

1. Introdução

1.1 Origem e toxicidade da Amónia

A amónia é um composto formado por um átomo de azoto e três de hidrogénio, organizados espacialmente em forma de pirâmide trigonal com vértice no átomo de azoto, descrito pela fórmula NH_3 . Este composto pode ser encontrado em todos os meios ambientes, ocorrendo em maior quantidade no meio aquático, no qual é particularmente miscível devido à sua polaridade e formando frequentemente iões de amónio, NH_4^+ . A amónia é excretada por plantas e animais, produzida como resultado do catabolismo dos compostos azotados, da decomposição de organismos, actividade de microorganismos, mas também devido a descargas de fertilizantes, emissões industriais ou actividade vulcânica (Randall e Tsui, 2002).

Mesmo baixas quantidades de amónia no meio ambiente são tóxicas. Apesar da sua natureza gasosa, a exposição terrestre não é usualmente um problema, pois mesmo havendo uma continua volatilização desta da superfície, a amónia na atmosfera é rapidamente destruída por reacções fotolíticas. Contudo alguma dessa amónia retorna à superfície terrestre como deposição húmida ou seca, e vários sais de cloreto, sulfato ou bicarbonato são relativamente comuns na composição dos solos. Ao contrário do que acontece no meio terrestre, elevadas quantidades de amónia são introduzidas no meio aquático, o que constitui um grave problema ambiental. Os escoamentos urbanos e de agricultura e a maioria das excreções biológicas são libertadas nos rios e oceanos e a preocupação relativamente à toxicidade por amónia nos sistemas aquáticos, é particularmente elevada em regiões com grande grau de urbanização e/ou elevado numero de quintas de animais, como as de criação de suínos e bovinos (Randall e Tsui, 2002).

Nos organismos a produção de amónia provém da transaminação e subsequente desaminação dos L-aminoácidos em excesso (Wilkie, 1997). Apesar desta libertação natural (Ip *et al.*, 2001; Randall and Tsui, 2002), para muitos animais a amónia, e a sua forma ionizada, o ião amónio, NH_4^+ , é muito tóxica nos mamíferos (com um DL_{50} de aproximadamente 0.005 mmol/L) (Withers, 1998), sendo os vertebrados aquáticos em geral mais tolerantes à amónia que os vertebrados terrestres, mantendo valores de

amónia no plasma por volta dos 0.2 mM (Anderson, 2001). Para os mamíferos, aqueles valores relativamente baixos de amónia no plasma (≥ 0.005 mM) são altamente tóxicos para o sistema nervoso central (Wright, 1995). Este efeito sobre o sistema nervoso central dos organismos faz com que existam poucos animais tolerantes a elevados níveis de amónia, sendo na sua maioria invertebrados, como são exemplos o decápode marinho *Notostomus gibbosus* que tolera uma concentração na sua hemolinfa de 217 mmol/L ou o isópode terrestre *Porcellio scaber* que tolera uma concentração superior a 100 mmol/L (Withers, 1998).

Como referido anteriormente e descrito em vários estudos (p.ex. Ip *et al.*, 2001a) a elevada toxicidade da amónia é causada maioritariamente devido ao seu efeito no sistema nervoso central dos vertebrados. O efeito mais grave relacionado com a amónia está relacionado com a capacidade de NH_4^+ substituir K^+ nos transportadores iónicos (Binstock e Leckar, 1969). Foi também proposto que a toxicidade da amónia é mediada por activação excessiva de receptores de glutamato do tipo NMDA (responsivos a N-methyl-D-aspartate) (Marcaida *et al.*, 1992). A activação excessiva destes receptores leva a influxo de Ca^{2+} e Na^+ nas células nervosas. O aumento intracelular de Ca^{2+} vai activar as enzimas e uma cascata de reacções acontece que acaba por levar à morte da célula. Bloqueando os receptores do tipo NMDA em ratos através de antagonistas como o MK-801 uma redução significativa da taxa de mortalidade por amónia é observada (Randall e Tsui, 2002). poder-se á então especular que a causa primária da toxicidade da amónia em todos os vertebrados é devido ao aumento dos níveis de glutamina extracelular no cérebro, que causa uma activação excessiva dos receptores NMDA e subsequente morte neuronal. Contudo foi também sugerido que isto pode não ser desta forma. Hermengildo e colegas (2000) mostraram que a activação dos receptores NMDA precedia ao aumento dos níveis extracelulares de glutamato e propuseram que a activação inicial dos receptores NMDA era devido ao efeito de despolarização de NH_4^+ nos neurónios. Previamente havia sido sugerido que NH_4^+ pode substituir K^+ e afectar o potencial de membrana do neurónio da lula gigante (Binstock e Lecar, 1969); Beaumont e colegas (2000) identificaram níveis elevados de despolarização nas fibras musculares de trutas com elevados níveis de amónia no seu tecido, que coincide com o efeito previsto. Uma das consequências da activação excessiva dos receptores NMDA é a depleção de ATP, que inverte a absorção de glutamato pelo mecanismo sódio-dependente. Segundo esta proposta, o aumento de glutamato extracelular é portanto uma consequência, e não a causa, da activação dos

receptores NMDA. Portanto, a causa primária da intoxicação por amónia poderá ser o efeito de despolarização de NH_4^+ nos neurónios, levando a uma excessiva activação dos receptores NMDA e subsequente morte da célula (Randall e Tsui, 2002).

Apesar da sua elevada toxicidade, a excreção de amónia é a forma energeticamente mais favorável de eliminar compostos azotados no meio aquático, pois devido à sua fácil miscibilidade difunde-se rapidamente e a sua concentração local é diminuta. Talvez por isso a maioria das espécies de peixe não tolere elevada concentração de amónia ambiental. Contudo algumas espécies que habitam nichos específicos ou com características de vida particulares são amónio-tolerantes, e possuem uma variedade de estratégias para evitar a toxicidade da amónia (Randall e Tsui, 2002) (Figura 1).

1.2 Estratégias utilizadas por peixes para evitarem intoxicação por amónia

1.2.1 Redução de produção de amónia

A redução de produção de amónia é uma estratégia para diminuir o problema da toxicidade da amónia, observada em vários peixes quando expostos a pH elevado (Wilson *et al.*, 1998) ou expostos ao ar (Lim *et al.*, 2001). Por exemplo, quando expostos a condições aéreas em escuridão constante os saltadores de lodo, ou Saltão-da-vasa, *Periophthalmodon schlosseri* e *Boleophthalmus boddarti*, reduziram significativamente a sua taxa de excreção tanto de amónia como de ureia (Lim *et al.*, 2001).

Wilson e colegas (1998) também concluíram que a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, reduziu a produção de amónia quando exposta a pH 10. Um pH ambiental elevado reduz o gradiente de difusão de NH_3 , podendo levar a um aumento dos níveis de amónia dentro dos peixes (Wilkie e Wood, 1996) e a morte pode ocorrer quando o aumento é muito rápido e/ou os níveis tóxicos são alcançados (Wilkie *et al.*, 1993). Wilson e colegas (1998) observaram que houve uma significativa diminuição na excreção da amónia, e a acumulação de amónia, ureia e glutamina no corpo não foi significativa para contar como redução da excreção de amónia. Estes autores concluíram que a truta arco-íris minora a acumulação de amónia quando exposta a elevado pH na água diminuindo a produção de amónia.

1.2.2 Excreção activa de iões de amónio

Wilson e Taylor (1992) descobriram que a truta arco-íris podia excretar parte da sua amónia armazenada contra níveis ambientais elevados, de amónia, tanto em água doce como em água salgada, sugerindo que NH_4^+ poderá ser trocado activamente por H^+ em água doce e Na^+ em água salgada.

O saltador de lodo, *Periphalmodon schlosseri*, é capaz de sobreviver tanto em água com elevados níveis de amónia como quando exposto a ambientes terrestre através da excreção activa de iões de amónio (Randall *et al.*, 1999). Possuem também níveis elevados de iões sensíveis à amónia, Na^+/K^+ ATPase e um co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ na membrana basolateral, (a acção de ambos consegue mover iões de amónio para a célula epitelial), sugerindo, que os iões de amónio seriam movidos através da membrana apical em troca de sódio (Wilson *et al.*, 2000).

1.2.3 Produção de Glutamina

Muitos peixes transformam a amónia em glutamina quando expostos a elevada amónia ambiental. Níveis cerebrais de glutamina mostraram uma correlação linear com o ambiente quando peixes dourados *Carassius auratus* (Linnaeus, 1758) foram expostos até 0.75 mM de NH_4Cl (Levi *et al.*, 1974). Quando expostos a 0.75mM de NH_4Cl durante 24-48 h, a glutamina cerebral nos peixes dourados aumentou 10 vezes.

A glutamina é formada a partir de glutamato e NH_4^+ pela enzima glutamina sintetase (GSase). Glutamato é por sua vez produzido a partir de α -ketoglutarato e NH_4^+ pela enzima glutamato desidrogenase. Portanto, a começar com α -ketoglutarato, a formação de 1 mole de glutamina irá destoxificar 2 moles de NH_4^+ (Ip *et al.*, 2001 b). A elevada actividade da GSase geralmente observada no tecido cerebral ser é atribuída aos mecanismos de desintoxicação da amónia, que protegem os órgão sensíveis à amónia tanto nos mamíferos (Cooper e Plum, 1987) como nos peixes (Ip *et al.*, 2001b). É possível que a principal força selectiva para o desenvolvimento desta estratégia, tenha sido a necessidade de lidar com o pico de amónia que acontece depois da alimentação, especialmente em espécies de peixe carnívoras. Uma vantagem desta estratégia é que a glutamina pode ser armazenada nos tecidos e fica disponível para ser utilizada como substrato oxidativo após o peixe retomar às condições normais. Contudo, uma desvantagem é que por cada mole de amónia destoxificada, 2 moles de equivalente ATP são dehidrolizadas (Randall e Tsui, 2002).

1.2.4 Transformação de Amónia em Ureia

Alguns peixes têm a capacidade de converter a amónia num produto menos tóxico, ureia, pelo ciclo ornitina-ureia. O xarroco *Opsanus beta*, um membro da família Batrachoididae é uma das poucas espécies em que o ciclo está activo. Este peixe produz ureia pelo ciclo ornitina-ureia e liberta-a em pulsos (Wood *et al.*, 1995), aparentemente de forma facultativa e sem uma clara relação com a amónia ambiental.

A tilapia do Lago Magadi (*Alcolapia grahami*) é outro teleosteo ureotélico conhecido e essa característica deve-se ao seu, único e extremo, meio ambiente (Randall *et al.*, 1989; Wood *et al.*, 1989; Wright *et al.*, 1990; Wood *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 2001a). Este peixe vive no quente (água pode chegar aos 40°C), alcalinizado (pH 10) e altamente tamponizado (total CO₂ = 180 mmol/L) Lago Magadi situado no Quénia (Coe, 1966), condições estas que matariam a grande maioria dos teleósteos. O pH alcalino e elevada capacidade de tampão da água faz com que a excreção difusiva da amónia seja impossível, maioritariamente porque o gradiente de difusão sangue-água para NH₃ ser extremamente baixo quando o pH está acima do pK (9.0-9.5) da reacção NH₃/NH₄⁺ (Randall e Wright, 1989). Em adição, ao facto de que, devido à elevada capacidade de tampão da água, a capacidade das brânquias conseguirem acidificar a camada de água que as envolve não é possível e assim a conversão de NH₃ para NH₄⁺ na água que passa nas brânquias, que facilitaria a excreção de NH₃, não acontece (Wright, Randall e Perry, 1989; Wood *et al.*, 1989). Devido a isto, a tilapia apenas excreta ureia e fá-lo a taxas de 5000-10000 µmol-N·k⁻¹·h⁻¹ (Wood *et al.*, 1989).

O saltador de lodo Indiano (*Heteropneustes fossilis*) consegue produzir ureia, para evitar intoxicação por amónia, quando expostos ao ar (Saha *et al.*, 2001).

Apesar da maioria dos peixes manter os genes que codificam as enzimas deste ciclo, este mecanismo parece estar suprimido na maioria dos teleósteos adultos devido ao facto do processo de difusão para o meio ambiente ser normalmente suficiente para eliminar a amónia e requerer menos energia do que produzir ureia. No entanto, os embriões de peixes utilizam as proteínas do saco embrionário numa taxa elevada durante o desenvolvimento resultando numa elevada taxa de produção de amónia durante um período em que a perda por difusão é reduzida por causa do sistema circulatório e as brânquias ainda estarem em desenvolvimento. Por isso muitos embriões de peixes têm um ciclo ornitina-ureia activo e convertem a amónia em ureia, evitando a intoxicação por amónia nos primeiros estágios de desenvolvimento (Wright *et al.*, 1995). A produção de ureia é portanto utilizada por varias espécies de peixes

durante o desenvolvimento ou sob certas condições ambientais, como exposição ao ar ou pH alcalino da água, para evitar problemas de acumulação e toxicidade por amónia.

Num caso de adaptação com contornos diferentes, os elasmobrânquios produzem ureia utilizando amónia pelo ciclo ornitina-ureia para aumentarem a sua osmolaridade corporal e assim reduzirem os gastos energéticos com osmorregulação; no entanto também excretam a maioria dos seus catabolitos azotados sob a forma de ureia através das brânquias (Randall e Tsui, 2002).

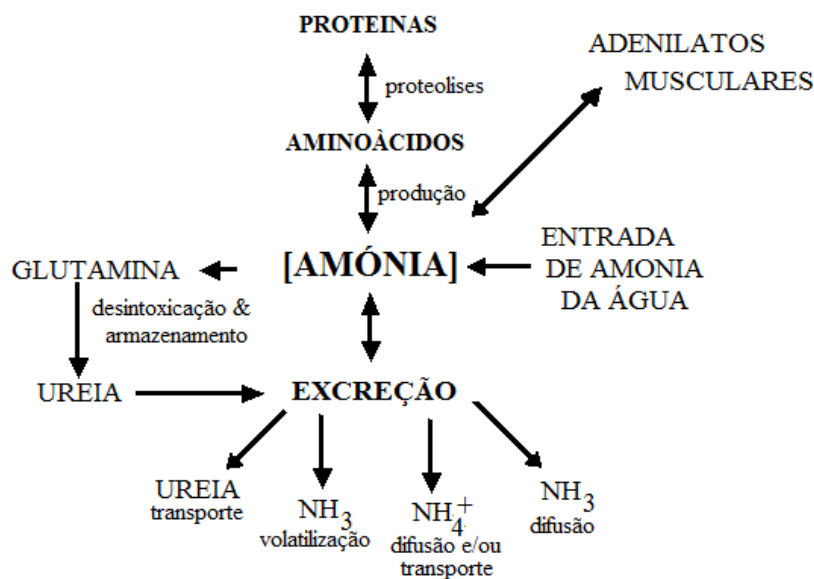


Figura 1 – Sumário das diferentes estratégias utilizadas para evitar intoxicação por amónia (adaptado de Ip *et al.*, 2001a, b).

1.3 Ciclo da ureia

A síntese e retenção de ureia nos primeiros vertebrados foi uma importante pré-adaptação para a invasão do ambiente terrestre. Como já referido em elasmobrânquios, mas também em celacantos (*Latimeria* sp.), o elo extante mais antigo na transição para os tetrápodes, a ureia é retida em elevada concentração (~400 mmol/l) para contrabalançar o estresse osmótico provocado pela água salgada e a ureia constitui também o maior produto de azoto excretado em elasmobrânquios (~98% do azoto é eliminado como ureia na espécie *Squalus acanthias*) (Wood *et al.*, 1995).

A ureia é essencialmente sintetizada a partir de dois iões de amónio e um dióxido de carbono com um custo energético de 4 moléculas de ATP. Mais

especificamente, o ciclo da ureia consiste em cinco reacções - duas dentro da mitocôndria e três no citoplasma. O ciclo utiliza dois grupos amino, um do NH_4^+ , e um do aspartato, e um carbono do HCO_3^- para formar a ureia. Estas reacções utilizam a energia de quatro ligações de fosfato (3 de ATP, que são hidrolizadas a 2 ADP, e 1 AMP). A molécula de ornitina é a transportadora desses átomos de carbono e nitrogénio.

O primeiro passo no ciclo ornitina-ureia, que ocorre na mitocôndria, é a formação de carbamoil fosfato a partir de dióxido de carbono e substrato azotado (NH_4^+ ou glutamina) pela enzima carbamoil-fosfato sintetase (CPSase). O carbamoil fosfato é depois condensado com ornitina para formar citrulina, que é convertida em arginosucinato e depois em arginina, que é depois dividida pela arginase em ureia e ornitina (formando o ciclo ornitina-ureia) (figura 2).

O ciclo ornitina-ureia é uma serie de complexas reacções bioquímicas, envolvendo substratos e enzimas distribuídas entre o espaço intramitocondrial e o citosol da célula. Contudo, pode ser considerado como uma interacção de duas vias lineares, uma para a síntese de arginina a partir de glutamina (envolvendo CPSase) e outra para a quebra da arginina (pela arginase) para formar ornitina como fonte de energia e ureia como sub-produto. Estas vias estão amplamente presentes desde bactérias e eucariotas primitivos até vertebrados.

Ao contrário dos mamíferos, em que o primeiro passo do ciclo ornitina-ureia é a fixação, mitocondrial, de amónia pela enzima CPSase I, que utiliza directamente a amónia como substrato. A maioria dos peixes que excretam maioritariamente ureia como desperdício de azoto (ureogénicos) possui a enzima CPSase III, que tipicamente tem preferência por glutamina em vez de amónia como doador de azoto para a formação de carbamoil fosfato. O fornecimento de glutamina para a CPSase III é feito pela enzima glutaminase sintetase (GSase), que pensa-se estar co-localizada nos mesmos hepatocistos que o ciclo ornitina-ureia. Por isso, em contraste com os mamíferos, nos peixes ureogénicos, GSase é vista como a chave para a fixação de azoto no primeiro passo na produção de ureia, em adição á sua função de capturar amónia no sistema nervoso.

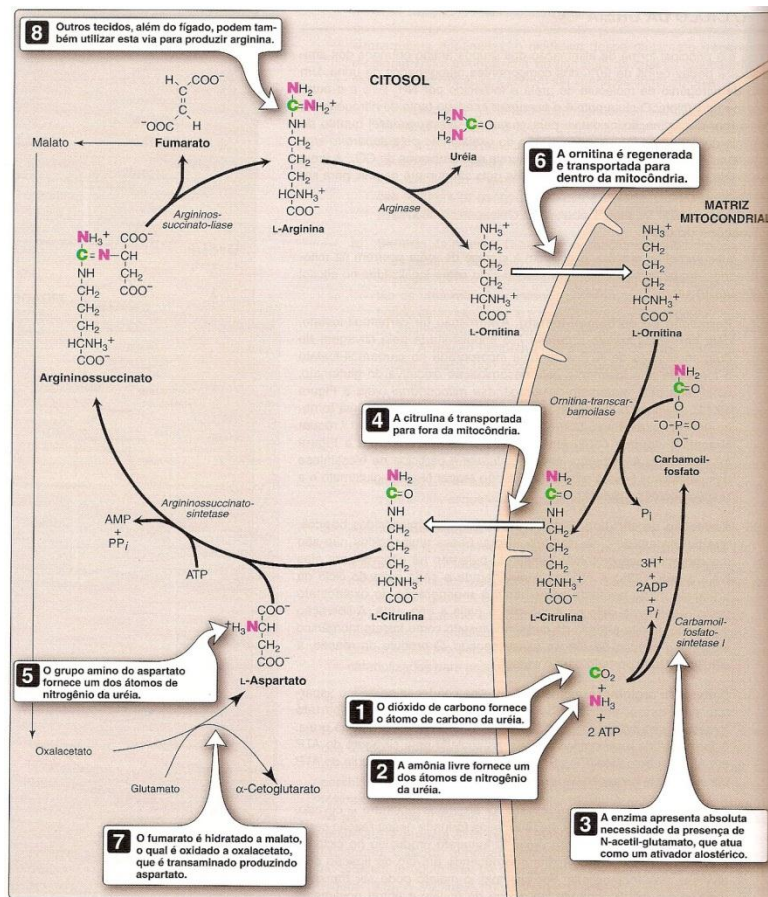


Figura 2 – Representação do ciclo ornitina- ureia; fixação da amónia pela carbamoilfosfato sintetase I formando carbamoilfosfato (3); libertação de ureia da L-arginina pela arginase (8) e formação de L-ornitina (6).

1.4 Ureotelismo

1.4.1 Elasmobrânquios

Com excepção dos elasmobrânquios de água doce, família Potamytionidae, todos os elasmobrânquios são ureotélicos, ou seja, sintetizam e excretam ureia como produto final do metabolismo de azoto (Hazon *et al.*, 2003). Sendo retida em elevada concentração (aproximadamente 400 mmol/L) (Wright e Land, 1998), é utilizada como osmólito orgânico maioritário (Hazon *et al.*, 2003), a sua alimentação envolve grandes quantidades de proteína (carnívoros) podendo por isso transformar grandes quantidades de proteína em ureia. Como consequência, a osmolaridade dos fluidos corporais é bastante mais elevada que nos teleosteos, e o plasma é mantido hiperosmótico em água doce ou ligeiramente hipo-osmótico em água salgada (Smith, 1931b; Thorson *et al.*, 1973; Piermarini e Evans, 1998).

A elevada concentração de ureia encontrada, atribui-se também à baixa permeabilidade das brânquias (Boylan, 1967; Fines *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2004; Pärt *et al.*, 1998). Esta baixa permeabilidade é devido à composição elevada em colesterol da membrana da brânquia, acoplada com antitransportador ureia/sódio na membrana basolateral que transporta ureia novamente para o sangue (Fines *et al.*, 1998). Contudo alguma ureia é perdida para o meio ambiente, por isso, os elasmobranquios sintetizam continuamente ureia a elevadas taxas através do ciclo ornitina-ureia (O-UC), maioritariamente no fígado, mas também alguma parte no tecido do músculo esquelético (Kajimura *et al.*, 2006; Steele *et al.*, 2005).

1.4.2 Teleósteos

Embora a maioria dos peixes teleósteos excrete amónia como principal produto do metabolismo de azoto, vários excretam ureia como produto principal do metabolismo de azoto, e esta lista tem vindo a crescer à medida que novas espécies são estudadas ou descobertas (Mommensen e Walsh, 1992; Wright, 1995). Normalmente consideram-se os peixes como ureotélicos quando excretam $\geq 50\%$ do seu excesso de azoto na forma de ureia (Anderson, 1995; Ip *et al.*, 2001).

Estas espécies ureotélicas contrariam assim a ideia de que os genes para O-UC estariam silenciados nos teleósteos (Wood *et al.*, 2003). Este fenómeno é agora interpretado como uma retenção de características embrionárias e que é expresso nos primeiros estágios de vida de várias espécies (Wright *et al.*, 1995) que mais tarde se tornam amoniotelicas (excretam o azoto principalmente sob forma de amónia) (Wright e Land, 1998; Wright e Fyhn, 2001).

O ureotelismo apresentado por algumas espécies de teleósteos pode ser um processo comum ou acontecer apenas em circunstâncias fisiológicas específicas, acompanhadas pela presença de níveis fisiologicamente significantes, de todas as enzimas do ciclo da ureia (Kong *et al.*, 1999). Os peixes pulmonados africanos (*Protopterus annectens*) dependem completamente da respiração aérea (Graham, 1997) e são capazes de sobreviver a extensos períodos de estivação e seca (Loong e tal., 2007). Eles são amoniotelicos em água, produzindo amónia e excretando como NH_3 por difusão através do epitélio branquial e cutâneo (Graham, 1997). Contudo, quando expostos ao ambiente terrestre (devido às secas), a excreção de amónia é impedida devido à falta de água para a retirar das superfícies branquiais e cutâneas, que levaria a

um aumento da amónia no corpo. Por isso os peixes pulmonados africanos têm que se defender da toxicidade da amónia quando estão fora de água (Loong *et al.*, 2007). Os dois principais mecanismos adaptados pelos peixes pulmonados africanos para lidar com a toxicidade da amónia durante emersão ou estivação, são o aumento da síntese de ureia e a diminuição da produção de amónia (Smith 1930, 1935; Janssens, 1964; Janssens and Cohen 1968a; Chew *et al.*, 2003b, 2004; Loong *et al.*, 2005).

Outra espécie de teleósteo bastante estudado é o xarroco do golfo (*Opsanus beta*) que possui também um completo e funcional ciclo ornitina-ureia e pode mudar de amoniotelismo para ureotelismo quando exposto ao ar, amónia, elevada taxa populacional e confinamento (Walsh *et al.*, 1990, 1994; Walsh and Milligan, 1995). No entanto os mecanismos responsáveis pelo desencadear do ureotelismo ainda não são conhecidos e o que torna esta espécie ainda mais original no seu ureotelismo facultativo é modo de excreção pulsátil da ureia através das brânquias (McDonald *et al.*, 2004). Como na maioria dos teleósteos, as brânquias do *O. beta*, contribuem para mais de 90% da excreção dos metabolitos de compostos azotados. A excreção nesta espécie resulta em vários pulsos diários com duração que varia entre 0.5h e 3h (Wood *et al.*, 1997) cada um.

1.5 O caso do xarroco lusitano, *Halobatrachus didactylus* (Bloch e Schneider, 1801)

Ao longo da Península Ibérica, existe apenas uma espécie representante da família Batrachoididae, *Halobatrachus didactylus*. A sua distribuição estende-se desde o Golfo da Biscaia ao Gana e até ao Mediterrâneo Oeste (Roux, 1989). *Halobatrachus didactylus* é geralmente encontrado em águas pouco profundas - canais de maré e enseadas, baías, praias – abaixo dos 50 m. É uma espécie sedentária e solitária, que vive sobre tudo enterrado por areia fina ou lodo, escondida entre as ervas marinhas e as algas ou cavernas rochosas (Palazón-Fernández *et al.*, 2001). É uma espécie eurialina, capaz de colonizar diversos ambientes, desde águas salobras de estuários de rios (como Guadalquivir, em Espanha), Mira, Sado, Tejo (Portugal) até águas hipersalinas de poças de sais (Arias and Drake, 1990; López de Cunha, 1994; Costa *et al.*, 1995; Fernández-Delgado *et al.*, 2000).

Apresenta grande resiliência, sendo capaz de sobreviver durante horas fora de água. Durante a época de desova os machos desta espécie diminuem a sua taxa de

alimentação enquanto guardam os seus ninhos e tomam conta dos ovos e da prole (Palazón-Fernández *et al.*, 2010).

Estudos já realizados indicam que a tolerância à amónia na espécie *Halobatrachus didactylus* (xarroco) é alta, quando comparada com os valores para outros teleósteos, no entanto, é mais baixa que em outros indivíduos da mesma família como *Opsanus beta*, *Opsanus tau* e *Porichthys notatus* (Barimo *et al.* 2007). Já foi demonstrado que a espécie *H. didactylus* é um dos *Batrachoididae* que excreta ureia, podendo ser uma espécie moderadamente ureotélica quando exposta a condições ambientais onde os níveis de amónia são relativamente elevados (Barimo *et al.*, 2007; Jordão, 2008).

O estudo de mais uma espécie da família *Batrachoididae* poderá assim permitir comparações entre espécies próximas e contribuir para melhor compreender o porquê da existência de ureotelismo facultativo nesta família de peixes.

1.6 Objectivos

Com este estudo pretende-se perceber em que condições exógenas ou endógenas, o xarroco (*Halobatrachus didactylus*) muda de um processo energeticamente menos dispendioso (amoneotelismo) para um processo energeticamente mais dispendioso como é o ureotelismo. Tendo como factor de quantificação de ureotelismo a quantificação da actividade da enzima da GSase, enzima chave no ciclo da ornitina-ureia nos teleósteos. Os dados obtidos serão importantes pois contribuirão para um melhor percepção do porquê desta espécie, assim como dos membros pertencentes à família *Batrachoididae*, apresentarem este tipo característica fisiologicamente mais dispendiosa.

Para tal foram realizadas dois tipos de experiencias i) *in-vitro*, onde se pretendeu testar os protocolos a serem utilizados assim como alguns factores stressantes em amostras de tecidos nomeadamente fígados, ii) *in-vivo*, onde se utilizaram factores stressantes (amónia e cortisol) em xarrosos vivos.

2. Material e metodologias

2.1 Animais

Indivíduos da espécie *Halobatrachus didactylus*, de ambos os sexos, foram capturados por pesca com redes de arrasto de vara na Ria Formosa e no Rio Arade. Os peixes capturados foram transportados para tanques em circuito fechado no edifício do Laboratório Experimental de Organismos Aquáticos da Universidade do Algarve. Durante o período de aclimação (2-8 meses para os peixes do ensaio I, 2-3 meses para os ensaio II e com cortisol) que antecedeu as experiências in-vivo, os peixes foram mantidos em fotoperíodo e temperatura natural a 36ppt, e alimentados com tiras de surimi (delícias do mar) e lulas congeladas, a cada 48 horas, numa dosagem de aproximadamente 3% da carga, em massa, do tanque.

2.2 Experiências *in-vitro*

2.2.1 Amostragem de fígados

Os peixes foram anestesiados com uma dose letal de 2-Fenoxil-etanol, de seguida foram pesados e medidos. Os fígados foram recolhidos, pesados e colocados numa solução salina RINGER (150.58 mM NaCl, 4.02 mM KCl, 1.98 mM CaCl₂(anidroso)), solução homogenizadora (1.01 mM MgSO₄.7H₂O, 0.43 mM NaH₂PO₄.H₂O, 4.17 mM NaHCO₃, 25.01 mM HEPES, 5.00 mM Glucose e 1.03 mM Glutamina, sendo os dois últimos reagentes adicionados de fresco, pH 7.75) num recipiente com gelo.

2.2.2 Aferição dos protocolos para a determinação da actividade da GSase e concentração de proteína

Foram feitas várias experiências ao longo de vários meses que antecederam as experiências principais, com o objectivo aferir e validar os protocolos que iriam posteriormente ser utilizados.

Testaram-se os protocolos não só em fígados de xarroco mas também em fígados de robalo de forma a verificar se o método utilizado para medir a actividade enzimática da GSase mostraria diferenças entre as duas espécies para reforçar a utilização do método. Também se usaram diferentes volumes de amostra (5, 10 e 20 ul) de forma a ser testado se existiria diferenças na medição da actividade em função da concentração de proteína.

2.2.3 Resposta hepática à amónia e cortisol no meio de incubação (0, 1 e 3 mM)

Para simular a resposta a factores de stress *in-vitro*, procedeu-se da seguinte forma, os indivíduos foram anestesiados com uma dose letal de MS-222, de seguida foram medidos e pesados e o seu fígado recolhido para um tubo falcon com solução Ringer, tudo isto num recipiente com gelo. Os fígados foram então divididos em porções de \pm 200 mg, sendo estas depois divididas em 4 partes cada. Após divididas em 4 partes estas foram colocadas numa placa de cultura de 24 poços (200 mg em cada poço) cada poço contendo já 1 ml de solução RINGER + inibidor de protéases. Após 30 minutos o RINGER envolvente foi aspirado, com uma bomba de sucção, foi colocado novo RINGER sem inibidor e novamente aspirado e de seguida colocou-se nova solução RINGER contendo glucose, glutamina e inibidor de protéases. Os factores stressantes (cortisol, forskolina e amónia) foram então adicionados, com as concentrações e tempos de incubação como mostra a tabela 1. Decorrido o tempo de incubação, o meio envolvente dos tecidos foi aspirado, adicionou-se novamente solução RINGER sem inibidor e voltou-se a aspirar, os tecidos foram então congelados em azoto líquido e armazenados a -80°C .

Tabela 1 – Factores utilizados e as concentrações usadas dos mesmos nas diferentes dosagens.

	Cortisol	Forskolina*	Amónia*
Doses	(ng/ ml)	(μM)	(mM)
D0	0	0	0
DI	0.2	1	0.5
DII	2	10	2
DIII	20	100	-
Tempo de Incubação	3h	3h	5h

2.3 Experiências *in-vivo*

2.3.1 Resposta fisiológica ao aumento da amónia ambiental

Esta experiência foi realizada em duas alturas diferentes, sendo o primeiro ensaio em Junho e o segundo em Novembro.

Para a primeira experiência, os peixes foram colocados em tanques de 40 L, com fluxo de água contínuo num único sistema de recirculação. Cada tanque continha 5 indivíduos, que foram aclimatados 8 dias, sendo alimentados com surimi (delícias do mar) e mais tarde com camarinha a cada 24 h. Os tanques durante esse período foram sempre limpos (retirou-se toda a comida não ingerida e dejectos dos animais) e a salinidade da água e temperatura foram mantidos a 36 ppm e 25°C, respectivamente. Durante o tempo de aclimatização, ocorreu elevada mortalidade tendo sido reduzido o número de 25 para 12 indivíduos.

Após decorrido o tempo de aclimatização os xarrosos foram agrupados (N=4) por peso semelhante (peso médio por tanque 14,51 g \pm 0,465 g). O fluxo de água foi fechado e o volume da água por tanque foi reduzido para 20 L cada. Foi recolhida uma amostra de água de cada tanque correspondendo ao tempo zero, de seguida procedeu-se à adição de amónia, previamente diluída num volume de 5 litros de água do sistema, de forma a obter as concentrações apresentadas na tabela 3, e passados 30 minutos houve nova recolha de água. Esta experiência teve um período de tempo de 24 h, no qual se fez renovação das águas de cada tanque (10 l) a cada 8 h, com recolha de amostra de água antes da renovação e 30 minutos após renovação. Indicar mortalidade, também nos resultados.

Tabela 2 – Concentração de amónia em cada tanque.

Tanques	[Amónia] (mM)
A	0
B	1
C	3

Decorridas as 24h, os xarrosos foram expostos a uma dose letal de 2-Fenoxil-etanol, e procedeu-se à sua amostragem. Os peixes foram medidos e pesados e de seguida procedeu-se à recolha de: sangue, tecido muscular, brânquias, cérebros e fígados.

O sangue foi recolhido utilizando seringas heparinizadas, centrifugado a 13000 rpm durante 4 minutos e o sobrenadante (plasma) foi colocado em azoto líquido e armazenado a -80°C para posterior análise de amónia, ureia, lactato, cortisol, cálcio, glucose, magnésio, fósforo e cloreto. Os fígados foram pesados e divididos para análise de actividade da Gsase, colocados em azoto líquido e armazenados a -80°C para posterior análise. O tecido muscular e cerebral foi recolhido e colocado em azoto líquido e armazenado a -80°C para posteriores análises de GSase. As brânquias foram recolhidos e colocados em solução SEI (150 mM de sacarose, 10 mM Na_2EDTA , 50 mM imidazole, pH 7.3) colocou-se em azoto líquido e foi armazenado a -80°C para posterior análise de ATPases.

Para o segundo ensaio realizado em Novembro, os peixes (N=4) foram colocados também em tanques de 40 L para aclimatização durante 8-9 dias. Os peixes foram alimentados com lulas congeladas e a limpeza dos tanques foi feita de 48 h em 48 h assim como a alimentação, para evitar maior stress dos peixes. A temperatura e a salinidade foram mantidas a $23,9^{\circ}\text{C}$ e 35ppt, respectivamente. Ao longo da aclimatização alguns peixes morreram, tendo-se realizado a experiência com dois tanques de N=3 (A e B) e um tanque (C) de N=4 sendo o peso médio por tanque de $77,39 \text{ g} \pm 12,5 \text{ g}$. Em ambos os ensaios os peixes ficaram privados de alimento 24 h antes do início das amostragens.

2.3.2 Resposta fisiológica à injeção de cortisol

Para esta experiência foram utilizados dois grupos de peixes (N = 3), os grupos controlos foram os próprios peixes, em que foi feita uma recolha de sangue de cada peixe antes da injeção com cortisol.

Os peixes foram anestesiados para a primeira recolha, medidos e pesados, de seguida procedeu-se à injeção de cortisol + óleo de coco, depois de injectados foram postos num recipiente com água limpa e arejada para recuperarem e só depois colocados nos tanques com circuito sempre aberto.

Um dos grupos (G 12h) foi amostrado decorridas 12 h e o outro (G 36h) após 36 horas. Os animais foram anestesiados com uma dose letal de MS-222, e procedeu-se à recolha de: sangue, branquias, fígado, tecido muscular e cérebro. À excepção do sangue todos os tecidos foram armazenados a -80°C (branquias recolhidas para tubos eppendorf contendo solução SEI) o sangue foi centrifugado e o plasma foi armazenado a -20°C .

2.4 Métodos analíticos

2.4.1 Determinação da actividade enzimática da GSase

2.4.1.1 Homogeneização dos tecidos

Os tecidos foram descongelados por imersão numa solução tampão de homogeneização. Este tampão é composto por 20 mM K_2HPO_4 , 10 mM HEPES, 0,5 mM EDTA, 1 mM DTT (este adicionado de fresco), pH a 7,5 em 100 ml de água ELIX à qual no fim foram adicionados mais 100 ml de glicerol, ficando guardado a 4°C , utilizando uma quantidade 4x o peso de tecido (fígado) em gramas, o qual foi homogeneizado com uma varinha homogeneizadora. Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm durante 20 minutos a 4°C . O sobrenadante foi então recolhido para quantificar a actividade enzimática da GSase e proteína total no tecido.

2.4.1.2 Actividade enzimática da GSase

Para determinar a actividade enzimática da GSase foi utilizado o protocolo “Glutamine Synthetase Assay (GSase)”.

Este método baseia-se na disponibilização do substrato glutamina à GSase presente no sobrenadante, cuja actividade é indicada pela mudança de coloração da solução causada pela transformação da glutamina em carbamoil fosfato, correspondente ao primeiro passo do ciclo ureia-ornitina. O homogenizado é adicionado à solução de glutamina (em volumes de 5, 10 ou 20 μl para os testes de aferição do método, e 10 μl para os ensaios definitivos) iniciando-se a conversão do substrato. Esta reacção é inibida pela presença da solução férrica, a qual é adicionada aos controlos no início da reacção e às amostras após um período de incubação de 10 minutos. A diferença de absorvância

obtida entre estas reacções, após leitura a 540nm, é indicativa da actividade da GSase e será depois normalizada em função da quantidade de proteína total presente em cada amostra.

2.4.1.3 Determinação da concentração de proteína total

A determinação da concentração de proteína presente nos tecidos, foi determinada pelo ensaio de Bradford, este método envolve a ligação de um corante (Coomassie Brilliant Blue G-250) às proteínas (Bradford, 1976). Este corante existe em três formas: cationica (vermelho), neutra (verde) e aniónica (azul) (Compton e Jones, 1985). Quando em condições ácidas, este corante está predominantemente na sua forma vermelha duplamente protonada ($A_{\max}= 470$ nm). Contudo, quando o corante se liga a uma proteína, é convertido à forma azul, estável, desprotonada ($A_{\max}= 595$ nm) (Fazekes de St. Groth *et al.*, 1963, Reisner *et al.*, 1975, Sedmack e Grossberg, 1997). E é a absorvância desta forma azul proteína-corante que é determinada a 595 nm no ensaio usando um espectrofotómetro ou leitor de microplaca (Biorad Benchmark).

Para calcular a quantidade de proteína (mg/ml) foram utilizadas microplacas de 96 poços de poliestireno e um kit de determinação da marca BioRad seguindo as instruções do fabricante.

Fez-se uma curva padrão 0-2 mg/ml BSA. Após incubação dos padrões e amostras com os reagentes durante 10 minutos à temperatura ambiente, a absorvância foi lida a 595 nm num espectrofotómetro para microplacas (Biorad Benchmark) e foram recolhidas as leituras.

Para a determinação da concentração de proteína foi utilizada a equação abaixo, resultados são apresentados em mg/ml:

$$x = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4a(ABS)}}{2a} * f$$

f – factor diluição ; ABS – absorvância média

2.5 Análise de Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPases em brânquias

Para quantificar a actividade das ATPases nas amostras de brânquias foi utilizado o protocolo segundo McCormick (1993). Para este protocolo as brânquias recolhidas em tampão SEI (sucrose EDTA e Imidazole) foram homogenizadas após adição de 0.5 % SEID (0.1 g ácido Na-deoxicólico em 20 ml de SEI); O homogenizado foi centrifugado a 5000 g durante 2 minutos a 4°C e o sobrenadante recolhido para medição da actividade enzimática e concentração de proteína (analísada como descrito acima).

Para determinação de actividade enzimática da Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase foram realizados ensaios cinéticos em que foram disponibilizados os substratos necessários à activação destas enzimas, na ausência e na presença de inibidores específicos de cada uma, nomeadamente ouabaína para a Na^+/K^+ -ATPase e ouabaína e bafilomicina para a H^+ -ATPase. Assim para cada individuo foram preparadas 6 amostras, dois replicados para cada reacção, indicando a actividade enzimática total dependente de ATP, aquela correspondente apenas à Na^+/K^+ -ATPase e a correspondente apenas à H^+ -ATPase.

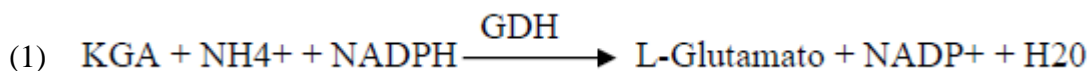
Realizou-se uma medição cinética a 25°C durante 10 minutos a 340 nm em microplaca de 96 poços. Após a medição obteve-se uma curva de redução da absorvância por poço, correspondente ao desaparecimento de substrato, à qual se retirou o valor de declive.

Os resultados são apresentados em $\mu\text{mol ADP/h/mg}$ proteína.

2.6 Análise da amónia nas amostras de água

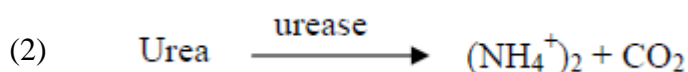
Para determinar a concentração de amónia nas amostras de água utilizou-se o protocolo adaptado de Ivancic e Degobbis (1984). A concentração de amónia nas amostras de água, foi determinada pelo método indofenol/azul descrito por Ivancic & Degobbis (1984) adaptado a microplacas (Walsh *et al.* 1990). Este método tem como princípio a reacção de transformação de amónia em indofenol. Esta reacção ocorre quando numa solução alcalina, os iões de amónia reagem com hipoclorito, formando monoclaramina, que na presença de fenol e nitroprussido, como catalizador, se torna azul formando um composto líquido chamado indofenol. A concentração de amónia nas amostras de plasma, foi medida com o auxílio de um kit de amónia (Sigma-Aldrich,

AA0100), adaptado a microplacas. Esta técnica baseia-se na reacção da amónia com ácido α -cetoglutárico (KGA) e redução do NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), na presença de GDH (desidrogenase do Lglutamato) de modo a formar L-glutamato e oxidar NADP^+ , como mostra a equação (1) os resultados são apresentados em μM .

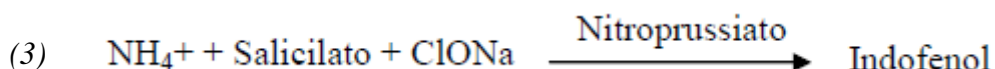


2.7 Análise de ureia nas amostras de água

Para quantificar a concentração de ureia nas amostras de água utilizou-se o protocolo “Urea Assay (for water and plasma) – read *in* Microplates” usado por Walsh, Wood *et al.*, adaptado de Rahmatullah *et al.* (1980) e Price *et al.*, (1987). A concentração de ureia nas amostras de água e plasma, foi determinada pelo método colorimétrico e diacetil monoxime, descrito por Rahmatullah & Boyde (1980), Price & Harrison (1987) e adaptado a microplacas (Walsh *et al.* 1990). Este método baseia-se na reacção entre a ureia e o diacetil monoxime. Este condensa, ficando com uma cor amarelada. Esta reacção é fortalecida pela presença de tiosemicarbazido, que no final forma um composto líquido rosado. A concentração de ureia nas amostras de plasma, foi medida com o auxílio de um kit de ureia (Spinreact, 1001329), adaptado a microplacas. Este método baseia-se na catálise da ureia em amoníaco e dióxido de carbono, pela enzima urease (2) os resultados são apresentados em μM .



Os iões amónia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio (ClONa), na presença de um catalisador (nitroprussiato), formando um composto verde (4).



2.8 Parâmetros analisados nas amostras de plasma

As amostras de plasma foram submetidas a várias análises: concentrações de ureia, amónia, cálcio, fósforo, iões cloreto, glucose e lactato.

2.9 Amónia

Para a análise da concentração de amonia no plasma utilizou-se o kit da SIGMA-ALDRICH (AA0100). O método utilizado tem como princípio a reacção da amonia com ácido α -cetoglutarico (KGA) e a redução de NADPH na presença de L-glutamato desidrogenase (GDH, que reage especificamente com a amonia), para formar L-glutamato e NADP⁺. A diminuição da absorvância a 340 nm, por oxidação do NADPH, é proporcional à concentração de amonia. Os resultados são apresentados em μ M.

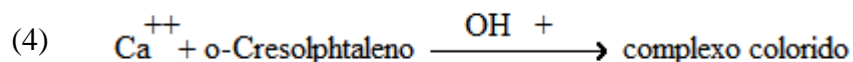
2.10 Ureia

Para a determinação da concentração de ureia no plasma foi usado o kit da SPINREACT (1001331), em que a ureia presente na amostra ser hidrolizada enzimaticamente em amónia (NH₄⁺) e dióxido de carbono (CO₂). Os iões de amónia formados vão reagir com salicilato e hipocloreto (NaClO), na presença de nitroprussiato, catalizador, para formar o indofenol verde. A intensidade da cor formada é proporcional à concentração da ureia na amostra (Kaplan, 1984; Burtis *et al.*, 1999; Tietz *et al.*, 1995). As amostras foram colocadas nas reacções de acordo com as instruções do fabricante, mas em volumes adaptados para microplacas. Após adição dos reagentes colocou-se a microplaca a incubar a 37°C durante 5 minutos com agitação, após 5 minutos adicionou-se o reagente R2 (kit) e voltou-se a incubar a microplaca por mais 5 minutos a 37°C com agitação. De seguida fez-se a leitura das absorvâncias das amostras 575 nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão a partir de um stock de ureia a 30 mM. Os resultados são apresentados em μ M.

2.11 Cálcio

Para a determinação da concentração de cálcio no plasma utilizou-se o kit “Calcium assay for microplates (plasma, urine, water)” (SPINREACT- 1001061) adaptado no laboratório para microplacas.

Este método baseia-se na formação de um complexo colorido entre o cálcio e o-cresolftaleno em meio alcalino (4). A intensidade da cor formada é proporcional à concentração de cálcio na amostra (Farell, 1984; Kessler *et al.*, 1964; Connerty *et al.*, 1996). Os resultados são apresentados em mM.



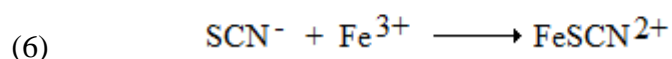
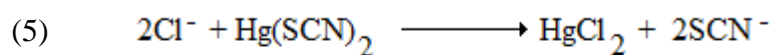
2.12 Fósforo

Para determinar a concentração de fósforo no plasma utilizou-se o protocolo “Phosphorus assay for microplates (plasma, urine)” (SPINREACT-1001155) adaptados no laboratório para microplacas.

Este método baseia-se na reacção de fósforo inorgânico com molibdato de amonia, em meio acido, para formar um complexo amarelo de fosfomolibdato, sendo a intensidade da cor formada proporcional à concentração de fósforo inorgânico na amostra (Farrel, 1984; Daly *et al.*, 1972). Os resultados são apresentados em mM.

2.13 Ião cloreto

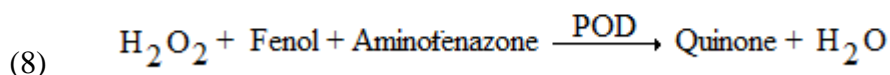
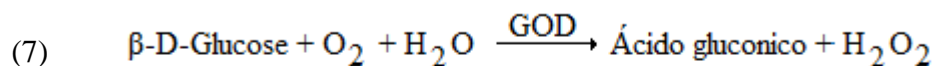
Para a determinação da concentração do ião cloreto foi utilizado o kit da SPINREACT (1001360) adaptados no laboratório para microplacas. Este metodo tem como base a quantidade de separação de tiocinato por cloreto do tiocinato de mercurio (5) e a formação subsequente do complexo vermelho de tiocinato ferrico (6) que é medido colorometricamente, sendo a intensidade de cor proporcional à concentração do ião cloreto na amostra. Os resultados são apresentados em μM .



2.14 Glucose

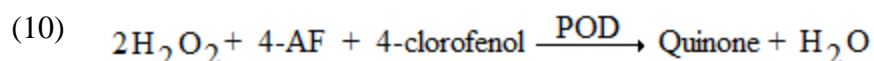
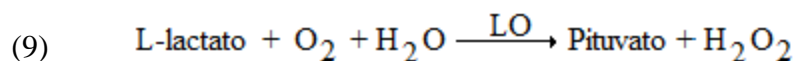
Para a determinação de glucose foi usado o kit da SPINREACT (1001190) adaptado no laboratório para microplacas. Este método tem como principio a oxidação

da glucose em ácido gluconico, catalizada pela glucose oxidase (GOD) (7). O peróxido de hidrogenio formado (H_2O_2), é detectado pelo aceitador de oxigénio cromagénico, fenol-aminofenazone na presença de peroxidase (POD) (8), os resultados são apresentados em mM: A intensidade de cor observada é proporcional á concentração de glucose presente na amostra.



2.15 Lactato

Para a determinação de lactato utilizou-se o kit da SPINREACT (1001330) adaptados no laboratório para microplacas. Este método tem como principio a oxidação do lactato pela lactato oxidase (LO) em piruvato (9) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que na presença de peroxidase (POD), 4-aminofenazone (4-AF) e 4-clorofenol forma um composto roxo de quinonea (10). A intensidade de cor observada é proporcional á concentração de lactato presente na amostra. Os resultados são apresentados em mM.



2.16 Osmolaridade

A osmolaridade foi medida num osmómetro de pressão a vapor (WESCOR 5520), na qual se utilizaram 10 ul de plasma. Os resultados são apresentados em mOSmol/Kg.

3. RESULTADOS

3.1 Experiências *in-vitro*

3.1.1 Teste de aferição do protocolo para determinação da GSase

Para verificar a responsividade do método escolhido para a medição da actividade da GSase foram testadas várias quantidades de proteína, correspondendo a três volumes do extracto de tecido obtido como descrito anteriormente. A figura 3 mostra os resultados obtidos das várias repetições realizadas, que antecederam os tratamentos *in-vitro* e os ensaios *in vivo*. Verifica-se, como seria esperado, que ao aumentarmos o volume de amostra no ensaio a absorvância também aumenta (A), contudo a actividade da enzima em função do volume de amostra, isto é normalizada à quantidade de proteína, mostra uma tendência para diminuir com o aumento do volume de amostra (B).

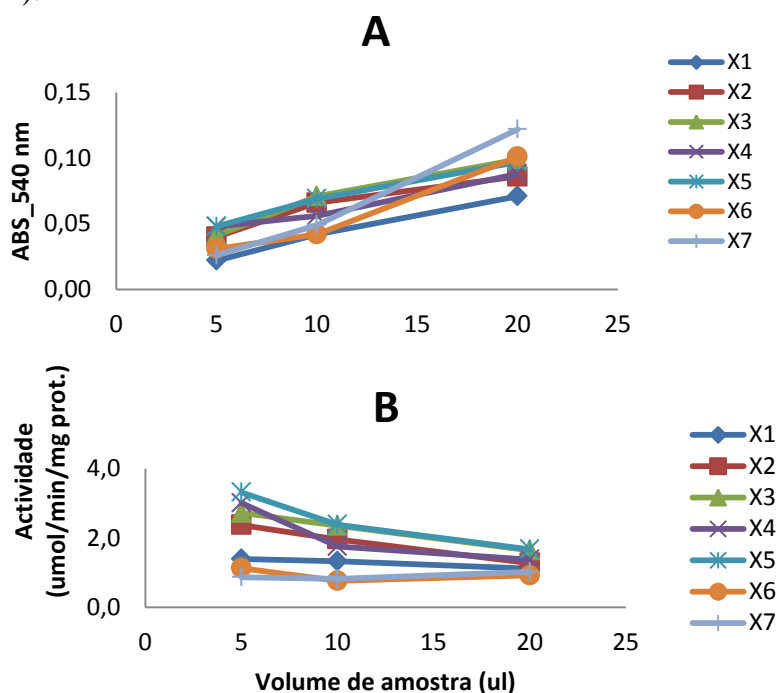


Figura 3 – Gráfico A mostra a variação da absorvância (ABS_540 nm) em função da quantidade (volume em ul) de amostra usada (5, 10 e 20 ul) no protocolo; gráfico B mostra a variação da actividade da enzima GSase em função do volume de amostra usado no protocolo (5, 10 e 20 ul); X representa cada indivíduo.

De forma a testar o método, foi realizada também a determinação da actividade GSase para o robalo e comparou-se a sua actividade basal com a actividade basal determinada no xarroco (*H. didactylus*) (figura 4).

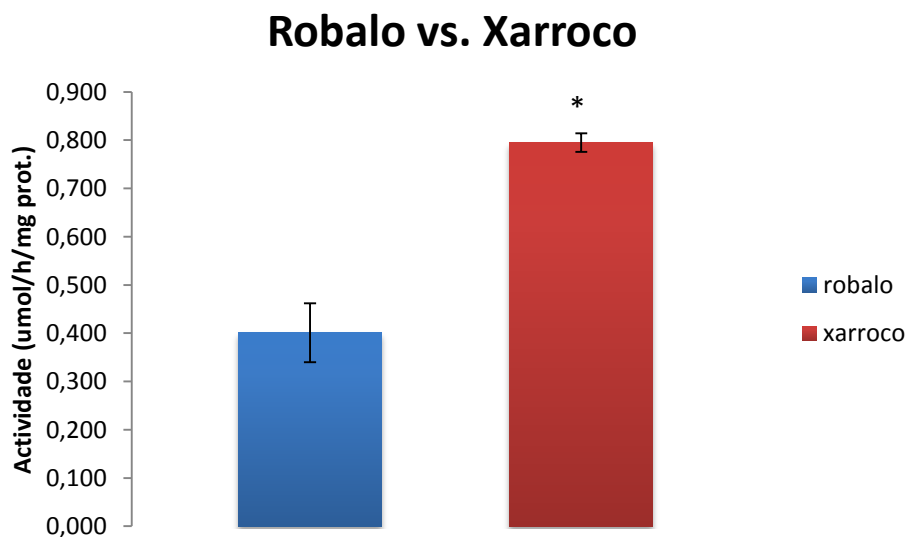


Figura 4 – Comparação da actividade GSase basal no robalo com a do xarroco; barras a cores representam médias; barras a preto (s.e.m); * valor estatisticamente diferente ($p < 0.05$), $n = 4$.

3.1.2 Resposta da GSase a diferentes concentrações de amónia durante 5 h

Na figura 5 pode-se observar a resposta, *in-vitro*, dos fígados expostos a solução fisiológica com diferentes concentrações de amónia (0, 0.5, 2 mM) durante um período de tempo de 5h. Observa-se que para o peixe 1 existe uma diminuição significativa da actividade GSase quando o fígado foi exposto a uma concentração de amónia de 2 mM, para $p < 0.05$. O mesmo não acontece para o peixe 2 que apresentou sempre uma maior actividade que o peixe 1, mas sem diferenças significativas ($p < 0.05$) entre as diferentes concentrações de amónia.

GSase fígado

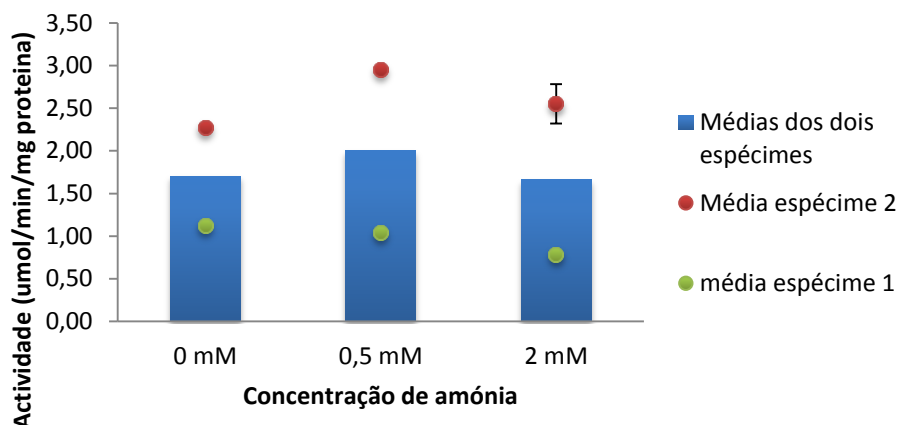


Figura 5 – Variação da actividade da GSase no fígado de xarrosos com diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 0.5 e 2 mM). Os valores representados são as médias de cada peixe \pm s.e.m ao fim de 5 h de incubação; não foi possível calcular a estatística para $p < 0.05$ pois para cada espécime apenas existem 2 replicados.

3.1.3 Resposta da GSase a diferentes concentrações de cortisol durante 5 h

O teste com cortisol foi apenas realizado com fígado de robalo, na figura 6, observa-se que existe grande variabilidade nos valores encontrados para a actividade GSase para cada concentração de cortisol, e por isso não foi possível determinar um relação causa efeito entre a dosagem de cortisol e a actividade da GSase, para $p < 0.05$.

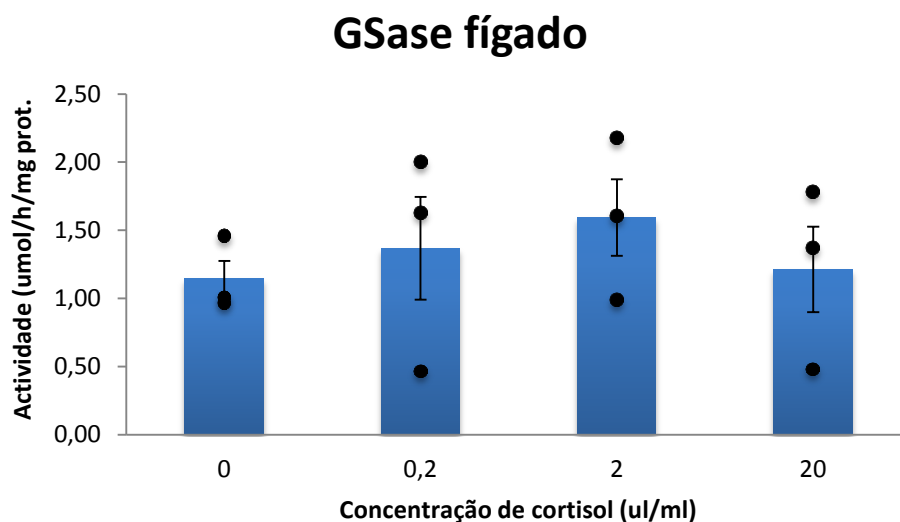


Figura 6 - Actividade da GSase no fígado de robalo em função da concentração de cortisol fornecido; pontos a preto (valores individuais de cada peixe); barras azul (média de cada grupo); barras a preto (s.e.m).

3.1.4 Resposta da GSase a diferentes concentrações de Forskolina durante 3 h

De forma a observar uma alteração na actividade GSase em fígado de xarroco, realizou-se um ensaio *in-vitro* em que dois fígados foram expostos a diferentes dosagens de forskolina ambiental (0, 1, 10 e 100 uM) durante um período de incubação de 3 h (figura 7). Cada fígado foi dividido 8 partes de forma a ter um duplicado de cada peixe para cada dosagem.

Verifica-se que para ambos os peixes não houve uma alteração significativa para as diferentes dosagens de Forskolina ($p < 0.05$)

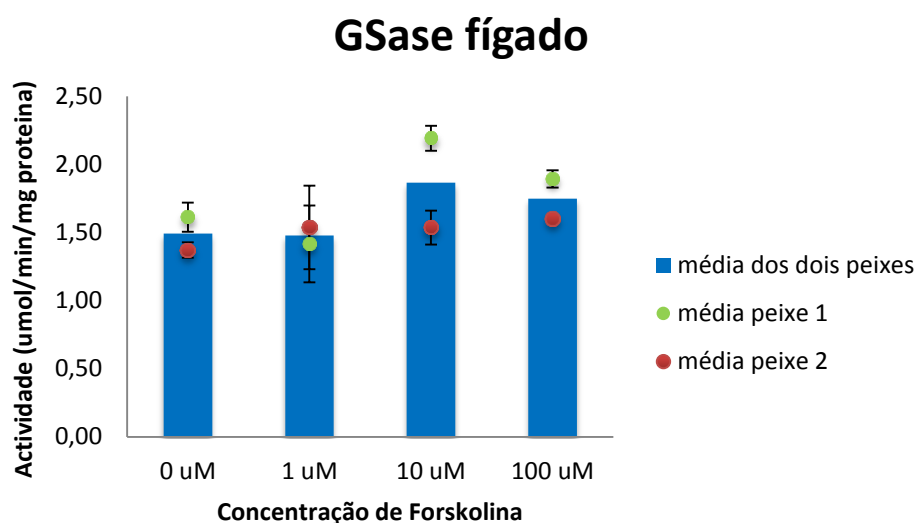


Figura 7 – Variação da actividade da GSase no fígado de xarrocos com diferentes concentrações de Forskolina ambiental (0, 1, 10 e 100 uM). Os valores representados são as médias de cada duplicado de fígado de peixe \pm s.e.m ao fim de 3 h de incubação.

3.2 Experiências *in vivo*

3.2.1 Resposta do ciclo da ornitina-ureia a diferentes concentrações de amónia ambiental durante 24 h

Tabela 4 – Dados dos xarrocos usados nos ensaios I e ensaios II. Mostra o mês em que cada ensaio decorreu; comprimento individual de cada peixe usado em cada ensaio assim como a média de cada grupo; sexo de cada individuo; peso individual de cada peixe e média de cada grupo; indice de condição (K) de cada peixe e média de cada peixe; valor de K esperado para machos (M) e fêmeas (F) para a altura do ano em que cada ensaio decorreu.

Mês	Grupos	Peixes #	Peso (g)	Comprimento (cm)	Sexo	Factor condição (K)	Factor condição (K) de referência (Modesto e Canário, 2002)
Junho (ensaio I)	0 mM A	1	54,8	16,8	M	1,2	M = 1,7
		2	51,8	16,0	F	1,3	
		3	37,2	14,7	M	1,2	
		4	24,7	13,1	M	1,1	
	Médias	--	37,9 ± 6,03	14,6 ± 0,70	--	1,2 ± 0,03	
	1 mM B	5	34,3	14,7	F	1,1	F = 1,6
		6	39,7	14,8	M	1,2	
		7	33,7	13,8	F	1,3	
		8	47,6	15,0	F	1,4	
	Médias	--	40,3 ± 2,79	14,5 ± 0,23	--	1,3 ± 0,06	
3 mM C	9	46,2	13,8	M	1,8		
Novembro (ensaio II)	0 mM A	1	78,5	16,8	M	1,7	M = 1,75
		2	75,6	17,0	M	1,5	
		3	106,1	18,7	F	1,6	
		Médias	--	86,7 ± 6,87	17,5 ± 0,43	--	
	1 mM B	4	48,5	14,4	F	1,6	F = 1,85
		5	61,3	16,1	M	1,5	
		6	105,1	18,4	F	1,7	
	Médias	--	71,6 ± 12,12	16,3 ± 0,82	--	1,6 ± 0,05	
	3 mM C	7	43,9	15,3	M	1,2	
		8	62,0	15,4	F	1,7	
9		106,2	18,4	M	1,7		
10		127,6	19,5	M	1,7		
Médias	--	98,6 ± 16,74	17,8 ± 0,92	--	1,7 ± 0,10		

3.2.1.1 Análises feitas às amostras de água recolhidas durante os ensaios I e II

Os ensaios consistiam na exposição dos animais a diferentes níveis de amónia ambiental, o que foi feito adicionando várias doses de NH₄Cl a um volume de água que foi adicionado ao tanque. A quase totalidade do volume do tanque foi renovada a cada 8 horas com água de idêntica concentração de amónia. Pela figura 8 pode-se observar que a variação da concentração de amónia no ensaio I foi aumentando ao longo do tempo (a amostra do grupo A das 16h perdeu-se), no caso do ensaio II observa-se que no grupo B aparenta haver uma ligeira diminuição da amónia ao longo do tempo e que no grupo C

parece existir uma diminuição entre as 8h e as 16h mas não foi encontrada nenhuma diferença significativa. Podemos ver os dois gráficos descrevendo as alterações ocorridas na concentração da ureia ao longo das experiências para os diferentes tanques. Pode-se observar que os valores para o ensaio I são na maioria superiores aos do ensaio II, estando os níveis iniciais de todos os tanques em ambos os ensaios dentro da mesma gama de valores

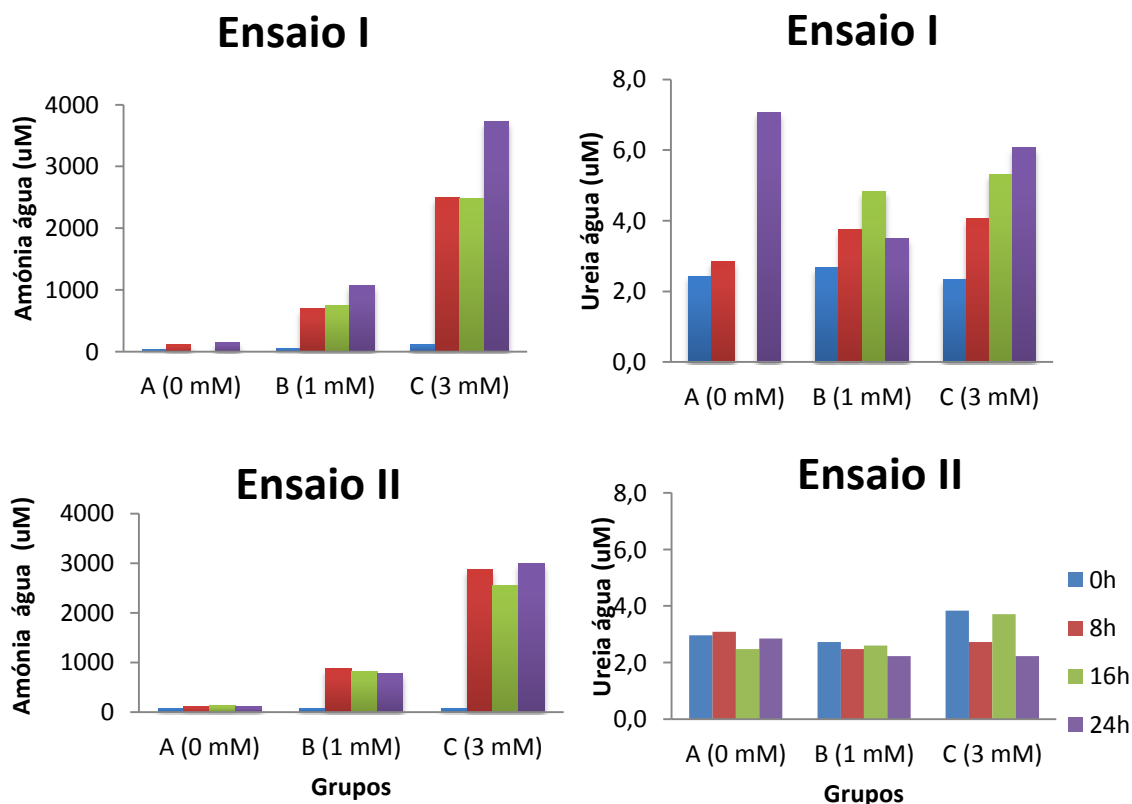


Figura 8 – Variação da concentração de amónia (A) e ureia (B) na água dos tanques ao longo de 24 h, com renovação de água a cada intervalo de 8 H. Nos gráficos não estão apresentados os valores recolhidos após 30 minutos da água ter sido mudada, apenas os valores encontrados a cada 8h (A e B).

.Conhecendo a quantidade de ureia presente na água ao início e no final de cada período de 8 horas é em teoria possível calcular as taxas de excreção de cada grupo e relaciona-las com a quantidade de amónia ambiental. Neste caso as taxas são corrigidas pela massa total presente em cada aquário no final de cada período. A figura 9 mostra as diferentes taxas de produtos azotados (ureia e amónia) encontradas nos ensaios I e II. No caso do ensaio I verifica-se que o grupo que esteve sujeito a 0 mM (controlo) apresenta maior taxa de excreção de ureia ao fim de 24 h, contudo para este grupo perdeu-se a amostra de água referente ao período das 16 h, não se podendo dizer por isso que não terá ocorrido outro pico de excreção de ureia, para o grupo B existe

também um pico de excreção no período das 16 h havendo de seguida uma diminuição até 0 de excreção, para o grupo C (exposto a 3 mM) verifica-se que as taxas de excreção além de serem bastante superiores às dos restantes grupos, também estão sempre a aumentar ao longo dos períodos de tempo, contudo este grupo é apenas constituído por um único indivíduo, não se podendo, por isso, afirmar que estes dados serão os mais precisos. Relativamente ao ensaio II observa-se que não existe ou quase não existe nenhuma excreção por parte dos grupos (A, B e C) de ureia.

No gráfico C observa-se as taxas de excreção de amónia encontradas para os grupos de peixes que foram sujeitos a 0 mM (os nossos controlos de ambos os ensaios). Observa-se que existe um padrão semelhante entre ensaios para a ocorrência de uma maior excreção no período das 16 h, contudo os valores encontrados são bastante diferentes entre ensaios, para o ensaio I os valores situam-se entre os 25-120 $\mu\text{mol/h/Kg}$ enquanto no ensaio II os valores não ultrapassam os 25 $\mu\text{mol/h/Kg}$.

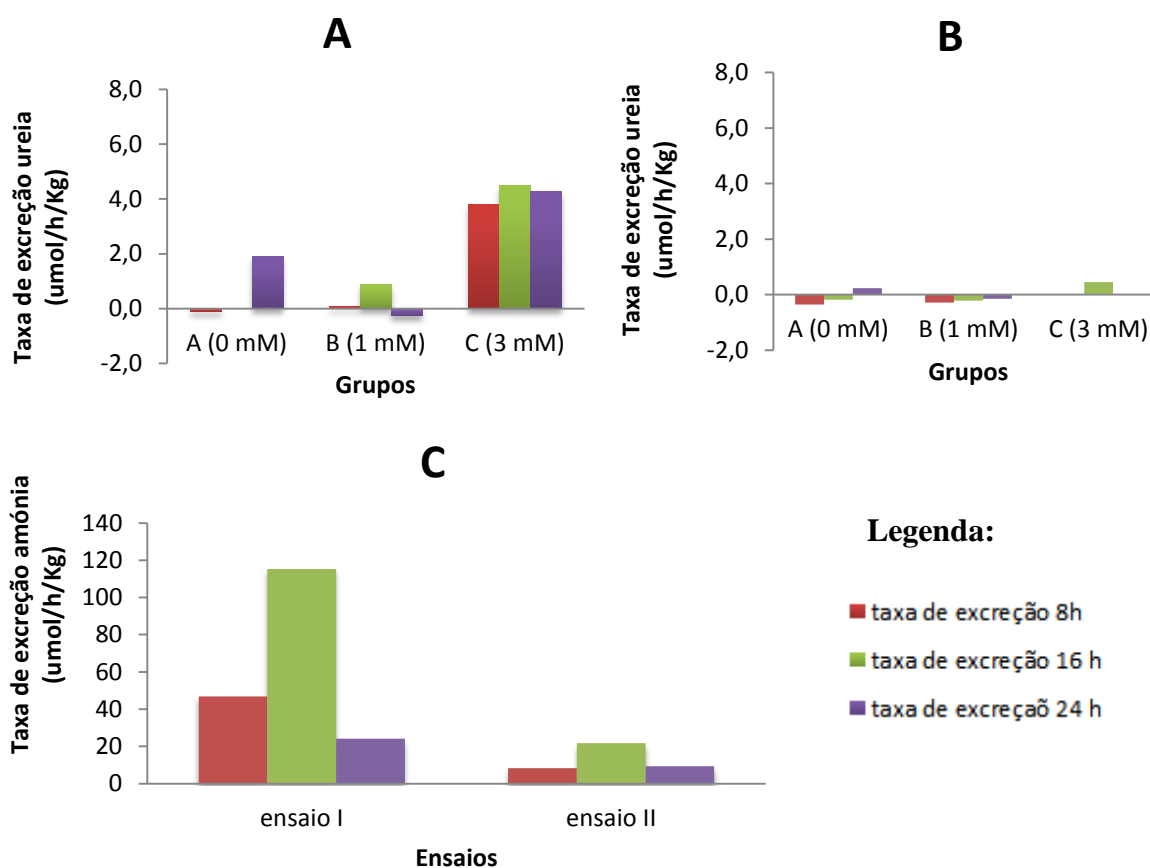


Figura 9 – Taxas de excreção de ureia e amónia observadas nos ensaios I e II. Gráfico A mostra as taxas de excreção de ureia encontradas para os peixes do ensaio I; gráfico B representa as taxas de excreção de ureia dos peixes do ensaio II; gráfico C mostra as taxas de excreção de amónia para os grupos de peixes que não foram sujeitos a amónia ambiental (0 mM) para os ensaios I e II. Nota: o grupo C do ensaio I (gráfico A) é constituído por valores de um único indivíduo, o grupo A e B são constituídos por 4 indivíduos.

A variação da concentração da ureia e amónia no plasma dos peixes, sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM) pode ser observada na figura 10. No ensaio I os valores obtidos de ureia dos peixes sujeitos a 1 mM de amónia ambiental não diferem do grupo controlo, relativamente ao peixe do tanque com 3 mM de amónia ambiental observa-se um aumento relativamente ao grupo controlo (os dados do tanque 3 são apenas de um único peixe). No ensaio II observa-se que os valores em geral são superiores aos valores do ensaio I, no entanto para ambos os ensaios não se verificou nenhuma diferença significativa entre os grupos sujeitos a amónia ambiental e os grupos controlos, para $p < 0.05$. Para a variação de amónia no plasma dos peixes no ensaio I e no ensaio II observa-se que existe um aumento da concentração de amónia plasmática á medida que a concentração de amónia ambiental também aumenta. Para o ensaio I o grupo B e no ensaio II o grupo C são estatisticamente diferentes dos valores dos controlos de ambos os ensaios.

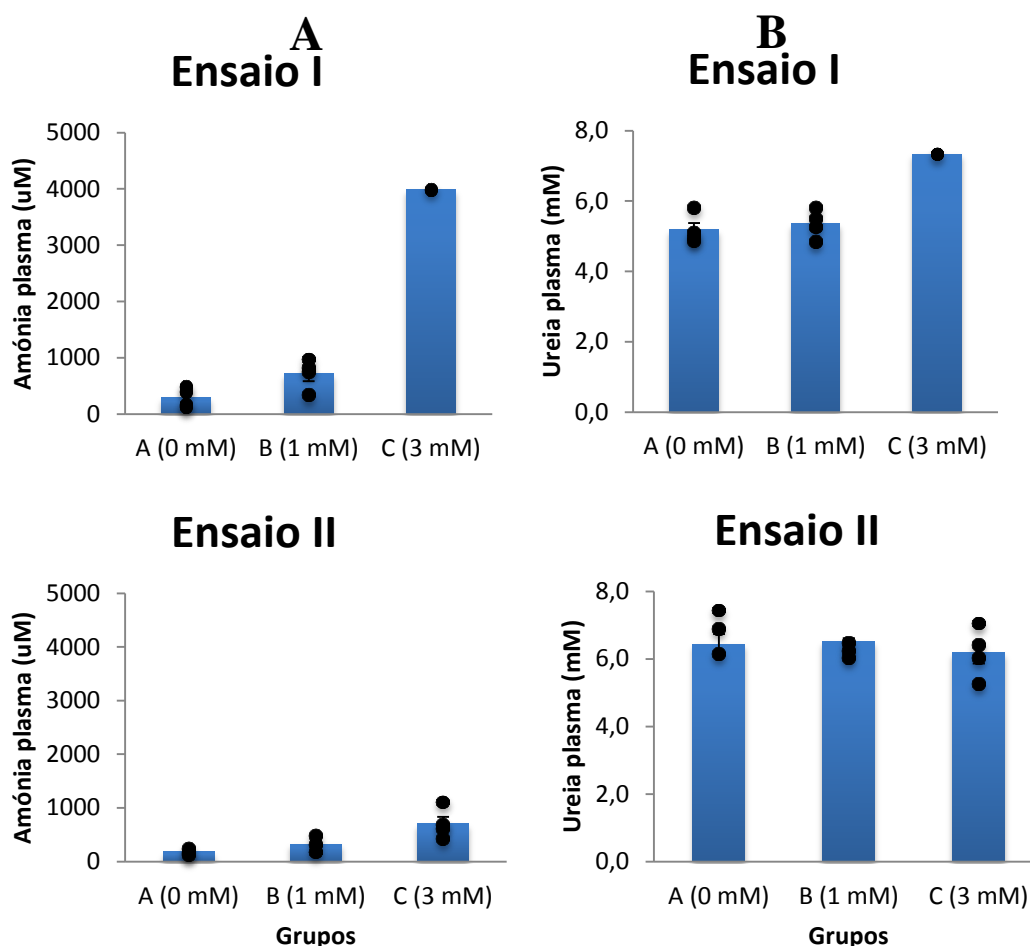


Figura 10 – Concentração de ureia e amónia no plasma obtido dos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM); pontos a preto (valores individuais de cada peixe); barras azul (valor médio); * valor estatisticamente diferente do controlo, $p < 0.05$.

3.2.1.2 Análise de cortisol, glucose e lactato

A exposição a um tóxico constitui um factor que pode interferir com a resposta ao stress e os mecanismos de ajuste do organismo. Por outro lado estudos anteriores sugerem que o cortisol pode ser um mediador da produção de ureia no *Opsanus beta*.

Na figura 11 pode-se ver a concentração de cortisol presente no plasma dos peixes sujeitos a diferentes tipos de concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM). Observa-se que no ensaio I os valores de cortisol são superiores para os grupos sujeitos a amónia ambiental comparativamente com os grupos do ensaio II, com o grupo B apresentar valores estatisticamente diferentes do grupo controlo entre si ($p < 0.05$). Para o ensaio II observa-se um aumento dos níveis de cortisol plasmático com o aumento da concentração ambiental de amónia, e observa-se também que o grupo sujeito a 3 mM de amónia ambiental tem valores significativamente superiores aos restantes grupos para $p < 0.05$.

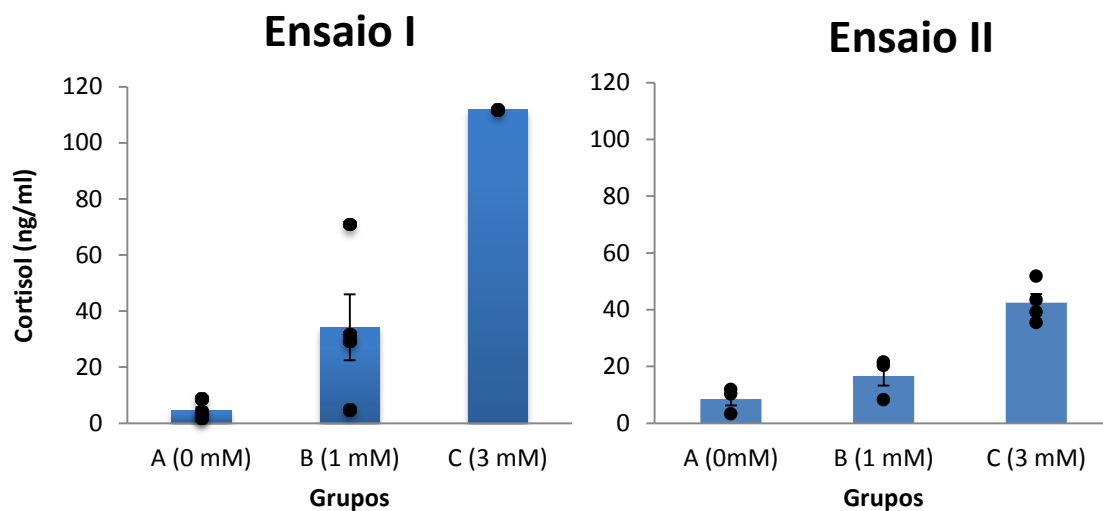


Figura 11 – Concentração de cortisol no plasma obtido dos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM); pontos a preto (valores individuais de cada peixe); barras azuis (valor médio de cada grupo); (*) valor estatisticamente diferente dos restantes grupos ($p < 0.05$).

Na figura 12 observa-se a concentração de glucose encontrada no plasma dos peixes exposto a diferentes concentrações de amónia ambiental. Entre os dois ensaios I e II, não existem muitas diferenças entre valores (ambos entre 1.5 e 2.0 mmol/L). No caso do ensaio I nota-se uma ligeira diminuição entre o grupo sujeito a 1 mM de amónia ambiental e o grupo controlo. No caso do ensaio II não se verifica nenhuma alteração

entre os grupos sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental e o grupo controlo. Para ambos os ensaios não foram encontrados diferenças significativamente diferentes entres os grupos sujeitos concentrações de amónia ambiental (B e C) e os grupos controlo (A) ($p < 0.05$).

A variação da concentração de lactato encontrada no plasma dos xarrosos, em geral os valores obtidos no ensaio II são superiores aos valores obtidos no ensaio I. No ensaio I observa-se um aumento da concentração de lactato entre os grupos sujeitos a 1 e 3 mM de amónia ambiental comparativamente com o grupo controlo (grupo sujeito a 1 mM apresenta um individuo com bastante variação comparando-o com os peixes do mesmo tanque), mas estatisticamente não existem diferenças significativas ($p < 0.05$).

No ensaio II observa-se que existe grande variabilidade em todos os grupos, contudo, os grupos sujeitos às concentrações 1 e 3 mM apresentam em média uma maior concentração de lactato no plasma que os peixes do grupo controlo, contudo, de igual forma para o que acontece com o ensaio I, não existem diferenças significativas entre os grupos sujeitos a concentrações elevadas de amónia ambiental e o grupo controlo para $p < 0.05$.

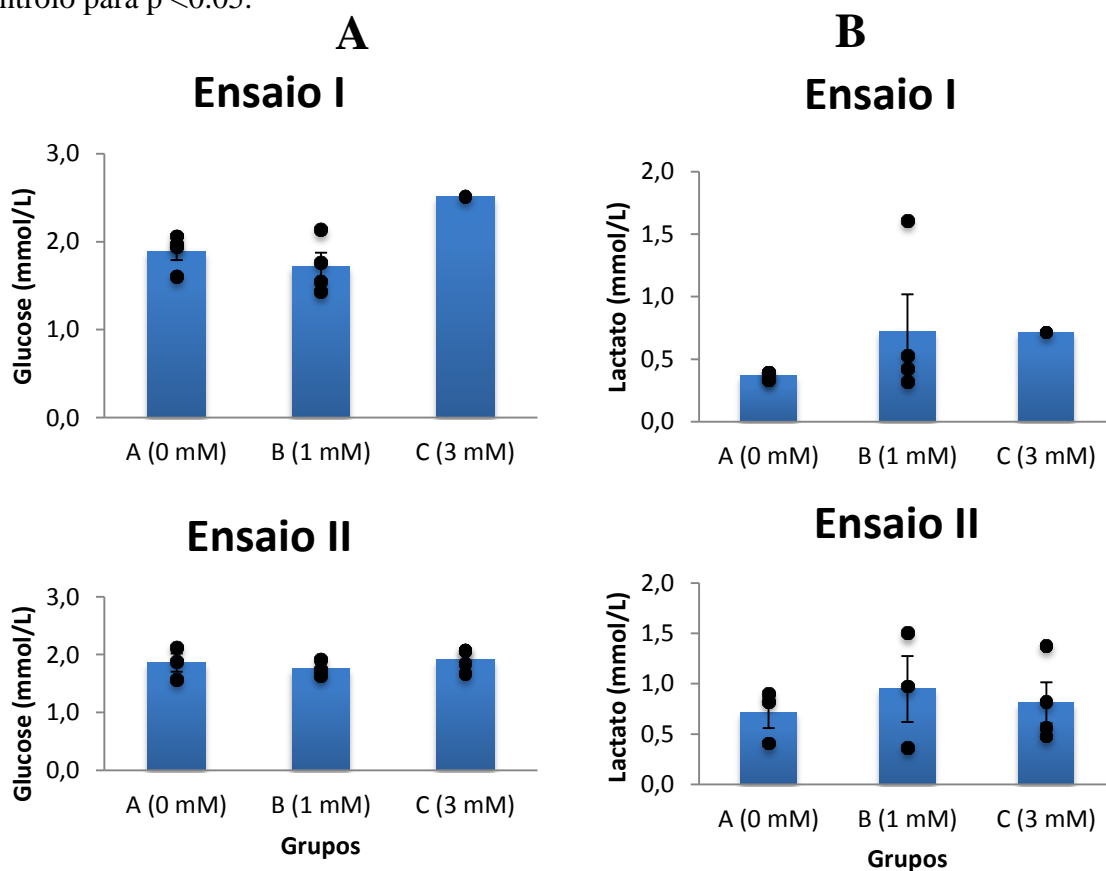


Figura 12 – Concentração de glucose (A) e lactato (B) no plasma obtido dos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM), nos ensaios I e II. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos A, B e C de cada ensaio, $p < 0.05$.

3.2.1.3 Análise dos iões plasmáticos

A determinação de vários electrólitos plasmáticos foi feita com o intuito de perceber se a exposição à amónia ambiental poderia levar a um desequilíbrio osmótico, quer por um efeito de troca de iões de NH_4^+ , quer por um ajuste nos mecanismos de troca, quer ainda por alterações do balanço ácido-base ou finalmente por possíveis efeitos deletérios da toxicidade da amónia.

Na figura 13 observa-se a variação da concentração dos iões presentes no plasma (cálcio, magnésio, fosforo, cloreto). Observa-se a variação da concentração do ião cloreto nos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental. Em ambos os ensaios os valores foram semelhantes, à excepção do ensaio II em que os grupos de 0 e 1 mM de amónia ambiental apresentam um individuo que possuía valores bastantes elevados comparando-os com os indivíduos do mesmo grupo, contudo, em ambos os ensaios não houve diferenças significantes de forma a afirmar que existiu alguma diferença entre grupos expostos a amónia e os respectivos grupos controlo ($p < 0.05$).

No ensaio I observa-se uma diminuição da concentração de fosforo entre o grupo controlo (0 mM) e o grupo sujeito a 1 mM de amónia ambiental e também uma diminuição (menor) entre o individuo sujeito a 3 mM e o grupo controlo, sendo que apenas os grupos expostos a 1 mM apresenta uma diferença estatisticamente significativa em relação aos restantes grupos ($p < 0.05$). No ensaio II não se verifica nenhuma diferença significativa entre os grupos sujeitos a 1 e 3 mM de amónia ambiental com o grupo controlo (0 mM). Observa-se também que entre os dois ensaios os valores do ensaio II são superiores aos valores de concentração de fosforo do ensaio I.

Para o cálcio e magnésio não se observou nenhuma alteração entre os grupos sujeitos a amónia ambiental e os grupos controlos ($p < 0.05$).

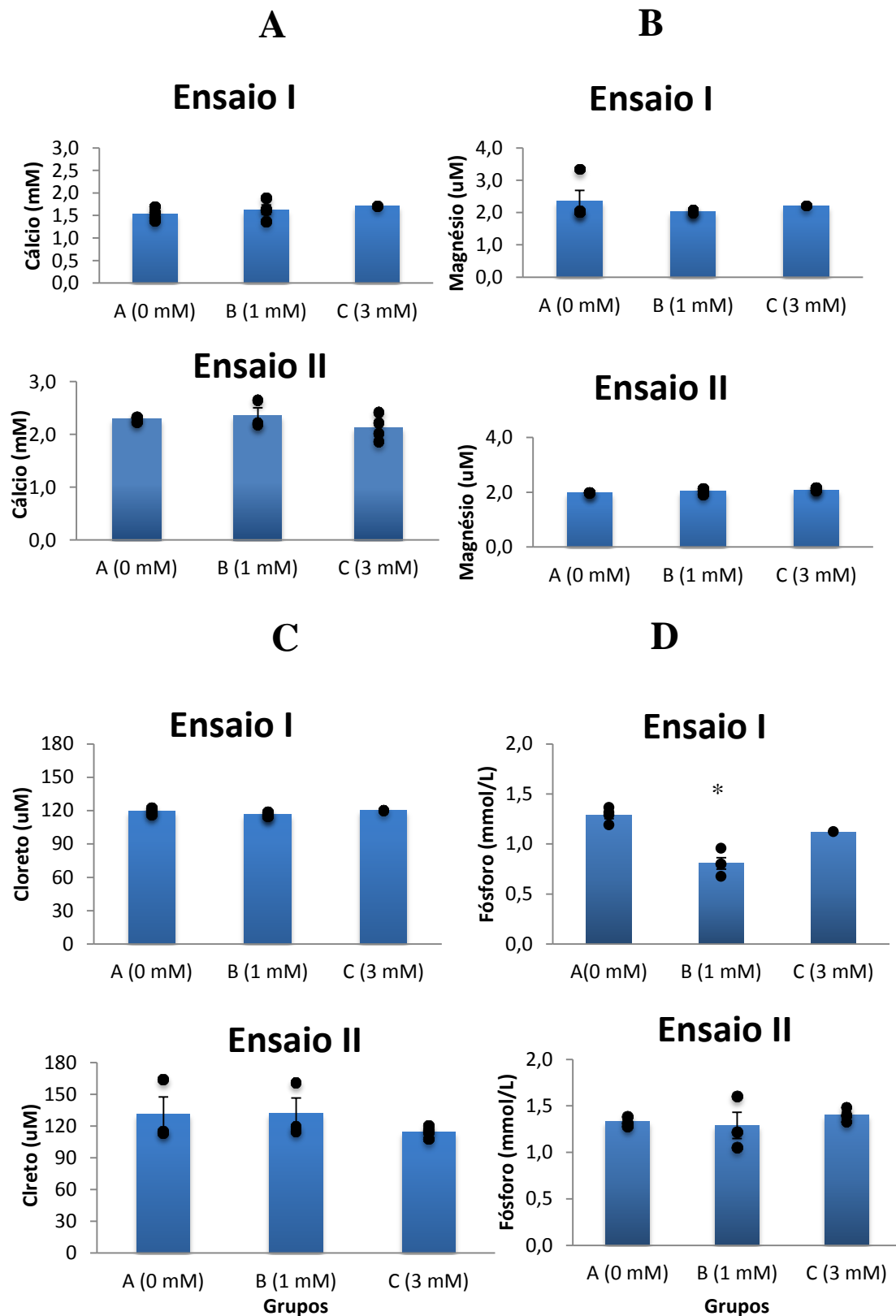


Gráfico 13 – Concentração dos diferentes íons no plasma, cálcio (A), magnésio (B), cloreto (C) e fósforo (D) obtido dos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amônia ambiental (0, 1 e 3 mM); pontos a preto (valores individuais de cada peixe); barras azuis (valores médios); valor significativamente diferente do controle, $p < 0.05$.

Na figura 14 pode se observar a variação de osmolaridade nos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM). Pode-se ver que os valores de osmolaridade obtidos do plasma dos peixes do ensaio I são em média superiores aos valores obtidos no ensaio II. Contudo, em cada ensaio os valores de cada grupo não são estatisticamente diferentes entre si para $p < 0.05$.

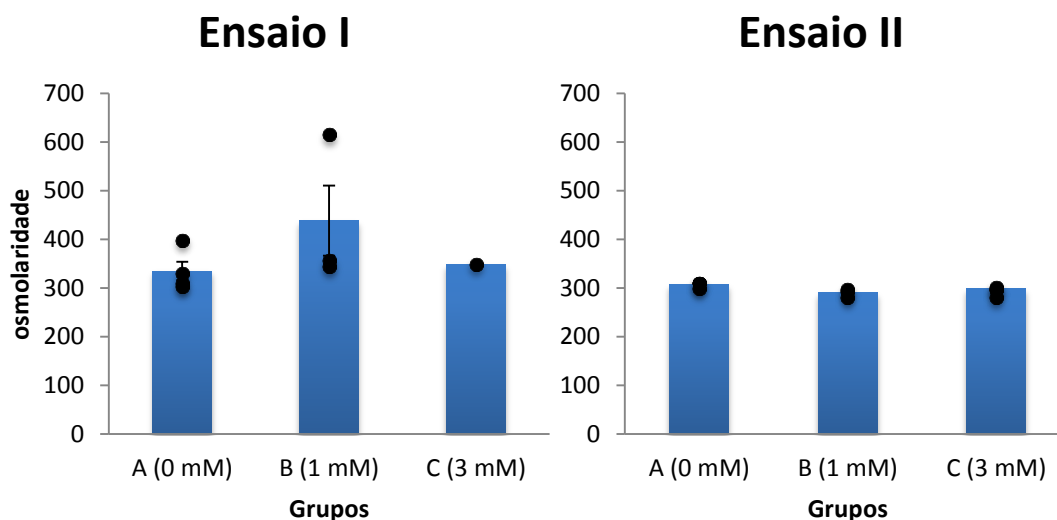


Figura 14 – Valores de osmolaridade no plasma obtido dos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos A, B e C de cada ensaio, $p < 0.05$.

3.2.1.4 Actividade enzimática branquial

A variação na actividade da Na^+/K^+ - ATPase branquial reflecte sobretudo o esforço metabólico deste tecido para suprir necessidades de trocas osmóticas e de iões. Na figura 19 observa-se a actividade da Na^+/K^+ - ATPase encontrada nas branquias dos peixes dos ensaios I e II. Para o ensaio I observa-se que não existe diferenças visíveis entre os grupos sujeitos a elevadas concentrações de amónia ambiental (grupos B e C) e o grupo controlo (grupo A). Para o ensaio II observa-se alguma variação entre os diferentes grupos, nomeadamente o grupo B que apresenta uma diminuição comparativamente ao grupo A (controlo), contudo esta variação não é significativa para $p < 0.05$. Também se observa que em média os valores encontrados para os grupos do ensaio II são superiores aos valores encontrados para os grupos do ensaio I.

A actividade da H-ATPase é relativamente mais específica, pois esta enzima serve fundamentalmente para a secreção de ácido e estabelecer um gradiente de sódio.

A secreção de ácido cria um meio favorável para a excreção de NH_3 por difusão facilitada ao transformar a amónia no exterior da célula em ião amónio, NH_4^+ , criando assim um gradiente para NH_3 (Wood & Nawata, 2012). Na figura 15 observa-se a variação da actividade da H-ATPase nas branquias dos peixes dos ensaios I e II. Para o ensaio I observa-se grande variabilidade entre indivíduos do mesmo grupo, sendo que o grupo C apresenta menor actividade (este grupo é constituído por apenas um indivíduo). No ensaio II observa-se de igual forma uma grande variabilidade dentro de cada grupo apesar de menor em relação ao ensaio I, sendo que em média o grupo C apresenta menor actividade que os restantes grupos. No entanto em ambos os ensaios não houve uma mudança significativa entre grupos de cada ensaio, para comparar as actividades.

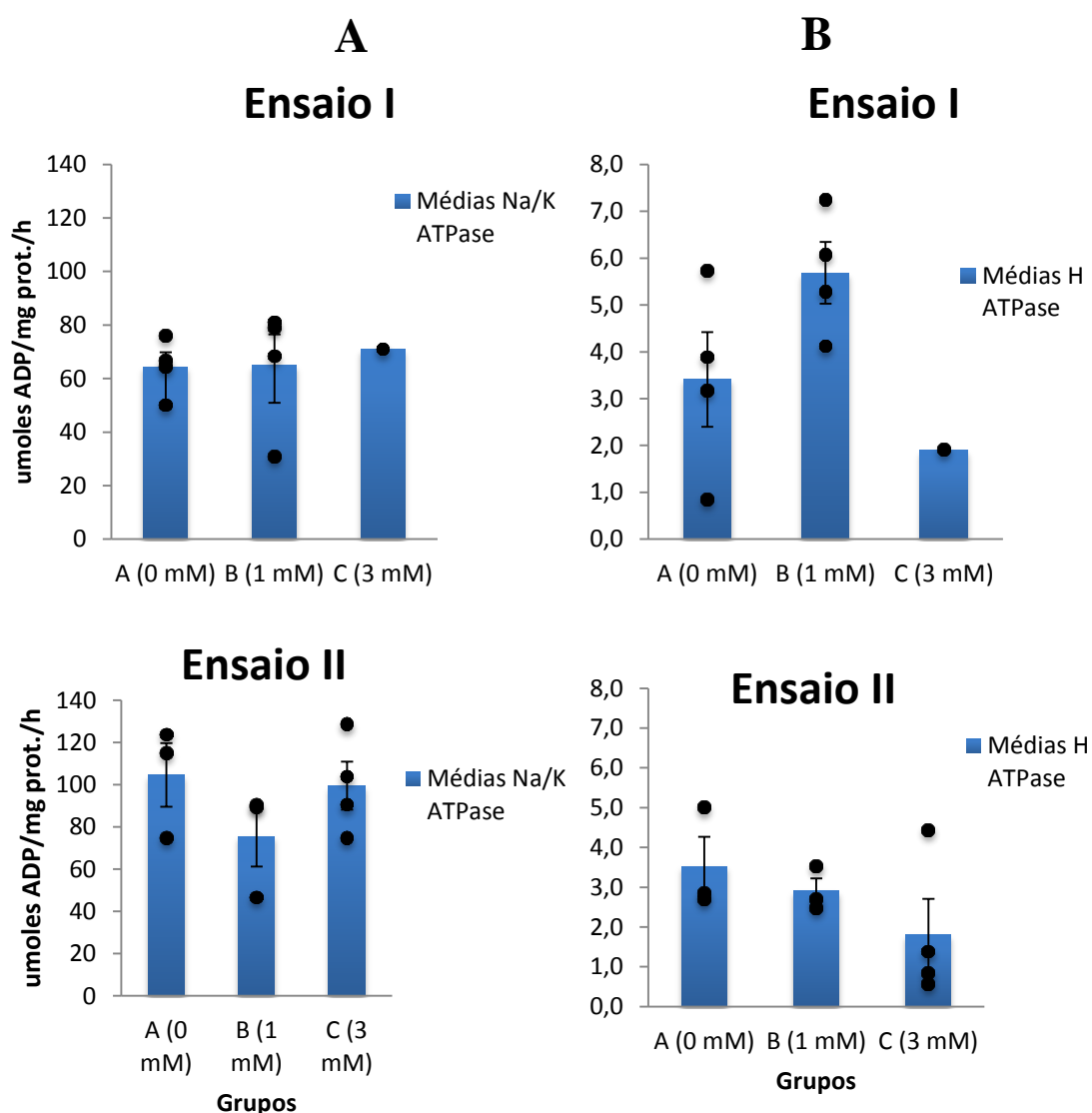


Figura 15 – Actividade da Na^+/K^+ - ATPase (A) obtida das branquias dos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM). Não se verificou nenhuma diferença significativa ($p < 0.05$). Actividade da H-ATPase (B) obtida das branquias dos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM). Não se verificou nenhuma diferença significativa ($p < 0.05$).

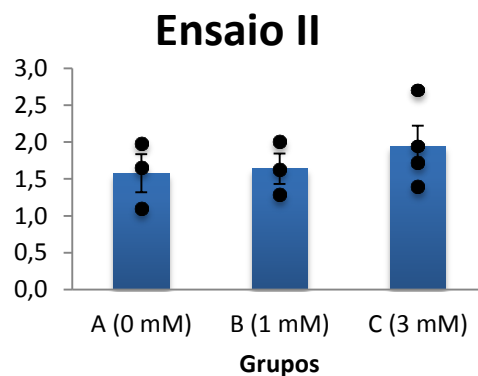
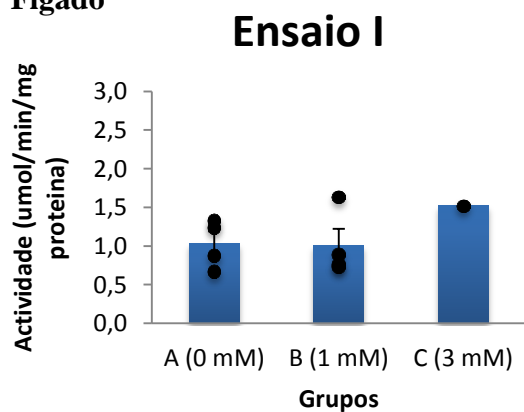
3.2.1.5 Actividade enzimática da GSase em relação à amónia ambiental

A análise da actividade GSase realizada nos tecidos recolhidos (fígado, cérebro e musculo) é um factor importante, pois como já referido a GSase é a enzima responsável pela fixação de amónia no ciclo ornitina-ureia, sendo por isso importante determinar se existiu alguma alteração na sua actividade com o aumento da amónia ambiental. É de igual modo importante analisar diferentes tecidos, o cérebro devido a ser o órgão principal do sistema nervoso e em caso de toxicidade por amónia é o que tem que estar mais protegido, o fígado pois pensa-se ser aí que se encontra o ciclo da ornitina-ureia e o músculo pois em caso de exercício vão metabolizados compostos azotados e poderá ocorrer um aumento de amónia.

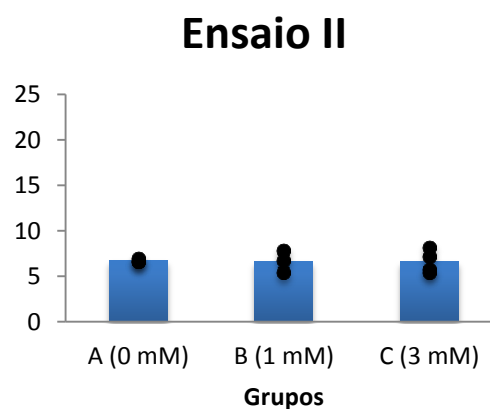
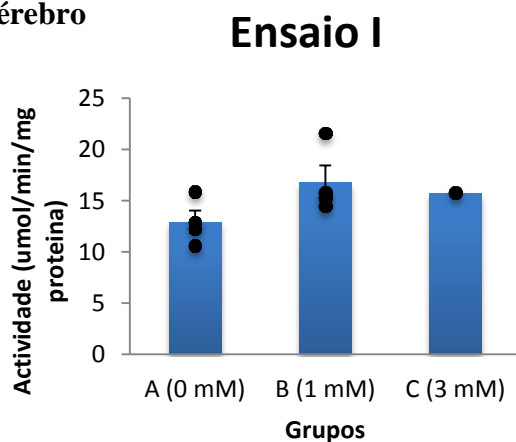
Na figura 16, pode-se observar a actividade enzimática da enzima GSase nos tecidos recolhidos dos peixes sujeitos a diferentes tipos de concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM). Pode-se observar que em ambos os ensaios a actividade hepática nos grupos expostos a amónia ambiental não difere muito do grupo controlo. Observa-se também a actividade do ensaio II é superior em média à actividade do ensaio I (gráfico I). No entanto não se observou nenhuma diferença significativa entre grupo de cada ensaio, para $p < 0.05$. Para a actividade GSase cerebral dos peixes observa-se que os valores obtidos no ensaio I (gráfico A) são em médias superiores aos valores obtidos no ensaio II (gráfico B). No caso do ensaio I há um aumento de actividade enzimática entre o grupo exposto a 1 mM de amónia ambiental comparativamente com o grupo controlo. Para o ensaio II os valores entre os grupos expostos a amónia ambiental e o grupo controlo, são semelhantes.

Para a actividade enzimática da GSase no músculo nos peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1 e 3 mM) pode se ver, entre os valores dos dois ensaios, os valores do ensaio II são superiores aos valores do ensaio I. No ensaio I apesar de observar um aumento da actividade da enzima GSase entre o grupo controlo e o grupo sujeito a 1 mM de amónia ambiental, mas uma diminuição de actividade entre o grupo controlo e o grupo sujeito a 3 mM de amónia ambiental (este grupo apenas constituído por um individuo) os valores não são significativamente diferentes para $p < 0.05$. No entanto, para o ensaio II observa-se que existe uma diminuição significativa da actividade GSase muscular entre o grupo controlo e o grupo sujeito a 3 mM de amónia ambiental.

Fígado



Cérebro



Músculo

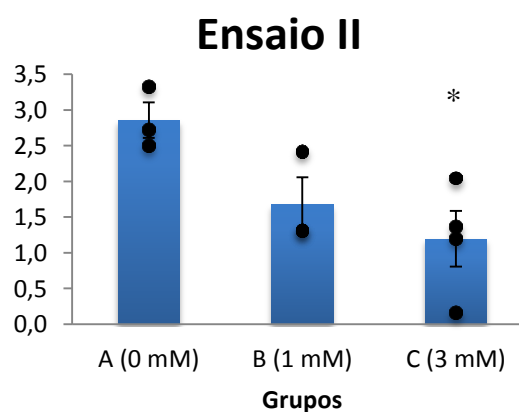
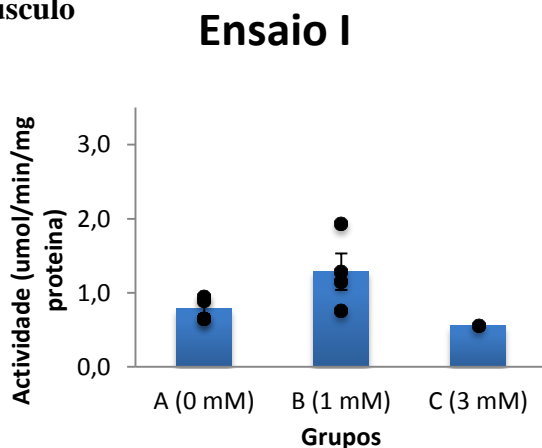


Figura 16 – Variação da actividade GSase nos diferentes tecidos recolhidos (fígado, cérebro e musculo); barras azul (valores médios de cada grupo); pontos a preto (valores individuais de cada peixe); * valor estatisticamente diferente do controlo, $p < 0,05$.

3.2.2 Resposta fisiológica dos peixes ao cortisol (injectado) em intervalos de tempo de 12 h e 36 h

Tabela 5 – Dados dos xarrocós usados no ensaio III (injecção com cortisol). Mostra o mês em que cada ensaio decorreu; comprimento individual de cada peixe usado em cada ensaio assim como a média de cada grupo; sexo de cada indivíduo; peso individual de cada peixe e média de cada grupo; índice de condição (K) de cada peixe e média de cada peixe; valor de K esperado para machos (M) e fêmeas (F) para a altura do ano em que cada ensaio decorreu.

Mês	Grupos	Peixes	peso (g)	comprimento (cm)	sexo	factor condição (K)	Factor condição (K) de referência (Modesto e Canário, 2002)	
Novembro	Grupo 36 h	1	126	18,2	F	2,1	M = 1,75	
		2	105,5	19,6	M	1,4		
		3	125,2	20,2	F	1,5		
		Médias	--	118,9 ± 5,47	19,3 ± 0,48	--	1,7 ± 0,17	
	Grupo 12h	4	136,8	20,8	F	1,5	F = 1,85	
		5	131,6	19,6	M	1,7		
		6	106,6	19,2	F	1,5		
		Médias	--	125,0 ± 7,61	19,9 ± 0,39	--		1,6 ± 0,06

Na figura 17 pode-se observar a variação da concentração de cortisol no plasma dos peixes injectados com cortisol. Observa-se que houve um elevado aumento dos níveis de cortisol entre o tempo zero (t0) e tempo final (tf), os níveis aumentaram entre 20 a 100 vezes mais que os níveis iniciais. Estatisticamente verificou-se que houve um aumento significativo dos níveis plasmáticos de cortisol.

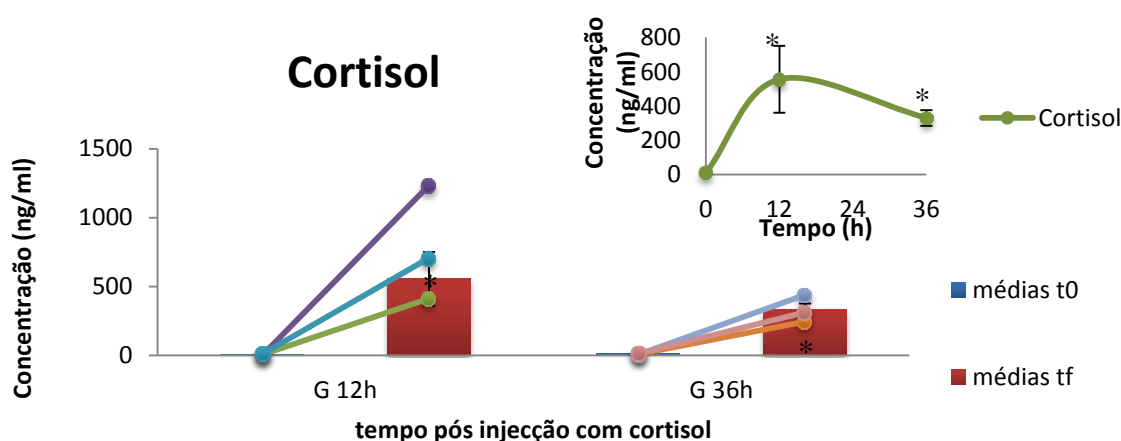


Figura 17 – Concentração de cortisol obtida dos plasmas dos peixes sujeitos a diferentes períodos de tempo (12 e 36h) de injecção com cortisol; t0 representa os valores iniciais encontrados no plasma antes da injecção com cortisol, tf representa os valores encontrados ao fim de 12 e 36 h; pontos ligados por rectas mostram a variação individual de cada peixe entre o tempo 0 e o tempo final de cada grupo, (*) valores estatisticamente diferentes do tempo 0 ($p < 0,05$).

Na figura 18 pode-se observar a alteração da concentração de glucose entre os dois grupos injectados com cortisol mas com períodos de tempo de injeccção diferentes. Observa-se que em ambos os grupos houve um aumento em relação à concentração inicial e á concentração no final da experiência, tendo sido este aumento significativo para $p < 0.05$, observa-se que a variação de lactato encontrada no plasma dos peixes injectados com cortisol não sofreu muita alteração entre o tempo zero e o tempo final e também entre grupos (12h e 36 h) não houve diferenças significativas ($p < 0.05$).

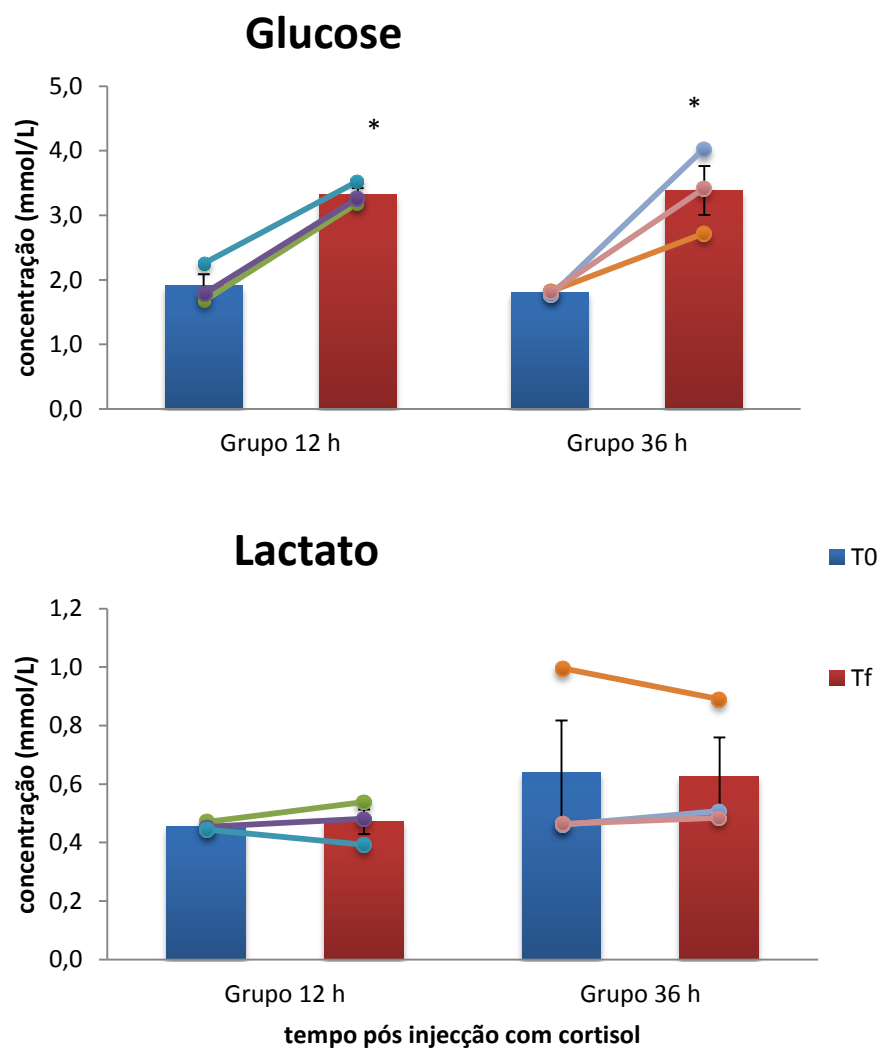


Figura 18 – Concentração de glucose e lactato obtida dos plasmas dos peixes sujeitos a diferentes períodos de tempo (12 e 36h) de injeccção com cortisol; pontos ligados por rectas mostram a variação individual de cada peixe entre o tempo 0 e o tempo final de cada grupo; (*) valores significativamente diferentes do respectivo controlo ($p < 0.05$).

Na figura 19 observa-se a variação de amónia no plasma ocorrida em grupos de peixes sujeitos a diferentes tempos de injeccção com cortisol. Como se pode ver, em média verifica-se que existe tendência de diminuição entre o tempo inicial (t0) e o

tempo final (tf), no entanto não existe uma diferença estatisticamente significativa para $p < 0.05$. A variação de concentração de ureia no plasma dos peixes de ambos os grupos não se altera com o tempo de injeção de cortisol, não havendo diferenças significativas ($p < 0.05$).

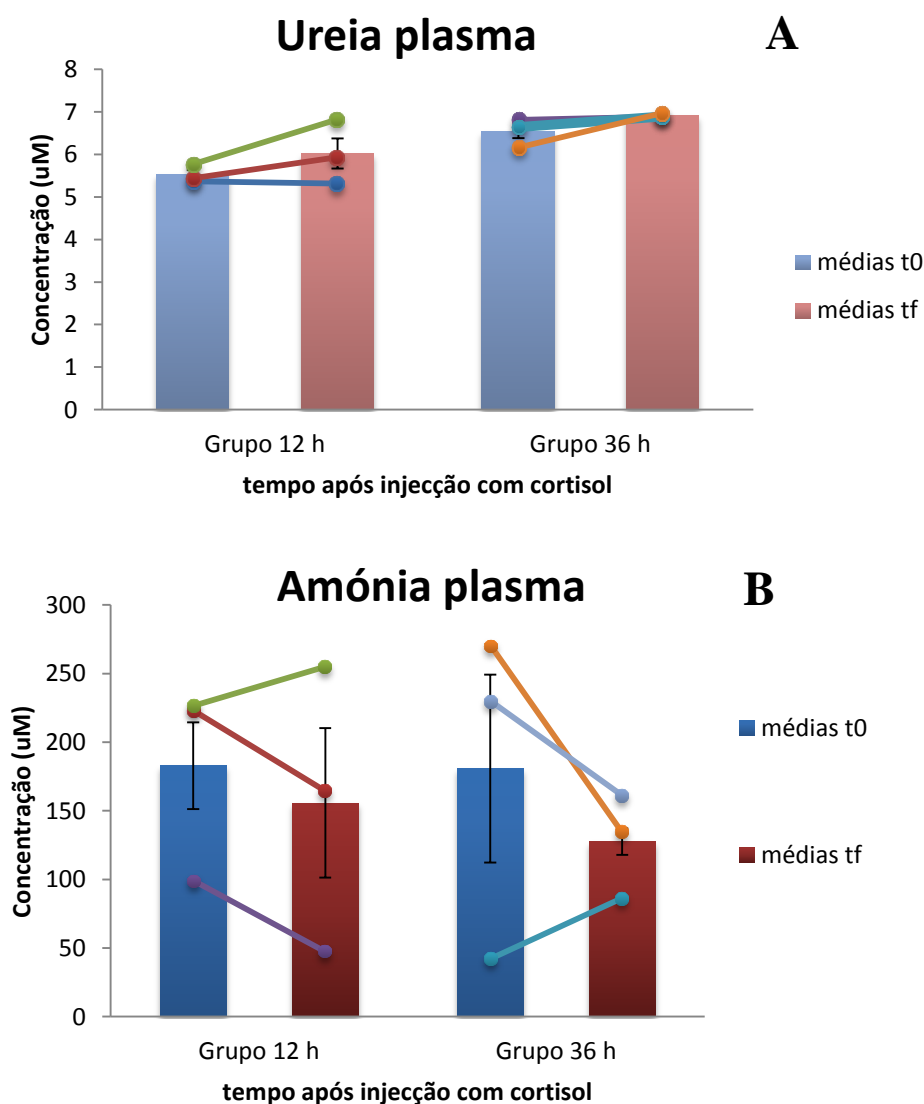


Figura 19 – Concentração de ureia (A) e amónia (B) obtida dos plasmas dos peixes sujeitos a diferentes períodos de tempo (12 e 36h) de injeção com cortisol. Pontos ligados por rectas mostram a variação individual de cada peixe entre o tempo 0 e o tempo final de cada grupo.

Pela figura 20 observa-se que a concentração de cálcio em ambos os grupos não sofreu alteração ao longo do tempo de injeção com cortisol para $p < 0.05$.

Na figura 28 pode se observar a variação da concentração do ião cloreto nos diferentes tempos de injeção com cortisol. No grupo injectado durante 12 h observa-se que a concentração do ião cloreto aumenta um pouco, mas não sendo significativo, contudo no grupo dos peixes injectados durante 36 h a concentração de cloreto diminui significativamente ($p < 0.05$) em relação à do grupo controlo. A variação da concentração de fósforo no grupo injectado durante 12 h diminuiu em relação ao controlo (t_0), mas no caso do grupo de peixes injectados durante o período de tempo de 36 h houve um pequeno aumento da concentração de fosforo em relação ao grupo controlo (t_0), no entanto, em ambos os grupos as diferenças encontradas não estatisticamente diferentes para $p < 0.05$.

Verifica-se que não houve variação significativa ($p < 0.05$) na concentração de magnésio no plasma dos peixes comparativamente à concentração inicial, nem diferença entre o grupo injectado durante 12 h e o grupo injectado durante 36h.

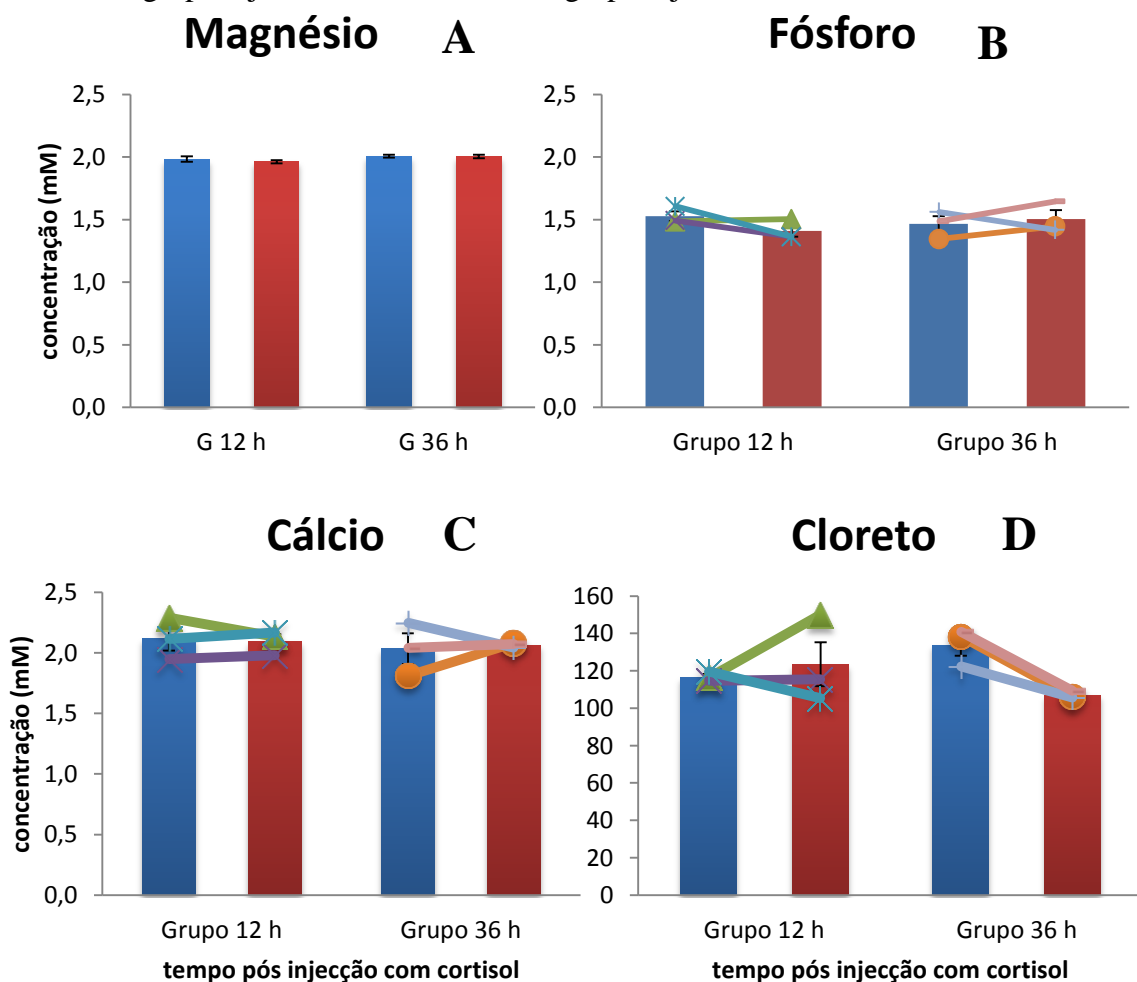


Figura 20 – Concentração de magnésio (A), fósforo (B), cálcio (C) e cloreto (D) obtida dos plasmas dos peixes sujeitos a diferentes períodos de tempo (12 e 36h) de injeção com cortisol. Pontos ligados por rectas mostram a variação individual de cada peixe entre o tempo 0 e o tempo final de cada grupo; não houve diferenças significativas observadas para $p < 0.05$.

3.2.2.1 Osmolaridade

Foi medida a osmolaridade para o ensaio do cortisol de forma a poder determinar se houve alguma alteração na capacidade de osmorregulação dos peixes (figura 21). Verificou-se que em média os valores se mantiveram constantes (não havendo diferenças significativas, $p < 0.05$), contudo observa-se que um peixe do grupo injectado durante 36 h teve uma drástica diminuição nos valores de osmolaridade.

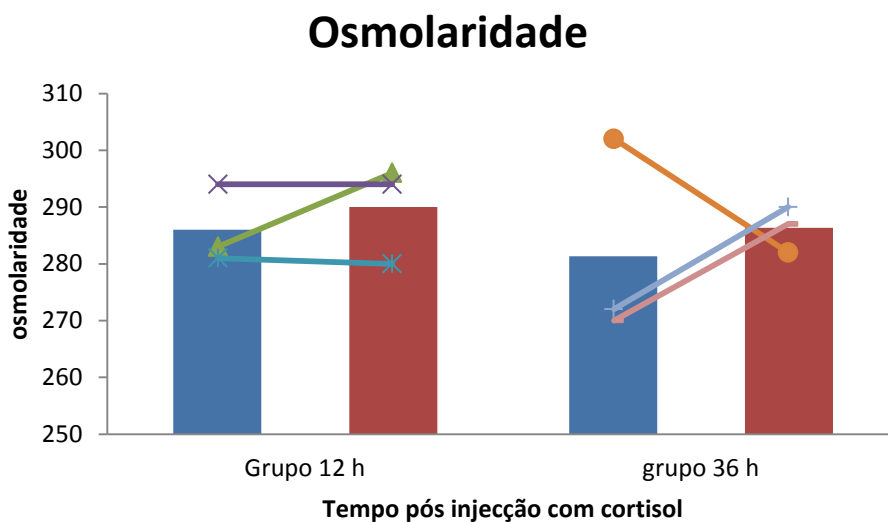


Figura 21 – Valores de osmolaridade obtidos de peixes sujeitos a diferentes períodos pós injeção com cortisol. Barras a azul (valores médios do tempo zero); barras a vermelho (valores médios do tempo finais de cada grupo); rectas variação individual de cada peixe); não houve diferenças significativas para $p < 0.05$.

3.2.2.2 Actividade enzimática branquial.

As actividades das ATPases na brânquias, quer Na^+/K^+ -ATPase, quer H^+ -ATPase, comportaram-se da mesma forma que nos ensaio I e II, não havendo alteração entre os diferentes grupos (figura 22), neste caso, entre grupos com tempos de injeção com cortisol diferentes.

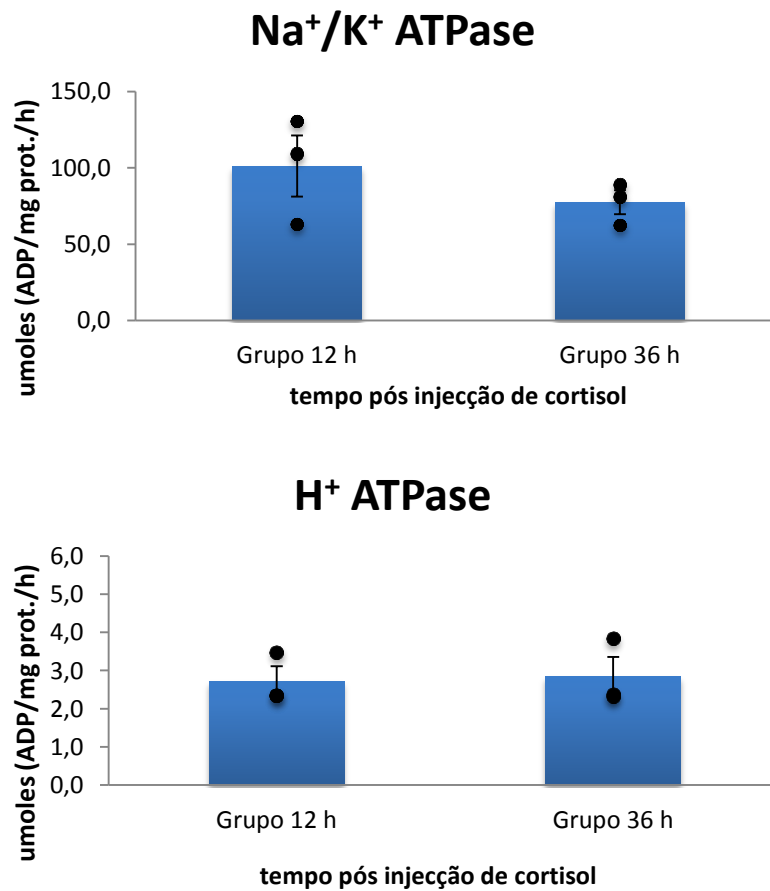


Figura 22 – Actividade das enzimas ATPase obtida as brânquias dos peixes sujeitos a diferentes períodos de tempo (12 e 36h) de injeção com cortisol; barras a azul representam as médias dos valores encontrados no final de cada tempo.

3.2.2.3 Actividade enzimática da GSase

Na figura 23 pode-se ver a actividade da enzima GSase para os diferentes tecidos recolhidos (fígado, cérebro e musculo). Observa-se que para todos os tecidos não se registou nenhuma diferença significativa entre os diferentes tempos pós injeção com cortisol.

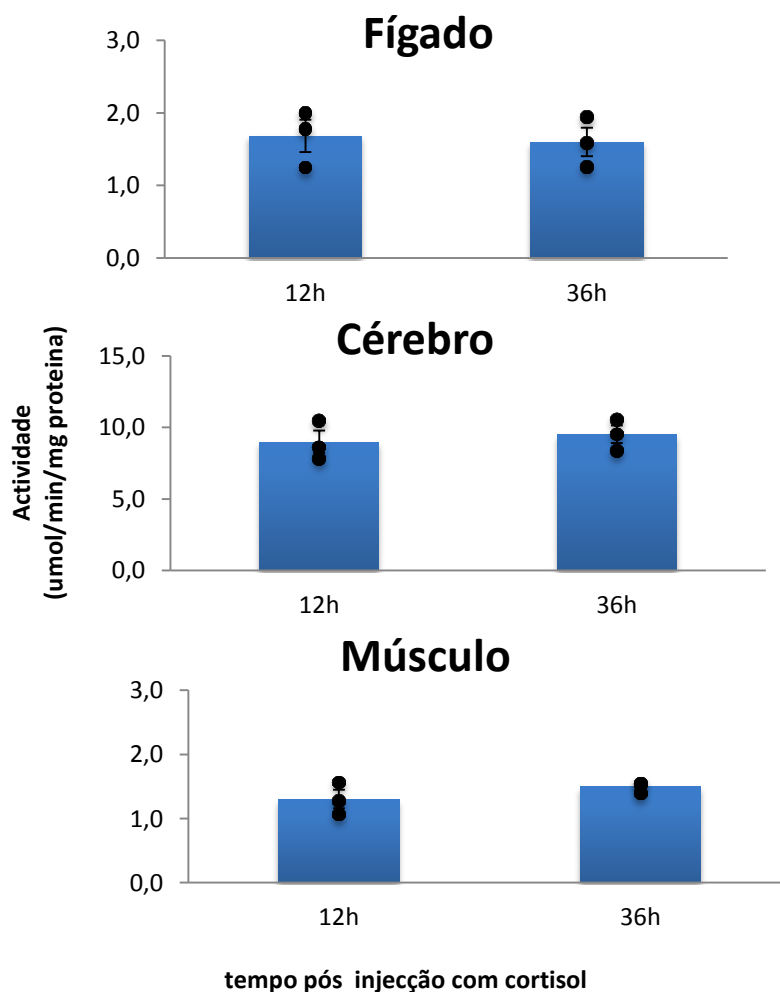


Figura 23 – Actividade da enzima GSase obtida dos tecidos recolhidos (fígado, cérebro e musculo) dos peixes sujeitos a diferentes períodos de tempo (12 e 36h) de injeção com cortisol; barras a azul representam as médias dos valores encontrados no final de cada tempo; pontos pretos representam valores individuais de cada peixe.

4. Discussão

No seguimento de trabalhos anteriores e com o objectivo de determinar a tolerância à amónia e o grau de ureotelismo nesta espécie, este estudo é o primeiro a ser realizado para medir a actividade da GSase na espécie *H. dydactilus*. Para isso foram utilizados desafios ambientais, tais como o aumento de amónia ambiental, quer tratamentos endógenos, como o aumento de cortisol endógeno. Apesar dos resultados não serem conclusivos, pois não foi possível verificar uma alteração significativa na actividade da enzima GSase este estudo permite estabelecer uma técnica para determinar a GSase e dar indicações para ensaios futuros.

4.1 Aferição do método para determinação da actividade da GSase e incubações *in-vitro*

Visto que este método ainda não tinha sido posto em prática no laboratório nem realizado nesta espécie, foi necessário verificar se era adequado e se tinha sensibilidade para mostrar diferenças entre tratamentos. Os testes que antecederam os vários ensaios, tanto *in-vivo* como *in-vitro*, foi mostrado que o protocolo usado para determinar a actividade GSase funcionou, na medida em que se obteve um aumento de absorvância com o aumento do volume de amostra usada (figura 3), contudo a actividade da enzima GSase mostrou ter grande variabilidade de peixe para peixe, com tendência a diminuir com o aumento do volume de amostra usada no protocolo, mas com a diminuição da variabilidade. O gráfico que compara a actividade GSase com o volume de amostra deveria ser uma recta, pois o volume seria acertado nos cálculos, contudo isto não acontece, devendo-se ao factor de diluição, ou seja, nos testes foi apenas alterado o volume de amostra mas todos outros volumes de reagentes se mantiveram constantes ao protocolo. Apesar de se verificar uma menor variabilidade da actividade GSase para o volume de 20 ul de amostra, optou-se por utilizar o volume de 10 ul de amostra por ser o volume que consta no protocolo usado.

O gráfico 4 reforça que o método utilizado na medição de GSase funciona, pois ao ser medida a actividade GSase no fígado de robalo observou-se que este apresenta um valor significativamente menor que a actividade da GSase para o xarroco, para $p < 0.05$.

Os testes realizados com os fígados de xarrocos mostraram (apenas para um fígado de peixe) que com o aumento da concentração de amónia ambiental existe, uma diminuição da actividade enzimática, na qual a concentração de 2 mM fez com que a actividade da GSase no fígado diminuísse significativamente ($p < 0.05$) em relação ao grupo controlo, contudo esta diminuição não se verificou para o segundo fígado de xarroco utilizado na mesma experiência, pelo contrário verificou-se um ligeiro aumento (mas não sendo significativo para $p < 0.05$). No teste com cortisol, que apenas foi realizado em fígado de robalo também não foi observado nenhuma alteração de actividade da GSase. Por isso foi feita a forskolina. No teste em que os fígados de xarroco foram sujeitos a diferentes concentrações de forskolina, não foi observada nenhum tipo de relação com o aumento da dosagem de forskolina, e sendo a forskolina

um estimulador da actividade GSase, tornou o método inconclusivo. No entanto estes resultados poderão indicar que é necessário um estímulo no sistema nervoso central para haver uma resposta do ciclo ornitina-ureia e não apenas um estímulo ao nível do fígado, ou então aumentar o tempo de incubação para esta espécie que é caracterizada de ter um metabolismo lento.

4.2 Efeitos da exposição à amónia ambiental *in-vivo*

No nosso estudo, a espécie *Halobatrachus didactylus*, pertence à família Batrachoididae, estando a sua tolerância à amónia entre os níveis intermédios dos membros da sua família descritos acima, em condições de elevada toxicidade exhibe alterações neurológicas ou com desequilíbrios no balanço ácido-base (Randall e Tsui 2002; Eddy 2005; Smart 1976; Jordão 2008).

Nos ensaios realizados para testar a resposta da actividade GSase a diferentes concentrações de amónia ambiental num período de 24 h (ensaio I e ensaio II), as concentrações de amónia encontradas nas amostras de água recolhidas (a cada 8 h) mostraram que existiu um aumento da amónia ambiental presente na água e que estas se mantiveram constantes durante o período de 24 h, podendo-se afirmar que houve um factor stressante a ser exercido durante um período de 24 h nos xarrocós sujeitos a 1 e 3 mM de amónia ambiental. Para o ensaio I parece haver uma relação entre a amónia ambiental e a ureia presente na água, contudo, para o ensaio II esse padrão não é visível.

Observa-se também que a concentração de amónia no plasma aumenta com o aumento da amónia ambiental, mas não se consegue nenhum tipo de padrão para a ureia no plasma em relação à amónia ambiental.

Estes valores ambientais decorrentes do desenho experimental impedem que se pudesse calcular as taxas de excreção de amónia para os grupos B e C. No entanto foi calculada a taxa de excreção no grupo A. Observou-se que os grupos controlo do ensaio I e ensaio II apresentaram o mesmo padrão de excreção de amónia (figura 10), no entanto os valores observados são muito diferentes entre cada ensaio, com o ensaio I apresentar valores de taxas de excreção de amónia de 45, 120 e 20 $\mu\text{mol/h/Kg}$ para as 8, 16 e 24 h respectivamente, e o ensaio II apresentar valores de 10, 20 e 12 $\mu\text{mol/h/Kg}$. Esta diferença de gama de valores poderá estar associada ao facto de que para o ensaio I

os pesos dos peixes serem mais homogéneos assim como inferiores aos pesos dos peixes do ensaio II que apresentavam maior variabilidade e pesos superiores.

Os resultados obtidos para as taxas de excreção estão em concordância com os anteriormente obtidos (Jordão, 2008) em que verifica-se que existe uma maior excreção de produtos azotados nos períodos nocturnos (figura 10), apesar de as taxas de excreção encontradas para a ureia serem reduzidas principalmente no ensaio II em que os valores se situaram perto de 0 (indicar que a existência de valores negativos é muito provavelmente uma consequência da pouca sensibilidade do método de determinação de ureia, mas que indica taxas de excreção muito baixas ou nulas). Estes resultados poderão dizer que, assim como é descrito para outras espécies como é o caso peixe-gato indiano, que para um fotoperíodo de 12h luz:12h escuro, excreta mais ureia no período escuro do que no período de luz, o que pode estar relacionado com a actividade locomotora ser predominantemente nocturna (Kajimura *et al.* 2002). No entanto é preciso ter em conta o facto de poder haver um stress cumulativo nos peixes, devido à recolha de água feita de 8 em 8 horas que poderá ter influenciado este padrão de excreção, pois a experiência iniciou-se às 10h da manhã e a maioria das recolhas feitas deu-se no período de noite.

No ensaio I ocorreu a morte de vários peixes, não só no tempo de aclimatização como também durante o ensaio (grupo sujeito a 3 mM de amónia ambiental) isto poderá ser uma das razões para afirmar que os peixes no caso do ensaio I se encontravam debilitados. Estudos realizados por Ruyet e Quemener (1995) indicaram que vários factores ambientais, como a temperatura, o pH e o O₂ influenciam a acção tóxica da amónia, e consequentemente afectam a sensibilidade dos peixes a este composto. Contudo no período de aclimatização, e mesmo durante o decorrer dos ensaios, não houve alteração observável nos factores ambientais acima referidos.

O factor condição (k) dos peixes usados nos ensaios I e II encontravam-se abaixo do que seria esperado para a altura do ano em que os ensaios se realizaram. Apesar de os peixes do ensaio I terem sido mantidos durante mais tempo nas instalações do LEOA do que os peixes utilizados no ensaio II, os valores de factor de condição não se mostraram melhores que os peixes do ensaio II que foram utilizados com curto espaço de tempo entre terem sido capturados do rio Arade e utilizados na experiência.

Estes baixos valores de K podem estar relacionados com a alimentação, no caso do ensaio I os peixes foram alimentados com delícias do mar, que se mostrou não ser um alimento mais adequado para os peixes pois estes ingeriam pouco alimento, no caso

do ensaio II os peixes foram alimentados com lula congelada, tendo tido esta uma excelente aceitação por parte dos peixes. Outro factor que poderá ter levado a valores de K baixo, no caso do ensaio II, poderá ter sido o facto do tamanho individual de cada individuo em cada tanque, pois ao contrário do ensaio I em que o tamanho dos peixes era homogéneo, no ensaio II a variação de tamanho foi bastante maior, podendo ter originado que peixes de tamanho mais pequeno tenham sofrido maior stress ao terem no mesmo tanque peixes de maiores dimensões.

Outro factor a ter em conta, foi também o número baixo de indivíduos de utilizados em cada ensaio, para o ensaio I foram usados 9 peixes (controlo n=4, 1 mM n=4 e 3 mM n=1) e para o ensaio II foram utilizados 10 peixes (controlo n=3, 1 mM n=3 e 3 mM n=4). O baixo número de indivíduos, reflecte-se numa maior heterogeneidade nos valores obtidos, tendo sido observados grande variabilidades em cada grupo de cada ensaio. Um valor mínimo de 6 peixes por tanque seria mais adequado, mas tal não foi possível devido à falta de peixes.

De forma a tentar realizar estes ensaios com maior precisão, dever-se-ia realizar a experiencia com oito grupos (n=6) em vez de três, ou seja, dois grupos seriam mantidos em tanques de 350 L de forma a ser sujeito ao menor número de factores stressantes, outros dois grupos seriam os grupos controlos (0 mM de amónia ambiental), dois grupos sujeitos a um nível intermédio de amónia ambiental (1 mM) e por ultimo dois grupos sujeitos a um nível elevado de amónia ambiental (3 mM), desta forma poder-se-ia obter uma resposta ao fim de 24 e 48 h. Antes do inicio da experiência, dever-se-ia fazer uma recolha de sangue de cada peixe assim como recolher todos os dados das condições da água de cada meio (pH, amónia, temperatura, ureia, salinidade). No fim da experiencia todos os peixes seriam anestesiados com uma dose letal de anestésico, e assim como foi feito para os ensaios I e II dever-se-ia recolher todos os dados (peso, sexo e comprimento) e todos os tecidos e sangue de cada peixe. Tendo analisado todos os dados obtidos, dever-se-ia comparar o grupo controlo com o grupo que se manteve no tanque de 50 L, para saber se existia algum factor stressante não desejado no grupo controlo, caso não exista, de seguida comparar-se-ia os grupos sujeitos a amónia ambiental com o grupo controlo de forma a saber se foi exercido por parte da amónia, uma mudança fisiológica no peixes tornando-os ureotélico.

4.3 Resposta enzimática das ATPase presentes nas branquias de peixes sujeitos a diferentes concentrações de amónia ambiental

Ao contrário dos tetrápodes terrestres, os peixes respiram maioritariamente pelas branquias, que estão expostas directamente a amónia exógena durante exposição de amónia ambiental. Amónia tem que penetrar através do epitélio branquial e cutâneo antes de ser transportada do sangue para o cérebro e outros órgãos. Como órgão osmorregulatório e respiratório activo, as branquias dos peixes possuem elevada capacidade de produzir espécies de oxigénio reactivo, Ching *et al.* (2009) reportou que a exposição a amónia ambiental resultou num stress oxidativo das branquias do góbio (*Boleophthalmus boddarti*). Em adição, amónia ambiental tem efeitos nocivos nos transportadores iónicos branquiais não associados com acumulação de amónia endógena.

A exposição das branquias a amónia ambiental predispõe estas a alterações histopatológicas que poderão quebrar o transporte iónico (Daoust e Ferguson, 1984). A quebra da integridade epitelial tem consequências adversas para o transporte iónico e outros processos celulares, e a proliferação das células mucosas branquiais pela amónia ambiental aumenta as distâncias de difusão através das branquias (Ferguson *et al.*, 1992).

A análise feita das branquias recolhidas dos xarrococos dos ensaio I e ensaio II não foram observadas diferenças significativas, para as ATPases (Na^+/K^+ -ATPase, H^+ -ATPase) entre os grupos sujeitos a concentrações de amónia ambiental e grupos controlo, no entanto verifica-se que em média os valores observados para a actividade da Na^+/K^+ -ATPase no peixes do ensaio I são inferiores aos valores médios da actividade da Na^+/K^+ -ATPase nos peixes do ensaio II. Para o ensaio I observa-se que existe uma menor variabilidade dentro de cada grupo de peixes comparativamente com os grupos do ensaio II. Contudo não se pode afirmar que existe algum tipo de relação entre a actividade da bomba sódio potássio e a concentração de amónia ambiental.

Em relação a actividade H^+ -ATPase, observa-se o mesmo cenário da bomba sódio potássio, no entanto, apesar de não se ter encontrado nenhuma diferença significativa entre os vários grupos de cada ensaio, para o ensaio I observa-se que a média de actividade H^+ -ATPase para o grupo exposto a 1 mM é superior em relação aos restantes grupos e comparando com os níveis de foforo encontrados no plasma os mesmo grupo (exposto a 1 mM) apresenta níveis significativamente mais baixos que os

restantes grupos do ensaio I, o que poderá dizer que houve um maior gasto de energia nos peixes do grupo exposto a 1 mM (ensaio I) podendo este gasto energético estar relacionado com a actividade da H⁺-ATPase, que pela variabilidade encontrada não foi possível encontrar diferenças significativas (p <0.05).

4.4 Resposta da GSase e ciclo ornitina-ureia à amónia ambiental e ao aumento de cortisol

Apenas alguns teleósteos são ureotélicos, ou seja, excretando mais de 50 % dos desperdícios de azotados como ureia (*Opsanus beta* em condições de confinamento e elevada taxa populacional (Walsh *et al.*, 1990), ou capazes de desintoxicarem pequenas quantidades de amónia durante períodos de aumento de amónia *Mugilogobius abei* (Iwata *et al.* 2000). Para estes animais a activação do ciclo ureia-ornitina é essencial mas não é claro quais os sinais e mecanismos fisiológicos envolvidos no desencadear deste conjunto de reacções.

Estudos anteriormente realizados por Barimo e co-autores (2007) e Jordão (2008) demonstraram que a espécie *Halobatrachus didactylus* é um dos Batrachoididae que excreta ureia, podendo ser uma espécie moderadamente ureotélica quando exposta a condições ambientais onde os níveis de amónia são relativamente elevados.

Neste estudo observou-se a actividade da enzima GSase, a enzima responsável por fixar a amónia, na forma de glutamina, e que corresponde ao primeiro passo no ciclo da ureia. Nos ensaios I e II não foi possível observar-se uma resposta da GSase nos fígados e cérebros, no entanto observa-se que para o ensaio II houve uma diminuição da actividade GSase para o grupo exposto a 3 mM comparativamente aos restantes grupos. Esta diminuição pode estar associada ao colapso fisiológico devido à toxicidade da amónia. Os dados observados para os ensaios I e II revelaram também que a actividade da GSase no tecido cerebral é bastante superior à dos restante tecidos analisados, no entanto houve diferenças entre os dois ensaios na qual o ensaio I apresentou em média valores superiores aos valores encontrados para o ensaio II, esta diferença de valores médios poderá estar associada ao facto de os peixes do ensaio I se encontrarem mais stressados e debilitados que os peixes do ensaio II. Um maior stress poderá ter sido exercido nos peixes do ensaio I pelo facto de os tanques, ao contrário do ensaio II, não estarem isolados uns dos outros, e a quando da manutenção dos tanques um maior stress foi provocado nos peixes, podendo ter debilitado fisiologicamente

estes. Este stress pode ser o que provocou um aumento dos níveis de cortisol no grupo controlo comparativamente com o grupo controlo do ensaio I.

Os níveis de cortisol observados (figura 13) em ambos os ensaios mostraram haver um grupo em cada ensaio que apresentou níveis de cortisol significativamente diferente dos restantes grupos, para o ensaio I o grupo exposto apresentou valores significativamente diferentes do grupo controlo e para o ensaio II o grupo exposto a 3 mM foi o que apresentou níveis significativamente diferentes dos restantes grupos, apesar desta diferença entre quais os grupos estatisticamente diferentes dos grupos controlo, os valores encontrados entre o grupo exposto a 1 mM (ensaio I) e o grupo exposto a 3 mM (ensaio II) apresentam a mesma gama de valores. De notar que para o ensaio I o grupo exposto a 3 mM é apenas constituído por um único indivíduo e por isso não foi possível realizar uma análise estatística, contudo os valores de cortisol apresentados por este grupo/indivíduo são muito superiores aos restantes grupos do ensaio I.

Nos ensaios I e II não foram feitas análises de expressão genética de forma a relacionar níveis de expressão genéticas das enzimas envolvidas no ciclo da ureia e a sua actividade enzimática. No entanto, esta análise já foi feita para outros trabalhos em que os peixes foram também submetidos a diferentes concentrações de amónia ambiental (0, 1, 3.5 e 5 mM) para um período de 48 h. Nesse trabalho verificou-se que existe uma maior expressão da enzima GSase no fígado e no músculo (não foi feita esta análise para o tecido cerebral). Foi registada uma maior expressão do gene GSase no grupo controlo (0 mM), e que nos grupos expostos a amónia ambiental a expressão foi aumentando em função da concentração de amónia ambiental, tendo sido registada a menor expressão para o grupo exposto a 1 mM (Jordão, 2008).

Para a excreção do gene GSase no músculo foi observada uma maior excreção para o grupo exposto a 5 mM, sendo que assim como para a expressão no fígado, esta foi aumentando com o aumento da concentração de amónia ambiental.

No entanto não foram registadas diferenças significativas entre grupos de todos os tecidos.

4.5 Resposta do ciclo ornitina-ureia, nomeadamente GSase, a peixes sujeitos a diferentes tempos de injeção com cortisol (12 e 36h)

Os mecanismos de ureotelismo nos xarrococos (não o xarroco deste estudo) estão bem estudados (revisão por Walsh 1997 e Wood *et al.*, 2003), e existe uma forte evidência que os pulsos de ureia poderão estar sob controlo neural e/ou hormonal. A mudança de amoniotélismo para ureotelismo está associada a um aumento das concentrações de cortisol plasmático e os níveis de actividade enzimática da GSase (glutamina sintetase) (Hopkins *et al.*, 1995). A natureza pulsátil da excreção da ureia é, contudo, dependente da activação de um mecanismo de excreção na branquias porque a produção metabólica é contínua mais que pulsátil (Wood *et al.*, 1997). Após um pulso, uma diminuição do cortisol plasmático é observado (Wood *et al.*, 1997, 2001).

Nesta experiência pretendeu-se elevar os níveis de cortisol plasmático a níveis bastante elevados de forma a observar uma resposta na produção de ureia através do aumento da actividade da enzima GSase. O aumento do cortisol foi conseguido (figura 17), havendo diferenças entre os tempos pós injeção com cortisol e os valores iniciais de cortisol, mas não se observou diferenças entre os grupos já injectados.

A glucose sofreu também alterações significativas para ambos os grupos relativamente aos níveis iniciais encontrados no plasma (figura 19), este aumento deve-se sobretudo à elevada concentração de cortisol a que foram sujeitos os xarrococos.

No entanto, não houve diferenças significativas para a actividade da GSase nos diferentes tecidos analisados (fígado, musculo e cérebro), apenas se verificou que a actividade da GSase no tecido cerebral é bastante superior à dos restantes tecidos.

Ao nível das ATPases não foram observadas diferenças entre grupos injectados de 12h e 36h. De igual forma também não se registaram aumentos dos níveis plasmáticos de ureia e amónia nos grupos pós injeção com cortisol para os tempos 12 e 36h. Podendo afirmar-se que o aumento de cortisol por si só não provoca uma resposta por parte da enzima GSase, responsável pela transformação de amónia em glutamina e introdução desta última no ciclo da ureia nos peixes.

4.6 Comparação entre o ensaio I e II e o ensaio com injeção de cortisol

Comparando os diferentes ensaios entre si, verifica-se que existe uma diferença entre o ensaio I e os restantes ensaios, para a actividade da GSase no tecido cerebral, em que os valores observados para o ensaio I são bastante superiores que os valores registados para os ensaios II e o ensaio com injeção de cortisol. No entanto, não foi

possível determinar a causa deste padrão, contudo poderá ter sido algo que apenas estava presente nos peixes usados no ensaio I que não estaria nos peixes dos restante ensaios, pois ao analisar-se os níveis de cortisol verifica-se que para ambos os controlos dos ensaios os valores são semelhantes, ou seja, existia o mesmo nível de stress ambiental em todos os ensaios. Poderá ter sido a algum factor não analisado na água ou mesmo nos indivíduos. Tendo sido esta a maior diferença encontrada ao analisar-mos os diferentes ensaios entre si.

5. Conclusão

No presente estudo, pode-se concluir, em concordância com estudos anteriores, que a espécie *Hallobatrachus didactylus* apresenta tolerância a níveis elevados de amónia ambiental, sendo esta tolerância aparentemente menor que outros membros da família Batrachoididae.

Este estudo não foi conclusivo para determinar se a quantificação da actividade GSase serve para afirmar a existência de uma mudança de amoneotelismo para ureotelismo, contudo pode-se afirmar que a espécie *H. didactylus* apresenta uma actividade da enzima GSase semelhante a outros membros da mesma família (*O. beta*).

Da mesma forma não foi possível determinar um factor que leve ao desencadear de uma mudança de amoneotelismo para ureotelismo. Contudo a falta de resultados positivos, ou seja, que demonstrassem que existe um factor que exerce uma mudança na estratégia do xarroco que faça este mudar para ureotélico, pode estar relacionada com vários factores: o número baixo de indivíduos, a diferença de tamanhos entre indivíduos, condição (k) dos xarrocós utilizados.

Este estudo vai servir de base para trabalhos futuros, na medida em que já revela valores esperados para a actividade GSase na espécie *H. didactylus*. A determinação de outras enzimas envolvidas no ciclo da ornitina-ureia, como a CPAase III poderá dar mais informação sobre como o ciclo ornitina-ureia é activado no *H. didactylus* e também o processo evolutivo que levou, não só para a espécie *H. didactylus* mas também para as restantes espécies da família Batrachoididae, a possuírem este tipo de estratégia. A utilização de outros tipos de factores stressantes como elevada taxa populacional, poderá ser um factor que despontara uma mudança de amoneotelismo

para ureotelismo, como já foi observado em outros estudos. A determinação da expressão genética da enzima GSase e CPAase III também será relevante para a determinação do ureotelismo para a espécie *H. didactylus*, na medida em que se terá uma maior percepção do que acontece ao nível genético.

6. Referências Bibliográficas

- Anderson PM, Broderius, MA., Fong FC, Tsui KNT, Chew S. and Ip YK (2002) Glutamine synthetase expression *in* liver, muscle, stomach and intestine of *Bostrichthys sinensis* *in* response to exposure to a high exogenous ammonia concentration. *J. Exp. Biol.* 205, 2053-2065.
- Anderson PM (2001) Urea and Glutamine Synthesis: Environmental Influences on Nitrogen Excretion. In: *Nitrogen Excretion* (eds. Wright PA, Anderson PM), pp. 239- 270. Academic Press.
- Anderson PM (1995) Molecular aspects of carbamoyl phosphate synthesis. In: *Nitrogen Metabolism and Excretion* (eds. Walsh PJ, Wright PA). Boca Raton: CRC Press, 33-99.
- Anderson PM (1995) Urea cycle *in* fish: molecular and mitochondrial studies. In: *Fish Physiology* (eds. Hoar WS, Randall DJ, Farrel TJ), vol. 14, Ionoregulation: Cellular and Molecular Approaches (In: Wood CM, Shuttleworth TJ editors). New York: Academic, pp 57-83.
- Anderson PM. and Walsh PJ (1995) Subcellular localization and biochemical properties of the enzymes of carbamoyl phosphate and urea synthesis *in* the Batrachoidid fishes *Opsanus beta*, *Opsanus tau* and *Porichthys notatus*. *J. Exp. Biol.* 198, 755-766.
- Arias A (1976) Contribución al conocimiento de la fauna bentónica de la Bahía de Cádiz. *Inv. Pesq*, 40, 355-386.
- Arias A and Drake P (1990) Estados juveniles de la ictiofauna en los caños de las salinas de la Bahía de Cádiz. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía.
- Bosman DK, Deutz NEP, Maas MAW, van Eijik HMH, Smit JJH, de Haan JG, Chamuleau RAFM (1992) Amino acid release from cerebral cortex *in* experimental acute liver failure, studied by *in vivo* cerebral cortex microdialysis. *J. Neurochem.* 59, 591-599.

- Boylan JW, (1967) Gill permeability *in* *Squalus acanthias*. In: Gilbert, P.W., Mathewson, R.F., Rall, D.P. (Eds.), *Sharks, Skates and Rays*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp. 197–206.
- Bradford M.M., (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254
- Brusilow SW (2002) Reviews *in* molecular medicine – hyperammonemic encephalopathy. *Medicine*. 81, 240-249.
- Campbell JW, Anderson PM (1991) Evolution of mitochondrial enzyme systems *in* fish: the mitochondrial synthesis of glutamine and citrulline. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Phylogenetic and Evolutionary Perspectives* (eds. Hochachka PW, Mommsen TP). New York: Elsevier, vol. 1, 43-75.
- Chadwick TD and Wright PA (1999) Nitrogen excretion and expression of urea cycle enzymes *in* the atlantic cod (*Gadus morhua* L.): a comparison of early life states with adults. *J. Exp. Biol.* 202, 2653-2662.
- Chew SF, Chan NKY, Loong AM, Hiong KC, Tam WL, Ip YK (2004) Nitrogen metabolism *in* the African lungfish (*Protopterus dolloi*) aestivating *in* a mucus cocoon on land. *J Exp Biol.* 207, 777-786.
- Chew SF, Wong MY, Tam WL, Ip YK (2003b) The snakehead *Channa asiatica* accumulates alanine during aerial exposure, but is incapable of sustaining locomotory activities on land through partial amino acid catabolism. *J Exp Biol.* 206, 693-704.
- Coe MJ (1966) The biology of *Tilapia grahami* Boulenger *in* Lake Magadi, Kenya. *Acta Trop.* 23, 146–177.
- Compton SJ and Jones CG (1985) Mechanism of dye response and interference *in* the Bradford protein assay, *Anal Biochem* 151, 369–374
- Cooper JL and Plum F (1987) Biochemistry and physiology of brain ammonia. *Physiol. Rev.* 67, 440-519.
- Costa MJ, Lopes MT, Domingos IM, Almeida PR, Costa JL (1995) The effects of environmental changes on European salt marshes: Structure, functioning and Exchange potentialities with marine coastal waters. Final Report, Portuguese fauna working group- Tagus and Mira Sites: Environmental Research Program, European Commission.
- Cunha LPG (1994) Estrutura e dinâmica da ictiofauna do estuário do Sado. PHD thesis, Lisbon University, Portugal.

- Dabrowska H and Wlason T (1986) Sublethal effect of ammonia on certain biochemical and haematological indicators *in* common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 83C, 179-184.
- Compton SJ and Jones CG, Mechanism of dye response and interference *in* the Bradford protein assay, *Anal Biochem* 151, 369–374 (1985)
- Felipo V, Butterworth RF (2002) Neurobiology of ammonia. *Progr Neurobiol.* 67, 259-279.
- Fernández JLP, Arias AM, Sarasquete C (2001) Aspects of the reproductive biology of the toadfish *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801). *SCI. MAR.* 65, 131-138.
- Fernández JLP, Drake P, Arias AM, González DG (2000) Peces del Parque Nacional de Doñana y su entorno. Ser. Téc. Minist. Medio Ambiente, Madrid.
- Fernández JLP, Potts JC, Manooch CS, Sarasquete C (2010) *Halobatrachus didactylus* (Schneider, 1801) (Pisces: Batrachoididae), *in* the Bay of Cádiz (southwestern Spain). *Scientia Marina.* 74, 121-130.
- Fines GA, Ballantyne JS, Wright PA (2001) Active urea transport and an unusual basolateral membrane composition *in* the gills of a marine elasmobranch. *Am. J. Physiol.* 280,R16–R24.
- Goldstein L and Forster RP (1965) The role of uricolysis *in* the production of urea by fishes and other aquatic vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 14, 567-576.
- Graham JB (1997) Air-breathing Fishes: evolution, diversity and adaptation. Academic, San Diego, p. 299.
- Hazon N, Wells A, Pillans RD, Good JP, Anderson WG, Franklin CE (2003) Urea based osmoregulation and endocrine control *in* elasmobranch fish with special reference to euryhalinity. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*, 136, 685-700.
- Hermenegildo C, Marcaida G, Montoliu C, Grisolia S, Minana M, Felipo V (1996) NMDA receptor antagonists prevent acute ammonia toxicity *in* mice. *Neurochem Res.* 21, 1237-1244.
- Hermegildo C, Monfor P, Felipo V (2000) Activation of N-methyl-D-aspartate receptors *in* rat brain *in vivo* following acute ammonia intoxication: characterization by *in vivo* brain microdialysis. *Hepato.* 31, 709-715.
- Ip YK, Chew SF, Randall DJ (2001) Ammonia Toxicity, Tolerance, and Excretion. In: Nitrogen Excretion (eds. Wright PA, Anderson PM). Academic Press. pp. 109-140.
- Ip YK, Chew SF, Randall DJ (2001b) Ammonia Toxicity, Tolerance, and Excretion. In: Fish Physiology (eds. Wright PA, Anderson PM). Academic Press. New York vol. 20, pp. 109-148.

- Ip YK, Chew SF, Leung, IAW, Jin Y, Lim CB, Wu RSS (2001a) The sleeper *Bostrichthys sinensis* (Family Eleotridae) stores glutamine and reduces ammonia production during aerial exposure. *J. Comp. Physiol. B* 171, 357-367.
- Janssens PA (1964) The metabolism of the aestivating African lungfish. *Comp Biochem Physiol.* 11, 105-117.
- Janssens PA, Cohen PP (1968a) Biosynthesis of urea *in* the estivating African lungfish and *in* *Xenopus laevis* under conditions of water shortage. *Comp Biochem Physiol.* 24, 887-898.
- Jordão V (2008) Tolerância à ammonia e grau de ureotelia no Xarroco, *Halobatrachus didactylus*. Tese mestrado
- Kajimura M, Walsh PJ, Mommsen TP, Wood GF (2006) The dogfish shark (*Squalus acanthias*) increase both hepatic and extrahepatic ornithine urea cycle enzyme activities for nitrogen conservation after feeding. *Physiol. Biochem. Zool.* 17, 602-613.
- Levi G, Morisi G, Coletti A, Catanzaro R (1974) Free amino acids *in* fish brain: normal levels and changes upon exposure to high ammonia concentration *in vivo* and upon incubation of brain slices. *Comp. Biochem. Physiol.* 49A, 623-636.
- Lim CB, Chew SF, Anderson PM, Ip YK (2001) Reduction *in* the rates of protein and amino acid catabolism to slow down the accumulation of endogenous ammonia: strategy potentially adopted by mudskippers (*periophthalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarei*) during aerial exposure *in* constant darkness.
- Loong AM, Pang CYM, Hiong KC, Wong WP, Chew SF, Ip YK (2007) Increased urea synthesis and/or suppressed ammonia production *in* the African lungfish, *Protopterus annecten*, during aestivation *in* air or mud. *J Comp Physiol. B*, 178, 351-363.
- Loong AM, Hiong KC, Lee SML, Wong WP, Chew SF, Ip YK (2005) Ornithine-urea cycle and urea synthesis *in* African lungfishes, *Protopterus aethiopicus* and *Protopterus annectens*, exposed to terrestrial conditions for 6 days. *J Exp Zool. A*, 303, 354-365.
- Marcaida G, Felipe V, Hermenegildo C, Minana MD, Grisolia S (1992) Acute ammonia toxicity is mediated by NMDA type of glutamate receptors. *FEBS Lett.* 296, 67-68.
- McCormick SD (1993). Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺/K⁺-ATPase activity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50, 656-658.
- McDonald MD, Wood CM, Grosell M, Walsh PJ (2004) Glucocorticoid receptors are involved *in* the regulation of pulsatile urea excretion *in* toadfish. *J Comp. Physiol. B*, 174, 649-658.

- Modesto T, Canario AVM (2002) Morphometric changes and sex steroid levels during the annual reproductive cycle of the Lusitanian toadfish, *Halobatrachus didactylus*. General and comparative endocrinology. 131, 220-231.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol *in* teleosts: dynamics of action, and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fisheries. 9, 211-268.
- Mommsen TP, Walsh PJ (1991) Metabolic and Enzymatic Heterogeneity *in* the Liver of the Ureogenic Teleost *Opsanus beta*. Journal of Experimental Biology 156, 407-418.
- Mommsen TP, Walsh PJ (1989) Evolution of urea synthesis *in* vertebrates: the piscine connection. Science, 243, 72-5
- Mommsen TP and Walsh PJ (1992) Biochemical and environment perspectives on nitrogen metabolism *in* fishes. Experientia. 48, 583-593.
- Morales G and Polez VPL (2003) Ureotelism is inducible *in* the neotropical freshwater *Hoplias malabaricus* (Teleostei, erythrinidae). Braz. J. Biol. 64, 265-271.
- Part P, Wright PA, Wood CM (1998) Urea and water permeability *in* dogfish (*Squalus acanthias*) gills. Comp. Biochem. Physiol. A 119, 117-123
- Peg KW, Chew SF, Lim CB, Kuah SSL, Kok WK, Ip YK (1998) The mudskippers *perioththalmodon schlosseri* and *Boleophthalmus boddarti* can tolerate environmental NH₃ concentrations of 446 and 36 μ M, respectively. Fish Physiol. Biochem. 18, 59-69.
- Piermarini PM, Evans DH (1998) Osmoregulation of the Atlantic stingray (*Dasyatis sabina*) from the freshwater lake Jesup of the St. Johns River, Florida. Physiol. Zool. 71, 553-560.
- Randall DJ, Tsui TKN (2002) Ammonia toxicity *in* fish. Marine Pollution Bulletin 45, 17-23.
- Randall DJ, Wilson JM, Peng KW, Kok TWK, Kuah SSL, Chew SF, Lam TJ, Ip YK (1999) The mudskipper, *perioththalmodon schlosseri*, actively transports NH₄⁺ against a concentration gradient. Am. J. Physiol. 46, 1562-1567.
- Randall DJ, Wood CM, Perry SF, Bergman H, Maloij GM, Mommsen TP, Wright PA (1989) Urea excretion as a strategy for survival *in* a fish living *in* a very alkaline environment. Nature 337, 165-166.
- Reisner AH *et al.*, (1975) The use of Coomassie Brilliant Blue G-250 perchloric acid solution for staining *in* electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels, Anal Biochem 64, 509-516
- Rao VLR, Murthy CRK, Butterworth RF (1992) Glutamatergic synaptic dysfunction *in* hyperammonemic syndromes. Metab. Brains Dis. 7, 1-20.

- Rose C (2002) Increased extracellular brain glutamine *in* acute liver failure: decreased uptake or increased release? *Metabolic Brain Disease*. 17, 251-261.
- Roux C (1986) Batrachoididae. In: P.J.P. Whitehead, M.L. Bauchot, J.C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.), *Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediterranean*. UNESCO, 1360-1361.
- Schmidt W, Wolf G, Grungriff K, Linke K (1993) Adenosine influences the high-affinity-uptake of transmitter glutamate and aspartate under conditions of hepatic encephalopathy. *Metab. Brain Dis.* 7, 1-20.
- Seegers L and Tichy H (1999) The *Oreochromis alcalicus* flock (Teleostei: Cichlidae) from lakes Natron and Magadi, Tanzania and Kenya, with descriptions of two new species. *Ichthyol. Expl. Freshwaters*. 10, 97–146.
- Sedmak JJ and Grossberg SE, (1977) A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250, *Anal Biochem* 79, 544–552
- Smith HW (1930) Metabolism of the lungfish *Protopterus aethiopicus*. *J Biol Chem*. 88, 97-130.
- Smith HW (1935) The metabolism of the lungfish II. Effect of feeding meat on metabolic rate. *J Cell Comp Physiol*. 6, 335-349.
- Smith, HW (1931b) The absorption and excretion of water and salts by the elasmobranch fishes. II Marine elasmobranchs. *Am. J. Physiol*. 98, 296–310.
- Steele SL, Yancey PH, Wright PA (2005) The little skate *Raja erinacea* exhibits an extrahepatic ornithine urea cycle *in* the muscle and modulates nitrogen metabolism during low-salinity challenge. *Physiol Biochem Zool*. 78, 216-226.
- Thorson TB, Cowan CM, Watson DE (1973) Body fluid solutes of juveniles and adults of the euryhaline bull shark *Carcharinus leucas* from freshwater and saline environments. *Physiol. Zool*. 46, 29–42.
- Walsh PJ, Handel-Fernandez ME, Vincek V (1999) Characterization and sequencing of glutamine synthetase cDNA from liver of the ureotelic gulf toadfish (*Opsanus beta*). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 124, 251-259.
- Walsh PJ, Bergman HL, Narahara A, Wood CM, Wright PA, Randall DJ, Maina JN and Laurent P (1993) Effects of ammonia on survival, swimming and activities of enzymes of nitrogen metabolism *in* the Lake Magadi tilapia *Oreochromis alcalicus grahami*. *J. Exp. Biol*. 180, 323–327.

- Walsh PJ, Danulat EM, Mommsen TE (1990) Variation *in* urea excretion *in* the gulf toadfish, *Opsanus beta*. *Mar Biol.* 106, 323-328.
- Walsh PJ, Heitz M, Campbell CE, Cooper GJ, Medina M, Wang YS, Goss GG, Vincek V, Wood CM and Smith CP (2000) Molecular identification of a urea transporter *in* gill of the ureotelic gulf toadfish (*Opsanus beta*). *J. Exp. Biol.* 203, 2357–2364.
- Walsh PJ, Milligan CL (1995) Effects of feeding and confinement on nitrogen metabolism and excretion *in* the gulf toadfish *Opsanus beta*. *J Exp Biol.* 198, 1559-1566.
- Walsh PJ, Tucker BC, Hpkins TE (1994) Effects of confinement/crowding on ureogenesis *in* the gulf toadfish *Opsanus beta*. *J Exp Biol.* 191, 195-206.
- Wilson JM, Iwama K, Iwama GK, Randall DJ (1998) Inhibition of ammonia excretion and production *in* rainbow trout during severe alkaline exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 121, 99-109.
- Wilson RW and Taylor EW (1992) Transbranchial ammonia gradients and acidbase responses to high external ammonia *in* rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) acclimated to different salinities. *J. Exp. Biol.* 166, 95-112.
- Wilson RW, Randall DJ, Donowitz M, Bogl AW, Ip YK (2000) Immunolocalization of ion transport proteins to the mudskipper (*Periophthalmodon schlosseri*) branchial epithelium mitochondria-rich cells. *J. Exp. Biol.* 203, 2297-2310.
- Withers PC (1998) Urea: Diverse functions of a 'waste' product. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 25, 722-727.
- Wood CM (1993) Ammonia and urea metabolism and excretion. In: Evan DH, editor. *The physiology of fishes*. Boca Raton: CRC Press. 379-425.
- Wood CM, Hopkins TE, Walsh PJ (1997) Pulsatile urea excretion *in* the toadfish (*Opsanus beta*) is due to a pulsatile excretion mechanism, not a pulsatile production mechanism. *J Exp Biol.* 200, 1039-1046.
- Wood CM, McDonald MD, Sundin L, Laurent P, Walsh PJ (2003) Pulsatile urea excretion *in* the gulf toadfish: mechanisms and controls. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 136, 667-684.
- Wright PA (1993). Nitrogen excretion and enzyme pathways for ureagenesis *in* freshwater tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Physiol. Zool.* 66, 881-901.
- Wright PA, Fyhn HJ (2001) Ontogeny of nitrogen metabolism and excretion. In: *Nitrogen and Excretion* (eds. Wright PA, Anderson P). Academic Press, San Diego, pp 149-200.
- Wright PA, Land MD (1998) Urea production and transport *in* teleost fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A* 119, 47-54.

- Wright PA, Pärt P, Wood CM (1995) Ammonia and urea excretion *in* the tidepoll sculpin (*Oligocottus maculosus*): sites of excretion, effects of reduced salinity, and mechanisms of urea transport. *Fish Physiol Biochem.* 14, 111-123.
- Wright PA (1995) Nitrogen excretion: three end-products, many physiological roles. *J. Exp. Biol.* 198, 273-281.