação ácido-base, trocas de íons), e são também o meio de excreção de nitrogênio no peixe. Frequentemente, o estresse pode causar distúrbios osmorregulatórios, como a elevação dos níveis iônicos plasmáticos e do cortisol. A exposição a altos níveis de amônia pode ser considerada como causa de estresse em diferentes espécies de peixes.

O oxigênio é uma das variáveis ambientais mais importantes que afetam a biologia dos peixes, bem como a sua distribuição no habitat. Fatores bióticos e abióticos podem levar à hipóxia aquática e as respostas fisiológicas dos peixes tem sido extensivamente estudadas. A concentração de oxigênio dissolvido na água depende da quantidade de matéria orgânica presente e da temperatura. A respiração de animais e plantas também interfere, pois quanto maior a quantidade de animais no ambiente, maior o consumo de oxigênio. As plantas consomem oxigênio durante o dia e à noite, mas à noite o consumo é maior, e não há nenhuma atividade fotossintetizante. Portanto, durante o dia, graças à fotossíntese, há um aumento da quantidade de oxigênio dissolvido na água. Quando a noite inicia, a fotossíntese é interrompida e os níveis de oxigênio dissolvido começam a cair (Rantin & Marins, 1984). Os níveis de oxigênio ao redor de $5\text{-}6 \text{ mg L}^{-1}$ são requeridos para a maioria dos peixes, quando está abaixo de 3 mg L^{-1} , a situação é muito estressante para muitos peixes, e níveis inferiores a 1 mg L^{-1} são geralmente letais. Em jundiás houve mortalidade de 70%, 43%, 6,6% e 0%, com 96h de exposição a 0,40, 0,76, 1,04 e $1,68 \text{ mg L}^{-1}$ de oxigênio dissolvido, respectivamente (Braun *et al.*, 2006). *Leiostomus xanthurus* e *Prochilodus lineatus* apresentaram 100% de mortalidade após 3-4h de exposição para 0,8 e 0,3-0,5 mg L^{-1} de oxigênio dissolvido, respectivamente (Cooper *et al.*, 2002).

Os animais de respiração aquática estão mais sujeitos a uma variação do oxigênio dissolvido, pois a quantidade existente na água é pequena. Uma redução na pressão parcial de oxigênio na água leva o peixe a uma situação de hipóxia. Esta situação ocorre com mais freqüência em ambientes com pouca circulação de água, como lagos e tanques de cultivo com pouca renovação de água. Esta diminuição da

quantidade de oxigênio dissolvido pode ser temporária ou permanente, dependendo das condições ambientais, tais como: presença de matéria orgânica, respiração de animais e plantas, aumento da temperatura (Baldisserotto, 2002).

O consumo de oxigênio é maior em peixes bem alimentados. Quando diminui a quantidade de oxigênio dissolvido na água, a ingestão de alimento diminui, pois a quantidade disponível não seria suficiente para suprir um peixe bem alimentado. Experimentos com juvenis de piapara (*Leporinus elongatus*) submetidos a diferentes níveis de oxigênio dissolvido por 30 dias demonstraram que com mais de 5,2 mg O₂ /L o consumo e o ganho de peso independem deste fator. Abaixo de 4,2 mg O₂ /L o consumo de ração diminui. Conseqüentemente, o crescimento é reduzido (Meurer *et al.*, 1998).

A diminuição da pressão parcial do oxigênio na água é detectada por receptores branquiais. A primeira opção do peixe é mudar de ambiente, procurando ambientes com maior pressão parcial de oxigênio. Caso não seja possível, ele aumenta a ventilação branquial para uma maior captação de oxigênio da água. Porém, acarreta numa perda de íons do peixe para o meio. Quando expostos à hipóxia severa, alguns peixes utilizam a via anaeróbia como rota metabólica. O glicogênio hepático e muscular é convertido em glicose, que é utilizada na produção de energia, resultando na formação de ácido láctico. A hipóxia crônica provoca inúmeras mudanças fisiológicas que ajudam os peixes a manter o metabolismo durante longos períodos de baixas concentrações de O₂ (Baldisserotto, 2002).

Como exemplo de alterações fisiológicas, o fígado, órgão que utiliza, produz e armazena glicose, tem a maior parte da glicose intracelular em hepatócitos armazenada em forma de glicogênio em teleósteos (Moon & Foster, 1995). Segundo Jobling (1994), a energia extra que um peixe precisa para um movimento rápido deriva do metabolismo anaeróbico do glicogênio do músculo, com a formação de lactato. Durante um exercício exaustivo, há uma rápida diminuição de ATP, fosfato creatina e reservas de glicogênio no músculo, e com o processo da glicólise anaeróbica ocorre grande acúmulo de lactato no músculo branco. Em mamíferos, há liberação de lactato para a corrente sangüínea durante um “árduo” exercício, e após ele é reconvertido em glicogênio via Ciclo de Cori. Isto implica na transformação do lactato circulante no fígado, onde uma pequena proporção é metabolizada para estimular a conversão da maior parte de lactato em glicose, que é então transportada para o músculo a fim de restabelecer os níveis de glicogênio. Nos

peixes existe a liberação de lactato para o sangue durante o exercício exaustivo, porém a maior parte é retida no músculo branco, e o ciclo de Cori desempenha um papel secundário na reconversão durante a recuperação do peixe após o exercício. A quantidade de lactato produzido durante um “árido” exercício parece, portanto, ser metabolizada no músculo, tanto como um substrato da respiração resultando em produção de ATP, como para a regeneração de estoques de glicogênio.

O estresse causado por problemas de baixos níveis de oxigênio na água resulta em um aumento da perda de vários íons em peixes de água doce. Em truta arco-íris, por exemplo, imediatamente após uma situação de hipóxia, ocorre um aumento na excreção de urina, com um aumento na concentração de ácido láctico, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Cl^- e PO_4 na urina (Hunn, 1969). E esta manifestação deve ocorrer em combinação ao aumento da eliminação de glucocorticóides e pode possivelmente ser compensado pelo aumento destes íons via brânquias.

A concentração de oxigênio dissolvido é um dos mais importantes fatores da qualidade da água, afetando diretamente os peixes e demais organismos aquáticos em seus ambientes naturais, bem como os cultivados em laboratórios ou criadouros. Altos níveis de amônia são muito comuns em ambientes de cultivo intensivo e em locais poluídos, de modo que o conhecimento da fisiologia desta espécie frente às variações destes parâmetros favorecerá o cultivo da espécie *Leporinus obtusidens* e uma melhor compreensão de sua biologia no ambiente natural.

Os efeitos ocasionados por fatores de estresse ambiental e/ou substâncias xenobióticas em peixes podem ser avaliados por diversas metodologias, dentre elas estão a avaliação da atividade de enzimas e parâmetros metabólicos intermediários, além de avaliações sobre íons plasmáticos.

OBJETIVO GERAL

Verificar o efeito da amônia e do oxigênio dissolvido na sobrevivência e nos parâmetros metabólicos e íons plasmáticos em piava, *Leporinus obtusidens*, em curto período de exposição (96 h).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos das concentrações de amônia não ionizada e oxigênio dissolvido na sobrevivência;
- Avaliar os efeitos das concentrações de amônia não ionizada e oxigênio dissolvido em parâmetros metabólicos (lactato, açúcares redutores solúveis, proteína e glicogênio);
- Avaliar os efeitos das concentrações de amônia não ionizada e oxigênio dissolvido nos níveis iônicos plasmáticos;
- Avaliar os efeitos das concentrações de amônia não ionizada e oxigênio dissolvido na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias e no rim;

Artigo 1

PARÂMETROS METABÓLICOS E ÍONS PLASMÁTICOS DE PIAVAS *Leporinus obtusidens* EXPOSTAS A DIFERENTES NÍVEIS DE AMÔNIA

K.C.S Bolner, F.L. Rosso, J. Radünz Neto e B. Baldisserotto

RESUMO

Juvenis de piava (7-13 cm; 25-30 g) foram expostas a diferentes concentrações de NH_3 (em mg L^{-1}): 0,003 (controle); 0,1; 0,4; 0,7; 1,4 por 4 dias (96h). Decorrido o período experimental, o sangue foi coletado para a determinação dos níveis plasmáticos de Na^+ , K^+ , Cl^- e NH_4^+ . Em seguida foram retiradas amostras de tecidos (fígado, rim, brânquias e músculo esquelético), para as análises de metabólicos e enzimas. A sobrevivência da piava na concentração de 0,1 mg L^{-1} NH_3 na água foi 100%, em 0,4 mg L^{-1} NH_3 foi de 20% após 96h de experimento. Nos níveis de 0,7 e 1,4 mg L^{-1} NH_3 , após 72 e 42h, respectivamente, houve mortalidade total. O valor da $\text{CL}_{50-96\text{h}}$ para a piava foi de 0,27 (0,21 - 0,34) mg L^{-1} NH_3 . As concentrações plasmáticas de Na^+ e NH_4^+ aumentaram com a crescente concentração de NH_3 na água, já o K^+ diminuiu e o Cl^- manteve-se estável. A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias aumentou com a elevação da concentração de NH_3 na água, enquanto que no rim houve redução da atividade. Os níveis de glicose no fígado e músculo reduziram proporcionalmente com o aumento da concentração de NH_3 . Os níveis de lactato aumentaram significativamente em todos os tecidos com o aumento da NH_3 . Os níveis de NH_4^+ nos tecidos tiveram correlação positiva em relação à concentração de NH_3 na água. Portanto, o experimento confirmou que a amônia é um agente estressor para o peixe, inclusive em baixas concentrações. Os efeitos observados nas mudanças comportamentais da piava foram similares em outros peixes, e são associados com atuações erráticas e com aumento no consumo do oxigênio. Como resultado final, há acumulação de amônia no plasma e em outros tecidos.

INTRODUÇÃO

A amônia pode ser originada de várias fontes que incluem efluentes de água de esgotos, descargas industriais, resíduos agrícolas e como um natural produto do catabolismo de proteínas dos peixes. Níveis elevados de amônia no ambiente podem prejudicar sua excreção pelo peixe. O resultado final é uma elevação dos níveis de amônia no corpo, levando à convulsões e morte. Muitas espécies de peixes não toleram altos níveis de amônia, mas algumas são tolerantes e dispõem de algumas estratégias para evitar a toxicidade pela amônia. A manutenção da excreção e/ou conversão de amônia em outras substâncias menos tóxicas são algumas das estratégias adotadas (Randall & Tsui, 2002).

A toxicidade da amônia primariamente é atribuída à forma não-ionizada (NH_3), sendo a forma ionizada (NH_4^+) menos tóxica (Tomasso, 1994). No caso da NH_3 , existem dados sobre concentração letal (50% de mortes) para várias espécies. Por exemplo, a concentração letal de NH_3 (48 h) para *Lophiosilurus alexandri* (pacamã) é de $0,92 \text{ mg L}^{-1}$ para alevinos, e para alevinos de guadalupe bass (*Micropterus treculi*) (96 h) é de $0,56 \text{ mg L}^{-1}$ (Tomasso & Carmichael, 1986). Concentrações subletais de amônia reduzem o crescimento porque podem causar modificações fisiológicas histológicas nos rins, fígado, baço, tecidos tiróideos e sangue (Wood, 2001).

Em juvenis de “seabass” (*Dicentrarchus labrax*), “seabream” (*Spams aurata*) e “turbot” (*Scophthalmus maximus*) expostos a 6,43, 4,87 e 5,70 $\text{mg L}^{-1} \text{NH}_3$, respectivamente, houve aumento das concentrações de amônia no sangue, variando de 20-60 $\text{mg L}^{-1} \text{NH}_3$ nas três espécies (Ruyet *et al.*, 1995). “Seabass” expostos a $0,71 \pm 0,12$, $0,88 \pm 0,10$ e $0,90 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1} \text{NH}_3$ apresentaram uma relação positiva entre os níveis de amônia total no plasma e a amônia na água (Lemarié *et al.*, 2004). Juvenis de “turbot” expostos a $0,960 \text{ mg L}^{-1} \text{NH}_3$ tiveram os níveis plasmáticos de Na^+ , Cl^- , K^+ e NH_4^+ aumentados quando expostos a altas concentrações de amônia na água (Ruyet *et al.*, 1997). Em “turbot” expostos a $0,73 \text{ mg L}^{-1} \text{NH}_3$ por 28 dias, os níveis plasmáticos de Na^+ , Cl^- , K^+ e NH_4^+ aumentaram (Ruyet *et al.*, 2003).

Existem muitas controvérsias ainda quanto ao mecanismo de excreção de amônia via brânquias. Difusão passiva, atividade de ATPases e co-transportes têm sido propostos como meios importantes de excreção de amônia. Dos vários mecanismos para o seu transporte, a atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase tem sido

muito estudada. Perca prateada (*Bidyanus bidyanus*) e perca dourada (*Macquaria ambigua*) expostas a $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ por 5 dias tiveram a atividade branquial da Na^+ , K^+ -ATPase aumentada (Alam & Frankel, 2006).

A piava, *Leporinus obtusidens* Valenciennes (1847), pode ser encontrada principalmente nas Bacias do São Francisco, Paraná e do Uruguai. No baixo Rio Uruguai esta é uma espécie de elevada importância comercial e recreativa. É uma espécie onívora, pois entre os principais itens alimentares apresentam destaque as sementes, insetos aquáticos, crustáceos e moluscos (Zaniboni Filho & Schulz, 2003). Altos níveis de amônia são muito comuns em ambientes de cultivo intensivo e em locais poluídos, de modo que o conhecimento da fisiologia da piava frente às variações deste parâmetro favorecerá seu cultivo e uma melhor compreensão de sua biologia no ambiente natural. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar os efeitos de uma exposição aguda (96 h) a diferentes concentrações de amônia na sobrevivência, parâmetros metabólicos (lactato, açúcares redutores, proteína e glicogênio) no fígado rim e músculo, níveis iônicos plasmáticos e na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias e no rim, em piava.

METODOLOGIA

Juvenis de piava (7-13 cm; 25-30 g) foram coletados em viveiros de alevinagem de uma piscicultura da região de Teutônia (RS) (todos pertencentes a um mesmo lote) e transportados para o Laboratório de Fisiologia de Peixes da UFSM, onde permaneceram por uma semana em caixas plásticas de 250 litros, com aeração constante em sala aclimatizada com temperatura mantida em torno de 23°C , através de ar condicionado, antes dos experimentos. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial (Supra 42% de proteína bruta).

Após a aclimação, as piavas foram colocadas em caixas plásticas com capacidade de 40 litros. As caixas permaneceram com aeração constante e temperatura em torno de 23°C . Os animais foram distribuídos na proporção de 10 juvenis por caixa, onde permaneceram por 4 dias (96h) para os experimentos. Foram testadas as seguintes concentrações de NH_3 (em mg L^{-1}): 0,003 (controle); $0,1 \pm 0,06$; $0,4 \pm 0,11$; $0,7 \pm 0,13$; $1,4 \pm 0,19$. A concentração da NH_3 foi controlada

com a adição de NH_4Cl quando necessário. Para cada concentração de NH_3 foram feitos testes em triplicata.

A limpeza das caixas foi feita por sifonagem para retirada de resíduos (fezes). A água retirada foi substituída por outra nas mesmas condições do início de cada experimento. Houve uma renovação diária de 20-40% da água das caixas. Durante o experimento não foi fornecido alimento aos indivíduos e a cada 2 horas as caixas foram revisadas para contabilizar a sobrevivência.

Decorrido o período experimental os animais sobreviventes foram colocados em recipiente contendo água e gelo por 5 minutos a fim de anestesiá-los, após este período o sangue foi coletado da veia caudal com seringas heparinizadas. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 5 min para obtenção do plasma (determinação dos níveis de Na^+ e K^+). Em seguida foram retiradas amostras de tecidos (fígado, rim, brânquias e músculo esquelético), e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para as análises de metabólicos e enzimas.

Os intermediários metabólicos foram dosados conforme as metodologias a seguir: lactato (Harrower & Brown, 1972), açúcares redutores (Dubois *et al.*, 1956), proteína (Lowry *et al.*, 1951), glicogênio (Bidinotto *et al.*, 1998); amônia total (Verdouw *et al.*, 1978), no fígado rim e músculo. A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias e rim foi realizada de acordo com Flik *et al.* (1983). Os níveis de Na^+ e K^+ foram verificados com um fotômetro de chama Micronal B262, Cl^- pela metodologia de Zall *et al.* (1956).

As medidas da temperatura e do oxigênio dissolvido na água foram efetuadas a cada 2 h com um oxímetro YSI, modelo Y5512. O pH foi medido e mantido em 7,0-7,5 utilizando-se um pHmetro BNC, Oakton. Amostras de água foram coletadas a cada 2 h e congeladas para posterior análise de amônia total pelo método baseado na formação do indofenol (Verdouw *et al.*, 1978). No início do experimento a alcalinidade total e a dureza da água foram determinadas através de titulometria segundo Greenberg *et al.* (2005). No momento de coleta de água para determinações dos parâmetros físico-químicos da mesma, foi observado o comportamento das piavas (natação e equilíbrio normal ou alterados).

Para os cálculos de regressão (níveis de NH_3 na água X parâmetros determinados) foi utilizado o programa SigmaPlot 8.0. Nos casos que a regressão não foi significativa para algum parâmetro, as diferenças entre as médias dos

tratamentos foram verificadas por análise de variância de um fator e teste de Tukey, através do programa Statistica (versão 5.1, 1997). O nível mínimo de significância foi de 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

A sobrevivência da piava na concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ na água foi 100%, em $0,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ foi de 20% após 96h de experimento. Nos níveis de $0,7$ e $1,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$, após 72 e 42h, respectivamente, houve mortalidade total (Figura 1). O valor da CL_{50-96h} para a piava foi de $0,27$ ($0,21 - 0,34$) $\text{mg L}^{-1} \text{ NH}_3$. Nos níveis que houveram mortalidade, esta foi precedida por alterações comportamentais dos peixes como o desequilíbrio, natação com o abdômen para cima, hiper-atividade seguida por constantes choques nas paredes do aquário e convulsões.

As concentrações plasmáticas de Na^+ e NH_4^+ aumentaram com a crescente concentração de NH_3 na água, já o K^+ diminuiu e o Cl^- manteve-se estável (Figura 2). A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias aumentou com a elevação da concentração de NH_3 na água, enquanto que no rim houve redução da atividade (Figura 3).

Os níveis de glicose no fígado e músculo reduziram proporcionalmente com o aumento da concentração de NH_3 . No rim, houve uma redução significativa nos peixes expostos a $0,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ ou níveis mais elevados, em relação ao controle (Figura 4). O glicogênio reduziu no fígado e rim com o aumento da NH_3 , no músculo os níveis foram significativamente menores nas concentrações de $0,7$ e $1,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ se comparados aos outros níveis (Figura 5). Os níveis de lactato aumentaram significativamente em todos os tecidos com o aumento da NH_3 (Figura 6). A proteína diminuiu no fígado e rim com a elevação da concentração de NH_3 na água, e no músculo os níveis foram significativamente maiores nas piavas expostas a todos os níveis de NH_3 com relação ao controle (Figura 7). Os níveis de NH_3 nos tecidos tiveram correlação positiva em relação à concentração de NH_3 na água (Figura 8).

DISCUSSÃO

A exposição da piava a níveis acima de $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ causou mortalidade, sendo precedida por alterações comportamentais como: desequilíbrio, natação com

o abdômen para cima, hiper-atividade seguida por constantes choques nas paredes do aquário e convulsões. O mesmo foi descrito para juvenis de “seabass”, “seabream” e “turbot” expostos a 6,43, 4,87 e 5,70 mg L⁻¹ NH₃ respectivamente (Ruyet, 1995). Em juvenis de salmão do Atlântico (*Salmo salar*) expostos por 48h a 0,30 ± 0,13 e 0,68 ± 0,25 mg L⁻¹ NH₃ houve mortalidade de 40 e 100% respectivamente. Neste mesmo experimento, peixes expostos aos níveis mais altos os peixes moribundos mostraram características comportamentais indicando os efeitos tóxicos no sistema nervoso, e após algumas horas houve a morte. Também foram observadas convulsões, natação em espiral e colisões violentas com a parede do aquário (Knoph, 1996). Estes comportamentos descritos para a toxicidade aguda de amônia indicam efeitos no sistema nervoso central. A princípio, há acumulação de amônia nos tecidos do peixe, prejudicando o metabolismo oxidativo do cérebro (Knoph, 1996). Walsh *et al.* (2007) relatam que exposição em concentrações subletais de amônia rompe o metabolismo cerebral de aminoácidos. Através de estudos com toadfish os mesmo autores revelaram que o metabolismo mitocondrial do cérebro foi severamente alterado por altas concentrações de amônia.

A piava mostrou-se muito sensível à amônia, havendo mortalidade a partir de 12h de exposição em concentrações acima de 0,4 mg L⁻¹ NH₃ (Figura 1), sendo a CL_{50-96h} de 0,27 (0,21 - 0,34) mg L⁻¹ NH₃. Em “seabass” expostos a 0,71 ± 0,12, 0,88 ± 0,10 e 0,90 ± 0,13 mg L⁻¹ NH₃ houve taxas de sobrevivência de 100, 70 e 76% respectivamente, após 96h de experimento (Dosdat *et al.*, 2003). Em juvenis de tilápia houve 100% de sobrevivência a 2,23 mg L⁻¹ NH₃ após 48h, e ocorrendo mortalidade apenas em níveis acima de 4,98 mg L⁻¹ NH₃, mostrando que esta espécie é extremamente resistente aos efeitos tóxicos da amônia (Benlí & Köksal, 2005).

A excreção de NH₃ é facilitada pelo fato de que, na camada de água estacionária (a água situada ao lado na membrana apical não é retirada imediatamente, de modo que se forma uma camada de água estacionária), junto à membrana apical das brânquias, o CO₂ (originário da respiração) eliminado é hidratado, resultando na formação de H⁺. Este H⁺ se combina com NH₃, formando NH₄⁺, mantendo o gradiente de NH₃ entre o sangue do peixe e o ambiente (Wilkie, 1997). No presente estudo, o aumento dos níveis de NH₃ na água pode ter provocado mudanças neste gradiente ocasionando mudanças nas concentrações iônicas no plasma da piava, como o aumento dos níveis de NH₃, com isso o sistema

de troca $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ localizado na membrana apical é alterado, pois há a necessidade de eliminar uma alta quantidade de NH_3 , e como consequência, há aumento dos níveis de Na^+ no epitélio branquial que é carregado para o plasma através da bomba Na^+ , K^+ -ATPase, localizada na membrana basolateral.

Assim, com a habilidade que o NH_4^+ tem de substituir o K^+ na bomba (Wilkie, 1997), esta trabalhará mais para retirar NH_4^+ do plasma, aumentando, portanto os níveis de Na^+ , como ocorreu na piava. A função da Na^+ , K^+ -ATPase é primariamente associada com o transporte do sódio, que também envolve a homeostase da amônia, assim podemos afirmar, de acordo com os resultados deste estudo, que a Na^+ , K^+ -ATPase também tem um papel muito importante na homeostase da amônia. A NH_4^+ pode também ser eliminada através de canais específicos de K^+ , substituindo-o (Wilkie, 1997). A diminuição da atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no rim da piava pode estar relacionada com a entrada do nitrito nas hemácias, provocando a oxidação do ferro e formando metahemoglobina, que não se liga ao oxigênio. Experimentos com perca prateada (*Bidyanus bidyanus*) e perca dourada (*Macquaria ambigua*) expostas a $5 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ por 5 dias, tiveram a atividade branquial da Na^+ , K^+ -ATPase aumentada de 7,4 para $12,4 \pm 0,8$ e de 3,1 para $6,2 \pm 0,8 \mu\text{mol Pi mg proteína}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Alam & Frankel, 2006).

Resultados similares quanto aos níveis iônicos no plasma e da Na^+ , K^+ -ATPase foram observados em outros estudos. Juvenis de “seabass”, “seabream” e “turbot” expostos a 6,43, 4,87 e $5,70 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$, respectivamente, tiveram aumento das concentrações de amônia no sangue, variando de 20-60 $\text{mg L}^{-1} \text{ NH}_4^+$ nas três espécies (Ruyet *et al.*, 1995). Outro trabalho com “seabass” expostos a $0,71 \pm 0,12$, $0,88 \pm 0,10$ e $0,90 \pm 0,13 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ tiveram correlação positiva dos níveis de amônia total no plasma com a amônia na água (Lemarié *et al.*, 2004). Juvenis de “turbot” expostos a $0,960 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ tiveram os níveis plasmáticos de Na^+ , Cl^- , K^+ e NH_4^+ aumentados quando expostos a altas concentrações de amônia na água (Ruyet *et al.*, 1997). Em “seabass” expostos a diferentes concentrações de NH_3 por 61 dias, tiveram uma pequena redução dos níveis plasmáticos de Na^+ e K^+ , porém houve um significativo aumento de Cl^- , e NH_4^+ (Dosdat *et al.*, 2003). Juvenis de salmão do Atlântico expostos por 72h a $0,023 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ apresentara níveis plasmáticos de Na^+ , Cl^- e NH_4^+ aumentados em relação ao controle (Knoph & Thorud, 1996), e em turbot expostos a $0,73 \text{ mg L}^{-1} \text{ NH}_3$ por 28 dias, os níveis plasmáticos de Na^+ , Cl^- , K^+ e NH_4^+ também aumentaram (Ruyet *et al.*, 2003).

Os níveis de glicose no fígado e músculo e glicogênio no fígado e rim de piava reduziram com o aumento da NH_3 na água. Segundo Jobling (1994), com a energia derivada do metabolismo anaeróbico do glicogênio do músculo, há formação de lactato ao fim do processo. Durante um exercício exaustivo, há uma rápida diminuição de ATP no músculo, fosfato de creatina e reservas de glicogênio, e com o processo da glicólise anaeróbica ocorre grande acúmulo de lactato no músculo branco. Por isso, no presente trabalho, deve ter havido utilização de uma via anaeróbia, o que levou ao aumento de lactato nos tecidos da piava com o aumento dos níveis de NH_3 na água. Randall & Tsui (2002) retrataram que o estresse da exposição à alta NH_3 na água resulta no aumento dos níveis de cortisol plasmático no peixe, estimulando a glicogênese e gliconeogênese, bem como o aumento do catabolismo de proteínas. Provavelmente este processo ocorreu na piava, resultando na diminuição dos níveis de proteína nos tecidos devido ao seu catabolismo.

Em aquacultura, a acumulação de amônia excretada pode levar ao declínio do crescimento, redução da alimentação e mudanças estruturais nas brânquias. A mais importante consequência de altas concentrações externas de amônia é o aumento desta no sangue. Em casos extremos, a toxicidade da amônia é caracterizada pela hiper-atividade, convulsões, coma e morte (Erdogan *et al.*, 2005). Na piava, as maiores mudanças fisiológicas foram observadas nos níveis plasmáticos de NH_4^+ , que foi positivamente relacionado com os níveis de amônia na água (indicando uma dose resposta), como visto em outras espécies também. Esta relação pode ser um indicador dos níveis de intoxicação da amônia.

O experimento confirmou que a amônia é um agente estressor para o peixe, inclusive em baixas concentrações. O efeito dela é imediato, linear e dose dependente. Os efeitos observados nas mudanças comportamentais da piava foram similares em outros peixes, e são associados com atuações erráticas e com aumento no consumo do oxigênio. Como resultado final, há acumulação de amônia no plasma e em outros tecidos, no qual muda o gradiente de pressão da NH_3 , refletindo em mudanças na permeabilidade e metabolismo do peixe (Montfort *et al.*, 2000; Barimo & Walsh, 2005).

REFERÊNCIAS

- Alam, M.; Frankel, T.L. (2006). Gill ATPase activities of silver perch, *Bidyanus bidyanus* (Mitchell), and golden perch, *Macquaria ambigua* (Richardson): effects of environmental salt and ammonia. *Aquaculture*, **251** (1): 118-133.
- Barimo, J.F.; Walsh, P.J. (2005). The effects of acute and chronic ammonia exposure during early life stages of the gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Aquatic Toxicology*, **75** (3): 225-237.
- Benli, A. C. K.; Köksal, G. (2005). The acute toxicity of ammonia on Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) larvae and fingerlings. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, **29** (2): 339-344.
- Bidinotto, P.M.; Moraes, G.; Souza, R.H.S. (1998). Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico CEPTA*, Pirassununga, **10**: 53-60, 1998.
- Dosdat, A.; Ruyet, J. P. -L.; Coves, D.; Dutto, G.; Gasset, E.; Le Roux, A.; Lemarie, G. (2003). Effect of chronic exposure to ammonia on growth, food utilisation and metabolism of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, **16** (6): 509-520.
- Duboie, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**: 350-358.
- Erdogan, O.; Hisar, O.; Koroglu, G.; Ciltas, A. (2005). Sublethal ammonia and urea concentrations inhibit rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **141** (2): 145-150.
- Flik, C.; Wendelaar Bong, S.E; Fenwick, J.C. (1983). Ca²⁺-dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes. I. Identification of Ca²⁺-activated ATPase activities with non-specific phosphatase activities. *Comp. Biochem. Physiol.* **76B**: 745-754.
- Greenberg, G.; Hasson, D.; Semiat, R. (2005). Limits of RO recovery imposed by calcium phosphate precipitation. *Desalination and the Environment*, **183**: 273-288.
- Harrover, J.R.; Brown, C.H. (1972). Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter sample. *Journal of Applied Physiology*, **32**: 224-228.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.

- Jobling, M. (1994). Ingestion, absorption and excretion. In: *Fish Bioenergetics*, London: CHAPMAN & HALL. pp. 109-119.
- Knoph, M. B. (1996). Gill ventilation frequency and mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) exposed to high ammonia levels in seawater. *Water Research*, **30 (4)**: 837-842.
- Knoph, M.B.; Thorud, K. (1996). Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in seawater - effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematologic parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **113 (4)**: 375-381.
- Lemarie, G.; Dosdat, A.; Coves, D.; Dutto, G.; Gasset, E.; Ruyet, J. P. -L. (2004). Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Aquaculture*, **229 (1)**: 479-491.
- Moon, T.W.; Foster, G.D. (1995). Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. (Eds). *Biochemistry and molecular biology of fish, Metabolic biochemistry*. Volume 4. Elsevier, New York, pp. 65-100.
- Montfort, P.; Montoliu, C.; Hermenegildo, C.; Munoz, M. D.; Felipo, V. (2000). Differential effects of acute and chronic hyperammoniemia on signal transduction pathways associated to NMDA receptors. *Neurochemistry International*, **37**: 249-253.
- Randall, D.J.; Tsui, T.K.N. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, **45**: 17-23.
- Ruyet, J. P. -L.; Chartois, H.; Quemener, L. (1995). Comparative acute ammonia toxicity in marine fish and plasma ammonia response. *Aquaculture*, **136 (1)**: 181-194.
- Ruyet, J. P. -L.; Lamers, J. A.; Le Roux, A.; Sévère, A.; Boeul, G.; Mayer-Gostan, N. (2003). Long-term ammonia exposure of turbot: effects on plasma parameters. *Journal of Fish Biology*, **62 (4)**: 879-894.
- Tomasso, J.R. (1994). Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. *Reviews in Fisheries Science*, **2 (4)**: 291-314.
- Tomasso, J.R.; Carmichael, G.J. (1986). Acute toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the Guadalupe bass, *Micropterus treculi*. *Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology*, **36**: 866-870.

- Verdouw, H.; Vanechteld, C.J.A.; Deckkers, E.M.J. (1978). Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*. **12**: 399-402.
- Walsh, P. J.; Veauvy, C. M.; McDonald, M. D.; Pamentor, M. E.; Buck, L.; Wilkie, M. P. (2007). Piscine insights into comparisons of anoxia tolerance, ammonia toxicity, stroke and hepatic encephalopathy. *Comparative Biochemistry and Physiology A* **147**: 332–343
- Wilkie, M.P. (1997). Mechanisms of ammonia excretion across fish gills - the active transport of chloride and the paracellular pathways. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **118 (1)**: 39-50.
- Wood, C.M. (2001). Toxic responses of the gill. In: Schlenk, D.; Benson, W.H. Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts. v.1. Organs. Taylor & Francis, London, p.1-89.
- Zall, D. M., Fisher, M. D.; Garner, Q. M. (1956). Photometric determination of chlorides in water. *Analytical Chemistry*, **28**: 1665-1678.
- Zaniboni-Filho, E.; Schulz, U.H. (2003). Migratory fishes of the Uruguay River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; BAER, A.; ROSS, C. Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status. Washington, DC, USA, p. 157-194.

Figuras

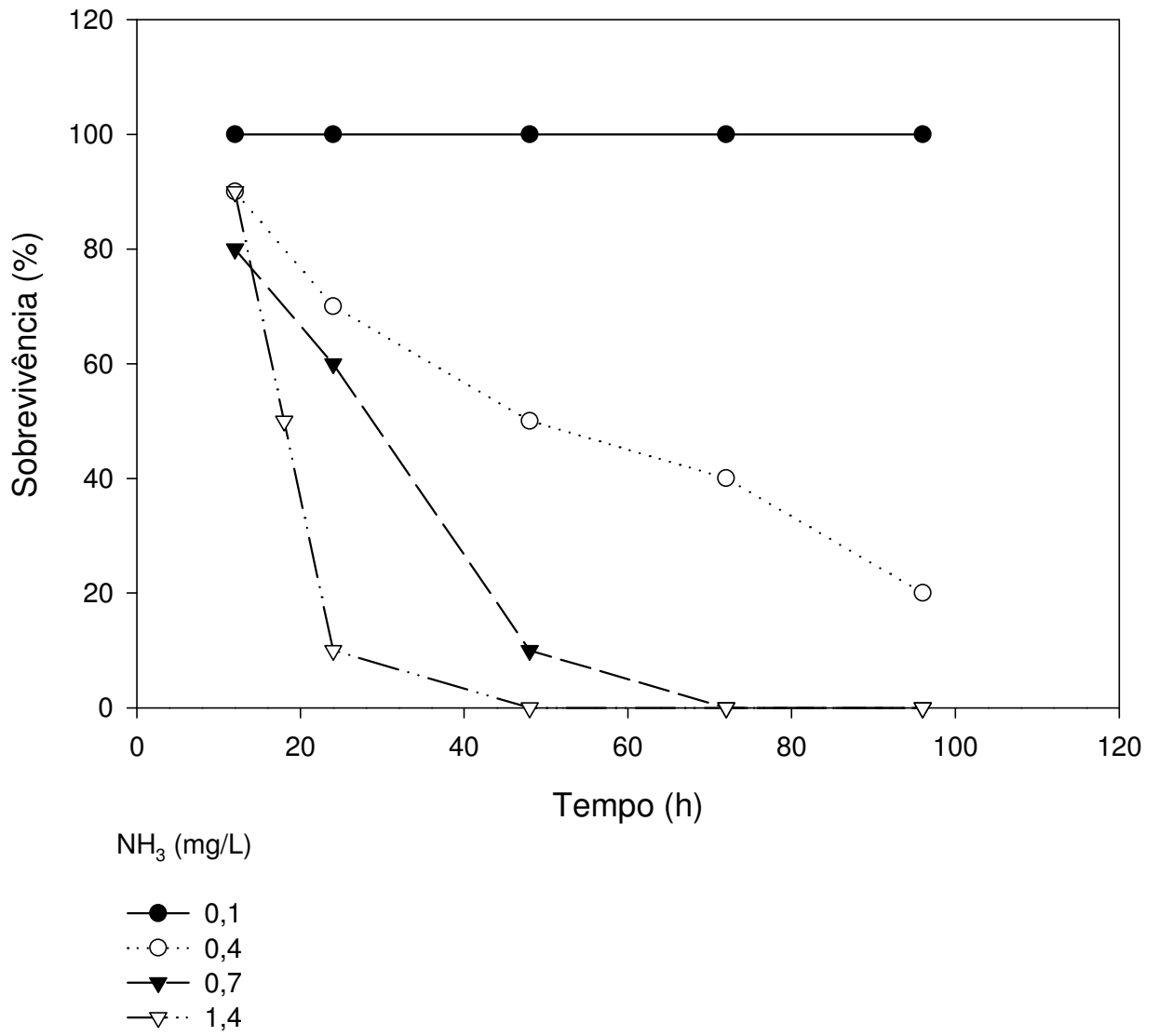


Figura 1: Taxa de sobrevivência da piava (Y), em diferentes níveis de NH_3 na água, em função do tempo (x).

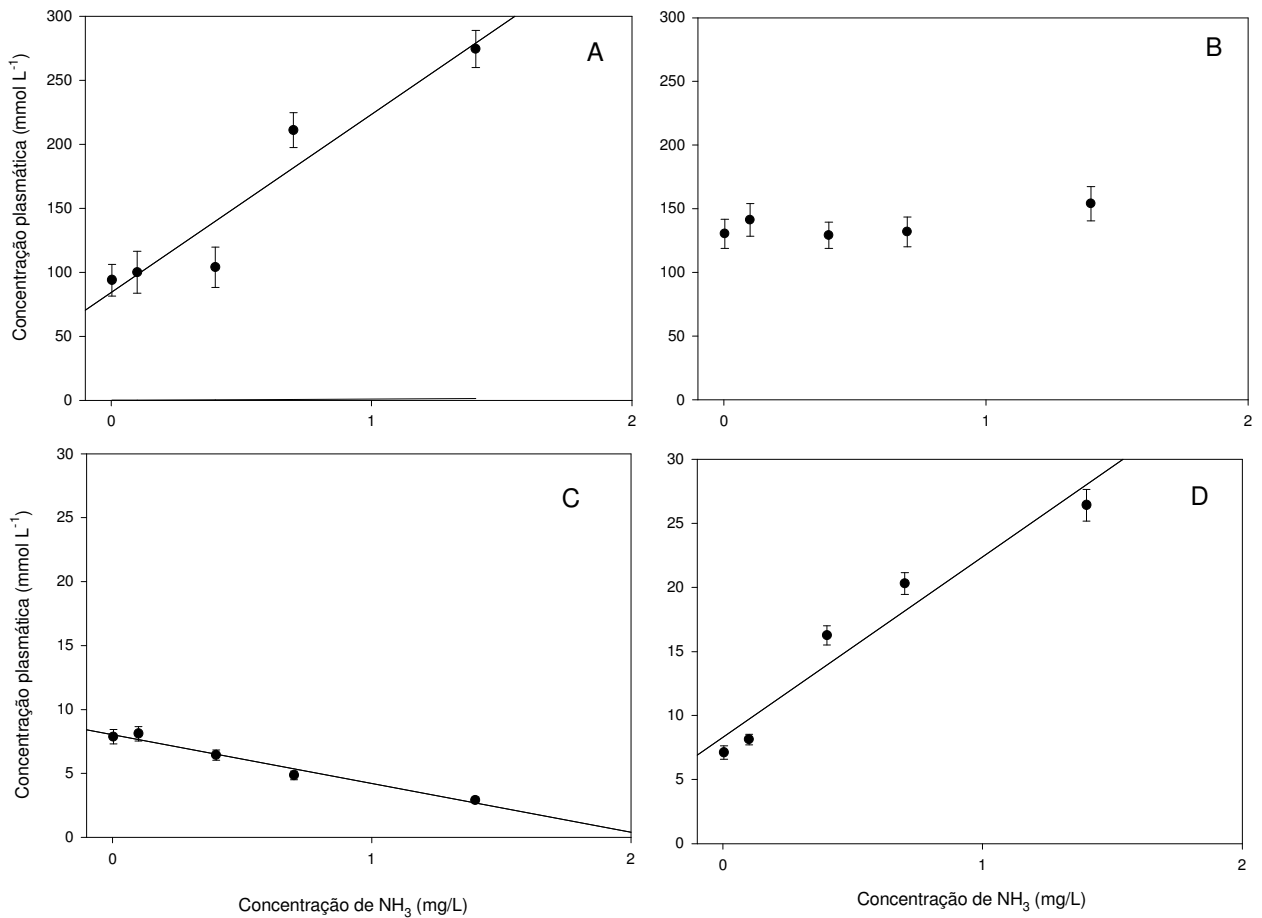


Figura 2: Concentração de íons no plasma (y) em função dos níveis de amônia (NH₃) na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Na⁺: $r^2 = 0,92$ $y = 84,17 + 139,14x$

B= Cl⁻: Sem relação e diferença significativa entre os peixes expostos a diferentes níveis de NH₃

C= K⁺: $r^2 = 0,97$ $y = 8,02 - 3,82x$

D= NH₄⁺: $r^2 = 0,94$ $y = 8,31 + 14,08x$

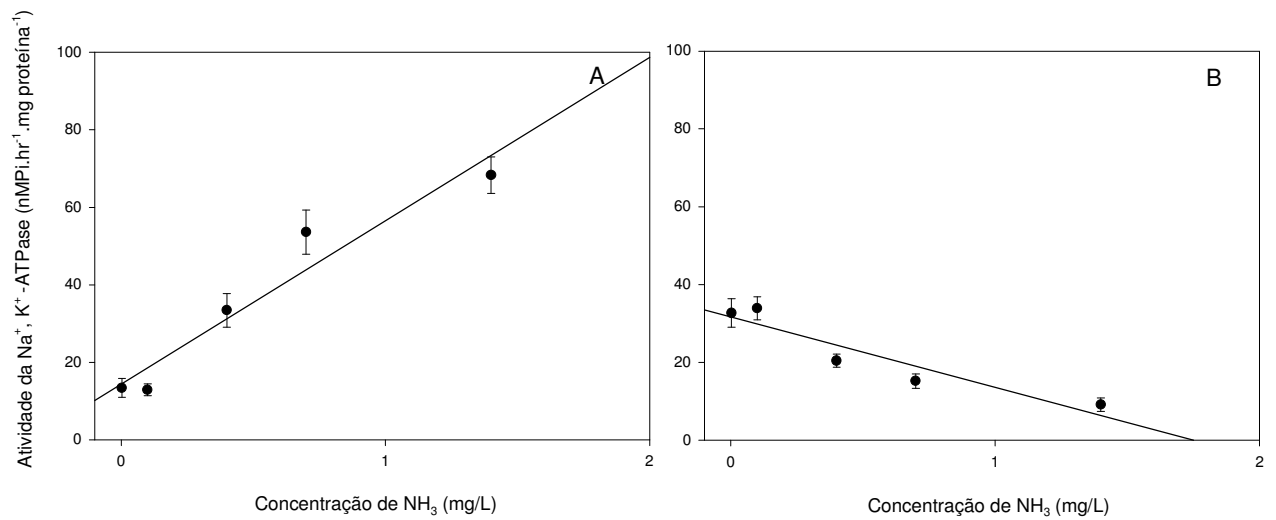


Figura 3: Atividade Na⁺, K⁺-ATPase nas brânquias e rim (y) em função dos níveis de amônia (NH₃) na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Brânquias: $r^2 = 0,93$ $y = 14,38 + 42,13x$

B= Rim: $r^2 = 0,88$ $y = 31,68 - 18,10x$

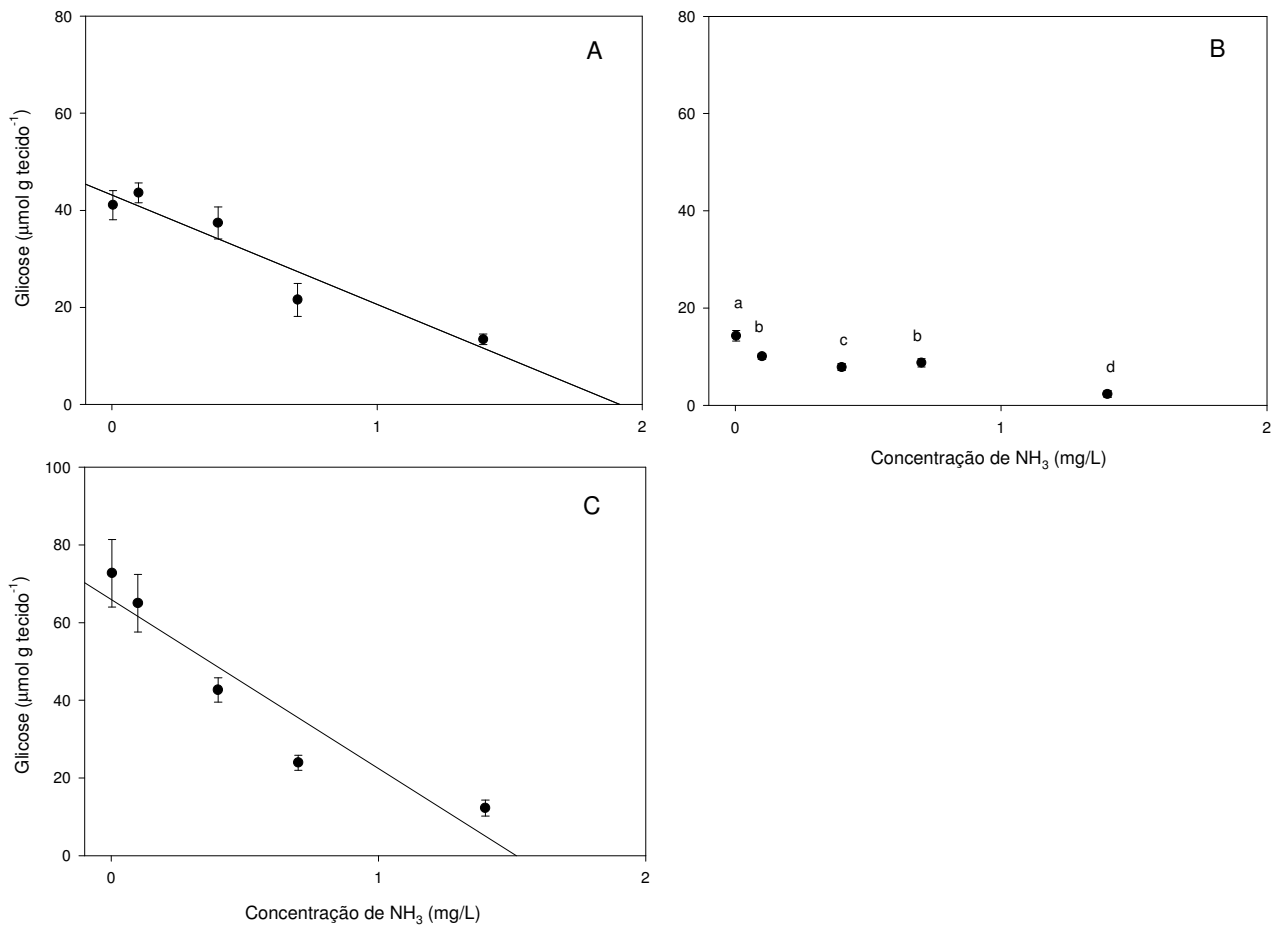


Figura 4: Níveis de glicose nos tecidos (y) em função da amônia (NH_3) na água (x).

As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2= 0,91$ $y= 43,11 - 22,49x$

B= Rim: sem relação significativa, e letras diferentes indicam diferença significativa entre os peixes expostos a diferentes níveis de NH_3 .

C= Músculo: $r^2= 0,89$ $y= 65,94 - 43,50x$

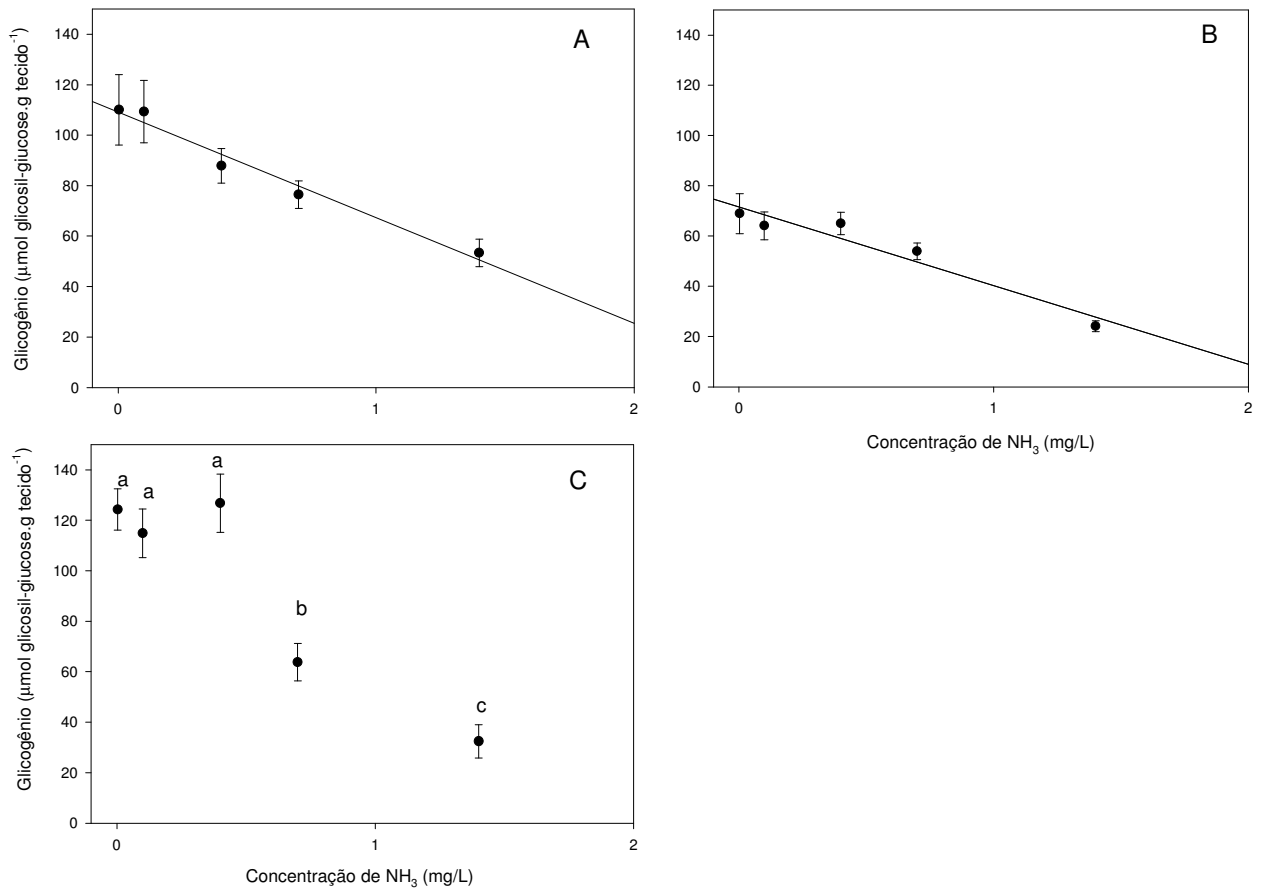


Figura 5: Níveis de glicogênio nos tecidos (y) em função da amônia (NH₃) na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2= 0,97$ $y= 109,19 - 41,85x$

B= Rim: $r^2= 0,93$ $y= 71,49 - 31,30x$

C= Músculo: sem relação significativa, e letras diferentes indicam diferença significativa entre os peixes expostos a diferentes níveis de NH₃.

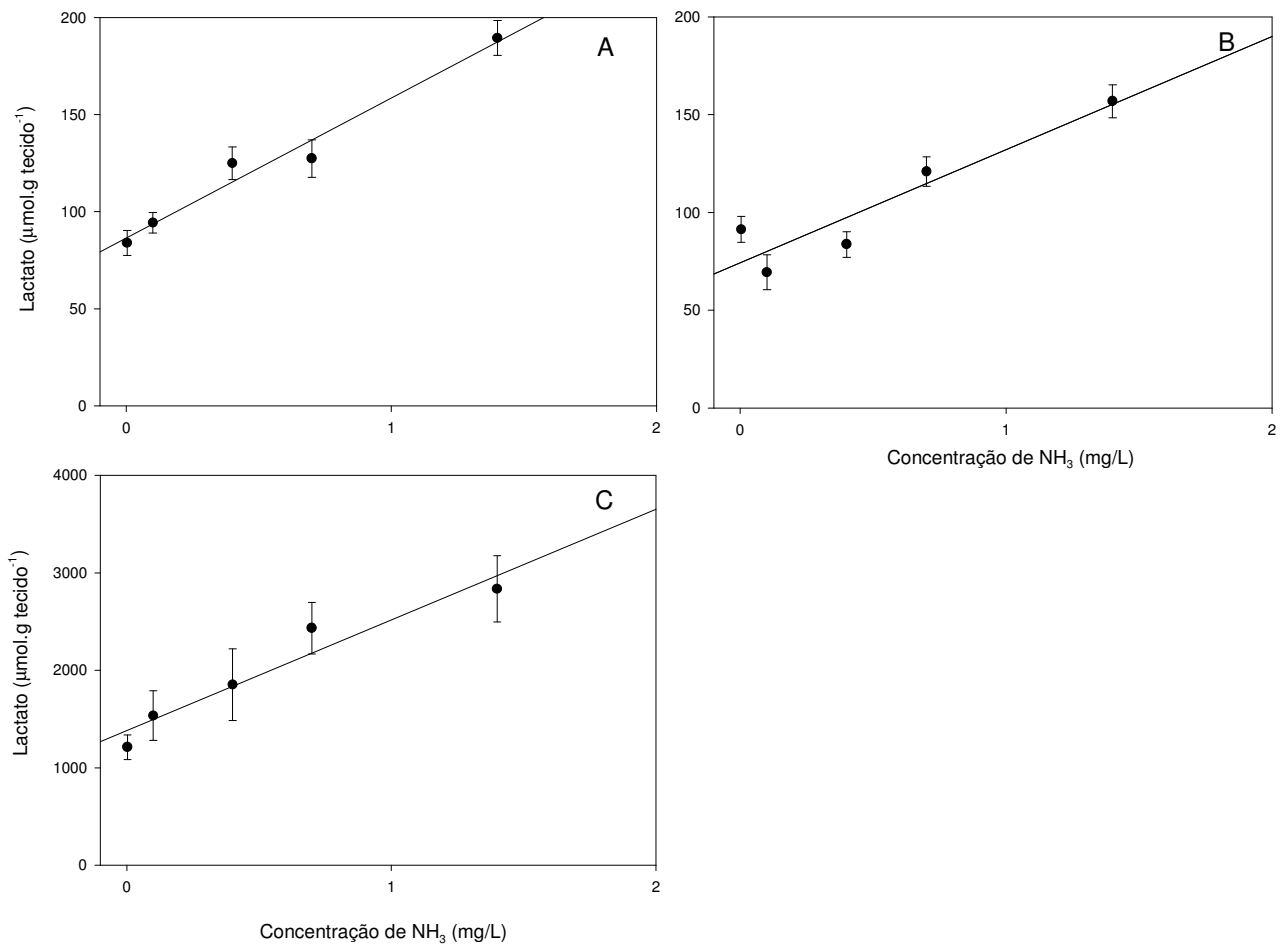


Figura 6: Níveis de lactato nos tecidos (y) em função da amônia (NH₃) na água (x).

As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2= 0,97$

$y= 86,41 + 72,13x$

B= Rim: $r^2= 0,87$

$y= 74,35 + 57,82x$

C= Músculo: $r^2= 0,93$

$y= 1382,24 + 1133,93x$

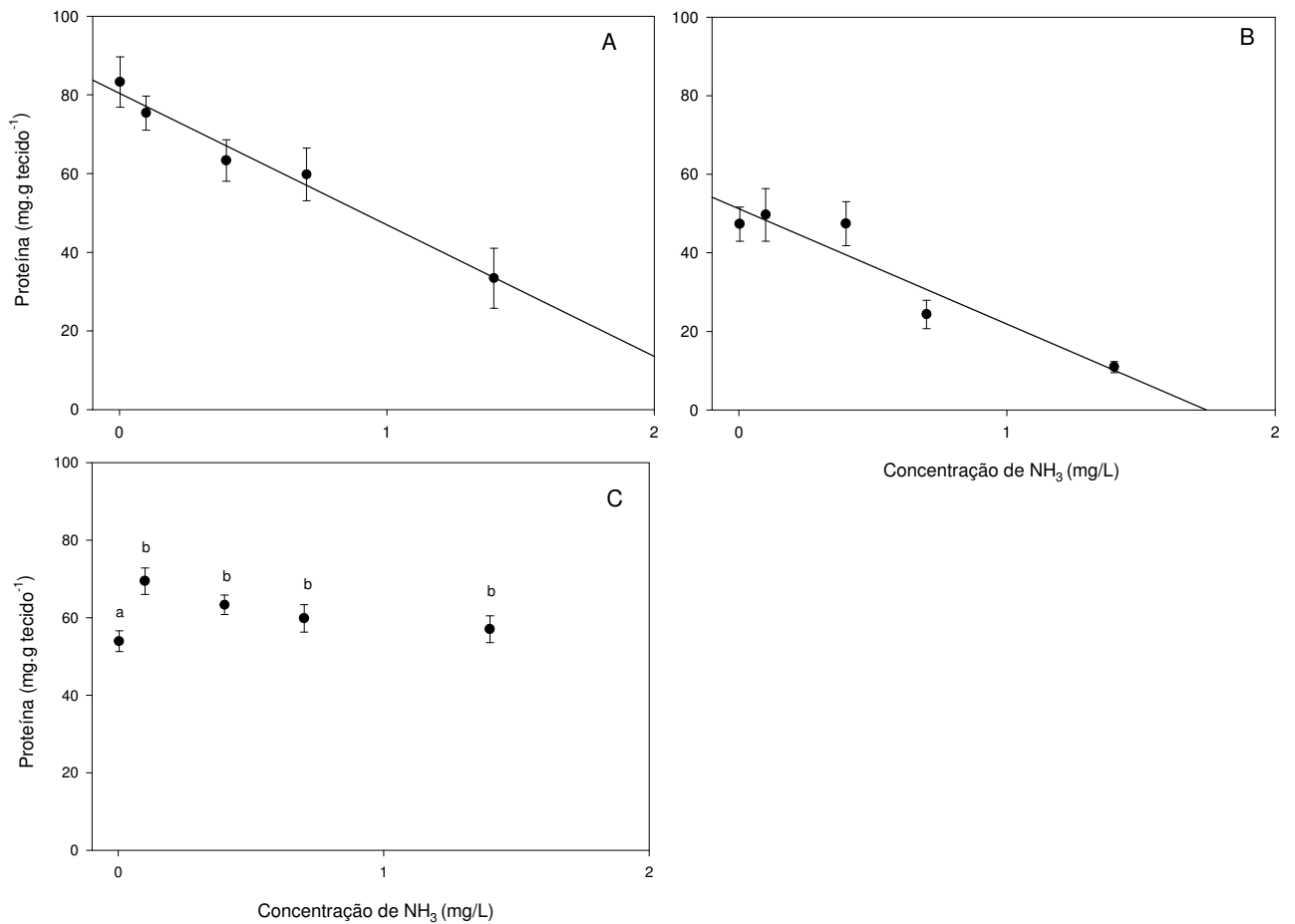


Figura 7: Níveis de proteína nos tecidos (y) em função da amônia (NH₃) na água (x).

As curvas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2 = 0,98$ $y = 80,48 - 33,49x$

B= Rim: $r^2 = 0,90$ $y = 51,19 - 29,34x$

C= Músculo: sem relação significativa, e letras diferentes indicam diferença significativa entre os peixes expostos a diferentes níveis de NH₃.

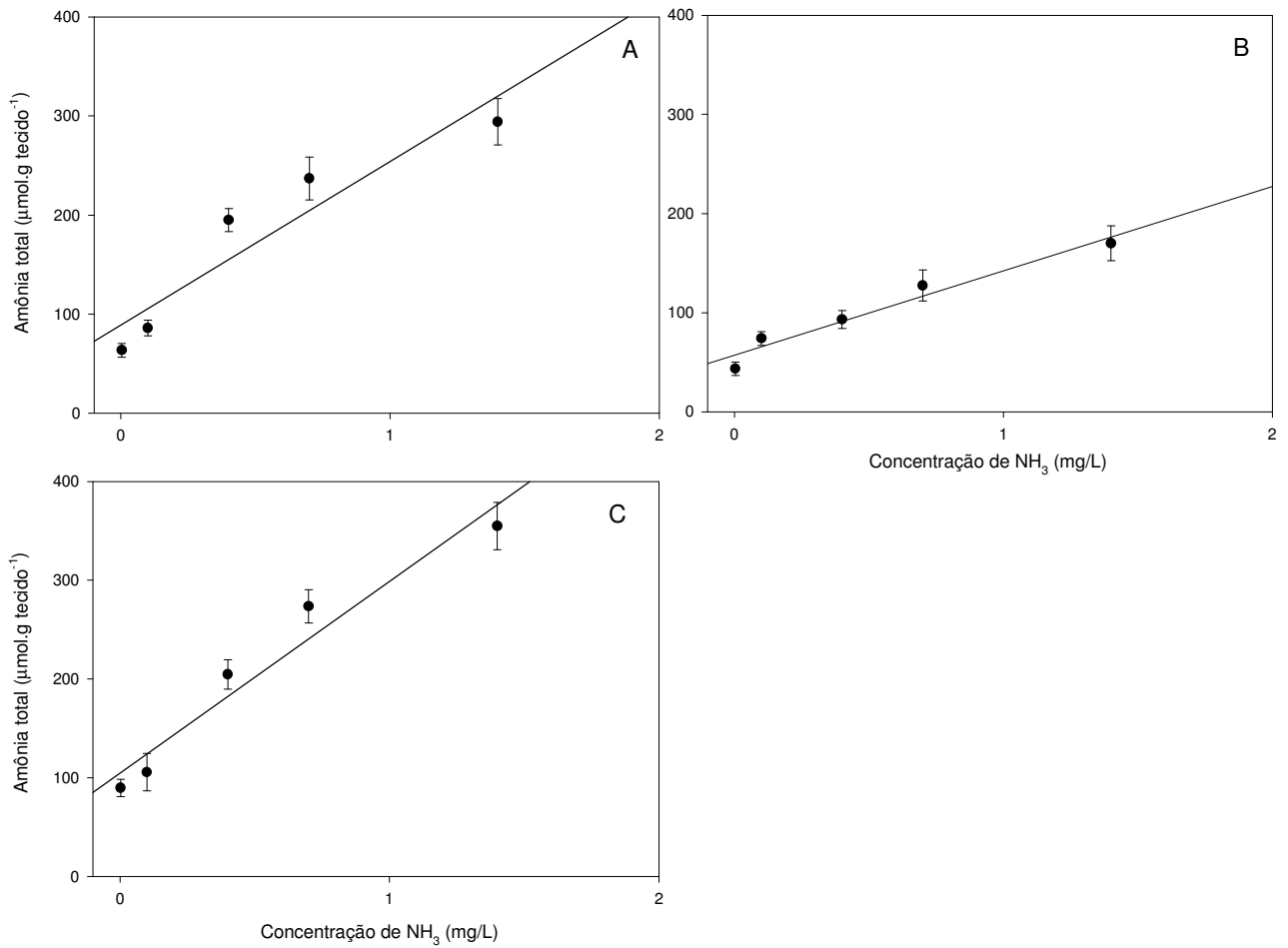


Figura 8: Amônia nos tecidos (y) em função da amônia (NH₃) na água (x). As curvas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2 = 0,89$

$y = 89,12 + 165,01x$

B= Rim: $r^2 = 0,96$

$y = 57,24 + 84,98x$

C= Músculo: $r^2 = 0,95$

$y = 104,58 + 194,23x$

Artigo 2

PARÂMETROS METABÓLICOS E ÍONS PLASMÁTICOS DE PIAVAS *Leporinus obtusidens* EXPOSTAS A DIFERENTES NÍVEIS DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO

K.C.S Bolner, F.L. Rosso, J. Radünz Neto e B. Baldisserotto

RESUMO

Juvenis de piava (7-13 cm; 25-30 g) foram expostos a diferentes níveis de oxigênio dissolvido na água: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 6,0 mgO₂/L, por 4 dias (96h). Decorrido o período experimental os animais foram anestesiados, após o sangue foi coletado da veia caudal para a determinação dos níveis plasmáticos de Na⁺, K⁺, Cl⁻ e NH₄⁺. Em seguida foram retiradas amostras de tecidos (fígado, rim, brânquias e músculo esquelético) para as análises de parâmetros metabólicos e enzimas. As concentrações plasmáticas de Na⁺, Cl⁻, K⁺ e NH₄⁺ diminuíram e a atividade da Na⁺, K⁺ -ATPase nas brânquias aumentou com a redução do oxigênio dissolvido na água. Os níveis de glicose no fígado, rim e músculo aumentaram de acordo com a redução do oxigênio dissolvido na água, mas os níveis de glicogênio reduziram. A concentração de amônia aumentou em todos os tecidos de acordo com a redução do oxigênio dissolvido na água. Assim, podemos afirmar que a hipóxia pode provocar mudanças morfológicas, fisiológicas e metabólicas para o peixe suportar tal estresse, tal como o aumento da ventilação branquial através da elevação da frequência respiratória, que leva a um aumento do fluxo de sangue nas brânquias para acentuar a troca de gás e conseqüente perda de íons. Na piava, podemos observar mudanças fisiológicas, tanto na osmorregulação como nos parâmetros metabólicos, após a exposição a diferentes níveis de oxigênio dissolvido.

INTRODUÇÃO

Baixos níveis de oxigênio dissolvido na água (hipóxia) podem ser estressores importantes, influenciando na fisiologia do peixe. A hipóxia provoca efeitos em diversos processos fisiológicos, reduzindo a alimentação, crescimento, taxa de conversão alimentar e aumentando a taxa de ventilação branquial (Wu, 2002). Alguns peixes desenvolvem mecanismos e estratégias comportamentais, morfológicos, fisiológicos e bioquímicos para sobreviver em ambientes hipóxicos. A hipóxia pode ser provocada pelo alto consumo de oxigênio pelos peixes e/ou outros organismos, decomposição de matéria orgânica, aumento da temperatura, entre outros. A hipóxia pode levar a um aumento da ventilação branquial através da elevação da frequência respiratória e por um aumento do volume corrente (ou seja, a amplitude da respiração é maior). O aumento da ventilação branquial é acompanhado por alterações hemodinâmicas para aumentar o fluxo de sangue nas brânquias para acentuar a troca de gás (Sundin, 1999).

Peixes expostos à hipóxia respondem com diferentes estratégias metabólicas e pelo aumento da capacidade de extração de oxigênio do meio. Estas estratégias implicam mudanças comportamentais, fisiológicas e níveis teciduais de metabólitos (Muusze *et al.* 1998). Em geral, os organismos dispõem de duas estratégias metabólicas iniciais quando expostos à hipóxia: uma redução total na taxa metabólica e uma mudança na via aeróbica com a contribuição da via anaeróbica no metabolismo total (Cooper *et al.* 2002).

Jundiás expostos à hipóxia ($1,96 \text{ mg L}^{-1}$) por 30 dias apresentaram baixos níveis de glicogênio no músculo (Braun *et al.*, 2006). No bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) os níveis de lactato hepático diminuíram e no músculo aumentaram em peixes expostos à hipóxia moderada ($\approx 3,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$) (Chabot & Dutil, 1999).

A concentração de oxigênio dissolvido é um dos mais importantes fatores da qualidade da água, afetando diretamente os peixes e demais organismos aquáticos em seus ambientes naturais, bem como os cultivados em laboratórios ou criadouros, de modo que o conhecimento da fisiologia da piava, *Leporinus obtusidens*, frente às variações deste parâmetro favorecerá o cultivo da espécie e uma melhor compreensão de sua biologia no ambiente natural. Portanto, o objetivo deste trabalho foi de avaliar os efeitos da exposição aguda (96 h) a diferentes

concentrações do oxigênio dissolvido na amônia e em parâmetros metabólicos (lactato, açúcares redutores, proteína e glicogênio) no fígado, rim e músculo, nos níveis iônicos plasmáticos e na atividade da enzima Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias e no rim de piava.

METODOLOGIA

Juvenis de piava (7-13 cm; 25-30 g) foram coletados em viveiros de alevinagem de uma piscicultura da região de Teutônia (RS) (todos pertencentes a um mesmo lote) e transportados para o Laboratório de Fisiologia de Peixes da UFSM, onde permaneceram por uma semana em caixas plásticas de 250 litros, com aeração constante em sala climatizada com temperatura mantida em torno de 23°C, através de ar condicionado, antes dos experimentos. Os peixes foram alimentados uma vez ao dia com ração comercial (Supra 42% de proteína bruta).

Após a aclimação, as piavas foram colocadas em caixas plásticas com capacidade de 40 litros. As caixas permaneceram com aeração constante e temperatura controlada em torno de 23°C. Os animais foram distribuídos na proporção de 10 juvenis por caixa, onde permaneceram por 4 dias (96h) para os experimentos. O controle dos níveis de oxigênio dissolvido foi feito através da aeração com ar ou nitrogênio, sendo que foram testadas as seguintes concentrações (com níveis de NH_3 o mais baixo possível): $1,0 \pm 0,35$; $2,0 \pm 0,58$; $3,0 \pm 0,48$; $4,0 \pm 0,57$ e $6,0 \pm 1,21$ mgO_2/L . Para cada concentração de O_2 dissolvido foram feitos testes em triplicata.

A limpeza das caixas foi feita por sifonagem para retirada de resíduos (fezes). A água retirada foi substituída por outra nas mesmas condições do início de cada experimento. Houve uma renovação diária de 20-40% da água das caixas. Durante o experimento não foi fornecido alimento aos indivíduos, e a cada 2 horas as caixas foram revisadas para contabilizar a sobrevivência.

Decorrido o período experimental os animais sobreviventes foram colocados em recipiente contendo água e gelo por 5 minutos a fim de anestesiá-los, após este período o sangue foi coletado da veia caudal com seringas heparinizadas. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 5 min para obtenção do plasma (determinação dos

níveis de Na^+ e K^+). Em seguida foram retiradas amostras de tecidos (fígado, rim, brânquias e músculo esquelético), imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para as análises de metabólicos e enzimas.

Os intermediários metabólicos foram dosados conforme as metodologias a seguir: lactato (Harrower & Brown, 1972), açúcares redutores (Dubois *et al.*, 1956), proteína (Lowry *et al.*, 1951), glicogênio (Bidinotto *et al.*, 1998); amônia total (Verdouw *et al.*, 1978), no fígado rim e músculo. A atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias e rim foi realizada de acordo com Flik *et al.* (1983). Os níveis de Na^+ e K^+ foram verificados com um fotômetro de chama Micronal B262, Cl^- pela metodologia de Zall *et al.* (1956).

As medidas da temperatura e do oxigênio dissolvido na água foram efetuadas a cada 2 h com um oxímetro YSI, modelo Y5512. O pH foi medido e mantido em 7,0-7,5 utilizando-se um pHmetro BNC, Oakton. Amostras de água foram coletadas a cada 2 h e congeladas para posterior análise de amônia total pelo método baseado na formação do indofenol (Verdouw *et al.*, 1978). No início do experimento a alcalinidade total e a dureza da água foram determinadas através de titulometria segundo Greenberg *et al.* (2005). No momento da coleta de água para determinação dos parâmetros físico-químicos da mesma, também foi observado o comportamento das piavas (natação e equilíbrio normal ou alterados).

Para os cálculos de regressão (níveis de oxigênio dissolvido X parâmetros determinados) foi utilizado o programa SigmaPlot 8.0. Nos casos que a regressão não foi significativa para algum parâmetro, as diferenças entre as médias dos tratamentos foram verificadas por análise de variância de um fator e teste de Tukey, através do programa Statistica (versão 5.1, 1997). O nível mínimo de significância foi de 95% ($P < 0,05$).

RESULTADOS

As concentrações plasmáticas de Na^+ , Cl^- , K^+ e NH_4^+ diminuíram e a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias aumentou com a redução do oxigênio dissolvido

na água, enquanto que a atividade da Na^+ , K^+ -ATPase no rim foi significativamente maior em níveis baixos de oxigênio dissolvido na água (Figuras 1 e 2).

Os níveis de glicose no fígado, rim e músculo aumentaram de acordo com a redução do oxigênio dissolvido na água (Figura 3), mas os níveis de glicogênio reduziram (Figura 4). Os níveis de lactato mantiveram-se estáveis no fígado, mas aumentaram no rim e músculo com a redução do oxigênio (Figura 5). A concentração de proteína no fígado, rim e músculo diminuiu com a redução do oxigênio dissolvido na água (Figura 6). Os níveis de amônia aumentaram em todos os tecidos (Figura 7).

DISCUSSÃO

Em bagre de canal (*Ictalurus punctatus*) 7 dias de aclimação em hipóxia moderada ($\approx 2,00 \text{ mg L}^{-1}$) causou um aumento na ventilação e frequência cardíaca (Burlison *et al.*, 2002). Esses mecanismos tentam manter a pressão parcial de oxigênio constante na cascata respiratória. O aumento da ventilação branquial aumenta o volume de água que passa nas brânquias, elevando a quantidade de oxigênio disponível para as trocas gasosas nas brânquias (Sakuragui *et al.*, 2003; Evans *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2006). Este aumento da ventilação branquial é acompanhado por alterações hemodinâmicas para aumentar o fluxo de sangue nas brânquias para acentuar a troca de gás (Sundin, 1999).

Os peixes de água doce são hiperosmóticos em relação ao ambiente e apresentam um influxo de água e perda de íons por difusão nas brânquias (Baldisserotto, 2003). Juvenis de jundiá (*Rhamdia quelen*) expostos a diferentes níveis de hipóxia mostraram aumentos significativos dos efluxos líquido de Na^+ , Cl^- e K^+ em determinados momentos após a transferência (Rosso *et al.*, 2006). No presente estudo baixos níveis de oxigênio na água provocaram uma redução dos níveis iônicos plasmáticos, o que pode ter ocorrido devido à maior ventilação branquial da piava, que aumentaria a perda de íons, como visto em outras espécies. Experimentos com bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) mostraram que os níveis plasmáticos de Na^+ e Cl^- diminuíram e os de K^+ aumentaram durante a hipóxia ($\approx 3,00 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$) (Chabot & Dutil, 1999). A hiperventilação, causada pela hipóxia em trutas (*Salmo gairdneri*), levou a um aumento da proliferação das células de cloreto,

onde se localiza a Na^+ , K^+ -ATPase e conseqüentemente a atividade da bomba aumenta (Perry, 1998). Isto explicaria o aumento da atividade Na^+ , K^+ -ATPase na piava durante a hipóxia, tanto nas brânquias quanto nos rins. No rim de teleósteos a Na^+ , K^+ - ATPase é um importante energizador para o transporte iônico, pois a maior parte da reabsorção de solutos e água é através da retenção de Na^+ , feita pela Na^+ , K^+ - ATPase na membrana basolateral. Em teleósteos de água doce o rim apresenta uma alta taxa de filtração glomerular que compensa o ganho osmótico de água e retém NaCl por reabsorção (Evans, 1993). Portanto, a Na^+ , K^+ - ATPase é de maior importância no rim e brânquias de teleósteos (Evans, 2002).

Portanto, o aumento do fluxo sanguíneo nas brânquias causado pela hipóxia pode levar a um aumento da perda de íons por difusão. As condições de hipóxia também mudam, além da bomba Na^+ , K^+ -ATPase, a atividade de transportes importantes (Na^+/H^+ , K^+/Cl^-) e canais de Cl^- em eritrócitos de vários peixes (Nikinmaa, 2002). McDonald *et al.* (1991) argumentaram que um declínio na permeabilidade iônica tem sido incorporado no “design” das brânquias de peixes de água doce no que se refere às altas perdas iônicas, e conseqüentemente, afetando as trocas Na^+/H^+ , $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ e $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. O sistema de troca $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$, em que o influxo de Na^+ é acompanhado pela excreção de NH_4^+ , é um importante meio de excreção de amônia através das brânquias, e uma vez afetado acarreta distúrbios na excreção (Wilkie, 1997).

Uma das estratégias para sobreviver em hipóxia é a conservação de energia através da depressão do metabolismo, que pode ser mediado através da redução do metabolismo geral, síntese protéica, e/ou modificação de certas enzimas regulatórias de rotas aeróbicas e anaeróbicas. Tais ajustes bioquímicos permitem ao animal entrar num estado hipometabólico para sobreviver durante a hipóxia (Wu, 2002). Muitos estudos indicam que quimiorreceptores oxigênio-sensitivos nas brânquias mediam muitos reflexos em resposta à hipóxia, levando a mudanças na taxa metabólica (Burlison *et al.*, 2001). No presente estudo, a piava parece ter optado pela rota anaeróbica para suportar os efeitos da hipóxia. Isso se justifica pelo fato dos níveis de glicose terem se acumulado nos tecidos, pois no metabolismo anaeróbico, o substrato para a obtenção de energia é o glicogênio, que diminui sua concentração nos tecidos. Por conseqüência, houve acumulação de lactato nos tecidos. Neste estudo observamos a redução dos níveis de proteína nos tecidos de piavas expostas à hipóxia. Supõe-se que os baixos níveis de oxigênio dissolvido

sejam estressantes para o peixe e influam no processo da proteólise. Em uma analogia semelhante, a exposição à alta temperatura (31°C) foi suficientemente estressante em jundiás para diminuir a proteólise no músculo e aumentar em outros tecidos (rim e fígado) (Lermen *et al.* 2004).

Jundiás expostos a diferentes níveis de oxigênio dissolvido por 30 dias apresentaram baixos níveis de glicogênio no músculo em hipóxia, devido ao fato que esta espécie estoca glicogênio no músculo para a produção de energia durante a glicólise e, conseqüentemente, pode haver um aumento de lactato nos tecidos e/ou plasma. Também foram observados altos níveis de glicose muscular em exemplares expostos a 6,16 mg L⁻¹ O₂. Os níveis de proteína no músculo foram baixos nas concentrações maiores de oxigênio dissolvido (Braun *et al.*, 2006). Experimentos com bacalhau do Atlântico mostraram que os níveis de lactato hepático diminuíram e no músculo aumentaram em peixes expostos à hipóxia moderada (Chabot & Dutil, 1999). Ciclídios amazônicos (*Astronotus crassipinnis* e *Symphysodon aequifasciatus*) expostos à hipóxia (0,06 – 1,54 mg L⁻¹ O₂) apresentaram um declínio no glicogênio hepático, porém o mesmo aumentou no músculo. A acumulação do glicogênio no músculo pode ser explicada devido à ativação da gliconeogênese neste tecido (Chippari-Gomes *et al.*, 2005). Exposição à hipóxia por 96h em *Colossoma macropomum* causou redução dos níveis de glicogênio hepático, porém houve aumento no músculo, mostrando que os carboidratos são importantes fontes de energia durante a hipóxia. Muitos animais expostos a esta situação por longos períodos inibem a atividade glicolítica para evitar uma acidose metabólica (Affonso *et al.*, 2002).

A amônia é a principal excreta do peixe e de muitos organismos aquáticos. O balanço entre sua produção e excreção pode ser quebrado por vários fatores endógenos e exógenos (Wood, 1993). Como resultado, ocorre aumento dos níveis de amônia no sangue e conseqüente autointoxicação por esta (Svobodová *et al.* 1986). A maior parte é produzida no fígado do peixe e então transportada pelo sistema circulatório até as brânquias para excreção. Uma parte da amônia é também produzida pelas brânquias, rins e músculos. A produção no tecido muscular é maior quando o peixe é exposto a hipóxia ou seus movimentos natatórios aceleram, e neste último caso, ocorre elevação dos níveis internos de amônia (Randall & Tsui, 2002). De acordo com isso, os níveis de amônia aumentaram em todos os tecidos da piava quando exposta à hipóxia.

Assim, mudanças morfológicas, fisiológicas e metabólicas são essenciais para o peixe suportar a hipóxia. Exemplares de *Hoplias malabaricus* expostos à hipóxia severa ($\cong 0,7 \text{ mg L}^{-1}$) por 7 dias apresentaram mudanças morfológicas no epitélio lamelar das brânquias, e os danos respiratórios foram compensados por respostas fisiológicas como a via anaeróbica para a obtenção de energia (Sakuragui *et al.*, 2003). Experimentos com piapara (*Leporinus elongatus*) expostos a $1,92 \text{ mg L}^{-1} \text{ O}_2$ mostraram que ocorre a redução do consumo alimentar, ganho de peso e lipoperoxidação (Wilhelm Filho *et al.*, 2005). Na piava, podemos observar mudanças fisiológicas, tanto na osmorregulação como nos parâmetros metabólicos, após a exposição a diferentes níveis de oxigênio dissolvido. Essas mudanças são respostas à hipóxia, mostrando de que forma a piava se adaptou à situação de estresse em que se encontrava.

REFERÊNCIAS

- Affonso, E. G.; Polez, V. L. P.; Corrêa, C. F.; Mazon, A. F.; Araújo, M. R. R.; Moraes, G.; Rantin, F. T. (2002). Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology C*, **133**: 375-382.
- Baldisserotto, B. (2003). Osmoregulatory adaptations of freshwater teleosts. Pp. 179-201. In: Val, A. L.; Kapoor, B. G. (Eds). In *Fish Adaptations*. Enfield, Science Publishers, 418p.
- Braun, N.; Lima, R. L.; Moraes, B.; Loro, V. L.; Baldisserotto, B. (2006). Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Galmard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Aquaculture Research*, **37**: 1524-1531.
- Bidinotto, P.M.; Moraes, G.; Souza, R.H.S. (1998). Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. *Boletim Técnico CEPTA, Pirassununga*, **10**: 53-60, 1998.
- Burleson, M.L.; Wilhelm, D.R.; Smatresk, N.J. (2001). The influence of fish size on the avoidance of hypoxia and oxygen selection by largemouth bass. *Journal of Fish Biology*, **59** (5): 1336-1349.

- Burleson, M. L.; Carlton, A. L.; Silva, P. E. (2002). Cardioventilatory effects of acclimatization to aquatic hypoxia in channel catfish. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, **131**: 223-232.
- Chabot, D.; Dutil, J. D. (1999). Reduced growth of Atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. *Journal of Fish Biology*, **55**: 472-491.
- Chippari-Gomes, A. R.; Gomes, L. C.; Lopes, N. P.; Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F. (2005). Metabolic adjustments in two Amazonian cichlids exposed to hypoxia and anoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, **141**: 347-355.
- Cooper, R.U.; Clough, L.M.; Farwell, M.A.; West, T.L. (2002). Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **279 (1)**: 1-20.
- Duboie, M; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K. *et al*; (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, **28**:350-358.
- Evans, D.H. (1993). Osmotic and ionic regulation. In: EVANS, D.H. *The Physiology of fish*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 315-341.
- Evans, D.H. (2002). Cell signaling and ion transport across the fish gill epithelium. *Journal of Experimental Zoology*. **293**: 336-347.
- 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 nitrogenous waste. *Physiological Revue*, **85**: 97-177.
- Flik, C.; Wendelaar Bong, S.E; Fenwick, J.C. (1983). Ca²⁺-dependent phosphatase and ATPase activities in eel gill plasma membranes. I. Identification of Ca²⁺-activated ATPase activities with non-specific phosphatase activities. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **76B**: 745-754.
- Greenberg, G.; Hasson, D.; Semiat, R. (2005). Limits of RO recovery imposed by calcium phosphate precipitation. *Desalination and the Environment*, **183**: 273-288.
- Gonzalez, R. J.; McDonald, D. G. (1992). The relationship between oxygen consumption and ion loss in a freshwater fish. *Journal of Experimental Biology*, **163**: 317-332.
- Harrover, J.R.; Brown, C.H. (1972). Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter sample. *Journal of Applied Physiology*, **32**: 224-228.
- Lermen, C.L.; Lappe, R.; Crestani, M.; Vieira, V.P.; Gioda, C.R.; Schetinger, M.R.C.; Baldisserotto, B.; Moraes, G.; Morsch, V.M. (2004). *Aquaculture*, **239**: 497-507.

- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951). Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.
- McDonald, D. G.; Cavdek, V.; Ellis, R. (1991). Gill design in freshwater fishes: interrelationships amongst gas exchange, ion regulation and acid-base regulation. *Physiological Zoology*, **64**: 103-123.
- Muusze, B.; Marcon, J.; van den Thillart, G.; Almeida-Val, V. (1998). Hypoxia tolerance of Amazon fish. Respirometry and energy metabolism of the cichlid *Astronotus Ocellatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **120 (1)**: 151-156.
- Nikinmaa, M. (2002). Oxygen-dependent cellular functions – why fishes and their aquatic environment are a prime choice of study. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **133**: 1-16.
- Perry, S. F. (1998). Relationships between branchial chloride cells and gas transfer in freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **119(1)**: 9-16.
- Randall, D.J.; Tsui, T.K.N. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, **45**: 17-23.
- Rantin, F. T.; Marins, M. A. (1984). Como os teleósteos respondem à hipóxia ambiental – Uma revisão. Anais do Simpósio Brasileiro de Aqüicultura III. São Carlos, SP. p.673-692.
- Rosso, F. L.; Bolner, K. C. S.; Baldisserotto, B. (2006). Íon fluxes in silver catfish (*Rhamdia quelen*) juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Neotropical Ichthyology*, **4(4)**: 435-440.
- Sakuragui, M. M.; Sanches, J. R.; Fernandes, M. N. (2003). Gill chloride cell proliferation and respiratory responses to hypoxia of the neotropical erythrinid fish *Hoplias malabaricus*. *Journal of Comparative Physiology B*, **173**: 309-317.
- Sundin, L. (1999). Hypoxia and blood flow control in fish gills. Pp. 353-362. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F. (Eds). *Biology of Tropical Fishes*. Manaus, INPA, 460p.
- Svobodová, Z.; Faina, R.; Groch, L.; Máchová, J. (1986). Study on the etiology of the toxic necrosis of carp gills. *Bul VÚRH Vodnany*. **22**: 3-13.
- Verdouw, H.; Vanechteld, C.J.A.; Deckkers, E.M.J. (1978). Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*. **12**: 399-402.

- Wilkie, M.P. (1997). Mechanisms of Ammonia Excretion Across Fish Gills - the active transport of chloride and the paracellular pathways. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, **118 (1)**: 39-50.
- Wilhelm Filho, D.; Torres, M. A.; Zaniboni-Filho, E.; Pedrosa, R. C. (2005) Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongates* (Valenciennes, 1847). *Aquaculture*, **244**: 349-357.
- Wood, C.M. (1993). Ammonia and urea metabolism and excretion. In: EVANS, D.H. *The Physiology of fishes*. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 379-425.
- Wu, R. S. S. (2002). Wypoxia: from molecular responses to ecosystem responses. *Marine Pollution Bulletin*, **45**: 35-45.
- Xu, J.; Liu, Y.; Cui, S.; Miao, X. (2006). Behavioral responses of tilapia (*Oreochromis niloticus*) to acute fluctuations in dissolved oxygen levels as monitored by computer vision. *Aquacultural Engineering*, **35**: 207-217.
- Zall, D. M., Fisher, M. D.; Garner, Q. M. (1956). Photometric determination of chlorides in water. *Analytical Chemistry*, **28**: 1665-1678.
- Zaniboni-Filho, E.; Schulz, U.H. (2003). Migratory fishes of the Uruguay River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; BAER, A.; ROSS, C. *Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status*. Washington, DC, USA, p. 157-194.

Tabelas

Tabela 1: Comparação de parâmetros metabólicos de peixes expostos: Piava (*Leporinus obtusidens*) (1,00 mg L⁻¹ O₂)^a, *Astronotus crassipinnis* e *Symphysodon aequifasciatus* (1,00 mg L⁻¹ O₂)^b, bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*) (≈3,00 mg L⁻¹ O₂)^c, jundiá (*Rhamdia quelen*) (1,96 mg L⁻¹ O₂)^d.

	<i>Leporinus obtusidens</i>	<i>Astronotus crassipinnis</i>	<i>Symphysodon aequifasciatus</i>	<i>Gadus morhua</i>	<i>Rhamdia quelen</i>
<i>Fígado</i>					
Glicose	75,80 ± 3,51			68,3 ± 5,3	51,4 ± 0,6
Glicogênio	72,80 ± 3,84	≈ 110,00	≈ 70,00		37,8 ± 1,4
Lactato	90,31 ± 2,51			36,1 ± 2,2	9,2 ± 0,4
Proteína	54,31 ± 2,41				124,7 ± 10,6
<i>Rim</i>					
Glicose	39,60 ± 3,15				
Glicogênio	34,15 ± 2,12				19,1 ± 1,6
Lactato	108,34 ± 11,54				
Proteína	22,41 ± 1,21				104,4 ± 12,0
<i>Músculo</i>					
Glicose	88,97 ± 3,52			22,8 ± 2,7	8,3 ± 0,5
Glicogênio	54,15 ± 3,45	≈ 29,00	≈ 16,00		7,1 ± 0,4
Lactato	3113,15 ± 286,31			205,56 ± 12,2	34,7 ± 1,9
Proteína	19,40 ± 1,21				132,4 ± 9,4

^aPresente estudo, ^bChippari-Gomes *et al.* (2005), ^cChabo & Dutil (1999), ^dBraun *et al.* (2006). Glicose, glicogênio e lactato expressos em μmol.g⁻¹ de tecido; proteína em mg.g⁻¹ de tecido.

Figuras

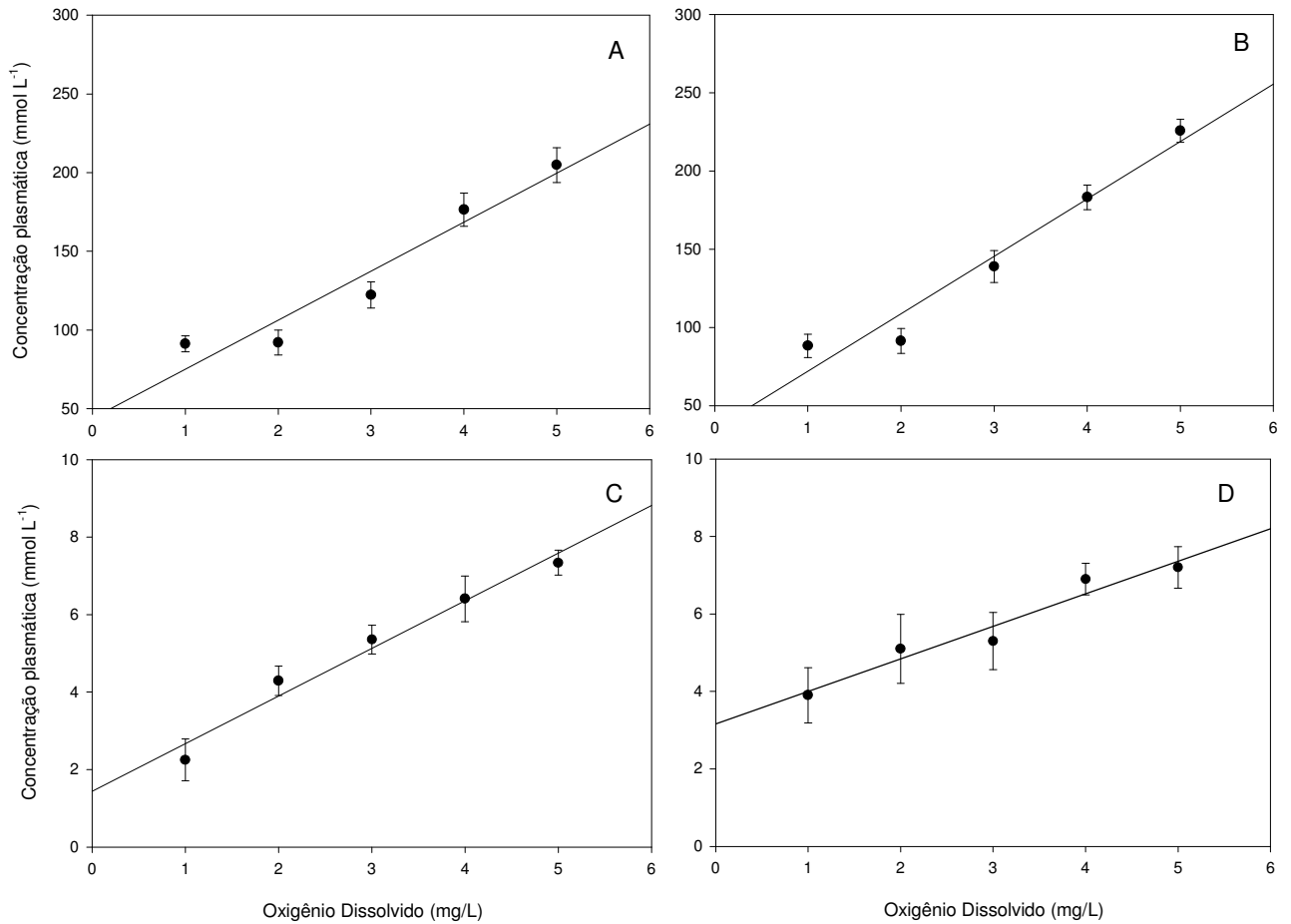


Figura 1: Níveis iônicos plasmáticos (y) de piavas em função do oxigênio dissolvido na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Na ⁺ : r ² = 0,92	y= 43,85 + 31,15x
B= Cl ⁻ : r ² = 0,95	y= 35,47 + 36,68x
C= K ⁺ : r ² = 0,97	y= 1,44 + 1,23x
D= NH ₄ ⁺ : r ² = 0,95	y= 3,16 + 0,84x

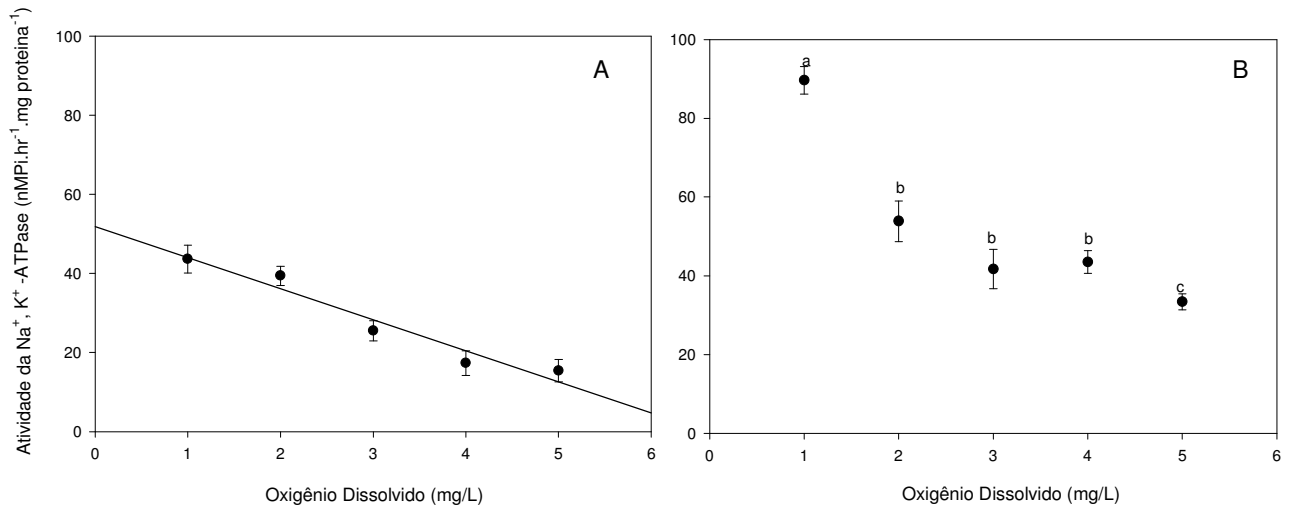


Figura 2: Níveis da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase nas brânquias e rim (y) de piavas em função do oxigênio dissolvido na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Brânquias: $r^2 = 0,94$ $y = 51,82 - 7,86x$

B= Rim (não há relação significativa)

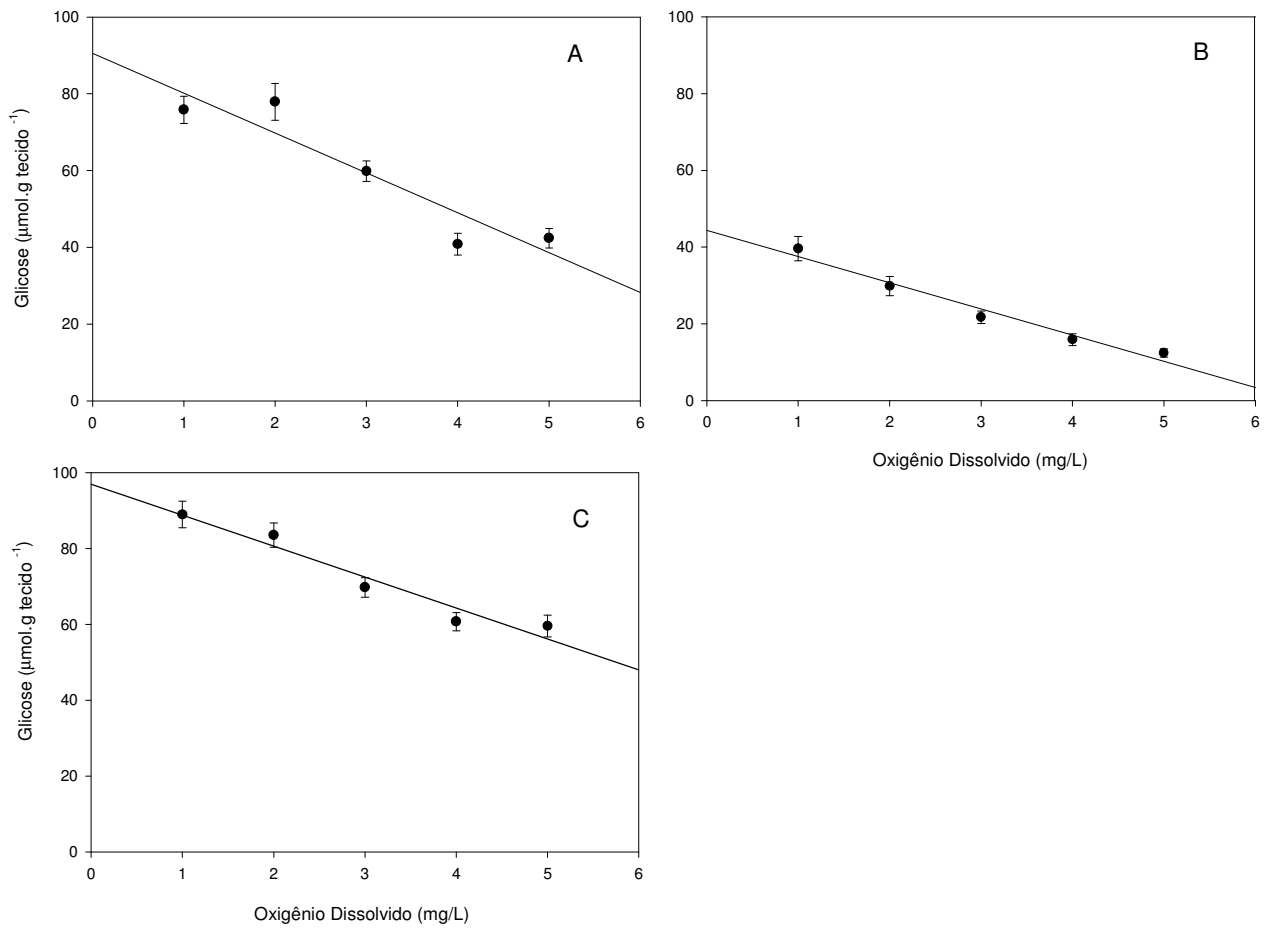


Figura 3: Níveis de glicose nos tecidos (y) de piavas em função do oxigênio dissolvido na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2= 0,87$ $y= 9,51 - 10,39x$

B= Rim: $r^2= 0,98$ $y= 44,38 - 6,83x$

C= Músculo: $r^2= 0,94$ $y= 96,98 - 8,16x$

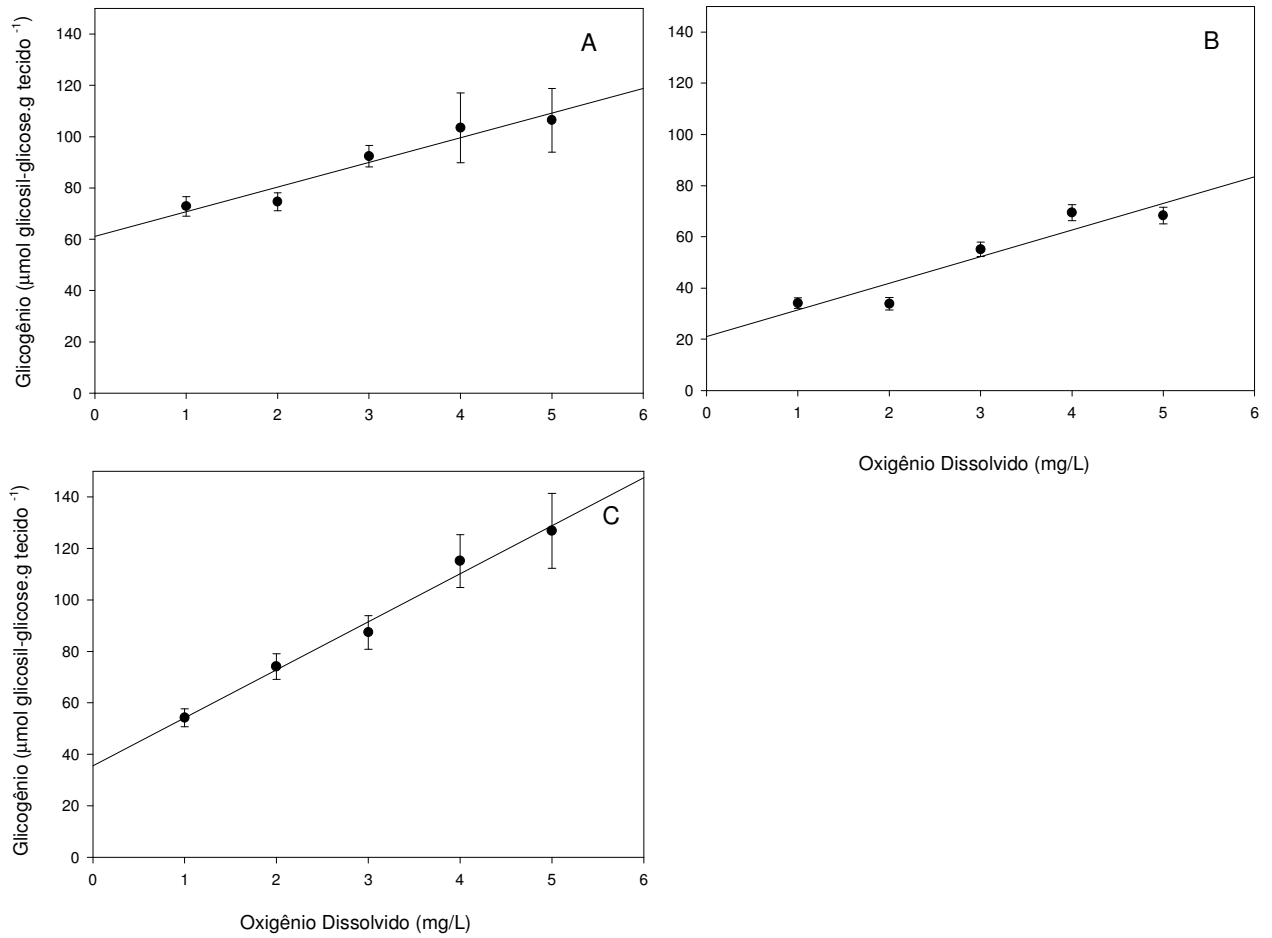


Figura 4: Níveis de glicogênio nos tecidos (y) de piavas em função do oxigênio dissolvido na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2 = 0,93$

$y = 61,11 + 9,60x$

B= Rim: $r^2 = 0,88$

$y = 21,00 + 10,39x$

C= Músculo: $r^2 = 0,98$

$y = 35,62 + 18,64x$

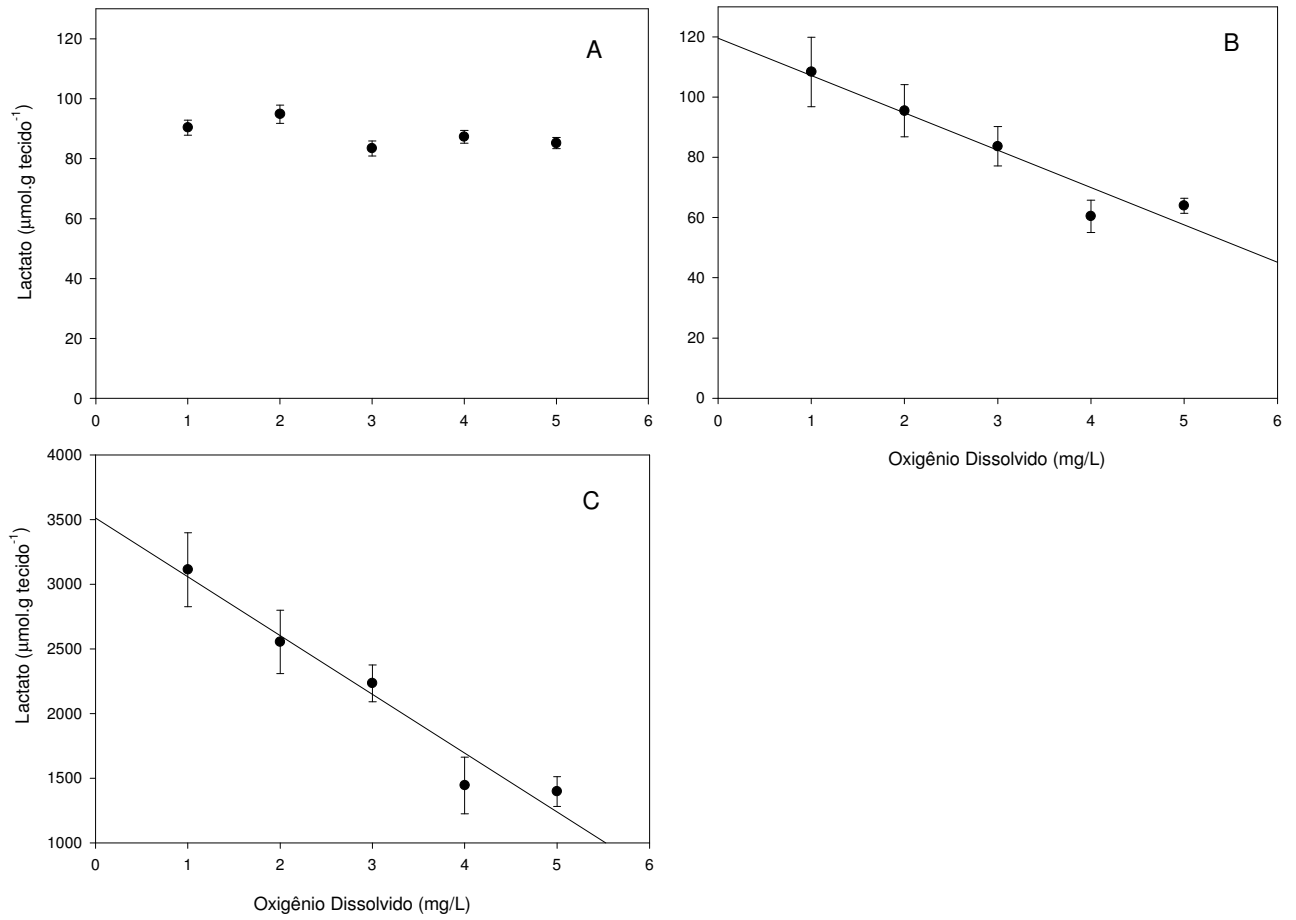


Figura 5: Níveis de lactato nos tecidos (y) de piavas em função do oxigênio dissolvido na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: Sem correlação e diferença significativa.

B= Rim: $r^2 = 0,92$ $y = 119,52 - 12,39x$

C= Músculo: $r^2 = 0,95$ $y = 3511,47 - 454,40x$

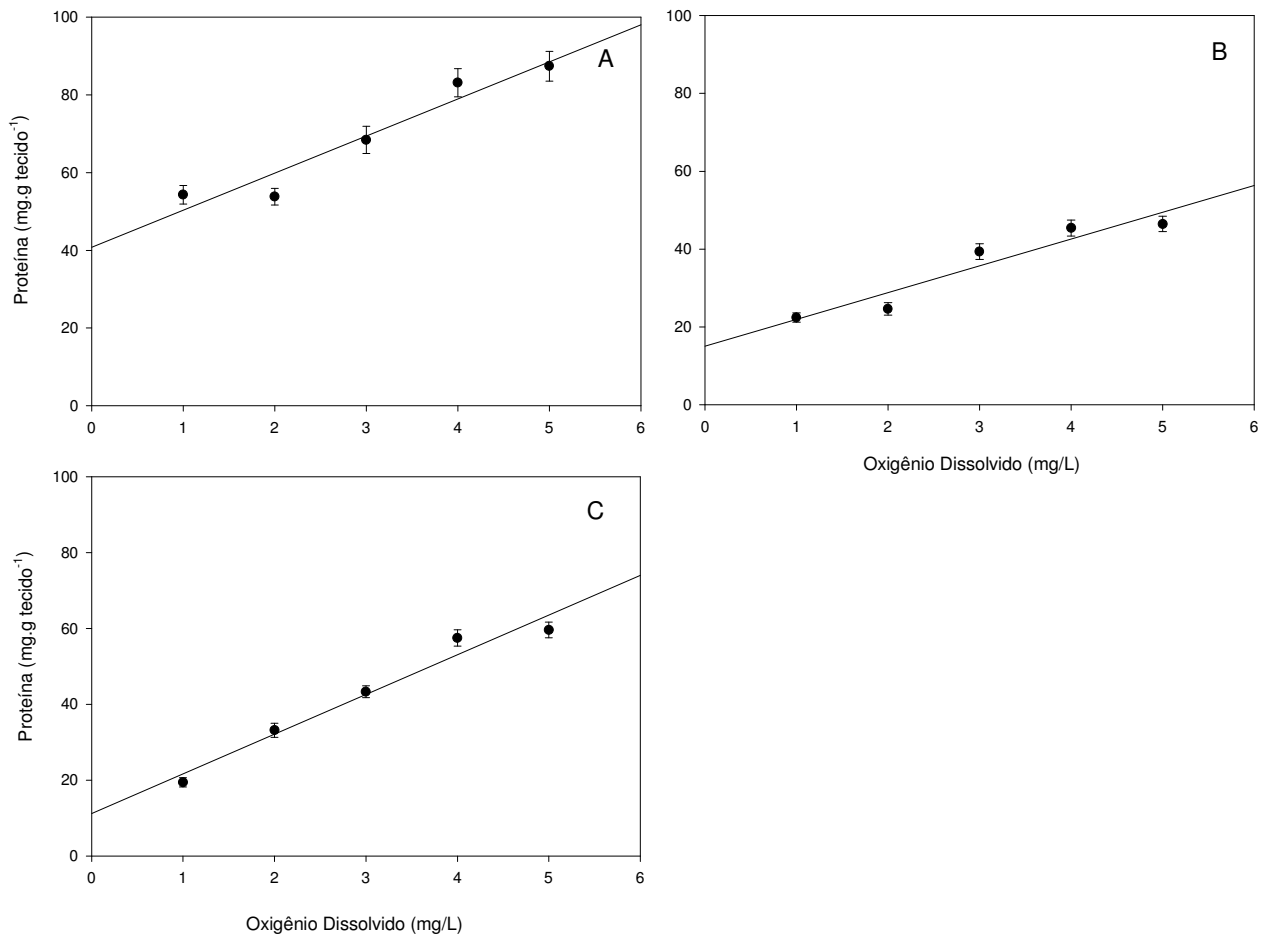


Figura 6: Níveis de proteína nos tecidos (y) de piavas em função do oxigênio dissolvido na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2= 0,93$	$y= 40,75 + 9,55x$
B= Rim: $r^2= 0,91$	$y= 15,00 + 6,88x$
C= Músculo: $r^2= 0,96$	$y= 11,17 + 10,48x$

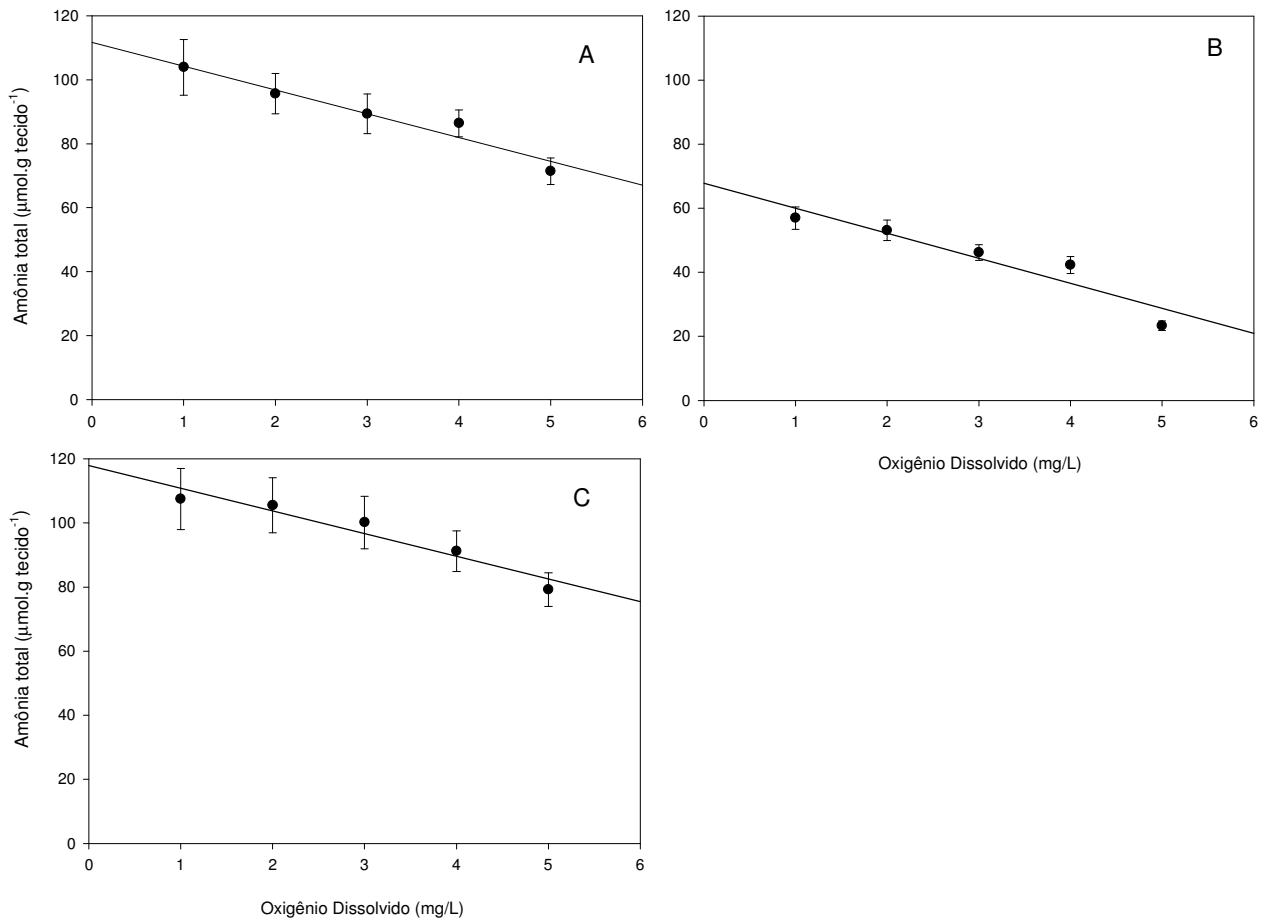


Figura 7: Níveis de amônia nos tecidos (y) de piavas em função do oxigênio dissolvido na água (x). As retas estão de acordo com os seguintes dados:

A= Fígado: $r^2= 0,95$	$y= 111,59 - 7,42x$
B= Rim: $r^2= 0,89$	$y= 67,78 - 7,81x$
C= Músculo: $r^2= 0,93$	$y= 117,97 - 7,09x$

CONCLUSÕES

- A $CL_{50\ 96h}$ para a piava é de 0,27 (0,21 - 0,34) $mg\ L^{-1}\ NH_3$;
- Nos níveis de NH_3 que houve mortalidade, esta foi precedida por alterações comportamentais como: desequilíbrio, natação com o abdômen para cima, hiper-atividade seguida por constantes choques nas paredes do aquário e convulsões;
- O aumento no nível de NH_3 na água provocou o aumento de NH_3 no sangue e tecidos;
- A atividade da $Na^+, K^+ -ATPase$ nas brânquias aumentou com a elevação da concentração de NH_3 na água, enquanto que no rim houve redução da atividade;
- Houve sobrevivência total das piavas expostas a diferentes níveis de oxigênio dissolvido;
- A hipóxia provocou redução de íons plasmáticos;
- A $Na^+, K^+ -ATPase$ teve aumento em sua atividade nas brânquias, devido às perdas iônicas;
- O aumento do lactato muscular e a degradação de glicogênio no tecido, levou ao metabolismo anaeróbico para suportar os efeitos da hipóxia;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANA, L. V. **Princípios químicos da qualidade da água em aquicultura**. Florianópolis: UFSC, 1997. 152p.
- BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2002. v. 01. 212 p.
- BALDISSEROTTO, B. Osmoregulatory adaptations of freshwater teleosts. Pp. 179-201. In: Val, A. L.; Kapoor, B. G. (Eds). *Fish Adaptations*. Enfield, Science Publishers, 2003. 418p.
- BARIMO, J.F.; WALSH, P.J. The effects of acute and chronic ammonia exposure during early life stages of the gulf toadfish, *Opsanus beta*. **Aquatic Toxicology**, 75 (3): 225-237, 2005.
- BIDINOTTO, P.M.; MORAES, G.; SOUZA, R.H.S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical freshwater teleost fish: A procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA**, Pirassununga, v.10, p. 53-60, 1998.
- BRAUN, N.; LIMA, R. L.; MORAES, B.; LORO, V. L.; BALDISSEROTTO, B. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Galmard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. **Aquaculture Research**, 37: 1524-1531, 2006.
- CARDOSO, E. L. **Toxidez de amônia não ionizada e seu efeito sobre a pele e brânquias de *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876; *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874; *Prochilodus marggravii* (Walbaum, 1792); *Leporinus elongatus* Valenciennes, 1849; (Pisces, Teleostei)**. 1993. 122f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 1993.
- COOPER R.U., CLOUGH L.M., FARWELL M.A. & WEST T L. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 279, p. 1-20, 2002.
- DUBOIE, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-358, 1956.
- GARAVELLO, J.C.R. **Revisão taxonômica do gênero *Leporinus* Spix, 1829 (Ostariophysii, Anostomidae)**. 1979. 123f. Tese de doutorado em Zoologia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1979.

- HARROWER, J.R.; BROWN, C.H. Blood lactic acid. A micromethod adapted to field collection of microliter sample. **Journal of Applied Physiology**, v. 32 n.5, p. 224-228, 1972.
- HUNN, J.B. Chemical composition of rainbow trout urine following acute hypoxic stress. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.98, p.20-22, 1969.
- JOBLING, M. Ingestion, absorption and excretion. In: **Fish Bioenergetics**, London: CHAPMAN & HALL. pp. 109-119, 1994.
- KIRK, W.L. The effects of hypoxia on certain blood and tissue electrolytes of channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Transactions of the American Fisheries Society**, v.103, p.593-600. 1974.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Folin Phenol Reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F.; DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 106, p.201-212. 1977.
- MEURER, S.; WEINGARTNER, M.; PÉREZ, C.; ZANIBONI FILHO, E. Efeito de diferentes concentrações de oxigênio dissolvido sobre o crescimento de juvenis de "piapara" *Leporinus elongatus* (Cuvier & Valenciennes, 1864). In: I CONGRESSO SUL-AMERICANO DE AQUICULTURA. Resumo. Recife, PE, novembro 1998. p. 137.
- MOON, T.W.; FOSTER, G.D. Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: HOCHACHKA, P.W.; MOMMSEN, T.P. (Eds). **Biochemistry and molecular biology of fish, Metabolic biochemistry**. V. 4. Elsevier, New York, pp. 65-100, 1995.
- MOYLE, P. B., and J. J. CECH, Jr. **Fishes: An introduction to ichthyology**. 2ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs, NJ, USA. 1998. 559p.
- PICKERING, A .D. Growth and stress in fish production. **Aquaculture**, v.111, p.51-63, 1993.
- RANDALL, D.J.; TSUI, T.K.N. Ammonia toxicity in fish. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 17-23, 2002.
- RANTIN, F.T.; MARINS, M.A. Como os teleósteos respondem à hipóxia ambiental – uma revisão. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA III. Anais do Simpósio Brasileiro de Aquicultura, III., São Carlos, 1984. p. 673-692.

- SAHA, N.; DUTTA, S.; BHATTACHARJEE, A. Role of amino acid metabolism in an air-breathing catfish, *Clarias batrachus* in response to exposure to a high concentration of exogenous ammonia. **Comparative biochemistry and physiology B**, 133 (2), p.235-250, 2002.
- SVOBODOVÁ, Z.; FAINA, R.; GROCH, L.; MÁCHOVÁ, J. Study on the etiology of the toxic necrosis of carp gills. **Bul VÚRH Vodnany**. v. 22, p. 3-13, 1986.
- TOMASSO, J.R. Toxicity of nitrogenous wastes to aquaculture animals. Reviews in **Fisheries Science**, v.2, n.4, p.291-314, 1994.
- TOMASSO, J.R.; CARMICHAEL, G.J. Acute toxicity of ammonia, nitrite, and nitrate to the Guadalupe bass, *Micropterus treculi*. **Bulletin of Environmental and Contaminant Toxicology**, v.36, p.866-870, 1986.
- VAZZOLER, A.E.A de M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996, 169p.
- VERDOUW, H.; VANECHTELD, C.J.A.; DECKKERS, E.M.J. Ammonia determinations based on indophenol formation with sodium salicylate. **Water Research**. v. 12, p. 399-402, 1978.
- WANG, Y.; WALSH, P.J. High ammonia tolerance in fishes of the family Batrachoididae (Toadfish and Midshipmen). **Aquatic Toxicology**, 50 (3), p.205-219, 2000.
- WICKS, B. J.; RANDALL, D. J. The effect of feeding and fasting on ammonia toxicity in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquatic toxicology**, 59 (1-2), p.71-82, 2002.
- WOOD, C.M. Toxic responses of the gill. In: Schlenk, D.; Benson, W.H. **Target organ toxicity in marine and freshwater teleosts**. v.1. Organs. Taylor & Francis, London, p.1-89, 2001.
- WOOD, C.M. Ammonia and urea metabolism and excretion. In: EVANS, D.H. **The Physiology of fishes**. Boca Raton, FL: CRC Press. pp 379-425, 1993.
- ZALL, D. M., FISHER, M. D.; GARNER, Q. M. Photometric determination of chlorides in water. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 1665-1678, 1956.
- ZANIBONI-FILHO, E; NUÑER, A.P.O.; FRACALOSSO, D.M.; MEURER, S.; WEINGARTNER, M.; REYNALTE-TATAJE, D.A. **Ictiofauna do Alto Rio Uruguai: biologia, conservação e cultivo**, Relatório Parcial para UHE Ita. Tractebel. Florianópolis, SC., 2002, 131p.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U.H. Migratory fishes of the Uruguay River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; BAER, A.; ROSS, C. **Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. Washington, DC, USA, 2003, p. 157-194.