



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MODELO PARA INTERVENÇÃO HORMONAL EM PEIXES E O SEU USO  
NO ESTUDO DOS EFEITOS DA INSULINA SOBRE O METABOLISMO DE  
CARBOIDRATOS E LIPÍDIOS EM PACU JUVENIL,  
*Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887)

MÁRCIA QUEIROZ LATORRACA

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato(a)  
Márcia Queiroz Latorraca  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação submetida ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual  
de Campinas, para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências Biológicas,  
na área de Fisiologia.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Marta H. Krieger-Azzolini <sup>afilia</sup>  
*conf. c. pos-grad.*

CAMPINAS - SÃO PAULO  
1994



1994

UNIDADE	BC
CHAMADA:	7/UNICAMP
	L351m
Es.	
OMBO BC/	21154
ROC.	286/94
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	CR\$ 800,00
DATA	22/03/94
CPD	

CM-00057989-9

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL - UNICAMP

L351m      Latorraca, Marcia Queiroz  
Modelo para intervencao hormonal em peixes e o seu uso no estudo dos efeitos da insulina sobre o metabolismo de carboidratos e lipidios em pacu juvenil, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) / Marcia Queiroz Latorraca. -- Campinas, SP : [s.n.], 1994.

Orientador : Marta Helena Krieger-Azzolini.  
Dissertacao (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Insulina. 2. Glicemia. 3. Acidos graxos nao-esterificados. 4. Glicogenio. 5. Hidrocortisona. 6. Cateterismo. 7. *Piaractus mesopotamicus*. I. Krieger-Azzolini, Marta Helena. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

20. CDD - 596.013 3 - 574.192 481 3  
- 574.192 47 - 574.192 482  
- 574.192 434 - 636.089 7 - 597

Indices para catalogo sistematico:

1. Insulina 596.013 3
2. Glicemia 574.192 481 3
3. Acidos graxos nao-esterificados 574.192 47
4. Glicogenio 475.192 482
5. Hidrocortisona 574.192 434
6. Cateterismo : Medicina veterinaria 636.089 7
7. *Piaractus mesopotamicus* 597

Aos meus pais,

Palmino e Adiles

Aos meus irmãos,

Marília e Tadeu

Ao Carlos Henrique

Dedico

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marta Helena Krieger-Azzolini, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Júlio Sérgio Marchini, que despertou em mim o interesse pela pesquisa.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Boschero, pelo incentivo e apoio.

Ao Biólogo José Augusto Ferraz de Lima, pelas valiosas idéias, apoio e incentivo durante a execução deste trabalho.

Ao Economista Francisco Palhares, ex-chefe do Centro de Pesquisa e Treinamento e Treinamento em Aqüicultura (CEPTA-IBAMA) pela oportunidade e facilidades concedidas para a realização deste trabalho nesse Centro.

À Profa. Rosa Helena Crestana, pelo auxílio no aprendizado da técnica de implante de cânula em peixes.

Ao Biólogo Roberto Huet de Salvo Souza pela confecção da mesa cirúrgica e caixas de experimentação.

Ao Prof. Dr. Eduardo Kokubun, pela colaboração na análise dos resultados do presente trabalho e pelas valiosas sugestões na fase de pré-banca.

Às Professoras Dra. Regina Célia Spadari-Bratfisch, Dra. Maria Inês Nogueira, Dra. Naomi S. Hell pela análise da dissertação e sugestões consistentes na fase de pré-banca.

À Profa. Dra. Ieda T. Verreschi pela validação e execução das dosagens de cortisol plasmático.

Às Bibliotecárias Jacqueline Françoise Bressan Neptune e Gláucia Maria Ayres Brandão, pela correção das referências bibliográficas e elaboração da ficha catalográfica.

A todos os pesquisadores e funcionários do CEPTA que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial aos Biólogos Rosely O. Ramos, Luís Alberto Gaspar, Paulo Sérgio Ceccarelli, Claudio Bock, ao Zootecnista Osmar Cantelmo e ao Técnico Donizetti Aparecido Ribeiro.

Às Biólogas Patrícia Oliveira Gunninger e Carla Petti Garcia pelo auxílio nas análises laboratoriais.

Aos técnicos do Laboratório de Biodinâmica do Departamento de Educação Física do Instituto de Biociências da UNESP-Rio Claro pela contribuição na análise de glicogênio e ácidos graxos livres.

À Maria Elidia dos Santos pelo incentivo e colaboração.

Aos docentes e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica da UNICAMP, pelos ensinamentos e convivência agradável.

Ao Prof. Everardo Magalhães Carneiro pela amizade e incentivo constantes.

Aos colegas da Pós-Graduação pelo apoio e amizade.

À Marise A. de Barros Reis, Verônica S. Valentinuzzi e Lenir Vaz Guimarães pela agradável convivência, incentivo, apoio e amizade.

Ao Carlos Henrique Fregadolli pelos inúmeros auxílios na metodologia e criteriosa análise estatística.

À CAPES-PICD pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO .....	1
2 - OBJETIVOS .....	9
3 - MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 - <u>Animais</u> .....	10
3.2 - <u>Implante de Cãnula Crônica na Aorta Dorsal e Manutenção dos Animais</u> .....	10
3.3 - <u>Recuperação Pós-Implante de Cãnula</u> .....	17
3.4 - <u>Efeito da Administração Intra-Arterial de Insulina Sobre a Glicemia</u> .....	18
3.5 - <u>Ação da Menor Dose Efetiva de Insulina Sobre as Reservas de Carboidratos e Ácidos Graxos Livres Plasmáticos</u> .....	19
3.6 - <u>Coleta e Processamento das Amostras Sangüíneas e de Outros Tecidos</u> .....	20
3.7 - <u>Métodos de Análises Bioquímicas</u> .....	21
3.8 - <u>Parâmetros Morfométricos e Unidades de Medida</u> .....	22
3.9 - <u>Análises Estatísticas</u> .....	22
4 - RESULTADOS	
4.1 - <u>Recuperação Pós-Implante de Cãnula</u> .....	23
4.2 - <u>Efeito da Administração Intra-Arterial de Insulina Sobre a Glicemia</u> .....	27
4.3 - <u>Ação da Menor Dose Hipoglicemiante de Insulina Sobre as Reservas de Carboidratos e Ácidos Graxos Livres Plasmáticos</u> .....	40

5 - DISCUSSÃO	
5.1 - <u>Recuperação Pós-Implante de Cânula</u> .....	46
5.2 - <u>Efeito da Administração Intra-Arterial de Insulina Sobre a Glicemia</u> .....	49
5.3 - <u>Ação da Menor Dose Hipoglicemiante de Insulina Sobre as Reservas de Carboidratos e Ácidos Graxos Livres Plasmáticos</u> .....	52
6 - CONCLUSÕES .....	56
7 - RESUMO .....	58
8 - SUMMARY .....	60
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## 1 - INTRODUÇÃO

A unidade neuro-endócrina regula uma série de eventos bioquímicos e fisiológicos, permitindo a completa integração dos organismos às características e alterações do meio externo.

As linhas gerais de organização do sistema endócrino permaneceram praticamente inalteradas no curso da evolução, uma vez que com exceção da placenta e da paratireóide, as demais glândulas estão presentes em todas as classes de vertebrados. Todavia, os hormônios polipeptídios evoluíram como resultado de mudanças geneticamente determinadas e os receptores se diferenciaram quanto a estrutura e localização tecidual. As mudanças progressivas da molécula hormonal resultaram no aumento do número de hormônios de cada "família" de peptídios homólogos e as alterações da estrutura e localização dos receptores determinaram ações biológicas diversas para um mesmo hormônio em diferentes classes de vertebrados (FONTAINE, 1985).

No entanto, existem hormônios peptídios como a insulina, que apresentam um grande número de aminoácidos conservativos, encontrados na mesma seqüência e posição em classes tão distantes como os agnatas e os mamíferos (PFEIFFER, 1993). A insulina é encontrada em todos os vertebrados (PFEIFFER, 1993) e, em alguns invertebrados, substâncias semelhantes a insulina foram identificadas em extratos de intestino e tecidos associados (BENTLEY, 1982; PLISETSKAYA; JOOSSE, 1985).

Os estudos comparativos do pâncreas endócrino de vertebrados têm demonstrado que as primeiras ilhotas isoladas surgem nos peixes primitivos, os agnatas, e estas já apresentam as células B, produtoras de insulina, além das células D, que secretam somatostatina. A glândula endócrina genuína com os quatro

tipos de células (A, B, D e PP) é observada nos elasmobrânquios, uma sub-classe mais desenvolvida (BONNER-WEIR; WEIR, 1979).

Nos vertebrados, a molécula de insulina é constituída pelas cadeias A e B com 21 e 30 aminoácidos, respectivamente, unidas por duas pontes dissulfídicas de cistina. Estudo realizado por PLISETSKAYA *et al.* (1985) comparando a insulina do teleósteo *Oncorhynchus kisutch* com a bovina mostrou que elas diferem em catorze aminoácidos, mas todas as substituições são conservativas do ponto de vista de conformação da molécula e ocorrem em áreas da seqüência mais sujeitas a variações. Com relação ao receptor, MUGGEO *et al.* (1979) sugeriram que as suas propriedades funcionais foram bem conservadas no curso da evolução dos vertebrados, provavelmente mais do que o hormônio.

A insulina é um importante regulador do metabolismo intermediário em vertebrados e o seu efeito resulta da ação principalmente no fígado, músculo e tecido adiposo. Em mamíferos, a insulina é o principal hormônio anabólico e estimula a captação de glicose pelo músculo esquelético, cardíaco, glândulas mamárias; e de ácidos graxos e glicose pelo tecido adiposo. Em adição, o hormônio acelera a captação de aminoácidos em vários órgãos, mas preferencialmente no tecido hepático e muscular esquelético. A insulina também inibe a gliconeogênese, a glicólise, a lipólise e a proteólise (BENTLEY, 1982). Esse hormônio tem um papel primário na manutenção dos níveis constantes de metabólitos específicos no sangue, principalmente a glicose que é indispensável para a função normal do sistema nervoso central. Todos esses mecanismos foram exaustivamente estudados em mamíferos e, em outras classes de vertebrados, principalmente em peixes, não há concordância quanto a muitos aspectos do controle do metabolismo de carboidratos e lipídios pela insulina.

Durante muito tempo, acreditou-se que os peixes eram deficientes em insulina, tendo em vista a sua inabilidade para regular a glicemia em resposta a uma sobrecarga de glicose. Esse falso conceito foi retificado com a descoberta, nos últimos

anos, de que os níveis de insulina tanto nos agnatas como nos teleósteos é muito maior do que os verificados em mamíferos (MOMMSEN; PLISETSKAYA, 1991). Em experimento realizado com *Oncorhynchus mykiss* (GUTIERREZ *et al.*, 1989), a dieta com elevado teor de carboidratos produziu aumento da insulinemia, do número de receptores de insulina e da interação hormônio-receptor, três a cinco horas após a última alimentação. Esses autores sugeriram que a intolerância à glicose observada nos peixes carnívoros parece refletir a fosforilação inadequada da tirosina-quinase na sub-unidade beta do receptor de insulina ou de algum defeito pós-receptor do sistema transportador de glicose. Mais recentemente, HARMON *et al.* (1991) verificaram que a administração intraperitoneal de glicose (10µg/g de peso corporal) na mesma espécie resultou em hiperglicemia, aumento da somatostatina e do glucagon, enquanto a insulina foi inicialmente suprimida. Eles sugeriram que, em *Oncorhynchus mykiss* as células D pancreáticas são mais sensíveis à glicose do que as células B e que a somatostatina suprime a secreção de insulina, contribuindo para a intolerância à glicose.

A administração de insulina em peixes, produz uma lenta e prolongada queda da glicemia, contudo a magnitude e duração do efeito são variáveis e parecem depender de fatores intrínsecos à espécie e ao indivíduo. LEIBSON; PLISETSKAYA (1968) sugeriram que as diferentes respostas à insulina observadas entre as espécies podem estar relacionadas a posição filogenética, uma vez que peixes primitivos como os ciclóstomos apresentam hipoglicemia mais duradoura se comparados com os teleósteos. De acordo com PLISETSKAYA *et al.* (1976), em teleósteos a mobilidade poderia ser um outro fator importante na determinação da resposta à insulina: peixes bentônicos marinhos e de água doce, quando comparados com os mais ativos, exibem hipoglicemia mais lenta e prolongada em resposta à insulina exógena. A condição nutricional parece também determinar a intensidade e duração da queda glicêmica em resposta à administração de insulina. OTTOLENGHI *et al.* (1982) verificaram que em *Ictalurus melas* adultos a administração intraperitoneal de insulina bovina (60U/Kg de

peso corpóreo) induziu hipoglicemia, mas o efeito hormonal foi mais pronunciado nos animais alimentados do que nos que haviam sido submetidos a um jejum de vinte dias.

Na maioria dos estudos *in vivo*, foram testadas doses de insulina variando entre 2U/Kg e 350U/Kg de peso (CARNEIRO; AMARAL, 1983; INCE; THORPE, 1974; LEIBSON; PLISETSKAYA, 1968; LEWANDER *et al.*, 1976; OTTOLENGHI *et al.*, 1982; PEREZ *et al.*, 1989; THORPE; INCE, 1974), todavia a espécie *Oncorhynchus kisutch* (PLISETSKAYA *et al.*, 1985) exibiu sensibilidade a dose de insulina bovina e espécie-específica tão baixa quanto 0,01U/Kg de peso corporal. Portanto, a principal distinção entre os peixes e os vertebrados superiores em relação ao efeito da insulina não parece ser a sua resistência, mas a sua grande tolerância a hipoglicemias intensas provocadas por doses farmacológicas desse hormônio. Esse fato é atribuído, em parte, a menor dependência do organismo à glicose, particularmente do tecido nervoso, uma vez que algumas espécies possuem reservas de glicogênio cerebral e as utilizam nas situações emergenciais (MOMMSEN; PLISETSKAYA, 1991).

Embora algumas espécies possuam reservas consideráveis de glicogênio cerebral, em geral, o fígado é o principal órgão de estoque, seguido pelo miocárdio, músculo esquelético vermelho e músculo esquelético branco (OTTOLENGHI *et al.*, 1981). Considerando que em teleósteos a musculatura esquelética é composta predominantemente por fibras brancas, esse tecido constitui numa importante reserva de glicogênio, apesar das baixas concentrações encontradas (OTTOLENGHI *et al.*, 1981). O teor de glicogênio tecidual pode ser afetado por fatores fisiológicos e/ou ambientais como exercício, desova, migração, estresse, jejum e sazonalidade (BLASCO *et al.*, 1992; DEAN; GOODNIGHT, 1964; MORALES *et al.*, 1990; MORATA *et al.*, 1982; OTTOLENGHI *et al.*, 1981), mas o padrão de mobilização nessas situações varia entre as espécies.

Ainda que a insulina tenha um papel central no controle da síntese e da estocagem de reservas metabólicas, os relatos a respeito do seu efeito em peixes são conflitantes. Dos experimentos realizados com espécies carnívoras têm evoluído o

conceito que a principal função da insulina é de regulação do metabolismo de proteínas no músculo (ABLETT *et al.*, 1981; COWEY *et al.*, 1977).

Os estudos *in vivo* têm demonstrado que a administração de insulina promove, frequentemente, decréscimo da concentração de glicogênio hepático, acompanhado por aumento ou manutenção do teor de glicogênio muscular (CARNEIRO; AMARAL, 1983; LEWANDER *et al.*, 1976; OTTOLENGHI *et al.*, 1982). Em *Pimelodus maculatus*, um teleósteo de água doce, mantidos em jejum por quatro dias, a administração intraperitoneal de insulina bovina (350U/Kg de peso corporal) induziu hipoglicemia severa, acompanhada por decréscimo do glicogênio hepático e manutenção do glicogênio muscular. Os autores sugeriram que a redução do glicogênio hepático pode ter resultado da ação dos hormônios contra-regulatórios em resposta à hipoglicemia e à aumentada captação da glicose pelos tecidos periféricos. A manutenção do teor de glicogênio muscular foi atribuída ao consumo de glicose pelos processos oxidativos nesse tecido.

Na espécie onívora *Rhamdia hilarii* (MACHADO *et al.*, 1988), mantida com dieta contendo elevado teor de carboidratos, a administração intravenosa de insulina bovina (20U/Kg de peso corporal) resultou em redução da taxa de incorporação da 14-C-glicose em glicogênio no fígado e não alterou a incorporação da mesma no músculo. Eles também atribuíram esses efeitos à liberação de hormônios contra-regulatórios, como o glucagon, principalmente em função da dose farmacológica utilizada nesse estudo.

Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado o efeito anabólico da insulina em peixes, representado pelo aumento do conteúdo de glicogênio em hepatócitos de *Oncorhynchus kisutch* (PLISETSKAYA *et al.*, 1984) e em fatias de fígado de *Notemigonus crysoleucas* (VLAMIG; PARDO, 1975). Em hepatócitos isolados de *Anguilla rostrata* (FOSTER; MOON, 1990) a insulina manteve os níveis de glicogênio e suprimiu a taxa de produção de glicose através da glicogenólise, sendo essa ação

aparentemente mediada, em parte , pelo decréscimo da glicogênio-fosforilase total e também da forma ativa da enzima (glicogênio-fosforilase a). Em hepatócitos isolados de *Salmo gairdneri* (PETERSEN *et al.*, 1987) a insulina inibiu a gliconeogênese a partir do lactato, contudo, na espécie *Hemitripterus americanus* (FOSTER; MOON, 1987) ativou a gliconeogênese a partir da serina e da alanina.

O efeito da insulina sobre as reservas de glicogênio no tecido muscular cardíaco e cerebral foi pouco estudado em peixes. PLISETSKAYA (1968) relatou que a administração intra-peritoneal de insulina suína/bovina (30-80U/Kg de peso) em *Lampetra fluviatilis*, *Dasyatis pastinaca*, *Scorpaena porcus* e *Cyprinus carpio*, resultou em declínio da concentração de glicogênio do cérebro e do músculo cardíaco e em todas as espécies o retorno da glicemia aos níveis iniciais foi acompanhado por restauração do glicogênio nesses tecidos.

Com referência à ação biológica da insulina sobre o metabolismo de lipídios, estudos *in vivo* realizados com várias espécies de teleosteos têm demonstrado que a administração do hormônio determina a redução de ácidos graxos livres plasmáticos (INCE; THORPE, 1975; LEWANDER *et al.*, 1976; MINICK; CHAVIN, 1972) pelo seu efeito anti-lipolítico (HARMON; SHERIDAN, 1992; PLISETSKAYA *et al.*, 1989) e lipogênico (COWLEY; SHERIDAN, 1993; VLAMIG; PARDO, 1975). De acordo com PLISETSKAYA (1980), a intensidade e duração do efeito da insulina *in vivo* são dependentes da via de administração hormonal, da espécie estudada e da sua condição fisiológica.

Em *Esox lucius* (INCE; THORPE, 1975) a administração intra-arterial de insulina bovina (2U/Kg de peso corporal) não alterou a concentração plasmática de ácidos graxos livres, enquanto igual dose de insulina de bacalhau causou redução imediata e significativa em relação aos animais controle entre trinta minutos e nove horas após a intervenção hormonal. Em estudo posterior com essa espécie, nas mesmas condições, a insulina de bacalhau (2U/Kg de peso corporal) estimulou a

incorporação de 14-C de glicose em lipídios hepático e muscular (INCE; THORPE, 1976).

Os conhecimentos obtidos até o momento sobre o papel da insulina na regulação de metabólitos e reserva energéticas em peixes são inconclusivos. Ademais, resultam de estudos conduzidos essencialmente com espécies como lampréias, salmão, enguias, que possuem estratégias de vida complexas; ou com outros peixes de clima temperado que estão sujeitos a condições ambientais diferentes das espécies tropicais.

Dentre os peixes tropicais que têm despertado grande interesse científico nos últimos anos, destaca-se o pacu (*Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887), teleósteo nativo da Bacia Paraná-Paraguai e com ocorrência principal no Pantanal Mato-Grossense, conhecido vulgarmente por pacu, pacu-guaçu ou caranha. De acordo com FERRAZ DE LIMA (1981, 1983), o *Piaractus mesopotamicus* é um peixe de hábito alimentar onívoro, tipicamente reofilico, que empreende longa migração ascendente durante a seca, e na estação chuvosa penetra as zonas de inundação onde permanece em alimentação intensiva até a vazante, quando retorna ao leito do rio e recomeça o ciclo.

Nessa espécie, as investigações têm-se limitado a determinar a composição e a mobilização de reservas energéticas e dos metabólitos plasmáticos frente ao jejum e à realimentação (AKIOSHI *et al.*, 1992; SOUZA *et al.*, 1993), às mudanças sazonais e do ciclo reprodutivo (MONTREZOR *et al.*, 1992; URBINATI, 1991), à sobrecarga de glicose (PIRES *et al.*, 1991) e ao estresse de manejo (KRIEGER-AZZOLINI *et al.*, 1989). O conhecimento sobre o controle endócrino do metabolismo intermediário é ainda restrito, sendo necessários estudos para conhecer o efeito de hormônios como a insulina.

Os estudos de intervenção hormonal exigem a manipulação constante do animal, para as coletas de sangue consecutivas e em curto período de tempo. É de consenso a necessidade de condições experimentais rigorosamente controladas nas investigações dessa natureza. Em peixes, são grandes as dificuldades para obter amostras

sanguíneas seriadas. As técnicas frequentemente empregadas (punção caudal ou cardíaca, secção do pedúnculo caudal e decapitação) e o uso de agentes anestésicos durante esses procedimentos resultam em alterações significativas do estado fisiológico do animal (CHAVIN; YOUNG, 1970; HOUSTON *et al.*, 1971; MORALES *et al.*, 1990).

Em experimento piloto realizado com *Piaractus mesopotamicus* juvenis (LATORRACA, 1992), o manuseio para a administração hormonal e para as coletas consecutivas de sangue determinaram hiperglicemia acompanhada por queda da concentração plasmática de ácidos graxos livres plasmáticos; além disso, não foi possível discriminar os efeitos de diferentes doses de insulina, demonstrando a necessidade de procedimentos menos estressantes.

Com o implante de cânula na aorta dorsal é possível o acompanhamento individual das respostas ao hormônio, por vários dias ou semanas. A manutenção dos peixes em aquário escuro com compartimentos individuais é recomendado para minimizar distúrbios fotosensoriais e padronizar as condições experimentais durante as amostragens (SOIVIO *et al.*, 1975).

A avaliação das alterações endócrino-metabólicas decorrentes da manipulação cirúrgica e das condições de manutenção dos peixes com cânula implantada é essencial para a interpretação dos resultados de experimentos posteriores. Assim, este trabalho teve o propósito de padronizar um modelo para estudo de intervenção hormonal, usando o teleósteo *Piaractus mesopotamicus*. O efeito *in vivo* da insulina sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios, foi investigado em *Piaractus mesopotamicus* juvenis com cânula crônica implantada na aorta dorsal e mantidos em caixa de experimentação especial. Para isto, foi avaliada a ação do referido hormônio sobre a glicemia, as reservas de glicogênio tecidual e a concentração plasmática de ácidos graxos livres.

## 2 - OBJETIVOS

Este trabalho foi executado em três etapas, buscando atingir os seguintes objetivos:

- Verificar a viabilidade do implante de cânula crônica na aorta dorsal em *Piaractus mesopotamicus* e da sua manutenção em caixa de experimentação especial.
- Determinar o tempo requerido para a estabilização dos indicadores endócrino-metabólicos (cortisol, glicose e ácidos graxos livres plasmáticos) após a cirurgia de implante de cânula na aorta dorsal.
- Determinar o intervalo de tempo para o início da intervenção hormonal.
- Determinar a menor dose de insulina capaz de promover hipoglicemia, os tempos de efeito máximo e de recuperação.
- Verificar o efeito da menor dose hipoglicemiante sobre as reservas de glicogênio e de ácidos graxos livres plasmáticos.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Animais

Foram utilizados aproximadamente 200 exemplares de pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*), machos e fêmeas, obtidos de desova induzida e mantidos sob a criação em viveiro natural de 350m<sup>2</sup> em densidade populacional de 1 peixe/m<sup>2</sup>, no Centro de Pesquisa e Treinamento em Aqüicultura (CEPTA), em Pirassununga - São Paulo.

No viveiro de criação, os peixes foram alimentados uma vez por dia, *ad libitum*, com ração balanceada, peletizada, contendo aproximadamente 2600Kcal/Kg (CANTELMO, 1993), produzida pelo Setor de Nutrição e Alimentação Artificial do CEPTA. Em condições experimentais, os peixes permaneceram em jeum.

Os experimentos foram realizados entre dezembro de 1992 e maio de 1993.

#### 3.2 - Implante de Cânula Crônica na Aorta Dorsal e Manutenção dos Animais

Os peixes capturados com puçá, foram anestesiados em recipientes com capacidade para 10 litros, contendo Mentol-5-Metil-2 (1-metiletil) ciclohexanol (mentol cristalino) na concentração de 80ppm por 1,5 a 3,5 minutos até a perda da reatividade aos estímulos externos. A seguir os peixes foram transferidos para a mesa cirúrgica (Figura 1), mantidos sobre a maca em decúbito ventral, tendo o corpo imobilizado pelos suportes paralelos ajustáveis e a cabeça externalizada. A mandíbula foi tracionada para manter a

cavidade bucal aberta. As brânquias foram irrigadas constantemente com solução anestésica de mentol cristalino a 25ppm.

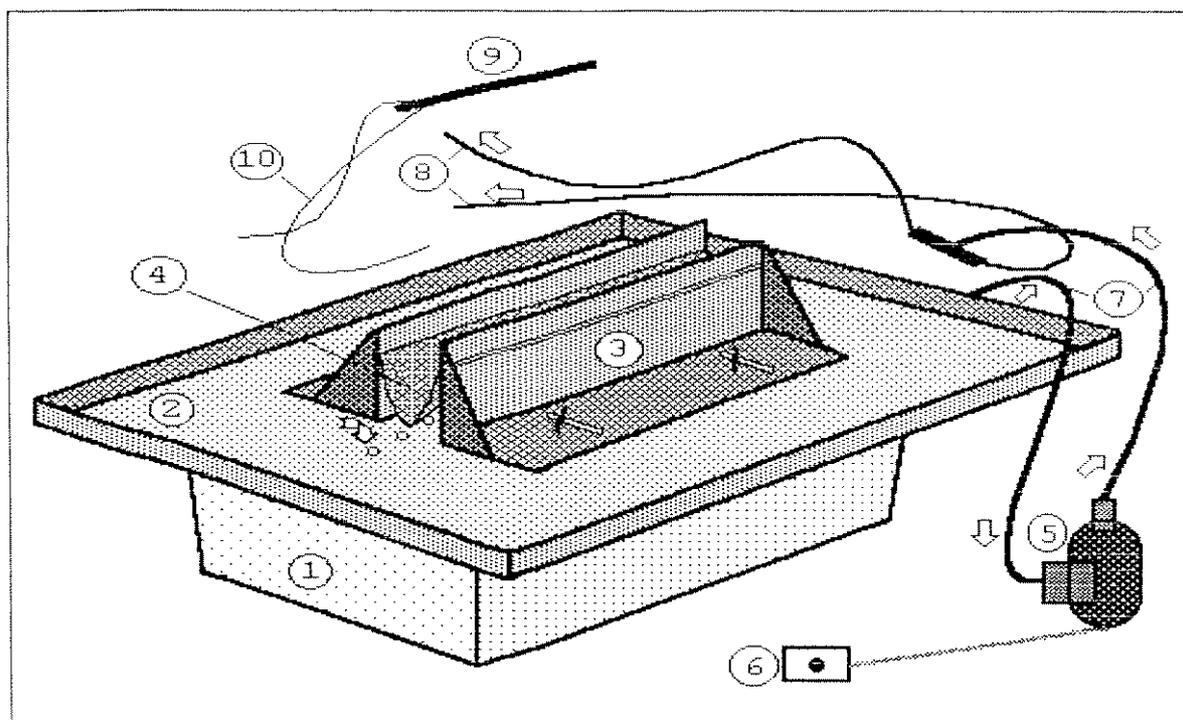
O implante da cânula na aorta dorsal foi conduzido segundo a técnica descrita por SOIVIO *et al.* (1975). O cone nasal (Figura 2C) foi introduzido através de um orifício aberto da narina até o palato, servindo de suporte para a cânula (Figura 2D). A cânula previamente lavada com solução de cloreto de sódio a 0,9% contendo heparina sódica (LIQUEMINE-ROCHE) na concentração de 10U/ml, foi introduzida com o auxílio de um mandril, na linha média de inserção dos arcos branquiais na altura do primeiro par, em um ângulo de 45°. O refluxo de sangue rápido e forte, após a retirada do mandril, foi o indicativo de que a aorta havia sido puncionada. A cânula foi inserida na artéria por aproximadamente 4cm, em seguida externalizada através do cone nasal e suturada no palato. Após acoplamento à extensão, a cânula foi preenchida com 0,2ml de solução fisiológica e heparina sódica, na concentração anteriormente descrita, e vedada.

A Figura 3 mostra um exemplar de *Piaractus mesopotamicus* com a cânula posicionada na aorta dorsal e preenchida com contraste.

Os peixes foram banhados em solução de azul de metileno a 0,3% e transferidos para a caixa de experimentação (Figura 4) construída em acrílico preto, para minimizar distúrbios fotosensoriais causados por movimentos durante a retirada de sangue.

A água de abastecimento da caixa de experimentação apresentou pH e oxigênio dissolvido praticamente constantes (pH=6,1±0,3; oxigênio dissolvido=6,0±0,3mg/l), enquanto a temperatura variou entre 21,0°C e 29,0°C em função do período de realização dos experimentos (Tabela I).

Durante todos os experimentos, adotou-se como medida profilática contra o aparecimento de fungos, a adição de 20ml de uma solução de formal e verde de malaquita no compartimento de entrada de água da caixa de experimentação, uma vez ao



**Figura 1 - Mesa cirúrgica e sistema de irrigação branquial. Componentes: 1- recipiente de plástico (10 litros) com solução anestésica; 2- bandeja de acrílico com orifícios de drenagem; 3- suportes paralelos ajustáveis em acrílico para imobilização do peixe; 4- maca de nylon; 5- bomba de drenagem com potência de 90 watts e pressão máxima de 1,9 metros de coluna de água; 6- controlador de fluxo de água; 7- mangueiras de abastecimento e saída de água; 8- tubos de látex para irrigação das brânquias; 9 e 10- suporte e cordão para retração da mandíbula; ⇨ fluxo da solução anestésica.**



Figura 2 - Fotografia da cânula e do cone nasal. A cânula era composta de duas partes, a inicial e a extensão, com comprimentos de cerca de 30cm e 20cm, respectivamente, confeccionadas com tubos de polietileno Clay-Adams (PE-50 e PE-60) e CPL Medical's (referência nº 10 e 20). (A) Cânula utilizada nos experimentos iniciais. Componentes: 1- parte inicial (Clay-Adams PE-60); 2- extensão (Clay-Adams PE-60); 3- conexão feita com segmento de agulha hipodérmica; 4- tampa feita com arame galvanizado. (B) Cânula modificada que apresentou melhor desempenho. Componentes: 1- parte inicial (CPL Medical's referência nº 20); 2- extensão feita com a porção superior de uma sonda uretral (CPL Medical's referência nº 04) com sistema de vedação próprio, evitando refluxo de sangue; 3- protuberância feita com parafilme enrolado no tubo a 6-7cm da extremidade, funcionando como uma trava para impedir a retirada da cânula; 4- conexão feita com segmentos de tubos de polietileno com maior diâmetro, evitando ocorrência de obstrução; 5- cordão de sustentação da cânula em um varal elástico, impedindo que a cânula caísse dentro da caixa de experimentação ou enrolasse no peixe. (C) Cone nasal confeccionado com tubo de polietileno com diâmetro interno que permitia a passagem da cânula e comprimento de cerca de 4cm. (D) Parte inicial da cânula (Clay-Adams PE-50) (1) mostrando como a protuberância feita com parafilme (3) travava a cânula no cone nasal (2).



Figura 3 - Radiografia de um pacu (*Piaractus mesopotamicus*) juvenil (com peso de 580g e comprimento total de 30,1cm) com cânula implantada na aorta dorsal, preenchida com contraste (Urografina 370).

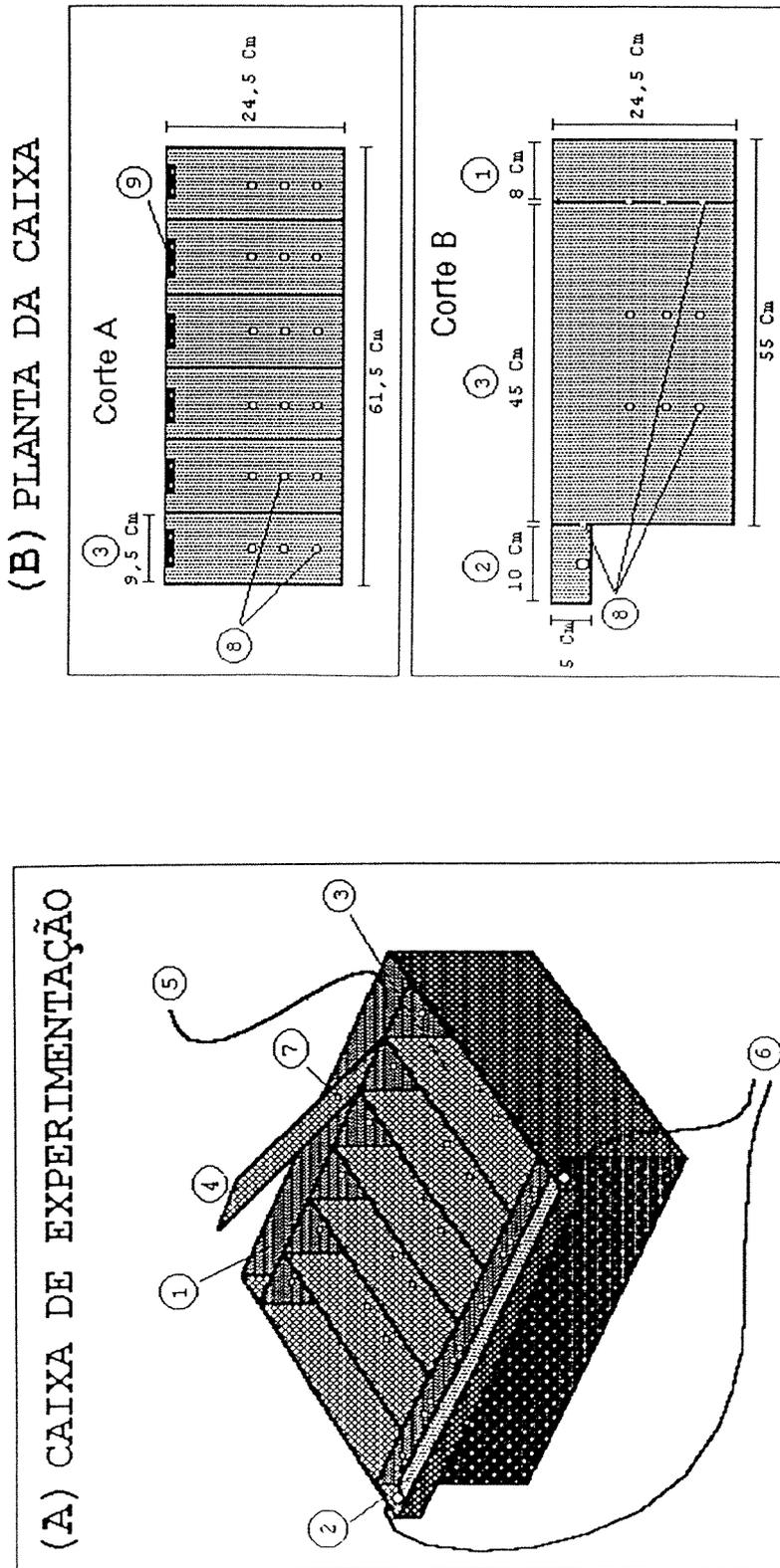


Figura 4 - Caixa de experimentação (A) e sua planta (B). Componentes: 1- compartimento de entrada de água; 2- compartimento de saída de água; 3- compartimento individual com cerca de 8,5 litros; 4- tampa do compartimento individual; 5- mangueiras de abastecimento de água provendo um fluxo constante de 13,5l/min; 6- mangueiras de drenagem; 7- orifício para externalização da câmara; 8- orifícios para circulação de água; 9- dobradiça das tampas.

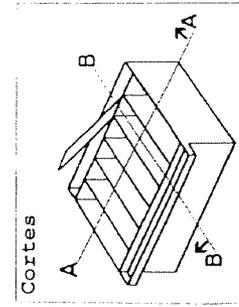


Tabela I - Período de realização dos experimentos com a temperatura da água na caixa de experimentação. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e variação.

EXPERIMENTOS	Número de experimentos	Período de realização					TEMPERATURA (°C)			
		Dez./92	Jan./93	Fev./93	Mar./93	Abr./93	Maiú/93	Média	DP	Amplitude
<u>Recuperação pós-implante de cânula</u>	5	—	—	—	—	—	—	27,0 $\pm$ 1,1	—	25,2--29,0
<u>Efeito hipoglicemiante da insulina</u>										
1,0U/Kg	5	—	—	—	—	—	—	26,2 $\pm$ 0,8	—	24,9--27,9
5,0U/Kg	4	—	—	—	—	—	—	25,8 $\pm$ 0,8	—	24,4--27,0
2,5U/Kg	3	—	—	—	—	—	—	25,6 $\pm$ 0,8	—	24,0--26,9
0,25U/Kg	2	—	—	—	—	—	—	25,2 $\pm$ 0,7	—	24,2--26,3
<u>Efeito da amostragem de sangue/injeção de salina</u>	1	—	—	—	—	—	—	21,3 $\pm$ 0,3	—	21,0--21,8
<u>Efeito da insulina sobre Glicose/AGL/Glicogênio</u>	3	—	—	—	—	—	—	21,8 $\pm$ 1,2	—	20,5--23,9

dia. Essa solução tinha a seguinte composição: 1000ml de formol, 6,5ml de verde de malaquita mais 0,5g de bicarbonato de sódio.

### **3.3 - Recuperação Pós-Implante de Cânula**

A recuperação pós-implante de cânula foi determinada pelo monitoramento dos valores de glicose, ácidos graxos livres e cortisol plasmáticos.

Os peixes foram capturados com rede de arrasto no dia da cirurgia, mantidos em galões com capacidade para 30 litros de água constantemente renovada. A seguir, foram retirados com puçá, anestesiados, pesados, medidos e submetidos ao implante de cânula. Após a cirurgia e antes de serem transferidos para a caixa de experimentação, 1ml de sangue foi coletado através da cânula (T0). O mesmo volume de sangue foi obtido 6 (T6), 12 (T12), 24 (T24), 48 (T48), 72 (T72) e 96 (T96) horas após a primeira amostragem, para dosagem dos parâmetros endócrino-metabólicos de interesse.

Os mesmos parâmetros metabólicos foram determinados em animais sob condição de vida em cativeiro (grupo pré-experimental) para confronto com os valores obtidos após manuseio, cirurgia e manutenção nas condições experimentais.

Para isto, os peixes foram capturados do viveiro com rede de arrasto doze horas após terem sido alimentados, envolvidos em toalhas úmidas para coleta de 2ml de sangue por punção do vaso caudal, no mínimo de tempo possível (3 a 5 minutos). Após a obtenção de dados referentes a peso e comprimento, os peixes foram devolvidos ao viveiro.

### 3.4 - Efeito da Administração Intra- Arterial de Insulina Sobre a Glicemia

Os peixes recém-alimentados foram capturados do viveiro com rede de arrasto em grupos de dezoito animais e mantidos em caixa de fibra de vidro com capacidade de 300 litros e sistema de renovação contínua de água. Após 24 horas foram capturados com puçá, submetidos aos procedimentos para implante de cânula na aorta dorsal e transferidos para a caixa de experimentação.

A intervenção hormonal deu-se 48 horas após a cirurgia para implante de cânula (vide resultados do período de recuperação). Amostras de sangue foram obtidas no curso das 48 horas subsequentes à administração do hormônio.

Insulina suína regular purificada (BIOBRÁS) foi injetada via cânula (0,1ml) em concentrações correspondentes a 0,25U; 1U; 2,5U e 5U/kg de peso corporal. Os animais controles receberam igual volume de solução salina (NaCl a 0,9%). Imediatamente antes da aplicação do hormônio ou da solução salina, amostras de 0,5ml de sangue foram coletadas através da cânula, correspondendo a T<sub>0</sub> (09:00-10:00 horas). Iguais volumes foram obtidos 1 (T<sub>1</sub>), 3 (T<sub>3</sub>), 6 (T<sub>6</sub>), 12 (T<sub>12</sub>), 24 (T<sub>24</sub>) e 48 (T<sub>48</sub>) horas subsequentes à intervenção hormonal ou com solução salina para a determinação da glicemia.

Um experimento adicional foi realizado com o objetivo de verificar a possível causa da queda da glicemia observada nos animais controles.

Grupo com 12 peixes foi submetido aos mesmos procedimentos pré e pós-cirúrgicos adotados nos experimentos para verificação do efeito hormonal.

Findo o período de recuperação, os animais foram divididos em três grupos: o primeiro recebeu tratamento igual ao descrito para os animais controles quanto à administração de solução salina, volume de sangue retirado, número e tempos de coleta. No segundo excluiu-se apenas a injeção de solução salina; e o terceiro foi submetido a duas amostragens nos tempos correspondentes a 6 e 12 horas dos demais

grupos. De todas as amostras foram determinados glicose, ácidos graxos livres e cortisol plasmáticos.

### 3.5 - Ação da Menor Dose Efetiva de Insulina Sobre as Reservas de Carboidratos e Ácidos Graxos Livres Plasmáticos

Após o período de recuperação da cirurgia de implante de cânula, um grupo de peixes foi sacrificado sem que tivesse sofrido qualquer tipo de intervenção (T0). Outro grupo foi submetido à administração de insulina suína purificada (BIOBRÁS) em concentração correspondente a 1U/kg de peso corporal ou solução salina (NaCl a 0,9%), injetadas em volume de 0,1ml.

Os animais foram sacrificados 3 (T3) e 24 (T24) horas após a injeção de hormônio ou solução salina e amostras de tecidos foram imediatamente separadas para determinação do teor de glicogênio.

Desses mesmos animais foram obtidas amostras de sangue via cânula antes (T0) e 1 (T1), 3 (T3), 6 (T6), 12 (T12) e 24 (T24) horas após intervenção para as dosagens de glicose e ácidos graxos livres plasmáticos.

Um grupo de peixes submetidos a jejum de 12 horas foi amostrado no viveiro para determinação do glicogênio tecidual. Os animais foram sacrificados após a coleta de sangue e os dados morfométricos foram obtidos após o sacrifício.

### 3.6 - Coleta e Processamento das Amostras Sangüíneas e de outros Tecidos

#### a) Sangue

Nos experimentos para determinação dos valores pré-experimentais de glicose, ácidos graxos livres e cortisol plasmáticos, as amostras de sangue foram coletadas por punção do vaso caudal, usando-se seringas descartáveis heparinizadas.

As coletas via cânula foram inicialmente efetuadas pela inserção da agulha hipodérmica, com a extremidade nivelada, à cânula. Com a substituição da extensão pela sonda uretral foi dispensado o uso da agulha hipodérmica. Utilizaram-se seringas descartáveis heparinizadas para as coletas. Para evitar a formação de coágulos, após a retirada de sangue, a cânula foi preenchida com 0,2ml de solução de cloreto de sódio a 0,9% contendo 10U de heparina sódica/ml (LIQUEMINE-ROCHE), e esse conteúdo descartado antes de cada coleta.

O plasma foi obtido por centrifugação a 5000rpm por 10 minutos. Uma parte das amostras foi separada para a determinação imediata de ácidos graxos livres e glicemia, sendo o restante armazenado a -20°C para a determinação do cortisol.

#### b) Amostras de Tecido

Os peixes foram sacrificados por decapitação e imediatamente dissecados. O coração foi removido da cavidade pericárdica e o fígado retirado após incisão ventral. O cérebro foi extirpado através de um corte longitudinal originário na borda superior dos olhos. Fatias de músculos branco e vermelho foram removidas da região dorsal e do pedúnculo caudal, respectivamente.

### 3.7 - Métodos de Análises Bioquímicas

#### a) Glicemia

A glicose plasmática (mg/dl) foi determinada por método enzimático segundo, usando o Kit Glicose E- enzimático (CELM).

#### b) Ácidos Graxos Livres Plasmáticos

A concentração de ácidos graxos livres foi determinada conforme método descrito por REGOUW *et al.* (1971) e os resultados expressos em mEq/l.

#### c) Cortisol Plasmático

O cortisol plasmático foi extraído e determinado por radioimunoensaio, seguindo o método descrito por VIEIRA *et al.* (1979) e os resultados expressos em µg/dl.

#### d) Glicogênio Tecidual

O glicogênio tecidual foi extraído e determinado pelo método de SJÖGREN *et al.* (1938). Solução de KOH a 30% foi adicionada às amostras em duplicata de tecido muscular esquelético e cardíaco (200mg) e de tecido hepático e cerebral (500mg). As amostras foram refrigeradas para a determinação de glicogênio, que foi expresso em mg/100 mg de tecido úmido.

### 3.8 - Parâmetros Morfométricos e Unidades de Medida

a) **Peso Corpóreo (g)** - obtido pela pesagem individual, usando balança com capacidade para 5Kg e precisão de 1g.

b) **Comprimento Total (cm)** - distância entre a mandíbula e a extremidade da nadadeira caudal. Obtido com o auxílio de um ictiômetro graduado em milímetros.

c) **Fator de Condição (K)** - é o índice que caracteriza a condição nutricional de uma determinada população e foi calculado segundo VAZZOLER (1981) :

$$K = \frac{\text{Peso (g)}}{[\text{Comprimento (cm)}]^3} \times 100$$

### 3.9 - Análises Estatísticas

Para verificar as diferenças entre os grupos ou tratamentos experimentais utilizou-se análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey-Kramer para comparação múltipla de médias (SOKAL; ROHLF, 1981). Em alguns casos foi aplicado o teste de contraste de médias para verificar diferenças específicas sugeridas pelos resultados. O teste t foi aplicado somente quando não foi possível o emprego da ANOVA. O nível de significância adotado foi de 5%. Utilizou-se também, análise de correlação entre variáveis de interesse, sendo especificado em cada caso o nível de significância adotado.

## 4 - RESULTADOS

Os peixes utilizados em todos os experimentos não diferiram quanto aos parâmetros morfométricos analisados (peso, comprimento e fator de condição) como mostra a Tabela II.

Com prática, a cirurgia foi realizada em 5 a 10 minutos e a mortalidade durante ou após o implante de cânula foi baixa (menor que 5%).

As amostragens sanguíneas e a administração hormonal foram realizadas com facilidade e não causaram qualquer distúrbio visível no animal.

### 4.1 - Recuperação Pós-Implante de Cânula

Estão apresentados na Figura 5 e na Tabela III os resultados dos experimentos nos quais verificou-se os valores glicêmicos e de ácidos graxos livres plasmáticos nos animais na condição pré-experimental e os efeitos do estresse em decorrência dos procedimentos de captura, manuseio e cirurgia sobre a concentração de glicose, ácidos graxos livres e cortisol plasmáticos em pacus juvenis.

Imediatamente após a cirurgia (T0) os peixes apresentaram glicemia de  $134,69 \pm 7,61$  mg/dl e decorridas seis horas (T6), os altos níveis permaneceram inalterados. Decréscimo significativo ocorreu entre a sexta hora (T6) e a décima segunda hora (T12), correspondendo a uma queda de 34,5%. Após vinte e quatro horas (T24) a concentração de glicose plasmática atingiu a média de  $72,43 \pm 3,93$  mg/dl e manteve-se dentro dessa faixa de variação até a nonagésima sexta hora (T96) (Figura 5-A).

Por outro lado, os valores médios de ácidos graxos livres plasmáticos aumentaram progressivamente de T0 a T24, atingindo níveis 78,5% maiores

Tabela II - Parâmetros morfométricos de pacus juvenis utilizados para realização de todos os experimentos. CT = comprimento total, K = fator de condição, EPM = erro padrão da média e n = número de peixes analisados.

Grupos analisados e/ou tratamentos por experimentos	PESO (g)		CT (cm)		K		n
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM	
<b>Pré-experimental I (a)</b>							
Análise glicemia	552	43	30,6	0,6	1,90	0,10	17
Análise A.G.L. plasmático	522	48	30,9	0,7	1,73	0,08	12
<b>Recuperação pós-implante de cânula</b>							
Análise glicemia	601	31	31,4	0,6	1,91	0,04	18
Análise A.G.L. plasmático	629	46	31,2	0,7	2,01	0,06	17
Análise cortisolemia	636	32	32,0	0,6	1,92	0,05	14
<b>Efeito hipoglicemiante da insulina</b>							
Tratados: 0,25U/Kg	604	50	30,4	0,7	2,10	0,05	7
Controles: salina	585	46	30,3	0,6	2,10	0,06	7
Tratados: 1,0U/Kg	690	49	31,8	0,5	2,10	0,07	17
Controles: salina	702	41	31,4	0,5	2,20	0,06	18
Tratados: 2,5U/Kg	695	62	32,2	0,8	2,00	0,05	9
Controles: salina	677	50	31,5	0,8	2,10	0,04	8
Tratados: 5,0U/Kg	670	43	31,6	0,6	2,10	0,03	10
Controles: salina	627	47	31,2	0,6	2,00	0,10	9
<b>Pré-experimental II (b)</b>	500	34	28,9	0,6	2,05	0,05	8
<b>Efeito de 1U de insulina/Kg</b>							
<b>Análise glicemia</b>							
Tratados	499	15	28,6	0,3	2,12	0,03	22
Controles	517	20	29,0	0,4	2,11	0,03	19
<b>Análise A.G.L. plasmático</b>							
Tratados	499	20	28,6	0,4	2,12	0,03	15
Controles	511	28	28,7	0,5	2,14	0,04	12
<b>Análise glicogênio tecidual</b>							
Antes do tratamento: T0	491	26	28,5	0,6	2,12	0,09	5
3hs após tratamento: T3							
Tratados	494	27	28,4	0,5	2,13	0,04	10
Controles	530	47	29,2	0,8	2,09	0,05	7
24hs após tratamento: T24							
Tratados	512	24	28,9	0,4	2,11	0,04	8
Controles	520	20	29,0	0,6	2,14	0,06	6
<b>Efeito da amostragem de sangue/injeção de salina: (Glicose/A.G.L./Cortisol)</b>							
Grupo I	542	46	29,1	0,7	2,19	0,09	4
Grupo II	553	54	29,3	0,8	2,18	0,07	4
Grupo III	532	56	28,7	0,8	2,23	0,07	4

(a) e (b) - Pré-experimentais I e II, respectivamente para comparação com os experimentos de recuperação pós-implante de cânula e efeito da insulina sobre as reservas de glicogênio.

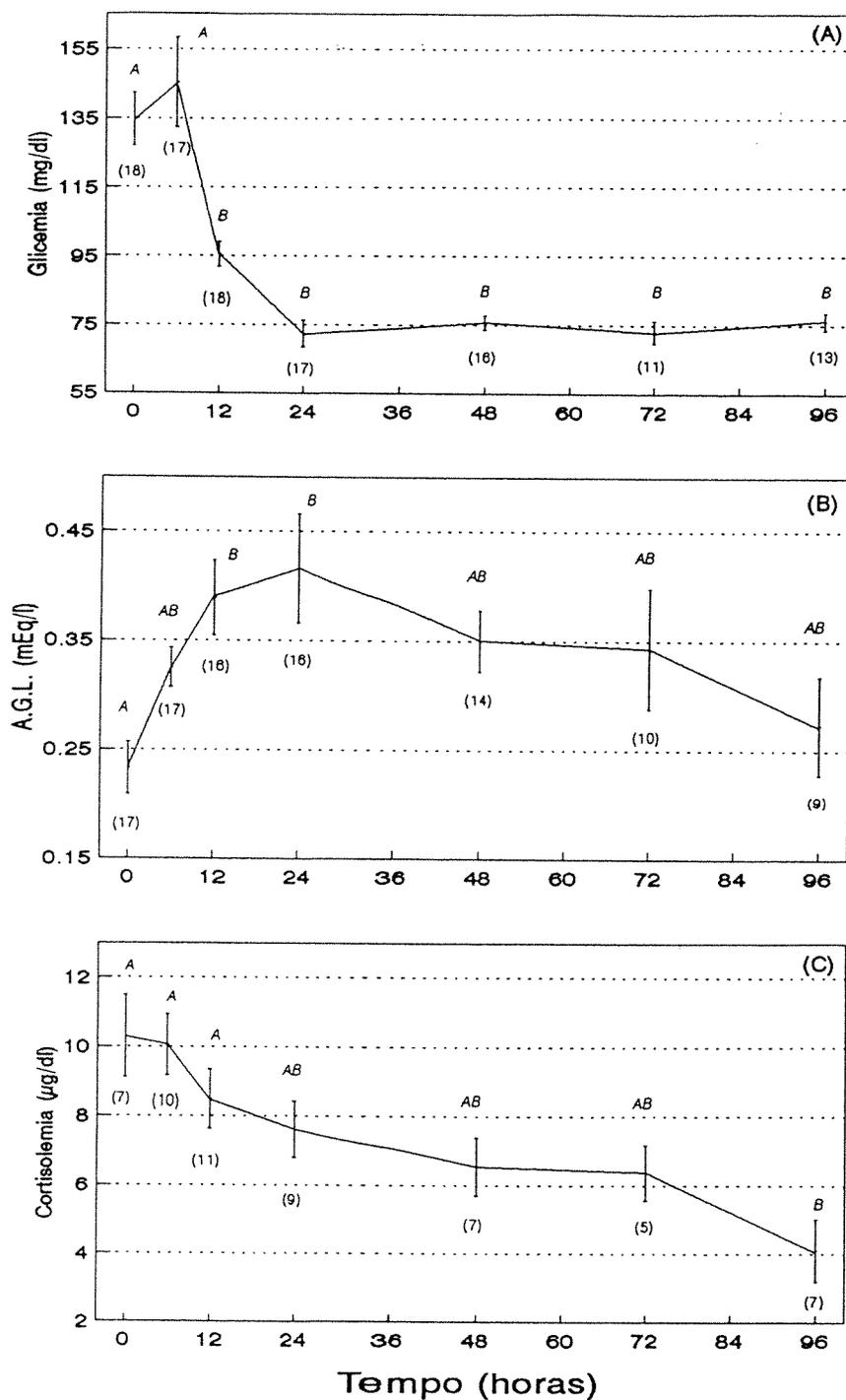


Figura 5 - Variação temporal da glicemia (A), ácidos graxos livres plasmáticos (B) e cortisolemia (C) de pacu juvenis após implante de cânula na aorta dorsal. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Número de peixes entre parênteses. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre as respectivas médias.

Tabela III - Glicemia, ácidos graxos livres plasmáticos e cortisolemia (média  $\pm$  erro padrão da média) de pacus juvenis na condição pré-experimental e após implante de cânula na aorta dorsal. Os valores entre parênteses indicam o número de peixes analisados.

Parâmetros	Pré-experimental	Tempo pós-implante (horas)							
		T0	T6	T12	T24	T48	T72	T96	
Glicemia (mg/dl)	1 56,95 $\pm$ 1,92 (a) (17)	2 134,69 $\pm$ 7,61 (18)	3 145,35 $\pm$ 12,85 (17)	4 95,47 $\pm$ 3,66 (18)	5 72,43 $\pm$ 3,93 (b) (17)	6 75,68 $\pm$ 2,05 (b) (16)	7 73,09 $\pm$ 3,27 (b) (11)	8 76,19 $\pm$ 2,45 (b) (13)	
Ácidos Graxos Livres plasmáticos (mEq/l)	2 0,280 $\pm$ 0,022 (c) (12)	3 0,233 $\pm$ 0,024 (17)	4 0,325 $\pm$ 0,018 (17)	5 0,389 $\pm$ 0,034 (16)	6 0,416 $\pm$ 0,050 (16)	7 0,350 $\pm$ 0,028 (c) (14)	8 0,343 $\pm$ 0,055 (c) (10)	9 0,273 $\pm$ 0,045 (c) (9)	
Cortisolemia ( $\mu$ g/dl)	4 10,31 $\pm$ 1,18 (7)	5 10,06 $\pm$ 0,89 (10)	6 8,49 $\pm$ 0,86 (11)	7 7,60 $\pm$ 0,82 (9)	8 6,54 $\pm$ 0,85 (7)	9 6,36 $\pm$ 0,80 (5)	10 4,10 $\pm$ 0,91 (7)		

1 - Resultados de duas amostragens realizadas no viveiro

2 - Resultados de uma amostragem realizada no viveiro

3 - Resultados de cinco experimentos

4 - Resultados de três experimentos

( ) - Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre as respectivas médias para cada parâmetro

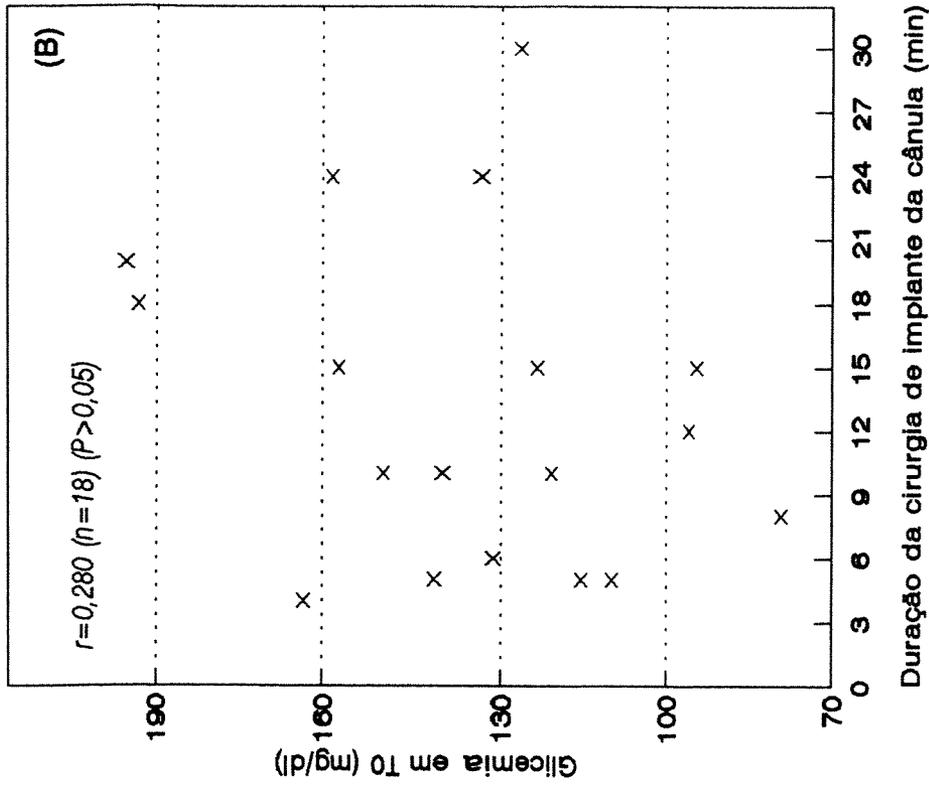
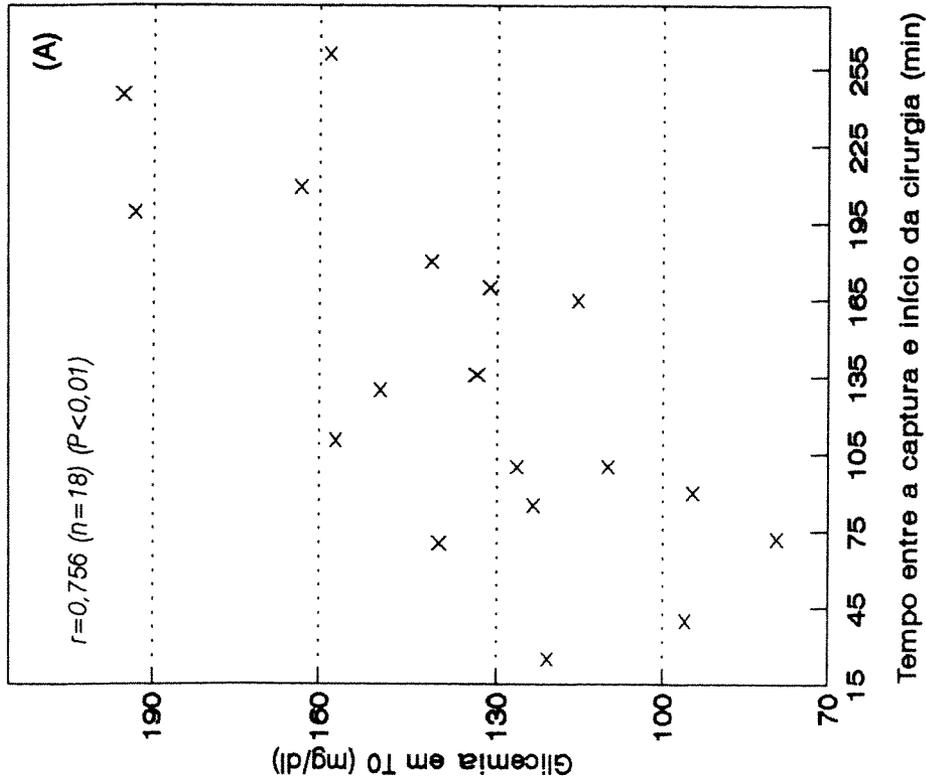


Figura 6 - (A) Relação entre a glicemia após a cirurgia de implante de cânula na aorta dorsal (T0) e o intervalo de tempo decorrido da captura do peixe no viveiro ao início da cirurgia. (B) Relação entre a glicemia após a cirurgia (T0) e a duração da cirurgia. ( $r$  = coeficiente de correlação;  $n$  = número de peixes).

do que os iniciais e mantiveram-se sem alteração significativa a partir de T48 até T96. Nestes experimentos, chamou a atenção a grande variabilidade da concentração de ácidos graxos livres plasmáticos entre os animais (Figura 5-B).

A concentração de cortisol plasmático verificada em T0 foi em média  $10,31 \pm 1,18 \mu\text{g/dl}$  e houve declínio gradual até 96 horas. Nesse tempo observou-se o menor valor médio ( $4,1 \pm 0,91 \mu\text{g/dl}$ ), que no entanto, não diferiu daqueles detectados entre T24 e T72 (Figura 5-C).

A análise desse conjunto de resultados, indica que é necessário um período de pelo menos quarenta e oito horas para a estabilização dos indicadores endócrino-metabólicos determinados e o início da intervenção hormonal.

A comparação entre os níveis médios de glicose e ácidos graxos livres plasmáticos dos animais submetidos a cirurgia e daqueles em condição pré-experimental (Tabela III) mostrou que mesmo após a estabilização (T24) a glicemia manteve-se significativamente maior, enquanto a concentração de ácidos graxos livres foi similar a dos animais mantidos no viveiro.

Verificou-se uma correlação significativa entre a glicemia inicial dos peixes com cânula implantada (T0) e o período de tempo decorrido da captura ao início do implante (Figura 6-A), mas não entre a glicemia em T0 e a duração da cirurgia (Figura 6-B).

#### 4.2 - Efeito da Administração Intra-Arterial de Insulina Sobre a Glicemia

As Figuras 7, 8, 9 e 10 e a Tabela IV mostram a evolução temporal da alteração da glicemia em resposta à administração intra-arterial de cada dose de insulina suína (0,25U; 1U; 2,5U e 5U/Kg de peso corpóreo) ou solução salina em pacus juvenis após o período de recuperação (48 horas).

No grupo que recebeu 0,25U/Kg de peso, a queda da glicemia não diferiu do controle em todos os tempos. Em ambos os grupos verificou-se redução significativa da glicose plasmática seis horas (T6) após a administração do hormônio ou de solução salina, seguida de aumento em doze horas (T12) e retorno aos níveis iniciais em vinte e quatro horas (T24) (Figura 7).

Nos peixes tratados com 1U/Kg de peso, observou-se decréscimo significativo da glicemia em relação aos animais controles em uma (T1), três (T3) e seis (T6) horas após a intervenção hormonal, contudo os valores de T3 e T6 não foram diferentes entre si. A glicemia média inicial (T0) de  $71,58 \pm 2,85$  mg/dl reduziu para  $38,35 \pm 2,79$  mg/dl em T6, correspondendo a 46% de queda, enquanto no grupo controle decréscimo foi de 31% no mesmo período (Figura 8).

Com a administração de 2,5U/Kg de peso corpóreo, verificou-se redução significativa dos valores glicêmicos em relação ao controle somente em T3, após a injeção hormonal. No grupo controle detectou-se glicemia significativamente menor em T6 em relação aos demais tempos e no grupo teste em T3 e T6 (Figura 9).

O tratamento com 5U/Kg de peso produziu queda significativa em relação ao controle em T6, T12 e T24. No grupo teste, a concentração de glicose plasmática inicial (T0) de  $69,06 \pm 4,47$  mg/dl reduziu significativamente em T3 para  $46,77 \pm 2,81$  mg/dl até em T12 para  $18,90 \pm 2,96$  mg/dl (Figura 10).

Na Figura 11 estão representadas as respostas glicêmicas dos grupos testes e controles em conjunto. Nos animais controles (Figura 11-A) o padrão de resposta foi similar, ou seja, aumento discreto da glicemia em T1, valor significativamente menor em T6 e retorno aos valores iniciais em T24 após a administração de solução salina. Todavia nos grupos controles correspondentes as doses 0,25U/Kg e 2,5U/Kg de peso corporal, a hipoglicemia em T6 foi significativamente mais intensa em relação a observada nos outros dois grupos controles. Na análise das respostas glicêmicas dos grupos testes (Figura 11-B) evidenciou-se que a dose efetiva com potencial

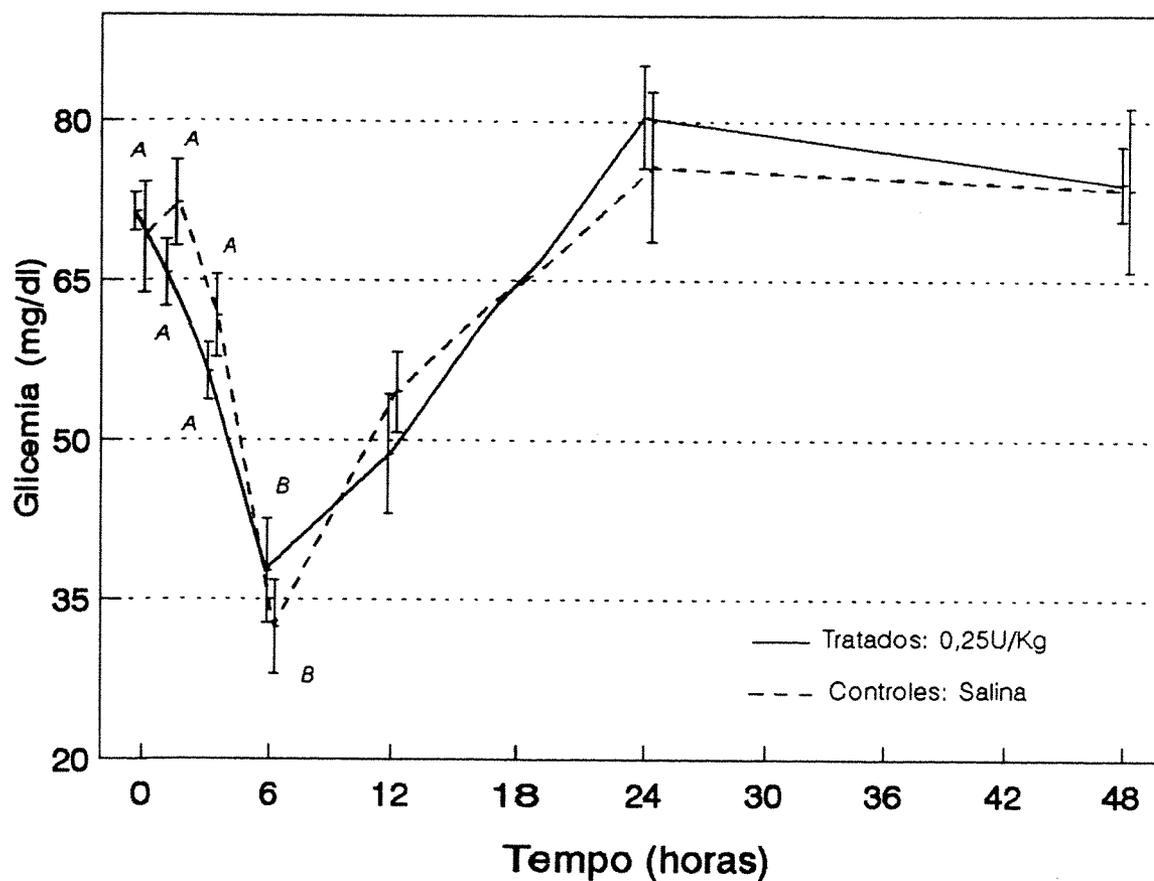


Figura 7 - Variação temporal da glicemia de pacus juvenis em resposta à administração intra-arterial de 0,25U de insulina suína/Kg de peso (tratados) ou solução salina a 0,9% (controles). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre as respectivas médias.

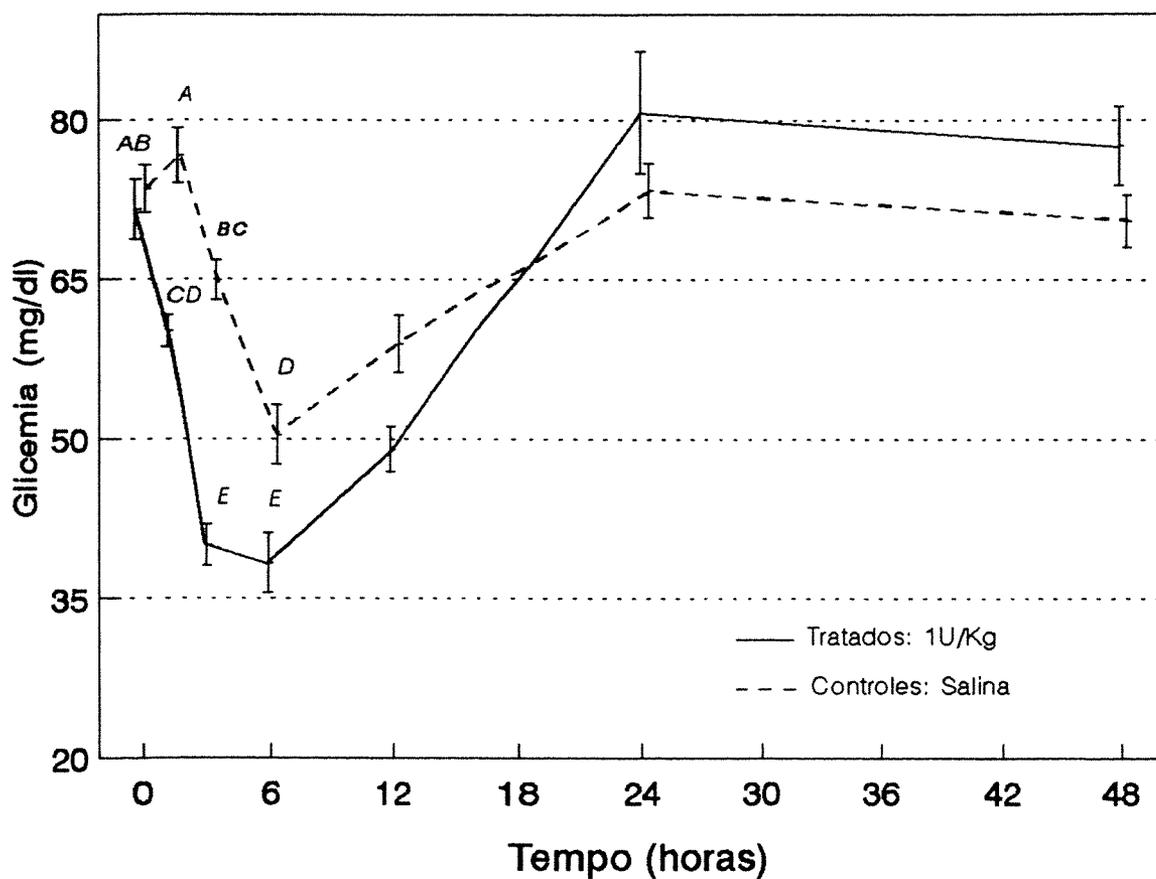


Figura 8 - Variação temporal da glicemia de pacus juvenis em resposta à administração intra-arterial de 1,0U de insulina suína/Kg de peso (tratados) ou solução salina a 0,9% (controles). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre as respectivas médias.

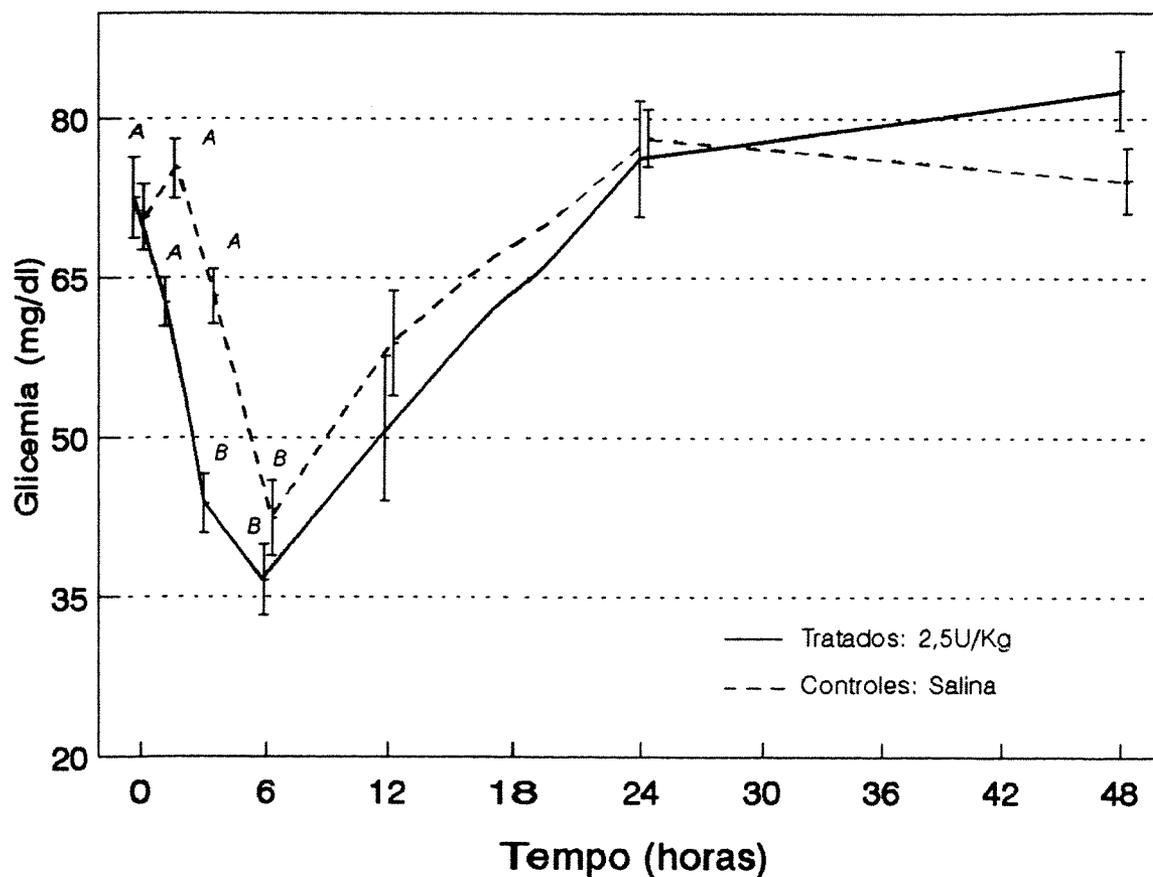


Figura 9 - Variação temporal da glicemia de pacus juvenis em resposta à administração intra-arterial de 2,5U de insulina suína/Kg de peso (tratados) ou solução salina a 0,9% (controles). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre as respectivas médias.

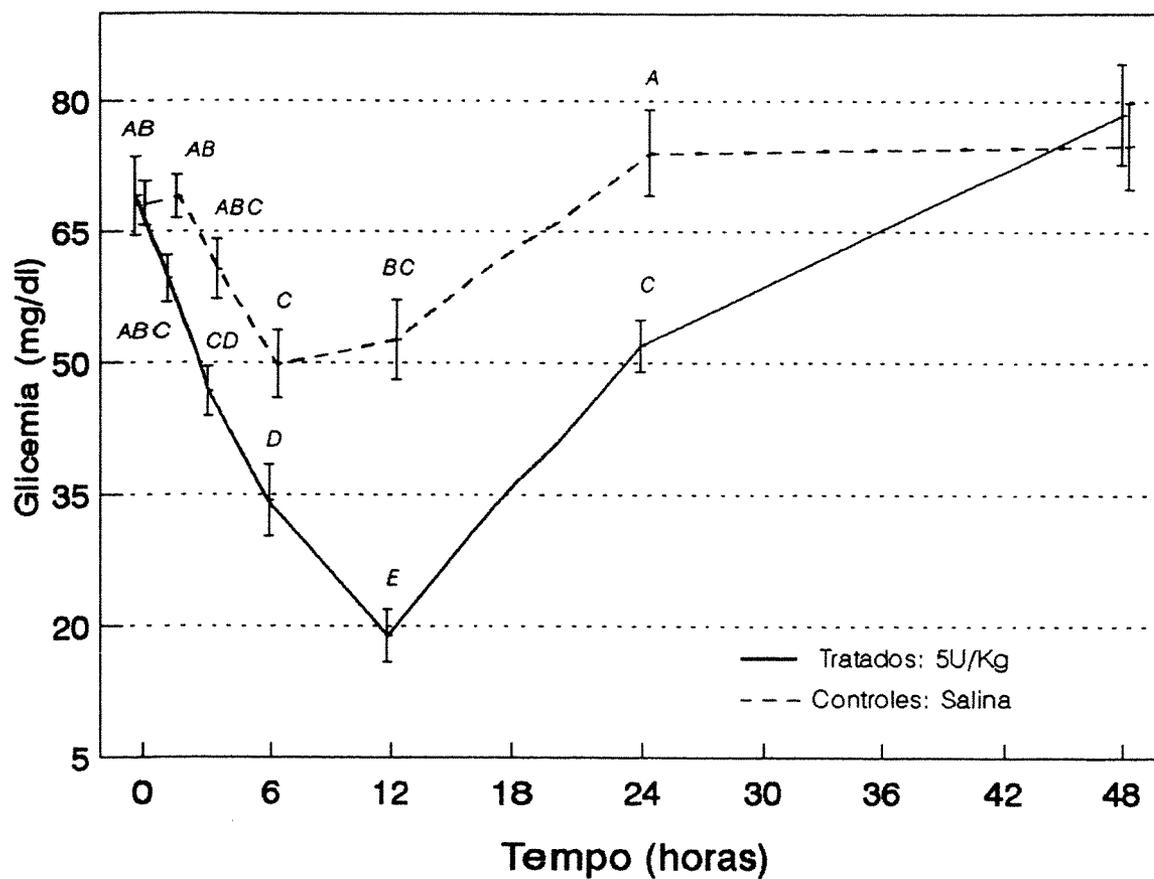


Figura 10 - Variação temporal da glicemia de pacus juvenis em resposta à administração intra-arterial de 5,0U de insulina suína/Kg de peso (tratados) ou solução salina a 0,9% (controles). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre as respectivas médias.

Tabela IV - Glicemia (média  $\pm$  erro padrão da média) de pacus juvenis em resposta à administração intra-arterial de 0,25U; 1,0U; 2,5U e 5,0U de insulina suína/Kg de peso corpóreo (tratados) ou solução salina a 0,9% (controles). Os valores entre parênteses indicam o número de peixes analisados.

TEMPO (horas)	GLICEMIA (mg/dl)							
	Tratados 0,25U/Kg	Controles Salina	Tratados 1,0U/Kg	Controles Salina	Tratados 2,5U/Kg	Controles Salina	Tratados 5,0U/Kg	Controles Salina
T0	71,42 $\pm$ 1,80 (7)	69,01 $\pm$ 5,16 (7)	71,58 $\pm$ 2,85 (17)	73,53 $\pm$ 2,23 (18)	72,58 $\pm$ 3,80 (9)	70,75 $\pm$ 3,12 (8)	69,06 $\pm$ 4,47 (10)	68,23 $\pm$ 2,53 (9)
T1	65,71 $\pm$ 3,14 (7)	72,25 $\pm$ 4,05 (7)	60,17 $\pm$ 1,50 (17)	76,69 $\pm$ 2,62 (18)	62,70 $\pm$ 2,28 (9)	75,32 $\pm$ 2,80 (8)	59,64 $\pm$ 2,69 (9)	69,05 $\pm$ 2,45 (9)
T3	56,40 $\pm$ 2,71 (7)	61,66 $\pm$ 3,90 (7)	40,04 $\pm$ 1,97 (17)	64,97 $\pm$ 1,87 (18)	43,79 $\pm$ 2,75 (9)	63,28 $\pm$ 2,58 (8)	46,77 $\pm$ 2,81 (9)	60,68 $\pm$ 3,39 (9)
T6	37,69 $\pm$ 4,91 (7)	32,40 $\pm$ 4,40 (6)	38,35 $\pm$ 2,79 (16)	50,38 $\pm$ 2,81 (18)	36,63 $\pm$ 3,34 (9)	42,44 $\pm$ 3,51 (8)	34,33 $\pm$ 4,10 (10)	49,92 $\pm$ 3,85 (9)
T12	48,73 $\pm$ 5,67 (7)	54,51 $\pm$ 3,75 (7)	49,05 $\pm$ 2,12 (16)	58,95 $\pm$ 2,70 (18)	50,86 $\pm$ 6,81 (9)	58,88 $\pm$ 4,94 (8)	18,90 $\pm$ 2,96 (10)	52,68 $\pm$ 4,51 (8)
T24	80,47 $\pm$ 4,86 (7)	75,79 $\pm$ 7,11 (7)	80,76 $\pm$ 5,77 (16)	73,41 $\pm$ 2,53 (18)	76,27 $\pm$ 5,46 (9)	78,20 $\pm$ 2,72 (8)	52,01 $\pm$ 2,95 (10)	74,07 $\pm$ 4,96 (9)
T48	74,22 $\pm$ 3,51 (7)	73,60 $\pm$ 7,70 (6)	77,62 $\pm$ 3,71 (11)	70,54 $\pm$ 2,47 (15)	82,71 $\pm$ 3,70 (6)	74,22 $\pm$ 3,07 (5)	78,46 $\pm$ 5,77 (9)	74,88 $\pm$ 4,96 (8)

1 - Resultados de dois experimentos

2 - Resultados de cinco experimentos

3 - Resultados de três experimentos

4 - Resultados de quatro experimentos

hipoglicemiante maior foi a de 5U/Kg de peso corporal, o efeito máximo ocorreu em T12, sendo significativamente diferente das demais doses. Com exceção do grupo tratado com 5U/Kg de peso, verificou-se o retorno da glicemia aos níveis iniciais 24 horas após a administração hormonal.

Os resultados indicam que 1U/Kg de peso foi a menor dose de insulina capaz de promover queda significativa da glicemia em relação ao controle. Considerando que nos grupos experimentais em que a insulina foi efetiva, a glicemia em T3 e T6 não foram significativamente diferentes; e tendo em vista que o teste de contraste de médias para 1U/Kg apontou T3 como o único tempo em que a queda da glicemia dos peixes tratados foi diferente do controle, adotou-se este tempo como o de maior ação da insulina.

Em todos os grupos tratados com doses efetivas de insulina verificou-se correlação positiva entre a concentração de glicose plasmática inicial (T0) e o percentual de queda glicêmica três horas após a intervenção hormonal (Figura 12). Tal correlação não foi significativa nos grupos controles.

Os resultados dos experimentos em que foram testados os possíveis agentes promotores da hipoglicemia nos animais controles encontram-se na Figura 13 e na Tabela V.

A glicemia não diferiu significativamente entre os três grupos experimentais. Verificou-se declínio significativo dos níveis de glicose plasmática em todos os grupos entre T6 e T12 (Figura 13-A).

A concentração de ácidos graxos livres plasmáticos nos grupos I e II foi significativamente menor em relação ao III em T6. Nos dois primeiros grupos observou-se aumento significativo dos níveis de ácidos graxos livres plasmáticos entre T6 e T12, o mesmo não ocorrendo no terceiro que não foi submetido a coleta seriada e reposição de salina (Figura 13-B).

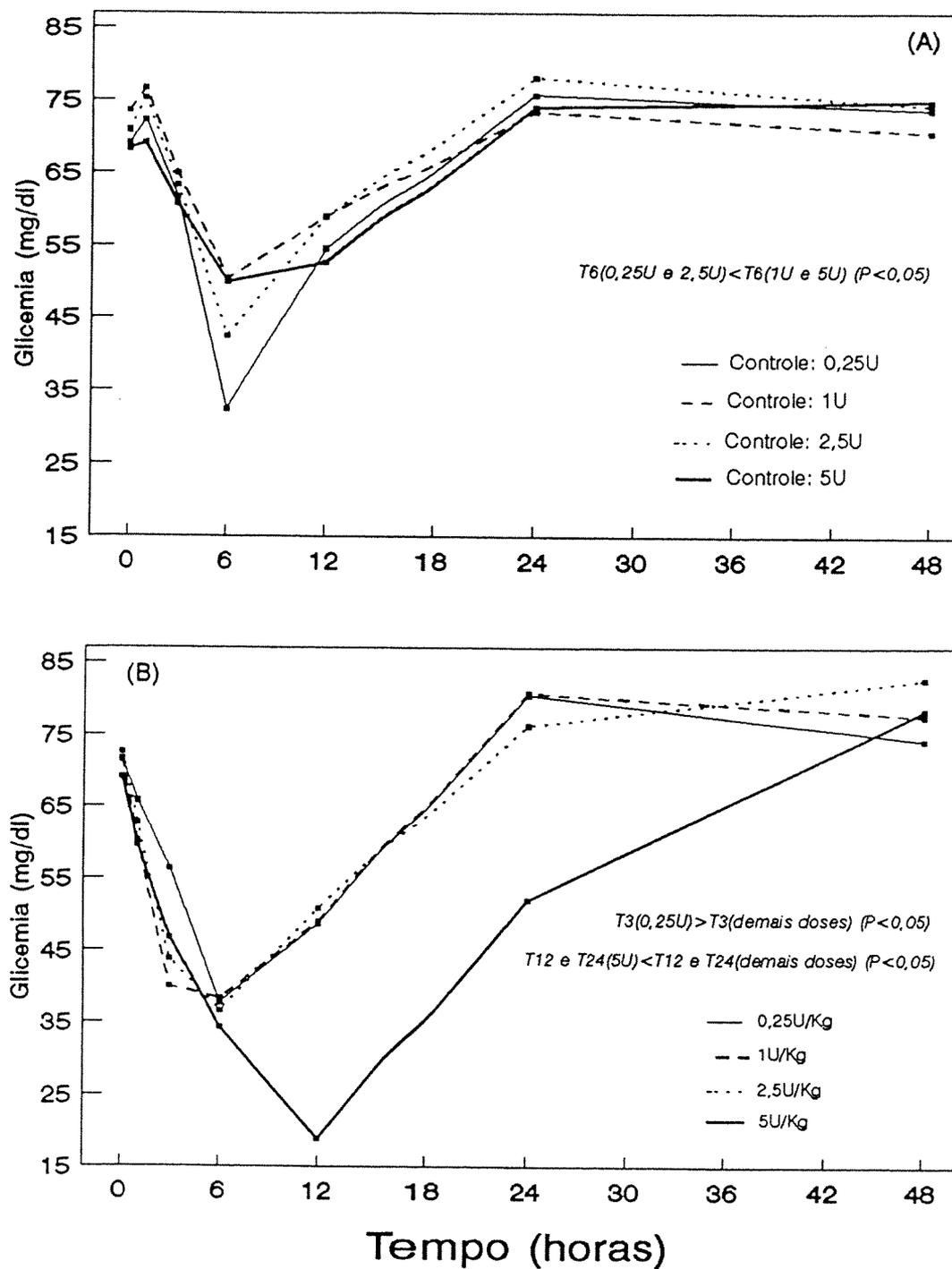


Figura 11 - Comparação da glicemia de pacus juvenis dos grupos controles (A) e tratados com diferentes doses de insulina suína/Kg de peso (B) no curso temporal. As diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) estão descritas na figura.



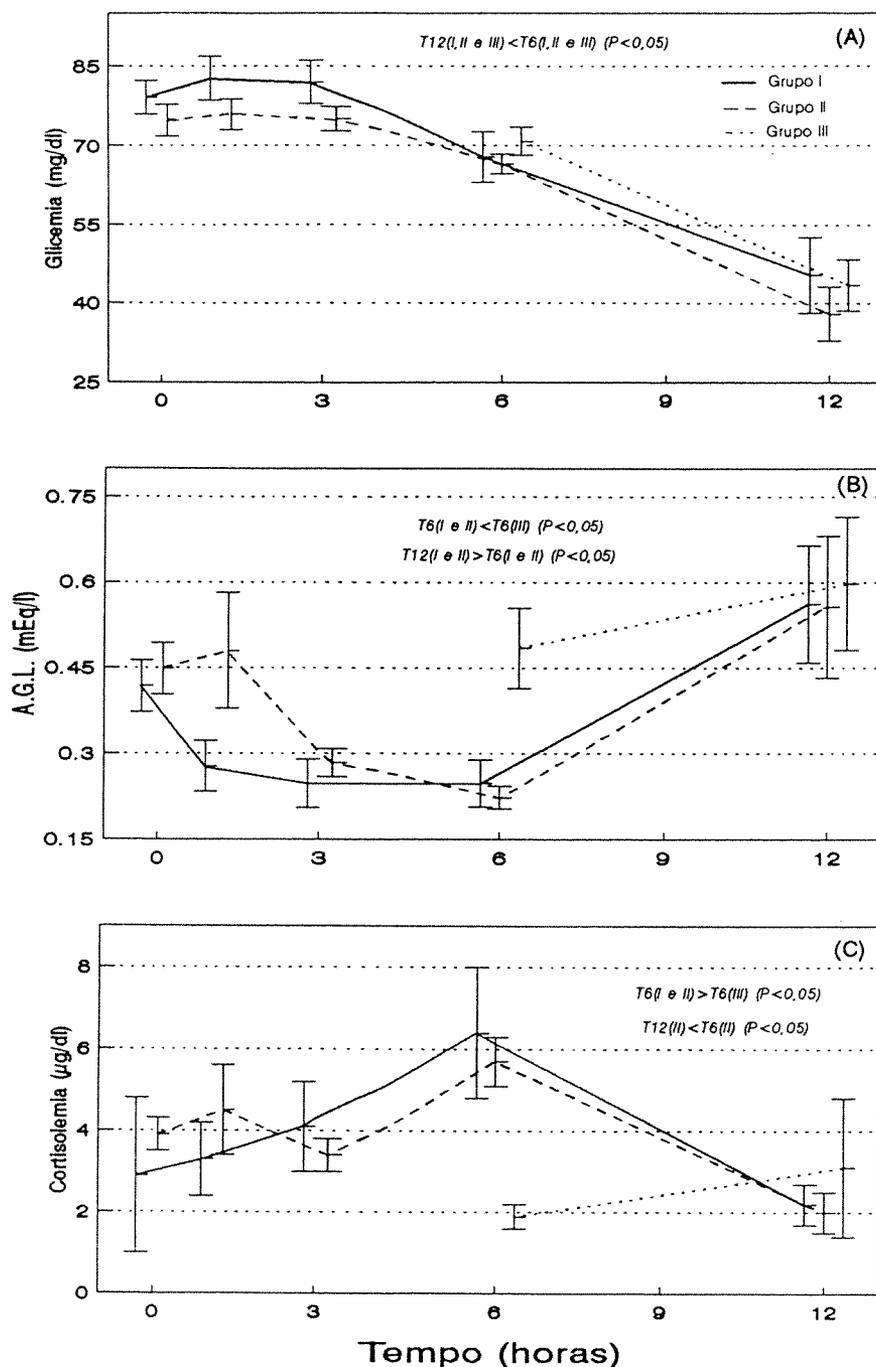


Figura 13 - Variação temporal da glicemia (A), ácidos graxos livres plasmáticos (B) e cortisolemia (C) no experimento que comparou os seguintes grupos de peixes: I - injetados com 0,1ml com solução salina; II - não injetados com solução salina; e III - não injetados com solução salina e sem coleta consecutiva de sangue. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) estão descritas na figura.

Tabela V - Glicemia, ácidos graxos livres plasmáticos e cortisolemia (média ± erro padrão da média) de pacus juvenis no experimento que comparou os seguintes grupos: I - injetados com 0,1ml de solução salina a 0,9%; II - não injetados com solução salina; e III - não injetados com solução salina e sem coleta consecutiva de sangue. Os valores entre parênteses indicam o número de peixes analisados em cada grupo.

TEMPO (horas)	GLICEMIA (mg/dl)			A.G.L. (mEq/l)			CORTISOLEMIA (µg/dl)		
	Grupo I (4)	Grupo II (4)	Grupo III (4)	Grupo I (4)	Grupo II (4)	Grupo III (4)	Grupo I (4)	Grupo II (4)	Grupo III (4)
T0	79,10 ± 3,18	74,80 ± 2,96	—	0,418 ± 0,046	0,469 ± 0,046	—	2,9 ± 1,9	3,9 ± 0,4	—
T1	82,68 ± 4,14	75,90 ± 2,89	—	0,278 ± 0,044	0,479 ± 0,102	—	3,3 ± 0,9	4,5 ± 1,1	—
T3	81,99 ± 4,09	75,03 ± 2,28	—	0,247 ± 0,042	0,284 ± 0,025	—	4,1 ± 1,1	3,4 ± 0,4	—
T6	67,85 ± 4,79	66,54 ± 1,87	70,86 ± 2,66	0,248 ± 0,041	0,223 ± 0,020	0,485 ± 0,071	6,4 ± 1,6	5,7 ± 0,6	1,9 ± 0,3
T12	45,45 ± 7,26	38,00 ± 5,20	43,53 ± 4,94	0,562 ± 0,103	0,557 ± 0,125	0,598 ± 0,117	2,2 ± 0,5	2,0 ± 0,5	3,1 ± 1,7

∟ - Número de peixes analisados = 2

Quanto ao cortisol plasmático, em T6 os grupos I e II tiveram concentração significativamente maior em relação ao grupo III. Contudo, o grupo II apresentou declínio significativo da cortisolemia em T12 (Figura 13-C).

#### 4.3 - Ação da Menor Dose Hipoglicemiante de Insulina Sobre as Reservas de Carboidratos e Ácidos Graxos Livres Plasmáticos

Na Figura 14 e na Tabela VI estão representados os resultados dos experimentos em que se verificou a ação da menor dose efetiva de insulina (1U/Kg de peso corporal) sobre a glicemia e os ácidos graxos livres plasmáticos.

Neste experimento, a temperatura média registrada foi 21,8°C e a insulina produziu declínio significativo da glicemia em relação ao controle em T1 e T3. A glicemia média inicial de  $75,03 \pm 1,79$  mg/dl reduziu para  $57,63 \pm 1,94$  mg/dl em T3, correspondendo a um decréscimo de 23%. O grupo controle, nesse mesmo período, apresentou redução de apenas 1%. Após o tratamento hormonal verificou-se em T6 concentração média de glicose plasmática significativamente menor em relação aos tempos anteriores, mas esta não diferiu da apresentada pelo controle (Figura 14-A). No experimento anterior em que foi testada igual dose de insulina a uma temperatura média de 26,2°C, verificou-se no grupo teste decréscimo de 44% da glicemia em T3 e no grupo controle declínio de 11%.

A concentração de ácidos graxos livres plasmáticos diminuiu significativamente tanto no grupo teste quanto no controle em relação aos respectivos valores iniciais (T0). No grupo teste, o valor médio inicial de  $0,225 \pm 0,015$  mEq/l foi reduzido para  $0,098 \pm 0,019$  mEq/l, enquanto no controle a concentração inicial de  $0,220 \pm 0,019$  mEq/l caiu para  $0,174 \pm 0,009$  mEq/l em T1, correspondendo a um decréscimo

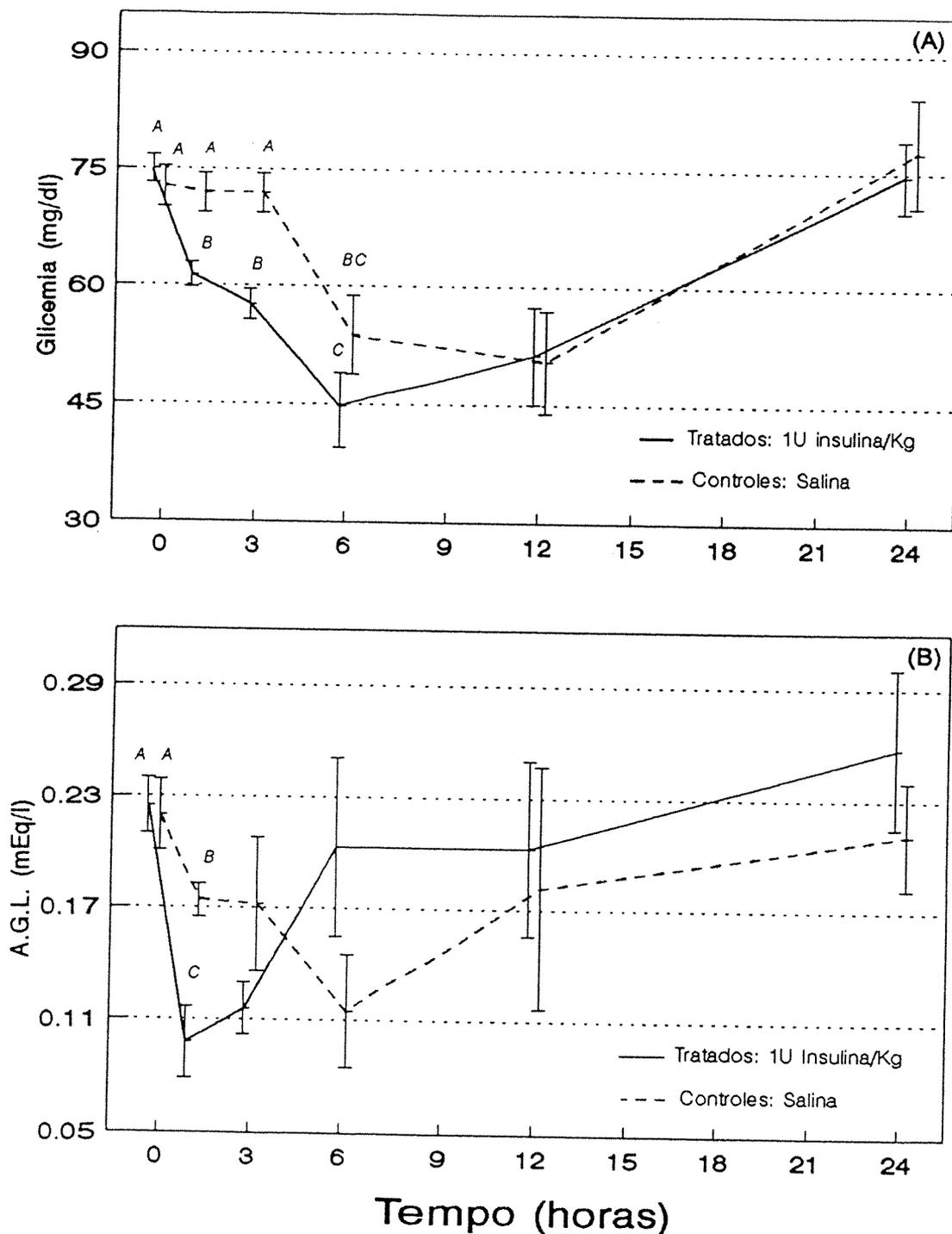


Figura 14 - Variação temporal da glicemia (A) e dos ácidos graxos livres plasmáticos (B) de pacus juvenis em resposta à administração intra-arterial de 1,0U de insulina suína/Kg de peso ou de solução salina a 0,9% (controles). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (Glicemia: ANOVA,  $P < 0,05$ ; A.G.L.: Teste t,  $P < 0,05$ ) entre as respectivas médias.

Tabela VI - Glicemia, ácidos graxos livres plasmáticos (média  $\pm$  erro padrão da média) de pacus juvenis em resposta à administração intra-arterial de 1,0U de insulina suína/Kg de peso corpóreo (tratados) ou solução salina a 0,9% (controles). Os valores entre parênteses indicam o número de peixes analisados.

TEMPO (horas)	GLICEMIA (mg/dl)		A.G.L. (mEq/l)	
	Tratados	<u>1</u> Controles	Tratados	<u>2</u> Controles
T0	75,03 $\pm$ 1,79 (22)	72,72 $\pm$ 2,59 (19)	0,225 $\pm$ 0,015 (15)	0,220 $\pm$ 0,019 (12)
T1	61,35 $\pm$ 1,58 (17)	71,94 $\pm$ 2,51 (14)	0,098 $\pm$ 0,019 (12)	0,174 $\pm$ 0,009 (9)
T3	57,63 $\pm$ 1,94 (13)	71,91 $\pm$ 2,51 (13)	0,116 $\pm$ 0,014 (12)	0,172 $\pm$ 0,036 (9)
T6	44,20 $\pm$ 4,72 (7)	53,76 $\pm$ 5,02 (6)	0,203 $\pm$ 0,048 (5)	0,115 $\pm$ 0,030 (4)
T12	51,25 $\pm$ 6,18 (7)	50,44 $\pm$ 6,50 (6)	0,203 $\pm$ 0,047 (5)	0,182 $\pm$ 0,065 (4)
T24	74,58 $\pm$ 4,59 (7)	77,64 $\pm$ 6,97 (6)	0,258 $\pm$ 0,043 (5)	0,211 $\pm$ 0,029 (4)

1 - Resultados de três experimentos

2 - Resultados de dois experimentos

de 56,5% e 21% respectivamente. Contudo, os níveis de ácidos graxos livres plasmáticos no grupo teste foi significativamente menor em relação ao controle (Figura 14-B).

Na Figura 15 e na Tabela VII são mostrados os valores de glicogênio tecidual dos animais mantidos na condição pré-experimental e dos submetidos a administração de insulina.

O teor médio de glicogênio hepático e do miocárdio nos peixes sob condição pré-experimental foi significativamente menor em comparação ao verificado nos animais em condição experimental antes da administração de insulina (Figuras 15-A e 15-B). Nos demais tecidos, a concentração de glicogênio entre esses dois grupos não foi significativamente diferente (Figuras 15-C, 15-D, 15-E).

O tratamento com insulina não produziu efeito diferente do controle em todos os tecidos estudados (Figura 15). No músculo esquelético vermelho a administração de insulina e solução salina alteraram o teor de glicogênio em T3 em relação ao grupo pré-experimental (Figura 15-C).

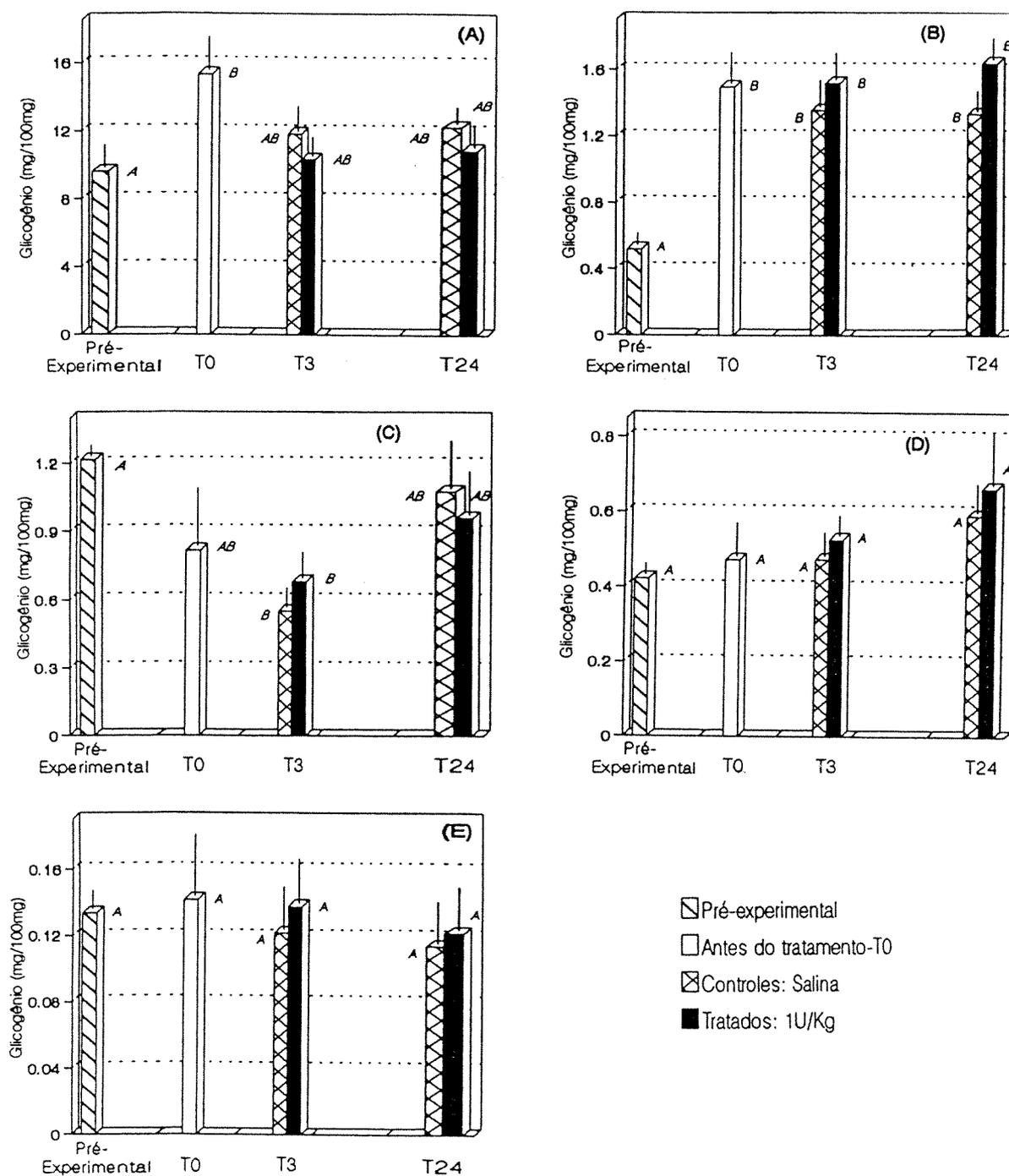


Figura 15 - Comparação entre o glicogênio tecidual em pacus juvenis na condição pré-experimental (viveiro), antes do tratamento (T0) e após três (T3) e vinte e quatro (T24) horas da administração intra-arterial de 1,0U de insulina suína/Kg de peso (tratados) ou solução salina a 0,9% (controles). (A) fígado; (B) músculo cardíaco; (C) músculo esquelético vermelho; (D) músculo esquelético branco; e (E) cérebro. Resultados expressos como média + erro padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas (ANOVA,  $P < 0,05$ ) entre as respectivas médias.

Tabela VII - Glicogênio tecidual (média  $\pm$  erro padrão da média) de pacus juvenis na condição pré-experimental, antes do tratamento (T0) e após três (T3) e vinte e quatro (T24) horas da administração intra-arterial de 1,0U de insulina suína/Kg de peso corpóreo (tratados) ou solução salina a 0,9% (controles). Os valores entre parênteses indicam o número de peixes analisados em cada grupo ou tratamento.

TECIDOS	GLICOGÊNIO ( mg/100mg de tecido <sup>1</sup> )							
	T3				T24			
	Pré-experimental (8) <sup>2</sup>	T0 (5) <sup>3</sup>	Tratados (10) <sup>3</sup>	Controles (7)	Tratados (8) <sup>3</sup>	Controles (6)	Tratados (8) <sup>3</sup>	Controles (6)
Fígado	9,633 $\pm$ 1,193	15,370 $\pm$ 1,724	10,349 $\pm$ 0,928	11,875 $\pm$ 1,286	10,919 $\pm$ 0,993	12,276 $\pm$ 1,626		
Músculo cardíaco	0,520 $\pm$ 0,067 <sup>4</sup>	1,459 $\pm$ 0,178	1,518 $\pm$ 0,135	1,356 $\pm$ 0,150	1,637 $\pm$ 0,107	1,333 $\pm$ 0,113		
Músculo vermelho	1,216 $\pm$ 0,047	0,817 $\pm$ 0,258	0,681 $\pm$ 0,099	0,551 $\pm$ 0,081	0,961 $\pm$ 0,176	1,077 $\pm$ 0,207		
Músculo branco	0,422 $\pm$ 0,029	0,472 $\pm$ 0,087	0,527 $\pm$ 0,046	0,473 $\pm$ 0,061	0,663 $\pm$ 0,134	0,591 $\pm$ 0,075		
Cérebro	0,134 $\pm$ 0,011	0,142 $\pm$ 0,036	0,138 $\pm$ 0,025	0,122 $\pm$ 0,025	0,122 $\pm$ 0,024	0,114 $\pm$ 0,024		

<sup>1</sup> - Peso úmido

<sup>2</sup> - Resultados de uma amostragem realizada no viveiro

<sup>3</sup> - Resultados de três experimentos

<sup>4</sup> - Número de peixes analisados = 7

## 5 - DISCUSSÃO

### 5.1 - Recuperação Pós-Implante de Cânula

Nos estudos de intervenção hormonal em peixes, o implante de cânula em vasos sanguíneos é recomendado por minimizar o estresse de manuseio e permitir o acompanhamento individualizado. Todavia, os procedimentos cirúrgicos induzem a alterações fisiológicas, cuja magnitude e persistência devem ser determinadas para a interpretação correta dos resultados dos experimentos subsequentes.

As investigações relacionadas ao estresse e seus efeitos em decorrência do implante de cânula crônica na aorta dorsal foram, até o momento, realizadas com espécies como carpa, truta, salmão, enguia e concentram-se principalmente na avaliação de respostas, respiratórias, hematológicas e eletrolíticas (HOUSTON *et al.*, 1969; HOUSTON *et al.*, 1971; NGAN *et al.*, 1973; SOVIO *et al.*, 1975; DUTHIE; TORT, 1985). Assim, na primeira etapa deste trabalho avaliamos os efeitos dos procedimentos cirúrgicos sobre parâmetros endócrino-metabólicos e o tempo requerido para a estabilização destes nas condições experimentais adotadas.

Verificamos que o pacu tolerou os procedimentos de implante de cânula e foi baixa a mortalidade em consequência da cirurgia. A captura, a manipulação e os procedimentos cirúrgicos determinaram a rápida elevação da glicose plasmáticos, enquanto o aumento da concentração de ácidos graxos livres foi demorado e apresentou relação inversa com a glicemia no período de T0 a T24. O níveis iniciais de cortisol plasmático foram elevados e apresentou declínio gradual até T96.

O aumento de cortisol plasmático caracteriza a resposta primária ao estresse (PANKHURST *et al.*, 1992) e resulta em mudanças metabólicas como

hiperglicemia e alteração dos níveis de ácidos graxos livres plasmáticos (MORALES *et al.*, 1990). A relação inversa entre a concentração de glicose e ácidos graxos livres plasmáticos foi observada em outras espécies expostas a diferentes condições estressantes como injúria, baixa temperatura, anoxia, distúrbios físicos e após a administração de glicose e de hormônios (FARKAS, 1967; FLETCHER, 1984; MAZEAUD *et al.*, 1977; MINICK; CHAVIN, 1969). Segundo PLISETSKAYA (1980), essa condição parece ser determinada pela efeito lipogênico e anti-lipolítico da insulina que é secretada em resposta à hiperglicemia.

A elevação da glicemia também foi observada em *Anguilla anguilla* (INCE; THORPE, 1974) e em *Esox lucius* (THORPE; INCE, 1974) após cirurgia para implante de cânula no bulbo arterial e no ventrículo, respectivamente, e foi atribuída a combinação da anestesia e manipulação cirúrgica.

No presente estudo, a elevação da glicemia inicial pareceu resultar dos procedimentos de captura e manipulação antes da cirurgia. Esta hipótese está baseada na correlação positiva entre a concentração de glicose plasmática inicial (T0) e o intervalo de tempo da captura ao início da cirurgia. Relação semelhante foi observada por PICKERING *et al.* (1982) ao analisarem em *Salmo trutta* a cortisolemia em resposta ao estresse de manejo. Nesse estudo, a concentração de cortisol plasmático foi maior nos últimos animais amostrados, sugerindo que o ato de remoção de um peixe é suficiente para provocar distúrbios nos remanescentes.

Por outro lado, o ato cirúrgico parece não ter interferido no aumento da glicemia, dada a inexistência de correlação entre a concentração da glicose plasmática inicial e o tempo de duração da cirurgia. É provável que os efeitos do trauma cirúrgico tenham sido minimizados pelo anestésico. Segundo MORALES *et al.* (1990) o anestésico pode atuar como um eliminador da resposta ao estresse agudo quando administrado antes de qualquer tipo de manipulação do animal.

A permanência de altos níveis glicêmicos e a grande variação individual da glicose plasmática seis horas após a cirurgia, pode ter resultado da adaptação inicial ao novo ambiente, tendo em vista a agitação dos animais frequentemente observada nesse período. Contudo, a elevação da glicemia e cortisolemia em resposta ao estresse de manipulação e confinamento em caixa experimental nas seis horas subsequentes ao ato cirúrgico foi semelhante ao observado em pacus jovens (KRIEGER-AZZOLINI *et al.*, 1989) submetidos a captura, transporte e manipulação para coletas de sangue seriadas por punção caudal, sem anestesia e no mesmo intervalo de tempo.

A concentração de cortisol plasmático apresentou uma tendência de decréscimo durante as 96 horas de acompanhamento, que pareceu refletir a adaptação do animal à condição experimental. Segundo PICKERING (1992), em situações de estresse contínuo ou crônico, como no confinamento, o cortisol pode permanecer elevado por diversos dias ou semanas, mas em alguns casos retorna aos níveis basais, a despeito da presença do agente estressor, representando uma forma de adaptação. O mecanismo envolvido nesse processo não foi completamente elucidado, sendo necessários estudos para verificar se ocorre como consequência da redução da secreção ou do aumento da taxa de "clearance" metabólico do hormônio.

A despeito da tendência de queda do cortisol, a glicemia estabilizou-se em níveis maiores do que os observados na condição pré-experimental. É provável que a restrição alimentar seja um dos fatores que contribui para essa resposta. Hiperglicemia transitória em resposta ao jejum de curta duração foi verificada em espécies como *Notopterus notopterus* (NARASHIMAN; SUNDARARAJ, 1971), *Oncorhynchus nerka* (SHERIDAN; MOMMSEN, 1991) e *Cyprinus carpio* L. (BLASCO *et al.*, 1992) parece resultar da ativação da gliconeogênese pelo aumento da razão glucagon/insulina.

A análise do conjunto de resultados mostrou serem necessárias 48 horas para a estabilização de todos os parâmetros analisados, sendo fixado esse período para a recuperação e o início da intervenção hormonal.

## 5.2 - Efeito da Administração Intra-Arterial de Insulina Sobre a Glicemia

A hipoglicemia é a resposta à insulina exógena mais registrada em peixes teleósteos (ABLETT *et al.*, 1981; CARNEIRO; AMARAL, 1983; INCE; THORPE, 1974; LEWANDER *et al.*, 1976; MINICK; CHAVIN, 1972; PEREZ *et al.*, 1989; PLISETSKAYA *et al.*, 1985; OTTOLENGHI *et al.*, 1982; THORPE; INCE, 1974), sendo lenta e prolongada em comparação aos mamíferos. Além disso, a intensidade da queda e a sua duração são muito variáveis entre as espécies.

Em *Piaractus mesopotamicus*, a menor dose capaz de induzir hipoglicemia significativa foi 1U/Kg de peso corporal (44µg/Kg). Os nossos resultados contrastam com os relatados por PLISETSKAYA *et al.* (1985) que demonstraram em *Oncorhynchus kisutch* queda significativa da glicemia à administração intraperitoneal de dose de insulina bovina e espécie-específica cem vezes menor do que a utilizada no presente estudo.

THORPE; INCE (1974) verificaram que em *Esox lucius* a intensidade e duração da hipoglicemia provocada pela insulina bovina foi dose-dependente; 2U/Kg de peso produziu um efeito transitório entre seis e vinte e quatro horas, enquanto 10U/Kg, 25U/Kg e 50U/Kg de peso tiveram um efeito contínuo até a morte dos peixes entre quarenta e oito e setenta e duas horas.

Verificamos que no pacu a administração de 5U/Kg de peso de insulina suína resultou em hipoglicemia mais intensa e duradoura em relação às demais doses testadas. As doses intermediárias (1U/Kg e 2,5U/Kg de peso) não foram diferentes

quanto à ação hipoglicêmica, e produziram taxa de queda até a sexta hora de 7,7%/h e 8,2%/h, respectivamente. Por sua vez, 5U/Kg de peso corpóreo provocou hipoglicemia até a décima segunda hora, com taxa de queda de 8,4%/h nas primeiras seis horas e 7,5%/h nas seis horas subsequentes. Considerando que grande parte da insulina é degradada via receptor depois de exercer sua ação (ROTH; GRUNFELD, 1985), espera-se que doses maiores provoquem hipoglicemia mais duradoura. Porém, a responsividade ao hormônio depende de vários fatores além da sua interação com o receptor, incluindo a condição intra-celular e os efeitos concomitantes dos hormônios contra-regulatórios ou sinérgicos (GENUTH, 1990). É provável que a maior dose testada no presente estudo (5U/Kg) além de ter promovido a ocupação dos receptores por maior tempo, tenha conseguido suplantar os efeitos dos hormônios contra-regulatórios, resultando numa ação potencializada na sua intensidade e duração.

Nos animais submetidos à administração de insulina, a intensidade da queda glicêmica em T3 não foi dependente da dose injetada e teve relação positiva com a glicemia inicial. Thorpe, Ince (1974) relataram que espécies que apresentam baixos níveis glicêmicos são mais resistentes ou mesmo insensíveis à insulina. Em *Ictalurus melas* (Ottolenghi *et al.*, 1982) o efeito hipoglicemiante da insulina foi mais pronunciado nos animais alimentados do que naqueles que, em função do jejum prolongado, apresentavam valores glicêmicos menores.

Verificamos que todos os peixes do grupo controle exibiram hipoglicemia significativa seis horas após a administração de solução salina. Analisando os experimentos em que foram investigados os possíveis promotores dessa resposta, comprovamos que a glicemia não se alterou com os procedimentos testados e pareceu obedecer a um ritmo diário. Observou-se o maior nível glicêmico no período matutino (9:00-10:00 horas) e menor no período noturno (21:00-22:00 horas). Interessante notar que nos primeiros experimentos realizados com temperatura média de 25°C-26°C, a hipoglicemia foi observada seis horas após a primeira coleta de sangue (entre 15:00-

16:00 horas), enquanto nos últimos em que a temperatura média caiu para 21°C-22° C, esta passou a ocorrer após doze horas (21:00-22:00 horas). Esse fato indica a possibilidade da queda glicêmica estar sob a influência de um ritmo biológico endógeno que foi alterado pela queda da temperatura ou sazonalidade.

SOVIO *et al.* (1975) verificaram em *Salmo gairdneri* com cânula implantada na aorta dorsal, aumento da glicemia no período matutino (9:40-10:30 horas) em relação ao período noturno. Os autores sugeriram que a rotina de trabalho no laboratório tinha funcionado como um arrastador para um possível ritmo circadiano, mesmo estando esses animais sob luz contínua. PEREZ *et al.* (1989) observaram em *Dicentrarchus labrax* um ritmo diário de insulinemia relacionado aos níveis de metabólitos.

Por outro lado, os ácidos graxos livres e o cortisol pareceram ter sido influenciados pelas coletas sanguíneas seriadas, sendo verificada uma relação inversa entre ambos seis horas após a primeira amostragem. É provável que a manipulação constante da cânula e as retiradas consecutivas de sangue tenham provocado distúrbios osmorregulatórios. Segundo SAKAMOTO *et al.* (1993) existem evidências de que em salmonídeos a ação osmorregulatória do hormônio de crescimento é mediada pelo cortisol, hormônios da tireóide e pelas somatomedinas, principalmente a IGF-I (fator de crescimento semelhante a insulina-I). Em mamíferos, as somatomedinas mimetizam o efeito da insulina no tecido adiposo, incluindo a estimulação da oxidação da glicose, a síntese de glicogênio e lipídeos e inibe a lipólise estimulada pela epinefrina (UNDERWOOD; VAN WYK, 1985). De acordo com O'CONNOR *et al.* (1993) a ação do hormônio de crescimento sobre a mobilização de lipídios em peixes parece ser variável e dependente do tempo de exposição. Provavelmente, exposição por curtos períodos de tempo resulta em ação lipogênica (semelhante à insulina), enquanto os longos períodos produzem ação lipolítica.

### 5.3 - Ação da Menor Dose Hipoglicemiante de Insulina Sobre as Reservas de Carboidratos e Ácidos Graxos Livres Plasmáticos

Neste estudo, verificou-se uma ampla variação individual do teor de glicogênio nos tecidos, tanto na condição pré-experimental quanto na experimental. As maiores reservas foram encontradas no fígado, seguido pelo músculo esquelético vermelho, coração, músculo esquelético branco e cérebro.

Os peixes mantidos em condição experimental apresentaram aumento das reservas de glicogênio hepático e do músculo cardíaco concomitante com os níveis elevados de glicemia. Em *Salmo gairdneri* (MORALES *et al.*, 1990) o manuseio, a anestesia e a injeção de solução salina, produziram inicialmente uma correlação inversa entre glicemia e glicogênio hepático, que posteriormente tornou-se positiva. Segundo MORALES *et al.* (1990) em situações estressantes, as catecolaminas induzem à glicogenólise e os glicocorticóides ativam a gliconeogênese a partir do lactato e do glicerol repondo as reservas de glicogênio hepático.

A elevação da concentração de glicogênio no músculo cardíaco pela ação da adrenalina tem sido demonstrada em estudos *in vivo*. Esse efeito resulta provavelmente da ação secundária do hormônio sobre o tecido adiposo, promovendo lipólise e conseqüentemente aumento de ácidos graxos livres, que são captados pelo miocárdio e utilizados como fonte energética. Embora a captação da glicose possa estar diminuída, uma grande parte que chega ao coração é desviada para a síntese de glicogênio (LANDSBERG; YOUNG, 1992).

O efeito da insulina sobre as reservas de glicogênio nos tecidos hepático e muscular esquelético de peixes é controverso. A administração prolongada de insulina bovina em *Salmo gairdneri* R. (ABLETT *et al.*, 1981) não produziu efeito sobre o conteúdo de glicogênio hepático e muscular. Por outro lado, em *Dicentrarchus labrax*

juvenis, (PEREZ *et al.* 1989) a insulina de bonito (2U/Kg de peso corpóreo) causou aumento significativo do glicogênio muscular, mas nenhuma diferença foi observada no teor de glicogênio hepático entre peixes controles e tratados. Doses farmacológicas de insulina, proveniente de mamíferos, (60U/Kg a 350U/Kg de peso corporal) produziram decréscimo da concentração de glicogênio hepático, associado ao aumento (LEWANDER *et al.*, 1976; OTTOLENGHI *et al.*, 1981) ou manutenção do teor de glicogênio muscular (CARNEIRO; AMARAL, 1983).

No presente estudo a administração intra-arterial de insulina (1U/Kg de peso corpóreo) não alterou a concentração de glicogênio hepático e muscular, a despeito da queda glicêmica significativa em relação aos animais controle. Contudo, a redução da glicemia tanto nos animais controles quanto nos testes foi menor do que a observada no experimento anterior, em que foi injetada igual dose hormonal. É provável que a queda da temperatura da água de  $26\pm 0,8^{\circ}\text{C}$  para  $21\pm 1,2^{\circ}\text{C}$  tenha determinado o menor efeito da insulina. HOCHACHKA *apud* VLAMIG; PARDO (1975) verificou que em temperatura elevada, as sínteses de glicogênio e lipídio foram favorecidas em preparações de fígado de *Lepidosiren paradoxa* e *Symbranchus marmoratus*. OLMSTED *apud* VLAMIG; PARDO (1975) demonstrou que o efeito da insulina em teleósteos e anfíbios varia com a temperatura. É possível que a variação sazonal da temperatura tenha interferido na interação hormônio receptor. No anfíbio *Rana esculenta* (SCAPIN; INCEPI, 1992) foi demonstrado que a capacidade de ligação da insulina aos receptores de membrana de hepatócitos foi marcadamente afetada pela estação: a ligação total foi maior no verão do que no inverno. PLISETSKAYA *et al.* (1993) demonstraram em estudo *in vivo*, que a uma temperatura de  $15^{\circ}\text{C}$  ou maior, as mudanças substanciais dos níveis fisiológicos de insulina podem regular o número de receptores no hepatócito de salmonídeos.

O glicogênio cardíaco e cerebral não se modificaram após a administração de insulina. São poucos os estudos que tratam da ação da insulina sobre o

glicogênio no músculo cardíaco. OTTOLENGHI *et al.* (1982) observaram em *Ictalurus melas* alimentados uma resposta bifásica, ou seja, manutenção da concentração em relação aos controles durante um dia, seguida por um decréscimo significativo. O efeito da insulina sobre as reservas de glicogênio cerebral em peixes teleósteos tem recebido pouca atenção. Os estudos conduzidos em Agnatas têm demonstrado a presença de receptores de insulina no tecido cerebral, mas a sua localização não foi definida (PLISETSKAYA, 1985). Posteriormente, LEIBUSH; BONDAVERA e LEIBUSH *et al.* *apud* PLISETSKAYA (1989) demonstraram que, em contraste com os animais homeotérmicos, as concentrações plasmáticas de insulina não alteram o número de receptores de insulina no miocárdio e membrana cerebral de lampréias. FOSTER *et al.* (1993) demonstraram que em lampréias adultas (*Petromyzon masinus*) a insulina pode determinar a síntese de glicogênio cerebral.

Os estudos da regulação insulínica sobre o metabolismo de lipídeos têm focado principalmente seu efeito sobre concentração de ácidos graxos livres plasmáticos. A insulina exógena (bovina, suína ou obtida de teleósteos) quando administrada em peixes produz, concomitante com hipoglicemia, declínio marcado dos ácidos graxos livres plasmáticos (LEWANDER *et al.*, 1976; MINICK; CHAVIN, 1972; PEREZ *et al.*, 1989).

Investigações recentes têm procurado determinar se essa redução plasmática de ácidos graxos livres em presença de insulina exógena resulta de uma ação anti-lipolítica e lipogênica. PLISETSKAYA *et al.* (1989) verificaram que a deficiência aguda da insulina provocada por imunoneutralização específica produziu aumento da atividade lipolítica no fígado de *Oncorhynchus kisutch* e *Oncorhynchus tshawytscha*. Em *Oncorhynchus nerka*, a insulina teve um efeito direto sobre a mobilização de lipídios inibindo a lipólise estimulada pelo glucagon e a atividade da lipase triacilglicerol (HARMON; SHERIDAN, 1992). Os resultados do estudo com *Oncorhynchus mikiss*

(COWEY; SHERIDAN, 1993), mostrou a sua ação lipogênica manifestada pela elevação do teor de lipídios hepáticos e atividade aumentada da ácido graxo sintetase.

No presente estudo, a insulina suína (1U/Kg de peso corporal) produziu remoção rápida de ácidos graxos livres plasmáticos. A magnitude desse decréscimo em relação ao controle uma hora após a administração do hormônio, foi similar a relatada por MINICK; CHAVIN (1972) para *Carassius auratus* L. submetidos à injeção intraperitoneal com igual dose de insulina bovina. Contudo, no *Piaractus mesopotamicus* o efeito não se prolongou por mais de três horas, enquanto no *Carassius auratus* o decréscimo se manteve por doze horas. É provável que no *Piaractus mesopotamicus* a insulina tenha um efeito primário sobre o metabolismo lipídico.

## 6 - CONCLUSÕES

Os experimentos mostraram que:

- O *Piaractus mesopotamicus* tolerou os procedimentos de implante de cânula, sendo registrada baixa mortalidade em consequência da cirurgia.
- As amostragens sanguíneas e a administração hormonal foram realizadas com rapidez, facilidade e não causaram qualquer distúrbio visível nos peixes.
- Os procedimentos de captura, manuseio, anestesia e cirurgia para implante de cânula causaram elevação da glicemia, da cortisolemia e da concentração plasmática de ácidos graxos livres.
- O intervalo de tempo requerido para a recuperação dos procedimentos cirúrgicos, para a adaptação à caixa experimental e para o início da intervenção hormonal foi quarenta e oito horas.
- A menor dose capaz de promover hipoglicemia foi 1U/Kg de peso corporal, sendo registrado o efeito máximo na terceira hora e o retorno aos níveis iniciais na vigésima quarta hora, considerando a hipoglicemia invariavelmente presente nos animais controle no curso das seis horas iniciais.
- Os resultados do experimento inicial que investigou a influência da coleta seriada de sangue e a administração de solução salina como agentes promotores da resposta hipoglicêmica nos animais controle indicaram que: a hipoglicemia não foi promovida pelos procedimentos testados, enquanto o cortisol e os ácidos graxos livres plasmáticos sofreram alterações, verificando-se uma relação inversa entre ambos seis e doze horas após a primeira amostragem.

- A menor dose efetiva (1U/Kg de peso corporal) produziu declínio imediato e pronunciado da concentração plasmática de ácidos graxos livres, contrastando com a hipoglicemia mais lenta e duradoura.
- As reservas de glicogênio hepático não foram alteradas, possivelmente por influência da queda da temperatura.

Pela análise do conjunto de resultados conclui-se que o modelo experimental padronizado proporcionou o estudo dos efeitos da insulina exógena com mínima participação dos agentes e dos hormônios da reação ao estresse. Em *Piaractus mesopotamicus* juvenis, a insulina exerceu um efeito anti-lipolítico e lipogênico que pareceu ser mais rápido do que a ação hipoglicemiante, indicando função importante na regulação do metabolismo lipídico.

## 7 - RESUMO

Este trabalho teve o propósito de padronizar um modelo para estudo de intervenção hormonal, usando o teleósteo *Piaractus mesopotamicus*. O efeito da insulina *in vivo* sobre o metabolismo de carboidratos e lipídios, foi investigado em *Piaractus mesopotamicus* juvenis, com cânula crônica implantada na aorta dorsal e mantidos em caixa de experimentação especial. O estudo foi conduzido em três etapas: 1- verificou-se a viabilidade do implante da cânula crônica aórtica nessa espécie, da sua manutenção em caixa de experimentação especial, do período de tempo necessário para a recuperação do estresse cirúrgico e para o início da intervenção hormonal, através da monitoração dos níveis de glicose, ácidos graxos livres e cortisol plasmáticos; 2- determinou-se a menor dose capaz de promover hipoglicemia, os tempos de efeito máximo e de recuperação frente a várias doses de insulina suína regular-BIOBRÁS (0,25U/Kg, 1,0U/Kg, 2,5U/Kg e 5,0U/Kg); 3- verificou-se o efeito da menor dose hipoglicemiante sobre as reservas de glicogênio hepático, muscular esquelético branco e vermelho, muscular cardíaco, cerebral e a concentração de ácidos graxos livres plasmáticos. Os resultados demonstraram que a espécie estudada tolerou os procedimentos de implante de cânula e adaptou-se às condições experimentais. Houve aumento dos níveis de glicose, cortisol e ácidos graxos livres plasmáticos em resposta aos procedimentos de captura, manuseio, anestesia e cirurgia, sendo necessárias quarenta e oito horas para a estabilização dos indicadores mensurados e para o início da intervenção hormonal. A menor dose hipoglicemiante foi 1,0U/Kg de peso corporal, com efeito máximo na terceira hora e retorno aos níveis iniciais na vigésima quarta hora após a administração hormonal, considerando a hipoglicemia invariavelmente presente nos animais controle no curso das seis horas iniciais. Devido a este fato, investigou-se a influência da coleta seriada e/ou

administração de solução salina como agentes promotores da resposta hipoglicêmica dos animais controle. Os resultados indicaram que a hipoglicemia não foi promovida pelos procedimentos testados, enquanto o cortisol e os ácidos graxos livres plasmáticos sofreram alterações, verificando-se uma relação inversa entre ambos seis e doze horas após a primeira amostragem. A menor dose efetiva (1,0U/Kg peso corporal) produziu declínio imediato e pronunciado dos ácidos graxos livres plasmáticos, em contraste com a hipoglicemia mais lenta e duradoura. As reservas teciduais de glicogênio não foram alteradas, possivelmente por influência da queda da temperatura. Os resultados do presente trabalho indicam que o modelo padronizado permitiu a amostragem de sangue seriada, a administração hormonal (após adequado período de recuperação pós-cirúrgico) e minimizou os efeitos do estresse causado pelo manuseio. Em *Piaractus mesopotamicus* juvenis, a insulina exerceu um efeito anti-lipolítico e lipogênico, que parece ser mais rápido do que a ação hipoglicemiante, indicando função importante na regulação do metabolismo lipídico.

## 8 - SUMMARY

The main aim of this work was to standardize a model for studying the hormone intervention, using the teleost *Piractus mesopotamicus*. It was investigated the effect of insulin *in vivo* on the carbohydrate and lipid metabolism of young *Piractus mesopotamicus*, using a chronic cannula inserted into the dorsal aorta and kept in special experimentation boxes. The research was carried out in three stages: 1- It was verified the viability of implanting the aortic chronic cannula into *Piractus mesopotamicus* and keeping it in a special experimentation box, the period of time necessary for overcoming surgical stress, and the beginning of the hormone intervention by the monitoring of glucose, free fat and plasma cortisol levels; 2-It was also determined the lowest dose which is able to cause hypoglycemia, the maximum effect and recovering time towards several regular suine insulin doses-BIOBRAS (0,25U/Kg, 1,0U/Kg, 2,5U/Kg e 5,0U/Kg); 3- It has been verified the effect of the lowest hypoglycemic dose upon the liver, white and red skeletal muscles, brain, myocardium glycogen contents and the concentration of plasmatic free fat. The results have shown that the studied species had tolerated the cannula implantation procedures and got used to the experimental conditions. There was an increase of glucose, cortisol and plasmatic free fat levels in response to the capture, handling, anesthesia and surgery procedures, being necessary 48 hours for the stabilization of the measured indicators and for beginning the hormones intervention. The lowest hypoglycemic dose was 1,0U/Kg of body weight, with maximum effect in the third hour and the return to the beginning levels in the 24th hour after the hormone administration, considering hypoglycemia invariably present in the control animals during the first 6 hours. Due to this fact, it was investigated the influence of the repeated blood sampling and/or administration of saline solution as promoting agents of the response of the control

animals. The results indicated that hypoglycemia was not promoted by the tested procedures, whereas cortisol and plasmatic free fat underwent alterations, showing an inverse relationship between cortisol and plasmatic free fat six and twelve hours after the first sampling. The lowest effective dose (1,0U/Kg body weight) caused immediate and pronounced decrease of the plasmatic free fat, contrasted to the slower and more lasting hypoglycemia. The glycogen tissue reservations did not alter, possibly because of the influence of the temperature decrease. The results of the work have shown that the standardized model allowed the serial blood sampling and hormone administration (after adequate postsurgery recovery period), minimizing the effects of stress caused by handling. In young *Piractus mesopotamicus*, insulin caused an antilipolytic and/or antilipogenic effect which seemed to be faster than the hypoglycemic action, indicating an important role on the regulation of lipid metabolism.

## 9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

- 1- ABLETT, R.F., SINNHUBER, R.O., HOLMES, R.M., *et al.* The effect of prolonged administration of bovine insulin in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). **Gen. Comp. Endocrinol.** , v.43, p.211-217, 1981.
- 2- AKIOSHI, R., URBINATI, E.C., ROVIEIRO, D.P. Comportamento glicêmico, em pacus de cativeiro, durante jejum e realimentação. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7, Caxambu, 1992. **Resumos...** Caxambu: FESBE, 1992. p.245.
- 3- BENTLEY, P.J. **Comparative vertebrate Endocrinology**. 2. ed. New York: Cambridge University, 1982. 485 p.
- 4- BLASCO, J., FERNÁNDEZ, J., GUTIÉRREZ, J. Fasting and refeeding in carp, *Cyprinus carpio* L.: the mobilization of reserves and plasma metabolite and hormone variations. **J. Comp. Physiol. B**, v.162, p.539-546, 1992.
- 5- BONNER-WEIR, B., WEIR, G.C. The organization of the endocrine pancreas: a hypothetical unifying view of the phylogenetic differences. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.38, p.28-37, 1979.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - NBR 6023: Referências bibliográficas. Rio de Janeiro: Forum Nacional de Normalização, 1989. 10p.

- 6- CANTELMO, O.A. Níveis de proteína e energia em dietas para o crescimento do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg, 1887, em sistema de criação superintensiva. Florianópolis: UFSC, 1993. 47 p. (Dissertação) Mestrado em Aqüicultura - Universidade Federal de Santa Catarina, 1993.
- 7- CHAVIN, W., YOUNG, J.E. Factors in the determination of normal serum glucose levels of goldfish, *Carassius auratus* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.33, p.629-653, 1970.
- 8- CARNEIRO, N.M., AMARAL, A.D. Effects of insulin and glucagon on plasma glucose levels and glycogen content in organs of the freshwater teleost *Pimelodus maculatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.49, p.115-121, 1983.
- 9- COWEY, C.B., DE LA HIGUERA, M., ADRON, J.M. The effect of dietary composition and of insulin on gluconeogenesis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Brit. J. Nutr.*, v.38, p.385-395, 1977.
- 10- COWLEY, D.J., SHERIDAN, M.A. Insulin stimulates hepatic lipogenesis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.*, v.11, p.421-428, 1993.
- 11- DEAN, J.M., GOODNIGHT, C.J. A comparative study of carbohydrate metabolism in fish as affected by temperature and exercise. *Physiol. Zool.*, v.37, p.280-299, 1964.
- 12- DUTHIE, G.G., TORT, L. Effects of dorsal aortic cannulation on the respiration and haematology of mediterranean living *Scyliorhinus Canicula* L. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.81A, p.879-883, 1985.

- 13- FARKAS, T. The effect of catecholamines and adrenocorticotrophic hormone on blood and adipose tissue FFA levels in the fish *Cyprinus carpio* L. **Progr. Biochem. Pharmacol.**, v.3, p.314-319, 1967.
- 14- FERNANDEZ, J., PLANAS, J. Annual variations of some carbohydrate and lipid parameters in the fish *Spicara Chryselis* during captivity. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.67A, p.383-389, 1980.
- 15- FERRAZ DE LIMA, J.A. A pesca no pantanal de Mato Grosso (Rio Cuiabá: Biologia e Ecologia Pesqueira). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 2, Recife, 1981. **Anais...** Recife: 1981, p.503-516.
- 16- \_\_\_\_\_ . Observações sobre a biologia do pacu (*Colossoma mitrei*) do rio Cuiabá - Pantanal de Mato Grosso. Mato Grosso: COREG SUDEPE, 1983, (Informações Técnicas de Circulação Interna).
- 17- FLETCHER, D.J. Plasma glucose and plasma fatty acid levels of *Limanda limanda* (L.) in relation to season, stress, glucose loads and nutritional state. **J. Fish Biol.** v.25, p.629-649, 1984.
- 18- FONTAINE, Y.A. Hormonal peptide evolution. In: FOREMAN, R.F., GORBMAN, A., DODD, J.M., OLSSON, R. (ed.) **Evolutionary biology of primitive fishes.** New York: Plenum, 1985, p.413-432.

- 19- FOSTER, G.D., MOON, T.W. Metabolism in sea raven (*Hemitripterus americanus*) hepatocytes: the effects of insulin and glucagon. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.66, p.102-115, 1987.
- 20- FOSTER, G.D., YOUSON, J.H., MOON, T.W. Carbohydrate metabolism in the brain of the adult lamprey. *J. Exp. Zool.*, v.267, p.27-32, 1993.
- 21- GENUTH, S.M. O sistema endócrino. In: BERNE, R. M., LEVY, M. N. (ed.) *Fisiologia* . 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990, p.653-667.
- 22- GUTIERREZ, J., ÅSGÅRD, T., FABBRI, E., PLISETSKAYA, E.M. Insulin receptors in skeletal muscles of trout fed carbohydrate-enriched diet. *Amer. Zool.*, v.29, p.19A, 1989.
- 23- HARMON, J.S., EILERTSON, C.D., SHERIDAN, M.A., *et al.* Insulin suppression is associated with hypersomatostatinemia and hyperglucagonemia in glucose-injected rainbow trout. *Am. J. Physiol.*, v.30, p.609-613, 1991.
- 24- HARMON, J.S., SHERIDAN, M.A. Effects of nutritional state, insulin, and glucagon on lipid mobilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.87, p.214-221, 1992.
- 25- HOUSTON, A.H., DEWILDE, M.A., MADDEN J.A. Some physiological consequences of aortic catheterization on the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Res. Bd. Canada*, v.26, p.1847-1856, 1969.

- 26- HOUSTON, A.H., MADDEN, J.A., WOODS, R.J., *et al.* Some physiological effects of handling and tricaine methane-sulphonate anesthetization upon the brook trout, *Salvelinus fontinalis*. **J. Fish. Res. Bd. Canada**, v.28, p.625-642, 1971.
- 27- INCE, B.W., THORPE, A. Effects of insulin and of metabolite loading on blood metabolites in the european silver eel, (*Anguilla anguilla* L.). **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.23, p.460-471, 1974.
- 28- \_\_\_\_\_ . Hormonal and metabolite effects on plasma free fatty acids in the northern pike, *Esox lucius* L. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.27, p.144-152, 1975.
- 29- KRIEGER-AZZOLINI, M.H., CAROLSFELD, J., DELATTRE, E., *et al.* Determinação dos indicadores endócrinos e metabólicos no estresse de manejo em pacu juvenil, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887. **B. Téc. CEPTA**, v.2, p.35-42, 1989.
- 30- LANDSBERG, L., YOUNG, J.B. Catecholamines and the adrenal medulla. In: WILSON, J.D., FOSTER, D.W. (ed.) **Williams textbook of Endocrinology**. 8. ed. Philadelphia: Saunders, 1992. p.621-705.
- 31- LATORRACA, M.Q. Relatório de atividades: fevereiro a dezembro de 1991. Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração Fisiologia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1992. 11 p.
- 32- LEIBSON, L., PLISETSKAYA, E.M. Effect of insulin on blood sugar level and glycogen content in organs of some cyclostomes and fish. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.11, p.381-392, 1968.

- 33- LEWANDER, K., DAVE, G., JOHANSSON-SJÖBECK, M. *et al.* Metabolic effects of insulin in the european eel, *Anguilla anguilla* L. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.29, p.455-467, 1976.
- 34- MACHADO, C.R., GAROFALO, M.A.R., ROSELINO, J.E.S., *et al.* Effects of starvation, refeeding, and insulin on energy-linked metabolic processes in catfish (*Rhamdia hilarii*) adapted to a carbohydrate-rich diet. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.71, p.429-437, 1988.
- 35- MAZEAUD, M.M., MAZEAUD, F., DONALDSON, E.M. Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v.106, p.201-212, 1977.
- 36- MINICK, M.C., CHAVIN, W. Effects of hormones upon serum free fatty acids in goldfish (*Carassius auratus* L.). **Amer. Zool.**, v.9, p.1082-1089, 1969.
- 37- \_\_\_\_\_ . Effects of vertebrate insulins upon serum FFA and phospholipid levels in the goldfish, *Carassius auratus* Linnaeus. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.41A , p.791-805, 1972.
- 38- MOMMSEN, T.P., PLISETSKAYA, E.M. Insulin in fishes and agnathans: history, structure, and metabolic regulation. **Rev. Aqu. Sci.**, v.4, p.225-259, 1991.

- 39- MONTREZOR, L.H., URBINATI, E.C., PÁDUA, D.M.C. Efeito da idade e temperatura nas reservas de carboidratos em pacus (*Piaractus mesopotamicus*) de cativeiro. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 7, Caxambu, 1992. Resumos... Caxambu: FESBE, 1992. p.245.
- 40- MORALES, A.E., GARCÍA-REJÓN, L., DE LA HIGUERA, M. Influence of handling and/or anaesthesia on stress response in rainbow trout. Effects on liver primary metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.95A, p.87-93, 1990.
- 41- MORATA, P., FAUS, M.J., PEREZ-PALOMO, M., *et al.* Effect of stress on liver and muscle glycogen phosphorylase in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, v.72B, p.421-425, 1982.
- 42- MUGGEO, M., GINSBERG, B.H., ROTH, J., *et al.* The insulin receptor in vertebrates is functionally more conserved during evolution than insulin itself. *Endocrinology*, v.104, p.1393-1402, 1979.
- 43- NARASIMHAN, P.V., SUNDARARAJ, B.I. Effects of stress on carbohydrate metabolism in the teleost *Notopterus notopterus* (Pallas). *J. Fish. Biol.*, v.3, p.441-451, 1971.
- 44- NGAN, P.V., HANYU, I., HIBIYA, T. Implantation of Cannula into dorsal aorta of the carp. *Japan. J. Ichthyol.*, v.20, p. 79-84, 1973.

- 45- O'CONNOR, P.K., REICH, B., SHERIDAN, M.A. Growth hormones stimulates hepatic lipid mobilization in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **J. Comp. Physiol. B**, v.163, p.427-431, 1993.
- 46- OTTOLENGHI, C., PUVIANI, A.C., BRIGHENTI, L. Glycogen in liver and other organs of catfish (*Ictalurus melas*): seasonal changes and fasting effects. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.68A, p.313-321, 1981.
- 47- OTTOLENGHI, C., PUVIANI, A.C., BARUFFALDI, A. "In vivo" effects of insulin on carbohydrate metabolism of catfish (*Ictalurus melas*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.72A, p.35-41, 1982.
- 48- PANKHURST, N.W., WELLS, R.M.G., CARRAGHER, J.F. Effects of stress on plasma cortisol levels and blood viscosity in blue mao mao, *Scorpius violaceus* (Hutton), a marine teleost. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.101A, p.335-339, 1992.
- 49- PEREZ, J., GUTIEREZ, J., CARRILLO, M., *et al.* Effect of bonito insulin injection on plasma immunoreactive glucagon levels and carbohydrate and lipid metabolism of sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comp. Biochem. Physiol.**, v.94A, p.33-36, 1989.
- 50- PETERSEN, T.D.P., HOCHACHKA, P.W., SUAREZ, R.K. Hormonal control of gluconeogenesis in rainbow trout hepatocytes: regulatory role of pyruvate kinase. **J. Exp. Zool.**, v.243, p.173-180, 1987.
- 51- PFEIFFER, E.F. Impact of insulin research upon biomedicine and clinical investigation. **Horm. Metab. Res.**, v.26, p.1-11, 1993.

- 52- PICKERING, A.D. Rainbow trout husbandry: management of the stress response. **Aquaculture**, v.100, p.125-139, 1992.
- 53- PICKERING, A.D., POTTINGER, T.G., CHRISTIE, P. Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. **J. Fish Biol.**, v20, p.229-224, 1982.
- 54- PIRES, R.C., URBINATI, E.C., AKIHOSHI, R. Estudos da capacidade de utilização de carboidratos pelo pacu *Piaractus mesopotamicus*, e traíra *Hoplias malabaricus*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 6, Caxambu, 1991. **Resumos...** Caxambu: FESBE, 1991. p.425.
- 55- PLISETSKAYA, E. Brain and heart glycogen content in some vertebrates and effect of insulin. **Endocrinol. Experiment.**, v.2, p.251-262, 1968.
- 56- \_\_\_\_\_ . Fatty acid levels in blood of cyclostomes and fish. **Env. Biol. Fish.**, v.5, p.273-290, 1980.
- 57- PLISETSKAYA, E. Some aspects of hormonal regulation of metabolism in agnathans. In: FOREMAN, R.F., GORBMAN, A., DODD, J.M., OLSSON, R. (ed.) **Evolutionary biology of primitive fishes**. New York: Plenum, 1985. p.339-361.
- 58- PLISETSKAYA, E.M. Physiology of fish endocrine pancreas. **Fish Physiol. Biochem.**, v.7, p.39-48, 1989.

- 59- PLISETSKAYA, E., BHATTACHARYA, S., DICKHOFF, W.W., et al. The effect of insulin on amino acid metabolism and glycogen content in isolated liver cells *Oncorhynchus kisutch*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.78A, p.773-778, 1984.
- 60- PLISETSKAYA, E., FABBRI, E., MOON, T.W., et al. Insulin binding to isolated hepatocytes of atlantic salmon and rainbow trout. **Fish Physiol. Biochem.**, v.11, p.401-409, 1993.
- 61- PLISETSKAYA, E., JOOSSE, J. Hormonal regulation of carbohydrate metabolism in molluscs. In: LOFTS, B., HOLMES, W.N. (ed.) **Current trends in Comparative Endocrinology**. Hong Kong: Hong Kong University, 1985. p.1077-1079.
- 62- PLISETSKAYA, E., LEIBUSH, B.N., BONDAREVA, V. The secretion of insulin and its role in cyclotomes and fishes. In: GRRILLO, T.A.L., LIEBSON, L., EPPLE, A. (ed.) **The evolution of pancreatic islets**. Oxford: Pergamon, 1976. p.251- 269.
- 63- PLISETSKAYA, E., POLLOCK, H.G., ROUSE, J.B., et al. Characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) insulin. **Reg. Peptides**, v.11, p.105-116, 1985.
- 64- PLISETSKAYA, E., SHERIDAN, M.A., MOMMSEN, T.P. Metabolic changes in coho and chinok salmon resulting from acute insufficiency in pancreatic hormones. **J. Exp. Zool.**, v.249, p.158-164, 1989.
- 65- REGOUW, B.J.M., CORNELISSEN, P.J.H.C., HELDER, R.A.P., et al. Specific determination of free fatty acid in plasma. **Clin. Chim. Acta**, v.31, p.187-195, 1971.

- 66- ROUTH, J., GRUNFELD, C. Mechanism of action of peptide hormones and catecholamines. In: WILSON, J.D., FOSTER, D.W. (ed.) **Williams textbook of Endocrinology**. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 1985. p.76-122.
- 67- SAKAMOTO, T., McCORMICK, S.D., HIRANO, T. Osmoregulatory actions of growth and its mode of action in salmonids: a review. **Fish Physiol. Biochem.**, v.11, p.155-164, 1993.
- 68- SCAPIN, S., INCERPI, S. Annual variations in the binding of insulin to hepatic membranes of the frog *Rana esculenta*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.86, p.128-137, 1992.
- 69- SHERIDAN, M.A., MOMMSEN, T.P. Effects of nutritional state on *in vivo* lipid and carbohydrate metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. **Gen. Comp. Endocrinol.**, v.81, p.473-483, 1991.
- 70- SJÖGREN, B., NORDENSKJÖLD, T., HOLMGEEM, H., *et al.* Beitrag zur kenntnis der leberhythmik (glykogen, phosphor und calcium in der kaninchenleber). **Pflügers Arch. Ges. Physiol.**, v.240, p.427, 1938.
- 71- SOIVIO, A., NYNOLM, K., WESTMAN, K. A technique for repeated sampling of the blood of individual resting fish. **J. Exp. Biol.**, v.62, p.207-217, 1975.
- 72- SOKAL, R.R., ROHLF, F.J. **Biometry**. 2. ed. New York: Freeman, 1981. 859 p.

- 73- SOUSA, V.L., URBINATI, E.C., ROVIEIRO, D.P. Estudos metabólicos em pacus juvenis (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos à restrição alimentar e realimentação. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 8, Caxambu, 1993. Resumos... Caxambu: FESBE, 1993. p.255.
- 74- THORPE, A., INCE, B.W. The effects of pancreatic hormones, catecholamines, and glucose loading on blood metabolites in the northern pike (*Esox lucius* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, v.23, p.29-44, 1974.
- 75- UNDERWOOD, L.E., VAN WYK, J.J. Normal and aberrant growth. In: WILSON, J.D., FOSTER, D.W. (ed.) *Williams textbook of Endocrinology*. 6. ed. Philadelphia: Saunders, 1985. p.155-205.
- 76- URBINATI, E.C. Alterações metabólicas ligadas ao ciclo reprodutivo no pacu, *Piaractus mesopotamicus*. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 6, Caxambu, 1991. Resumos... Caxambu: FESBE, 1991. p.429
- 77- VAZZOLER, A.E.A.M. *Manual de métodos para estudos biológicos de populações de peixes. Reprodução e crescimento*. Brasília: CNPq, Programa Nacional de Zoologia, 1981. 108 p.
- 78- VIEIRA, J.G.H., RUSSO, E.M.K., GERMEK, O.A., et al. Método radioimunológico para a dosagem do cortisol sérico. *Rev. Bras. Patol. Clin.*, v.15,p.125-130, 1979.

- 79- VLAMIG, V.L. de, PARDO, R.J. *In vitro* effects of insulin on liver lipid and carbohydrate metabolism in the teleost, *Notemigonus crysoleucas*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.51B, p.489-497, 1975.