

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE ÁGUA
DOCE E PESCA INTERIOR

**Desempenho natatório de tambaqui e matrinhã:
aspectos ambientais e farmacológicos envolvendo o
óxido nítrico**

MARCIO SOARES FERREIRA

Manaus, Amazonas

08/2015

Desempenho natatório de tambaqui e matrinhã: aspectos ambientais e farmacológicos envolvendo o óxido nítrico

MARCIO SOARES FERREIRA

Orientador: Adalberto Luis Val, Dr.

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Curso de Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

Suporte financeiro: INCT ADAPTA (FAPEAM/CNPq)

Manaus, Amazonas

08/2015

FICHA CATALOGRÁFICA

F383 Ferreira, Marcio Soares

Desempenho natatório de tambaqui e matrinhã: aspectos ambientais e farmacológicos envolvendo o óxido nítrico / Marcio Soares Ferreira. --- Manaus: [s.n.], 2015.

xiv, 96 p. : il.

Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2015.

Orientador: Adalberto Luis Val.

Área de concentração: Biologia de Água Doce e Pesca Interior.

1. Tambaqui. 2. Matrinhã. 3. Óxido nítrico. I. Título.

CDD 597.0929

SINOPSE

O aminoácido arginina é precursor do óxido nítrico, uma molécula sinalizadora com diversas funções no organismo, entre elas, a vasodilatação quando há aumento do atrito do sangue sobre o epitélio. A suplementação da dieta com arginina, por meio do aumento da produção de óxido nítrico, tem mostrado efeitos benéficos sobre o metabolismo de muitos animais, favorecendo a queima de gorduras, a vasodilatação e o aumento da resistência ao estresse. Este estudo investigou de que forma o exercício e a hipóxia atuam sobre a produção de óxido nítrico nos músculos do tambaqui e matrinhã, e sua relação com o desempenho natatório. Investigou também se a suplementação da ração com arginina ou seu antagonista, o L-NAME, interferem na produção de óxido nítrico nos músculos, no desempenho natatório e nas respostas ao estresse.

Agradecimentos

A Deus, em quem confio, criador do universo e da vida.

Ao meu orientador, Dr. Adalberto, por seus valiosos ensinamentos sobre fisiologia de peixes e por suas orientações sobre a tese, sempre mostrando o melhor caminho nos momentos mais difíceis.

A minha amada esposa, Ana Rafaela, que sempre acredita na minha capacidade de ir cada vez mais longe, estando ao meu lado em qualquer circunstância.

Aos meus pais, pelo carinho e educação que me ofereceram, e por me ajudarem a me preparar para a carreira de biólogo.

À Dra. Vera Val, pelo amor sincero por todos os alunos que passam pelo seu laboratório, e que com sua postura educadora sempre acredita no progresso das pessoas.

A Nazaré Paula, sempre disposta a ajudar, em assuntos acadêmicos ou pessoais, tornando a nossa vida muito mais fácil no laboratório e na cidade de Manaus.

Aos amigos do LEEM, especialmente Rafael, Helen, Alzira, Paulo Aride, Tiago Gabriel, Ramon, Daniel, Daiani e muitos outros.

À Sra. Raimunda e à Claudinha, que com muita paciência nos ajudam em todas as questões burocráticas do dia-a-dia.

A FAPEAM, ao CNPq, que fomentaram minha bolsa e minha pesquisa, e ao INPA, que viabilizou todo o processo e cedeu sua estrutura.

“Todo o trabalho é vazio a não ser que haja amor”.

Khalil Gibran

Desempenho natatório de tambaqui e matrinhã: aspectos ambientais e farmacológicos envolvendo o óxido nítrico

O óxido nítrico é produzido a partir da L-arginina pela enzima Sintase do óxido nítrico, sendo uma molécula sinalizadora com papel importante na homeostase cardiovascular, neurotransmissão, defesas imunológicas, vasodilatação e desempenho muscular, entre outras. A arginina, por ser a precursora do óxido nítrico, tem sido relatada como um suplemento para reduzir o estresse e aumentar o desempenho, na medida que aumentaria a perfusão sanguínea durante o exercício. Este trabalho teve como objetivo verificar se o óxido nítrico muscular atua para retardar a fadiga de peixes exercitados. Tem também como objetivo verificar se a suplementação da ração dos peixes com a arginina ou L-NAME (seu antagonista) pode interferir no desempenho natatório ou na sua resistência ao estresse do exercício. Ambas as espécies foram submetidas aos seguintes experimentos: (a) exercício incremental até a fadiga (Ucrit); (b) exercício prolongado e moderado (30 cm/s por 12 horas); (c) hipóxia com acesso à superfície da água; (d) hipóxia sem acesso à superfície da água; e (e) suplementação da ração com 1 g/Kg de ração de arginina, L-NAME ou equivalente em nitrogênio de alanina, e subsequente exposição dos animais ao exercício. Os resultados indicam que em tambaqui o óxido nítrico só se eleva na fadiga, e em matrinhã sua atuação ocorre nas fases iniciais do exercício, ajudando a retardar a fadiga por postergar a utilização intensa dos músculos brancos e o consequente acúmulo de lactato. Indicam também que a suplementação da ração com pequenas quantidades de arginina não melhora o desempenho natatório em nenhuma espécie, mas pode ajudar na recuperação do matrinhã por permitir uma melhor perfusão sanguínea, e na do tambaqui, por meio do aumento das respostas do cortisol ao exercício.

Swimming performance of tambaqui and matrinchã: environmental and pharmacologic effects involving the nitric oxide

Nitric oxide is produced from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase and is a signaling molecule with important role in cardiovascular homeostasis, neurotransmission, immune defenses, vasodilation and muscle performance, among others. Besides being the precursor of the synthesis of nitric oxide, arginine has been reported as a supplement to reduce stress and increase performance, since it increases the production of nitric oxide, increasing blood perfusion during exercise. This study aimed to verify if the muscle nitric oxide acts to delay fatigue of exercised fish. It also aims to identify whether supplementation of fish feed with arginine or L-NAME (its antagonist) can interfere with swimming performance or its resistance to stress of exercise. Both species were subjected to the following experiments: (a) incremental exercise until fatigue (ucrit); (B) prolonged and moderate exercise (30 cm/s for 12 hours); (C) hypoxia with access to the water surface; (D) hypoxia without access to the water surface; and (e) feed supplementation with arginine, L-NAME (1 g/Kg of feed) or equivalent amount of alanine to balance nitrogen, and exposure of animals to subsequent exercise. The results indicate that nitric oxide in tambaqui only rises at fatigue, and in matrinchã nitric oxide takes place in the early stages of the swimming, helping to delay fatigue by delaying energy dependence of white muscle and the consequent accumulation of lactate. Results also indicates that feed supplementation with small amounts of arginine can not increase swimming performance in both species, but it can help in the recovery of matrinchã by allowing a better blood perfusion, and of the tambaqui, by raising the response of the cortisol to exercise.

ABREVIATURAS E UNIDADES DE MEDIDA

g	grama
cm	centímetros
L	litro
°C	graus Celsius
mgO ₂ /L	miligrama de oxigênio por litro
%	porcentagem
<i>g</i>	força de gravidade
h	hora
rpm	rotações por minuto
min	minuto
mg/L	miligrama por litro
mg/dL	miligrama por decilitro
mM	milimolar
mmoles/L	milimoles por litro
μmoles/L	micromoles por litro
μmoles.min ⁻¹ .g ⁻¹	micromoles por minuto por grama de tecido
abs	Absorbância
nm	nanômetros
mmHg	milímetros de mercúrio
ml O ₂ /g.h	mililitros de oxigênio por grama por hora
VO _{2 Max}	consumo de oxigênio máximo
SEM	erro padrão da média
LDH	lactato desidrogenase
CS	citrato sintase
HOAD	3-hidroxiacil CoA desidrogenase

AACoA	aceto acetil coenzima A
Acetil CoA	acetil coenzima A
ATP	adenosina trifosfato
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
Triton X-10	octilfenoxipolietoxietanol
Hepes	ácido etanosulfúrico hidroxietilpiperazina
DTT	dithiothreitol
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
MgSO ₄	sulfato de magnésio
DTNB	ácido dithio-bis (2-nitrobenzóico)
TRIS	tris hidroximetil aminometano
RSA	respiração na superfície aquática
Ucrit	velocidade crítica de natação
cm/s	centímetros por segundo
cc/s	comprimento de corpo por segundo
kPa	Kilopascal

Índice de Figuras

Capítulo I

Figura 1 - Nitritos e nitratos (NOx) no músculo de exemplares de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos à natação forçada até a fadiga, por meio do protocolo de Ucrit (Brett, 1964), e de animais mantidos em repouso dentro do túnel de natação. 26

Figura 2 - Lactato no músculo branco de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos por 30 minutos a cada intervalo de 1 comprimento de corpo por segundo, até a velocidade submáxima para a fadiga da espécie, baseado em teste preliminar de Ucrit (Velocidade Crítica de Natação)..... 30

Figura 3 - Consumo de oxigênio de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos por 30 minutos a cada intervalo de 1 comprimento de corpo por segundo, até a velocidade submáxima para a fadiga da espécie, baseado em teste preliminar de Ucrit (Velocidade crítica de natação)..... 31

Figura 4 - Nitritos e nitratos (NOx) no músculo vermelho de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos por 30 minutos a cada intervalo de 1 comprimento de corpo por segundo, até a velocidade submáxima para a fadiga da espécie, baseado em teste preliminar de Ucrit (Velocidade crítica de natação)..... 32

Figura 5 - Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH) de exemplares de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos ao exercício moderado (30cm/s por 12 horas) e de animais mantidos em repouso dentro do túnel de natação. 33

Capítulo II

Figura 6 - Nitritos e nitratos (NOx) no músculo vermelho de tambaqui alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação), e submetido, no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo

teste de Ucrit, ou exercitado moderadamente a 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas, ou mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). 73

Figura 7 - Nitritos e nitratos (NOx) no músculo vermelho de matrinhã alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação) e, submetido no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste de Ucrit, ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas, ou mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade).. 74

Figura 8 - Cortisol plasmático de tambaqui alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação), e submetido no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste de Ucrit, ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas, ou mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). 78

Figura 9 - Cortisol plasmático de matrinhã alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação), e submetido no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste de Ucrit, ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas, ou mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). 79

Índice de tabelas

Capítulo I

Tabela I. Atividade das enzimas hidroxiaçil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), Lactato Desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de tambaqui. (C) controle, (F) fadigados pelo teste de Ucrit..... 27

Tabela II. Atividade das enzimas hidroxiaçil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de matrinchã. (C) controle ou (F) fadigados pelo teste de Ucrit..... 28

Tabela III. Atividade das enzimas hidroxiaçil Co-A desidrogenase (HOAD) e citrato sintase (CS), Lactato (LAC) e nitritos e nitratos (NOx) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de tambaqui. (C) controle. (E) exercitados moderadamente (30 cm/s) por 12 horas. 35

Tabela IV. Concentração de nitritos e nitratos (NOx) e atividade das enzimas hidroxiaçil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH) e lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de matrinchã exercitado moderadamente e de forma prolongada (30 cm/s) por 12 horas (E) ou controles (C). 36

Tabela V. Concentração de nitritos e nitratos (NOx) e atividade das enzimas hidroxiaçil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), Lactato Desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de tambaqui. (T) grupos tratados ou (C) controles referindo-se à 6, 12 ou 24 horas de exposição à hipóxia ($\pm 0,5$ mg/L) com acesso à superfície da água (HCAS) e 1 hora de hipóxia sem acesso à superfície da água (HSAS). 38

Tabela VI. Concentração de nitritos e nitratos (NOx) e atividade das enzimas hidroxiaçil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), Lactato

Desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de matrinchã, referentes a grupos submetidos à hipóxia de $\pm 0,5$ mg/L por 1 hora sem acesso à superfície da água (HSAS) ou controles (C). 39

Capítulo II

Tabela VII. Velocidade crítica de natação (Ucrit) de tambaqui e matrinchã alimentados por 10 dias com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME. 72

Tabela VIII. Níveis plasmáticos de glicose, lactato, NOx e triglicérides de tambaqui alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação) e submetido, no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste incremental de Ucrit (FAD), ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas (EM), ou não exercitado (NE) e mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). 76

Tabela IX. Níveis plasmáticos de glicose, lactato, NOx e triglicérides de matrinchã alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação), e submetido no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste incremental de Ucrit (FAD), ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas (EM), ou não exercitados (NE) e mantidos em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). 77

Desempenho natatório de tambaqui e matrinhã: aspectos ambientais e farmacológicos envolvendo o óxido nítrico

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Caracterização da bacia amazônica.....	1
1.2. A ictiofauna amazônica.....	2
1.3. Desempenho natatório em peixes	5
2. Objetivos.....	9
2.1. Objetivo Geral	9
2.2. Objetivos específicos	9
3. Referências Bibliográficas	9
Capítulo I - Efeito do exercício e da hipóxia sobre o óxido nítrico muscular de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) e matrinhã (<i>Brycon amazonicus</i>).....	14
1. Introdução	17
2. Material e métodos	19
2.1. Animais experimentais e parâmetros da água.....	19
2.2. Efeito da fadiga	19
2.3. Efeito da hipóxia com acesso à superfície da água.....	20
2.4. Efeito da hipóxia sem acesso à superfície da água.....	20
2.5. Efeito do exercício prolongado.....	21
2.6. Efeito do incremento de velocidade.....	21
2.7. Análises estatísticas.....	22
2.8. Análises musculares	22
3. Resultados	24
4. Discussão.....	40
4.1. NOx.....	40
4.2. A hydroxyacyl CoA desidrogenase (HOAD).....	44
4.3. Citrato Sintase.....	45
4.4. LDH e lactato.....	47
5. Conclusões	52
6. Bibliografia.....	53

Capítulo II - Efeito da suplementação alimentar com L-arginina ou L-NAME sobre o óxido nítrico e desempenho natatório de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>) e matrinhã (<i>Brycon amazonicus</i>).....	63
1. Introdução	66
2. Material e métodos	67
2.1. Animais e desenho experimental	67
2.2. Análises Musculares	69
2.3. Análises do plasma	70
2.4. Análises estatísticas.....	71
3. Resultados	71
4. Discussão.....	80
4.1. Cortisol e glicose.....	80
4.2. Lactato.....	82
4.3. NOx plasmático e muscular	83
4.4. Triglicerídeos plasmáticos.....	85
4.5. Ucrit.....	86
5. Conclusões	87
6. Bibliografia.....	88
Considerações finais e perspectivas.....	94

1. Introdução

1.1. Caracterização da bacia amazônica

A Amazônia ocupa 7,5 milhões de km², sendo que 65% está no Brasil, onde faz fronteira com Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Peru e Bolívia (revisito por Val e Almeida-Val 1995). Segundo Sioli (1986) é o maior sistema tropical do mundo, sendo composto por inúmeros rios, lagos, paranás, igarapés, praias e igapós. Seu imenso sistema aquático despeja cerca de 175000 m³ de água no Atlântico a cada segundo, o que resulta em cerca de 20% do total de água doce recebido por todos os oceanos (Sioli 1986).

Vários tipos de água podem ocorrer nos diferentes ambientes amazônicos, mas em geral são classificados como pretas, brancas ou claras. As águas brancas são provenientes dos Andes, ricas em sedimentos; como exemplo temos o rio Solimões. A coloração das águas pretas são consequência de ácidos húmicos e fúlvicos, além de outras substâncias; como principal exemplo temos o rio Negro. As águas claras são oriundas de solos pobres, com alto teor mineral e menos matéria orgânica que os rios de água preta; como exemplos temos os rios Xingú e Tapajós (Sioli 1984).

A temperatura da água nos rios da bacia amazônica é considerada constante, variando de 29±1 °C no rio Solimões à 30±1 °C no rio Negro, embora grandes flutuações diárias possam ser observadas (Sioli 1986, 1991).

As variações nos níveis da água são importantes na bacia amazônica, podendo alcançar 17 metros em alguns pontos e são uma consequência direta das chuvas, não geograficamente regulares na Amazônia. As oscilações nos níveis da água afetam todas as formas de vida e suas interações, e Junk e colaboradores (1989) propuseram que os pulsos de inundação são as principais forças que dirigem a biota nestes sistemas.

Processos químicos, físicos e biológicos atuam para determinar a quantidade de oxigênio dissolvido na água dos rios amazônicos. Nestes sistemas as variações de oxigênio dissolvido ocorrem em tempo muito curto, podendo variar de quase zero, na várzea durante a noite, até a saturação no dia seguinte ao meio-dia (Junk e Howard-Williams 1984). Essa variação rápida tem

implicações importantes, principalmente no padrão respiratório dos animais aquáticos (Val *et al.* 1986). Durante os períodos de cheia, quando nutrientes são varridos da terra e represados, ocorre grande crescimento de plantas aquáticas. Como resultado da respiração abundante da vegetação, os níveis de oxigênio caem consideravelmente (Kramer 1978; Junk 1984). Outro fenômeno importante é a estratificação, gerada ao longo do dia, e que se desfaz no final da tarde ou devido aos ventos, causando queda na saturação do oxigênio da água para cerca de 10% (Junk 1984). Frequentemente, quantidades significativas de gás sulfídrico são suspendidas das profundezas atingindo a superfície, principalmente em áreas onde a estratificação permanece por longos períodos (Rai e Hill 1984).

1.2. A ictiofauna amazônica

A fauna de peixes da Amazônia é maior que a de qualquer outro local do planeta. As estimativas variam de 1300 a 2500 espécies, mas à medida que avançam as pesquisas, indícios apontam para números ainda maiores (revisto por Val e Almeida-Val 1995). A ictiofauna amazônica tem representantes de quase todos os peixes de água doce, que colonizam praticamente todos os tipos de habitats da bacia, mesmo os lagos com escassez de oxigênio e as águas pretas, com pH tão ácido como 3,8 e com concentração de íons similar à da água destilada (Lowe-McConnell 1987).

O grupo dos peixes teleósteos é o mais diversificado e abundante quando comparado à qualquer outro grupo de vertebrados, com cerca de 2600 espécies (Nelson 1984). Embora existam muitos peixes com respiração aérea obrigatória ou facultativa na Amazônia, a grande maioria é de respiração aquática (Val e Almeida-Val 1995). Muitas espécies são capazes de detectar redução nas concentrações de oxigênio dissolvido, e até mesmo de antecipá-las, migrando para outras regiões (Wotton 1990). Enquanto algumas espécies fogem dos locais com pouco oxigênio dissolvido, outras, como por exemplo o tambaqui, podem preferir ficar e enfrentar tais condições (Val e Almeida-Val 1995; Val *et al.* 1998). Esta e outras espécies, em condições de baixo oxigênio, apresentam o comportamento de se dirigirem à superfície da água, onde há mais oxigênio.

Dentre as espécies que apresentam este comportamento algumas também apresentam uma adaptação morfológica, que é a expansão do lábio inferior, facilitando ainda mais o direcionamento da água oxigenada para as brânquias. *Colossoma macropomum*, *Brycon amazonicus*, *Mylossoma duriventris*, *Mylossoma aureum*, entre outras, possuem essa adaptação morfológica (Braum e Junk 1982; Val e Almeida-Val 1995; Val *et al.* 1998). No tambaqui (*Colossoma macropomum*), por exemplo, os lábios aparecem após 2 horas de hipóxia e, juntamente com o desenvolvimento dos lábios, vários ajustes bioquímicos e fisiológicos também ocorrem afim de diminuir os efeitos negativos gerados pela falta de oxigênio. Essas modificações incluem diminuição dos níveis de ATP e GTP intraeritrocitário, aumento da taxa metabólica anaeróbica e aumento do hematócrito (Val *et al.* 1986; Val e Almeida-Val 1995; Muusze *et al.* 1998; Val *et al.* 1998; Val 2000).

Existem basicamente três tipos de processos migratórios praticados pelos peixes amazônicos: migrações devido à flutuação nos níveis das águas, migrações reprodutivas e migrações alimentares. As migrações devido às flutuações do nível da água são geralmente mais curtas, atingindo no máximo alguns quilômetros (Junk 1984). As migrações de alimentação e reprodutivas podem ser subdivididas em laterais e longitudinais. As laterais se referem àquelas com destino às margens alagadas dos rios e, então, de volta às calhas principais. As longitudinais se referem àquelas com destino às cabeceiras dos rios. Vários fatores podem definir os movimentos migratórios dos peixes, como por exemplo, os pulsos de inundação, os níveis de oxigênio, os ciclos lunares, as chuvas, etc (Goulding 1980; Junk 1984).

Entre os peixes que realizam migrações longitudinais, os de maior interesse econômico são os caraciformes. São conhecidos por migrarem até 400 Km para desovarem e o objetivo seria deixar áreas pobres em nutrientes em direção a áreas mais ricas, geralmente rio acima. A desova da maioria destas espécies coincide com o período de cheia dos rios, quando aumenta a oferta de áreas alagadas, oferecendo mais refúgio e alimento. Ela ocorre, geralmente, nas calhas dos rios principais, mas as larvas são rapidamente levadas pelas correntezas e adentram as florestas alagadas onde se refugiam e iniciam seu desenvolvimento (de Lima e Araujo-Lima 2004). Os caraciformes também

realizam migrações laterais, à procura de alimentos como invertebrados, macrófitas aquáticas, esponjas, briozoários, peixes, frutas, sementes, fitoplâncton, detritos e algas. Os igapós representam uma importante fonte de alimento, especialmente durante os períodos alagados, onde eles buscam frutas e sementes, mesmo que os baixos níveis de oxigênio dificultem sua respiração (Val e Almeida-Val 1995).

A dieta dos peixes pode variar de acordo com a disponibilidade nos períodos de cheia e seca. Um estudo com *Colossoma macropomum*, habitando o rio Madeira, apresentou 94% do seu conteúdo estomacal como frutos e sementes de 13 espécies diferentes e os demais 6% de alimentos de origem animal. Durante os períodos de seca a situação era inversa, sendo 90% do conteúdo estomacal de origem animal e 10% de frutos e sementes (Goulding 1980).

Dentre as espécies de maior importância comercial para a pesca e piscicultura na Amazônia, estão o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e o matrinhã (*Brycon amazonicus*) (Oliveira 2012). O matrinhã possui importância destacada no estado do Amazonas, tanto na pesca quanto na piscicultura, podendo atingir até 40 cm. É onívoro, consumindo basicamente frutos, sementes, insetos e outros invertebrados; os jovens e pré-adultos podem optar por pequenos peixes e artrópodes, enquanto os mais velhos preferem frutos e sementes. Fazem migrações tróficas e reprodutivas, inclusive a “arribação”, ou seja, dispersam rio acima durante a seca dos rios (Santos et al. 2006). O tambaqui, também importante na economia regional, tanto na pesca quanto na piscicultura, alcança cerca de 110 cm de comprimento total e é uma espécie que realiza migrações reprodutivas, tróficas e de dispersão. Durante a época de cheia entra na mata inundada, onde se alimenta de frutos ou sementes. Durante a seca, os indivíduos jovens ficam nos lagos de várzea onde se alimentam de zooplâncton e os adultos migram para os rios de águas barrentas para desovar. Na época de desova não se alimentam, vivendo da gordura que acumularam durante a época cheia (Santos et al. 2006).

1.3. Desempenho natatório em peixes

O desempenho natatório de peixes é considerado o principal aspecto que determina a sobrevivência do animal, visto que pode influenciar na sua capacidade de obter alimento, encontrar um parceiro, evitar condições desfavoráveis, encontrar locais de desova, etc. (Plaut 2001). O custo energético da natação é alto, ou seja, aumenta em oito vezes para se dobrar a velocidade, sem contar os custos necessários para se manobrar o corpo em diferentes direções. Soma-se a isso o custo do equilíbrio, ou seja, em velocidades baixas, a manutenção do equilíbrio dos peixes gera um custo energético que diminui à medida que ele acelera, devendo-se ao aprimoramento da hidrodinâmica (Boisclair e Tang 1993; Krohn e Boisclair 1994; Webb 1998).

Os peixes utilizam diferentes “marchas” para acelerar e, para isso, se baseiam na utilização de diferentes combinações de nadadeiras e comportamento. Em geral, as nadadeiras médias e pares são usadas em marchas mais baixas, enquanto nas mais altas e na aceleração, a nadadeira caudal e a ondulação do corpo são utilizados (Webb 1998; Alexander 2003). Os dois principais tipos de músculos que suportam a natação são o de oxidação lenta (ou vermelhos) e o glicolítico rápido (ou brancos). Os músculos vermelhos têm menos potência, mas podem contrair-se indefinidamente, pois tem maior suprimento de sangue, maior quantidade de mioglobina e mitocôndrias, alta concentrações de lipídeos e citocromos, e alta atividade das enzimas da cadeia respiratória do ácido cítrico. Ao contrário, os músculos brancos são mais potentes, porém fadigam rapidamente devido, principalmente, ao acúmulo de lactato, uma vez que são predominantemente anaeróbicos e produzem energia por fermentação. Isso quer dizer que nas marchas iniciais, ou seja, nas velocidades mais baixas, os músculos vermelhos são predominantemente utilizados, enquanto nas velocidades mais altas, os músculos brancos predominam (Almeida-Val *et al.* 2006; Burgetz *et al.* 1998; Webb 1998). Peixes que tem por hábito nadar por longos períodos ou distâncias têm maior quantidade de fibras musculares vermelhas, tendo portanto maior razão entre a quantidade de músculo vermelho e músculo branco no corpo. Ao contrário, peixes com hábitos territorialistas, com boa capacidade explosiva dos músculos apresentam proporções de músculo vermelho menores, e em algumas espécies

os músculos vermelhos são ausentes, como por exemplo, no ciclídeo *Symphysodon aequifasciatus* (Almeida-Val *et al.* 2006). Do ponto de vista fisiológico, o desempenho natatório dos peixes está diretamente relacionado à sua capacidade de transferir oxigênio e moléculas energéticas aos músculos, e ao mesmo tempo, eliminar os subprodutos indesejáveis (Revisto por Webb, 1998).

Embora os peixes em geral necessitem de uma dieta rica em proteínas, não se conhece a importância da oxidação de aminoácidos na produção de ATP durante o exercício (Moyes e West 1995). Sabe-se que na truta arco-iris os aminoácidos contribuem muito pouco em animais nadando a 80% da sua capacidade aeróbica máxima (Ucrit) (Van den Thillart 1986).

Os carboidratos, com importante participação na geração de ATP em peixes exercitados, suprem os músculos vermelhos a partir do (1) glicogênio intramuscular; (2) da glicose circulante no sangue e (3) da oxidação do lactato produzido a partir do glicogênio dos músculos brancos (Moyes e West 1995; Richards *et al.* 2002). Na maioria dos peixes, os depósitos de glicogênio nos músculos vermelhos são discretos; portanto, após poucas horas de exercício de baixa intensidade os peixes passam a se basear nas fontes externas de carboidratos, como a glicose e o lactato circulante (Moyes e West 1995). Quando o exercício atinge velocidades mais altas, os músculos brancos são predominantemente utilizados, e os animais fadigam em pouco tempo. Nestas condições, a maior parte do ATP para o músculo é gerado a partir do glicogênio armazenado no próprio músculo, sendo praticamente desprezível a participação da glicose circulatória (Moyes e West 1995; Richards *et al.* 2002)

Os lipídeos são responsáveis por suportar a natação moderada e prolongada, mas os mecanismos não são bem estabelecidos (Lauff e Wood 1996). Em sockeye salmon, por exemplo, as lipoproteínas carreadoras dos triglicerídeos parecem suportar a migração, visto que suas concentrações diminuem drasticamente após esse processo (Magnoni *et al.* 2006). Os ácidos graxos são liberados a partir dos triglicerídeos armazenados nos músculos brancos, fígado e vísceras, por meio das lipases (Sheridan 1994; Moyes e West 1995; Magnoni *et al.* 2006). Lipases são estimuladas pelo cortisol e outros

hormônios que são liberados em diversas situações, inclusive durante o exercício em peixes (Sheridan 1994; Vijayan *et al.* 1997). Uma vez na circulação, os ácidos graxos são oxidados pelos músculos vermelhos e podem até mesmo inibir a oxidação de carboidratos, favorecendo a preservação deles para serem usados em outros tecidos (Moyes e West 1995).

O desempenho natatório de peixes, em laboratório, pode ser classificado em três categorias: (1) sustentado, (2) prolongado e (3) explosivo. Sustentado é aquele que pode ser mantido por longos períodos (>240 minutos) e é predominantemente aeróbico; o prolongado também é predominantemente aeróbico porém o peixe fadiga antes de 200 minutos, devido à depleção de carboidratos e acúmulo de lactato; e o explosivo é aquele com duração de menos de 20 segundos, mantido de forma predominantemente anaeróbica, pela fosfocreatina (Plaut 2001). O modo sustentado é usado principalmente durante migrações e atividades de rotina, como forrageamento. O explosivo é geralmente usado para fugir de predadores ou atacar suas presas, ou ainda para manobras agressivas quando as correntes de água mudam repentinamente. O modo prolongado não pode ser visto na natureza, pois não se conhece uma condição na qual peixes nadam até fadigarem, exceto quando há interferência humana, como por exemplo, a pesca esportiva. No entanto, a natação prolongada é muito utilizada em laboratório, uma vez que o tempo de duração do teste até a fadiga nos dá uma ideia da capacidade aeróbica do animal (Plaut 2001).

O teste elaborado por Brett em 1964 é de longe o mais utilizado para se medir a capacidade aeróbica de peixes. Neste teste os peixes são transferidos para um túnel de natação, com capacidade de controlar a velocidade da água, e são permitidos se recuperarem por 2 horas em uma velocidade de 10 centímetros por segundo (cm/s). Após esse período, a velocidade é aumentada em 10 cm/s a cada 30 minutos, até que ocorra a fadiga do peixe. Sabemos que esse teste é uma medida da capacidade aeróbica do animal, com uma maior participação do metabolismo anaeróbico, próxima a sua velocidade de fadiga (Hammer 1995; Burgetz *et al.* 1998; Richards *et al.* 2002; Martinez 2003; Peake e Farrell 2004). Este teste é frequentemente usado também para se determinar o efeito de diferentes condições ambientais sobre a capacidade aeróbica dos peixes, já que desta forma podemos prever os efeitos ecológicos destas

condições (ex: hipóxia, metais pesados, temperatura, etc) (Plaut 2001). Embora não esteja definitivamente provado que a capacidade natatória dos peixes, medida pelo teste de Ucrit, esteja diretamente relacionado com o seu ajuste no ambiente e à sua sobrevivência, é pelo menos a melhor medida ecofisiológica disponível para se prever consequências ecológicas, especialmente em peixes migradores (Plaut 2001).

Conforme mencionado anteriormente, o matrinchã é uma espécie que realiza a arribação e isso certamente está relacionado com o seu melhor desempenho natatório (Ucrit), quando comparado com o tambaqui, espécie que realiza migrações em menor escala. O que ainda não sabemos é se esse melhor desempenho pode ser explicado apenas pelo formato mais fusiforme e hidrodinâmico do matrinchã, ou se há diferenças bioquímicas e fisiológicas entre as espécies que podem definir esta condição. Uma vez estabelecido isso, poderemos entender melhor de que forma as pressões ambientais amazônicas direcionaram de forma diferente a relação delas com o ambiente em que vivem e, por conseguinte, a evolução dessas espécies. O cultivo de matrinchã em água corrente mostra-se favorável ao ganho de peso e melhor conversão alimentar (Ferreira 2013). Uma possível explicação para os efeitos benéficos do cultivo desta espécie em água corrente é o efeito sobre a agressividade, uma vez que apresenta hierarquia de dominâncias, mas muda o comportamento e diminui a frequência dos ataques sob exercício. Isso favoreceria o consumo de ração e a redução do estresse que, sabidamente, impedem a liberação do cortisol, melhorando a conversão alimentar (Jobling 1994). Não sabemos se a suplementação da dieta de peixes cultivados em água corrente poderia favorecer a produção de óxido nítrico nos músculos e, conseqüentemente, aumentar o desempenho natatório. Isso poderia se dar pela vasodilatação e aumento da oferta de oxigênio e demais nutrientes aos músculos, ou ainda por outros processos não conhecidos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Compreender o papel do óxido nítrico no desempenho natatório de tambaqui e matrinhã, e sua relação com outros parâmetros do metabolismo energético.

2.2. Objetivos específicos

- a) Avaliar se a disponibilidade de óxido nítrico nos músculos durante, ou no final do exercício, está relacionada com um melhor desempenho natatório prolongado;
- b) Examinar se a hipóxia ambiental ou o déficit de oxigênio causado pelo exercício prolongado interfere na disponibilidade do óxido nítrico nos músculos;
- c) Analisar se a suplementação da dieta de peixes com fármacos pode alterar as respostas do óxido nítrico ao exercício, e de que forma isso afeta o desempenho;

3. Referências Bibliográficas

Alexander, R. M. 2003. *Principles of Animal Locomotion*, Princeton University Press, New Jersey, 377p.

Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Hochachka P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: Status of an under-explored biological “goldmine”. In: Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Van den Thillart, G. (Ed). *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press, London, p.435–445.

- Almeida-Val, V. M. F.; Chipari-Gomes, A. R.; Lopes, N. P. 2006. Metabolic and Physiological Adjustments to Low Oxygen and High Temperature in Fishes of the Amazon. In: Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Randall, D. J. (Ed). *The Physiology of Tropical Fishes*, Academic Press, Massachusetts, p.443-491.
- Boisclair, D.; Tang, M. 1993. Empirical analyses of the swimming pattern on the net energetic cost of swimming in fishes. *Journal of Fish Biology*, 42:169–183.
- Braum, E.; Junk, W. J. 1982. Morphological adaptation of two Amazonian caracoids (Pisces) for surviving in oxygen deficient waters. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie*, 67: 869-886.
- Brett, J. R. 1964. The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 21:1183-1226.
- Burgetz, I.; Rojas-Vargas, A.; Hinch, S.; Randall, D. 1998. Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 201:2711–2721.
- De Lima, A. C.; Araujo-Lima, C. A. R. M. 2004. The distributions of larval and juvenile fishes in Amazonian rivers of different nutrient status. *Freshwater Biology*, 49:787–800.
- Ferreira, M. S., Aride, P. H. R., Silva, M. de N. P. da, and Val, A. L. 2013. Efeito da quantidade de proteína na dieta e treinamento físico sobre parâmetros fisiológicos e zootécnicos de matrinchã (*Brycon amazonicus*, Günther 1869). *Acta Amazonica*, 43(4):439–446.
- Goulding, M. 1980. *The Fishes and the Forest: Explorations in Amazonian Natural History*. University of California Press, California, 280 p.
- Hammer, C. 1995. Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112:1-20.

- Jobling, M. 1994. Fish Bioenergetics. Chapman & Hall, London, UK. 309p.
- Junk, W. 1984. Ecology of the várzea, floodplain of Amazonian whitewater rivers. In: Harald S. (Ed). *The Amazon*. Springer, Netherlands, p.215-243.
- Junk, W.; Howard-Williams, C. 1984. Ecology of aquatic macrophytes in Amazonia. In: Harald S. (Ed). *The Amazon*. Springer, Netherlands, p.269-293.
- Junk, W. L.; Bayley, P. B.; Sparks, R. E. 1989. The flood pulse concept in river-floodplain systems. in: D. P. Dodge (Ed). *Proceedings of the International Large River Symposium*. Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, Canada, p.110-127.
- Kramer, D. L. 1978. Ventilation of the respiratory gas bladder in *Hoplerythrinus unitaeniatus* (Pisces, Characoidei, Erythrinidae). *Canadian Journal of Zoology*, 56(4):931–938.
- Krohn, M. M. ; Boisclair, D. 1994. Use of stereo video system to estimate the energy expenditure of free-swimming fish. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science*, 51:1119–1127.
- Lauff, R. F.; Wood, C. H. 1996. Respiratory gas exchange, nitrogenous waste excretion, and fuel usage during aerobic swimming in juvenile rainbow trout. *Journal of Comparative Physiology*, 166:501–509.
- Lowe-McConnell, R. H. 1987. *Ecological Studies in Tropical Fish Communities*. Cambridge University Press, Cambridge, 387p.
- Magnoni, L. J.; Patterson, D. A.; Farrell, A. P.; Weber, J. M. 2006. Effects of long-distance migration on circulating lipids of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 63:1822–1829.
- Martinez, M. 2003. Condition, prolonged swimming performance and muscle metabolic capacities of cod *Gadus morhua*. *Journal of Experimental Biology*, 206:503–511.

- Moyes, C. D.; West, T. G. 1995. Exercise metabolism of fish. In: Mommsem, T. P. Hochach, P. (Ed). *Metabolic biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Vol. 4). Elsevier, Amsterdã, p.367-392.
- Muusze, B.; Marcon, J.; van den Thillart, G.; Almeida-Val, V. M. F. 1998. Hypoxia tolerance of Amazon fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120:151–156.
- Nelson, J. S. 1984. *Fishes of the World*. John Wiley and Sons Publisher, New York, 523p.
- Oliveira, A. M.; Silva, M. N. P.; Almeida-Val, V. M. F.; Val, A. L. 2012. Caracterização da atividade de piscicultura nas mesoregiões do estado do Amazonas, Amazônia brasileira. *Revista Colombiana Ciência Animal*, 4:154-162.
- Peake, S. J.; Farrell, A. P. 2004. Locomotory behaviour and post-exercise physiology in relation to swimming speed, gait transition and metabolism in free-swimming smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *The Journal of Experimental Biology*, 207:1563–1575.
- Plaut, I. 2001. Critical swimming speed: Its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131:41–50.
- Rai, H.; Hill, G. 1984. Microbiology of Amazonian waters. In: Sioli, H. (Ed). *The Amazon*, Springer, Netherlands, p.413–442.
- Richards, J. G.; Mercado, A. J.; Clayton, C. A.; Heigenhauser, G. J. F.; Wood, C. M. 2002. Substrate utilization during graded aerobic exercise in rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology*, 205:2067–2077.
- Santos, G.; Ferreira, E.; Zuanon, J. 2006. Peixes Comerciais de Manaus, *Pró Varzea*.
- Sheridan, M. A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107:495–508.

- Sioli, H. 1984. The Amazon and its main affluents: Hydrography, morphology of the river courses, and river types. in: Sioli, H. (Ed). *The Amazon. Limnology and Landscape Ecology of a Mighty Tropical River and Its Basin*. Springer.
- Sioli, H. 1986. The Amazon. Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin. *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie Und Hydrographie. Harald Sioli (Editor):*, 71(5):723–723.
- Sioli, H. 1991. Amazônia: fundamentos da ecologia da maior região de florestas tropicais. *Editores Vozes*, São Paulo, 72p.
- Val, A. L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 125:417-35.
- Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. 1995. *Fishes of the Amazon and their Environment*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 224p.
- Val, A. L.; Schwantes, A. R.; Almeida-Val, V. M. F. 1986. Biological aspects of Amazonian fishes. Hemoglobins and whole blood properties of *Semaprochilodus* species (prochilodontidae) at two phases of migration. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 83:659–667.
- Val, A. L.; Silva, M. N. P.; Almeida-Val, V. M. F. 1998. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. *South African Journal of Zoology*, 33:107–114.
- Van den Thillart, G. 1986. Energy metabolism of swimming trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Comparative Physiology*, 156:511–520.
- Vijayan, M. M.; Pereira, C.; Grau, E. G.; Iwama, G. K. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 116:89–95.
- Webb, P. W. 1998. Swimming. In: Evans, D. H.; Claiborne, J. B.; Currie, S. (Ed). *The Physiology of Fishes*. CRC press, Flórida, p.3–24
- Wotton, R. J. 1990. *Ecology of teleost fishes*. Chapman and Hall, London, 404p.

Capítulo I - Efeito do exercício e da hipóxia sobre o óxido nítrico muscular de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e matrinhã (*Brycon amazonicus*)

Chapter I - Effect of exercise and hypoxia on the muscle nitric oxide of tambaqui (*Colossoma macropomum*) and matrinhã (*Brycon amazonicus*)

RESUMO

Acredita-se que o óxido nítrico causa vasodilatação muscular durante o exercício intenso e a irrigação sanguínea aumentada retardaria a fadiga. Espécies de peixes amazônicos como, por exemplo, o tambaqui e o matrinhã, baseiam-se fortemente na sua capacidade natatória para realizar migrações tróficas e reprodutivas. Verificamos em laboratório que o matrinhã possui um desempenho natatório superior ao do tambaqui e, embora o formato fusiforme possa lhe dar alguma vantagem, possíveis diferenças fisiológicas que poderiam determinar o desempenho não são conhecidas. Este trabalho teve como objetivo verificar se o óxido nítrico muscular ajuda a retardar a fadiga muscular de peixes em exercícios aeróbicos intensos ou prolongados. Ambas as espécies foram submetidas aos seguintes experimentos: (a) exercício incremental até a fadiga (Ucrit); (b) exercício prolongado e moderado (30 cm/s por 12 horas); (c) hipóxia com acesso à superfície da água; e (d) hipóxia sem acesso à superfície da água. Enquanto que em tambaqui o óxido nítrico só se eleva na fadiga, em matrinhã sua atuação ocorre nas fases iniciais do exercício, ajudando a retardar a fadiga por postergar a dependência energética dos músculos brancos e o consequente acúmulo de lactato. Também, os níveis basais mais elevados de LDH nos músculos brancos de matrinhã indicam uma adaptação para a utilização do metabolismo anaeróbico. Retardar os efeitos negativos do uso do metabolismo anaeróbico e apresentar menor sensibilidade ao lactato é essencial para o melhor desempenho natatório do matrinhã, em relação ao tambaqui.

ABSTRACT

Nitric oxide seems to cause muscle vasodilation during intense exercise, and the increased blood supply would delay fatigue. Amazon fish species such as tambaqui and matrinchã, rely heavily on their swimming capabilities to perform trophic and breeding migration. We found in the laboratory that the matrinchã has a better swimming performance than tambaqui, and although the fusiform shape of the body represents some advantage to matrinchã, possible physiological differences that could determine the performance are not known. This study aimed to verify if the muscle nitric oxide acts to delay muscle fatigue in prolonged or intense aerobic exercise. Both species were subjected to the following experiments: (a) incremental exercise until fatigue (ucrit); (B) prolonged exercise (30 cm/s for 12 hours); (C) hypoxia with access to the water surface; and (d) hypoxia without access to the water surface. While in tambaqui nitric oxide only rises in fatigue, in matrinchã it increases in the early stages of the exercise, helping to delay fatigue by delaying energy dependence of the muscle and the consequent accumulation of lactate. Also, higher basal levels of LDH in the white muscles of matrinchã suggest an adaptation for the use of anaerobic metabolism and decreased susceptibility to lactate. Delaying the negative effects of the use of anaerobic metabolism and presenting less sensitivity to lactate, is essential for the best swimming performance of matrinchã, compared to tambaqui.

1. Introdução

O desempenho natatório dos peixes está diretamente relacionado à sua capacidade de transferir oxigênio e moléculas energéticas aos músculos, e ao mesmo tempo, eliminar os subprodutos indesejáveis (revisto por Webb 1998). Em humanos, acredita-se que o óxido nítrico cause vasodilatação muscular durante o exercício intenso e a irrigação sanguínea aumentada retardaria a fadiga (Macardle 2011). O óxido nítrico é uma molécula sinalizadora com papel importante na homeostase cardiovascular, neurotransmissão, defesas imunológicas (Moncada e Higgs 2006), vasodilatação (Jensen 2009) e desempenho muscular (Rudnick *et al.* 2004), entre outras. Um aspecto marcante desta molécula é a sua capacidade de ser benéfica ou potencialmente tóxica conforme a concentração ou depuração tecidual (Hansen e Jensen 2010). Devido a sua evanescência, a detecção do óxido nítrico é muito difícil, sendo comumente feita de maneira indireta, considerando-se a medida da concentração de nitritos e nitratos (NOx)(McNeill e Perry 2006) por meio de técnica relativamente simples. O óxido nítrico é produzido a partir da L-arginina pela enzima sintase do óxido nítrico (Nitric Oxide Synthase - NOS) em um processo que requer O₂ e NADPH (Alderton *et al.* 2001). Três isoformas da enzima NOS são conhecidas, sendo que duas são constitutivas, a neuronal (NOS1) e a endotelial (NOS3), e a outra é induzível (NOS2) ou estimulável pelos lipopolissacarídeos e/ou citocinas. A NOS2, ou induzível, participa do processo imunológico e gera grandes quantidades de óxido nítrico, produzindo efeitos citotóxicos e citostáticos em células de vários órgãos-alvo (Wright *et al.* 1992; Lee *et al.* 2001). Já a NOS1 é conhecida como neuronal, indicando onde foi primeiramente descoberta, mas sabe-se hoje que está presente também nos tecidos musculares, mais especificamente na região sarcolemal e junção neuromuscular (Kobzik *et al.* 1995; Kusner e Kaminski 1996), onde produzem o óxido nítrico que atua nos processos de sinalização neuromuscular, geração de força, contratilidade e a tomada da glicose por um processo independente da insulina (Flora Filho e Zilberstein 2000; Rudnick *et al.* 2004). A NOS3, ou endotelial, encontra-se uniformemente distribuída na fibra muscular e na parede dos vasos sanguíneos (Kobzik *et al.* 1995) e produzem o ON que funciona como sinalizador capaz de acionar a dilatação dos vasos e reduzir a resistência

vascular (Joannides *et al.* 1995). É proposto na literatura que o estímulo fisiológico para aumentar a produção de óxido nítrico endotelial é o atrito causado pelo fluxo sanguíneo aumentado através do lúmen do vaso (Pohl *et al.* 1986; Rubanyi *et al.* 1986; Hutcheson e Griffith 1991). O atrito faz com que esta molécula, pequena e lipofílica, penetre facilmente nas células, onde terá forte afinidade pelo grupo heme da enzima guanilato ciclase. A ligação causa a ativação da enzima, que atua como catalizadora da transformação de GTP em GMP cíclico. O acúmulo do GMPc bloqueia a saída de cálcio do retículo endoplasmático das células musculares lisas das paredes dos vasos, impedindo a contração e induzindo o relaxamento (Lowenstein *et al.* 1994; Andrew e Mayer 1999; Cerqueira e Yoshida 2002; Dusse *et al.* 2003; Moncada e Higgs 2006). Embora pareça que o papel das três isoformas da NOS em peixes teleósteos seja comparável ao dos mamíferos, os resultados na literatura são muitas vezes conflitantes (Agnisola 2005; Tota *et al.* 2005; Olson e Donald 2009). Espécies de peixes amazônicos como, por exemplo, o tambaqui e o matrinchã, baseiam-se fortemente na sua capacidade natatória para realizar migrações tróficas e reprodutivas. O matrinchã realiza ainda a arribação, um processo no qual os adultos e jovens recrutados das áreas de várzea dispersam rio acima no período da seca (Santos *et al.* 2006). Verificamos em laboratório que o matrinchã possui um desempenho natatório superior ao do tambaqui (Ferreira *et al.* 2010) e, embora o formato fusiforme do corpo possa lhe dar alguma vantagem, possíveis diferenças fisiológicas que poderiam determinar o desempenho não são conhecidas.

Este trabalho teve como objetivo verificar se a disponibilidade de óxido nítrico nos músculos durante, ou no final do exercício, está relacionada com um melhor desempenho natatório prolongado; e se a hipóxia ambiental ou o déficit de oxigênio causado pelo exercício prolongado interfere na disponibilidade do óxido nítrico nos músculos.

2. Material e métodos

2.1. Animais experimentais e parâmetros da água

O tambaqui e matrinhã, adquiridos de piscicultores da região, passaram por um processo de aclimatação de 30 dias em tanques com aeração constante e recirculação parcial da água, antes de serem utilizados em todos os experimentos. Foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Purina) composta por 36% de proteína, até a saciedade aparente. As características físico-químicas da água de poço do INPA, usada durante a aclimatação e nos experimentos foram: Na^+ $34,00 \pm 1,00 \mu\text{mol}$, Cl^- $28,00 \pm 1,00 \mu\text{mol}$, Ca^{2+} $11,50 \pm 0,90 \text{ mol}$, Mg^{2+} $0,80 \pm 0,10 \text{ mol}$, K^+ $15,50 \pm 0,40 \text{ mol}$, pH $6,32 \pm 0,04$, SH $0,99 \pm 0,19 \text{ mg C.L}^{-1}$, O_2 Dissolvido $5,91 \pm 0,07 \text{ mg.L}^{-1}$, temperatura $28,00 \pm 1,00 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2. Efeito da fadiga

Os exemplares de matrinhã utilizados tinham $15,20 \pm 2,45 \text{ g}$ e $8,80 \pm 0,82 \text{ cm}$, e os exemplares de tambaqui, $31,00 \pm 6,99 \text{ g}$ e $9,87 \pm 0,71 \text{ cm}$. Este experimento foi baseado no teste de fadiga elaborado por Brett (1969), no qual os peixes são transferidos para o túnel de natação, dotado de bombas controladas por computadores, que é capaz de aumentar a velocidade da água em 10 cm/s a cada 30 minutos, até a fadiga dos peixes. Os peixes foram considerados fadigados quando permaneciam apoiados na grade posterior do túnel após 3 estímulos elétricos de 24 Volts. Doze peixes de cada espécie, em experimentos separados, foram transferidos para o túnel de natação e passaram pelo período de 2 horas de aclimatação, e então 6 animais foram retirados e tiveram o músculo vermelho e branco coletados para análises, conforme será explicado posteriormente, e os seis restantes foram submetidos ao incremento de velocidade até a fadiga, para então terem os tecidos coletados. Além das análises musculares, o valor de U_{crit} de cada peixe foi calculado da seguinte forma:

$U_{\text{crit}} = U_i + (T_i / T_{ii} \times U_{ii})$, onde U_{ii} é o incremento de velocidade (cm/sec), U_i é a penúltima velocidade na qual o peixe nadou antes de fadigar, T_i é o tempo

decorrido entre o último aumento de velocidade e a fadiga (minutos), e T_{ii} é o tempo entre os incrementos de velocidade (minutos). A U_{crit} foi padronizada dividindo seu valor pelo comprimento padrão do peixe.

2.3. Efeito da hipóxia com acesso à superfície da água

Os exemplares de tambaqui tinham $29,00 \pm 6,32$ g e $8,39 \pm 0,57$ cm. Este experimento não foi realizado com matrinhã, já que em testes preliminares eles não suportaram tais condições. Embora seja possível manter esta espécie na concentração de 0,5 mg/L de oxigênio na água por vários dias, desde que tenha acesso à superfície, a pequena área superficial da câmara usada (176 cm^2) dificultou a movimentação do animal, o que é necessário para que a captação da água superficial, rica em oxigênio, ocorra com eficiência. Foi criado um sistema de aeração para as câmaras experimentais e, em seguida, 12 animais foram individualmente transferidos dos tanques para as estas câmaras de aproximadamente 2L onde ficaram mantidos em aeração constante e troca de 70% de água na metade do tempo de aclimação que foi de 24 horas. Após a aclimação a aeração de 6 câmaras foi desligada e injetado nitrogênio gasoso na água até que a concentração de oxigênio baixasse para aproximadamente 0,5 mg/L, permanecendo as demais em normoxia. Os peixes foram permitidos coletar água na superfície, sabidamente mais oxigenada, para realizarem trocas gasosas. Os peixes, após os períodos de 6, 12, 24 horas nessas condições, em experimentos separados, foram coletados, anestesiados com MS-222 (Sigma® A5040-25G) na concentração de 3g/L e sacrificados por secção cervical, de acordo com processo submetido e aprovado pelo CEUA/INPA, para depois terem o músculo vermelho e o branco retirados para armazenamento em -80°C e análises posteriores.

2.4. Efeito da hipóxia sem acesso à superfície da água

Os exemplares de matrinhã tinham $15,5 \pm 2,99$ g e $10,10 \pm 0,95$ cm, e os exemplares de tambaqui, $30,00 \pm 6,89$ g e $8,85 \pm 0,69$ cm. Doze peixes foram mantidos na aclimação de 24 horas e cerca de 70% da água das câmaras foi

trocada na metade desse período. Após aclimatação a aeração de 6 câmaras foi desligada e injetado nitrogênio gasoso na água até que a concentração de oxigênio baixasse para aproximadamente 0,5 mg/L, permanecendo as demais em normoxia. Os peixes foram impedidos de respirarem na superfície por meio da instalação de uma camada plástica, permanecendo nessas condições por uma hora. Em seguida os tecidos foram coletados conforme já mencionado.

2.5. Efeito do exercício prolongado

Os exemplares de matrinhã utilizados tinham $15,00 \pm 2,88$ g e $9,80 \pm 0,88$ cm, e os exemplares de tambaqui, $32,00 \pm 7,48$ g e $9,42 \pm 0,66$ cm. Doze peixes de cada espécie foram transferidos para o túnel de natação onde permaneceram por duas horas na velocidade de água de 10 cm/s para se aclimatarem. Após esse período, seis animais foram retirados, anestesiados e sacrificados para análise dos músculos branco e vermelho. Os outros seis animais permaneceram no túnel e a velocidade da água foi aumentada em 10 cm/s a cada 10 minutos até que atingisse 30 cm/s, permanecendo assim por 12 horas. Após esse período, os animais foram coletados, anestesiados e sacrificados para análise dos músculos branco e vermelho.

2.6. Efeito do incremento de velocidade

Os exemplares de matrinhã utilizados tinham $17,00 \pm 3,20$ g e $10,50 \pm 0,90$ cm, e os exemplares de tambaqui, $53,28 \pm 22,73$ g e $11,73 \pm 1,25$ cm. Este experimento foi baseado no teste de fadiga elaborado por Brett (1964), porém, diferentemente do primeiro experimento, diferentes peixes foram analisados em cada etapa do teste, e o último grupo foi levado até um nível submáximo de velocidade, e não até a fadiga. Os peixes foram transferidos para o túnel de natação vedado (Loligo Systems[®]), dotado de sensores de oxigênio e bombas controladas por computadores, que é capaz de aumentar a velocidade da água em 10 cm/s a cada 30 minutos, até a fadiga dos animais. Cada grupo de 6 peixes foi levado à um estágio, iniciando-se o grupo controle com 0,1 comprimento de corpo por segundo (cc/s), o segundo grupo passou pelo primeiro estágio e foi

levado até 1 cc/s, depois outro grupo passou pelos estágios anteriores até atingir 2 cc/s, e assim por diante até que houve um grupo de tambaqui atingindo 4 cc/s e um de matrinhã atingindo 5 cc/s. Houve também um grupo de recuperação, no qual os peixes nadaram até o último estágio, e depois foram mantidos na velocidade inicial de 0,1 cc/s para se recuperarem, antes de terem os tecidos retirados para análise. Ao longo de todo o processo, o consumo de oxigênio de cada peixe foi medido, de acordo com seu peso inserido previamente no *software* de análise, e no fim de cada etapa cada peixe teve os músculos brancos e vermelhos retirados para análise.

2.7. Análises estatísticas

Utilizamos o pacote estatístico SigmaPlot (11.0), sendo que em todos os casos foram observadas as premissas para aplicação de cada teste. Os dados foram expressos como média e erro padrão da média, e diferenças estatísticas foram consideradas quando o valor de p foi menor que 0,05. No experimento até a fadiga e exercício prolongado, usamos teste t para comparação de cada tipo de músculo com seu controle não exercitado. O mesmo teste foi usado nos experimentos de hipóxia, de forma isolada, em cada período de tempo, já que se tratavam de peixes diferentes. Nos experimentos de velocidade incremental, usamos ANOVA de um fator, com teste *a posteriori* de SNK.

2.8. Análises musculares

Os peixes foram anestesiados por imersão em água contendo o anestésico MS222, e foram sacrificados por secção da coluna cervical. Amostras do tecido muscular vermelho e branco, próximo ao pedúnculo caudal, foram retiradas com o auxílio de um bisturi, congeladas em freezer a -80 °C. Estes tecidos foram homogeneizados com tampão específico em triturador automático e em gelo fundente e centrifugados durante 15 minutos a 13.000g em centrífuga Sorvall RC5B a 4°C para retirar qualquer material particulado.

Na análise da enzima Citrato Sintase foi utilizado o tampão EDTA (ácido etileno diamino tetracético) 1mM, contendo 1% de Triton X-100 (Octilfenoxipolietoxietanol) e 20mM de Hepes (ácido etanosulfúrico hidroxietilpiperazina), pH 7.4. As reações foram iniciadas com adição de 0,5mM de ácido oxalacético (substrato), e as medidas realizadas no comprimento de onda 412nm.

Na análise da enzima Lactato Desidrogenase e 3-Hidroxiacil CoA Desidrogenase (HOAD), foi utilizado o tampão Imidazol 150mM, contendo 1mM de EDTA, 5mM de dithiothreitol (DTT) e 1% de triton X-100, pH 7,4. No caso da LDH, as reações foram iniciadas com adição de 1mM de piruvato (substrato), e as medidas realizadas no comprimento de onda 340nm; para a HOAD, as reações foram iniciadas com a adição de 0,1mM de acetoacetyl-CoA (substrato), e as medidas realizadas no mesmo comprimento de onda (340nm).

Os cálculos foram feitos segundo a equação:

$$\mu\text{moles substrato.g}^{-1} \text{ tecido fresco. min}^{-1} =$$

$$\frac{[\Delta\text{OD}/\text{min} \times \text{fd} (\text{cubeta})]/6,22*}{\text{volume do tampão (ml)}/\text{peso do tecido(g)}}$$

onde:

fd = fator de diluição

$\Delta\text{OD}/\text{min}$ = variação na densidade óptica por minuto

6,22 = coeficiente de extinção molar da coenzima NADH (para LDH)

*para leitura da citrato sintase usou-se o coeficiente de extinção molar do DTNB = 13,6

Para análise dos nitritos e nitratos (NOx), os mesmos tecidos foram homogeneizados com equipamento automático em tampão salino (tampão PBS: 10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, e 2.7 mM KCl) e, em seguida, centrifugados a 10.000g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e passado em filtro Milipore (Amicon) com membrana de 30kDa, seguindo orientação do fabricante do kit de análise. O kit utilizado foi da Cayman Chemical (item n. 780001) o qual, primeiramente, converte todo o nitrato da amostra em nitrito, usando nitrato redutase. O segundo passo é a adição do reagente Griess, que converte nitrito em um azo-composto lilás. A medida fotométrica deste composto em 540nm

determina a concentração de nitrito, estimando desta forma, a concentração inicial de nitritos e nitratos da amostra (NO_x).

Para determinação do lactato muscular, as amostras dos músculos branco e vermelho foram digeridas em ácido perclórico 6M na proporção de 1µL para cada 1µg de tecido e, em seguida, centrifugados a 10.000g por 10min. O extrato sobrenadante (20µL) é adicionado a uma solução contendo, numa mistura, a enzima lactato desidrogenase (LDH, 10KU/ml), a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), hidrazina e tampão glicina (0,6 mol/L, pH 9,2). Neste método, a enzima converte o lactato, presente no extrato de tecido, a piruvato o qual é complexado a piruvato-hidrazina, evitando a reconversão do piruvato para lactato. A reação ocorre com redução simultânea da coenzima NAD⁺ e é monitorada por meio do decréscimo da absorbância em 340nm, decréscimo este proporcional à concentração original de lactato na amostra. Após 15min, quando a reação processa-se completamente a 37°C, os valores de lactato tecidual são obtidos por meio de uma curva de calibração previamente estabelecida. As leituras são feitas em leitor de microplaca com filtro de 340nm.

3. Resultados

A figura 1A,B mostra que não há aumento do NO_x no músculo branco de animais submetidos à fadiga pelo teste de Ucrit. Em contraste, para ambas as espécies, o NO_x aumenta no músculo vermelho em decorrência do exercício. A figura também indica que os níveis basais de ambas as espécies são similares entre os tipos de músculo, mas em matrinchã o valor médio para o músculo vermelho é maior que do tambaqui, em peixes fadigados. As tabelas I e II mostram que a HOAD não é alterada devido ao teste de fadiga, seja em músculo branco ou vermelho. Porém os valores médios são cerca de 10 vezes maiores no músculo vermelho do que no branco, para ambas as espécies, e ainda são cerca de 10 vezes maiores em matrinchã do que em tambaqui, seja em peixes fadigados ou controles. A citrato sintase também não sofre alteração devido ao exercício até a fadiga, em ambas as espécies (Tabelas I e II). Em tambaqui, esta enzima chega a ser quase 20 vezes mais ativa no músculo vermelho do que no

músculo branco. Em matrinchã essa diferença é de apenas cerca de 7 vezes. Com relação à diferença entre as espécies, em matrinchã os níveis médios chegam a ser o dobro do tambaqui para o músculo branco, mas muito parecidos no músculo vermelho. A LDH (Figuras I e II) também não sofre qualquer alteração em função do exercício até a fadiga, em ambas as espécies, e seus valores médios são muito parecidos em músculos branco e vermelho de tambaqui e matrinchã. No entanto, com relação às diferenças entre as espécies, esta enzima chega a ser quase duas vezes mais ativa no músculo branco de matrinchã do que de tambaqui, e no músculo vermelho chega a ser quase 3 vezes mais ativa. O lactato aumenta no músculo branco de tambaqui exercitado até a fadiga, acontecendo o mesmo com matrinchã. No músculo vermelho não há qualquer alteração em ambas as espécies. Os níveis basais de lactato (Tabela I e II) são similares nos músculos branco e vermelho, nas duas espécies, mas em matrinchã, esses níveis são cerca de 50% maiores do que em tambaqui, em ambas as situações e nos dois tipos de músculo.

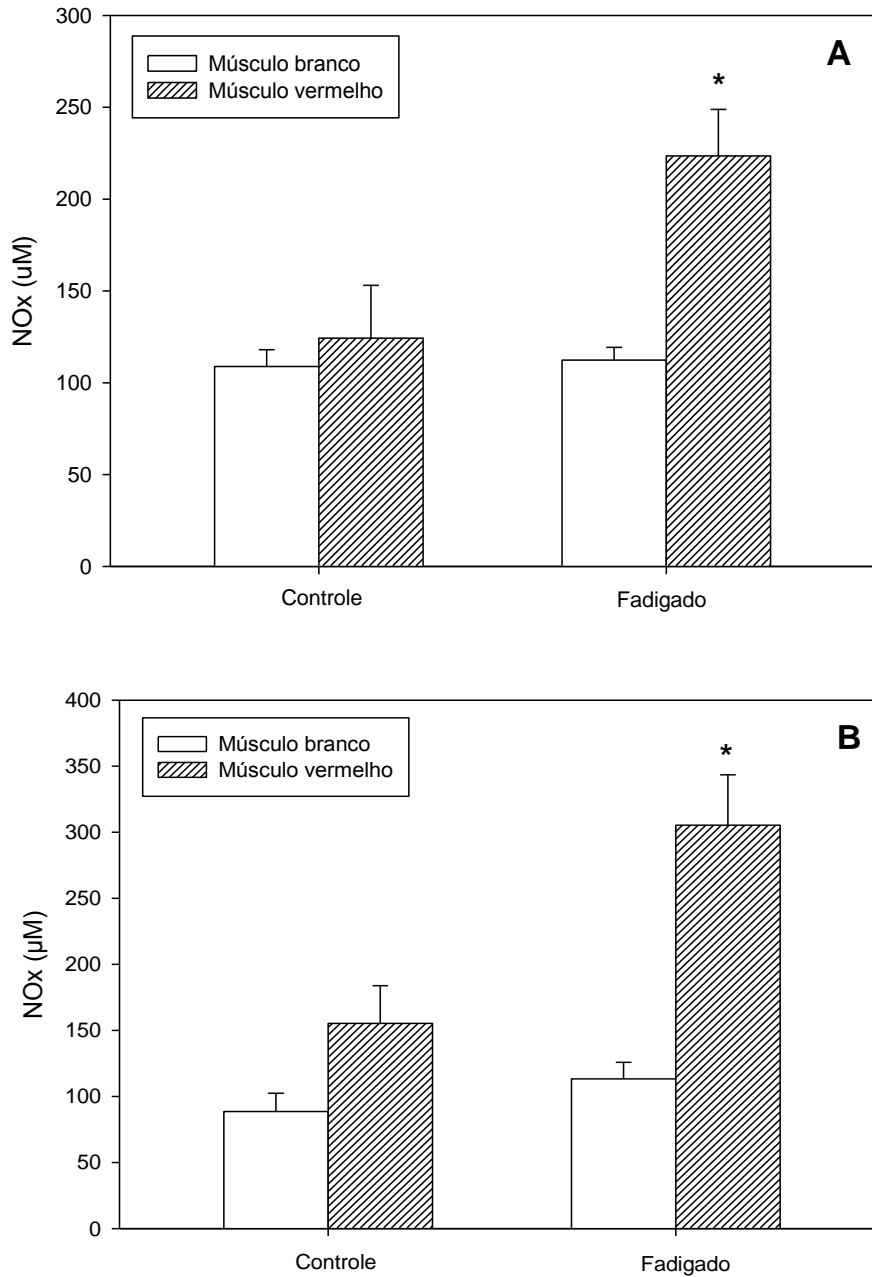


Figura 1 - Nitritos e nitratos (NOx) no músculo de exemplares de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos à natação forçada até a fadiga, por meio do protocolo de Ucrit (Brett, 1964), e de animais mantidos em repouso dentro do túnel de natação. Asterisco (*) indica diferença ($p < 0,05$) entre controle e tratamento para o mesmo tipo de músculo usando teste *t*. Dados mostrados como média e erro padrão da média ($n=6$).

Tabela I. Atividade das enzimas hidroxiaçil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), Lactato Desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de tambaqui. (C) controle, F) fadigados pelo teste de Ucrit.

		MB	MV
HOAD	C	0,152±0,02	1,35±0,15
	F	0,129±0,01	1,40±0,13
CS	C	0,68±0,07	11,16±0,75
	F	0,59±0,04	10,24±1,90
LDH	C	125,32±14,8	84,08±5,72
	F	121,24±15,24	75,72±6,84
LAC	C	153,41±17,97	177,16±16,14
	F	245,67±30,56 *	161,16±18,07

HOAD ($\mu\text{moles de acetoacetylCoA} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), CS ($\mu\text{moles de oxaloacetato} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), LDH ($\mu\text{moles de piruvato} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), lactato (mg de lactato.100 gramas de tecido fresco⁻¹). Valores expressos como média e erro padrão da média, n=6. Asterisco (*) indica diferença ($p < 0,05$) entre controle e tratamento para um mesmo tipo de músculo, usando teste *t*.

Tabela II. Atividade das enzimas hidroxiacil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de matrinchã. (C) controle ou (F) fadigados pelo teste de Ucrit.

		MB	MV
HOAD	C	0,95±0,17	9,90±1,08
	F	0,68±0,11	9,72±0,96
CS	C	1,44±0,14	9,29±0,56
	F	1,38±0,19	9,57±0,64
LDH	C	197,5±19,1	213,3±21,0
	F	194,8±12,0	203,4±17,1
LAC	C	265,9±20,5	280,5±26,6
	F	382,8±35,4 *	253,0±30,8

HOAD ($\mu\text{moles de acetoacetylCoA} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), CS ($\mu\text{moles de Oxaloacetato} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), LDH ($\mu\text{moles de piruvato} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), lactato (mg de lactato.100 gramas de tecido fresco⁻¹). Valores expressos como média e erro padrão da média, n=6. Asterisco (*) indica diferença ($p < 0,05$) entre controle e tratamento para um mesmo tipo de músculo, usando teste *t*.

No experimento no qual analisamos os peixes nos intervalos dos incrementos de velocidade, verificamos que o lactato do matrinhã aumenta de forma mais gradual que no tambaqui, ou seja, em 2 cc/s já é possível observar um aumento, que se acentua em 3 cc/s e permanece igualmente elevado em 4 cc/s. Se comparados a 2cc/s, há redução nos níveis de lactato do tambaqui em 1 cc/s, ficando o controle em níveis intermediários. O mesmo ocorre em matrinhã apenas se compararmos controle e 1 cc/s com 3 cc/s (Figura 2). Em ambas as espécies, o lactato do músculo branco de matrinhã e tambaqui se igualam aos do controle após uma hora de recuperação.

A figura 3 mostra que houve aumento do consumo de oxigênio de exemplares de tambaqui a partir de 2 cc/s, sendo que em 1 cc/s houve um consumo intermediário. Após o aumento, o consumo cai e volta a ficar em níveis intermediários na velocidade de 3 cc/s e também na recuperação de 15 minutos. Nos tempos de recuperação de 30 aos 60 minutos, os níveis de consumo de oxigênio foram iguais aos níveis iniciais. Em matrinhã o aumento do consumo de oxigênio ocorre de forma gradual, passando a ser maior que o controle a partir de 3 cc/s e atingindo um pico em 4 cc/s, velocidade máxima em que os animais foram submetidos. A recuperação ocorreu de forma similar ao tambaqui, sendo que em 15 minutos o consumo de oxigênio permaneceu elevado, caindo aos níveis do controle a partir de então.

A figura 4 mostra que os intervalos de velocidade não causam aumento significativo ($p < 0,05$) de NOx no músculo vermelho do tambaqui; no entanto, em matrinhã, o NOx aumenta a partir de 2 cc/s, atingindo o ápice em 3 cc/s e mantém o mesmo valor em 4 cc/s. Após 1 hora de recuperação na velocidade de água de 0,1 cc/s, os valores de NOx voltam aos níveis iniciais de repouso.

No experimento no qual submetemos os animais ao exercício prolongado, podemos ver que o exercício moderado e prolongado não altera a atividade da enzima LDH no músculo branco do tambaqui; porém, verifica-se o aumento da atividade desta enzima no músculo vermelho (Figura 5). Em matrinhã nenhuma alteração pode ser vista nesta enzima, após o exercício prolongado, em nenhum dos tipos de músculo. Também pode ser observado que esta enzima chega a ser duas vezes mais ativa em matrinhã do que em tambaqui, em qualquer situação e em ambos os músculos.

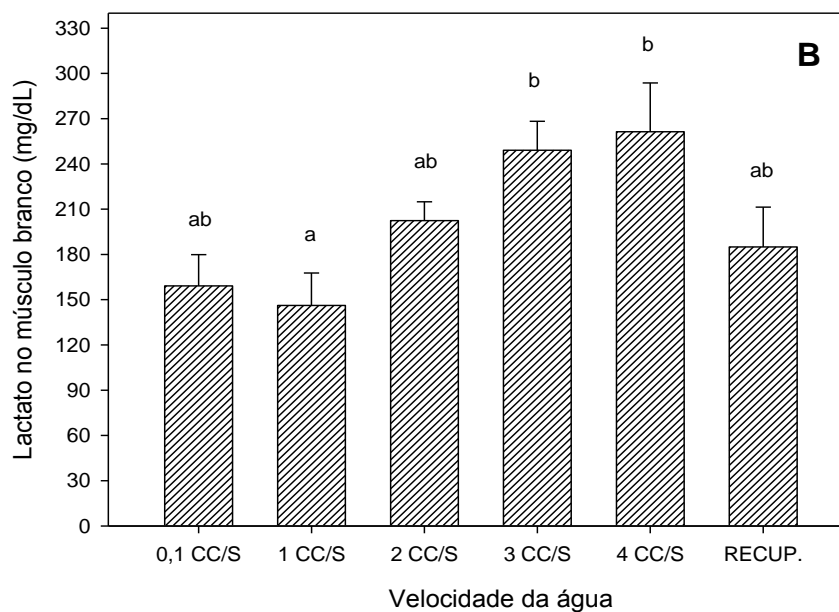
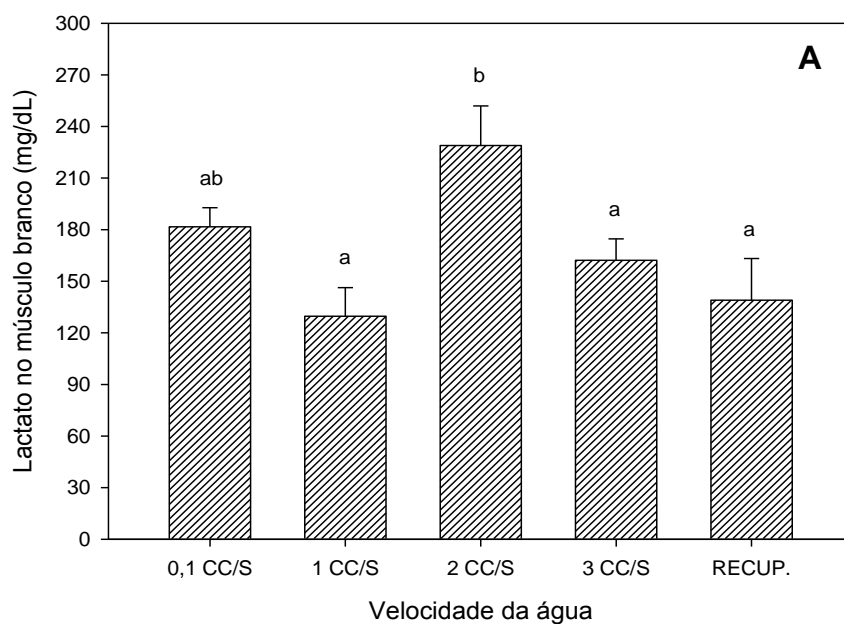


Figura 2. Lactato no músculo branco de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos por 30 minutos a cada intervalo de 1 comprimento de corpo por segundo, até a velocidade submáxima para a fadiga da espécie, baseado em teste preliminar de Ucrit (Velocidade Crítica de Natação). Para cada um dos intervalos foram usados peixes diferentes, que passaram pelos estágios inferiores até atingir o estágio alvo. A recuperação (RECUP.) se refere ao tempo de 1 hora em 0,1 cc/s, após os peixes passarem por todas as velocidades. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos por meio de ANOVA *one-way* e teste a posteriori de SNK. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

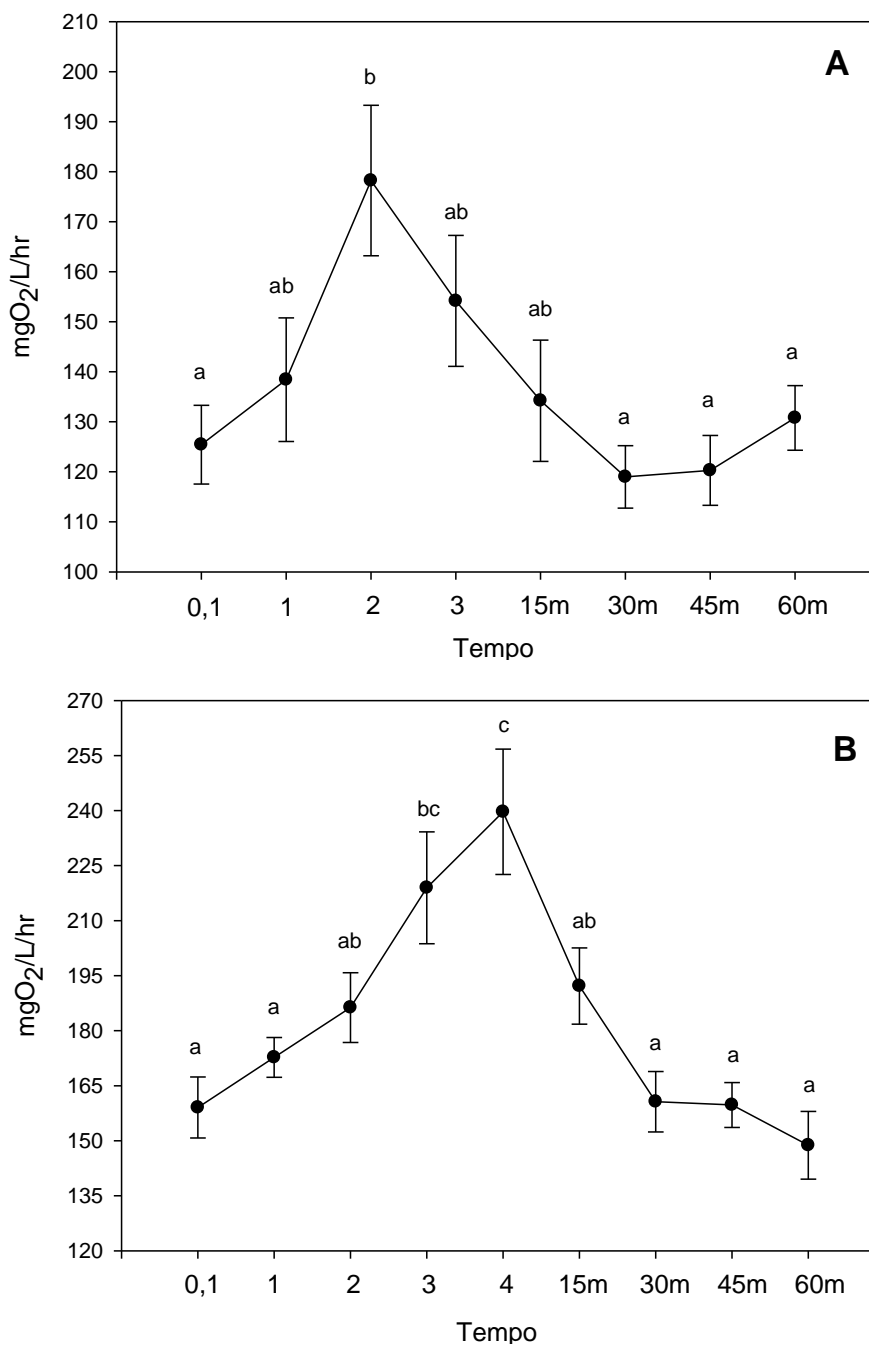


Figura 3. Consumo de oxigênio de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos por 30 minutos a cada intervalo de 1 comprimento de corpo por segundo, até a velocidade submáxima para a fadiga da espécie, baseado em teste preliminar de Ucrit (Velocidade crítica de natação). Para cada um dos intervalos foram usados peixes diferentes, que passaram pelos estágios inferiores até atingir o estágio alvo. A recuperação se refere aos tempos de 15, 30, 45 e 60 minutos em 0,1 cc/s, após os peixes passarem por todas as velocidades. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos por meio de ANOVA *one-way* e teste *a posteriori* de SNK. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

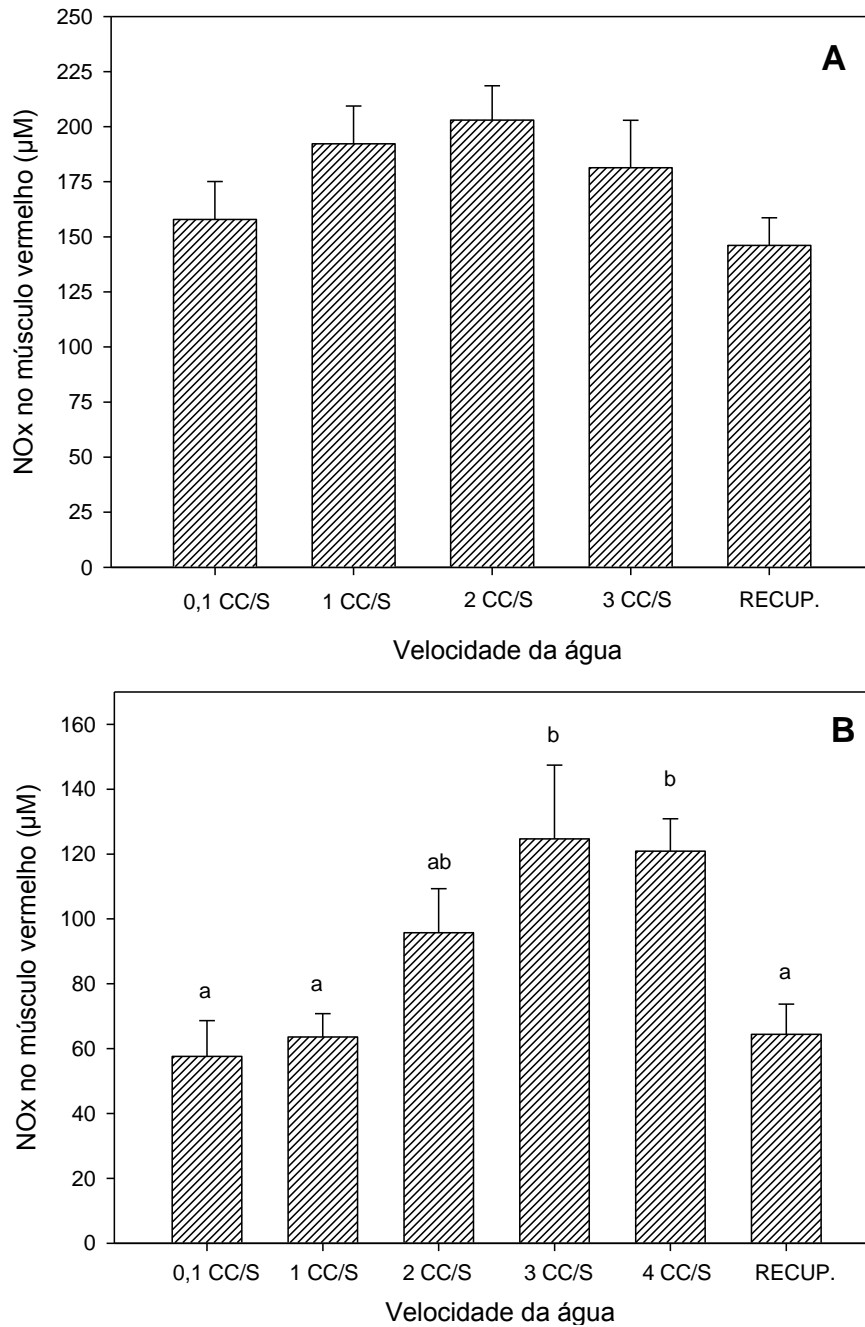


Figura 4. Nitritos e nitratos (NOx) no músculo vermelho de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos por 30 minutos a cada intervalo de 1 comprimento de corpo por segundo, até a velocidade submáxima para a fadiga da espécie, baseado em teste preliminar de Ucrit (Velocidade crítica de natação). Para cada um dos intervalos foram usados peixes diferentes, que passaram pelos estágios inferiores até atingir o estágio alvo. A recuperação se refere aos tempos de 15, 30 45 e 60 minutos em 0,1 cc/s, após os peixes passarem por todas as velocidades. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos por meio de ANOVA *one-way* e teste *a posteriori* de SNK. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

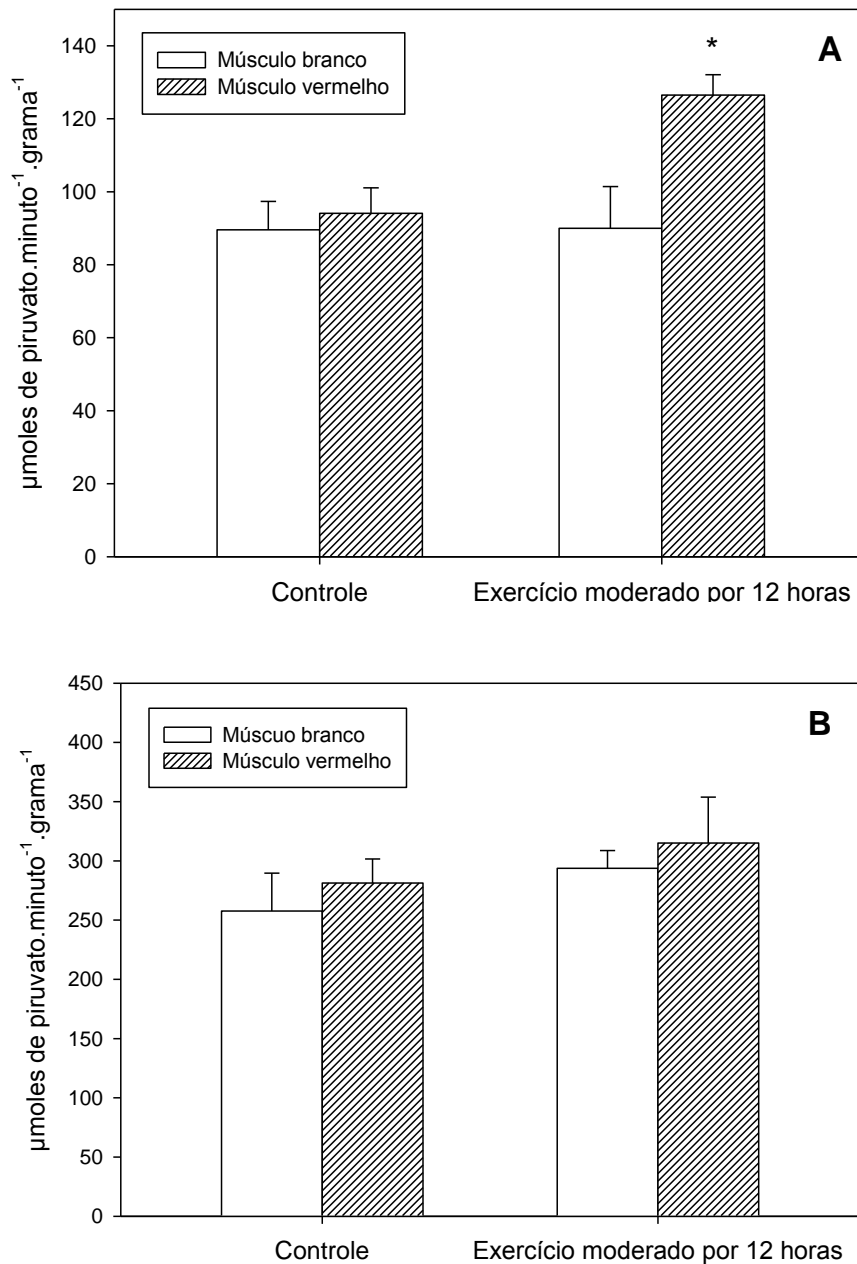


Figura 5. Atividade da Lactato Desidrogenase (LDH) de exemplares de tambaqui (A) e matrinhã (B) submetidos ao exercício moderado (30cm/s por 12 horas) e de animais mantidos em repouso dentro do túnel de natação. Asterisco (*) indica diferença ($p < 0,05$) entre controle e tratamento para um mesmo tipo de músculo, usando teste *t*. Dados mostrados como média e erro padrão da média ($n=6$).

Assim como ocorreu com o exercício até a fadiga, o exercício prolongado também não exerceu qualquer influência sobre a HOAD, em ambos os músculos, em tambaqui (Tabela III) e matrinchã (Tabela IV). Neste experimento também observamos as mesmas tendências do experimento com peixes fadigados, ou seja, a atividade desta enzima é cerca de 5 a 10 vezes maior em músculo vermelho do que em músculo branco, em ambas as espécies, e cerca de 4 a 5 vezes maior em matrinchã do que em tambaqui, em ambos os músculos.

A CS não sofreu qualquer alteração devido ao exercício prolongado, em ambos os músculos, em tambaqui e em matrinchã. Mais uma vez observamos que esta enzima possui uma atividade cerca de 5 a 10 vezes maior no músculo vermelho do que no branco, em ambas as espécies e, comparando as espécies, a atividade da enzima é muito similar em ambas.

O NOx não aumenta devido ao exercício prolongado em ambos os músculos e espécies. Além disso, os valores médios são muito similares entre o músculo branco e o vermelho, entre os tratamentos e entre as espécies.

Não houve alterações nos níveis de lactato em ambos os músculos e espécies devido ao exercício prolongado. Os níveis desse metabólito são muito similares entre os dois tipos de músculo, mas em matrinchã os níveis de lactato são maiores, chegando a quase dobrar.

Tabela III. Atividade das enzimas hidroxiacil Co-A desidrogenase (HOAD) e citrato sintase (CS), Lactato (LAC) e nitritos e nitratos (NOx) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de tambaqui. (C) controle. (E) exercitados moderadamente (30 cm/s) por 12 horas.

		MB	MV
HOAD	C	0,32±0,04	1,63±0,21
	E	0,21±0,02	1,72±0,20
CS	C	1,33±0,22	17,13±1,92
	E	1,52±0,28	12,76±1,30
NOx	C	99,06±19,4	117,51±19,70
	E	95,66±15,15	129,08±9,21
LAC	C	137,36±15,81	126,90±21,10
	E	114,90±16,57	133,20±15,37

HOAD ($\mu\text{moles de AcetoacetylCoA} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), CS ($\mu\text{moles de oxaloacetato} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), LDH ($\mu\text{moles de piruvato} \cdot \text{minuto}^{-1} \cdot \text{grama}^{-1}$), lactato (mg de lactato.100 gramas de tecido fresco⁻¹). Valores expressos como média e erro padrão da média, n=6. Análise a partir de teste *t* não identificou diferença significativa para o mesmo tipo de músculo ($P < 0,05$).

Tabela IV. Concentração de nitritos e nitratos (NOx) e atividade das enzimas hidroxiacil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), lactato desidrogenase (LDH) e lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de matrinchã exercitado moderadamente e de forma prolongada (30 cm/s) por 12 horas (E) ou controles (C).

		MB	MV
HOAD	C	1,40±0,25	6,79±0,29
	E	1,93±0,13	6,17±0,18
CS	C	1,97±0,30	9,56±0,44
	E	1,91±0,06	10,46±0,57
NOx	C	128,3±19,8	107,2±13,62
	E	119,2±9,21	102,2±19,29
LAC	C	227,5±19,86	268,0±19,26
	E	222,0±4,56	215,1±27,17

NOx (μM), HOAD ($\mu\text{moles de acetoacetyl Co A.minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$), CS ($\mu\text{moles de Ac. oxalacético.minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$), LDH ($\mu\text{moles de piruvato.minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$), lactato (mg de lactato.100 gramas de tecido fresco⁻¹). Valores expressos como média e erro padrão da média, n=6. Análise a partir de teste *t* não identificou diferença significativa para o mesmo tipo de músculo ($P<0,05$).

No experimento de hipóxia severa, no qual os animais são impedidos de subirem à superfície da água para respirarem, causa aumento a atividade da enzima LDH no músculo branco e sua diminuição no músculo vermelho de tambaqui (Tabela V). O lactato aumenta apenas no músculo branco. Em matrinchã (Tabela VI) não há qualquer efeito da hipóxia sobre a atividade da LDH, mas assim como em tambaqui, o lactato também aumenta no músculo branco. Os valores da atividade da LDH dos músculos vermelhos e brancos na mesma espécie são muito similares, porém em matrinchã, esta enzima chega a ser cerca de dez vezes mais ativa, independente do tratamento.

A HOAD não se altera devido hipóxia severa, em ambas as espécies e músculos. Esta enzima chega a ser mais de 10 vezes mais ativa no músculo vermelho do que no músculo branco e, também, cerca de 10 vezes mais ativa em matrinchã do que em tambaqui, em ambos os músculos.

A CS não sofre qualquer alteração devido à hipóxia severa, em ambas as espécies. Chega a ser de 10 a 20 vezes mais ativa no músculo vermelho do que no músculo branco, porém, com valores similares entre as espécies.

O NOx não aumenta devido a hipóxia severa, em ambas as espécies. É cerca de 70% maior no músculo vermelho que no músculo branco e similar entre as espécies, em ambos os músculos. Os níveis de lactato aumentam no músculo branco de ambas as espécies após hipóxia severa. Em geral, ambos os tipos de músculo apresentam níveis similares de lactato em repouso, mas os níveis de lactato chegam a ser mais que 50% maior em matrinchã em relação ao tambaqui.

Os experimentos de exposição à hipóxia por 6, 12 e 24 horas com acesso à superfície foram realizados apenas com o tambaqui, porque o matrinchã não foi capaz de suportar este tratamento, morrendo antes do tempo. Neste tipo de experimento, de hipóxia menos severa e mais prolongada, não foi verificado aumento da atividade da LDH em nenhum período de tempo em nenhum tipo de músculo do tambaqui (Tabela V). Também não pode ser verificado qualquer aumento na atividade da HOAD, da CS, do NOx e do lactato (Tabela V).

Tabela V. Concentração de nitritos e nitratos (NOx) e atividade das enzimas hidroxilacil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), Lactato Desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de tambaqui. (T) grupos tratados ou (C) controles referindo-se à 6, 12 ou 24 horas de exposição à hipóxia ($\pm 0,5$ mg/L) com acesso à superfície da água (HCAS) e 1 hora de hipóxia sem acesso à superfície da água (HSAS).

		6h HCAS		12h HCAS		24h HCAS		1h HSAS	
		MB	MV	MB	MV	MB	MV	MB	MV
LDH	C	86,64 $\pm 9,24$	89,84 $\pm 9,92$	82,2 $\pm 7,24$	88,64 $\pm 12,2$	113,2 $\pm 9,28$	105,1 $\pm 17,6$	110,96 $\pm 8,12$	102,84 $\pm 9,48$
	T	110,0 $\pm 11,0$	79,96 $\pm 7,24$	91,04 $\pm 6,88$	88,36 $\pm 9,48$	101,1 $\pm 6,3$	115,7 $\pm 21,2$	149,3 $\pm 9,92^*$	63,76 $\pm 5,08^*$
HOAD	C	0,25 $\pm 0,04$	1,37 $\pm 0,09$	0,25 $\pm 0,02$	1,20 $\pm 0,10$	0,20 $\pm 0,03$	1,18 $\pm 0,13$	0,19 $\pm 0,03$	1,89 $\pm 0,14$
	T	0,17 $\pm 0,03$	1,20 $\pm 0,13$	0,21 $\pm 0,01$	1,48 $\pm 0,15$	0,18 $\pm 0,03$	1,33 $\pm 0,16$	0,14 $\pm 0,02$	1,77 $\pm 0,22$
CS	C	0,68 $\pm 0,06$	9,82 $\pm 1,00$	0,56 $\pm 0,09$	7,82 $\pm 1,35$	0,76 $\pm 0,05$	10,32 $\pm 1,39$	0,84 $\pm 0,08$	14,76 $\pm 1,94$
	T	0,86 $\pm 0,04$	11,73 $\pm 0,82$	0,65 $\pm 0,06$	8,88 $\pm 1,68$	0,82 $\pm 0,07$	12,28 $\pm 0,89$	0,66 $\pm 0,10$	14,87 $\pm 1,52$
NOX	C	164,9 $\pm 16,4$	208,8 $\pm 15,8$	99,3 $\pm 9,9$	147,2 $\pm 11,0$	119,5 $\pm 15,7$	146,8 $\pm 39,8$	82,23 $\pm 7,44$	116,73 $\pm 8,58$
	T	153,9 $\pm 15,0$	175,2 $\pm 17,7$	122,3 $\pm 22,1$	170,3 $\pm 30,1$	158,4 $\pm 12,5$	193,4 $\pm 47,3$	84,12 $\pm 8,52$	123,18 $\pm 5,88$
LAC	C	211,7 $\pm 14,7$	138,5 $\pm 13,1$	263,1 $\pm 37,3$	173,9 $\pm 19,9$	222,5 $\pm 29,5$	152,0 $\pm 29,6$	209,40 $\pm 41,74$	166,27 $\pm 20,69$
	T	229,9 $\pm 13,9$	154,5 $\pm 15,4$	224,9 $\pm 17,0$	179,6 $\pm 15,4$	230,6 $\pm 34,0$	150,7 $\pm 22,5$	407,18 $\pm 25,13^*$	182,70 $\pm 24,78$

NOx (μM), HOAD ($\mu\text{moles de Acetoacetyl Co A. minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$), CS ($\mu\text{moles de Ac. Oxalacético. minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$), LDH ($\mu\text{moles de piruvato. minuto}^{-1}.\text{grama}^{-1}$), lactato (mg de lactato.100 gramas de tecido fresco $^{-1}$). Valores expressos como média e erro padrão da média, n=6. Asterisco (*) indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle, usando teste *t*.

Tabela VI. Concentração de nitritos e nitratos (NOx) e atividade das enzimas hidroxilacil Co-A desidrogenase (HOAD), citrato sintase (CS), Lactato Desidrogenase (LDH) e Lactato (LAC) nos músculos branco (MB) e vermelho (MV) de matrinhã, referentes a grupos submetidos à hipóxia de $\pm 0,5$ mg/L por 1 hora sem acesso à superfície da água (HSAS) ou controles (C).

		MB	MV
LDH	C	275,4 \pm 12,42	323,2 \pm 18,56
	HSAS	247,9 \pm 19,27	270,0 \pm 21,06
HOAD	C	0,94 \pm 0,17	14,62 \pm 1,12
	HSAS	0,82 \pm 0,14	16,87 \pm 2,82
CS	C	1,33 \pm 0,20	7,15 \pm 0,33
	HSAS	1,08 \pm 0,19	7,4 \pm 0,41
NOx	C	72,7 \pm 9,80	122,7 \pm 13,4
	HSAS	87,8 \pm 10,6	164,3 \pm 26,8
LAC	C	257,7 \pm 42,8	299,2 \pm 9,1
	HSAS	339,0 \pm 29,2 *	273,0 \pm 28,1

NOx (μ M), HOAD (μ moles de Acetoacetyl Co A.minuto⁻¹.grama⁻¹), CS (μ moles de Ac. Oxalacético.minuto⁻¹.grama⁻¹), LDH (μ moles de piruvato.minuto⁻¹.grama⁻¹), lactato (mg de lactato.100 gramas de tecido fresco⁻¹). Valores expressos como média e erro padrão da média, n=6. Asterisco (*) indica diferença ($p < 0,05$) em relação ao controle, usando teste *t*.

4. Discussão

4.1. NO_x

A principal função do óxido nítrico no epitélio vascular é a vasodilatação, visando o aumento da taxa de entrega de oxigênio nos órgãos (Moncada *et al.* 1991; Dusse *et al.* 2003). O estímulo para a sua produção é o atrito que o sangue gera no epitélio dos vasos sanguíneos, quando este circula de maneira vigorosa durante o exercício intenso (Niebauer e Cooke 1996). Outra situação que pode gerar óxido nítrico, é a hipóxia. Neste caso ele é gerado a partir da redução das reservas de nitritos e nitratos do plasma e dos músculos, em um processo catalisado pela hemoglobina desoxigenada (desoxihemoglobina) e que não requer arginina nem oxigênio (Kroupova *et al.* 2005; Jensen 2007; Hansen e Jensen 2010). Embora bem investigado principalmente em mamíferos nos últimos 25 anos (Green *et al.* 2004; Moncada e Higgs 2006), o papel do óxido nítrico *in vivo* em peixes recebeu pouca atenção e não sabemos se é capaz de gerar vasodilatação nesses animais (Eddy 2005). Na figura 1 vemos que o óxido nítrico está presente no músculo branco, em ambas as espécies aqui estudadas, mas responde à fadiga apenas no músculo vermelho, com maior intensidade no matrinchã. Em humanos, o treinamento em esteira ergométrica por 30 minutos diariamente durante 4 semanas causou um aumento de 96% na atividade da enzima sintase do óxido nítrico no endotélio das artérias coronarianas (Hambrecht *et al.* 2003). Outro trabalho aponta que em humanos a vasodilatação ocorre somente a partir de 50% da capacidade aeróbica máxima quando submetidos à bicicleta ergométrica (Goto *et al.* 2003). Outro estudo com pessoas submetidas ao exercício em bicicleta ergométrica, por 20 minutos à intensidades entre 40 e 79% do VO₂max, mostrou aumento da fosforilação da enzima Sintase do Óxido Nítrico (NOS) apenas no esforço máximo (Chen *et al.* 2003). Em ratos, 45 minutos de exercício incremental até a fadiga aumenta em 37% a atividade da NOS no músculo gastrocnêmio (Roberts *et al.* 1999). Uma importante diferença dos peixes para os demais grupos estudados é seu sistema muscular composto por dois tipos bem distintos de fibras musculares, os quais executam trabalhos diferentes e agem de forma distinta em cada tipo de exercício. Apesar do aumento do óxido nítrico ter ocorrido apenas no músculo vermelho, sabemos que o teste de velocidade incremental até a fadiga exercita os dois tipos de

músculos; a princípio, apenas o músculo vermelho responde, sendo que a participação do músculo branco passa a ocorrer próxima à sua velocidade de fadiga (Hammer 1995; Burgetz *et al.* 1998; Richards *et al.* 2002; Peake e Farrell 2004). Ocorre que em matrinchã e tambaqui, a concentração de nitritos e nitratos no músculo branco não aumenta devido ao exercício intenso até a fadiga porque neste local o sistema vascular é reduzido; em tese, não há um incremento suficiente de fluxo sanguíneo para que ocorra atrito e produção de óxido nítrico. Este tipo de músculo é conhecido por ser anaeróbico, com pouca mioglobina, e um aumento expressivo da oferta de oxigênio seria injustificável. No entanto, nos músculos vermelhos, o óxido nítrico é essencial à medida que aumenta a perfusão sanguínea durante o exercício, levando mais oxigênio até a mioglobina presente em grande quantidade nessa região. No presente experimento pudemos confirmar o melhor desempenho natatório do matrinchã, visto que sua Ucrit foi de $6,30 \pm 0,83$ cc/s (comprimentos de corpo por segundo), contra $4,60 \pm 0,32$ cc/s do tambaqui, porém essa diferença na Ucrit não pode ser explicada apenas pelos níveis de óxido nítrico no momento da fadiga, já que esse gás apresentou-se elevado nos músculos vermelhos de ambas as espécies.

Embora o óxido nítrico se apresente elevado no músculo vermelho de ambas as espécies após a fadiga, as respostas deste gás aos incrementos de velocidade são diferentes entre elas. A elevação não pode ser vista nas etapas intermediárias do teste em tambaqui, diferentemente do que ocorre em matrinchã, que exhibe incrementos do gás a partir de 2 cc/s, permanecendo em níveis elevados até a fadiga. Como verificamos, o óxido nítrico aumenta em ambas as espécies na fadiga, porém em tambaqui, esses níveis não se elevam mesmo nas velocidades muito próximas à fadiga. Tudo indica que a função deste gás nestas espécies esteja relacionada ao processo de recuperação muscular. No matrinchã, uma vez que a síntese de óxido nítrico se antecipa e sua concentração se eleva já nas fases iniciais do teste, é possível que este gás ajude no desempenho e no retardo da fadiga.

Em ambas as espécies, após uma hora de recuperação do exercício incremental, os níveis de óxido nítrico no músculo vermelho são iguais ao do controle. Seja qual for o papel do óxido nítrico nos músculos vermelhos, ele tem

uma atuação e um desaparecimento rápidos, visto que após 1 hora seus níveis já diminuem.

No exercício moderado e sustentado por 12 horas não há aumento do óxido nítrico em nenhum tipo de músculo, em ambas as espécies. Como visto em tambaqui, o óxido nítrico se eleva no momento da fadiga, mas não ocorre em nenhum momento antes disso. Em matrinhã, por mais que o óxido nítrico apresente uma resposta rápida e antecipada à fadiga, a resposta deste gás parece estar mais relacionada com a intensidade do que com a duração do esforço. Possivelmente a velocidade utilizada no teste de exercício prolongado, de 30 cm/s, não é suficiente para causar déficit de oxigênio nos músculos, o que seria um dos fatores capazes de gerar o óxido nítrico. O outro fator, o atrito do sangue nos vasos, também não parece ter sido alcançado por esse tipo de exercício. Os trabalhos previamente citados, que demonstram os efeitos do exercício prolongado sobre o óxido nítrico, foram conduzidos com exercícios repetitivos ao longo de dias e, portanto, podem ser considerados como treinamento. No treinamento, outros processos adaptativos, que não o atrito do sangue ou a hipóxia, podem estar envolvidos no aumento do óxido nítrico muscular.

Também não houve alteração do óxido nítrico em função da hipóxia, em ambas as espécies. Embora o exercício intenso até a fadiga e a hipóxia sejam similares, no que tange ao aumento do metabolismo anaeróbico, apenas no exercício há a possibilidade das sintases do óxido nítrico produzirem o gás a partir da arginina, pois há oxigênio disponível. Conforme mencionado, a produção de óxido nítrico em peixes sob hipóxia ocorreria a partir da reconversão das reservas de nitritos e nitratos, e não da arginina (Kroupova *et al.* 2005; Jensen 2007; Hansen e Jensen 2010). A hemoglobina desoxigenada, chamada de desoxihemoglobina, é a responsável por reduzir, de forma alostérica, o nitrito ao óxido nítrico. Esse processo pode ocorrer tanto na hemoglobina do sangue quanto na mioglobina nos músculos (Shiva 2013). O coração humano, por exemplo, possui a capacidade de acumular reservas de óxido nítrico na forma de compostos nitrogenados, aumentando a capacidade do tecido em reagir à eventos de hipóxia (Manukhina *et al.* 2000).

Em um trabalho com o peixe dourado (*Carassius auratus*), a exposição do peixe à hipóxia (30 mgHg) por 2 dias gerou uma queda nos níveis de nitritos no plasma, porém no músculo branco eles permaneceram constantes. Os autores sugerem que houve a migração dos nitritos em direção ao músculo na tentativa de dilatar os vasos sanguíneos e melhorar a oxigenação (Hansen e Jensen 2010). Ao contrário, em um trabalho com a truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*), a exposição à hipóxia (44,92 mgHg) por 30 minutos causou aumento dos níveis plasmáticos de nitritos e nitratos (NOx). Estes mesmos animais foram submetidos a esta condição duas vezes ao dia, por quatro dias, e amostras coletadas após cada exposição mostraram níveis elevados de NOx, aumentando ao longo do tempo. Ainda, no último dia, análise dos genes das sintases do óxido nítrico endotelial e neuronal na parede do vaso sanguíneo caudal, mostrou aumento da expressão destas duas enzimas (McNeill e Perry 2006). Isso indica que, durante hipóxia intermitente, além da reconversão de nitritos e nitratos em óxido nítrico, há aumento da atividade das sintases do óxido nítrico para aumentar suas reservas a partir da arginina, assim que o oxigênio esteja disponível.

Os resultados indicam que apesar do óxido nítrico estar presente nos músculos brancos, sua relação com o exercício ocorre apenas na musculatura vermelha, onde atua para melhorar a circulação sanguínea. Em tambaqui a resposta do óxido nítrico é mais lenta e está relacionada com o período de fadiga e pós exercício, onde deve atuar na recuperação muscular. Em matrinhã sua atuação é rápida, antecipando-se à fadiga para retardá-la. O estímulo para a liberação de óxido nítrico nos músculos vermelhos não está relacionado ao déficit de oxigênio que ocorre no exercício intenso, visto que a hipóxia isolada não gera aumento deste gás, e nem devido ao exercício moderado e sustentado. Tudo indica que o estímulo para a liberação de óxido nítrico em tambaqui e matrinhã é o aumento do atrito do sangue sobre o epitélio vascular, à medida que a intensidade do exercício aumenta.

4.2. A *hydroxyacyl CoA desidrogenase* (HOAD)

Não pudemos observar aumento da HOAD em função do exercício até a fadiga, em ambas as espécies, tanto no músculo vermelho quanto no músculo branco. O exercício sustentado também não causou aumento da atividade da HOAD, em nenhuma espécie ou músculo. A HOAD é a enzima chave na obtenção de energia aeróbica a partir da oxidação dos ácidos graxos livres (Driedzic e Hochachka 1979; McClelland 2004). A distribuição das reservas de lipídeos varia bastante mesmo entre os vertebrados, mas em peixes estão concentradas principalmente no mesentério, no fígado e nos músculos vermelhos (Sheridan 1994). Sabe-se, por exemplo, que a beta oxidação aumenta com a biogênese de mitocôndrias, em um processo que pode ser desencadeado por vários fatores, entre eles dietas ricas em gorduras e níveis de hormônios adrenérgicos (Jobgen *et al.* 2006). Estudos em peixes indicam o forte efeito do cortisol na ativação das lipases para quebrarem lipídeos em ácidos graxos, tornando-os livres na circulação (Müller e Van Leeuwen 2006). Sabemos que muitas espécies se baseiam fortemente nos ácidos graxos para suprir a demanda energética durante o exercício submáximo (Kieffer *et al.* 1998), justamente quando observarmos grandes aumentos do cortisol no plasma de peixes (Mommsen *et al.* 1999). A relação entre o cortisol e a elevação dos ácidos graxos parece variar muito entre espécies, assim como com a atividade da HOAD, que aumenta em *sea haven* e *char*, mas não em tilápia e *toadfish* (Müller e Van Leeuwen 2006). Em um experimento com ratos, a atividade da HOAD no músculo gastrocnêmio não aumentou após 40 minutos de exercício à um VO_2 Max de 70%. Em um trabalho com salmão, a atividade da HOAD não aumentou devido ao exercício contínuo por 1, 2 ou 4 semanas, seja no músculo branco ou vermelho. *Zebra fish* exercitados por 4 semanas, iniciando-se com a velocidade de 2 cc/s na primeira semana e terminando com a velocidade de 6 cc/s na última semana, não apresentou qualquer aumento da atividade da HOAD no músculo branco (Palstra *et al.* 2014). Mesmo que a oxidação de ácidos graxos possa aumentar durante o exercício, possivelmente pela atuação de hormônios sobre as lipases, o aumento da atividade da HOAD parece estar mais relacionado a outras circunstâncias. Um estudo com ratos demonstrou que a atividade da HOAD está diretamente relacionada à concentração lipídica da dieta

(Turner *et al.* 2007). No teleósteo *Sparus aurata*, exposição à baixas temperaturas por 10 dias resultou no aumento da atividade da HOAD no músculo vermelho, mas não no músculo branco (Kyprianou *et al.* 2010).

A HOAD também não responde à hipóxia em tambaqui ou matrinhã. Uma vez que a beta oxidação é um processo aeróbico, poderia pensar-se que a hipóxia diminuiria a atividade da HOAD, assim como visto em *zebrafish* expostos por 2 horas à 1,9 Kpa de pressão parcial de oxigênio, que apresentaram diminuição da atividade da HOAD nos músculos brancos (Chen *et al.* 2013). No entanto, o mesmo não ocorreu em matrinhã após 1 hora sem acesso à superfície e tambaqui após uma hora sem acesso ou 6, 12 ou 24 horas de hipóxia com acesso à superfície. Segundo Driedzic e Almeida-Val (1996) e West *et al.* (1999), as espécies de peixes amazônicas, geralmente, possuem baixa dependência do metabolismo aeróbico de ácidos graxos na produção de ATP e alta dependência do metabolismo anaeróbico no coração. Mais estudos precisam ser realizados para se saber se o mesmo ocorre nos músculos esqueléticos branco e vermelho das espécies amazônicas, mas os dados do presente trabalho sugerem que a HOAD muscular de tambaqui e matrinhã não aumenta rapidamente para adaptar-se às condições agudas. Talvez, assim como ocorre com outras espécies, a HOAD de tambaqui e matrinhã apenas altera sua atividade sob condições crônicas, como por exemplo, alterações persistentes na dieta, mudanças sazonais na temperatura, estágio de desenvolvimento, entre outros.

4.3. Citrato Sintase

A citrato sintase é uma enzima chave na produção de energia aeróbica em peixes, pois controla a entrada de acetyl-CoA no ciclo de Krebs, tendo função similar à dos mamíferos (Walton e Cowey 1982). Em peixes, sua atividade varia de 1 unidade (μmol de substrato convertido por g de tecido por minuto) à 10 unidades em atum (revisto por Val e Almeida-Val 1995). Aumento da atividade desta enzima no músculo vermelho foi verificada em carpa comum exercitada por 6 horas diárias, durante 4 semanas à velocidade de 60% da Ucrit, mas no músculo branco não houve alteração (He *et al.* 2013). Truta arco-iris treinada

entre 1 e 4 semanas em velocidade constante de 1,5 comprimento de corpo por segundo só apresentou aumento da atividade da citrato sintase no músculo vermelho, e na última semana (Morash *et al.* 2014). *Zebrafish* exercitado por 4 semanas, com velocidade incremental de 2 a 6 cc/s apresentou aumento da citrato sintase no músculo branco na quarta semana (Palstra *et al.* 2014). Em humanos, 75 minutos de exercício exaustivo na bicicleta (75% do Vo₂Max) já induz aumento da citrato sintase no músculo da coxa (Tonkonogi *et al.* 1997). Enquanto é aceito que um exercício simples pode aumentar a atividade da citrato sintase em músculos humanos, os resultados para esse tipo de exercício são conflitantes em ratos (Siu *et al.* 2003). Os efeitos de um exercício simples sobre a atividade da citrato sintase nos músculos de peixes não são conhecidos.

Além do treinamento, outros fatores podem alterar a atividade desta enzima, como por exemplo, a dieta rica a em lipídeos que aumenta a atividade da HOAD no músculo gastrocnêmico em ratos (Turner *et al.* 2007). Enquanto durante o exercício a oxigenação nos músculos é aumentada, durante hipóxia a atividade da citrato sintase, por ser a enzima central do ciclo de Krebs, poderia ser comprometida. Não é o que vemos no peixe estuarino *Leiostomus xanthurus*, que não apresentou qualquer alteração da citrato sintase no músculo branco após 12 horas de exposição aos níveis de oxigênio de 0,8 à 4 mg/L (Cooper *et al.* 2002). Carpa comum não diminui a atividade da citrato sintase no músculo branco após 6 horas de hipóxia de 0,5 mg/L, mas a atividade desta enzima diminui quando a exposição atinge 24 horas (Zhou *et al.* 2000). Sabe-se que a atividade da citrato sintase é um bom marcador para o conteúdo das mitocôndrias, porque ela se correlaciona com as medidas da sua morfologia (Reichmann *et al.* 1985). Isso implica que a atividade desta enzima é estável, não variando devido à efeitos agudos, até que um processo mais amplo, como por exemplo, a biogênese de mitocôndrias, ocorra (Jornayvaz e Shulman 2010). Não sabemos como a citrato sintase age em eventos de hipóxia aguda em outros peixes, mas nos experimentos de hipóxia por até 24 horas, no presente estudo, não foram capazes de alterar a atividade da citrato sintase nos músculos de tambaqui e matrinchã, indicando que nestas espécies esta enzima também se altera em resposta à eventos crônicos.

4.4. LDH e lactato

A lactato desidrogenase (LDH) é responsável pela geração de energia a partir do piruvato, quando não há oxigênio suficiente para que a geração de ATP ocorra por intermédio da cadeia oxidativa. Como resultado desta reação anaeróbica, há o acúmulo de lactato. A LDH também é capaz de reverter o lactato à piruvato, quando o oxigênio volta a ser disponível (Hochachka e Somero 1984; Wieser *et al.* 1987; Almeida-Val *et al.* 2011). Diferenças nas propriedades da atividade enzimática da LDH podem ser devidas às diferentes maneiras com que o lactato é manipulado pelos dois principais tipos de músculo. Os músculos brancos são os principais produtores de lactato, e nos músculos vermelhos e fígado ocorrem a maior parte da reconversão do lactato a piruvato de forma aeróbica (Wieser *et al.* 1987; Moyes e West 1995). Como principal estratégia para lidar com a hipóxia, peixes amazônicos frequentemente lançam mão de supressão do metabolismo oxidativo ou aumentam a dependência do metabolismo glicolítico anaeróbico (Almeida-Val e Hochachka 1993). No presente experimento, o exercício até a fadiga não causou alteração na atividade da LDH em nenhum dos dois tipos de músculo, embora se tenha observado aumento da concentração de lactato na musculatura branca. Apesar das divergências quanto ao aumento da atividade da LDH nos músculos após o exercício em geral, é consenso que causa acúmulo de lactato no músculo branco, que em seguida, extravasa para o plasma (Milligan e Girard 1993; Moyes e West 1995; Gladden 2004). O lactato é continuamente produzido por glicólise, mesmo em condições de contrações musculares leves, e seria continuamente consumido por células adjacentes ou, no processo circulatório, seria oxidado ou reconvertido e acumulado como glicogênio nos músculos vermelhos (Milligan e Girard 1993; Gladden 2004). Desta forma, o aumento do lactato se daria pelo desequilíbrio entre a sua geração e a capacidade de oxidá-lo, e durante o exercício intenso, vários processos estariam atuando para dificultar sua oxidação e causar o acúmulo, entre eles a vasoconstrição nos músculos consumidores, não ligados ao exercício, e a dificuldade das células de realizar glicólise intensamente e oxidar lactato ao mesmo tempo (Gladden 2004). Uma vez que no presente experimento o lactato acumulou-se nos músculos brancos sem

aumento da LDH, corroboramos a hipótese de que o acúmulo deste ácido se deveu em grande parte pela dificuldade dos músculos vermelhos em oxidá-lo.

Nas etapas intermediárias do teste, o tambaqui tem, de forma repentina, os níveis de lactato aumentados no músculo branco, que cai novamente na última velocidade testada. No matrinchã, a elevação ocorre de forma gradual, e sequer atingiu um platô nas etapas finais. Carpas exercitadas 6 horas por dia, durante 4 semanas à velocidade de 60% da Ucrit, não apresentaram aumento da atividade da LDH no músculo branco ou vermelho (He *et al.* 2013). Truta *brook* exercitada por 3 semanas à velocidade de 3 comprimentos de corpo por segundo não apresentou qualquer diferença na LDH no músculo vermelho ou branco (Johnston 1982). Ao contrário, *zebrafish* exercitados por 4 semanas em velocidades de 2 a 6 cc/s, apresentou aumento da atividade da LDH no músculo branco (Palstra *et al.* 2014). Não há na literatura informações sobre o efeito de uma única rodada de exercício sobre a atividade da LDH nos músculos de peixes. No presente experimento, o acúmulo de lactato seguiu o mesmo padrão do consumo de oxigênio. Em tambaqui houve aumento repentino destes parâmetros em 2 cc/s e queda em seguida, e em matrinchã um aumento gradual desde o início do exercício, sem atingir um platô no final. No presente estudo também identificamos que o ápice do acúmulo de lactato ocorreu próximo à fadiga, assim como identificado por outros trabalhos (Hammer 1995; Burgetz *et al.* 1998; Richards *et al.* 2002; Peake e Farrell 2004). Gladden (2004) propõe, ao fazer uma revisão sobre o assunto, que a incapacidade do músculo em continuar a contração quando o lactato se acumula não seria somente devido à consequente queda no pH intramuscular, podendo outros fatores desconhecidos estarem envolvidos. Em tambaqui, na última velocidade testada (4 cc/s), os níveis de lactato caem; porém, os animais permanecem nadando. Ocorre que os animais se utilizam, nesta velocidade, de um comportamento natatório que diminui seu esforço, ao permanecer encostado nas laterais do túnel de natação. Com menos esforço, menos oxigênio foi consumido, e os níveis de lactato rapidamente caíram. O fato deles continuarem nadando, pelo menos parcialmente, pode ter ajudado no desaparecimento rápido do lactato, já que juntamente com a queda da sua produção nos músculos brancos, havia o consumo pelos músculos vermelhos fortemente ativos.

Em ambas as espécies observamos que o consumo de oxigênio permaneceu acima dos níveis do controle apenas até 15 minutos de recuperação, quando provavelmente ainda havia bastante lactato acumulado. É bem conhecido em algumas espécies de peixes que o exercício intenso pode causar débito de oxigênio, que é quando o metabolismo anaeróbico entra em atividade, gerando lactato e, mesmo após cessado o exercício, o consumo de oxigênio permanece elevado por algum período até que todo o lactato seja oxidado (Hochachka 1961; Lewis *et al.* 2007). O fato deste fenômeno ter ocorrido por apenas cerca de 15 minutos em tambaqui e matrinhã, indica a habilidade da LDH destas espécies em reconverter o lactato à piruvato quando ele é gerado pelo exercício, e/ou dos músculos vermelhos em consumi-lo. Também não podemos deixar de notar que os níveis de lactato na primeira velocidade são menores que nos animais do controle, para ambas as espécies. Uma hipótese para explicar essa situação é que neste momento a geração de lactato pelos músculos ainda era muito baixa e a circulação sanguínea e a taxa de ventilação aumentada favoreceriam a oxidação do lactato pelos músculos vermelhos.

O exercício prolongado por 12 horas causou aumento da LDH no músculo vermelho de tambaqui, mas não causou nenhum efeito no músculo branco, e também não causou qualquer alteração em ambos os músculos de matrinhã. Não observamos qualquer aumento do lactato neste experimento. Independente do tipo de exercício aplicado, não há aumento da LDH no músculo branco de tambaqui ou matrinhã, indicando que não há um ajuste rápido na atividade desta enzima para aumentar a oferta de energia aos músculos. Informações sobre como a LDH reage em função do exercício em outras espécies só estão disponíveis com relação ao efeito do treinamento e, mesmo assim, são contraditórias. No caso das espécies aqui analisadas, o exercício prolongado deve ter continuamente gerado lactato nos músculos brancos e vermelhos e essa produção constante exigiu que o músculo vermelho melhorasse a sua capacidade oxidativa de lactato, aumentando a atividade da enzima LDH. Desta forma, mesmo com um longo período de 12 horas de produção moderada de lactato, não houve acúmulo. O fato de não observarmos qualquer aumento da atividade da LDH em matrinhã pode estar relacionado com seus níveis normalmente mais elevados desta enzima, em relação ao tambaqui. Sendo até

duas vezes mais ativa, em ambos os músculos, qualquer aumento adicional na sua atividade somente seria justificado por uma situação crítica, provavelmente de longo prazo. Essa maior atividade basal da LDH em matrinchã deve estar relacionada com seus maiores níveis basais de lactato. Isso sugere que esta espécie se baseia muito mais no metabolismo glicolítico anaeróbico do que o tambaqui e, por isso, teria uma maior resistência aos efeitos maléficos do acúmulo de lactato nos músculos sobre o desempenho natatório, assim como foi verificado por Ferreira (2010). De qualquer forma, os dados indicam que a velocidade usada neste experimento (30 cm/s) e o tempo de 12 horas de natação prolongada permitiram que ambas as espécies pudessem manter o equilíbrio entre geração e oxidação do lactato, sem prejuízo para o desempenho.

Com relação à exposição dos animais à hipóxia, verificamos diferenças marcantes entre as espécies em uma hora sem acesso à superfície. Enquanto que o matrinchã não apresenta qualquer ajuste na atividade da LDH e não pode suportar mais tempo sem oxigênio, o tambaqui é capaz de rapidamente ajustar a LDH de ambos os músculos para lidar com esta condição desfavorável. Apesar do baixo rendimento de ATP na glicólise anaeróbica, a ativação deste tipo de metabolismo é sempre a primeira resposta de animais com boa capacidade de enfrentar condições hipóxicas. Como principais exemplos temos as tartarugas e o *goldfish*, que além de se basearem fortemente no metabolismo anaeróbico, deprimem seu metabolismo quase à zero (Val e Almeida-Val 1995). *Colossoma macropomum* também possui a capacidade de se basear fortemente no metabolismo anaeróbico sob hipóxia, porém ao invés de deprimir demasiadamente seu metabolismo, apresenta uma queda relativamente pequena, mas conta com ajuda de outros tipos de ajustes fisiológicos, morfológicos e comportamentais (Val e Almeida-Val 1995).

Um exemplo de ajuste comportamental é a Respiração Superficial Aquática (RSA), que é muito adequada aos peixes amazônicos, já que enfrentam flutuações diárias na quantidade de oxigênio dissolvido e, neste caso, há a necessidade de se reverter rapidamente os ajustes à condição original. No presente experimento, a LDH no músculo branco de tambaqui aumenta em 1 hora de hipoxia sem acesso à superfície aquática. Isso favorece a continuidade da produção de ATP mesmo com pouco oxigênio, suprindo funções vitais à

sobrevivência. Mas no músculo vermelho, no qual predomina a reconversão de lactato à piruvato, a atividade da LDH diminuiu, sugerindo que a falta de oxigênio reduziu a glicólise aeróbica a ponto de causar acúmulo de piruvato, com consequente inibição da enzima. Em tecidos predominantemente aeróbicos, como por exemplo, coração, predomina a LDH-B, uma isoforma que protege este órgão dos efeitos agressivos do lactato a partir de um mecanismo de inibição da atividade pelo acúmulo do substrato (Gutfreund *et al.* 1968; Almeida-Val e Val 1993). Mais estudos precisam ser realizados nos músculos vermelhos destas espécies sob hipóxia, afim de se saber exatamente a isoforma predominante e se ela realmente é inibida pelo substrato.

Os níveis de lactato no músculo branco aumentam, em ambas as espécies, devido à hipóxia severa de uma hora sem acesso à superfície da água. Quando os tambaquis são permitidos coletarem água da camada superficial, mais rica em oxigênio, mesmo a concentração baixa de oxigênio na coluna da água, de 0,5 mg/L, não é capaz de alterar a atividade da LDH ou gerar acúmulo de lactato. O matrinhã não foi capaz de suportar essas condições, provavelmente porque não responde à hipóxia da mesma forma que o tambaqui. Conforme sugerem os dados, ao primeiro sinal de hipóxia o tambaqui já efetua ajustes na LDH. O matrinhã não. No presente estudo, embora os tambaquis tenham expandido os lábios e realizado RSA por todo o período de exposição com acesso à superfície, a manutenção de níveis baixos de LDH e lactato indicam que os ajustes comportamentais, fisiológicos e morfológicos, já bem conhecidos para esta espécie, foram eficazes nesta condição (Muusze *et al.* 1998; Val *et al.* 1998; Val 2000; Richards 2009; Zhu *et al.* 2013), não sendo necessário um ajuste enzimático. A atividade da LDH em músculos brancos de peixes variam de 100 unidades (μmol de substrato convertido por g de tecido por minuto) na maioria dos peixes de respiração aérea amazônicos a 5000 unidades em atum (Val e Almeida-Val 1995). A taxa anaeróbica, dada pela razão entre unidades de LDH por unidades de CS, pode nos dar uma idéia do metabolismo preferencial da espécie, em uma dada situação. Esta taxa pode alcançar 2000 no músculo branco do atum contra 153 em *Arapaima gigas*. Acredita-se que taxas mais altas estão relacioandas com bom desempenho natatório (Val e Almeida-Val 1995). No presente experimento, nos peixes em repouso, obtivemos uma taxa

anaeróbica média de 183 no músculo branco e 7 no músculo vermelho de tambaqui, enquanto em matrinchã obtivemos 136 no branco e 24 no vermelho. Enquanto no músculo branco, a superioridade do tambaqui na taxa anaeróbica é de apenas 35%, no vermelho a superioridade é do matrinchã, com taxa 250% maior. A maior capacidade do tambaqui em lidar com situações de hipóxia poderia estar relacionada com a maior taxa metabólica anaeróbica dos músculos brancos, e a superioridade do matrinchã na taxa do músculo vermelho, que estaria relacionada com maior capacidade natatória e oxidação de lactato.

Os dados nos mostram que o matrinchã possui uma capacidade maior de se adaptar a cada incremento de velocidade de uma forma equilibrada entre o metabolismo aeróbico e anaeróbico, enquanto que tambaqui faz uma transição repentina e antecipada para o metabolismo anaeróbico, possivelmente, antecipando-se também a fadiga. A LDH não aumenta sua atividade para melhorar o desempenho natatório destas espécies através do aprimoramento da via glicolítica anaeróbica, mas mostrou-se mais ativa para ajudar o tambaqui a reciclar o lactato em condições de exercício prolongado, embora isso não o faça melhor nadador. A condição do matrinchã em apresentar níveis basais mais elevados de LDH favorece seu desempenho natatório e, em tambaqui, as respostas rápidas da LDH quando em hipóxia o tornam altamente resistente à falta de oxigênio.

5. Conclusões

A atuação rápida do óxido nítrico estimulada pelo exercício no músculo vermelho, possivelmente como consequência do atrito do sangue no epitélio vascular, contribui para aumentar o diâmetro dos vasos sanguíneos e melhorar o transporte de gases e nutrientes aos músculos, de acordo com a literatura. Em matrinchã a atuação deste sistema ocorre nas fases iniciais do exercício, ou seja, de forma antecipada, ajudando a retardar a fadiga por postergar a dependência energética dos músculos brancos e o consequente acúmulo de lactato. No entanto, este não é o único fator que determina a diferença de desempenho natatório entre as espécies, visto que os níveis basais mais elevados de LDH nos músculos brancos de matrinchã indicam uma tendência natural à utilização

do metabolismo anaeróbico e menor sensibilidade ao lactato. Assim como retardar seu acúmulo é essencial para um bom desempenho, suportar níveis elevados de lactato também é de suma importância. Os resultados deixam claro que matrinhã e tambaqui possuem diferenças fisiológicas importantes que devem ser consideradas na conservação destas espécies, como por exemplo, na construção de escadas em barragens.

6. Bibliografia

- Agnisola, C. 2005. Role of nitric oxide in the control of coronary resistance in teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142:178–87.
- Alderton, W. K., Alderton, W. K., Cooper, C. E., Cooper, C. E., Knowles, R. G., and Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*, 357:593–615.
- Almeida-Val, V. M., and Val, A. L. 1993. Evolutionary trends of LDH isozymes in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 105(1):21–28.
- Almeida-Val, V.M.F.; Val, A.L.; Hochachka P.W. 1993. Hypoxia tolerance in Amazon fishes: Status of an under-explored biological “goldmine”. In: Hochachka, P.W.; Lutz, P.L.; Sick, T.; Rosenthal, M.; Van den Thillart, G. (Ed). *Surviving Hypoxia: Mechanisms of Control and Adaptation*. CRC Press, London, p.435–445.
- Almeida-Val, V. M. F.; Oliveira, A. R.; de Nazaré Paula da Silva, M.; Ferreira-Nozawa, M. S.; Araújo, R. M.; Val, A. L.; Nozawa, S. R. 2011. Anoxia- and hypoxia-induced expression of LDH-A* in the Amazon Oscar, *Astronotus crassipinis*. *Genetics and Molecular Biology*, 34:315–22.
- Andrew, P. J.; Mayer, B. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 43:521-531.

- Brett, J. R. 1964. The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 21:1183-1226.
- Burgetz, I.; Rojas-Vargas, A.; Hinch, S.; Randall, D. 1998. Initial recruitment of anaerobic metabolism during sub-maximal swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 201:2711–2721.
- Cerqueira, N. F.; Yoshida, W. B. 2002. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*, 17:417-423.
- Chen, K., Cole; R. B.; and Rees, B. B. 2013. Hypoxia-induced changes in the zebrafish (*Danio rerio*) skeletal muscle proteome. *Journal of Proteomics*, 78:477–85.
- Chen, Z. P.; Stephens, T. J.; Murthy, S.; Canny, B. J.; Hargreaves, M.; Witters, L. A.; McConell, G. K. 2003. Effect of Exercise Intensity on Skeletal Muscle AMPK Signaling in Humans. *Diabetes*, 52:2205–2212.
- Cooper, R. U.; Clough, L. M.; Farwell, M. A.; West, T. L. 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 279:1–20.
- Driedzic, W. R.; Hochachka, P. W. 1979. Metabolism in Fish During Exercise. In: Hoar, W. R.; Randall, D. J. *Locomotion. Fish Physiology*, Vol. 7. Elsevier, Amsterdã, p503-536.
- Driedzic, W.R.; Almeida Val, V.M.F. 1996. Enzymes of cardiac energy metabolism in Amazonian teleosts and fresh-water stingray (*Potamotrygon hystrix*). *Journal of Experimental Zoology*, 274: 327-333.
- Dusse, L. M. S.; Vieira, L. M.; Carvalho, M. G. 2003. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39:343-350.

- Eddy, F. B. 2005. Role of nitric oxide in larval and juvenile fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142:221–230.
- Ferreira, M. S.; Oliveira, A. M. ; Val, A. L. 2010. Velocidade crítica de natação (Ucrit) de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exposição à hipoxia. *Acta Amazonica*, 40:699–704.
- Flora-Filho, R.; Zilberstein, B. 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 46:265–271.
- Gladden, L. B. 2004. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *The Journal of Physiology*, 558:5–30.
- Goto, C.; Higashi, Y.; Kimura, M.; Noma, K.; Hara, K.; Nakagawa, K.; Nara, I. 2003. Effect of different intensities of exercise on endothelium-dependent vasodilation in humans: role of endothelium-dependent nitric oxide and oxidative stress. *Circulation*, 108:530–5.
- Green, D. J.; Maiorana, A.; O’Driscoll, G.; Taylor, R. 2004. Effect of exercise training on endothelium-derived nitric oxide function in humans. *The Journal of Physiology*, 561:1–25.
- Gutfreund, H.; Cantwell, R.; McMurray, C. H.; Criddle, R. S.; Hathaway, G. 1968. The kinetics of the reversible inhibition of heart lactate dehydrogenase through the formation of the enzyme-oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide-pyruvate compounds. *The Biochemical Journal*, 106(3):683–7.
- Hambrecht, R.; Adams, V.; Erbs, S.; Linke, A.; Kränkel, N.; Shu, Y.; Schuler, G. 2003. Regular physical activity improves endothelial function in patients with coronary artery disease by increasing phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 107:3152-3158.
- Hammer, C. 1995. Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 112:1-20.

- Hansen, M. N.; Jensen, F. B. 2010. Nitric oxide metabolites in goldfish under normoxic and hypoxic conditions. *The Journal of Experimental Biology*, 213:3593–3602.
- He, W., Xia; W., Cao; Z. D.; Fu, S. J. 2013. The effect of prolonged exercise training on swimming performance and the underlying biochemical mechanisms in juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 166:308–15.
- Hochachka, P. W. 1961. The effect of physical training on oxygen debt and glycogen reserves in trout. *Canadian Journal of Zoology*, 39:767–776.
- Hochachka, P. W.; Somero, G. N. 1984. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, Oxford, 468p.
- Hutcheson, I. R.; Griffith, T. M. 1991. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *The American Journal of Physiology*, 261:257–262.
- Jensen, F. B. 2007. Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *The Journal of Experimental Biology*, 210:3387–3394.
- Jensen, F. B. 2009. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 7:841-848.
- Joannides, R.; Haefeli, W. E.; Linder, L.; Richard, V.; Bakkali, E. H.; Thuillez, C.; Lüscher, T. F. 1995. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, 91:1314–1319.
- Jobgen, W. S.; Fried, S. K.; Fu, W. J.; Meininger, C. J.; Wu, G. 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17:571–88.
- Johnston, I. A. 1982. Physiology of muscle in hatchery raised fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73:105–124.

- Jornayvaz, F. R.; Shulman, G. I. 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry*, 47:69–84.
- Kieffer, J.; Alsop, D.; Wood, C. 1998. A respirometric analysis of fuel use during aerobic swimming at different temperatures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 201:3123–3133.
- Kobzik, L.; Stringer, B.; Balligand, J. L.; Reid, M. B.; Stamler, J. S. 1995. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 211:375–81.
- Kroupova, H.; Machova, J.; and Svobodova, Z. 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 50:461-471.
- Kusner, L. L.; Kaminski, H. J. 1996. Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Research*, 730:238–42.
- Kyprianou, T. D.; Pörtner, H. O.; Anestis, A.; Kostoglou, B.; Feidantsis, K.; Michaelidis, B. 2010. Metabolic and molecular stress responses of gilthead sea bream *Sparus aurata* during exposure to low ambient temperature: an analysis of mechanisms underlying the winter syndrome. *Journal of Comparative Physiology*, 180:1005–18.
- Lee, R. P.; Wang, D.; Kao, S. J.; Chen, H. I. 2001. The lung is the major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin shock. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 28:315–20.
- Lewis, J. M.; Costa, I.; Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. F.; Gamperl, A. K.; Driedzic, W. R. 2007. Responses to hypoxia and recovery: repayment of oxygen debt is not associated with compensatory protein synthesis in the Amazonian cichlid, *Astronotus ocellatus*. *The Journal of Experimental Biology*, 210:1935–43.
- Lowenstein, C. J.; Dinerman, J. L.; Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*, 120:227-237.

- Macardle, W. D. 2011. Fisiologia do Exercício: Nutrição, Energia e Desempenho Humano, *Sétima Edição*. Guanabara Coogan, São Paulo, 1039p.
- Manukhina, E. B.; Mashina S. Y.; Smirin, B. V.; Lyamina, N. P.; Senchikhin, V. N.; Vanin, A. F.; Malyshev I. 2000. Role of nitric oxide in adaptation to hypoxia and adaptive defense. *Physiological Research*, 49:89–97.
- McClelland, G. B. 2004. Fat to the fire: the regulation of lipid oxidation with exercise and environmental stress. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 139:443–60.
- McNeill, B.; Perry, S. F. 2006. The interactive effects of hypoxia and nitric oxide on catecholamine secretion in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Experimental Biology*, 209:4214–4223.
- Milligan, C.; Girard, S. 1993. Lactate metabolism in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 193:175–193.
- Mommsen, T. P.; Vijayan, M. M.; Moon, T. W. 1999. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3):211-268.
- Moncada, S.; Higgs, E. A. 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, 147:193–201.
- Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 43:109–142.
- Morash, A. J.; Vanderveken, M.; McClelland, G. B. 2014. Muscle metabolic remodeling in response to endurance exercise in salmonids. *Frontiers in Physiology*, 5:452.
- Moyes, C. D.; West, T. G. 1995. Exercise metabolism of fish. In: Mommsem, T. P. Hochach, P. (Ed). *Metabolic biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Vol. 4). Elsevier, Amsterdã, p.367-392.

- Müller, U. K.; Van Leeuwen, J. L. 2006. Undulatory fish swimming: From muscles to flow. *Fish and Fisheries*, 7(2):84-103.
- Muusze, B., Marcon, J., van den Thillart, G., Almeida-Val, V. 1998. Hypoxia tolerance of Amazon fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 120:151–156.
- Niebauer, J.; Cooke, J. P. 1996. Cardiovascular effects of exercise: role of endothelial shear stress. *Journal of the American College of Cardiology*, 28:1652–1660.
- Olson, K. R.; Donald, J. A. 2009. Nervous control of circulation: the role of gasotransmitters, NO, CO, and H₂S. *Acta Histochemica*, 111:244–256.
- Palstra, A. P.; Rovira, M.; Rizo-Roca, D.; Torrella, J. R.; Spaink, H. P.; Planas, J. V. 2014. Swimming-induced exercise promotes hypertrophy and vascularization of fast skeletal muscle fibres and activation of myogenic and angiogenic transcriptional programs in adult zebrafish. *BMC Genomics*, 15:1136.
- Peake, S. J.; Farrell, A. P. 2004. Locomotory behaviour and post-exercise physiology in relation to swimming speed, gait transition and metabolism in free-swimming smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *The Journal of Experimental Biology*, 207:1563–1575.
- Pohl, U.; Holtz, J.; Busse, R.; Bassenge, E. 1986. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*, 8:37–44.
- Reichmann, H.; Hoppeler, H.; Mathieu-Costello, O.; von Bergen, F.; Pette, D. 1985. Biochemical and ultrastructural changes of skeletal muscle mitochondria after chronic electrical stimulation in rabbits. *Pflügers Archiv*, 404:1–9.
- Richards, J. G. 2009. *Metabolic and Molecular Responses of Fish to Hypoxia*. In: Jeffrey, R.; Farrell, A.; Brauner, C. (Ed). *Fish Physiology: Hypoxia* (Vol. 27). Academic Press, Amsterdã, 536 p.

- Richards, J. G.; Mercado, A. J.; Clayton, C. A.; Heigenhauser, G. J. F., Wood, C. M. 2002. Substrate utilization during graded aerobic exercise in rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology*, 205:2067–2077.
- Roberts, C. K.; Barnard, R. J.; Jasman, A.; Balon, T. W. 1999. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *The American Journal of Physiology*, 277:390–394.
- Rubanyi, G. M.; Romero, J. C.; Vanhoutte, P. M. 1986. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *The American Journal of Physiology*, 250:1145–1149.
- Rudnick, J.; Püttmann, B.; Tesch, P. A.; Alkner, B.; Schoser, B. G. H.; Salanova, M.; Blottner, D. 2004. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18:1228–30.
- Santos, G.; Ferreira, E.; Zuanon, J. 2006. *Peixes Comerciais de Manaus*. Pró Varzea, Editora Ibama, Brasília, 144p.
- Sheridan, M. A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part*, 107:495–508.
- Shiva, S. 2013. Nitrite: A Physiological Store of Nitric Oxide and Modulator of Mitochondrial Function. *Redox Biology*, 1:40–44.
- Siu, P. M.; Donley, D. A.; Bryner, R. W.; Alway, S. E. 2003. Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles. *Journal of Applied Physiology*, 94:555–560.
- Tonkonogi, M.; Harris, B.; Sahlin, K. 1997. Increased activity of citrate synthase in human skeletal muscle after a single bout of prolonged exercise. *Acta Physiologica Scandinavica*, 161:435–6.

- Tota, B.; Amelio, D.; Pellegrino, D.; Ip, Y. K.; Cerra, M. C. 2005. NO modulation of myocardial performance in fish hearts. In *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142:164–177.
- Turner, N.; Bruce, C. R.; Beale, S. M.; Hoehn, K. L.; So, T.; Rolph, M. S.; Cooney, G. J. 2007. Excess lipid availability increases mitochondrial fatty acid oxidative capacity in muscle: evidence against a role for reduced fatty acid oxidation in lipid-induced insulin resistance in rodents. *Diabetes*, 56:2085–92.
- Val, A. L. 2000. Organic phosphates in the red blood cells of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 125:417-435.
- Val, A. L.; Almeida-Val, V. M. 1995. *Fishes of the Amazon and their Environment*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 224 p.
- Val, A. L., Silva, M. N. P., and Almeida-Val, V. M. F. 1998. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. *South African Journal of Zoology*, 33:107–114.
- Walton, M. J.; Cowey, C. B. 1982. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 73:59–79.
- Webb, P. W. 1998. Swimming. In: Evans, D. H.; Claiborne, J. B.; Currie, S. (Ed). *The Physiology of Fishes*. CRC press, Florida, p.3–24
- West, J. L.; Bailey, J. R., Almeida-Val, V.M.F.; Val, A. L.; Sidel, B. D.; Driedzic, W.R. 1999. Activity levels of enzymes of energy metabolism in heart and red muscle are higher in north-temperate-zone than in Amazonian teleosts. *Canadian Journal of Zoology*, 77: 690-696.
- Wieser, W.; Lackner, R.; Hinterleitner, S.; Platzer, U. 1987. Distribution and properties of lactate dehydrogenase isoenzymes in red and white muscle of freshwater fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3:151–62.
- Wright, C. E.; Rees, D. D.; Moncada, S. 1992. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*, 26:48–57.

Zhou, B. S.; Wu, R. S. S.; Randall, D. J.; Lam, P. K. S.; Ip, Y. K.; Chew, S. F. 2000. Metabolic adjustments in the common carp during prolonged hypoxia. *Journal of Fish Biology*, 57:1160–1171.

Zhu, C. D.; Wang, Z. H.; Yan, B. 2013. Strategies for hypoxia adaptation in fish species: A review. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 183:1005-1013.

Capítulo II - Efeito da suplementação alimentar com L-arginina ou L-NAME sobre o óxido nítrico e desempenho natatório de tambaqui (*Colossoma macropomum*) e matrinhã (*Brycon amazonicus*)

Chapter II - Effect of food supplementation with L-arginine and L-NAME on the nitric oxide and swimming performance of tambaqui (*Colossoma macropomum*) and Matrinhã (*Brycon amazonicus*)

Resumo

O óxido nítrico é produzido a partir da L-arginina pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS), e é uma molécula sinalizadora com papel importante na homeostase cardiovascular, neurotransmissão, defesas imunológicas, vasodilatação, desempenho muscular, entre outras. O estímulo fisiológico para aumentar a produção de óxido nítrico pela isoforma NOS3 seria o atrito causado pelo fluxo sanguíneo aumentado através do lúmen do vaso. Além de ser o precursor da síntese do óxido nítrico, a arginina é um aminoácido com muitas outras funções no organismo de vários vertebrados, incluindo peixes. Trabalhos recentes demonstram que a suplementação da dieta com L-arginina reduz a gordura corporal e aumenta a expressão de genes responsáveis pela oxidação de ácidos graxos e glicose em ratos. Uma vez que o desempenho natatório dos peixes está diretamente relacionado com a sua capacidade de fornecer oxigênio e moléculas energéticas aos músculos, o efeito vasodilatador do óxido nítrico poderia, teoricamente, aumentar seu desempenho natatório por aumentar o fluxo dessas substâncias. O objetivo do presente estudo foi verificar se a suplementação da ração com arginina ou seu bloqueador (L-NAME) poderiam alterar o desempenho natatório, os níveis de óxido nítrico no músculo e os parâmetros sanguíneos indicadores de estresse em peixes. Os resultados indicam que a suplementação da ração com pequenas quantidades de arginina não resulta em aumento do desempenho em ambas as espécies, mas pode ajudar na recuperação do matrinchã por permitir uma maior perfusão sanguínea, e do tambaqui por elevar os níveis de cortisol após o exercício intenso.

Abstract

Nitric oxide is produced from L-arginine by the enzyme nitric oxide synthase (NOS) and is a signaling molecule with important role in cardiovascular homeostasis, neurotransmission, immune defenses, vasodilatation, muscle performance, among others. The physiological stimulus for increasing nitric oxide production by the NOS3 isoform is the friction caused by increased blood flow through the vessel lumen. Furthermore, arginine is an amino acid with many other functions in the body of various vertebrates, including fish. Recent studies have demonstrated that dietary supplementation with L-arginine reduces body fat and increases the expression of genes related to fatty acid and glucose oxidation in mice. Once the swimming performance of fish is directly related to its ability to deliver oxygen and energetic molecules to the muscles, the vasodilator effect of nitric oxide could theoretically increase their swimming performance by increasing the flow of these substances. The aim of this study was to determine whether the diet supplementation with arginine or its blocker (L-NAME) could alter the swimming performance, muscle levels of nitric oxide and blood parameters indicators of stress in fish. The results indicate that food supplementation with small amounts of arginine does not result in increased swimming performance in both species, but it can help the recovery of matrinchã by allowing a better blood perfusion, and of the tambaqui, by raising the levels of cortisol after intense exercise.

1. Introdução

O óxido nítrico (ON) é produzido a partir da L-arginina pela enzima sintase do óxido nítrico (Nitric Oxide Synthase - NOS) (Alderton *et al.* 2001) e é uma molécula sinalizadora com papel importante na homeostase cardiovascular, neurotransmissão, defesas imunológicas (Moncada e Higgs 2006), vasodilatação (Jensen 2009), desempenho muscular (Rudnick *et al.* 2004), entre outras. Até o momento, três isoformas da NOS são conhecidas. A NOS2 é induzível, atua nos processos imunológico onde o ON produz efeitos citotóxicos e citostáticos em células de vários órgãos-alvo (Wright *et al.* 1992; Lee *et al.* 2001). Já a NOS1 está presente nos tecidos musculares, mais especificamente na região sarcolemal e junção neuromuscular (Kobzik *et al.* 1995; Kusner e Kaminski 1996), atuando nos processos de sinalização neuromuscular, geração de força, contratilidade e tomada da glicose (Flora Filho e Zilberstein 2000; Rudnick *et al.* 2004). A NOS3 (endotelial) encontra-se uniformemente distribuída na fibra muscular e na parede dos vasos sanguíneos (Kobzik *et al.* 1995), participando nos processos de sinalização para a redução da resistência vascular por meio da vasodilatação (Joannides *et al.* 1995). O estímulo fisiológico para aumentar a produção de óxido nítrico pela NOS3 seria o atrito causado pelo fluxo sanguíneo aumentado através do lúmen do vaso (Pohl *et al.* 1986; Rubanyi *et al.* 1986; Hutcheson e Griffith 1991). A partir do atrito, o ON, uma molécula pequena e lipofílica, penetra facilmente nas células, ligando-se à guanilato ciclase. A ligação ativa a enzima, que por sua vez catalisa a transformação do GTP à GMP cíclico. O GMPc acumulado causa bloqueio da saída de cálcio do retículo endoplasmático das células musculares lisas das paredes dos vasos, o que impede a contração e induz o relaxamento (Lowenstein *et al.* 1994; Andrew e Mayer 1999; Cerqueira e Yoshida 2002; Dusse *et al.* 2003; Moncada e Higgs 2006). Embora muitas vezes conflitantes, em geral o papel das isoformas da NOS em peixes teleósteos parece ser comparável aos dos mamíferos (Agnisola 2005; Tota *et al.* 2005; Olson e Donald 2009).

Trabalhos recentes com ratos demonstram que a suplementação da dieta com L-arginina reduz a gordura corporal e aumenta a expressão de genes responsáveis pela oxidação de ácidos graxos e glicose. O mecanismo não está totalmente esclarecidos, mas seria pela atuação do óxido nítrico sobre o GMP

cíclico e consequente ativação das lipases e perilipinas, entre outros (Jobgen *et al.* 2006).

Uma vez que o desempenho natatório dos peixes está diretamente relacionado com a sua capacidade de fornecer oxigênio e moléculas energéticas aos músculos, o efeito vasodilatador do óxido nítrico poderia aumentar ainda mais essa capacidade por aumentar o fluxo dessas substâncias. Porém, a influência da suplementação da dieta com arginina neste processo é desconhecida.

Em tese, o aprimoramento do desempenho natatório, a partir do efeito vasodilatador da arginina suplementar, poderia beneficiar a conversão alimentar, o ganho de peso e estado geral de saúde dos peixes cultivados, possibilitando o aumento da produtividade. Ferreira e colaboradores (2013) mostraram o efeito benéfico do exercício natatório para o ganho de peso, conversão alimentar e resistência ao estresse durante o cultivo de matrinhã (*Brycon amazonicus*), e o mesmo foi verificado para outras espécies de peixes (Davison 1997; Ogata e Oku 2000), indicando ser esta uma técnica que pode aumentar a produtividade. Uma vez que o alto custo da ração e a mortalidade por estresse são os principais entraves para a produção de peixes, mais estudos precisam ser realizados para se entender esta questão e colaborar com o desenvolvimento socioeconômico da região.

O objetivo do presente estudo foi verificar se a suplementação da ração com arginina ou seu bloqueador (L-NAME) poderia alterar as respostas do óxido nítrico ao exercício, e de que forma isso afeta o desempenho.

2. Material e métodos

2.1. Animais e desenho experimental

Exemplares de tambaqui e matrinhã, adquiridos de piscicultores da região, passaram por um processo de aclimação de 30 dias em tanques com

aeração constante e recirculação parcial da água, antes de serem utilizados nos experimentos. Foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial (Purina®) composta por 36% de proteína, até a saciedade aparente. As características físico-químicas da água de poço do INPA, usada durante a aclimação e no experimento foram: Na⁺ 34,00±1,00 µmol, Cl⁻ 28,00±1,00 µmol, Ca²⁺ 11,50±0,90 mol, Mg²⁺ 0,80±0,10 mol, K⁺ 15,50±0,40 mol, pH 6,32±0,04, SH 0,99±0,19 mg C.L⁻¹, O₂ dissolvido 5,91±0,07mg.L⁻¹, temperatura 28,00±1,00 °C.

Dezoito caixas de água de 100 litros cada, com recirculação parcial de água e com aeração constante foram utilizadas para acomodação dos peixes. Os exemplares de matrinhã utilizados tinham 33,00±5,18 g e 14,50±1,90 cm, e os exemplares de tambaqui, 49,48±12,33 g e 12,73±2,85 cm. Durante a aclimação, que ocorreu por 10 dias, foram produzidas as rações experimentais, a partir da trituração e reaglutinação da ração comercial, composta por 32% de proteína, marca Purina®. A primeira ração experimental foi suplementada com a 1g/Kg do aminoácido arginina, precursor da produção de óxido nítrico no organismo. Devido a inexistência de experimentos similares disponíveis na literatura, a concentração utilizada de arginina suplementar foi definida a partir do conceito de aminoácido limitante, que é aquele que traz grandes prejuízos ao organismo quando a quantidade ingerida diminui. Segundo Furuya e colaboradores (2004), o aminoácido lisina seria o mais limitante para Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), e a concentração ideal na ração seria de 1,4%. Na segunda ração adicionamos 1g/kg de L-NAME, um composto industrial feito a partir da arginina, que age como antagonista deste aminoácido bloqueando sua atividade. Na terceira ração adicionamos o aminoácido alanina para equilibrar as quantidades de nitrogênio entre as rações.

Cada grupo de peixes, correspondente a um terço do total, foi alimentado com um dos três tipos de ração, sendo que o grupo alimentado com alanina foi referenciado como controle. Após 20 dias de alimentação, na qual os peixes eram permitidos se alimentarem até a saciedade aparente, um terço do total de cada grupo foi retirado e sacrificado para análise, outro terço foi submetido no túnel de natação a exercício moderado por 2 horas na velocidade da água de 40

centímetros por segundo (cm/s), e o terço final passou pelo teste de Ucrit antes de ser analisado.

No protocolo de velocidade moderada da água, os peixes foram transferidos para o túnel de natação, dotado de bombas que controlavam a velocidade da água por intermédio de computadores, e foram permitidos se aclimatarem na velocidade da água de 10 cm/s por 2 horas. A partir daí, a velocidade foi incrementada em 10 cm/s a cada 5 minutos, até que atingisse 40 cm/s, permanecendo assim por 2 horas.

No protocolo de Ucrit (Brett 1964), os peixes são acondicionados no túnel de natação também por 2 horas na velocidade de aclimação de 10 cm/s, quando então a velocidade da água é aumentada em 10 cm/s a cada 30 minutos até que ocorra a fadiga do peixe, que é indicada pela sua aderência à grade posterior do túnel mesmo após estímulo elétrico de 24 volts. A Ucrit é calculada da seguinte forma:

$$Ucrit = U_i + (T_i / T_{ii} \times U_{ii}),$$

onde, U_{ii} é o incremento de velocidade (cm/sec), U_i é a penúltima velocidade na qual o peixe nadou antes de fadigar, T_i é o tempo decorrido entre o último aumento de velocidade e a fadiga (minutos), e T_{ii} é o tempo entre os incrementos de velocidade (minutos). A Ucrit deve ser padronizada dividindo seu valor pelo comprimento padrão do peixe.

2.2. Análises Musculares

Para análise dos nitritos e nitratos (NOx) do músculo vermelho, o tecido foi homogeneizado com equipamento automático em tampão salino (tampão PBS: 10 mM PO_4^{3-} , 137 mM NaCl, e 2.7 mM KCl), e em seguida centrifugados a 10.000g por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado e passado em filtro Millipore (Amicon) com membrana de 30kDa, seguindo orientação do fabricante do kit de análise. O kit utilizado foi da Cayman Chemical (item n. 780001), o qual primeiramente converte todo o nitrato da amostra em nitrito, usando nitrato redutase. O segundo passo é a adição do reagente Griess, que converte nitrito

em um azo-composto lilás. A medida fotométrica deste composto em 540nm determina a concentração de nitrito, estimando desta forma, a concentração inicial de nitritos e nitratos da amostra (NO_x).

Para determinação do lactato do músculo branco, as amostras foram digeridas em ácido perclórico 6M na proporção de 1µL para cada µg de tecido e, em seguida, centrifugados a 10.000g por 10min. O extrato sobrenadante (20µL) é adicionado a uma solução contendo, numa mistura, a enzima lactato desidrogenase (LDH, 10KU/ml), a coenzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), hidrazina e tampão glicina (0,6 mol/L, pH 9,2). Neste método, a enzima converte o lactato, presente no extrato de tecido, a piruvato o qual é complexado a piruvato-hidrazina, evitando a reconversão do piruvato para lactato. A reação ocorre com redução simultânea da coenzima NAD⁺ e é monitorada por meio do decréscimo da absorvância em 340nm, decréscimo este proporcional à concentração original de lactato na amostra. Após 15min, quando a reação processa-se completamente a 37°C, os valores de lactato tecidual são obtidos por meio de uma curva de calibração previamente estabelecida. As leituras são feitas em leitor de microplaca com filtro de 340nm.

2.3. Análises do plasma

O sangue foi retirado por meio de punção da veia caudal, usando-se seringas heparinizadas. O plasma foi separado centrifugando-se o sangue por 10min a 2.000 rpm.

A glicose foi determinada por meio de ensaio enzimático colorimétrico, cujo princípio consiste em adicionar o plasma em uma solução contendo tampão fosfato, aminoantipirina, p-hidroxibenzoato e as enzimas glicose oxidase e peroxidase na proporção de 1:100. Foi utilizado o kit comercial Glucos 500 (Dolles).

O cortisol foi medido a partir do método de competição entre o cortisol livre e o cortisol conjugado com acetilcolinesterase (DBC Chemical). Essas duas substâncias competem pelos sítios de ligação formados por anticorpos monoclonais de rato, os quais vêm previamente aderidos no fundo de cada poço

da microplaca. Após a ligação de todo o cortisol da amostra, a quantidade subsequente de cortisol-conjugado que conseguir se ligar na placa será inversamente proporcional a quantidade de cortisol na amostra. O passo seguinte consiste em adicionar um reagente (Ellman's) que forma coloração amarela ao reagir com a acetilcolinesterase. A coloração formada é uma estimativa do cortisol da amostra e pode ser lida em 412nm.

Os triglicerídeos foram medidos por método enzimático colorimétrico (Kit InVitro), no qual são estimados após a hidrólise enzimática dos lipídeos da amostra com lipases. O indicador é a quinoneimina, formada a partir do peróxido de hidrogênio, da 4-aminoantipirina e do 4-clorofenol sob a influência catalítica da peroxidase.

O lactato foi medido segundo o mesmo procedimento utilizado para medir o lactato muscular, conforme citado anteriormente.

O NOx foi medido seguindo-se o mesmo procedimento descrito para o NOx muscular, sendo que também houve a necessidade de passar o plasma pelos filtros Milipore (Amicon) de 40kDa, seguindo orientação do fabricante do kit de análise (Cayman Chemical).

2.4. Análises estatísticas

Para a análise estatística utilizamos o programa Sigma Plot (11.0) e aplicação de ANOVA de dois fatores, sendo um fator o tipo de ração fornecida e o outro fator o tipo de exercício a que o peixe foi submetido. Nos casos em que houve diferença estatística para o fator principal, utilizamos o teste de *SNK* para contraste entre as médias.

3. Resultados

Eventuais diferenças para os fatores principais, quando detectados pela ANOVA *two-way*, são relatadas nas legendas e no texto abaixo; os resultados dos testes *post-hoc* de comparação intragrupos são mostrados nas próprias tabelas e gráficos com utilização de letras distintas.

Em ambas as espécies, a Ucrit não é afetada pelo tipo de alimentação que os animais receberam e podemos observar que a Ucrit de matrinchã é cerca de dois comprimentos de corpo por segundo maior que de tambaqui (Tabela VII).

O NOx do músculo vermelho aumenta em tambaqui devido ao exercício, independentemente do tipo aplicado, e, em matrinchã, o exercício gera aumento apenas no grupo exercitado até a fadiga, quando comparado com o controle, sendo que o grupo exercitado moderadamente atinge valores intermediários (Figuras 6 e 7).

Tabela VII. Velocidade crítica de natação (Ucrit) de tambaqui e matrinchã alimentados por 10 dias com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME.

	Alanina	Arginina	L-NAME
tambaqui	4,19±0,46	4,26±0,32	4,37±0,43
matrinchã	6,62±0,18	6,58±0,16	6,99±0,20

Valores em cc/seg expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%. ANOVA de um fator aplicada isoladamente para cada espécie não indica diferença estatística entre os grupos.

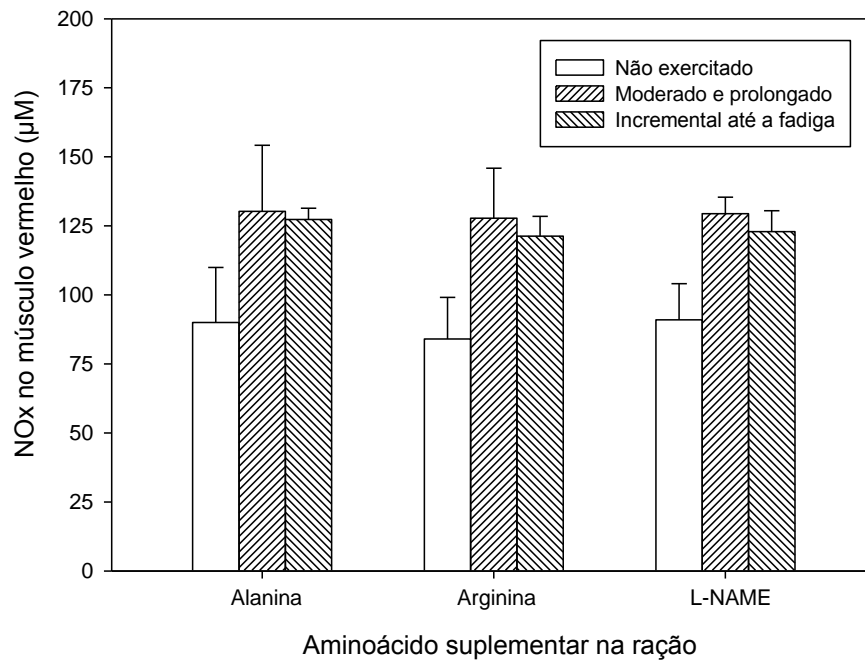


Figura 6 - Nitritos e nitratos (NOx) no músculo vermelho de tambaqui alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação), e submetido, no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste de Ucrit, ou exercitado moderadamente a 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas, ou mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). ANOVA de dois fatores indica diferença para o fator *atividade*, havendo diferença entre o grupo controle e os grupos exercitado moderadamente e incremental até a fadiga. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

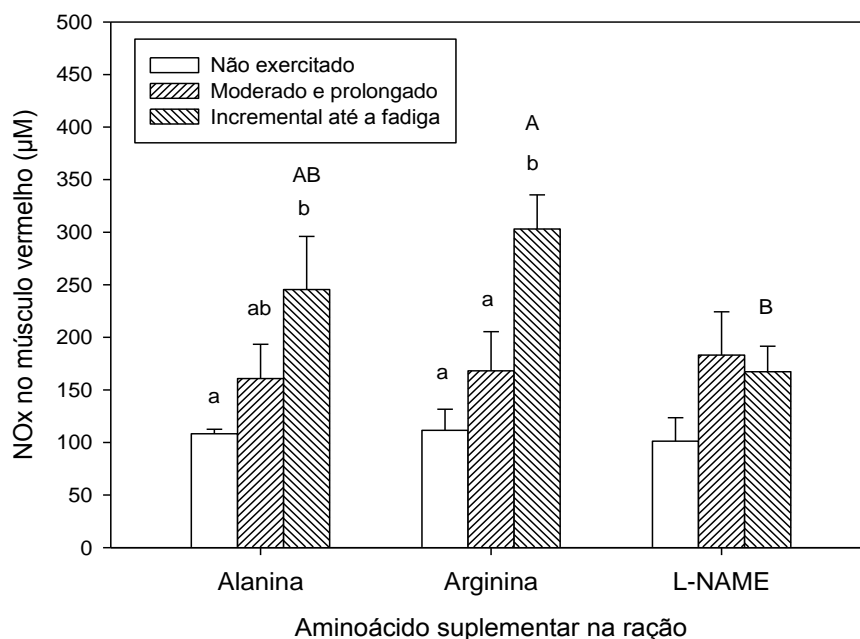


Figura 7 - Nitritos e nitratos (NOx) do músculo vermelho de matrinhã alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação) e, submetido no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste de Ucrit, ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas, ou mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). ANOVA de dois fatores indica diferença para o fator *atividade*, havendo diferença entre o grupo controle e o fadigado. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tipos de *atividade* para animais alimentados com o mesmo tipo de ração, enquanto maiúsculas indicam diferença entre os tipos de ração, dentre um mesmo tipo de ambiente. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

Em tambaqui e matrinhã, a glicose aumenta quando os animais são submetidos ao exercício, sendo que no exercício moderado ela aumenta de forma intermediária e na fadiga ela atinge os maiores valores (Tabelas VIII e IX).

Na análise do lactato plasmático de ambas as espécies, verificou-se o mesmo comportamento da glicose, ou seja, sua concentração é maior dependendo da intensidade do exercício; porém, se observou também que a alanina favoreceu o aumento deste metabólito em tambaqui, em relação aos grupos suplementados com L-NAME ou arginina (Tabelas VIII e IX).

Em tambaqui o NOx plasmático aumenta devido ao exercício moderado e prolongado, com relação ao grupo em repouso e ao exercitado de forma incremental até a fadiga. Em matrinhã não houve diferença nos níveis plasmáticos de NOx (Tabelas VIII e IX).

Os triglicerídeos plasmáticos se elevam devido ao exercício moderado em tambaqui, quando comparado ao grupo controle ou fadigado, mas o mesmo não ocorre em matrinhã, que não apresentou diferenças devido ao tipo de exercício (Tabelas VIII e IX).

Em tambaqui, observou-se interação entre os fatores alimentação e exercício sobre o cortisol plasmático (ANOVA two-way), sendo que desta forma o teste não determina efeitos isolados. O teste *a posteriori* identificou a interação, mostrando que quando a arginina é utilizada concomitantemente com o exercício até a fadiga, o cortisol atinge valores extremamente elevados comparados à todos os demais grupos (Figuras 7 e 8). Em matrinhã, o cortisol aumenta devido ao exercício, sendo os três grupos diferentes entre si, com o grupo exercitado até a fadiga atingindo os maiores valores (Figuras 7 e 8).

Tabela VIII. Níveis plasmáticos de glicose, lactato, NOx e triglicérides de tambaqui alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação) e submetido, no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste incremental de Ucrit (FAD), ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas (EM), ou não exercitado (NE) e mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade).

		Alanina	Arginina	L-NAME
Glicose plasmática (mg.dL ⁻¹)	NE	70,34±4,72 a	79,38±10,60 a	77,30±3,07 a
	EM	90,08±5,89 a	91,04±13,44 a	101,43±11,95 ab
	FAD	142,43±11,70 b	143,25±8,57 b	126,38±5,96 b
Lactato plasmático (mg.dL ⁻¹)	NE	23,02±2,97 a	25,49±1,44 a	22,60±3,92 a
	EM	74,65±9,01 b	70,69±10,51 b	51,00±4,93 b
	FAD	53,26±8,79 ab	45,81±6,39 ab	41,42±7,23 ab
NOx Plasmático (µM)	NE	372,64±31,60	452,70±59,65	292,80±52,67
	EM	561,70±102,69	478,60±58,51	551,73±59,74
	FAD	257,13±30,21	208,80±20,68	339,20±40,07
Triglicerídeos plasmáticos (mg.dL ⁻¹)	NE	147,96±22,82	129,86±19,80	136,95±13,82
	EM	177,19±12,71	172,85±18,67	164,85±13,54
	FAD	144,68±7,92	128,50±7,99	130,95±21,32

Diferenças estatísticas nos fatores principais, quando presentes, são dadas no texto e resultados de testes *post hoc* são mostrados no corpo da tabela, sendo que letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tipos de atividade para animais alimentados com o mesmo tipo de ração, enquanto letras maiúsculas indicam diferença entre os tipos de ração, dentre um mesmo tipo de ambiente. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

Tabela IX. Níveis plasmáticos de glicose, lactato, NOx e triglicérides de matrinchã alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação), e submetido no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste incremental de Ucrit (FAD), ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas (EM), ou não exercitados (NE) e mantidos em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade).

		Alanina	Arginina	L-NAME
Glicose plasmática (mg.dL ⁻¹)	NE	99,07±14,79 ab	84,97±5,033 a	69,36±4,84 a
	EM	87,0520±5,39 a	126,35±13,14 b	91,21±7,87 ab
	FAD	129,01±2,35 b	115,60±18,11 ab	121,67±12,64 b
Lactato plasmático (mg.dL ⁻¹)	NE	58,63± 6,71 a	46,07± 5,6120 a	34,06± 5,83 a
	EM	68,19± 10,30 a	54,73± 6,05 a	67,65± 10,99 b
	FAD	98,09± 10,19 b	104,40± 10,72 b	107,62± 5,20 c
NOx Plasmático (µM)	NE	346,00± 40,36	321,04± 57,50	212,80± 32,475
	EM	282,10± 54,68	251,12± 64,66	368,48± 60,12
	FAD	303,76± 53,69	409,30± 56,22	314,10± 34,64
Triglicérides plasmáticos (mg.dL ⁻¹)	NE	386,80 ±21,80	448,26±30,41	268,08±31,25
	EM	291,66±106,20	421,52±35,91	341,38±16,57
	FAD	458,33±74,33	357,40±44,96	408,79±62,75

Diferenças estatísticas nos fatores principais, quando presentes, são dadas no texto e resultados de testes *post hoc* são mostrados no corpo da tabela, sendo que letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tipos de atividade para animais alimentados com o mesmo tipo de ração, enquanto letras maiúsculas indicam diferença entre os tipos de ração, dentre um mesmo tipo de ambiente. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

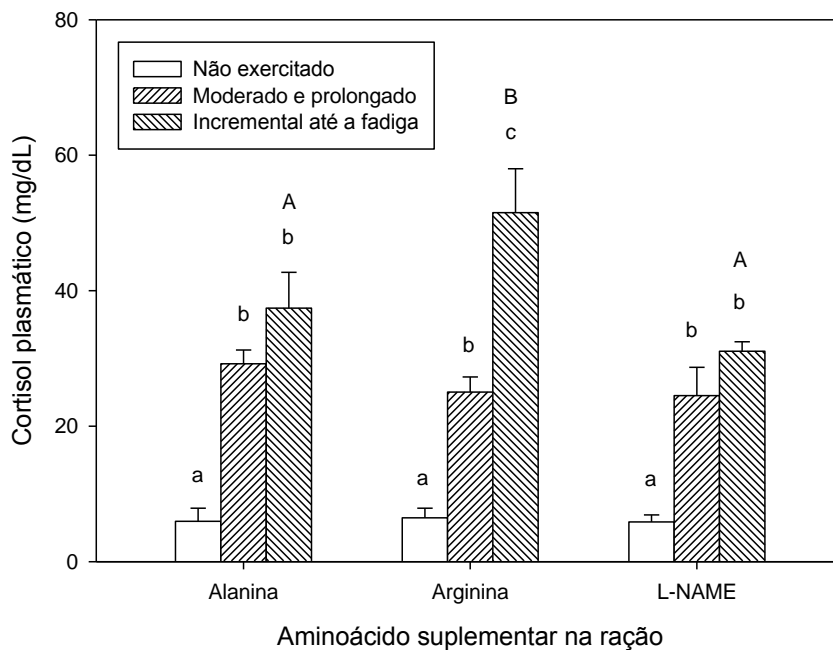


Figura 8 - Cortisol plasmático de tambaqui alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação), e submetido no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste de Ucrit, ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas, ou mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). ANOVA de dois fatores indica interação entre os fatores *atividade* e *alimentação*, sendo que desta forma os fatores isolados não podem ser apropriadamente determinados. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tipos de *atividade* para animais alimentados com o mesmo tipo de ração, enquanto letras maiúsculas indicam diferença entre os tipos de ração, dentre um mesmo tipo de ambiente. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

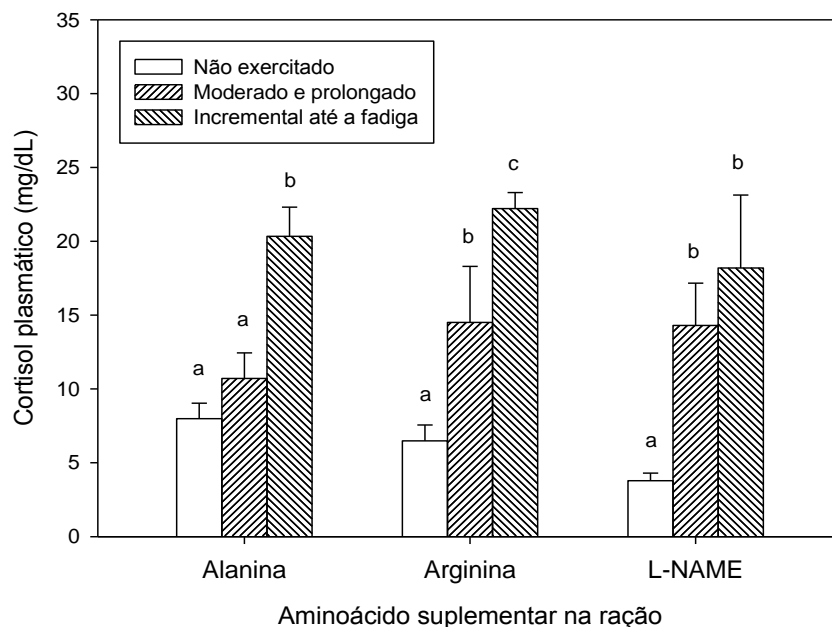


Figura 9 - Cortisol plasmático de matrinhã alimentado com ração suplementada com alanina, arginina ou L-NAME por 10 dias (fator alimentação), e submetido no último dia, minutos antes da análise, à fadiga pelo teste de Ucrit, ou exercitado moderadamente à 40 cm/s de velocidade de água por 2 horas, ou mantido em água parada por 2 horas dentro do túnel de natação (fator atividade). ANOVA de dois fatores indica diferença no fator *atividade*, sendo os três grupos diferentes entre si. Letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tipos de *atividade* para animais alimentados com o mesmo tipo de ração. Dados expressos como média e erro padrão da média, com nível de significância de 5%.

4. Discussão

4.1. Cortisol e glicose

O cortisol mobiliza e eleva a glicose em peixes a partir da gliconeogênese e da glicogenólise (Basu *et al.* 2001). A glicogenólise no fígado e nos músculos libera glicose na circulação, que entra na célula, ao menos em parte, com a ajuda da insulina (Moon 2001). Os mecanismos endócrinos que atuam na regulação de glicose em peixes não estão bem definidos (Legate *et al.* 2001; Moon 2001). O cortisol exerce um papel regulatório em muitas funções fisiológicas importantes nos peixes e níveis elevados deste hormônio tem sido relacionados à piscicultura por causar diminuição do apetite, diminuição do crescimento, queda na resistência às doenças, entre outros (Barton *et al.* 1987; Barton e Iwama 1991; De Boeck *et al.* 2001; Gregory e Wood 1999). Apresenta-se também como controlador chave do metabolismo aeróbico e anaeróbico de peixes, uma vez que pode elevar o consumo de oxigênio, aumentar gliconeogênese, entre outros, o que resulta em um maior “custo de sobrevivência” ao peixe (Barton *et al.* 1987; Morgan e Iwama 1996; Wendelaar Bonga 1997; Tort 2010). Em teleósteos, o cortisol tem também papel importante na osmoregulação, atuando na tomada de íons da água pelas brânquias (Vijayan *et al.* 1997; McCormick 2001). Embora seja a molécula energética central no metabolismo da maioria dos vertebrados, em especial mamíferos, a glicose apresenta uma importância mais discreta em peixes, tendo papel subordinado aos dos lipídeos e proteínas (Hemre *et al.* 2002).

O tambaqui e o matrinhã também respondem às situações de estresse em geral com liberação de cortisol e glicose na circulação. Ferreira (2006) verificou que a glicose e cortisol aumentam em tambaqui submetido a pH baixo, amônia elevada e hipóxia, indicando que estes são bons indicadores de estresse para esta espécie. Gomes e colaboradores (2003) demonstraram que o tambaqui eleva seu cortisol e glicose plasmáticas devido ao estresse de transporte. Ferreira e colaboradores (2013) verificaram aumento da glicose de matrinhã submetido por 24 horas à hipóxia, porém Hoshiba e colaboradores (2009) mostraram que o matrinhã perseguido por puçá, numa simulação de captura por até 30 minutos, não apresentou alteração nos níveis de glicose e

cortisol do plasma, indicando ser uma espécie resistente ao estresse natatório da captura.

No presente experimento, ambas as espécies apresentaram aumento do cortisol e da glicose em função do exercício, moderado ou intenso, porém com algumas diferenças. Para tambaqui, o cortisol aumenta na mesma magnitude independente se o exercício é moderado ou intenso, porém há uma interação com o fator alimentação, ou seja, se o grupo suplementado com arginina é submetido ao exercício intenso, os níveis de cortisol atingem os maiores valores entre todos os grupos. Nesta mesma espécie, a glicose aumenta devido à intensidade do exercício, não sendo afetada pelo tipo de suplementação. Esses dados indicam que, de alguma forma, a arginina é capaz de aumentar as respostas dos peixes aos agentes estressores, neste caso, o exercício intenso. Embora os níveis de cortisol constantemente elevados possam ser prejudiciais, conforme discutido anteriormente, sua atuação é essencial em situações pontuais, quando há uma grande demanda por energia, oxigênio ou distúrbios eletrolíticos iminentes, como no caso da natação extenuante.

Um conceito muito pouco debatido na literatura é o de *nutriente adaptogênico*, que são aqueles que, apesar de não serem considerados essenciais, quando inseridos na dieta aumentam a capacidade do organismo em reagir às situações de estresse, sendo então chamados de “condicionalmente essenciais” (Gupta *et al.* 2005). Arginina e glutamina são conhecidos por serem “condicionalmente essenciais” (Vissek 1984), e uma mistura desse e outros aminoácidos foi capaz de aumentar a atividade de hormônios adrenocorticóides e outros hormônios em atletas durante o exercício (di Luigi *et al.* 1999). Não há na literatura informações suficientes para se compreender de que forma a arginina suplementar poderia atuar para aumentar a resposta do cortisol ao exercício intenso e aos outros tipos de estresse, sendo necessários, portanto, mais estudos nesta direção.

Diferentemente do tambaqui, o matrinhã não apresentou qualquer efeito da dieta nos níveis de cortisol plasmático, porém o exercício causa o aumento deste hormônio de forma proporcional à sua intensidade. Enquanto que para tambaqui o exercício moderado já foi suficiente para elevar os níveis de cortisol

ao máximo, para matrinchã ficou claro que a velocidade moderada não é fator suficiente de estresse. Chama também atenção o fato de os níveis de cortisol de matrinchã serem mais baixos que de tambaqui em qualquer condição de exercício, porém similares quando em repouso. Desta forma fica claro que o matrinchã é muito menos sensível ao efeito estressante da natação do que o tambaqui, mesmo quando ambos são levados à exaustão. A glicose do matrinchã seguiu o mesmo padrão observado em tambaqui, com valores proporcionais à intensidade do exercício e sem efeito do tipo de suplemento. Apesar dos diferentes níveis de cortisol observados nas espécies nas diferentes condições testadas, a manutenção de níveis similares de glicose sugere a participação do cortisol em outros processos além da glicemia, como por exemplo, na osmoregulação.

4.2. Lactato

Os músculos brancos (anaeróbicos) são os principais produtores de lactato e nos músculos vermelhos e fígado ocorre a maior parte da reconversão do lactato a piruvato de forma aeróbica (Wieser *et al.* 1987; Moyes e West 1995). Novas suposições apontam que o acúmulo de lactato se daria pelo desequilíbrio entre a geração e o seu consumo pelos músculos vermelhos. Vários processos estariam atuando para dificultar sua oxidação e causar o acúmulo durante o exercício, entre eles a vasoconstrição nos músculos consumidores de lactato não ligados ao exercício, e a dificuldade das células de realizar glicólise intensamente e oxidar lactato ao mesmo tempo (Gladden 2004). Uma vez que o lactato é produzido e não é consumido, acumula-se no músculo e, em seguida, extravasa para o plasma. Na análise do lactato plasmático, verificamos em tambaqui que o exercício moderado e prolongado aumenta mais os níveis de lactato do que o exercício incremental até a fadiga, enquanto que em matrinchã os níveis de lactato aumentam com a intensidade do exercício. Isso provavelmente ocorre porque para tambaqui, assim como verificado nos níveis de cortisol, o exercício “moderado” já é forte o suficiente para ativar o metabolismo anaeróbico e dificultar a oxidação do lactato gerado. Isso pode estar relacionado com o seu formato de corpo, pois sendo mais arredondado que

o matrinchã, não tem a mesma hidrodinâmica. Desta forma fica claro que não é só a intensidade da natação que é capaz de resultar em acúmulo de lactato no plasma do tambaqui, o tempo de exercício (2 horas neste caso) também tem participação quando a velocidade é moderada. Em matrinchã os níveis de lactato aumentam com a intensidade do exercício, ou seja, atinge os maiores valores durante o teste incremental até a fadiga. O mesmo padrão de aumento de lactato no plasma visto neste capítulo, foi visto no capítulo I, indicando haver um maior esforço do tambaqui em vencer velocidades mais baixas do que o matrinchã. Também, o matrinchã apresenta maiores níveis de lactato em qualquer circunstância, mesmo basal, no plasma e no músculo branco (capítulo I), o que indica que essa espécie é muito mais especializada em obter energia de forma anaeróbica do que o tambaqui. Ferreira e colaboradores (2010) verificaram que matrinchã pode acumular grandes quantidades de lactato no plasma sem perder a capacidade natatória. Assim como retardar o acúmulo de lactato parece ser uma adaptação de bons nadadores, suportar níveis elevados também é essencial.

4.3. NOx plasmático e muscular

Nos músculos vermelhos o óxido nítrico participa no desempenho natatório à medida que aumenta a perfusão sanguínea, levando mais oxigênio até as moléculas de mioglobina presentes em grande quantidade nessa região. No entanto, o óxido nítrico pode ser produzido mesmo sem a presença de oxigênio, e ao invés de ocorrer a partir da arginina, ocorre a partir das reservas de nitrito e nitratos (Kroupova *et al.* 2005; Jensen 2007; Hansen e Jensen 2010). A hemoglobina desoxigenada, chamada de desoxihemoglobina, é a responsável por reduzir, de forma alostérica, o nitrito ao óxido nítrico, em um processo que ocorre tanto na hemoglobina do sangue quanto na mioglobina nos músculos (Shiva 2013). O peixe dourado (*Carassius auratus*) exposto à hipóxia (30 mgHg) por 2 dias teve queda nos níveis de nitrito no plasma, porém no músculo branco eles permaneceram constantes. Foi sugerido pelos autores que houve a migração dos nitritos em direção ao músculo na tentativa de dilatar os vasos sanguíneos e melhorar a oxigenação (Hansen e Jensen 2010). No entanto, durante o exercício do presente experimento, em ambas as espécies, apesar do

óxido nítrico ter aumentado no músculo vermelho, não há qualquer alteração do óxido nítrico plasmático, indicando que não houve qualquer necessidade de utilizar esta reserva do plasma para auxiliar na oxigenação dos músculos. Por mais que a natação tenha gerado lactato plasmático em ambas as espécies, não parece ter ocorrido déficit de oxigênio suficiente para disparar os mecanismos anaeróbicos de vasodilatação. Isso reforça a tese discutida no capítulo I, de que o lactato é continuamente gerado em praticamente qualquer nível de exercício e o que causa seu acúmulo é a incapacidade de oxidá-lo a medida que a intensidade do exercício aumenta. O aumento do óxido nítrico verificado no músculo vermelho de ambas as espécies, em ambos os tipos de exercício, certamente foi produzido pela via aeróbica, estimulada pelo atrito aumentado do sangue no epitélio vascular (Pohl *et al.* 1986; Rubanyi *et al.* 1986; Hutcheson e Griffith 1991). O aumento no entanto, não ocorreu da mesma forma em tambaqui e matrinhã. Assim como já demonstraram os demais parâmetros medidos, o exercício moderado aumentou as concentrações de óxido nítrico muscular nos mesmos níveis do exercício até a fadiga em tambaqui. Conforme já discutido, a menor capacidade desta espécie em vencer a velocidade moderada faz com que o animal, já nesta velocidade, altere toda a sua fisiologia afim de amenizar o estresse. Esta mesma reação do óxido nítrico do músculo nas velocidades mais baixas, também foi vista e discutida no capítulo I, quando o tambaqui daquele experimento também teve o óxido nítrico do músculo vermelho aumentado repentinamente nas primeiras velocidades do teste natatório. Ao contrário, o matrinhã analisado no capítulo I apresentou aumento do óxido nítrico do músculo vermelho de forma gradual, conforme a intensidade do exercício aumentava. O mesmo ocorreu no presente experimento com matrinhã, quando o exercício moderado aumentou o óxido nítrico muscular de forma intermediária, aumentando para valores ainda maiores no exercício até a fadiga. Isso demonstra mais uma vez que a velocidade moderada não é capaz de estressar de forma intensa o matrinhã, dada sua forma fusiforme e sua fisiologia adaptada ao exercício, confirmando sua superioridade em enfrentar o estresse natatório. Chama a atenção o fato de que, em matrinhã, a suplementação da ração com arginina favoreceu a maior produção de óxido nítrico muscular, enquanto que o L-NAME impediu uma elevação intensa. Esse mesmo efeito da suplementação não pode ser visto em tambaqui, provavelmente porque os níveis de óxido nítrico

são sempre menores nesta espécie, seja em condições basais ou sob exercício. Uma vez que o óxido nítrico tem níveis muito mais baixos em tambaqui, há pouca margem pra modulação dos seus valores por fatores nutricionais. Ao contrário, em matrinhã os níveis de óxido nítrico sofrem alterações em grande escala devido ao exercício, facilitando com que a arginina e o L-NAME possam agir com efeitos moduladores. Esses resultados deixam claro que, ao menos para matrinhã, os níveis de óxido nítrico do músculo vermelho podem ser aprimorados ou deteriorados após o exercício, por meio da adição de pequenas quantidades de aminoácidos específicos na dieta.

4.4. Triglicerídeos plasmáticos

A distribuição das reservas de lipídeos varia bastante mesmo entre os vertebrados, mas em peixes estão concentradas principalmente no mesentério, no fígado e nos músculos vermelhos (Sheridan 1994). Sabemos que muitas espécies de peixes se baseiam fortemente nos ácidos graxos para suprir a demanda energética durante o exercício submáximo (Kieffer *et al.* 1998), justamente quando observarmos aumento nos níveis plasmáticos do cortisol destes animais (Mommsen *et al.* 1999). A maior parte das gorduras é armazenada nos tecidos na forma de triglicerídeos, que quando necessários são quebrados por lipases em glicerol e ácidos graxos. Os ácidos graxos circulam no sangue até alcançarem os órgãos-alvos, como por exemplo, os músculos exercitados (Moyes e West 1995).

Não observamos alterações nos níveis plasmáticos de triglicerídeos devido ao exercício, independentemente do tipo de suplementação. Apesar do aumento da demanda por ácidos graxos durante o exercício, a ausência de alterações nos níveis plasmáticos de triglicerídeos ocorre porque na circulação eles são apenas armazenados, e não são mobilizados pelas lipases neste local. A atuação das lipases quebrando os triglicerídeos em ácidos graxos e glicerol ocorre apenas em outros tecidos, como por exemplo, nos músculos e fígado. Também não verificamos efeito da suplementação com L-NAME, alanina ou arginina sobre os triglicerídeos plasmáticos, antes ou após o exercício. Embora não existam informações para peixes, Jobgen e colaboradores (2006)

verificaram que a suplementação da dieta para ratos com L-arginina reduziu as gorduras corpóreas e aumentou a expressão de genes responsáveis pela oxidação de glicose e ácidos graxos. O mecanismo, embora ainda não totalmente identificado, seria o estímulo da arginina sobre a produção e óxido nítrico, que por sua vez atuaria sobre múltiplos mecanismos mediados pelo GMP cíclico, como por exemplo, a ativação das lipases e perilipinas e ativação dos receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPARs) (Jobgen *et al.* 2006).

Em outro estudo com ratos, seja em animais alimentados com dieta rica ou pobre em gorduras, a suplementação com arginina diminuiu os níveis plasmáticos de triglicerídeos em relação à animais que receberam ração suplementada com alanina (Jobgen *et al.* 2009), indicando que a maior utilização deste substrato diminuiu suas reservas inclusive no plasma. No presente estudo, não observamos qualquer efeito da suplementação da dieta de tambaqui e matrinhã com arginina, alanina ou L-NAME sobre a concentração de triglicerídeos plasmáticos, antes ou após o exercício. Os dados de NOx muscular indicam que a suplementação com arginina favoreceu com que, após o exercício incremental, os valores de óxido nítrico no músculo vermelho de matrinhã fossem maiores que nos demais grupos. Isso indica que houve um efeito da suplementação de arginina sobre a capacidade dessa espécie em gerar óxido nítrico durante o exercício, mas não nos níveis basais de óxido nítrico, o que poderia ser necessário para se verificar efeitos sobre o metabolismo das gorduras em peixes. Embora esses dados preliminares indiquem que não há efeito da suplementação com arginina sobre o metabolismo das gorduras destas espécies, mais trabalhos precisam ser realizados afim de se verificar se níveis maiores de arginina podem aumentar a atividade da sintase do óxido nítrico e o NOx basal em peixes, e se esses dois parâmetros, juntos ou isolados, podem interferir na atividade das lipases sobre os triglicerídeos.

4.5. Ucrit

Não pudemos observar qualquer alteração na Ucrit decorrente do tipo de alimentação, em ambas as espécies de peixes, embora possa ser visto que o

matrinchã, conforme esperado, possui um melhor desempenho que o tambaqui. Apesar do efeito causado pela arginina e pelo L-NAME de aumentar e diminuir, respectivamente, os níveis de óxido nítrico no músculo vermelho do matrinchã, após o exercício até a fadiga, isso não afetou sua Ucrit. Conforme discutido no capítulo I, o aumento antecipado e rápido do óxido nítrico nos músculos vermelhos já nas primeiras etapas do exercício, poderia ser um fator importante para aumentar o desempenho dos peixes, mas o nosso desenho experimental foi capaz apenas de identificar que a arginina eleva o nível máximo de óxido nítrico alcançado no fim do exercício, não nos permitindo identificar se o mesmo ocorreu nas etapas iniciais do teste. Um indício de que não ocorreu, é que no teste de velocidade moderada não houve diferença nos níveis de óxido nítrico muscular em função da arginina no matrinchã, indicando, portanto, que a arginina realmente só ajuda a aumentar o óxido nítrico no momento exato da fadiga. Desta forma, o aumento do óxido nítrico auxiliaria apenas na recuperação do exercício, mas não no aumento do desempenho.

5. Conclusões

Os resultados obtidos nos permitem concluir que o óxido nítrico não é um fator determinante da capacidade natatória máxima do matrinchã se não é liberado já nas fases iniciais do exercício. A suplementação da ração com pequenas doses de arginina não resultou no aumento do desempenho de matrinchã porque só ajuda a elevar o óxido nítrico no momento da fadiga, mas pode favorecer a recuperação do matrinchã por permitir uma melhor perfusão sanguínea após o exercício, e na do tambaqui, por favorecer um maior aumento dos níveis de cortisol como resposta ao esforço natatório. A piscicultura é uma atividade em plena expansão não só no estado do Amazonas mas também no mundo todo, e os resultados podem ajudar no desenvolvimento de técnicas de alta produtividade. A otimização do uso dos recursos disponíveis para pesca ou piscicultura são uma saída para mitigar os efeitos antrópicos sobre o meio ambiente.

6. Bibliografia

- Agnisola, C. 2005. Role of nitric oxide in the control of coronary resistance in teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142:178–87.
- Alderton, W. K.; Alderton, W. K.; Cooper, C. E.; Cooper, C. E.; Knowles, R. G. Knowles, R. G. 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical Journal*, 357:593–615.
- Andrew, P. J.; Mayer, B. 1999. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 43:521-531.
- Barton B. A.; Schreck C. B.; Barton L. D. 1987. Effects of chronic cortisol administration and daily acute stress on growth, physiological conditions, and stress responses in juvenile rainbow trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, 2:173–185
- Barton B. A.; Iwama G. K.; 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1:3–26
- Basu, N.; Nakano, T.; Grau, E. G.; Iwama, G. K. 2001. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *General and Comparative Endocrinology*, 124:97–105.
- Brett, J. R. 1964. The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 21:1183-1226.
- Cerqueira, N. F.; Yoshida, W. B. 2002. Óxido nítrico: revisão. *Acta Cirurgica Brasileira*, 17:417-423.
- Davison, W. 1997. The Effects of Exercise Training on Teleost Fish, a Review of Recent Literature. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117:67–75.
- Di Luigi, L.; Guidetti, L.; Pigozzi, F.; Baldari, C.; Casini, A.; Nordio, M.; Romanelli, F. 1999. Acute amino acids supplementation enhances pituitary

- responsiveness in athletes. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 31:1748–54.
- de Boeck, G.; Alsop, D; Wood, C. 2001. Cortisol effect on aerobic and anaerobic metabolism, nitrogen excretion and whole- body composition in juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 74:858–868
- Ferreira, M. S. 2006. *Certificado de vigor físico para o tambaqui (Colossoma macropomum, Cuvier 1818)*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas. 55p.
- Ferreira, M. S.; de Oliveira, A. M.; Val, A. L. 2010. Velocidade crítica de natação (Ucrit) de matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exposição à hipoxia. *Acta Amazonica*, 40(4):699–704.
- Ferreira, M. S.; Aride, P. H. R.; da Silva, M. de N. P.; Val, A. L. 2013. Efeito da quantidade de proteína na dieta e treinamento físico sobre parâmetros fisiológicos e zootécnicos de matrinxã (*Brycon amazonicus*, Günther 1869). *Acta Amazonica*, 43:439–446.
- Flora Filho, R.; Zilberstein, B. 2000. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 46:265–271.
- Furuya, W. M.; u, Botaro, D.; Neves, P. R.; Silva, L. C. R.; Hayashi, C. 2004. Exigência de lisina pela Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), na fase de terminação. *Ciência Rural*, 34(5):1571-1577.
- Gladden, L. B. 2004. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millennium. *The Journal of Physiology*, 558:5–30.
- Gomes, L. de C.; Lima, C. A. R. M. A.; Roubach, R.; Urbinati, E. C. 2003. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38:283-290.
- Gregory, T. R; Wood, C. M. 1999. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming

performance of juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72:286–295

Gupta, V.; Gupta, A.; Saggi, S.; Divekar, H. M.; Grover, S. K.; Kumar, R. 2005. Anti-stress and Adaptogenic Activity of L-Arginine Supplementation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2:93–97.

Hansen, M. N.; Jensen, F. B. 2010. Nitric oxide metabolites in goldfish under normoxic and hypoxic conditions. *The Journal of Experimental Biology*, 213:3593–3602.

Hemre, G. I.; Mommensen, T. P.; Krogdahl, Å. 2002. Carbohydrates in fish nutrition: Effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition*, 8:175–194.

Hoshiya, M. A.; Gonçalves, F. D.; Urbintati, E. C. 2009. Respostas fisiológicas de estresse no matrinxã (*Brycon amazonicus*) após exercício físico intenso durante a captura. *Acta Amazonica*, 39:445–451.

Hutcheson, I. R.; Griffith, T. M. 1991. Release of endothelium-derived relaxing factor is modulated both by frequency and amplitude of pulsatile flow. *The American Journal of Physiology*, 261:257–62.

Jensen, F. B. 2007. Nitric oxide formation from nitrite in zebrafish. *The Journal of Experimental Biology*, 210:3387–3394.

Jensen, F. B. 2009. The role of nitrite in nitric oxide homeostasis: A comparative perspective. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 7:841-848.

Joannides, R.; Haefeli, W. E.; Linder, L.; Richard, V.; Bakkali, E. H.; Thuillez, C.; Lüscher, T. F. 1995. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. *Circulation*, 91:1314–9.

Jobgen, W. S.; Fried, S. K.; Fu, W. J.; Meininger, C. J.; Wu, G. 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17:571–88.

- Jobgen, W.; Meininger, C. J.; Jobgen, S. C.; Li, P.; Lee, M. J.; Smith, S. B.; Wu, G. 2009. Dietary L-arginine supplementation reduces white fat gain and enhances skeletal muscle and brown fat masses in diet-induced obese rats. *The Journal of Nutrition*, 139:230–237.
- Jobgen, W. S.; Fried, S. K.; Fu, W. J.; Meininger, C. J.; Wu, G. 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17:571–88.
- Kieffer, J.; Alsop, D.; Wood, C. 1998. A respirometric analysis of fuel use during aerobic swimming at different temperatures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology*, 201:3123–3133.
- Kobzik, L.; Stringer, B.; Balligand, J. L.; Reid, M. B.; Stamler, J. S. 1995. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 211:375–81.
- Kroupova, H.; Machova, J.; and Svobodova, Z. 2005. Nitrite influence on fish: a review. *Veterinarni Medicina*, 50:461-471.
- Kusner, L. L.; Kaminski, H. J. 1996. Nitric oxide synthase is concentrated at the skeletal muscle endplate. *Brain Research*, 730:238–42.
- Lee, R. P.; Wang, D.; Kao, S. J.; Chen, H. I. 2001. The lung is the major site that produces nitric oxide to induce acute pulmonary oedema in endotoxin shock. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology*, 28:315–20.
- Legate, N. J.; Bonen, A.; Moon, T. W. 2001. Glucose tolerance and peripheral glucose utilization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), American eel (*Anguilla rostrata*), and black bullhead catfish (*Ameiurus melas*). *General and Comparative Endocrinology*, 122:48–59.
- Lowenstein, C. J.; Dinerman, J. L.; Snyder, S. H. 1994. Nitric oxide: A physiologic messenger. *Annals of Internal Medicine*, 120:227-237.

- McCormick, M. D. 2001. Endocrine control of osmoregulation in Teleost fish. *American Zoologists* 41:781–794.
- Mommsen, T. P.; Vijayan, M. M.; Moon, T. W. 1999. Cortisol in teleosts: Dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3):211-268.
- Moncada, S.; Higgs, E. A. 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British Journal of Pharmacology*, 147:193–201.
- Moon, T. W. 2001. Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction? *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129:243–249.
- Morgan, J. D; Iwama, G. K. 1996. Cortisol-induced changes in oxygen consumption and ionic regulation in coastal cut-throat trout (*Oncorhynchus clarki clarki*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 15:385–394
- Moyes, C. D.; West, T. G. 1995. Exercise metabolism of fish. In: Mommsem, T. P. Hochach, P. (Ed). *Metabolic biochemistry. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* (Vol. 4). Elsevier, Amsterdā, p.367-392.
- Ogata, H. Y.; Oku, H. 2000. Effects of Water Velocity on Growth Performance of Juvenile Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 31:225–231.
- Olson, K. R.; Donald, J. A. 2009. Nervous control of circulation:the role of gasotransmitters, NO, CO, and H₂S. *Acta Histochemica*, 111:244–256.
- Pohl, U.; Holtz, J.; Busse, R.; Bassenge, E. 1986. Crucial role of endothelium in the vasodilator response to increased flow in vivo. *Hypertension*, 8:37–44.
- Rubanyi, G. M.; Romero, J. C.; Vanhoutte, P. M. 1986. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *The American Journal of Physiology*, 250:1145–1149.
- Rudnick, J.; Püttmann, B.; Tesch, P. A.; Alkner, B.; Schoser, B. G. H.; Salanova, M.; Blottner, D. 2004. Differential expression of nitric oxide synthases (NOS

- 1-3) in human skeletal muscle following exercise countermeasure during 12 weeks of bed rest. *Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18:1228–30.
- Sheridan, M. A. 1994. Regulation of lipid metabolism in poikilothermic vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 107:495–508.
- Shiva, S. 2013. Nitrite: A Physiological Store of Nitric Oxide and Modulator of Mitochondrial Function. *Redox Biology*, 1:40–44.
- Tort, L. 2010. Stress in farmed fish: its consequences in health and performance. In: Koumoundouros, G. (Ed). *Recent advances in aquaculture research*. Transworld Research Network, Kerala, p.55–84.
- Tota, B.; Amelio, D.; Pellegrino, D.; Ip, Y. K., Cerra; M. C. 2005. NO modulation of myocardial performance in fish hearts. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, 142:164–177.
- Wendelaar, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77:591–625
- Wieser, W.; Lackner, R.; Hinterleitner, S.; Platzer, U. 1987. Distribution and properties of lactate dehydrogenase isoenzymes in red and white muscle of freshwater fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 3:151–62.
- Wright, C. E.; Rees, D. D.; Moncada, S. 1992. Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovascular Research*, 26:48–57.
- Vijayan, M. M.; Pereira, C.; Grau, E. G.; Iwama, G. K. 1997. Metabolic responses associated with confinement stress in tilapia: The role of cortisol. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 116:89–95.
- Visek WJ. 1984. An update of concepts of essential amino acids. *Annual Review of Nutrition*, 4:137–55.

Considerações finais e perspectivas

Os efeitos da crise ambiental, que tem se instalado em dimensões cada vez maiores em todo o planeta, gera impactos de ordem social e ambiental, e na Amazônia essa questão tem se tornado cada vez mais evidente. Além disso, sabe-se que o intenso processo de degradação ambiental e as intervenções humanas mal planejadas causam desequilíbrio ambiental e produzem impactos na perpetuação das espécies, sendo a extinção um perigo eminente.

Diante disso, evidenciou-se nessa pesquisa dois elementos que incidem diretamente nessas questões, o primeiro seria a possibilidade de criar estratégias sustentáveis a partir da piscicultura, com o aumento da produtividade na criação do tambaqui e matrinhã, podendo melhorar as condições de vida e de trabalho das pessoas que moram na região. O segundo seria a probabilidade das espécies manterem seu sucesso reprodutivo diante de intervenções no seu habitat, sendo que a pesquisa demonstrou diferenças importantes nas características fisiológicas entre essas espécies, evidenciadas durante as observações do óxido nítrico, determinante na sua capacidade natatória.

Nesse sentido, as perspectivas apontadas para a piscicultura referem-se à aumentar a produção de tambaqui e matrinhã utilizando o mínimo de recurso da natureza como opção para promover o desenvolvimento da região, uma proposta que se adequa não somente as questões econômicas mas inclui também as dimensões sociais e ambientais.

O interesse em potencializar a prática da piscicultura pode trazer melhorias para a região, e a partir do desenvolvimento de novas estratégias de produção, poder-se-ia gerar:

(a) melhorarias nas instalações e mecanismos de criação de peixe, aumentando a relação custo – benefício, oferecendo condições para que o piscicultor tenha maior produção com baixo custo (abrangência econômica);

(b) diminuir o impacto da pesca predatória, com o incentivo cada vez maior para a criação de peixe em cativeiro, pois a pesca indiscriminada tem colocado várias espécies de peixes amazônicos em posição de risco de extinção (abrangência ambiental); e

(c) impulsionar o desenvolvimento da comunidade, proporcionando melhores condições de vida dos habitantes dessa região (abrangência social).

As perspectivas que apontam para o manejo ambiental são importantes à medida que as espécies de peixes amazônicas, incluindo o tambaqui e o matrinhã, tem seu habitat ameaçado diante das intervenções humanas atuais. Um exemplo é a construção de barragens para implantação de hidrelétricas, que pode, entre outras possibilidades, diminuir a capacidade de reprodução de espécies de piracema, já que o desnível acentuado da água entre jusante e montante do rio constitui-se um obstáculo intransponível.

Vários países tem construído sistemas para transposição de peixes, também chamados de escadas, que são uma alternativa para mitigar os efeitos danosos dos barramentos dos cursos d'água sobre as comunidades desses animais. São sistemas consolidados e utilizados há séculos, mas que devem ser replicados com cautela na nossa região, uma vez que não há estudos suficientes sobre a fisiologia natatória das espécies locais. Para se construir uma escada que um conjunto de espécies possa usar de forma eficaz, é necessário o entendimento de como elas respondem ao ambiente, especialmente à velocidade da água e ao desenho da escada.

Nesse sentido, esta pesquisa oferece algumas contribuições que direcionam para a preservação das espécies de peixes amazônicos, considerando as particularidades da região, especialmente ao mostrar que a diferença na capacidade natatória entre tambaqui e matrinhã é, ao menos em parte, devido às diferenças na produção de óxido nítrico ao longo do exercício, podendo refletir-se na sua capacidade de transpor as escadas.

Estudos histológicos ainda são necessários para se confirmar se o efeito benéfico do óxido nítrico sobre o desempenho natatório é de fato o aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos, conforme bem estabelecido para outras espécies de animais, ou se em peixes este gás pode ter funções diferentes durante o exercício. Outra pergunta a ser respondida é qual a relação entre o desaparecimento do lactato muscular de peixes fadigados e a vasodilatação, induzida ou não de forma artificial por fármacos, nos dando uma ideia de como o óxido nítrico participa na recuperação desses animais. Contudo, é necessário

saber também, por meio de técnicas de biologia molecular, quais isoformas da sintase do óxido nítrico se expressam com mais intensidade nos músculos de peixes exercitados, uma vez que a expressão aumentada da forma neuronal, além da endotelial, poderia sugerir outras funções além da vasodilatação. Sendo o óxido nítrico capaz de aumentar o desempenho natatório e/ou a recuperação do estresse decorrente do exercício, necessita-se também saber se a suplementação da dieta dos peixes com arginina, com reflexos na produção de óxido nítrico, poderia influenciar nos índices zootécnicos de peixes cultivados em água corrente, já que tanto o estímulo do exercício quanto a recuperação do organismo são fatores essenciais para incremento de massa muscular de qualquer espécie.

Pouco se sabe sobre os efeitos do óxido nítrico em peixes, e muito menos nas espécies amazônicas e, embora seja uma molécula muito estudada, tem funções tão variadas que se torna impossível prever suas possíveis funções nestes animais. É fato que ele surge nesta tese como algo promissor para a piscicultura e o manejo ambiental, merecendo, sem dúvida alguma, estudos mais aprofundados.