

Arlindo Saran Neto; Wagner dos Santos Mariano;  
Silvia Fátima P. Sória  
(Orgs.)

# **Tópicos Especiais em Saúde e Criação Animal**



Pedro & João Editores

Todos os direitos garantidos. Qualquer parte desta obra pode ser reproduzida ou transmitida ou arquivada, desde que levados em conta os direitos dos autores.

SARAN NETO, Arlindo; MARIANO, Wagner dos Santos; SÓRIA, Sílvia Fátima P. (Orgs.)

**Tópicos especiais em saúde e criação animal.** São Carlos: Pedro & João Editores, 2009.

**ISBN 978-85-99803-78-3**

1. Saúde animal. 2. Produção animal. 3. Criação animal. 4. Medicina Veterinária. 5. Zootecnia. 6. Saúde Pública. 7. Autores. I. Título.

CDD – 590

**Capa:** André Luiz Covre

**Editores:** Pedro Amaro de Moura Brito & João Rodrigo de Moura Brito & Valdemir Miotello

**Conselho Científico da Pedro & João Editores:**

Augusto Ponzio (Bari/Itália); André Luiz Covre (Unicamp/Brasil); João Wanderley Geraldi (Unicamp/Brasil); Roberto Leiser Baronas (UFSCar/Brasil); Nair F. Gurgel do Amaral (UNIR/Brasil) Maria Isabel de Moura (UFSCar/Brasil); Dominique Maingueneau (Universidade de Paris XII); Maria da Piedade Resende da Costa (UFSCar/Brasil).



**Pedro & João Editores**

Rua Tadão Kamikado, 296

Parque Belvedere

www.pedroejoaoeditores.com.br

13568-878 - São Carlos – SP

2009

## ÍNDICE

### SAÚDE PÚBLICA

1. Utilização de bio sólidos e seu impacto na saúde pública 15  
*Juliana Rosa Carrijo Mauad & Bruna Fernanda da Silva*

### PEIXES

2. Hematologia: ferramenta para o monitoramento do estado de saúde de peixes em cultivo 43  
*Marcos Tavares Dias, Márcia Mayumi Ishikawa, Maurício Laterça Martins, Fabiana Satake, Hamilton Hisano, Santiago Benites de Pádua, Gabriela Tomas Jerônimo & Ana Rosa Sant'ana de Sá*

3. Biomarcadores de estresse oxidativo em peixes 81  
*Wagner dos Santos Mariano, Eliane Tie Oba & Helena Cristina da Silva de Assis*

### AVES

4. Problemas locomotores e bem-estar na produção de frangos de corte 107  
*Ibiara Correia de Lima Almeida Paz & Rodrigo Garófallo García*

### BOVINOS

5. Manejo de cria recria e produção de bovinos leiteiros 123  
*Marco Aurélio de Felício Porcionato, Arlindo Saran Netto & Gustavo Ribeiro Del Claro*

6. Produção de bovinos de corte 161  
*Arlindo Saran Netto, Marco Aurélio de Felício Porcionato, Gustavo Ribeiro Del Claro & Marcus Back*

### OVINOS

7. Sistema de produção de ovinos 197  
*Gustavo Ribeiro Del Claro, Arlindo Saran Netto & Marco Aurélio de Felício Porcionato*

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R.; ONAKA, E. M.; REZENDE, P.C.B. . 2007a. Changes in blood parameters of hybrid tambacu fish parasitized by *Dolops carvalhoi* (Crustacea, Branchiura), a fish louse. *Veterinarski Arhiv*, 77: 355-363.

TAVARES-DIAS, M.; ONO, E.A.; PILARSKI, F.; MORAES, F. R. 2007b. Can thrombocytes participate in the removal of cellular debris in the blood circulation of teleost fish? A cytochemical study and ultrastructural analysis. *J. Appl. Ichthyol.* 23, 709–712.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. 2008. Hematological assessment in four Brazilian teleost fish with parasitic infections, collected in feefishing from Franca, São Paulo, Brazil. *Bol. Inst. Pesca*, 34:189-196.

THATCHER, V.E.; BRITES-NETO, J. 1994. Diagnóstico, prevenção e tratamento das enfermidades de peixes neotropicais de água doce. *Revista Brasileira de Zoologia e Medicina Veterinária*, 16: 111-128.

UEDA I.K, EGAMI MI, SASSO WS, MATUSHIMA ER. 2001. Cytochemical aspects of peripheral blood cells of *Oreochromis (Tilapia) niloticus* (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei). Part II. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, 38(6): 273-277.

VIANNA, A.C.C. Estudo anatomopatológico e hematológico de tucunarés selvagens (*Cichla monoculus*, Spix, 1831) infestados por helmintos: aspectos da interação "peixe-endohelmintos". Tese de Doutorado em Patologia Experimental e Comparada. Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, 153p, 2003.

VIEIRA, V.L.P.; RADÜNZ-NETO, J.; LOPES, P.R.S.; LAZZARI, R.; FONSECA, M.B.; MENEZES, C.C. 2006. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiás (*Rhamdia quelen*) alimentados com rações contendo aflatoxinas. *Ciência Animal Brasileira*, 7(1): 49-55.

ZINTL, A.; POOLE, W.R.; VOORHEIS, H.P.; HOLLAND, C.V. 1997. Naturally occurring *Trypanosoma granulosum* infections in the European eel, *Anguilla anguilla* L. from Country Mayo, westrn Ireland. *Journal of Fish Diseases* 20:333-341.

## BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PEIXES

Wagner dos Santos Mariano<sup>1</sup>

Eliane Tie Oba<sup>2</sup>

Helena Cristina da Silva de Assis<sup>3</sup>

### Introdução

O termo *Homeostasis* foi criado por Walter Cannon para descrever os processos corporais coordenados para manter o meio interno aproximadamente constante (Cannon 1929; 1939). Estudando a função secretora da adrenal, Cannon concluiu que, em situações de e60

emergência, o organismo poderia preservar o meio interno, via ajustes compensatórios, e aumentar a probabilidade de sobrevivência (Cannon, 1929; Cannon, 1939; Gauthier *et. al.*, 1972; Julien *et. al.*, 1990).

<sup>1</sup> Biólogo, Mestre em Ciências Fisiológicas (UFSCar). Docente do Curso Medicina Veterinária das Faculdades Anhanguera Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. wagnermariano14@hotmail.com.

<sup>2</sup> Bióloga, Doutora em Ciências Fisiológicas (UFSCar). Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Macapá, Amapá, Brasil. eliane@cpafap.embrapa.br

<sup>3</sup> Médica Veterinária, Doutora em Ciências Naturais (TU-Berlim). Professora Associada da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil. helassis@ufpr.br



O termo estresse tem sido utilizado para caracterizar um estado de ameaça a homeostase causada por um estímulo estressante, o estressor (Wendelaar Bonga, 1997). O estresse é caracterizado também como uma resposta comportamental geral na qual há reações motoras e neurovegetativas mediadas pelo sistema neuro-endócrino e há mobilização de energia para o organismo escapar ou combater o estressor (Pickering, 1981).

Muitos fatores podem determinar a resposta do sistema neuro-endócrino a estímulos estressantes gerando variabilidade na resposta ao estresse. As causas de tais variabilidades podem ser devido a processos adquiridos ao longo da vida do indivíduo, a ajustes às particularidades do ambiente e desenvolvimentos do animal e evolutivos, ou seja, adaptações geneticamente estruturadas (Vigas, 1980; Pickering, 1981). A resposta a um agente estressor também pode ser determinada filogeneticamente, refletindo a história da espécie (Vigas, 1980; Schreck, 1981). O estresse pode causar distúrbios fisiológicos, bioquímicos ou morfológicos. Dentre as alterações bioquímicas temos a geração de radicais livres.

Nas células aeróbias, uma pequena quantidade de oxigênio consumido é reduzido por vias específicas, fornecendo uma variedade de substâncias químicas altamente reativas tais como o óxido nítrico (NO), o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $\cdot OH$ ), além de seus intermediários ou subprodutos como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), coletivamente chamados de Espécies Reativas de Oxigênio – ERO (Li & Karin, 1999). Pequenas quantidades de ERO produzidas como consequência de reações de transferência de elétrons na mitocôndria, peroxissomos e citosol, são neutralizadas por sistemas de defesa celular, incluindo antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Barbosa, 2001).

Um estado com níveis intracelulares de ERO moderadamente elevados é referido como estresse oxidativo. As células respondem a estas condições adversas modulando seus níveis de antioxidantes, o que é alcançado pela indução da expressão de novos genes (ex. superóxido dismutase ligada ao manganês – Mn-SOD E. C. 1.15.1.1) ou modificação de proteína (ex. GSH/GSSG<sup>4</sup>). A modulação homeostática dos níveis de antioxidantes é um mecanismo altamente eficiente e conservado desde os primórdios da evolução, mantendo rigorosamente o estado de oxido-redução celular dentro de limites estreitos (Li & Karin, 1999; Barbosa, 2001).

O presente capítulo abordará conceitos e fundamentos de estresse e biomarcadores de estresse oxidativo correlacionando-os com uma pesquisa de um peixe que possui respiração aérea acessória e que foi submetido à exposição aérea, o *Hoplerytinus unitaeniatus*.

## Estresse em Peixes

O ambiente aquático é extremamente dinâmico e os animais que vivem nesse ambiente enfrentam alterações ambientais dificilmente enfrentadas pelos animais terrestres como mudanças rápidas ou extremas na concentração de  $O_2$  dissolvido, pH e salinidade, o que podem ocasionar estresse e reduzir a habilidade em manter a homeostase (Mariano, 2006; Oba, *et al.* 2009).

Os agentes estressores podem ser de natureza química; como por exemplo, redução da concentração de  $O_2$  dissolvido, concentração elevada de amônia e nitrito, decorrente da degradação da matéria orgânica, poluentes orgânicos e inorgânicos. Podem também ser resultantes da

<sup>4</sup> As enzimas que atuam em situações de estresse oxidativo serão abordadas nas páginas seguintes.



atividade agro-industriais; ou podem ser de natureza física, como alta densidade populacional, confinamento, captura ou mudanças no ambiente físico, como a redução do nível de água dos corpos d'água que caracterizam os períodos de estiagem em regiões tropicais e subtropicais (Mariano *et. al.* 2009).

Quando o peixe é exposto a um agente estressor ocorre a ativação de dois eixos neuro-endócrinos: o eixo hipotálamo-sistema nervoso simpático-células cromafins (HSC) que resulta na liberação de catecolaminas (CA): epinefrina e norepinefrina como produtos finais e o eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (HHI) que libera os corticosteróides cortisol e cortisona dos quais o principal é o cortisol. A ação destes hormônios em diversos órgãos alvos, especialmente naqueles que estão sob múltiplo controle endócrino, resultam em modificações bioquímicas e fisiológicas denominadas respostas secundárias ao estresse (Perry & Laurent, 1993; Wendelaar Bonga, 1997).

A biossíntese de CA ocorre nas células cromafins localizadas na região anterior dos rins dos peixes e a inativação dessas moléculas ocorre no fígado e rins, antes de serem excretadas pela urina. A ativação adrenérgica resulta em efeitos secundários principalmente sobre a circulação, respiração, osmorregulação e metabolismo dos peixes (Mazeaud & Mazeaud, 1981). O aumento das catecolaminas circulantes favorece o aumento da tomada de oxigênio nas brânquias e conseqüentemente o aumento na oxigenação dos tecidos. O aumento da absorção de oxigênio nas brânquias deve-se ao efeito das catecolaminas no aumento na ventilação branquial, no fluxo sangüíneo nas lamelas secundárias, na capacidade de difusão do oxigênio do meio aquático para o sangue bem como na capacidade de transporte do oxigênio pelo sangue (Randall & Perry, 1992). Entretanto, o aumento da perfusão das brânquias favorece a perda de íons por difusão do sangue para o meio

externo podendo ocorrer desequilíbrio iônico. As CA também estimulam a glicogenólise que resulta na liberação de glicose do fígado para o sangue levando a hiperglicemia sob condições de estresse (Nolan, 2000).

O eixo hipotálamo-hipófise-interrenal (eixo HHI) desencadeia outras respostas secundárias. Em peixes, assim como em mamíferos, a síntese e liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela glândula hipófise está sob controle do hipotálamo, via síntese e liberação do fator liberador de corticotrofina (CRF) podendo ser mediada também pelo hormônio melanócito estimulante (MSH) e, possivelmente, por  $\beta$ -endorfina (Wendelaar Bonga, 1997). Quando o sistema sensorial detecta mudanças no meio externo e/ou interno dos peixes ocorre a ativação do hipotálamo, que libera CRF o qual estimula as células corticotróficas da hipófise a produzir e liberar ACTH que, por sua vez, estimula a síntese e liberação dos corticosteróides pelas células da interrenal localizada na região anterior do rim (Nandi, 1962; Donaldson, 1981).

O nível basal de cortisol varia entre as espécies. Por exemplo, em salmonídeos em condições de repouso é abaixo de 10 ng/mL, porém em situações de estresse agudo pode elevar-se 100 vezes o valor do nível basal (Pickering & Pottinger 1989). Em *Oreochromis niloticus* o nível basal de cortisol varia entre 22 a 78 ng/mL (Barreto 2002) e em *Leuciscus cephalus* é de aproximadamente 250 ng/mL (Pottinger *et al.*, 2000).

O cortisol em peixes atua via dois tipos de receptores intracelulares, os mineralocorticóides e glicocorticóides. Em sua função mineralocorticóide, o cortisol atua na regulação osmótica e iônica estimulando a diferenciação de células de cloreto nas brânquias e aumentando a atividade da bomba de sódio-potássio ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$  - ATPase) que participam no transporte ativo dos íons sódio e cloreto. Em sua função como glicocorticóide, o cortisol estimula a glicogenólise no



fígado, ocasionando uma hiperglicemia, além de estimular também a gliconeogênese neste mesmo órgão (Pickering, 1981; Wendelaar Bonga, 1997).

### **Radicais Livres, Defesas Antioxidantes e Estresse Oxidativo**

O organismo dos animais possui a habilidade de se adaptar a variados tipos de estresse, internos e externos, aos quais é submetido. Se o animal for habitualmente exposto a um estímulo estressor podem ocorrer adaptações para recuperar a homeostase. Por exemplo, quando o O<sub>2</sub> passou a ser utilizado no processo de respiração ocorreu, paralelamente, o desenvolvimento de um sistema antioxidante para proteger as células da toxicidade daquele gás, uma vez que o metabolismo aeróbico conduz à formação de radicais livres. Desse modo, qualquer estímulo que leve à produção excessiva de radicais livres e/ou à depleção de antioxidantes, conduz a uma alteração significativa do balanço entre a produção e remoção de radicais livres (Droge, 2002; Urso & Clarkson, 2003).

### **Radicais Livres**

As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. De maneira simples, o termo radical livre refere-se a o átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas (Ferreira & Matsubara, 1997). Por definição os radicais livres são: qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (Halliwell & Gutteridge, 1989), sendo

que esse elétron desemparelhado ocupa sozinho um orbital atômico ou molecular. Esse elétron não-emparelhado torna o átomo extremamente instável. Na tentativa de estabilizar-se, ele reage com um elétron de outro átomo. Em sistemas biológicos, os radicais livres reagem com os elétrons das biomoléculas que estão à sua volta, ou seja, proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucleicos. Cada vez que uma biomolécula perde um elétron, ela sofre uma modificação na sua forma e função, podendo perder a sua utilidade no organismo (Ramos *et al.*, 2000). Estes radicais livres e demais moléculas que surgem em função das suas ações oxidativas (Figura 1) nos sistemas biológicos são denominados de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) (Storey, 1996; Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

As ERO são capazes de causar danos oxidativos em macromoléculas levando a: peroxidação lipídica; oxidação da cadeia lateral de aminoácidos (especialmente cisteína); formação de ligações cruzadas entre proteínas; fragmentação protéica pela oxidação de seu esqueleto peptídico; dano do DNA; quebra das fitas do DNA. Portanto, níveis elevados de ERO são citotóxicos e podem ser gerados em doenças ou devido ao estresse ambiental (térmico, osmótico, radiação, etc.) (Li & Karin, 1999; Barbosa, 2001).

Dos radicais livres, o OH<sup>-</sup> e o O<sub>2</sub><sup>-</sup> são os que têm maior importância biológica porque são formados durante o processo normal de redução de O<sub>2</sub> no interior das mitocôndrias (Benzi 1993). Além disso, muitos xenobióticos podem aumentar esta geração de O<sub>2</sub><sup>-</sup>.

O OH<sup>-</sup> é o mais reativo e pode formar-se: 1) pela fissão homóloga da ligação O-O da molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (O-O do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → OH + OH<sup>-</sup>); 2) pela simples mistura de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com sal de ferro (Reação de Fenton, Fe<sup>+2</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → Fe<sup>+3</sup> + OH + OH<sup>-</sup>); 3) pela interação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com o O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Reação de Haber-Weiss, O<sub>2</sub><sup>-</sup> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → O<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O + OH); 4) quando



uma forma reduzida do cobre entra em contato com o  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\text{Cu}^+ + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Cu}^{+2} + \text{OH} + \text{OH}^-$ ) (Halliwell & Gutteridge, 1989; Storey, 1996).

O radical  $\text{O}_2^-$  é menos reativo que o OH, e é formado a partir da redução do  $\text{O}_2$  por um elétron. Em condições fisiológicas é gerado, principalmente, nas mitocôndrias, microsomas e peroxissomas (Andrade-Junior *et al.* 2005).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  surge no interior das células quando o  $\text{O}_2$  é reduzido ou quando o  $\text{O}_2^-$  sofre dismutação espontânea ou catalisada. Além disso, por não possuir elétrons desemparelhados, não é classificado como radical livre, sendo, portanto menos reativo que os radicais livres citados (Halliwell & Gutteridge, 1989; Pereira, 1994). O principal problema é que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  atravessa facilmente as membranas celulares e ao receber mais um elétron, normalmente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxila (Halliwell & Gutteridge, 1989).

A maior reatividade exibida pelos radicais livres, comparativamente aos não radicais, pode ser evidenciada pelo menor tempo de vida média que possuem. O radical  $\text{OH}^-$  e o ânion  $\text{O}_2^-$  possuem tempo de vida média, respectivamente de,  $1 \times 10^{-9}$  e  $1 \times 10^{-6}$  segundos, enquanto que o  $\text{H}_2\text{O}_2$  superior a  $10^{-2}$  segundos. Apesar de o  $\text{O}_2^-$  ser um radical livre sua reatividade também é muito baixa (tempo de vida média superior a  $10^2$  segundos) (YU, 1994). Este tempo de vida extremamente curto dos radicais livres se dá devido a instabilidade eletrônica que apresentam. Isto resulta na possibilidade de extraírem elétrons de outras moléculas com as quais venham a colidir, promovendo formação de outros radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 1989).

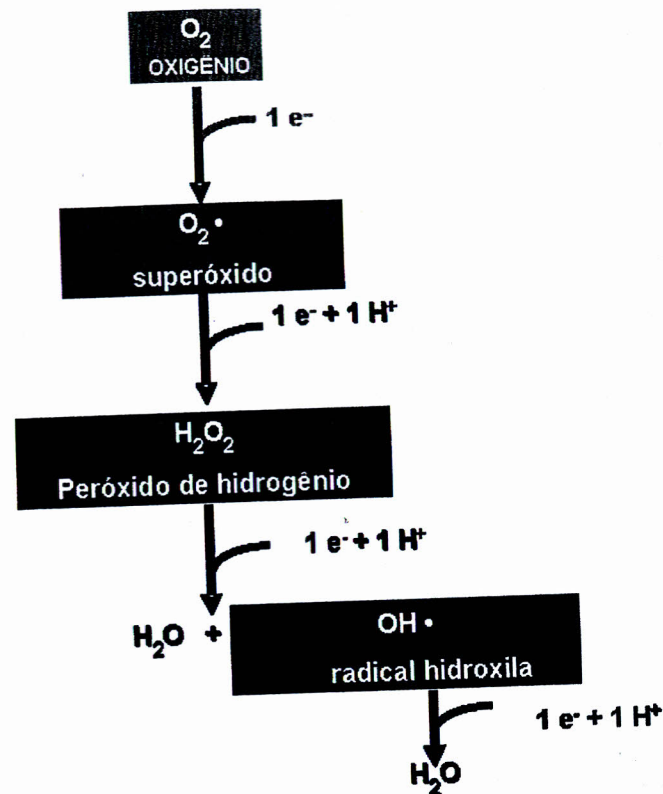


Figura 1. Etapas de um elétron na redução do oxigênio, levando à formação das espécies reativas de oxigênio superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila. Adaptado de DEVLIN (2003).

## Defesas Antioxidantes e Estresse Oxidativo

A toxicidade de vários xenobióticos parece estar relacionada com a capacidade de induzir estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento da produção de radicais livres a/ou estimulação da resposta celular ao estresse oxidativo. As ERO formadas na célula por agentes exógenos ou respostas geradas endogenamente podem rapidamente atacar proteínas, DNA e lipídios insaturados, resultando em



perda de função e dano. Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos não-enzimáticos e enzimáticos. No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta como o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) e  $\beta$ -caroteno, selênio, ácido ascórbico (vitamina C), glutathiona reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica das ERO produzidas intra e extracelularmente (YU, 1994). A GSH apresenta uma alta eficiência no impedimento da fase de propagação no processo de lipoperoxidação. Quanto a solubilidade, estas moléculas dividem-se em lipossolúveis e hidrossolúveis, o que assegura à célula, defesas antioxidantes no citosol e nas membranas celulares. No segundo caso, quando são expostos as ERO os organismos sintetizam proteínas (enzimas) antioxidantes, das quais pode-se citar:

a) Superóxido Dismutase (CuZn-SOD; Mn-SOD) que corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. A forma CuZn-SOD está presente, principalmente, no citosol e meio extracelular, enquanto que a Mn-SOD está localizada, principalmente, na mitocôndria. Esta enzima tem um papel antioxidante, pois catalisa a dismutação do  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ . Durante o processo hemolítico decorrente de agressão térmica, os glóbulos vermelhos exibem queda da atividade SOD (Bartosz *et al.*, 1978; Hatherill, *et al.*, 1991). A adição desta enzima também protege o DNA de lesões provocadas pela sobrecarga de  $Fe^{+++}$  (Ferreira & Matsubara, 1997). A SOD apresenta um grande potencial como biomarcador. Fitzgerald (1992) demonstrou que trutas e tilápias expostas à radiação UV apresentavam aumento da atividade da SOD no fígado e na pele, como resposta à formação de ânion superóxido, mediada por radiação UV.

b) Catalase (CAT) é uma enzima (do grupo das hemeoproteínas) citoplasmática que catalisa a redução do  $H_2O_2$  a  $H_2O$  e  $O_2$  e sua atividade é dependente de NADPH

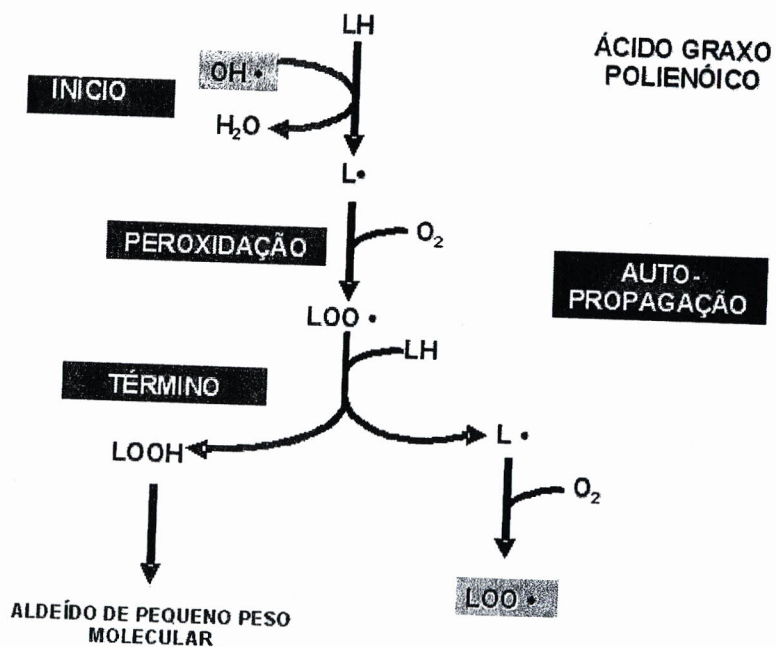
(SCOTT *et al.*, 1991). É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. A suplementação da catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo  $H_2O_2$ , em eritrócitos humanos normais, e inibe as lesões oxidativas do DNA de timo de carneiro submetidos à sobrecarga de  $Fe^{+++}$ . Em modelos de estresse oxidativo decorrente de agressão térmica, os eritrócitos exibem diminuição da atividade da catalase durante o processo hemolítico termo dependente (Ferreira & Matsubara, 1997).

c) Glutathiona Peroxidase (GPX— dependentes e não dependentes de selênio) enzima que tem um papel antioxidante, pois catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG. Embora a GPX tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (YU, 1994). Tem sido utilizada em monitoramento de contaminantes aquáticos.

Apesar de essas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por ERO, os organismos vivos podem vivenciar situações onde a proteção é insuficiente, quando isso acontece ocorre estresse oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 1989; STOREY, 1996). Algumas situações geradoras de estresse oxidativo já foram descritas como: ativação de fagócitos por microrganismos, radiação ionizante, xenobióticos, exercício físico extenuante, hiperóxia (Benzi, 1993; Yu, 1994; Pereira, 1994;), anóxia, hipóxia e isquemia (Ramos *et al.*, 2000). Praticamente todas as biomoléculas são suscetíveis à oxidação (Halliwell & Gutteridge, 1989), porém a peroxidação dos lipídios (Figura 2) das membranas celulares é um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelos radicais livres. As membranas das células e organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados. A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas



dos fosfolipídios e do colesterol e danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana, podendo levar ao seu rompimento. O ataque de algumas espécies reativas que abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados inicia o processo de peroxidação lipídica (Ramos *et al.*, 2000; Halliwell & Gutteridge, 1989). A decomposição dos hidroperóxidos resulta na formação do radical peroxila, que pode iniciar uma reação em cadeia, propagando a peroxidação lipídica (Jialal & Grundy, 1992).



**Figura 2.** Peroxidação lipídica iniciada pelo radical hidroxila. Adaptado de DEVLIN (2003).

## Biomarcadores

Os biomarcadores são comumente usados como indicadores precoces de alterações ambientais, antes da ocorrência de danos irreversíveis no ecossistema (Huggett *et al.* 1992). Os biomarcadores refletem o estado de saúde dos organismos nos níveis mais baixos de organização (molecular ou celular) e apresentam rápida resposta ao estresse e alta importância toxicológica. Existem também biomarcadores que refletem o estado de saúde em altos níveis de organização: populações, comunidades e ecossistemas. Estes respondem de forma mais lenta à presença de poluentes.

Jesus & Carvalho (2008), em sua revisão, classificam os biomarcadores como de exposição, efeito ou suscetibilidade, caracterizados assim:

Os biomarcadores de exposição são alterações biológicas mensuráveis que evidenciam a exposição dos organismos a um poluente. Um exemplo de biomarcadores de exposição são os parâmetros bioquímicos que têm sido testados em peixes com relação a suas respostas a substâncias tóxicas.

Os biomarcadores de efeitos, em geral, não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas são característicos da ocorrência de um estresse que poderá ser reversível tão logo o estressor cesse a atuação. São caracterizados pela indução de mecanismo de defesa celular, que se inicia sempre como uma resposta adaptativa em nível molecular/bioquímico. Entretanto, se esse mecanismo falha ou se sua capacidade de resposta é ultrapassada, poderão ser desencadeadas alterações fisiológicas ou histológicas, podendo ser irreversíveis, dependendo da capacidade do sistema ou órgão em responder ao estressor. Assim, o organismo pode ter afetada sua capacidade de reprodução



ou crescimento. Alguns desses biomarcadores são órgão-específico como enzimas que são lançadas na corrente sanguínea após lesão em tecidos.

Os biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de repostas ao longo do tempo e entre exposição e efeito (Barrett *et al.* 1997), determinando condições como: indivíduo sadio, compensação do metabolismo, perturbação das funções, alterações morfológicas e morte. Estas condições aumentam a taxa de transição entre esses dois extremos (exposição e efeito). Os organismos, mesmo da mesma espécie, não respondem igualmente a exposição aos xenobióticos. Sexo, jejum, estresse pelo confinamento, tamanho e estágio de desenvolvimento são parâmetros de variação nas respostas a estressores, bem como o polimorfismo genético de uma população. Estes biomarcadores correspondem aos chamados biomarcadores de efeito latente (Fossi & Leonzio 1993), significando que um organismo pode, em determinadas circunstâncias, ter limitada a habilidade de se adaptar ou sobreviver, o que pode ser determinado por mensuração de repostas fisiológicas que, analisadas em conjunto, expressam a diminuição da energia disponível para o crescimento.

Entre os biomarcadores de qualidade ambiental estão os de estresse oxidativo. Este pode ser verificado, por exemplo, através do nível de atividade de certas enzimas como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPX) e a glutathione S-transferase (GST) e da concentração de peroxidação lipídica e de oxidação de proteínas.

**Estresse Oxidativo, Defesas Antioxidantes em *Hoplerythrinus unitaeniatus* exposto ao ar atmosférico.**

### ***Hoplerythrinus unitaeniatus***

Segundo a classificação taxonômica de BRITSKI *et al.* (1984) o *Hoplerythrinus unitaeniatus* tem a seguinte classificação sistemática:

Superordem: Ostariophysi

Série: Otophysi

Ordem: Characiformes

Família: Erythrinidae

Gênero: *Hoplerythrinus*

Espécie: *Hoplerythrinus unitaeniatus*

Na América do Sul existem apenas três gêneros da família Erythrinidae: *Erythrinus* Scopoli, 1977; *Hoplias* Gill, 1903 e *Hoplerythrinus* GILL, 1895 (Godoy, 1975). *Hoplias* apresenta respiração exclusivamente aquática e os dois outros gêneros possuem respiração aérea facultativa. A distribuição geográfica do gênero *Hoplerythrinus* abrange o Peru, Bolívia, Venezuela, Guiana, Paraguai e Brasil (Godoy, 1979). Vulgarmente conhecido por jeju (SMITH, 1979) o *H. unitaeniatus* é a única espécie citada para este gênero. A espécie é ativa, carnívora, de crescimento rápido e ocorre em águas de inundação temporária (Lowe-McConnell, 1987).

Esta espécie extrai cerca de 25% de seu requerimento de O<sub>2</sub> através de bexiga natatória quando em águas normóxicas e, se o conteúdo de O<sub>2</sub> da água decresce drasticamente, a tomada de O<sub>2</sub> passa a ser diretamente do ar atmosférico (Mattias *et al.*, 1996). Fernandes *et al.* (1994) observaram que esta espécie apresenta filamentos branquiais curtos e poucas lamelas secundárias por filamentos, resultando em uma área branquial reduzida, característica de peixes de respiração aérea acessória.



### Biomarcadores de estresse oxidativo em *Hoplerythrinus unitaeniatus* exposto ao ar atmosférico.

Mariano (2006) estudou as defesas antioxidantes e o possível estresse oxidativo em *H. unitaeniatus* após exposição ao ar atmosférico e subsequente retorno ao ambiente aquático, de acordo com o seguinte desenho experimental:

- Um grupo (**Controle, T0**) foi mantido submerso nas mesmas condições de aclimação;
- Três grupos foram expostos ao meio aéreo (Figura 4) durante 1h (**T1**); 6 h (**T6**) e 12 h (**T12**), respectivamente.
- Dois grupos foram expostos ao meio aéreo durante 12 horas seguido de retorno ao meio aquático durante 1h (**TR1**) e 6h (**TR6**), para recuperação.



Figura 3. Exemplo de jeju, *Hoplerythrinus unitaeniatus* exposto ao ar atmosférico.

Mariano (2006) justifica seu trabalho demonstrando que os ajustes fisiológicos promovidos durante o estresse causado pela exposição aérea, como as possíveis alterações hormonais, metabólicas, hematológicas, dessecação e desequilíbrio osmótico-iônico levaram a um aumento no consumo de  $O_2$  e, com isso, gerou uma maior produção de radicais livres, bem como de defesas antioxidantes.

**Tabela 1.** Valores plasmáticos médios ( $\pm$  E.P.M.) da Concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol  $Fe^{3+}$ /g tec.), Proteínas Totais (mg/mL) e da atividade das enzimas antioxidantes Glutathione Peroxidase – GPX (nmol/mg prot) e Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) do jeju, *H. unitaeniatus*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). \* indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (T0).

	Controle	Exposição ao ar atmosférico (h)			Recuperação em Meio Aquático (h)	
	T0	T1	T6	T12	TR1	TR6
<b>HP</b> (nmol $Fe^{3+}$ /mL pl)	20,03 $\pm 0,44$	22,66 $\pm 0,40^*$	21,12 $\pm 0,28$	20,27 $\pm 0,27$	20,58 $\pm 0,27$	20,98 $\pm 0,57$
<b>Proteínas</b> (mg/mL)	18,43 $\pm 0,81$	21,70 $\pm 0,48$	22,81 $\pm 0,84$	20,46 $\pm 0,55$	19,50 $\pm 0,39$	17,91 $\pm 0,37$
<b>GPX</b> (nmol/mg prot)	3,88 $\pm 0,15$	4,06 $\pm 0,20^*$	4,83 $\pm 0,17^*$	5,27 $\pm 0,18^*$	5,85 $\pm 0,25^*$	5,91 $\pm 0,38^*$
<b>SOD</b> (USOD/mg prot)	137,62 $\pm 4,03$	107,93 $\pm 2,16$	74,61 $\pm 3,63$	59,83 $\pm 4,16^*$	35,33 $\pm 3,19^*$	35,09 $\pm 2,53^*$

O aumento na concentração plasmática de hidroperóxidos em *H. unitaeniatus* durante a primeira hora de exposição ao ar atmosférico (grupo T1) (Tabela 1) sugere um estresse oxidativo durante esse período, mas que logo foi controlado, possivelmente pela atuação das enzimas antioxidantes, principalmente a GPX cuja concentração



aumentou significativamente durante toda a exposição aérea e inclusive após o retorno ao meio aquático.

A produção de radicais livres pelas células pode ocorrer por auto-oxidação de pequenas moléculas, como as catecolaminas (CA) (Yu, 1994; Storey, 1996), o que pode ter influenciado no aumento dos HP durante a primeira hora de exposição ao ar, já que a síntese e liberação de CA acontecem imediatamente após a atuação do estímulo estressor, neste caso a exposição ao ar atmosférico. Com a possível diminuição das CA não oxidadas e o aumento da concentração da GPX os níveis de HP retornaram aos valores apresentados pelo grupo controle.

**Tabela 2.** Valores hepáticos médios ( $\pm$  E.P.M) da Concentração de Hidroperóxidos (HP) (nmol  $\text{Fe}^{3+}$ /g tec.), Proteínas Totais (mg/mL) e da atividade das enzimas antioxidantes Glutationa Peroxidase – GPX (nmol/mg prot), Superóxido Dismutase - SOD (U SOD/mg prot) e Catalase- CAT (U B/ mg prot) do jeju, *H. unitaeniatu*, durante exposição ao ar e subsequente recuperação em meio aquático (n = 8). \* indica diferença estatística (p < 0,05) em relação ao grupo controle (T0).

	Controle		Exposição ao ar atmosférico (h)		Recuperação em Meio Aquático (h)	
	T0	T1	T6	T12	TR1	TR6
<b>HP</b> (nmol $\text{Fe}^{3+}$ /mL pl)	233,85 $\pm$ 19,13	212,20 $\pm$ 19,32	254,85 $\pm$ 14,64	205,68 $\pm$ 17,73	195,59 $\pm$ 11,69	244,73 $\pm$ 13,02
<b>Proteínas</b> (mg/mL)	6,20 $\pm$ 0,24	6,46 $\pm$ 0,28	7,44 $\pm$ 0,23	8,23 $\pm$ 0,57*	7,40 $\pm$ 0,128	7,12 $\pm$ 0,528
<b>GPX</b> (nmol/mg prot)	17,53 $\pm$ 1,67	23,17 $\pm$ 1,73*	24,09 $\pm$ 1,54*	24,82 $\pm$ 0,55*	23,96 $\pm$ 1,37*	25,27 $\pm$ 1,95*
<b>SOD</b> (USOD/mg prot)	200,16 $\pm$ 8,51	186,01 $\pm$ 11,48	157,91 $\pm$ 4,06*	126,86 $\pm$ 8,19*	127,14 $\pm$ 5,36*	158,45 $\pm$ 11,58*
<b>CAT</b> (U B/mg prot)	40,01 $\pm$ 1,89	36,47 $\pm$ 2,35*	31,01 $\pm$ 1,97*	23,84 $\pm$ 2,18*	26,2 $\pm$ 2,1*	30,34 $\pm$ 1,38*

O conjunto das substâncias que neutralizam os efeitos danosos dos radicais livres de oxigênio constitui o sistema de defesas antioxidantes. Neste sistema estão incluídas as enzimas SOD, CAT e a GPX, citada acima, que não estão exclusivamente no citosol, mas também nas mitocôndrias, onde grande parte das ERO é produzida (JI, *et al.*, 1988; Storey, 1996; Hermes-Lima & Zenteno-Savín, 2002).

Em meio ácido, o  $\text{O}_2^-$  rapidamente forma o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , já em meio neutro ou pH alto a dismutação do  $\text{O}_2^-$  é catalisada pela SOD (Gregory & Fridovich, 1973; Fridovich, 1978, 1995). A diminuição da SOD tanto no fígado (Tabela 2) quanto no plasma apresentada em todos os grupos a partir de 6 horas de exposição ao ar e nos grupos de recuperação pode ter sido influenciado pela diminuição do pH, pois como a conversão  $\text{O}_2^-$  à  $\text{H}_2\text{O}_2$  poderia ter acontecido pela acidez do meio a SOD teve sua atividade reduzida neste processo.

Quando os peixes voltaram ao ambiente aquático, apesar do pH estar restaurado, a concentração da SOD ainda permaneceu reduzida em TR1 e TR6, apresentando diferença significativa quando comparado com o grupo controle. Possivelmente 6 horas de recuperação em meio aquático não são insuficientes para restauração dos níveis desta enzima ou ainda pela redução da produção do radical  $\text{O}_2^-$  durante a exposição aérea. O resultado mostrado corrobora com o estudo de Pannunzio & Storey (1998) realizado com gastrópoda, *Littorina littorea*, que foi submetido a 6 dias de anóxia e que mostrou redução da atividade da SOD quando comparado com o grupo controle, sendo que a recuperação durante 12 horas não foi suficiente para que retornasse ao nível do grupo controle.

A diminuição da atividade hepática da enzima CAT em todos os grupos de jejuns submetidos à exposição aérea, mesmo evidenciando uma tendência a aumentar durante a recuperação, e o aumento da enzima GPX (hepática e plasmática) em todos os grupos experimentais (tanto os



grupos de exposição ao ar como os grupos de recuperação em meio aquático - Tabelas 1 e 2) estão relacionados à diminuição da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, principalmente pelo aumento do pH na recuperação. Chung-Man *et al.* (2001) verificaram que na presença de baixos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os peróxidos são eliminados, preferencialmente, pela GPX, enquanto que em altas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> predomina a CAT, o que pode explicar os resultados obtidos neste estudo com jejus.

A GPX, segundo Devlin (2003), é um importante mecanismo de proteção o dano causado por radicais de oxigênio, pois catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e de peróxidos de lipídios. Essa enzima contendo selênio utiliza grupos sulfidril da glutathiona (GSH) como doador de hidrogênio para formação da forma dissulfeto oxidada da glutathiona (GSSG). Glutathiona redutase (GR) converte a forma dissulfeto da glutathiona de volta à forma sulfidril usando NADPH produzido na via das pentoses fosfatos como doador de elétrons.

A oxidação dos aminoácidos pelas ERO induz mudanças físicas nas proteínas constituídas por eles (Griffiths *et al.*, 1988). As proteínas são seletivamente fragmentadas nos resíduos de prolina (radical hidroxila), bem como nos aminoácidos histidina e arginina, que estão em íntima associação com os metais de transição (Wolff & Dean, 1986). A degradação proteolítica é o resultado das alterações da conformação protéica que podem ocorrer pela ação das ERO (Marx & Chevion, 1986). A atuação das ERO sobre as proteínas no presente estudo não parece ter sido significativa, pois a concentração de proteínas totais (plasmática e hepática) não demonstrou diferença, exceto em T12 no fígado, quando ocorre um aumento em relação ao grupo controle, o que pode estar associado à perda d'água.

Apesar da diminuição da atividade da CAT e da SOD, a peroxidação lipídica das membranas não foi evidenciada

no presente estudo, não sendo possível afirmar que houve estresse oxidativo durante a maioria do tempo de exposição aérea e subsequente retorno ao ambiente aquático, exceto em T1 (plasma). RAMOS *et al.* (2000) relataram que 1 hora de recuperação após 8 horas de anóxia no peixe *Carassius auratus*, causou um aumento de 100% no nível de peroxidação lipídica hepática e que a atividade hepática da CAT, durante a anóxia, serviu para manter a peroxidação lipídica em níveis fisiologicamente suportáveis. Durante a exposição aérea do *H. unitaeniatus*, o resultado da concentração de HP, atividade das enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPX) e proteínas totais mostram que apesar de ter maior acesso ao O<sub>2</sub> pelo aumento do número de eritrócitos/hemoglobina, e maior disponibilidade de O<sub>2</sub> na atmosfera não demonstrou estresse oxidativo, exceto na primeira hora (T1). A diminuição do pH e o aumento da concentração da GPX podem ter corroborado com a minimização dos efeitos das ERO em *H. unitaeniatus* durante 12 horas de exposição aérea e recuperação em ambiente aquático.

### Considerações Finais

Uma prevalência de processos pró-oxidativos leva a um aumento de danos oxidativos, tornando o organismo suscetível ao estresse oxidativo. Dentre esses danos estão a lipoperoxidação, oxidação de proteínas e o dano ao DNA. Contra estas oxidações, existem nos organismos vivos mecanismos não-enzimáticos (vitamina E, β-caroteno, selênio, vitamina C, glutathiona reduzida) e enzimáticos (SOD, CAT, GPX, GR, GST). Vários mecanismos estão envolvidos na ação antioxidante celular e muitos antioxidantes podem ser utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo. As atividades enzimáticas das enzimas antioxidantes são utilizadas como biomarcadores de



contaminação ambiental. Em muitos casos podem indicar uma alteração e a presença e o efeito de contaminantes na saúde dos organismos aquáticos.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE-JUNIOR, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. 2005. Os Radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. *J. Bras. Pneumol.*, 31(1) 60-68.

BARBOSA, D. S. 2001. *Efeito do tratamento com Sulfassalazina e Ácido graxos  $\alpha$ -3 de óleo de peixe sobre o estresse oxidativo na retocolite ulcerativa inespecífica*. Tese (Doutorado) UNESP – Faculdade de Medicina de Botucatu. Botucatu (SP).

BARRETT, J.C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D. & GOLDSTEIN, B.D. 1997. 12TH Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. *Environ. Health Perspec.*, 105: 699–737.

BARRETO, R.E. 2002. *Estressor social facilita estresse na tilápia-do-Nilo?* Dissertação (Mestrado) UNESP - Universidade Estadual Paulista-Botucatu. Botucatu, SP. 38p.

BARTOSZ G, TANNERT CH, FRIED R, LEYKO W. 1978. Superoxide dismutase activity decreases during erythrocyte aging. *Experientia*; 34: 1.464.

BENZI, G. 1993. Antioxidant nutrients and immune functions. In: PHILLIPS, M. & TERGERDY, R.P. (eds). *Advances in Exp. Med. Biol.* Bendich, APlenum Press. N.Y. and London, 1990.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. 1984. *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias*. Câmara dos Deputados/Codevasf, Brasília, 143.

CANNON, W. 1929. Organization for physiology homeostase. *Physiol. Rev.* 9, 399. 431.

CANNON, W. 1939. *The wisdom of the body*. Ed. W. W. Norton, New York.

CHUNG-MAN, H.J.; ZHENG S.; COMHAIR, S.A.; FARVER, C. 2001. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Res.* 61, 8578-8585.

DEVLIN, T.M. 2003. *Manual de Bioquímica com correlações clínicas*. Edgard Blucher(eds). São Paulo, 521-523.

DONALDSON, E.M. 1981. The pituitary-interrenal Axis as an indicator of stress in fish. In: *Stress and Fish*, PICKERING, A.D. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 11-47.

DROGE, W. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.

FERNANDES, M.N.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L.; MORON, S.E. 1994. Comparative study of gill dimensions of three erythrinid species in relation to their respiratory fuction. *Can. J. Zool.* 72, 160-165.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil* 43(1):61-8.

FITZGERALD, J.P. 1992. Comparative analysis of superoxide dismutase activities in a range of temperate and tropical teleost fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 101B,111–114.

FOSSI, C.; LEONZIO, C. 1993. Nondestructive biomarkers in vertebrates. Boca Raton. Floride, Lewis. 313p.

FRIDOVICH, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science.* 201, 875-780.

FRIDOVICH, I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutase. *Annu. Rev. Biochem.* 64-97.

GAUTHIER, P.; NADEAU, R.; DE CHAMPLAIN, J. 1972. Acute and chronic cardiovascular effects of 6-hydroxydopamine in dogs. *Circ. Res.* 31, 207-217.

GODOY, M.P., 1975. Família Erythrinidae. In: *Peixes do Brasil, Subordem Caracoidei*. Bacia do Rio Mogi Guaçu, Editora Franciscana, Piracicaba. 3, 440-444.

GODOY, M.P. 1979. *Rio Iguazu, Paraná, Brasil. Reconhecimento da ictiofauna, modificações ambientais e usos múltiplos dos reservatórios*. Eletrosul, Rio de Janeiro, 33p.

GREGORY, E.M.; FRIDOVICH, I. 1973. Oxygen toxicity and the superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 114, 1193-1197.

GRIFFITHS, H.R.; UNSWORTH, J.; BLAKE, D.R.; LUNEC, J. 1988. *Free radicals in chemistry, pathology and medicine*. London: Richelieu. pp. 439-454.

HATHERILL J.R.; TILL G.O.; WARD P.A. 1991. Mechanisms of oxidantinduced changes in erythrocytes. *Agents-Actions.* 32, 351-8.



HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. 1989. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press. p 543.

HERMES-LIMA, M.; ZENTENO, SAVÍN. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 133, 537-556.

HUGGETT, R.J.; KIMERLE, R.A.; MEHRLE J.R., P.M. (1992). *Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Bergman, H.L. (Ed). Boca Raton, FL, USA.

JESUS, T.B. & CARVALHO, C.E.V. 2008. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (hg). *Oecol. Bras.* 12 (4), 680-693.

JL, L.L., STRATMAN F.W.; LARDY, H.A. 1988. Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. Influences of selenium deficiency, chronic training, and acute exercise. *Arch. Biochem. Biophys.* 263, 150-160.

JIALAL, I.; GRUNDY, S.D. 1992. *Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation*. Annals of the New York Academy of Sciences. New York. 669 (30), 239-248

JULIEN, C.; KANDZA, P.; BARRESC. L.O.M.; CERUTTI, C.; SASSARD, J. 1990. Effects of sympathectomy on blood pressure and its variability in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 259,1337-1342.

LI, N.; KARIN, M. 1999. Is NF-kB the sensor of oxidative stress? *Faseb J.* 13, 1137-43.

LOWE-MCCONNEL, R.H. 1987. *Ecological studies in tropical fish communities*. Cambridge University Press, Cambridge 382.

MARIANO, W. S. 2006. *Respostas Fisiológicas e Bioquímicas do jeju, Hoplerthrinus unitaeniatus (Characiformes, Erythrinidae) a exposição aérea*. 72p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

MARIANO, W.S.; OBA, E.T.; SANTOS, L.R.B.; FERNANDES, M.N. 2009. Respostas fisiológicas de jeju, *Hoplerthrinus unitaeniatus* (Characiformes, Erythrinidae) expostos ao ar atmosférico. *Rev. Bras. Saúde Prod. An.* 10 (1), 210-223.

MARX G.; CHEVION M., 1986. Site-specific modification of albumin by free radicals. Reaction with copper and ascorbate. *Biochem. J.* 236, 397-400.

MATTIAS, A. T.; MORON, S. E.; FERNANDES, M. N. 1996. Aquatic respiration during hypoxia of the facultative air-breathing fish, *Hoplerthrinus unitaeniatus*. A comparison with the water-breathing, *Hoplias malabaricus*. In: VAL, A.L. ALMEIDA-VAL, V.M.F. & RANDLL,

D.J., (eds.). *Physiology and Biochemistry of the fishes of the Amazon*., INPA, Manaus, p. 203-211.

MAZEAUD, M.M.; MAZEAUD, F. 1981. Adrenergic responses to stress in fish. In: PICKERING, A.D. *Stress and Fish*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 49-75.

NANDI, J. 1962. The structure of the interrenal gland in teleost fishes. *Univ. of Calif. Publs Zool.* 65, 129-211.

NOLAN, D.T., 2000. *Skin response of fish to stressors*. Tese de Doutorado – Universidade Católica de Nijmegen, Holanda.

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

PANNUNZIO, M.T.; STOREY, K.B. 1998. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221, 277-292.

PEREIRA, B. 1994. Exercício físico como pró-oxidante. *Rev. Paul. Ed. Fis.* 8, 77- 89.

PERRY, S.F.; LAURENT, P. 1993. Environmental effects on fish gill structure and function. In: RANKIN, J.C. JENSEN, F.B. *Fish Ecophysiology*. Chapman & Hall, London, p. 231-264.

PICKERING, A.D., 1981. *Stress and Fish*. London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco: Academic Press, 1-9.

PICKERING, A.D.; POTTINGER, T.G. 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. and Biochem.* 7 (1-4), 253-258.

POTTINGER, T.G.; CARRICK, T.R.; APPLEBY, A.; YEOMANS, W.E. 2000. High blood cortisol levels and low cortisol receptor affinity: is the chub, *Leuciscus cephalus*, a cortisol-resistant teleost? *Gen. Comp. Endocrinol.* 120, 108-117.

RAMOS, G.; ALVES, A.L.; HERMES-LIMA, M. 2000. Radicais livres, antioxidantes e adaptabilidade animal. In: EL-HANI, C.N.; VIDEIRA, A.A.P. (eds). *O que é vida: para entender a biologia do século XXI*. 209-231.

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

SMITH, N.J.H. 1979. *A pesca no rio Amazonas*. IMPA, Manaus, 1979. p.154.



STOREY, K.B. 1996. Oxidative stress: animal adaptations in nature. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29 (12), 1715-1733.

SCHRECK, C.B. 1981. Stress and compensation in teleostean fishes: response to social and physical factors. In: PICKERING, A.D.(EDS), *stress and fish*. Academic Press, London, 295-321.

URSO, M.L.; CLARKSON, P.M. 2003. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 189, 41-54.

VIGAS, M. 1980. Contribution to the understanding of the stress concept. In: USDIN, KVETRIANSKY, KOPIN. (eds) *Catecholamines and stress: Recent advances*. Elsevier, North Holland 573-577.

WALKER, C.H.; HOPKIN, S.P.; SIBLY, R.M.; PEAKALL, D.B. (2001). *Principles of Ecotoxicology*. 2nd Ed. Taylor & Francis, Ed..London. 549p.

WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. The Stress Response in Fish. *Physiol.* 77, 591-625.

WOLFF. S.P.; DEAN, S.T. 1986. Fragmentation of protein by free radical and its effect on their susceptibility to enzymic hydrolysis. *Biochem. J.* 234, 399-403.

YU, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* 74, 139-161.