



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRÉA MARTINI RIBEIRO

**ACÚMULO TECIDUAL, RESPOSTA DE ESTRESSE E PERFIL
OSMORREGULATÓRIO DE *Prochilodus lineatus* NAS PRIMEIRAS 24
HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO**

ANDRÉA MARTINI RIBEIRO

**ACÚMULO TECIDUAL, RESPOSTA DE ESTRESSE E PERFIL
OSMORREGULATÓRIO DE *Prochilodus lineatus* NAS PRIMEIRAS 24
HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na instituição associada Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dra. Cláudia Bueno dos Reis
Martinez

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

R484a Ribeiro, Andréa Martini.

Acúmulo tecidual, resposta de estresse e perfil osmorregulatório de *Prochilodus lineatus* nas primeiras 24 horas de exposição ao chumbo / Andréa Martini Ribeiro.
– Londrina, 2014.
iv, 113 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Peixe – Efeito dos metais – Teses. 2. Peixe – Toxicologia – Teses. 3. Chumbo –
Biocumulação – Teses. 4. Regulação osmótica – Teses. 5. *Prochilodus lineatus* – Teses.
I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de
Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.
III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 597.554.1

ANDRÉA MARTINI RIBEIRO

**ACÚMULO TECIDUAL, RESPOSTA DE ESTRESSE E PERFIL
OSMORREGULATÓRIO DE *Prochilodus lineatus* NAS PRIMEIRAS 24
HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO**

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na instituição associada Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dra. Cláudia Bueno dos Reis
Martinez
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Cássia Thaís B. V. Zaia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Profa. Dra. Marta Marques de Souza
Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira
Universidade de São Paulo – USP

Londrina, 12 de setembro de 2014.

Dedicatória

*À inteligência suprema, causa primária de todas as coisas,
Nosso Pai Eterno!*

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

“Nem todos podem tirar um curso superior. Mas todos podem ter respeito, alta escala de valores e as qualidades de espírito que são a verdadeira riqueza de qualquer pessoa.”

Alfred Montapert

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. **Cláudia**, como orientadora e coordenadora do programa. E por que em 2007 me recebeu em seu laboratório de braços abertos, e, com carinho e paciência, tornou-se uma das maiores responsáveis pelo meu crescimento profissional. Mas mais do que isso, foi além de seu papel de orientadora, e, mesmo sem saber, contribuiu para o meu crescimento pessoal, trazendo exemplos diários de humildade, justiça e gentileza.

Ao meu filho, **João Guilherme**, que, desde que se conhece por gente, vê sua Mamy descabelada e estressada, que só pensa em brânquias de peixe. Meu querido filho, que colaborou da sua melhor maneira, com paciência e compreensão, nos momentos em que estive ausente ou que não pude lhe dar a atenção que merecia. E à família dele do outro lado, que deram ao Gui a assistência de que ele necessitava, e indiretamente contribuíram para a minha formação permitindo que eu me ausentasse com tranquilidade.

Aos meus pais, **Cecília** e **Félix**, que sempre me deram todo o incentivo e suporte de que eu precisava, com compreensão, carinho e preocupação, para o desenrolar de todas as etapas. E que nunca mediram esforços para se fazerem presentes nas minhas batalhas diárias proporcionando, de forma indireta, o ambiente necessário para que este curso alcançasse um final de sucesso.

Ao meu namorado, **Cláudio** Lísias Gonçalves, que pegou o bonde andando, e encarou comigo todos os desafios de finais de semana na UEL, noites de estudo, cansaços e desabafos. Trouxe para a minha vida a luz que me mostrou uma nova perspectiva, e me deu um novo ânimo para que eu pudesse encarar todos os desafios que estavam por vir. A esse bunitinho minha gratidão e admiração! Também aos novos membros que chegaram a minha família e me receberam com muito amor e respeito.

Às minhas irmãs **Adriana** e **Aline** e a todos os **familiares** pela presença em minha vida, e por construírem comigo momentos de alegria, relaxamento e descontração.

Às minhas irmãs do coração, **Amanda** Gambale, **Dani** Bernardi e **Débora** Sorgi que, em momentos diferentes, de formas diferentes, souberam me dar o suporte que eu precisava para transpor os obstáculos que surgiram no decorrer desses 4 anos.

Às duas loiras mais inteligentes que eu já conheci, **Cássia** e **Lu**, que trouxeram para a minha vida acadêmica conhecimento, problemas e soluções, e permitiram que eu levasse para casa, ao final de cada dia, sabedoria para a vida, satisfação em poder ajudar, alegria de viver. A vocês a minha gratidão e admiração.

Às amigas ex-lefianas, **Claudinha**, **Lindi** e **Nati** que mesmo depois de finalizarem seus trabalhos, não permitiram que a distância física pusesse fim em nossas amizades.

Ao aspirante a biólogo **Thiego** que encarou com muito empenho e boa vontade um pedacinho desse projeto, e à sua mão direita **Bruna** que deu a ele todo o suporte técnico-científico.

Ao **Alexandre** que, com disponibilidade e paciência, hidrolisou comigo alguns ATPs na tentativa de clarear o lado obscuro de alguns protocolos.

Ao **LEFA** nas pessoas de: Angélica, Carlos, Carol, Cylene, Dalita, Débora, Edson, Eveline, Fernanda, Francine, Hellen, Kelly, Laura, Matheus, Milena, Nadjha, Natara, Thaís e Wagner, que passaram pelo laboratório nas diversas fases deste trabalho, e sem os quais este trabalho seria inviável. Obrigada pelo auxílio e disposição durante as 5 horas e meia em cada um dos experimentos. Obrigada pela companhia e conversas no laboratório. Obrigada pelos experimentos de campo, pelos congressos, pelas festas e encontros extra-LEFA.

Aos **colegas de curso**, mas especialmente àqueles que foram companhia nas viagens para disciplinas, encontros e congressos: Daniela, Hiviny, Ozhayr, Alexandre, Claudinha e Cássia.

À Profa. Dra. **Juliana** D. Simonato Rocha, que me acompanha com muito carinho desde a graduação, por estar sempre disposta para ajudar, pela paciência, pelos livros que emprestou, e pelos conselhos que sempre chegaram em boa hora.

Ao Prof. Dr. **Paulo** C. Meletti pelo suporte durante todas as etapas das análises histológicas, e por descobrir uma solução inovadora para cada problema dentro e fora do laboratório.

À Professora Dra. **Célia** Guadalupe e ao Técnico **Oswaldo** Capello pela receptividade no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Microanálise (LMEM) da UEL onde recebi suporte para realização das técnicas de microscopia eletrônica.

Ao **Wagner** e à **Luciana** pelo auxílio técnico na operação do espectrofotômetro de absorção atômica.

Ao **Marcelo** Paulino da UFSCar pelo suporte teórico e pelas incontáveis dicas para a realização da técnica de imunohistoquímica. E à Professora Dra. **Marisa** pelo fornecimento do anticorpo que permitiu a aplicação desta técnica.

À Banca Examinadora Profa. Dra. Cássia **Thaís** Zaia, Profa. Dra. **Marisa** Narciso Fernandes, Profa. Dra. **Marta** Marques de Souza e Profa. Dra. **Renata** Moreira Guimarães pelo aceite do convite, e pelas valiosas contribuições para o enriquecimento deste trabalho.

Ao **Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** pela oportunidade de aprimoramento acadêmico.

Às **professoras** do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas que contribuíram com meu crescimento intelectual.

À **Daniela** Grosso Borin, ex-secretária do PMPGCF na UEL, que, por muito tempo, me auxiliou, com muita competência, nas responsabilidades burocráticas desta jornada.

À **Estação de Piscicultura** da UEL pelo fornecimento dos animais.

Aos órgãos financiadores **CAPES**, **CNPq** e **INCT-TA/CNPq** pela concessão de bolsa e apoio financeiro que viabilizaram a execução deste projeto.

RIBEIRO, Andréa Martini. **ACÚMULO TECIDUAL, RESPOSTA DE ESTRESSE E PERFIL OSMORREGULATÓRIO DE *Prochilodus lineatus* NAS PRIMEIRAS 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO**. 2014. 113f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

RESUMO

O chumbo (Pb) é um metal não-essencial e tóxico para os animais, e devido ao seu uso difundido em produtos industrializados, concentrações deste metal acima das concentrações permitidas pela legislação brasileira são encontradas em cursos de água. Este trabalho teve como objetivo determinar o perfil de bioacumulação de Pb e suas consequências para o peixe dulcícola *Prochilodus lineatus*. Para isso, juvenis desta espécie foram expostos a $3,0 \pm 0,3$ mg Pb dissolvido.L⁻¹ ou apenas à água por até 24 horas. O perfil de retenção de chumbo foi determinada nas brânquias, no rim posterior, no fígado, no músculo e nas células sanguíneas. O conteúdo de proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT) foi mensurado nos tecidos branquial, renal e hepático. A atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada no cérebro e no músculo. O sangue total foi utilizado para a dosagem de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos, e a partir do plasma foram medidas as concentrações de glicose, cortisol, lactato, íons (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ e Mg²⁺) e a osmolalidade. No rim e nas brânquias também foram determinadas a atividade das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), H⁺-ATPase e anidrase carbônica (AC). E no tecido branquial determinou-se o índice de alterações histológicas, a densidade de células ricas em mitocôndrias e alterações morfológicas ultraestruturais. Foi registrado acúmulo de Pb nos tecidos branquial e renal, desde as primeiras horas de exposição, enquanto nos tecidos, hepático, sanguíneo e muscular, o acúmulo iniciou-se a partir de 12 h de exposição. Desta forma, o perfil de acúmulo de Pb após as primeiras 24 h de exposição seguiu a seguinte ordem decrescente: brânquias = rim > sangue = fígado > músculo. A presença de Pb no sangue não foi capaz de promover alteração dos parâmetros hematológicos. O Pb inibiu a secreção de cortisol em 3 e 6 h, mas promoveu um aumento da glicose e do lactato plasmáticos a partir de 6 h. Estes resultados coincidem com a inibição da AChE nos tecidos muscular e cerebral nos mesmos tempos de exposição. As PSMT aumentaram nos tecidos branquial e hepático, após 3 e 12 h de exposição, respectivamente, mas não houve alteração do conteúdo de PSMT no tecido renal. Houve redução da atividade da NKA e AC entre 6 e 24 h em ambos os tecidos. E, enquanto a H⁺-ATPase aumentou no rim nos mesmos períodos, não houve alteração nas brânquias. As alterações nas atividades das enzimas osmorregulatórias provocaram redução da osmolalidade, do Na⁺ e do Ca²⁺, e aumento do Mg²⁺ e do K⁺, nos tempos finais de amostragem, sem interferência sobre a concentração de Cl⁻. Além disso, o Pb promoveu alterações histológicas leves no tecido branquial, e na distribuição de células ricas em mitocôndrias (CRM) após 1 h de exposição, e o padrão de microcristas das células pavimentosa (CPV) alterou-se após 12 h. Os resultados obtidos a partir da exposição de *P. lineatus* ao Pb por 24 h sugerem que os efeitos neurotóxicos provocados pelo Pb estejam desencadeando alterações sobre os parâmetros metabólicos do animal, ao mesmo tempo em que há uma sugestão de disfunção endócrina. Ademais, a elevada concentração de Pb encontrada nas brânquias e no rim foi capaz de inibir as enzimas envolvidas com a manutenção das concentrações osmoiônicas e com a regulação

ácido-base, resultando em hipocalcemia e hiponatremia. Em uma tentativa de compensar essas perdas iônicas houve um aumento do número de CRM nas lamelas e da superfície absorptiva das CPV. Portanto, concentrações de Pb encontradas em corpos de água doce são capazes de promover alterações em *P. lineatus* nas primeiras 24 h de exposição.

Palavras-chave: Acetilcolinesterase. ATPases. Brânquias. Metalotioneínas. Morfologia branquial. Rim.

RIBEIRO, Andréa Martini. **Tissue accumulation, stress response and osmoregulatory profile of *Prochilodus lineatus* in the first 24 hours of lead exposure.** 2014. 113p. Thesis (Ph.D. in Physiological Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

ABSTRACT

Lead (Pb) is a non-essential and toxic metal to animals and due to its widespread use in industrial products, this metal can be found in the water bodies in concentrations above the limit set by the Brazilian guidelines. Thus, the aim of this study was to determine the dynamic of Pb accumulation and its effects on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. For that, juveniles were exposed to 3.0 ± 0.3 mg dissolved Pb.L⁻¹ or to clean water for 24 h. Pb accumulation was determined in gills, posterior kidney, liver, muscle and blood cells. The content of metallothionein-like proteins (MT-LP) was measured on branchial, hepatic and renal tissues. Acetylcholinesterase activity (AChE) was measured on brain and muscle. Samples of total blood were used to analyze hematocrit, hemoglobin and number of red blood cells, while the plasma was used to determine glucose, lactate, cortisol, osmolality and ions (Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ e Mg²⁺) concentrations. Activities of Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), H⁺-ATPase e carbonic anhydrase (CA) were determined in renal and branchial tissues. The gills were used to analyze the degree of tissue change, number and location of mitochondrial rich cells (MRC) and ultrastructural and morphological alterations. Pb accumulation occurred since the first hours of exposure in branchial and renal tissues, while high Pb concentrations in liver, muscle and blood cells appeared only after 12 h of exposure. Thus, the dynamic of Pb accumulation along the first 24 h of exposure occurred in the following order: gills = posterior kidney > blood cells > liver > muscle. Although Pb accumulation has been detected in blood, hematological parameters did not show any significant alteration. Pb caused cortisol disruption at 3 and 6 h, while glucose and lactate concentrations increased after 6 h. Simultaneously, brain and muscle AChE were inhibited. MT-LP content increased in gill and liver after 3 and 12 h, respectively, but no significant change was detected in the kidney. The activity of NKA and CA in gill and kidney decreased between 6 and 24 h, whereas H⁺-ATPase increased only in the kidney. These alterations on osmoregulatory enzymes promoted a reduction on plasma osmolality and Na⁺ and Ca²⁺ concentrations, and increased Mg²⁺ and K⁺, with no influence on Cl⁻ concentrations. In addition, Pb promoted some light histopathological changes on the gills and alterations on the distribution of MRC after 1 h, and the pattern of microridges on pavement cells (PVC) was modified after 12 h. These results indicate that 24 h exposure to Pb promoted neurotoxic effects which led to metabolic changes and signs of endocrine disruption. On the other hand, the elevated Pb concentrations found in the gills and kidney inhibited the activity of enzymes related with osmoionic and acid-base regulations causing hypocalcemia and hyponatremia. In order to compensate these losses, MRC migrated to the lamellae and the absorptive area of PVC was increased. Accordingly, waterborne Pb at concentrations that can be found in freshwater systems is able to promote many dysfunctional changes on *P. lineatus* within the first 24 h of exposure.

Keywords: Acetylcholinesterase. ATPases. Gills. Metallothionein. Gill morphology. Kidney.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	anidrase carbônica
ACh	acetilcolina
AChE	acetilcolinesterase
ALA-D	ácido δ -aminolevulínico desidratase
Ca ²⁺	cálcio
Cl ⁻	cloreto
CPV	célula pavimentosa
CRM	célula rica em mitocôndrias
CTR	grupo experimental controle
EDS	espectrometria de energia dispersiva
H ⁺	íon hidrogênio
Hb	hemoglobina
HCO ₃ ⁻	íon bicarbonato
Hcto	hematócrito
IAH	índice de alteração histológica
K ⁺	potássio
MEV	microscopia eletrônica de varredura
Mg ²⁺	magnésio
MT	metalotioneína
Na ⁺	sódio
NKA	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
Pb	chumbo
PSMT	proteínas semelhantes à metalotioneínas
RBC	número de eritrócitos por mm ³ de sangue

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	iv
Capítulo I <i>Introdução</i>	1
1. O chumbo	2
2. Teste toxicológicos <i>in vivo</i>	4
3. <i>Prochilodus lineatus</i>	5
4. Bioacumulação e proteínas semelhantes à metalotioneínas	6
5. Parâmetros hematológicos	8
6. Parâmetros metabólicos	9
7. Acetilcolinesterase	11
8. Osmorregulação	13
9. Brânquias: histologia e ultraestrutura	18
10. Justificativa	21
11. Referências bibliográficas	21
Capítulo II <i>Hipóteses e objetivos</i>	33
1. Hipótese	33
2. Objetivo geral	33
3. Objetivos específicos.....	33
Capítulo III <i>Desenho Experimental</i>	34
1. Animais	34
2. Experimentos	34
3. Amostragem	35
4. Análises químicas e físicas da água	35
5. Referências bibliográficas	37
Capítulo IV <i>Bioacumulação de chumbo e alterações metabólicas em <u>Prochilodus lineatus</u> durante as primeiras 24 horas de exposição ao metal</i>	38
1. Material e métodos.....	38

a.	Concentração tecidual de chumbo	38
b.	Análises hematológicas	38
c.	Análises metabólicas	39
d.	Conteúdo de proteínas semelhantes à metalotioneínas.....	39
e.	Atividade da acetilcolinesterase	39
f.	Análises estatísticas.....	40
2.	Resultados	40
3.	Discussão	47
4.	Referências bibliográficas	56

Capítulo V. *Efeitos agudos do chumbo sobre a osmorregulação de Prochilodus*

	<i><u>lineatus</u>: atividade enzimática e íons plasmáticos</i>	<i>63</i>
1.	Material e métodos	63
a.	Análises osmoiónicas.....	63
b.	Atividades enzimáticas	63
c.	Análises estatísticas.....	65
2.	Resultados	65
3.	Discussão	68
4.	Referências bibliográficas	79

Capítulo VI *Parâmetros morfofuncionais e acúmulo de chumbo nas brânquias de*

	<i><u>Prochilodus lineatus</u> ao longo de 24 horas de exposição</i>	<i>87</i>
1.	Material e métodos	87
a.	Análises histopatológicas	87
b.	Densidade de células ricas em mitocôndrias (CRM)	88
c.	Microscopia eletrônica de varredura e microanálise	88
d.	Análises estatísticas.....	89
2.	Resultados	90
3.	Discussão	99
4.	Referências bibliográficas	106

Capítulo VII *Considerações finais*

	<i>.....</i>	<i>112</i>
--	--------------	------------

APRESENTAÇÃO

A formatação adotada nesta tese visa facilitar a publicação dos resultados obtidos ao longo do curso de doutorado. O trabalho encontra-se dividido em sete capítulos: I) Introdução; II) Hipóteses e objetivos; III) Desenho experimental; IV) Bioacumulação de chumbo e alterações metabólicas em *Prochilodus lineatus* durante as primeiras 24 horas de exposição ao metal; V) Efeitos agudos do chumbo sobre a osmorregulação de *Prochilodus lineatus*: atividade enzimática e íons plasmáticos; VI) Parâmetros morfofuncionais e acúmulo de chumbo nas brânquias de *Prochilodus lineatus* ao longo de 24 horas de exposição; VII) Considerações finais. Por causa do desmembramento da parte experimental do trabalho em três capítulos (IV, V e VI) alguns trechos dos textos inevitavelmente tornaram-se recorrentes para que os resultados pudessem ser discutidos adequadamente.

O primeiro capítulo contém uma sucinta revisão bibliográfica sobre os principais elementos constituintes deste trabalho com a finalidade de fornecer o embasamento teórico fundamental para justificar sua coerência e relevância. O segundo capítulo reúne as hipóteses e os objetivos correspondentes aos conteúdos apresentados nos capítulos de IV a VI. O terceiro capítulo traz a descrição do procedimento experimental comum aos três capítulos seguintes. Os capítulos IV, V e VI contêm uma descrição metodológica, apresentam seus resultados e os discutem para, em conjunto, testar as hipóteses e alcançar os objetivos previstos. O capítulo VII integra sinteticamente os resultados separados pela configuração da tese.

1 **Capítulo I: Introdução**

2

3 A partir da segunda metade do século XIX a população mundial iniciou um processo de
4 crescimento exponencial, favorecido por avanços no campo da medicina e da produção agrícola.
5 Simultaneamente, a área industrial despertou para uma revolução que mudaria a história da
6 humanidade em caráter tecnológico, passando de uma manufatura artesanal para uma produção por
7 meio de maquinários. Desta forma, houve um grande crescimento da produção de bens de consumo e
8 um êxodo da população rural para a área urbana, com a maior oferta de emprego nas cidades. Com
9 estas alterações no modo de vida fez-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias em diversos
10 setores, que culminou com uma maior demanda por matéria prima. Novos produtos químicos
11 começaram a ser fabricados e explorados, ao mesmo tempo em que elementos já conhecidos passaram
12 a ser empregados em setores inéditos (Renberg et al., 2000).

13 Desde o início da revolução industrial a crescente exploração por matérias primas mais
14 eficientes alavancou o descarte de rejeitos químicos e efluentes industriais. Tais dejetos têm,
15 frequentemente, os cursos d'água como seus receptores finais. Dependendo da natureza dos produtos
16 lançados, estes corpos d'água têm uma capacidade natural de autodepuração. Entretanto, quando a
17 quantidade de despejo torna-se maior do que a capacidade de purificação, instala-se um quadro de
18 poluição ambiental que, raramente, desaparece de maneira natural. A exemplo dos compostos
19 metálicos que podem sofrer alterações de carga, ou se complexar com elementos presentes na água ou
20 no sedimento, mas são incapazes de sofrer processo de degradação (Peakall e Burger, 2003).

21 Grande parte dos teleósteos, assim como diversos outros grupos de organismos, são animais
22 que estão restritos ao ambiente aquático. Deste modo, alterações causadas neste ambiente tendem a
23 afetar, em diferentes níveis, as diversas espécies ali viventes (Vinodhini e Narayanan, 2008). No cenário
24 atual, existe uma infinita gama de produtos oriundos da ação antrópica que são potencialmente tóxicos
25 para os organismos aquáticos. Estes vão desde produtos da percolação de aterros sanitários (Lopes et
26 al., 2007) e despejos de esgoto sem tratamento, a agroquímicos usados em lavouras, petróleo e seus
27 derivados, e rejeitos industriais (Heath, 1995; WHO, 1995). Existem também compostos com potencial
28 poluidor que são incorporados aos sistemas aquáticos de maneira natural. Mas no sentido original da
29 palavra, poluição se refere a produtos da ação antrópica que causam distúrbios quando em contato com
30 o ambiente natural (Mellanby, 1982), e trata-se por *xenobiótico* qualquer substância química estranha,
31 presente em um sistema biológico (Mídio, 1992). Em geral, a poluição gerada pelo homem é formada
32 por diferentes compostos que juntos tendem a ter seu potencial tóxico aumentado. Mas, é essencial

1 que se conheça com detalhes a ação de cada um deles isoladamente sobre a biota, para que decisões de
2 combate à poluição possam ser tomadas (Martinez e Cólus, 2002; Cicik et al., 2004).

3

4 **I. 1 O chumbo**

5 Dentre todos os elementos estáveis, o chumbo possui o maior número atômico (82), além disso,
6 graças a características como resistência à corrosão e baixa condução elétrica, o chumbo encontra
7 grande aplicabilidade na indústria atual (ICZ, 2014). Porém, ele apresenta algumas outras propriedades
8 singulares que o tornaram um dos metais mais utilizados ao longo da história da humanidade. Acredita-
9 se que seu uso date entre 9000 e 7000 anos atrás, graças a sua alta maleabilidade, ductilidade e baixo
10 ponto de fusão. Sua aplicação passou por ferramentas, armamentos, equipamentos de proteção,
11 ornamentos, utensílios de uso domésticos, encanamentos, componentes de tintas e cosméticos, em
12 diversas períodos, por diferentes civilizações. O Império romano foi a primeira sociedade a usar este
13 metal em larga escala, e acredita-se que o chumbo seja a real causa da demência desenvolvida por
14 imperadores e membros da monarquia, uma vez que utensílios como pratos, talheres e taças eram
15 produzidos a partir deste metal. Além disso, por apresentar um sabor levemente adocicado, o chumbo
16 também era empregado como adoçante de bebidas, rendendo aos seus usuários, cólicas severas,
17 anemia e gota.

18 Já no século XX, o chumbo foi empregado em pesticidas e tintas, e a partir da década de 1950,
19 até próximo dos anos 2000, o chumbo também foi amplamente utilizado como aditivo químico na
20 gasolina. Estes usos lançaram na atmosfera grandes quantidades de chumbo, permitindo que este metal
21 alcançasse até mesmo regiões desabitadas pelo homem (Köck e Hofer, 1998). Porém, sua aplicação
22 junto ao combustível vem sendo mundialmente abolida nas últimas décadas (desde 1978 no Brasil). Esta
23 foi, por um longo período, a maior fonte de contaminação ambiental por chumbo (ATSDR, 2007), e
24 talvez, o maior erro associado à saúde pública no período contemporâneo. Mas, desde que deliberações
25 de reduzir o metal na gasolina foram tomadas, houve notável decréscimo da concentração de chumbo
26 atmosférico em caráter global (ATSDR, 2007). Outros produtos que levavam chumbo em sua
27 formulação, como pesticidas, encanamentos e pigmentos de tintas, foram também abolidos (ATSDR,
28 2007). Decisões como estas foram baseadas no potencial tóxico que o chumbo apresenta. Na época
29 presente o chumbo é empregado nas indústrias de munição, química e naval, na construção civil, em
30 baterias automotivas, como isolante contra radiação, para a fabricação de vidro e cerâmica e como
31 parte de ligas metálicas para a produção de soldas, fusíveis, revestimentos de cabos elétricos, materiais
32 antifricção, metais de tipografia, entre outros (ATSDR, 2007; Capitani, 2009; ICZ, 2014).

1 O Brasil não é produtor de chumbo, porém, dados recentes, mostram que nos primeiros 5
2 meses de 2014, quase 30 mil toneladas de chumbo foram importadas para uso industrial. Mas nos 4
3 anos anteriores a média anual de importação chegou a 82 mil toneladas de chumbo (ICZ, 2014). A
4 produção nacional de chumbo deriva da extração mineral de zinco, e não é suficiente para atender a
5 demanda interna, mesmo porque não existem metalúrgicas para este tipo de metal no Brasil, fazendo-
6 se necessário exportar o pouco que se produz (MME, 2009; DNPM, 2013). Os maiores produtores
7 mundiais de chumbo são a China, Austrália e Estados Unidos (UNEP, 2010). Em média, 62% dos
8 materiais que utilizam chumbo e 97% das baterias (ATSDR, 2007) no mundo são reciclados, grande parte
9 do consumo brasileiro é atendido pela recuperação de sucatas (147 kt/ano), e a importação
10 corresponde a menos de 40% de todo o chumbo consumido anualmente pelo país. O Plano Nacional de
11 Mineração prevê que até 2030 o consumo de chumbo seja quase o dobro do consumo atual, mas, que,
12 grande parte deste aumento seja decorrente da produção de chumbo pelo próprio país (MME, 2009).

13 O chumbo pode ocorrer de forma natural no ambiente, através de erupções vulcânicas ou
14 intemperismo, mas estas atividades são responsáveis por quantidades diminutas do metal, ficando, a
15 maior parte, a cargo de atividades humanas. Os níveis ambientais de chumbo se elevaram mais de 1.000
16 vezes nos três últimos séculos em decorrência da atuação humana (ATSDR, 2007). O chumbo pode ficar
17 aderido a partículas de solo ou poeira por muitos anos, e através delas, pequenas quantidades de
18 chumbo podem alcançar os cursos d'água trazidos pela chuva (ATSDR, 2007). O movimento do chumbo
19 aderido a partículas para a água depende de diversas características químicas e físicas da água, mas em
20 geral, os parâmetros que mais influenciam nesta disponibilidade são o pH e a dureza (Eisler, 1988;
21 Paquim et al., 2000). Mas o despejo direto na água continua sendo a principal via de entrada deste
22 metal no ambiente (ATSDR, 2007). Existem diversas formas de o chumbo fluir para o ambiente por meio
23 da ação antrópica, da mineração à destinação inadequada de produtos derivados de chumbo, passando
24 por descarte de rejeitos na manufatura ou reciclagem de outros produtos industrializados (ATSDR, 2007;
25 UNEP, 2010). Contudo, sabendo-se que atualmente 78% do consumo global de chumbo destinam-se à
26 fabricação de baterias automotivas (UNEP, 2010), pode-se responsabilizar esta atividade como a
27 principal fonte de poluição atual por chumbo.

28 No município de Londrina – PR, localizado na região sul do Brasil, a atividade de uma indústria
29 do ramo de baterias automotivas foi responsável pelo descarte de efluentes industriais contendo altas
30 concentrações de chumbo em um lago na região centro-sul da cidade. Em decorrência disso, foram
31 encontradas concentrações de até $4,5 \text{ mg Pb.L}^{-1}$ na água (Yabe e Oliveira, 1998), e de $1170 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$ no
32 sedimento (Almeida et al., 2005) neste mesmo corpo d'água. Estes valores superam, em muito, os

1 limites estabelecidos pela legislação brasileira (CONAMA, 2005), de 0,01 mg.L⁻¹ de chumbo total para
2 águas destinadas ao consumo humano.

3 Por se tratar de um metal não essencial para o metabolismo dos organismos, não existem vias
4 de eliminação eficientes para o chumbo, e, por este motivo, é muito comum a ocorrência de
5 biocumulação ao longo da cadeia trófica (ATDSR, 2007). Existem diversos estudos que atestam a
6 toxicidade do chumbo para a saúde humana. Seus danos abrangem comprometimento na síntese de
7 hemoglobina, através da interferência sobre a atividade de enzimas que atuam nesta via, danos
8 neurológicos, que podem retardar o desenvolvimento cognitivo de crianças ou até causar demência em
9 pessoas expostas cronicamente a concentrações elevadas de chumbo.

10

11 **I. 2 Testes toxicológicos *in vivo***

12 Concentrações de chumbo relativamente elevadas podem ser encontradas no ambiente natural
13 em decorrência da ação antrópica, e esta ocorrência tem-se mostrado um problema especial para o
14 ambiente aquático (Yabe e Oliveira, 1998; Paoliello e Chasin, 2001; Almeida et al, 2005). A presença
15 deste metal nestes ambientes pode trazer prejuízos em diversos níveis organizacionais aos organismos
16 ali viventes, desde a microbiota aos vertebrados mais complexos (ATSDR, 2007). Grande parte do
17 chumbo presente no ambiente aquático liga-se fortemente ao sedimento, e apenas uma pequena fração
18 encontra-se biodisponível (WHO, 1995; Almeida et al., 2005). Assim, espécies que estão mais
19 intimamente relacionadas ao sedimento apresentam um maior risco de contaminação por este metal
20 (Roach et al., 2008).

21 Além do ambiente, outro fator importante que vai determinar a toxicidade da espécie metálica
22 está na capacidade da biota em absorvê-la. Diversas pesquisas já demonstraram que diferentes espécies
23 de teleósteos dulcícolas apresentam diferentes sensibilidades para a exposição a uma mesma
24 concentração de chumbo, sob as mesmas condições (Roach et al., 2008; Terra et al., 2008). É evidente
25 que peixes de regiões diferentes, que são fisiologicamente adaptados a condições ambientais distintas,
26 irão responder de forma singular à presença de contaminantes (Atli e Canli, 2008). Porém, o mesmo
27 pode acontecer para espécies simpátricas que podem apresentar adaptações fisiológicas ou fatores
28 comportamentais que conferem maior resistência ou um menor risco de exposição do organismo,
29 diminuindo a tomada do xenobiótico ou facilitando sua eliminação (Hodson et al., 1980). Contudo, ainda
30 dentro de uma mesma espécie, alguns fatores podem exercer influência sobre a sensibilidade do animal
31 à presença do contaminante. A fase de vida da exposição inicial (Hodson et al., 1979), o sexo, o período
32 reprodutivo (Al-Yousuf et al., 2000), a idade e o tamanho (Canli e Atli, 2003) também podem ser

1 determinantes para a toxicidade da substância sobre a espécie de interesse. Baseado nisso,
2 pesquisadores vêm trabalhando no desenvolvimento de modelos matemáticos computacionais capazes
3 de prever o potencial tóxico de elementos metálicos para diferentes espécies, submetidas a condições
4 ambientais variadas, como o modelo do ligante biótico (Paquin et al., 2000, 2002; Niyogi e Wood, 2004).

5 Neste contexto insere-se a importância dos testes toxicológicos, que visam entender a ação
6 tóxica da substância nociva para um determinado organismo utilizando para isso os biomarcadores.
7 Estes são parâmetros biológicos do organismo teste que estão sujeitos a alterações estruturais e
8 funcionais em virtude da presença de agentes contaminantes (Heath, 1995). Existem biomarcadores que
9 podem responder a uma ampla gama de poluentes, outros a um poluente específico (Hodson et al.,
10 1980; Van der Oost et al., 2003). Estes últimos são ideais para utilização em análises ambientais com o
11 objetivo de identificar compostos tóxicos específicos presentes no ambiente (Almeida et al., 2005).

12

13 **I. 3 *Prochilodus lineatus***

14 Diversos estudos já foram realizados para o estabelecimento de modelos dos efeitos do chumbo
15 sobre parâmetros fisiológicos da ictiofauna da região temperada, contudo, há uma carência de
16 informações para os peixes residentes da região neotropical. Muitos padrões de efeitos e respostas não
17 podem ser extrapolados entre diferentes espécies em função das diferenças fisiológicas e das condições
18 ambientais a que cada uma está adaptada (Atli e Canli, 2008). Assim, pesquisas relacionadas à ictiofauna
19 da região neotropical vêm ganhando destaque no cenário atual. Algumas espécies residentes desta
20 região revelaram-se biomonitoradores em potencial, por terem alguns de seus parâmetros sensivelmente
21 alterados em presença de contaminantes aquáticos (Winkaler et al., 2001; Martinez e Cólus, 2002; Torre
22 et al., 2007; Sampaio et al., 2008).

23 Um exemplar de teleósteo dulcícola da região neotropical é o *Prochilodus lineatus*
24 (Valenciennes, 1837), um peixe de médio porte pertencente à família Prochilodontidae e popularmente
25 conhecido no Brasil por curimba ou curimbatá. Possui hábito alimentar detritívoro e comportamento
26 migratório, podendo cobrir longas distâncias (Shibatta et al., 2007), fatores que fazem dele um alvo
27 vulnerável à presença de contaminantes (Speranza et al., 2012). Apesar dos indivíduos da família
28 Prochilodontidae estar em distribuídos por quase toda a América do sul, a ocorrência desta espécie se
29 restringe às bacias Paraíba do Sul, Paraná e Paraguai. Estes animais são bastante abundantes em águas
30 brasileiras, sendo uma das espécies com maior ocorrência na bacia do Rio Tibagi, região sul do Brasil
31 (Shibatta et al., 2007). Seu cultivo para consumo vem sendo explorado por aquicultores de outros países
32 (Kalous et al., 2012) demonstrando seu potencial e visibilidade no mercado pesqueiro internacional.

1 Apesar de trabalhos divergirem quanto à sensibilidade de *P. lineatus* em relação a agentes
2 contaminantes, seu uso já é bastante difundido em testes ecotoxicológicos (Almeida et al., 2005;
3 Lombardi et al., 2010; Speranza et al., 2012). Isto ocorre por esta espécie demonstrar uma ampla gama
4 de biomarcadores capazes de responder à presença de uma grande diversidade de poluentes orgânicos
5 (Nascimento et al., 2012; Paulino et al., 2012; Navarro e Martinez, 2014) e inorgânicos (Camargo et al.,
6 2009; Nascimento et al., 2012), incluindo o chumbo (Martinez et al., 2004; Monteiro et al., 2011; Ribeiro
7 et al., 2014).

8

9 **I. 4 Bioacumulação e proteínas semelhantes à metalotioneínas**

10 No ambiente, assim como outros metais, o chumbo está sujeito à precipitação, adsorção e
11 absorção (Paquim et al., 2000, 2002). A absorção ocorre quando a biota está presente, e o fato de o
12 chumbo ser um elemento não essencial à sobrevivência dos organismos (Mager, 2012) e não
13 biodegradável (Liu et al., 2008), para o qual não existem vias eficientes de metabolização e eliminação,
14 acaba por permitir sua bioacumulação em diferentes órgãos e tecidos das espécies peixes a ele expostas
15 (Peakal e Burger, 2003). A entrada das substâncias tóxicas em teleósteos se dá via brânquias, pele ou
16 alimentação (Van der Oost et al., 2003), e o acúmulo ocorre de forma não homogênea nos diferentes
17 órgãos e tecidos (Alves e Wood, 2006).

18 O acúmulo do elemento tóxico no corpo tende a ser maior conforme aumenta o nível trófico, ou
19 seja, peixes carnívoros retêm uma maior concentração do xenobiótico do que aqueles que se alimentam
20 apenas de vegetais ou matéria orgânica (Peakall e Burger, 2003; Metcheva et al., 2010). Diversos
21 estudos demonstraram um acúmulo marcante de uma variedade de espécies metálicas em diferentes
22 tecidos de peixes (Huang et al., 2007; Terra et al., 2008; Vinodhini e Narayanan, 2008; Cardoso et al.,
23 2009), tartarugas (Jerez et al., 2010) e aves (Kreager et al., 2008; Rattner et al., 2008) que ocupam os
24 níveis mais altos da cadeia alimentar. Mas, independente da posição trófica em que o organismo se
25 encontra, o simples contato com o contaminante somado à ineficiência de sua eliminação, já contribui
26 para que haja o acúmulo em tecidos e órgãos (Roach et al., 2008).

27 Espécies distintas podem reter concentrações diferentes de metais em determinados órgãos
28 (Peakall e Burger, 2003; Terra et al., 2008). Da mesma forma, diferentes metais podem apresentar
29 padrões de acúmulo distintos nos órgãos de uma dada espécie, o que representa certa 'preferência' de
30 cada metal por determinado tecido de um mesmo animal (Cicik et al., 2004; Vinodhini e Narayanan,
31 2008). Assim, a concentração de metal acumulada em cada tecido varia principalmente em função da
32 espécie exposta (Roach et al., 2008; Terra et al., 2008), da espécie metálica (Vinodhini e Narayanan,

1 2008) e do tempo de exposição (Grosell et al., 2006). Exposições agudas tendem a representar um maior
2 acúmulo de metais em tecidos moles, ao passo que na exposição crônica, o animal passa a reter o metal
3 em tecidos duros como ossos e dentes (Alves e Wood, 2006; Grosell et al., 2006; ATSDR, 2007).

4 O chumbo segue padrões distintos de acúmulo tecidual em teleósteos de água doce, variando
5 de acordo com o tempo de exposição (Rogers et al., 2003; Rogers e Wood, 2004), a concentração
6 utilizada (Rogers e Wood, 2004; Huang et al., 2007) e a interação com outros metais (Cicik et al., 2004).
7 O acúmulo de chumbo ocorre prioritariamente nos tecidos que estão relacionados com a absorção,
8 como as brânquias e os órgãos do sistema digestório (Alves e Wood, 2006), mas pode ser distribuído
9 para os demais tecidos através da corrente sanguínea após poucas horas, atingindo órgãos com altas
10 taxas metabólicas, como o rim e o fígado, que atuam na tentativa de eliminação de substâncias tóxicas
11 (Cicik et al., 2004; Palaniappan et al., 2009). Esta eliminação pode ocorrer em parte pela urina, após
12 filtração glomerular, ou via fezes (Alves e Wood, 2006), após ser eliminada do fígado através da bile. Por
13 sua vez, o músculo é um dos tecidos que menos acumula metais, em vista do grande volume que ocupa
14 (Alves e Wood, 2006; Atli e Canli, 2008; Palaniappan et al., 2009). No entanto, o monitoramento dos
15 níveis de metais retidos neste tecido é de grande importância uma vez que é o tecido mais comumente
16 consumido na alimentação humana (Nussey et al., 2000).

17 A retenção do chumbo em um dado tecido está associada às suas características, que indicam a
18 capacidade do tecido de se associar ao metal, impedindo que ele circule livremente. As brânquias e o
19 rim posterior dos teleósteos dulcícolas apresentam uma série de canais e transportadores responsáveis
20 pelo transporte de íons, muitos deles, com uma grande afinidade por íons divalentes, como é o caso dos
21 transportadores associados ao cálcio. Por apresentar uma carga de igual valor, o chumbo pode interagir
22 e se complexar com estas proteínas de membrana, podendo ficar ali redito permanentemente.

23 Outra possibilidade para a retenção de chumbo em determinada célula está na síntese de
24 proteínas ricas em resíduos de cisteínas, chamadas metalotioneínas (MT), que são capazes de se
25 complexar com elementos metálicos para mantê-los fora de circulação, minimizando seus efeitos
26 deletérios, (Viarengo et al., 2001; Carvalho et al., 2004; Monteiro et al., 2011). Metais como o zinco, o
27 cobre e o cádmio, são fortes indutores da MT (Viarengo et al., 2001; Alvarado et al., 2006). O chumbo,
28 porém, é relatado como um fraco indutor (Campana et al., 2003; Atli e Canli, 2008), por ter menor
29 afinidade aos grupamentos sulfidril. Entretanto, alguns trabalhos relatam que a indução da MT pelo
30 chumbo é espécie-específica (de Boeck et al., 2003), tempo-dependente (Campana et al., 2003),
31 dependente da temperatura ambiental (Lacorn et al., 2001; Guinot et al., 2012) e do órgão analisado
32 (Campana et al., 2003; Cretì et al., 2010). O fígado é o maior produtor de MT (Cicik et al., 2004; Alvarado

1 et al., 2007), porém, altas concentrações também podem ser encontradas no músculo (Creti et al., 2010)
2 e nas brânquias (Alvarado et al., 2007), frente a agentes indutores.

3 No tecido sanguíneo, 99% do chumbo se associam aos eritrócitos (Alves et al., 2006; Alves e
4 Wood, 2006; Dai et al., 2012), e destes, 85% encontram-se no citosol (Ong e Lee, 1980) dos mesmos,
5 onde diversas proteínas são alvos para o chumbo. Entretanto, existe uma marcada preferência desse
6 metal (entre 35 e 80%) em se ligar à enzima ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD) (Bergdahl et al.,
7 1998). A quantidade de chumbo que pode ser retido na ALAD é limitada, não permitindo seu aumento
8 indefinido no sangue (Skerfving e Bergdahl, 2007). Bergdahl e colaboradores (1998) descrevem que em
9 cada molécula de ALAD nos eritrócitos de humanos podem se ligar até seis átomos de chumbo, contudo,
10 a ligação de duas moléculas já é suficiente para reduzir sua atividade pela metade. Dados de Alves e
11 Wood (2006) sugerem que, além de servir como via de transporte para o chumbo, o sangue também
12 pode servir de reserva do metal em excesso no sistema. Além disso, órgãos altamente vascularizados
13 podem apresentar maiores concentrações de chumbo em virtude do metal que fica retido no sangue
14 (Alves et al., 2006).

15

16 **I. 5 Parâmetros hematológicos**

17 A ALAD é uma enzima presente nas células sanguíneas, no fígado e no rim de teleósteos
18 (Campana et al., 2003) que está envolvida na produção de hemoglobina. Sua atividade é sensivelmente
19 reduzida na presença de chumbo no tecido sanguíneo (Alves Costa et al., 2007; Schmitt et al., 2007;
20 Kutlu e Sümer, 2008; Lombardi et al., 2010), mas não nos demais (Campana et al., 2003). Desta forma, a
21 presença de chumbo pode promover a inibição desta enzima, acarretando redução da produção da
22 hemoglobina, seguida pelo decaimento dos outros índices hematológicos, como o hematócrito e o
23 número de células vermelhas circulantes (Ates et al., 2008). Contudo, alterações desta natureza são
24 perceptíveis apenas após um período de exposição que vai de 7 dias a mais de 50, dependendo da
25 espécie e da concentração do metal (Campana et al., 2003). Desta forma, alterações nos parâmetros
26 hematológicos decorrentes de exposições curtas ao chumbo devem se apresentar associadas a outros
27 fatores, e não à síntese de hemoglobina.

28 Além de prejudicar a produção de células sanguíneas, o chumbo pode promover a redução dos
29 parâmetros hematológicos decorrente da morte prematura de eritrócitos (James et al., 1993). A
30 presença do chumbo na circulação sanguínea pode ser a causa de uma instabilidade na membrana dos
31 eritrócitos, fragilizando-os e deixando-os mais susceptíveis ao rompimento (Shah, 2006). Por outro lado,
32 a presença de chumbo é capaz de promover o aumento dos valores hematológicos em resposta a uma

1 redução prévia do número de células ou conteúdo de hemoglobina (Shah, 2006; Mager, 2012). Esta
2 resposta aumenta a eficiência no transporte de oxigênio, por meio da liberação de catecolaminas,
3 liberando novas células sanguíneas para a circulação, através de contração esplênica, aumentando assim
4 os diversos parâmetros hematológicos (Wendelaar-Bonga, 1997). A concentração e o tempo de
5 exposição são fatores determinantes para a observação desses efeitos e respostas (Shah, 2006), além
6 disso, todos estes efeitos podem ser revertidos para os níveis normais na ausência do agente estressor
7 (James et al., 1993).

8 Apesar de o chumbo nem sempre promover alterações nos valores de hematócrito,
9 hemoglobina ou número de células, alterações na morfologia dessas células são facilmente observadas
10 (Shah, 2006; Serezli et al., 2011), indicando que pode haver uma atuação do chumbo sobre os
11 elementos que conferem aos eritrócitos sua estrutura e morfologia (Oliveira-Ribeiro et al., 2006). Além
12 disso, a ausência de efeitos do chumbo sobre os parâmetros hematológicos pode ser indício de uma
13 compensação ou de ajustes fisiológicos ao agente estressor (Shah, 2006).

14

15 **I. 6 Parâmetros metabólicos**

16 A glicose é uma das principais fontes de energia para os teleósteos, e seu suprimento se dá
17 através da alimentação. Após sua absorção, a glicose é utilizada como fonte de energia nos tecidos ou
18 armazenada sob a forma de glicogênio no músculo estriado esquelético, e de triacilglicerol no tecido
19 adiposo. No jejum, a manutenção dos níveis glicêmicos é regulada por ação hormonal, e a liberação de
20 glicose na corrente sanguínea pode ocorrer através da glicogenólise (hidrólise de moléculas de
21 glicogênio) e gliconeogênese (síntese de glicose a partir de glicerol, lactato e α -cetoácidos) no fígado
22 (Takasusuki et al., 2004). O glicogênio muscular, por sua vez, é utilizado exclusivamente como fonte
23 energética para consumo local (Milligan, 1996; Hemre et al., 2002). A obtenção de energia a partir da
24 glicose pode ocorrer através de duas rotas metabólicas que apresentam em comum as suas etapas
25 iniciais (Hochachka, 1969), dando origem ao piruvato. A partir do piruvato, o que determina a via
26 metabólica que dá continuidade ao metabolismo da glicose é a presença ou não de oxigênio.

27 Situações de estresse impõem ao animal necessidade imediata de mobilização de grandes
28 quantidades de energia, no intuito de combater o agente estressor. Esta mobilização é desencadeada
29 pela liberação de adrenalina e cortisol na corrente sanguínea, que em teleósteos são produzidos pelas
30 células cromafins e inter-renais, respectivamente, localizadas no rim anterior (Wendelaar-Bonga, 1997).
31 A adrenalina é um hormônio de ação rápida, cuja liberação e atuação ocorrem quase imediatamente
32 após a ação do fator desencadeante, mas sua atuação é limitada e decai após alguns minutos (Barton,

1 2002). O cortisol, por outro lado, está permanentemente presente na circulação em baixas
2 concentrações, e sua função é modular os níveis glicêmicos em períodos de jejum (Mommsen et al.
3 1999; Ramesh et al., 2009), existindo uma flutuação diária de seus níveis dentro de limites fisiológicos
4 normais (Barton, 2002). Entretanto, a presença de um agente estressor promove a liberação de cortisol
5 em quantidade bem acima da homeostática (Nascimento et al., 2012), desencadeando uma resposta
6 secundária de elevação dos níveis glicêmicos (Thomas, 2008). A liberação deste hormônio pode ocorrer
7 desde os primeiros minutos de exposição ao agente estressor, até algumas horas depois, e sua presença
8 no corpo do animal não dura mais que poucas horas (Wendelaar-Bonga, 1997; Iwama et al., 2006).
9 Porém, existem relatos de que o chumbo desencadeie a secreção de cortisol em teleósteos dulcícolas
10 mais tardiamente, após alguns dias de exposição (Rogers et al., 2003; Ramesh et al., 2009).

11 A magnitude da resposta de estresse em virtude da presença de contaminantes está ligada a
12 inúmeros fatores, como o tipo do agente contaminante (Pankhurst, 2011), sua concentração (Martinez
13 et al., 2004) e a espécie animal (Barton, 2002). Desta forma, ao mesmo tempo em que se acredita que a
14 hiperglicemia encontrada em peixes expostos a contaminantes pode ser decorrente da liberação prévia
15 do cortisol (Iwama et al., 2006), apenas a dosagem deste hormônio pode não refletir o grau de estresse
16 experimentado por um peixe, sendo que representa uma medida instantânea de um processo dinâmico
17 que pode ter tido início em um período desconhecido que antecede o momento da amostragem
18 (Barton, 2002). De encontro a isso, Wendelaar-Bonga (1997) alerta que nem toda elevação de cortisol
19 está associada ao estresse, pois que diferentes espécies de teleósteos apresentam variações diárias e
20 sazonais muito marcadas, além de este hormônio também estar associado ao comportamento
21 reprodutivo e regulação osmótica.

22 Além de sua imprescindível atuação junto à regulação metabólica, em conjunto com a
23 prolactina, o cortisol atua nas brânquias dos teleósteos dulcícolas, colaborando para a regulação da
24 captação iônica (Mancera e McCormick, 2007; Ramesh et al., 2009). A prolactina é o principal hormônio
25 regulador da osmorregulação em teleósteos de água doce (Evans, 2008) e sua produção está
26 relacionada com a redução da osmolaridade ambiental e ao declínio dos níveis de sódio no plasma
27 (Kaneko e Hirano, 1993). Juntos estes dois hormônios são capazes de estimular, nas brânquias, a
28 diferenciação de células ricas em mitocôndrias a partir de células indiferenciadas (Mommsen et al.,
29 1999; Dang et al., 2000; Mancera e McCormick, 2007; Ramesh et al., 2009), no intuito de aperfeiçoar os
30 processos de captação de íons.

31 A presença de alguns contaminantes na água, no entanto, pode ocasionar efeito oposto ao
32 deflagrado pela resposta de estresse, inibindo a síntese ou a liberação de hormônios, na chamada

1 disrupção endócrina. Uma ampla gama de contaminantes são descritos como disruptores endócrinos
2 (Colborn et al., 1993; Ankley et al., 2009), e a ação de contaminantes como cobre (Nascimento et al.,
3 2012), herbicidas (Nascimento et al., 2012; Navarro e Martinez, 2014) e compostos à base de petróleo
4 (Simonato et al., 2008) sobre a secreção de cortisol já foi descrita.

5 A resposta fisiológica do peixe diante de uma situação que lhe causa estresse é complexa, pois
6 envolve sua capacidade de mobilizar reservas energéticas de forma a evitar ou vencer imediatamente a
7 situação de ameaça. Como a glicose é o combustível principal para atender a demanda energética, esta
8 via torna-se essencial para a recuperação da homeostase (Aluru e Vijayan, 2009). O músculo esquelético
9 está sujeito a constantes alterações abruptas de requisição de energia, que é sustentada por um rápido
10 processo de glicólise e formação de piruvato (Hochachka, 1969). Este piruvato pode ser convertido a
11 acetil-CoA dando prosseguimento à via glicolítica aeróbica, ou pode ser convertido a lactato, quando o
12 suprimento de oxigênio é insuficiente para a demanda tecidual. Este mesmo processo pode ocorrer em
13 todas as células do organismo em situação de hipóxia metabólica. Durante o esforço físico extenuante
14 há uma grande produção deste metabólito pela ação da lactato desidrogenase, que é rapidamente
15 eliminado para o sangue (Milligan, 1996). A metabolização do lactato plasmático pode ocorrer no fígado
16 (Milligan, 1996; Hemre et al., 2002; Takasusuki et al., 2004; Enes et al., 2009) ou no rim (Hemre et al.,
17 2002), onde dará origem novamente à glicose pela via neoglicogênica (Hemre et al., 2002; Enes et al.,
18 2009), graças ao aumento da atividade reversível da lactato-desidrogenase (Vijayan et al., 1997). A
19 glicose formada a partir do lactato é encaminhada de volta ao sangue para suprir a demanda energética
20 dos demais tecidos.

21 O processo de formação de lactato plasmático em teleósteos pode ser amplificado pela
22 presença de contaminantes na água. Aumentos significativos da concentração plasmática deste
23 composto para teleósteos já foram verificadas após exposição a herbicidas (Navarro e Martinez, 2014),
24 compostos nitrogenados (Jensen et al., 1987) e metais (Chowdhury et al., 2004; Takasusuki et al., 2004),
25 e, em princípio, são mais associadas às condições de baixa concentração sistêmica de oxigênio, do que à
26 hiper-atividade do tecido muscular esquelético.

27

28 **I. 7 Acetilcolinesterase**

29 A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor sintetizado nos terminais axonais a partir da colina e
30 da acetilcoenzima A (Fig. I. 1), tendo um papel crucial nas sinapses centrais e neuromusculares do
31 sistema colinérgico. No sistema nervoso central a ACh é capaz de transmitir sinais excitatórios ou
32 inibitórios, enquanto sua liberação junto à placa motora promove a estimulação das células musculares.

1 Após a liberação na fenda sináptica, a ACh é rapidamente degradada pela enzima acetilcolinesterase
 2 (AChE), visando coibir seus efeitos prolongados (Fig. I. 1)(Behra et al., 2002). Assim, há uma rápida
 3 remoção da ACh liberada na sinapse adequando a intensidade do sinal e o desempenho da função
 4 muscular (Van der Oost et al., 2003). Desta forma, a inibição desta enzima promove uma hiper-
 5 estimulação da célula pós-sináptica (Payne et al., 1996).

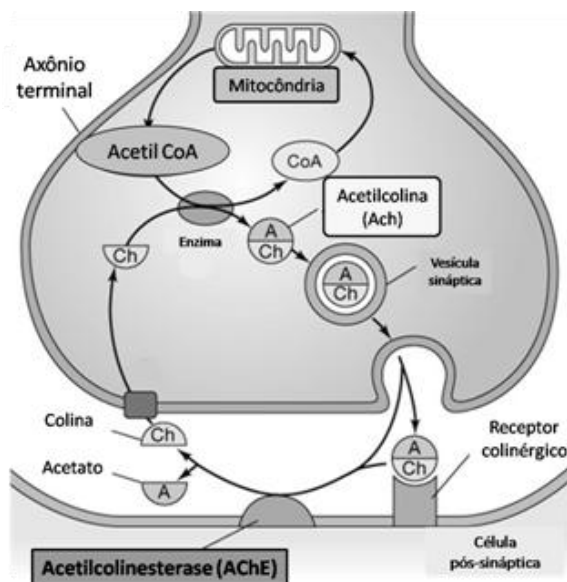


Figura I. 1. Figura esquemática da síntese e reciclagem da acetilcolina (ACh) e da ação da acetilcolinesterase (AChE) na sinapse. Figura adaptada de peaknootropics.com.

6 Acreditava-se que alterações na atividade da AChE estavam limitadas à presença de agrotóxicos,
 7 principalmente a base de organofosforados e carbamatos (Van der Oost et al., 2003; Scott e Sloman,
 8 2004), mas pesquisas recentes vêm mostrando que a atividade desta enzima também pode ser alterada
 9 por uma ampla gama de agente poluidores (Najimi et al., 1997; de la Torre et al., 2002; Richetti et al.,
 10 2011). Não há conclusões definitivas a respeito da ação de metais sobre a atividade da AChE (Zarros et
 11 al., 2013), enquanto alguns trabalhos relatam sua inibição (Labrot et al., 1996; Reddy et al., 2003; de
 12 Lima et al., 2013) ou ausência de efeitos (Nunes et al., 2014), outros descrevem uma flutuação entre
 13 inibição, estimulação e ausência de efeitos (Najimi et al., 1997; Richetti et al., 2011). Esta variação dos
 14 resultados deve-se principalmente às variações no tempo e concentração de exposição. Contudo, a
 15 maioria dos trabalhos envolvendo a ação do chumbo sobre a atividade colinesterásica *in vivo* ou *in vitro*,
 16 aponta para a inibição desta enzima. Alterações de ordem neurológicas desencadeadas por exposição a
 17 agentes tóxicos podem provocar alterações de comportamento, comprometendo a habilidade natatória,
 18 a capacidade de tomada de alimento ou fuga de predador, e o comportamento reprodutivo (Scott e
 19 Sloman, 2004), trazendo prejuízos sobre a sobrevivência da espécie.

1 I. 8 Osmorregulação

2 Os teleósteos dulcícolas apresentam a concentração osmótica de seus fluidos internos maior do
 3 que a do meio em que vivem. Devido à necessidade de troca de gases, regulação ácido-base e
 4 eliminação de metabólitos, é necessário que as brânquias desses animais apresentem uma ampla
 5 superfície de contato com a água, que favorece a perda iônica por difusão e o ganho de água por
 6 osmose, facilitando um desequilíbrio hídrico e iônico. A fim de contornar esta situação, as brânquias dos
 7 teleósteos dulcícolas são dotadas de tipos celulares especiais que atuam com a finalidade de absorver
 8 íons ativamente da água. Estas células apresentam uma grande população de organelas responsáveis
 9 por produzir a energia necessária para mover os íons contra seus gradientes de difusão, e por esta razão
 10 são chamadas células ricas em mitocôndrias (CRM) (Fig. 1. 2) (Evans et al., 2005). Além disso, uma grande
 11 quantidade de água precisa ser eliminada após entrar pelas brânquias ou com a ingestão de alimentos, e
 12 para isso, o rim posterior destes animais trabalha produzindo uma grande quantidade de urina diluída
 13 (Evans, 2008). Desta forma, há uma sincronia fisiológica entre as brânquias e o rim de teleósteos
 14 dulcícolas no intuito de absorver íons da água, impedir sua perda e eliminar a água que entra em
 15 excesso, gerando, assim, um ambiente interno favorável para a manutenção das funções homeostáticas.
 16 As células destes órgãos apresentam especializações que auxiliam na absorção ativa dos íons e
 17 prevenção de sua perda para o ambiente no processo de osmorregulação.

18 As CRM, presentes em grande quantidade no tecido branquial, são dotadas de uma ampla gama

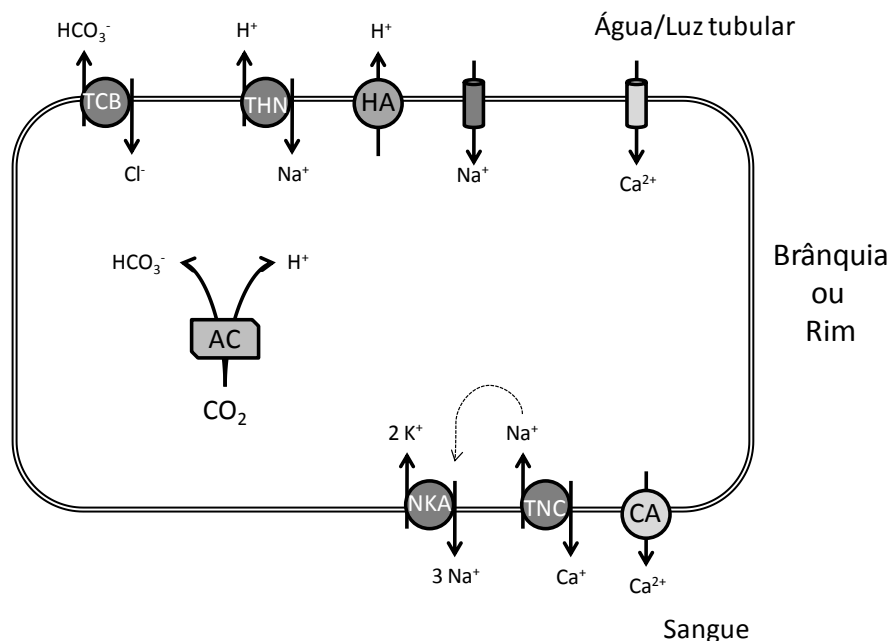


Figura I. 2. Modelo simplificado de CRM branquial e de célula tubular renal de teleósteos dulcícolas, mostrando os principais elementos envolvidos no transporte de Na^+ , H^+ , Cl^- , Ca^{2+} e HCO_3^- . TCB – trocador cloreto bicarbonato; THN – trocador Na^+/H^+ ; HA – H^+ -ATPase; AC – anidrase carbônica; NKA – Na^+/K^+ -ATPase; TNC – trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; CA – Ca^{2+} -ATPase. Fonte: a autora.

1 de diferentes transportadores inseridos no domínio apical e basolateral da membrana plasmática
2 (Hirose et al., 2003). A Na^+/K^+ -ATPase (NKA) é o mais abundante deles, está inserida na membrana
3 basolateral dessas células, e, como o próprio nome sugere, sua função é transportar sódio (Na^+) e
4 potássio (K^+) através da membrana plasmática (Fig. I. 2). A NKA é uma enzima formada por duas
5 subunidades, uma catalítica transmembrana multipasso chamada de subunidade alfa, e uma
6 glicoproteína associada, a subunidade beta (Hwang e Lee, 2007). Na subunidade alfa estão localizados
7 os sítios ligantes dos íons e do ATP, a fonte de energia para o transporte. A cada elemento que se acopla
8 à enzima há uma mudança em sua conformação, expondo o sítio de ligação do próximo elemento
9 ligante. Isso ocorre ora para o interior da célula, ora para o meio extracelular, retirando da célula três
10 íons sódio em troca de dois íons potássio do plasma, contra seus gradientes de concentração. Graças ao
11 número desigual de íons positivos transferidos através da membrana plasmática pela NKA, há a geração
12 de um potencial elétrico negativo no meio intracelular, favorecendo a entrada de cargas positivas para o
13 interior da célula (Heath, 1995; Hwang e Lee, 2007). Para que a molécula de ATP se ligue ao seu
14 respectivo sítio de ligação na porção intracelular da subunidade alfa da enzima, é necessária a presença
15 de um íon magnésio, que irá atuar como co-fator da enzima. E a ausência, substituição ou a
16 interferência na ligação deste íon implica em inatividade da enzima (Fischer e Giroux, 1987), provocando
17 alteração na concentração dos íons Na^+ e K^+ no plasma.

18 Uma segunda enzima que colabora para a obtenção de Na^+ do ambiente é a anidrase carbônica
19 (AC), que encontra-se aderida a membrana plasmática ou a organelas celulares, e também está presente
20 no citosol das células branquiais (Gilmour e Perry, 2009). Sua função é catalisar reversivelmente a
21 reação de hidratação do gás carbônico, que chega através da corrente sanguínea para se eliminado
22 pelas brânquias, formando ácido carbônico (Hirose et al., 2003). A estabilidade deste ácido é muito
23 baixa, ocorrendo uma rápida dissociação e a formação dos íons bicarbonato (HCO_3^-) e hidrogênio (H^+). A
24 importância desta enzima para a osmorregulação está no fato de os dois produtos por ela “formados”
25 atuarem como contra-íons para a captura de Na^+ e cloreto (Cl^-) do meio (Fig. I. 2) (Gilmour, 2012). Além
26 disso, a formação de H^+ possibilita a regulação do equilíbrio ácido-base (Gilmour, 2012), mas para isso, é
27 necessário que a AC esteja associada aos transportadores dos íons que serão formados, a fim de evitar
28 que o H^+ e o HCO_3^- se dissipem e interajam com os componentes celulares provocando desnaturação
29 protéica (Hirose et al., 2003). Desta forma, a interferência na atividade desta enzima pode causar
30 prejuízo das concentrações de Na^+ e Cl^- no plasma, e do balanço ácido base.

31 Para que o balanço ácido-base possa ser regulado é necessário que a célula seja capaz de
32 armazenar o hidrogênio em compartimentos celulares, ou movê-lo para fora na direção do ambiente ou

1 do plasma. Acredita-se que a eliminação do H^+ e do HCO_3^- ocorra separadamente em tipos celulares
2 distintos, por meio de diferentes transportadores (Gilmour, 2012). Um desses transportadores é a H^+ -
3 ATPase, uma proteína de membrana descrita primeiramente em endomembranas, e também conhecida
4 por bomba de próton tipo vacuolar (ou V-ATPase). Esta proteína é formada por um grande número de
5 subunidades agrupadas em dois complexos, um responsável pela hidrólise do ATP, e outro pela
6 translocação do próton (Hirose et al., 2003), e sua síntese ocorre no retículo endoplasmático, de onde é
7 transportada em vesículas até a membrana alvo (Nelson, 1988). A H^+ -ATPase atua acidificando
8 compartimentos celulares ou extraíndo H^+ de diferentes tipos de células, e nas brânquias, sua
9 localização não é restrita às CRM. O tipo celular branquial que apresenta uma grande concentração de
10 H^+ -ATPase está também envolvido com a absorção de Na^+ (Gilmour, 2012), já que a eliminação do H^+
11 para o meio, promove um gradiente elétrico favorável à entrada deste íon através de canais de sódio
12 associados ao carreador (Fig. 1. 2) (Hirose et al., 2003). Desta forma, além de comprometer a regulação
13 ácido-base, a perturbação da atividade da H^+ -ATPase, pode implicar em redução da concentração do Na^+
14 plasmático.

15 Outro mecanismo que favorece a entrada de Na^+ está associado à absorção do íon cálcio (Ca^{2+}),
16 através do trocador Na^+/Ca^{2+} presente na membrana basolateral das CRM (Hirose et al., 2003). Este
17 trocador desloca o Ca^{2+} intracelular para o plasma em associação com a Ca^{2+} -ATPase localizada na
18 mesma região da membrana plasmática (Hwang e Lee, 2007). A remoção do Ca^{2+} do interior celular
19 proporciona um gradiente eletroquímico adequado à entrada passiva por canais de Ca^{2+} localizados na
20 membrana apical das células (Fig. 1. 2) (Hirose et al., 2003; Hwang e Lee, 2007). Acredita-se que a Ca^{2+} -
21 ATPase apresente um papel secundário no transporte de Ca^{2+} através da membrana basolateral, ficando
22 a cargo do trocador Na^+/Ca^{2+} a geração da maior parte da força motriz para a absorção deste cátion
23 divalente (Hirose et al., 2003). Porém a resposta para hormônios hipercalcêmicos está diretamente
24 relacionada à densidade de bombas de cálcio na membrana basolateral (Flik et al., 1993), além disso,
25 diversos trabalhos apontam que a redução da atividade da Ca^{2+} -ATPase promove uma diminuição dos
26 níveis calcêmicos (Rogers e Wood, 2004; Atli e Canli, 2011a, b), mostrando que esta bomba desempenha
27 papel primordial no ajuste da regulação do Ca^{2+} plasmático. Em resumo, o transporte transepitelial de
28 íons Ca^{2+} através das CRM nas brânquias baseia-se na entrada passiva através de um canal apical,
29 seguido pela sua extrusão, através da membrana basolateral, por meio de um trocador Na^+/Ca^{2+} ou de
30 transporte ativo primário exercido por um transportador dependente de ATP (Ca^{2+} -ATPase).

31 Ao lado das brânquias, o rim posterior desempenha papel importante na hiperregulação iônica e
32 equilíbrio ácido-base em teleósteos de água doce (Perry et al., 2003; Gilmour e Perry, 2009). Mas ao

1 contrário delas, o rim não dispõe de amplo contato com o meio, mostrando-se menos susceptível a
2 variações ambientais (Heisler, 1993). Os mecanismos de captação iônica a partir da água descritos para
3 as células branquiais aplicam-se, em grande parte, para a reabsorção de íons que tomam lugar nas
4 células dos túbulos renais, no intuito de evitar a perda iônica através da urina, e estão representados na
5 Figura I. 1. A importância do sistema de reabsorção de íons do filtrado no tecido renal está na economia
6 energética que isso proporciona, uma vez que é muito mais dispendioso absorver íons ativamente
7 através das brânquias, já que o gradiente eletroquímico que a água impõe é muito maior (Hirose et al.,
8 2003). Além disso, o rim também desempenha papel auxiliar de regulação do pH através da reabsorção
9 de HCO_3^- (Perry e Gilmour, 2006).

10 As enzimas osmorregulatórias nas brânquias e no rim posterior atuam em sincronia no intuito
11 de manter constantes as concentrações de íons e o equilíbrio ácido-base, para proporcionar as
12 condições ideais para a realização de atividades metabólicas (Evans, 1987). Flutuações nas
13 concentrações de íons são rapidamente contornadas pela ação de hormônios osmorreguladores como o
14 cortisol, a prolactina e o hormônio do crescimento (Evans et al., 2005; Mancera e McCormick, 2007).
15 Estes hormônios agem em conjunto aumentando o número de células responsáveis pela hiperregulação
16 de íons ou a atividade dos transportadores envolvidos (Evans et al., 2005; Mancera e McCormick, 2007;
17 Evans, 2008).

18 Ainda existem muitas lacunas nos processos moleculares que envolvem o transporte ativo de
19 íons pelas brânquias, e muito especula-se em torno dos mecanismos envolvidos no transporte
20 transepitelial de alguns íons (Evans, 2008). O transporte de Na^+ e Ca^{2+} já foi discutido nos parágrafos
21 anteriores, e a partir daqui serão brevemente apresentados os mecanismos de captação dos íons Cl^- , K^+
22 e magnésio (Mg^{2+}).

23 A absorção do Cl^- se dá em associação com a extrusão de HCO_3^- , derivado da hidratação do CO_2 ,
24 através de trocadores de ânions localizados na membrana apical de células branquiais pavimentosas.
25 Estes trocadores também desempenham papel importante na regulação ácido-base e constituem a
26 principal força motriz para a absorção de Cl^- (Hirose et al., 2003). Desta forma, uma redução no
27 suprimento de HCO_3^- , em decorrência da redução da atividade da AC, pode culminar em redução das
28 concentrações plasmáticas de Cl^- (Rogers et al., 2005). Após entrar nas células epiteliais das brânquias, o
29 Cl^- sai em direção ao sangue movido por um gradiente elétrico, através de canais de cloreto na
30 membrana basolateral (Hirose et al., 2003; Perry et al., 2003).

31 A absorção do K^+ ocorre principalmente pela via alimentar, e sua concentração plasmática é
32 relativamente baixa, enquanto no interior celular a concentração de K^+ é consideravelmente maior

1 (Martinez e Souza, 2002). Nos epitélios absorptivos das brânquias e do rim, o K^+ é usado como
2 coadjuvante para a absorção de Na^+ graças à presença da NKA. O antiporte através da membrana
3 plasmática de mais cargas positivas para fora, do que para seu interior, cria um potencial elétrico que
4 favorece a entrada de cargas positivas. Canais de potássio na membrana basolateral das células permite
5 a extrusão de pequenas quantidades deste íon de volta ao plasma, para que seja possível a manutenção
6 do ciclo. Alterações nas concentrações de K^+ no plasma refletem o aumento do efluxo deste íon a partir
7 das células sanguíneas ou outro tipo celular (Laurén e McDonald, 1985; Saglan et al., 2013), ou desvios
8 da atividade normal da NKA (Jensen et al., 1987).

9 O Mg^{2+} plasmático em teleósteos dulcícolas é absorvido, quase totalmente, pela via alimentar
10 (Flik et al., 1993; Bijvelds et al., 1998) e sua concentração é bastante reduzida (Holmes e Donaldson,
11 1969), sua eliminação através da urina é evitada por um eficiente sistema de reabsorção tubular
12 (Bijvelds et al., 1998). Porém, além da via alimentar, o magnésio pode ser absorvido ativamente nas
13 brânquias através de processos ainda não totalmente compreendidos (Bijvelds et al., 1998; Marshall,
14 2002), e há suspeitas que sua regulação esteja associada à regulação de cálcio (Rogers et al., 2003).
15 Assim como o K^+ , as concentrações de Mg^{2+} no interior das células são superiores às encontradas no
16 plasma (Holmes e Donaldson, 1969), assim, alterações na concentração plasmática de Mg^{2+} podem
17 decorrer do extravazamento celular.

18 Além da manutenção das concentrações iônicas no plasma através da captação ativa de íons, as
19 células dos epitélios transportadores dos teleósteos dulcícolas também apresentam especializações
20 associadas à redução da permeabilidade. As células do epitélio branquial são dotadas de junções
21 oclusivas, especializações de membranas que as mantêm fortemente unidas para evitar a perda iônica
22 pela via paracelular (Laurent, 1984; Evans et al., 2005). As proteínas que compõem esta junção celular
23 dependem da presença de Ca^{2+} para poderem se ligar umas às outras (Brown e Davis, 2002), de modo
24 que, a depleção da concentração de Ca^{2+} circulante pode proporcionar o afrouxamento das junções,
25 permitindo o efluxo de íons.

26 Desajustes osmorregulatórios decorrentes de alterações na função dos transportadores de
27 membrana são frequentemente relatados para peixes dulcícolas expostos a água com metais (Ay et al.,
28 1999; Camargo et al., 2009; Atli e Canli 2011a, b), e diversos trabalhos indicam o potencial do chumbo
29 como desregulador iônico (Rogers et al., 2003, 2005; Rogers e Wood, 2004; Alves e Wood, 2006; Patel et
30 al., 2006; Ribeiro et al., 2014). Sabe-se que o chumbo é capaz de interagir com a NKA dificultando o
31 acoplamento do ATP em seu sítio catalítico, e promovendo redução da sua atividade (Ahern e Morris,
32 1999). Além disso, interferências na atividade da AC também já foram descritas, porém, com um baixo

1 limiar de sensibilidade (Rogers et al., 2005). O desempenho catalítico da AC depende da presença do
2 zinco como co-fator (Gilmour e Perry, 2009) e o chumbo é capaz de interagir com este metal (Ceyhun et
3 al., 2011), comprometendo a atividade da enzima. Ademais, este metal divalente é capaz de
4 comprometer o funcionamento da Ca^{2+} -ATPase graças à sua similaridade molecular com o Ca^{2+} ,
5 comportando-se como um antagonista, capaz de utilizar a mesma via de transporte para adentrar o
6 animal. Todos os eventos envolvidos no transporte de Ca^{2+} também são descritos como possíveis vias de
7 absorção do chumbo, podendo ocorrer o bloqueio do canal apical e a redução da atividade dos
8 trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ localizados na membrana basolateral (MacDonald et al., 2002; Rogers et al., 2003;
9 Atli e Canli, 2007). Mas além de interferir negativamente nos processos de tomada iônica, o chumbo
10 pode ainda alterar a concentração de íons plasmáticos em peixes de água doce pelo aumento do efluxo
11 de íons, provocado por distúrbios na permeabilidade iônica das membranas graças à depleção do Ca^{2+}
12 plasmático. Não há relatos de que o chumbo possa interferir diretamente no desempenho da H^+ -
13 ATPase, porém, o organismo é capaz de regular sua atividade para contornar desajustes advindos de
14 interferências em outros mecanismos (Perry et al., 2003), como a regulação ácido-base.

15

16 **I. 9 Brânquias: histologia e ultraestrutura**

17 Além do seu conhecido papel nas trocas gasosas, as brânquias desempenham importante
18 função na osmorregulação, equilíbrio ácido-base e excreção de compostos nitrogenados (Evans et al.,
19 2005). Em virtude disto, adequações morfológicas que proporcionem maior eficiência no desempenho
20 dessas funções são requeridas, conferindo às brânquias uma peculiar organização anatômica e
21 histológica (Hughes, 1984; Laurent, 1984).

22 Na maioria dos teleósteos as brânquias são formadas por um conjunto de oito arcos branquiais
23 situados bilateralmente, e alojadas em câmaras branquiais. A água entra pela boca e é direcionada para
24 as câmaras por um sistema de bombas acopladas, desta forma, as brânquias ficam imersas em água com
25 constante renovação. Os arcos branquiais são sustentados por uma porção cartilaginosa de onde
26 partem inúmeros filamentos organizados em duas fileiras semiparalelas. Um grande número de dobras
27 epiteliais eleva-se em quase todo o comprimento dos filamentos formando as lamelas. Todo esse
28 sistema é irrigado por um grande número de capilares e canais sanguíneos (Wilson e Laurent, 2002).

29 Nas lamelas o espaço destinado ao sangue é delimitado por células pilares, que formam uma
30 rede de vascularização complexa e que também mantêm unidas as paredes das lamelas (Fig. I. 3).
31 Externamente, compondo as paredes das lamelas, células epiteliais pavimentosas (CPV) formam um
32 delgado limite entre os espaços interno e externo. Esse tipo celular é caracterizado por seu formato

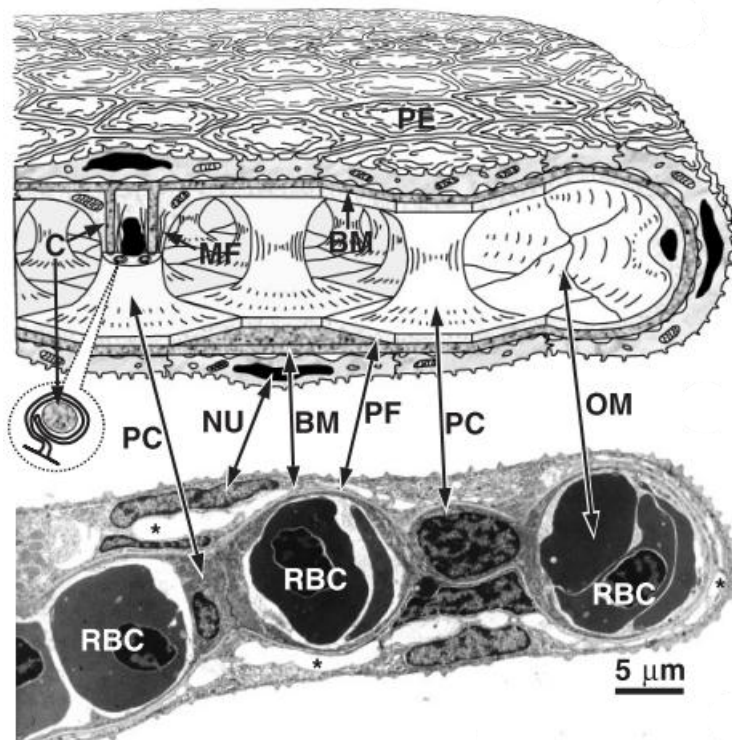


Figura 1. 3. Desenho esquemático e eletromicrografia da secção de uma lamela branquial próxima ao canal marginal (OM), onde é possível identificar células pilares (PC) e células epiteliais pavimentosas (PE) que formando os canais pelos quais circulam os eritrócitos (RBC). Extraído de Olson, 2002.

1 achatado, com um núcleo pequeno e alongado e com um número reduzido de organelas (Fig. I. 3). Tais
 2 células também estão presentes na camada mais externa do filamento e são responsáveis por recobrir
 3 as CRM, delimitando e regulando a área de superfície que faz contato com a água (Wilson e Laurent,
 4 2002). Na superfície externa das CPV verificam-se elevações da membrana plasmática que se
 5 assemelham às marcas de impressões digitais e recebem o nome de microcristas (Fig. I. 4). A função
 6 destas microcristas é ainda bastante debatida, mas segundo alguns autores elas são capazes de
 7 proporcionar uma maior adesão do muco (Carmona et al., 2004).

8 Na região do filamento desprovida de lamelas estão presentes as células mucosas, que são
 9 responsáveis pela produção e secreção de muco, e o padrão de número e distribuição dessas células
 10 pode variar de acordo com a necessidade (Wilson e Laurent, 2002). Nas camadas basais e intermediárias
 11 do filamento branquial estão presentes células epiteliais indiferenciadas que se caracterizam pelo
 12 grande tamanho do núcleo em relação ao citoplasma, e podem dar origem às CPV ou às CRM. Nos
 13 teleósteos essa diferenciação ocorre preferencialmente no filamento (Laurent, 1984), onde essas células
 14 correspondem a cerca de 90% número do total de células (Wilson e Laurent, 2002, Evans et al., 2005).

15 A CRM (Fig. I. 4) é o tipo celular mais estudado nas brânquias de teleósteos dulcícolas, já que
 16 nelas reside a função de captação da maior parte dos íons. As CRM apresentam diversas características
 17 que as diferenciam das demais células, e uma análise de microscopia eletrônica de transmissão permite
 18 distinguir morfológicamente a existência de diferentes tipos de CRM. Esta variação morfológica baseia-
 19 se na ocorrência de células em diferentes estágios de maturação, ou na distinção funcional entre os

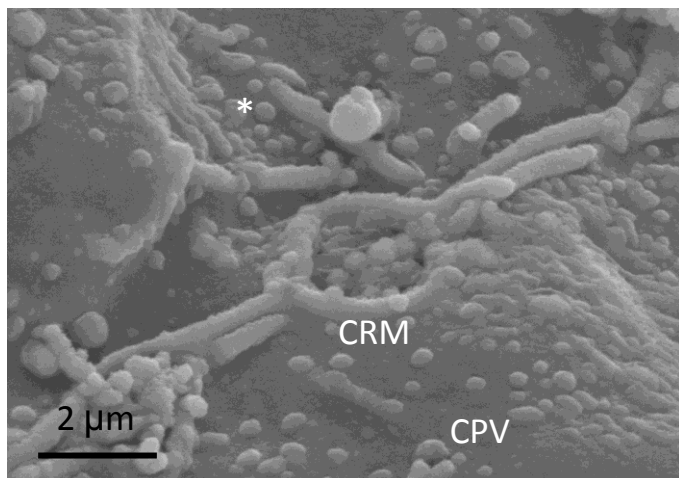


Figura 1. 4. Eletromicrografia de varredura do epitélio branquial de *P. lineatus* mostrando a abertura de uma célula rica em mitocôndrias (CRM) delimitada por células epiteliais pavimentosas (CPV), que apresentam elevações da membrana plasmática denominadas microvilosidades (*). Fonte: a autora.

1 tipos de CRM (Inokuchi et al., 2009). Além da presença de uma grande população de mitocôndrias, as
 2 CRM caracterizam-se por apresentar um amplo sistema de túbulos contínuos à membrana basolateral,
 3 vesículas sub-apicais e um grande núcleo ovóide (Perry, 1997). Estas células são tipicamente
 4 encontradas na região interlamelar dos filamentos, e sua presença na lamela limita-se a um número
 5 reduzido, ou a sua total ausência (Perry, 1997). Porém, a necessidade de aumentar a capacidade
 6 hiperregulatória nos teleósteos dulcícolas é capaz de promover o deslocamento de um grande número
 7 dessas células até as lamelas (Wilson e Laurent, 2002; Hwang e Lee, 2007). Alterações desta natureza,
 8 contudo, pode ser prejudicial para manter as trocas de gases a uma taxa eficiente (Perry, 1997).

9 Devido ao seu contato direto com a água, as brânquias representam portas de entrada para os
 10 contaminantes presentes (Vinodhini e Narayanan, 2008; Palaniappan et al., 2009) e se destacam como
 11 bons indicadores de qualidade de água (Palaniappan et al., 2009). Por isso, este tecido apresenta uma
 12 grande susceptibilidade aos xenobióticos e dispõe de mecanismos adaptativos que visam reduzir a
 13 entrada desses agentes tóxicos. O organismo pode apresentar alterações histológicas no tecido
 14 branquial que funcionam como uma barreira para minimizar a entrada desses contaminantes (Mallatt,
 15 1985). Por outro lado, assim como a proliferação e o deslocamento de CRM para as lamelas, outras
 16 alterações histopatológicas mostram-se como “más adaptações”, já que aumentam a distância de
 17 difusão entre o sangue e a água. Da mesma forma, o aumento da produção de muco frente à exposição
 18 a contaminantes também resulta em aumento da distância para as trocas (Shephard, 1994).

19 A exposição de teleósteos dulcícolas a águas contaminadas com metais (Dang et al., 2000;
 20 Camargo et al., 2009), incluindo o chumbo (Ribeiro et al., 2014), resulta tipicamente em aumento do
 21 número de CRM nas lamelas branquiais. Alterações histológicas no epitélio e nos vasos branquiais
 22 também já foram identificadas após exposição ao chumbo (Martinez et al., 2004). Contudo, a maior

1 parte dos estudos de alterações morfológicas nas brânquias acabam negligenciando as CPV, onde
2 podem estar grandes probabilidades de danos (Wilson e Laurent, 2002). As patologias referentes à CPV
3 são mais claramente identificadas através de técnicas histológicas de microscopia eletrônica de
4 varredura, quando alterações no padrão de microcristas podem ser identificados (Mallat, 1985;
5 Carmona et al., 2004; Paulino et al., 2012).

6

7 **I. 10 Justificativa**

8 O chumbo pode ser encontrado em corpos d'água em quantidades acima das concentrações
9 vigentes na legislação brasileira. Os efeitos osmoiônicos do chumbo e seu acúmulo nos tecidos da
10 espécie de peixe neotropical de água doce *Prochilodus lineatus* foram avaliados por Ribeiro et al. (2014),
11 que verificaram uma série de alterações a partir de 6 h de exposição ao metal. Neste contexto, insere-se
12 a importância de estudos que objetivam desvendar o modo de atuação desta espécie metálica sobre a
13 fisiologia de teleosteos dulcícolas da região neotropical nas primeiras horas de contato (1, 2 e 3 h).
14 Assim, a ênfase deste trabalho foi mapear os padrões de acúmulo do chumbo e a produção de MT nos
15 tecidos de *P. lineatus* ao longo das primeiras 24 horas de exposição, investigar seus efeitos neurotóxicos
16 e histopatológicos, e as interferências sobre os processos metabólicos e osmorregulatórios.

17

18 **I. 11 Referências bibliográficas**

- 19 Ahern MD, Morris S, 1998. Accumulation of lead and its effects on Na balance in the freshwater crayfish
20 *Cherax destructor*. J. Exp. Zool. 281, 270-279.
- 21 Al-Yousuf MH, El-Shahawi MS, Al-Ghais SM, 2000. Trace metals in liver, skin and muscle of *Lethrinus*
22 *lentjan* fish species in relation to body length and sex. Sci. Total. Environ. 256, 87-94.
- 23 Almeida JS, Meletti PC, Martinez CBR, 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on
24 physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp.
25 Biochem. Physiol. 140(C), 356-363.
- 26 Aluru N, Vijayan MM, 2009. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. Gen.
27 Comp. Endocrinol. 164, 142-150.
- 28 Alvarado NE, Quesada I, Hylland K, Marigómez I, Soto M, 2006. Quantitative changes in metallothionein
29 expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn
30 and after a depuration treatment. Aquat. Toxicol. 77, 64-77.

- 1 Alvarado NE, Cancio I, Hylland K, Marigómez I, Soto M, 2007. Immunolocalization of metallothioneins in
2 different tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd. *Histol. Histopathol.* 22, 719-728.
- 3 Alves Costa JRM, Mela M, Silva de Assis HC, Pelletier E, Randi MAF, Oliveira Ribeiro CA, 2007. Enzymatic
4 inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or
5 methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 82–88.
- 6 Alves LC, Wood CM, 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout
7 (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.* 78, 217-232.
- 8 Alves LC, Glover CN, Wood CM, 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout
9 (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 615-625.
- 10 Ankley GT, Bencic DC, Breen MS, Collette TW, Conolly RB, Denslow ND, Edwards SW, Ekman DR, Garcia-
11 Reyero N, Jensen KM, Lazoschak JM, Martinovic D, Miller DH, Perkins EJ, Orlando EF, Villeneuve DL,
12 Wang RL, Watanabe KH, 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing exposure
13 indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquat. Toxicol.* 92, 168-
14 178.
- 15 Ates B, Orun I, Talas ZS, Durmaz G, Yilmaz I, 2008. Effects of sodium selenite on some biochemical and
16 hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb²⁺
17 and Cu²⁺. *Fish. Physiol. Biochem.* 34, 53–59.
- 18 Atli G, Canli M, 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*.
19 *Comp. Biochem. Physiol.* 145C, 282-287.
- 20 Atli G, Canli M, 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwaterfish
21 *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 33-38.
- 22 Atli G, Canli M, 2011a. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and
23 muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol.* 20, 1861-1869.
- 24 Atli G, Canli M, 2011b. Metals (Ag⁺, Cd²⁺, Cr⁶⁺) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of
25 freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. *Environ. Toxicol.*
26 28(12), 707-717.
- 27 ATSDR, 2005. Toxicguide for lead. ATSDR/CAS# 7439-92-1. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and
28 Disease Registry. EUA.
- 29 Ay Ö, Kalay M, Tamer L, Canli M, 1999. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish
30 *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62,
31 160-168.

- 1 Barton BA, 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in
2 circulating corticosteroids. *Integ. Comp. Biol.* 42, 517-525.
- 3 Behra M, Cousin X, Bertrand C, Vonesch, JL, Biellmann D, Chatonnet A, Strähle U, 2002.
4 Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo.
5 *Nat. Neurosci.* 5, 111-118.
- 6 Bergdahl IA, Shaveleva M, Schütz A, Artamonova VG, Skerfving S, 1998. Plasma and blood lead in
7 humans: capacity-limited binding to δ -aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding
8 components. *Toxicol. Sci.* 46, 247-253.
- 9 Bijvelds MJC, Van der Velden JA, Kolar ZI, Flik G, 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts. *J.*
10 *Exp. Biol.* 201, 1981-1990.
- 11 Brown RC, Davis TP, 2002. Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential
12 mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *Stroke.* 33, 1706-1711.
- 13 Camargo MMP, Fernandes MN, Martinez CBR, 2009. How aluminium exposure promotes
14 osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.*
15 94, 40-46.
- 16 Campana O, Sarasquete C, Blasco J, 2003. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and
17 lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toad fish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicol.*
18 *Environ. Saf.* 55, 116–125.
- 19 Canli M, Atli G, 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of
20 six Mediterranean fish species. *Environ. Pollut.* 121, 129-136.
- 21 Capitani EM, Paoliello MMB, Costa de Almeida GR, 2009. Fontes de exposição humana ao chumbo no
22 Brasil. *Medicina.* 42, 311-318.
- 23 Cardoso TP, Mársico ET, Medeiros RJ, Tortelly R, Sobreiro LG, 2009. Concentração de mercúrio e análise
24 histopatológica em músculo, rim e cérebro de peixe-espada (*Trichiurus lepturus*) coletados na praia
25 de Itaipu, Niterói, Rio de Janeiro, Brasil. *Ciência Rural.* 39, 540-546
- 26 Carmona R, García-Gallego M, Sanz A, Domezaín A, Ostos-Garridos MV, 2004. Chloride cells and
27 pavement cells in gill epithelia of *Acipenser naccarii*: ultrastructural modifications in seawater-
28 acclimated specimens. *J. Fish. Biol.* 64, 553-566.
- 29 Carvalho CS, Araujo HSS, Fernandes MN, 2004. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*)
30 exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comp. Biochem. Physiol.* 137(B), 225-234.

- 1 Ceyhun SB, Sentürk M, Yerlikaya E, Erdogan O, Küfrevioğlu OI, Ekinci D, 2011. Purification and
2 characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass)
3 liver and toxicological effects of metals on enzyme activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 69–74.
- 4 Cicik B, Ay Ö, Karayakar F, 2004. Effects of lead and cadmium interactions on the metal accumulation in
5 tissue and organs of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 141–
6 148.
- 7 Chowdhury MJ, Pane EF, Wood CM, 2004. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and
8 waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress
9 parameters. *Comp. Biochem. Physiol.* 139C, 163–173.
- 10 Colborn T, vom Saal FS, Soto AM, 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in
11 wildlife and humans. *Environ. Health Persp.* 101, 378-384.
- 12 CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005.
13 BRASIL.
- 14 Cretì P, Trinchella F, Scudiero R, 2010. Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in
15 tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environ. Monit.*
16 *Assess.* 165, 321-329.
- 17 Dai W, Liu S, Fu L, Du H, Xu Z, 2012. Lead (Pb) accumulation, oxidative stress and DNA damage induced
18 by dietary Pb in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* 43, 208–214.
- 19 Dang Z, Balm PHM, Flik G, Wendelaar-Bonga SE, Lock RAC, 2000. Cortisol increases Na⁺/K⁺-ATPase
20 density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis*
21 *mossambicus*. *J. Exp. Biol.* 203, 2349-2355.
- 22 de Boeck G, Ngo TTH, Campenhout KV, Blust R, 2003. Differential metallothionein induction patterns in
23 three freshwater fish during sublethal copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 65, 413–424.
- 24 de la Torre FR, Ferrari L, Salibian A, 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain
25 acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comp. Biochem. Physiol.* 131C, 271–280.
- 26 de Lima D, Roque GM, Almeida EA, 2013. In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and
27 carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Environ. Res.* 91, 45-51.
- 28 DNPM, 2013. Departamento Nacional de Produção Mineral. Sumário mineral: Chumbo. BRASIL.
29 <<http://www.dnpm.gov.br/>> acesso em julho de 2014.
- 30 Eisler R, 1988. Lead hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *Biol. Rev.* 85, 14.
- 31 Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A, 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism
32 in fish. *Fish. Physiol. Biochem.* 35, 519–539.

- 1 Evans DH, 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants.
2 Environ. Health. Perspect. 71, 47-58.
- 3 Evans DH, 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith,
4 and Ancel Keys. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 295, R704–R713.
- 5 Evans DH, Piermarini PM, Choe KP, 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange,
6 osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85, 97–177.
- 7 Fischer PW, Giroux A, 1987. Effects of dietary magnesium on sodium-potassium pump action in the heart
8 of rats. Bureau. Nutri. Sci. 252, 2091-2095.
- 9 Flik G, van der Velden JA, Dechering KJ, Verbost PM, Schoenmakers TJM, Kolar ZI, Wendelaar-Bonga SE,
10 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} Transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. J. Exp.
11 Zool. 265, 356-365.
- 12 Gilmour KM, Perry SF, 2009. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. J. Exp. Biol. 212, 1647-
13 1661.
- 14 Gilmour KM, 2012. New insights into the many functions of carbonic anhydrase in fish gills. Resp.
15 Physiol. Neurobiol. 184, 223–230.
- 16 Grosell M, Gerdes R, Brix KV, 2006. Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity
17 in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. Comp. Biochem. Physiol. 143C,
18 473-483.
- 19 Guinot D, Ureña R, Pastor A, Varó I, Ramo J, Torreblanca A, 2012. Long-term effect of temperature on
20 bioaccumulation of dietary metals and metallothionein induction in *Sparus aurata*. Chemosphere. 87,
21 1215–1221.
- 22 Heath AG, 1995. Water pollution and Fish Physiology. 2^a ed. CRC Press Inc, Boca Raton. 395p.
- 23 Heisler N, 1993. Acid-base regulation. In: Evans DH, (Ed.) The physiology of fishes. CRC Press, Boca
24 Raton. pp. 343–378.
- 25 Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A, 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose
26 metabolism and hepatic enzymes. Aquacult. Nutr. 8, 175-194.
- 27 Hirose S, Kaneko T, Naito N, Takei Y, 2003. Molecular biology of major components of chloride cells.
28 Comp. Biochem. Physiol. 136B, 593–620.
- 29 Hochachka PW, 1969. Intermediary metabolism in fishes. In: Hoar WS, Randall DJ, (Eds.) Fish Physiology:
30 excretion, ionic regulation, and metabolism. Academic Press, Nova York. pp. 351-389.
- 31 Hodson PV, Blunt BR, Jensen D, Morgan S, 1979. Effect of fish age on predicted and observed chronic
32 toxicity of lead to rainbow trout in Lake Ontario water. J. Great. Lakes. Res. 5, 84-89.

- 1 Hodson PV, Blunt BR, Whittle DM, 1980. Biochemical monitoring of fish blood as an indicator of
2 biologically available lead. *Thalass. Jugosl.* 16, 389-396.
- 3 Holmes WN, Donaldson EM, 1969. The body compartments and the distribution of electrolytes. In: Hoar,
4 WS, Randall DJ, (Eds.) *Excretion, ionic regulation and metabolism*, Fish Physiology series, v. 1
5 Academic Press, New York. pp. 1-89.
- 6 Huang ZW, Zhang O, Chen J, Zhuang ZX, Wang XR, 2007. Bioaccumulation of metals and induction of
7 metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium,
8 mercury and lead. *Appl. Organomet. Chem.* 21, 101-107.
- 9 Hughes GM, 1984. General anatomy of the gills. In: Hoar WS, Randall DJ (Eds.) *Gills, part A: Anatomy, gas*
10 *transfer, and acid-base regulation*, Fish Physiology series v. 10A. Academic Press, London. pp. 1–72.
- 11 Hwang PP, Lee TH, 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp.*
12 *Biochem. Physiol.* 148A, 479 – 497.
- 13 ICZ, 2014. Instituto de metais não ferrosos. <<http://www.icz.org.br/>> acesso em junho de 2014
- 14 Inokuchi M, Hiroi J, Watanabe S, Hwang P, Kaneko T, 2009. Morphological and functional classification
15 of ion-absorbing mitochondria-rich cells in the gills of Mozambique tilapia. *J. Exp. Biol.* 212, 1003-
16 1010.
- 17 Iwama GK, Afonso LOB, Vijayan MM, 2006. Stress in fish. In: Evans DH Claiborne JB, (Eds.) *The physiology*
18 *of fishes*. CRC Taylor & Francis. 3ª ed. pp. 319-342.
- 19 James R, Alagurathinam S, Sampath K, 1993. Haematological changes and oxygen consumption on
20 *Oreochromis mossambicus* exposed to sublethal concentrations of lead. *Indian. J. Fish.* 40, 193-196.
- 21 Jensen FB, Andersen NA, Heisler N, 1987. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties,
22 acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol.* 157B, 533-541.
- 23 Jerez S, Motas M, Cánovas RA, Talavera J, Almela RM, Río AB, 2010. Accumulation and tissue distribution
24 of heavy metals and essential elements in loggerhead turtles (*Caretta caretta*) from Spanish
25 Mediterranean coastline of Murcia. *Chemosphere.* 78, 256–264.
- 26 Kalous L, Bui AT, Petrtýl M, Bohlen J, Chaloupková P, 2012. The South American freshwater fish
27 *Prochilodus lineatus* (Actinopterygii: Characiformes: Prochilodontidae): new species in Vietnamese
28 aquaculture. *Aquac. Res.* 43, 955–958.
- 29 Kaneko T, Hirano T, 1993. Role of prolactin and somatolactin in calcium regulation in fish. *J. Exp. Biol.*
30 184, 31-45.

- 1 Köck G, Hofer R, 1998. Origin of cadmium and lead in clear softwater lakes of high- altitude and high-
2 latitudes, and their bioavailability and toxicity to fish. In: Braunbeck T, Hinton DE, Streit B (Eds.), Fish
3 Ecotoxicology. Birkhäuser Verlag, Berlin. 396p.
- 4 Kreager N, Wainman BC, Jayasinghe RK, Tsuji LJS, 2008. Lead pellet ingestion and liver-lead
5 concentrations on upland game birds from southern Ontario, Canada. Arch. Environ. Contam. Toxicol.
6 54, 331-336.
- 7 Kutlu M, Sümer S, 2008. Some biochemical properties of δ -aminolevulinic acid dehydratase in
8 *Gammarus pulex*. Food. Chem. Toxicol. 46, 115-118.
- 9 Labrot F, Ribera D, Saint-Denis M, Narbonne JF, 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers
10 of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione
11 peroxidase activities in three non-mammalian species. Biomarkers. 1, 21-28.
- 12 Lacorn M, Lahrssen A, Rotzoll N, Simat TJ, Steinhart H, 2001. Quantification of metallothionein isoforms
13 in fish liver and its implications for biomonitoring. Environ. Toxicol. Chem. 20, 140–145.
- 14 Laurén DJ, McDonald DG, 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout,
15 *Salmo gairdneri* Richardson. J. Comp. Physiol. 155B, 635-644.
- 16 Laurent P, 1984. Gill internal morphology. In: Hoar WS, Randall DJ, (Eds.) Gills, part A: Anatomy, gas
17 transfer, and acid-base regulation, Fish Physiology series v. 10A. Academic Press, London. pp. 73–183.
- 18 Liu J, Goyer RA, Waalkers MP, 2008. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD, (Ed.) Casarett and Doull's
19 Toxicology. The basic science of poisons. 7^a ed., McGraw-Hill, New York. pp. 931–980.
- 20 Lombardi PE, Peri SI, Guerrero NRV, 2010. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead
21 contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 1704–1711.
- 22 Lopes AA, Brigante J, Schalch J, 2007. Influência do aterro sanitário de São Carlos (SP), Brasil, na
23 qualidade das águas superficial e subterrânea. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 2, 115-127.
- 24 MacDonald A, Silk L, Schwartz M, Playle RC, 2002. A lead–gill binding model to predict acute lead toxicity
25 to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. 133C, 227-242.
- 26 Mager EM, 2012. Lead. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ, (Eds.) Homeostasis and toxicology of non-
27 essential metals, Fish Physiology series v. 31B. Academic Press, London. pp. 185–236.
- 28 Mallatt J, 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review.
29 Can J. Fish Aquat. Sci. 42, 630-648.
- 30 Mancera JM, McCormick SD, 2007. Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor I and
31 cortisol in teleost osmoregulation. In: Baldisserotto B, Romero JMM, Kapoor BG, (Eds.) Fish
32 osmoregulation. Science Publishers, California. pp. 497-515.

- 1 Marshall WS, 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective
2 synthesis. J. Exp. Zool. 293, 264-283.
- 3 Martinez CBR, Cólus IMS, 2002. Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da
4 poluição aquática na bacia do Rio Tibagi. In: Medri ME, Bianchini E, Shibatta OA, Pimenta JA, (Eds.) A
5 bacia do Rio Tibagi. Editora dos editores, Londrina. pp. 551-557.
- 6 Martinez CBR, Nagae MY, Zaia CTBV, Zaia DAM, 2004. Acute morphological and physiological effects of
7 lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Braz. J. Biol. 64, 797-807.
- 8 Martinez CBR, Souza MM, 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species.
9 Comp. Biochem. Physiol. 133A, 151-160.
- 10 Metcheva R, Yurukova L, Bezrukov V, Beltcheva M, Yankov Y, Dinitrov K, 2010. Trace and toxic elements
11 accumulation in food chain representatives at Livingston Island (Antarctica). Int. J. Biol. 2, 155-160.
- 12 Mellanby K, 1982. Biologia da poluição. EPU: Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 89p.
- 13 Mídio AF, 1992. Glossário de Toxicologia. Roca, São Paulo. 95p.
- 14 Milligan CL, 1996. Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. Comp. Biochem.
15 Physiol. 113A, 51-60.
- 16 MME, 2009. Ministério de Minas e Energia. Relatório Técnico 66: Perfil do chumbo. BRASIL.
17 <<http://www.mme.gov.br/>> acessado em julho de 2014.
- 18 Mommsen TP, Vijayama MM, Moon TW, 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and
19 metabolic regulation. Rev. Fish. Biol. Fish. 9, 211-268.
- 20 Monteiro V, Cavalcante DGSM, Viléla MBFA, Sofia SH, Martinez CBR, 2011. In vivo and in vitro exposures
21 for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus*
22 *lineatus*. Aquat. Toxicol. 104, 291–298.
- 23 Najimi S, Bouhaimi A, Daubèze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, Moukrim A, 1997. Use of
24 acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in
25 Agadir marine Bay (south of Morocco). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 58, 901-908.
- 26 Nascimento CRB, Souza MM, Martinez CBR, 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress
27 response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. 155C, 456-461.
- 28 Navarro CDC, Martinez CBR, 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic,
29 biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. Comp.
30 Biochem. Physiol. 165C, 83–90.
- 31 Nelson N, 1988. Structure, function, and evolution of proton-ATPases. Plant. Physiol. 86, 1-3.

- 1 Niyogi S, Wood CM, 2014. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality
2 guidelines for metals. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6177–6192.
- 3 Nunes B, Capela RC, Sérgio T, Caldeira C, Gonçalves F, Correia AT, 2014. Effects of chronic exposure to
4 lead, copper, zinc, and cadmium on biomarkers of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Environ. Sci.*
5 *Pollut. Res.* 21, 5689-5700.
- 6 Nussey G, Van-Vuren JHJ, Preez HH, 2000. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in
7 the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water.*
8 *SA.* 26, 269-284.
- 9 Oliveira Ribeiro CA, Filipak Neto F, Mela M, Silva PH, Randi MAF, Rabitto IS, Alves Costa JRM, Pelletier E,
10 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and
11 dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environ. Res.* 101, 74–80.
- 12 Olson KR, 2002. Vascular anatomy of the fish gill. *J. Exp. Zool.* 293, 214-231.
- 13 Ong CN, Lee WR, 1980. Interaction of calcium and lead in human erythrocytes. *Brit. J. Ind. Med.* 37, 70-
14 77.
- 15 Palianiappan PLRM, Krishnakumar N, Vadivelu M, 2009. Bioaccumulation of lead and the influence of
16 chelating agents in *Catla catla* fingerlings. *Environ. Chem. Lett.* 7, 51-54.
- 17 Pankhurst NW, 2011. The endocrinology of stress in fish: an environmental perspective. *Gen. Comp.*
18 *Endocrinol.* 170, 265-275.
- 19 Paoliello MMB, Chasin AAM, 1998. *Ecotoxicologia do chumbo e seus compostos. Série cadernos de*
20 *referência ambiental, Vol. 3. Centro de Recursos Ambientais – SRA, Salvador. 144p.*
- 21 Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL,
22 Galvez F, Gensemer FW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, Mcgeer JC, Naddy RB, Playle RC, Santore
23 RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM, Wu KB, 2002. The biotic ligand model: a historical
24 overview. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 3-35.
- 25 Paquin PR, Santore RC, Wu KB, Kavvas CD, Di Toro DM, 2000. The biotic ligand model: a model of the
26 acute toxicity of metals to aquatic life. *Environ. Sci. Policy.* 3, S175-S182.
- 27 Patel M, Rogers JT, Pane EF, Wood CM, 2006. Renal responses to acute lead waterborne exposure in the
28 freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 80, 362-371.
- 29 Paulino MG, Sakuragui MM, Fernandes MN, 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in
30 a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 86, 1-7.

- 1 Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL, 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new
2 future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. Mar.
3 Pollut. Bull. 32, 225-231.
- 4 Peakall D, Burger J, 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of
5 metals, and ecological host factors. Ecotoxicol. Environ. Saf. 56, 110–121.
- 6 Perry SF, 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. Annu. Rev.
7 Physiol. 59, 325-347.
- 8 Perry SF, Gilmour KM, 2006. Acid–base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and
9 emerging models. Resp. Physiol. Neurobiol. 154, 199–215.
- 10 Perry SF, Shahsavarani A, Georgalis T, Bayaa M, Furimsky M, Thomas SLY, 2003. Channels, pumps, and
11 exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. J.
12 Exp. Zool. 300A, 53–62.
- 13 Ramesh M, Saravanan M, Kavitha C, 2009. Hormonal responses of the fish, *Cyprinus carpio*, to
14 environmental lead exposure. Af. J. Biotech. 8, 4154-4158.
- 15 Rattner BA, Golden NH, Toschik PC, McGowan PC, Custer TW, 2008. Concentrations of metals in blood
16 and feathers of nestling ospreys (*Pandion haliaetus*) in Chesapeake and Delaware Bays. Arch.
17 Environ. Contam. Toxicol. 54, 114-122.
- 18 Reddy GR, Basha MR, Devi CB, Suresh A, Baker JL, Shafeek A, Heinz J, Chetty CS, 2003. Lead induced
19 effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. Int. J.
20 Devl. Neuroscience. 21, 347–352.
- 21 Renberg I, Brännvall ML, Bindler R, Emteryd O, 2000. Atmospheric lead pollution history during four
22 millennia (2000 BC to 2000 AD) in Sweden. J. Human. Environ. 29, 150-156.
- 23 Ribeiro AM, Risso WE, Fernandes MN, Martinez CBR, 2014. Lead accumulation and its effects on the
24 branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. Fish. Physiol. Biochem. 40, 645-57.
- 25 Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD, 2011.
26 Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal
27 exposure. Neurotoxicology. 32, 116–122.
- 28 Roach AC, Maher W, Krikowa F, 2008. Assessment of metals in fish from lake Macquarie, New South
29 Wales, Australia. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 54, 292–308.
- 30 Rogers JT, Patel M, Gilmour KM, Wood CM, 2005. Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and
31 Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 289,
32 R463–R472.

- 1 Rogers, JT, Richards, JG, Wood, CM, 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for
2 lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 64, 215-234.
- 3 Rogers JT, Wood CM, 2004. Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater
4 rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 207, 813-825.
- 5 Saglam D, Atli G, Canli M, 2013. Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis*
6 *niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92,
7 79-86.
- 8 Sampaio FG, Boijink CL, Oba ET, Santos LRB, Kalinin AL, Rantin FT, 2008. Antioxidant defenses and
9 biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper
10 and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 147C, 43– 51.
- 11 Schmitt CJ, Whyte JJ, Roberts AP, Annis ML, May TW, Tillitt DE, 2007. Biomarkers of metals exposure in
12 fish from lead–zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 31–47.
- 13 Scott GR, Sloman KA, 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour:
14 integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392.
- 15 Serezli R, Akhan S, Delihasan-Sonay F, 2011. Acute effects of copper and lead on some blood parameters
16 on Coruh trout (*Salmo coruhensis*). *Af. J. Biotechnol.* 10, 3204-3209.
- 17 Shah SL, 2006. Hematological parameters in tench *Tinca tinca* after short term exposure to lead. *J. Appl.*
18 *Toxicol.* 26, 223–228.
- 19 Shephard KL, 1994. Functions for fish mucus. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 4, 401-429.
- 20 Shibatta OA, Gealh AM, Bennemann ST, 2007. Ichthyofauna from the middle and upper stretches of rio
21 Tibagi basin, Paraná, Brazil. *Biota. Neotrop.* 7, 125-134.
- 22 Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR, 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in
23 the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 69, 112–120.
- 24 Skerfving S, Bergdahl IA, 2007. Lead. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT (Eds.)
25 *Handbook on the toxicology of metals.* 3^a ed., Elsevier, Amsterdam, c. 31. pp. 599-643.
- 26 Speranza ED, Cappelletti N, Migoya MC, Tatone LM, Colombo JC, 2012. Migratory behaviour of a
27 dominant detritivorous fish *Prochilodus lineatus* evaluated by multivariate biochemical and pollutant
28 data. *J. Fish. Biol.* 81, 848–865.
- 29 Takasusuki J, Araujo MRR, Fernandes MN, 2004. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical
30 fish *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Environ. Contam. Toxicol.* 72, 1075-1082.
- 31 Terra BF, Araújo FG, Calza CF, Lopes RT, Teixeira TP, 2008. Heavy metal in tissues of three fish species
32 from different trophic levels in a tropical brazilian river. *Water. Air. Soil. Pollut.* 187, 275-284.

- 1 Thomas P, 2008. The endocrine system. In: Di Giulio RT, Hinton DE (Eds.) The toxicology of fishes. CRC
2 Press, Boca Raton. pp. 457-488.
- 3 Torre Fr, Salibian A, Ferrari L, 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a
4 freshwater fish. Chemosphere. 68, 1582-1590.
- 5 UNEP, 2010. United Nation Environmental Programme. Final review of scientific information on lead.
6 EUA.
- 7 Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental
8 risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol 13, 57-149.
- 9 Viarengo A, Burlando B, Evangelisti V, Mozzone S, Dondero F, 2001. Sensitivity and specificity of
10 metallothionein as a biomarker for aquatic environment biomonitoring. In: Garrigues PH, Barth H,
11 Walker CH, Narbonne JF (Eds.) Biomarkers in marine organisms: a practical approach. Elsevier
12 Science B.V., Amsterdam. pp. 29-43.
- 13 Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, Iwama GK, 1997. Metabolic responses associated with confinement
14 stress in tilapia: the role of cortisol. Comp. Biochem. Physiol. 116C, 89-95.
- 15 Vinodhini R, Narayanan R, 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus*
16 *carpio* (Common carp). Int. J. Environ. Sci. Tech. 5, 179-182.
- 17 Wendelaar-Bonga SE, 1997. The Stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591-618.
- 18 Wilson JM, Laurent P, 2002. Fish gill morphology: inside out. J. Exp. Zool. 293, 192-213.
- 19 Winkaler EU, Silva AG, Galindo HC, Martinez CBR, 2001. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o
20 monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. Acta. Scientiarum.
21 23, 507-514.
- 22 WHO, 1995. World Health Organization: Environmental Health Criteria 165. Geneva: International
23 Programme on Chemical Safety. EUA.
- 24 Yabe MJS, Oliveira E, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de
25 bacias hidrográficas. Quim. Nova 21, 551-6.
- 26 Zarros A, Kalopita K, Tsakiris S, Baillie GS, 2013. Can acetylcholinesterase activity be considered as a
27 reliable biomarker for the assessment of cadmium-induced neurotoxicity? Food. Chem. Toxicol. 56,
28 406-410.

Capítulo II: Hipótese e objetivos

II. 1 Hipótese

O chumbo, em concentrações ecologicamente relevantes no ambiente dulcícola, pode se acumular e provocar distúrbios metabólicos, osmorregulatórios e morfofuncionais em peixes, nas primeiras 24 horas de exposição.

II. 2 Objetivo geral

Verificar o padrão do acúmulo de chumbo e seus efeitos em parâmetros metabólicos, osmorregulatórios e morfofuncionais no teleósteo neotropical *Prochilodus lineatus* nas primeiras 24 horas de exposição ao metal.

II. 3 Objetivos específicos

- Verificar o padrão de acúmulo de Pb e sua relação com o conteúdo de proteínas semelhantes à metalotioneínas em órgãos alvo de *P. lineatus*;
- Avaliar os efeitos do Pb sobre parâmetros sanguíneos e metabólicos de *P. lineatus* ao longo das primeiras 24 horas de exposição ao metal;
- Analisar se a curta exposição ao Pb é capaz de promover desajustes iônicos e alterar as enzimas de transporte de íons nas brânquias e rim de *P. lineatus*;
- Determinar se a exposição aguda ao Pb promove danos ultraestruturais e histológicos nas brânquias de *P. lineatus*.

1 **Capítulo III: Desenho Experimental**

2 Nesta sessão estão descritos os procedimentos experimentais referentes aos capítulos IV, V e VI.

3

4 **III. 1 Animais**

5 *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae) é uma espécie de
6 teleósteo dulcícola presente na região neotropical e endêmica das bacias do Prata, Paraná e Paraguai.
7 Este peixe possui hábito alimentar detritívoro e já se revelou bastante responsivo à exposição a
8 contaminantes, podendo ser, por este motivo, considerado um bom biomonitor. Os exemplares juvenis
9 de *Prochilodus lineatus* utilizados neste trabalho foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da
10 Universidade Estadual de Londrina (N = 560) e transportados em sacos plásticos até o laboratório de
11 bioensaio, onde passaram por um período de aclimação de, no mínimo 5 dias, em tanques de 300 L
12 contendo água desclorada e um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro. Durante a aclimação os peixes
13 foram alimentados com ração comercial de peixe (Guabi®, 36% proteína) no 2º e no 4º dia. Os peixes
14 não foram alimentados durante os experimentos.

15

16 **III. 2 Experimentos**

17 Foram utilizados aquários de vidro de 100 L contendo 80 L de água desclorada e com aeração
18 constante. Nos aquários experimentais foi adicionado chumbo (Pb) na forma de nitrato de chumbo para
19 ter uma concentração nominal de 3,5 mg Pb total.L⁻¹. Esta concentração foi definida visando representar
20 uma fração de 85% da concentração máxima de Pb encontrada em trechos urbanos de cursos de água,
21 na região de Londrina, Paraná (Yabe e Oliveira, 1998). Nos aquários dos grupos controle (CTR) foi
22 adicionado apenas água desclorada. Os animais (n = 8-9 peixes) foram colocados nos aquários (CTR ou
23 Pb) 24 h após a adição do chumbo e submetidos a testes estáticos pelos tempos de: 1, 2, 3, 6, 12 e 24 h.
24 Foram realizados experimentos independentes para cada tempo experimental, constituído sempre por
25 um grupo CTR e um grupo Pb expostos e amostrados simultaneamente. Um grupo de peixes (n = 7-8) foi
26 amostrado diretamente dos tanques de aclimação constituindo o tempo experimental 0 h. Foram
27 feitas 4 réplicas da cada tempo experimental em diferentes dias, o que justifica a variação do n. A fim de
28 evitar variações naturais devido ao ciclo circadiano, os experimentos foram montados de forma que a
29 amostragem coincidissem sempre dentro do mesmo período do dia, e padronizou-se o horário entre as 9
30 e 14 horas para as amostragens.

1 **III. 3 Amostragem**

2 Os peixes foram retirados dos aquários e anestesiados com benzocaína ($0,12 \text{ g.L}^{-1}$), para a
3 tomada das medidas biométricas (massa: $13,3 \pm 0,3 \text{ g}$, comprimento total: $10,6 \pm 0,06 \text{ cm}$ e
4 comprimento padrão: $8,5 \pm 0,07 \text{ cm}$ – $N=560$) e a retirada de sangue através de um vaso da região
5 caudal, com seringas lavadas com heparina sódica (Hepamax-S). Os animais foram mortos por secção
6 medular para a retirada dos órgãos, que foram acondicionados em tubos plásticos e mantidos em gelo
7 até o final do período de amostragem. As análises realizadas nos diferentes órgãos estão descritas na
8 Tabela III.1, com base na distribuição dos capítulos.

9 Após a finalização do procedimento amostral, o plasma foi acondicionado em “freezer” (-20° C),
10 e o restante das amostras foi armazenado em “ultra-freezer” (-70° C). Todo procedimento experimental
11 foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Protocolo
12 número: 35004.2011.18).

13

14 **III. 4 Análises químicas e físicas da água**

15 Durante todo o período de aclimação e no decorrer dos experimentos, temperatura (temp),
16 pH, oxigênio dissolvido (OD), condutividade (cond), turbidez (turb) e total de sólidos dissolvidos (TSD)
17 foram monitorados diariamente por um aparelho medidor multiparâmetros (U-50, Horiba, Japão). A
18 dureza foi determinada pelo método titrimétrico do EDTA e expressa em $\text{mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$. Ao final dos
19 experimentos, a água dos aquários foi coletada para análise de carbono orgânico e de chumbo, totais e
20 dissolvidos. Para análise dos elementos totais, a água foi coletada com seringas de vidro, e armazenada
21 em tubos plásticos de 15 mL, embrulhados em papel alumínio, com ácido nítrico (0,5% - FMaia) para
22 fixação da amostra. Para a dosagem dos compostos dissolvidos, a água foi coletada da mesma forma,
23 filtrada ($0,45 \mu\text{m}$) e fixada (0,5% HNO_3 - FMaia). As amostras foram armazenadas em refrigerador (4° C)
24 até as análises de Pb por atomização eletrotérmica em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA –
25 Analyst 700, PerkinElmer, EUA) utilizando forno de grafite, e análises do carbono orgânico, em um
26 analisador de carbono (TOC-VCPN, Shimadzu, Japão) conforme descrito por Rodrigues e Bianchini
27 (2007).

28 Durante os experimentos os parâmetros químicos e físicos da água mantiveram-se sem
29 variações importantes (média \pm EP): temp: $19,8 \pm 1,0^\circ \text{ C}$; pH: $6,92 \pm 0,06$; OD: $6,5 \pm 0,49 \text{ mg.L}^{-1}$; cond:
30 $89,3 \pm 2,9 \mu\text{S.cm}^{-1}$; TSD: $0,058 \pm 0,002 \text{ g.L}^{-1}$; turb: $4,91 \pm 1,32 \text{ NTU}$. Os valores médios de dureza foram de

1 35,7 mg CaCO₃.L⁻¹ e o carbono orgânico dissolvido foi de 3,59 ± 0,3 mg COD.L⁻¹, e o total de 3,6 ± 0,3 mg
 2 COD.L⁻¹.

3 **Tabela III. 1.** Órgãos e tecidos retirados de *P. lineatus* expostos ao chumbo ou à água
 4 pelos tempos de 0, 1, 2, 3, 6, 12, ou 24 horas, e os parâmetros analisados. Os dados
 5 estão organizados com base na distribuição entre os capítulos que compõem esta tese.
 6

Capítulo	Análise	Órgão/Tecido	
IV	Hemoglobina	Sangue total	
	Hematócrito		
	Número de eritrócitos		
	Concentração tecidual de chumbo		Rim ¹
			Fígado
			Músculo ²
			Células sanguíneas ³
	Proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT)	Fígado	
		Rim	
	Acetilcolinesterase		Cérebro ⁴
		Músculo	
	Glicose	Plasma ³	
	Cortisol		
	Lactato		
V	Osmolalidade	Plasma	
	Na ⁺		
	K ⁺		
	Cl ⁻		
	Ca ²⁺		
	Mg ²⁺		
	Anidrase carbônica		Brânquias
			Rim
	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase		Brânquias
			Rim
H ⁺ -ATPase		Brânquias	
		Rim	
VI	Concentração de chumbo	Brânquias	
	PSMT		
	Microanálise		
	Índice de alterações histológicas		
	Densidade células ricas em mitocôndrias		

7 ¹ rim posterior; ² músculo axial da região antero-dorsal direita; ³ obtidos após a centrifugação do
 8 sangue total (1.870 g, 10 min– MCD2000, Hsiangtai, Taiwan); ⁴ inclui os órgão do SNC localizados
 9 na caixa craniana. Estas informações são referentes às amostras usadas nas diferentes análises.

1 O valor médio de chumbo total nos aquários CTR foi de 0,01 mg.L⁻¹, mantendo-se entre o limite de
 2 detecção do aparelho e o valor máximo de 0,03 mg.L⁻¹, os valores de chumbo nos aquários
 3 experimentais, por outro lado, são mostrados na Tabela III. 2.

4 **Tabela III. 2.** Concentrações de chumbo total e dissolvido (mg.L⁻¹) na água dos aquários
 5 experimentais (Pb) coletadas ao final de cada amostragem (média ± EP, n = 3-4).

Tempo (h)	PbTotal	PbDissolvido
1	3,9 ± 0,3	3,3 ± 0,8
2	4,4 ± 0,9	3,9 ± 0,9
3	3,8 ± 0,5	3,5 ± 0,4
6	3,2 ± 0,1	2,1 ± 0,7
12	3,1 ± 0,1	3,0 ± 1,3
24	3,1 ± 0,0	2,3 ± 0,5

6 Limite de detecção do aparelho: 0,05 µg Pb.L⁻¹

7

8 **III. 5 Referências Bibliográficas**

- 9 Almeida JS, Meletti PC, Martinez CBR, 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on
 10 physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp.
 11 Biochem. Physiol. 140C, 356-363.
- 12 Rodrigues SC, Bianchini A, 2007. Extraction and concentration of freshwater – and seawater – derived
 13 dissolved organic matter for use in aquatic toxicology studies. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. 2, 275-281.
- 14 Yabe MJS, Oliveira E, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de
 15 bacias hidrográficas. Quim. Nova. 21, 551-556.

1 **Capítulo IV: Bioacumulação de chumbo e alterações metabólicas em *Prochilodus lineatus* durante as**
2 **primeiras 24 horas de exposição ao metal.**

3 Nesta seção estão descritos as análises, resultados e discussão referentes à avaliação da concentração
4 tecidual de chumbo e os efeitos do metal em parâmetros hematológicos, metabólicos, na atividade da
5 acetilcolinesterase e na concentração de proteínas semelhantes às metalotioneínas em *P. lineatus*.

6

7 **IV. 1 Material e métodos**

8

9 **a. Análise de chumbo nos tecidos**

10 As amostras dos diferentes tecidos (rim, fígado, músculo, células sanguíneas) foram pesadas e
11 colocadas em estufa (60° C) até a completa secagem. As células sanguíneas foram obtidas após
12 centrifugação do sangue total (descrito no próximo item). As células e os tecidos secos foram
13 submetidos a digestão ácida, com ácido nítrico (5:1) (HNO₃ suprapuro Merck), em estufa a 60° C,
14 durante 24 h, em tubos criogênicos fechados. A análise de chumbo (Pb) foi realizada por atomização
15 eletrotérmica em forno de grafite acoplado ao EAA (AAAnalyst 700, PerkinElmer, EUA). Neste método o
16 limite de detecção para o Pb é de 0,05 µg. L⁻¹.

17

18 **b. Análises hematológicas**

19 O sangue total foi utilizado para a determinação do hematócrito (Hcto), para tal uma alíquota
20 aproximada de 25 µL de sangue foi colocada em microcapilares de vidro heparinizados e centrifugada
21 (1.200 g, 5 min), para a leitura em cartão padronizado que determina a porcentagem de células na
22 amostra. Além disso, outra alíquota de sangue total foi diluída (200x) em tampão formol citrato para a
23 contagem do número de eritrócitos por mm³ de sangue (RBC), em câmara de Neubauer ao microscópio
24 de luz. A análise do conteúdo de hemoglobina (Hb) foi realizada por meio do método de cianeto de
25 metahemoglobina, utilizado-se um kit comercial (Doles, Brasil), em espectrofotômetro (Libra S32,
26 Biochrom, Reino Unido) a 540 nm. Após a determinação dos parâmetros hematológicos o sangue total
27 foi centrifugado (1.870 g, 10 min – MCD2000, Hsiangtai, Taiwan), para a separação das células
28 sanguíneas e do plasma.

1 **c. Análises metabólicas**

2 O plasma foi utilizado para a determinação das concentrações de lactato, glicose e cortisol com
3 a utilização de kits comerciais. Para a dosagem de lactato, utilizou-se kit enzimático (Labtest Diagnóstica,
4 Brasil) adaptado para leitura em espectrofotômetro de microplacas (Victor³, PerkinElmer, USA) em 550
5 nm. A glicemia foi analisada pela técnica da glicose oxidase (Doles, Brasil) em leitora de microplaca a 510
6 nm. A concentração de cortisol foi determinada pela técnica de Elisa, utilizando kit comercial (DRG
7 Internacional Inc., EUA), em leitora de microplacas (ELX 800, BioTek, EUA) a 450 nm.

8

9 **d. Proteínas semelhantes à metalotioneínas**

10 Para a análise de proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT), foi utilizado homogeneizado
11 de fígado ou rim posterior (1:5 p:v) aplicando-se a técnica de purificação de proteínas para medição de
12 grupamentos -SH utilizando-se como curva padrão GSH, segundo método descrito por Viarengo et al.
13 (1999) e adaptado para leitora de microplacas. Após o descongelamento, os órgãos foram
14 homogeneizados (sacarose 500 mM, tris 26 mM, PMSF 0,5 mM, β-mercaptoetanol 0,01%, pH 8,6),
15 centrifugados (14000 g, 45 min, 4° C) e ao sobrenadante foi adicionado etanol absoluto resfriado (-
16 20°C). As amostras passaram por nova centrifugação (8000 g, 10 min, 4° C) e adicionou-se ao
17 sobrenadante etanol absoluto resfriado e ácido clorídrico. A mistura foi armazenada em freezer (-20° C)
18 por 1 h e centrifugada novamente (8000 g, 10 min, 4° C), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi
19 ressuspenso em uma solução de etanol-clorofórmio. As amostras foram agitadas vigorosamente e
20 seguiu-se uma nova centrifugação (8000 g, 10 min, 4° C), o sobrenadante foi outra vez descartado, o
21 pellet foi ressuspenso em solução (NaCl 250 mM, EDTA 4 mM) e os tubos foram agitados novamente.
22 Após adição de um novo tampão (DTNB 0,43 mM, NaPO₄ 200 mM, pH 8,0) foi realizada a leitura, em 412
23 nm, em espectrofotômetro de microplacas. A concentração de PSMT foi estimada usando uma curva
24 padrão de GSH (de 30 a 300 μM) e expressa por proteínas totais. A concentração de proteínas das
25 amostras foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando-se soro albumina bovina como
26 padrão.

27

28 **e. Atividade da acetilcolinesterase**

29 Os tecidos muscular e cerebral foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio (0,1 M;
30 pH 7,5; 1:10 p/v) e centrifugados (10.000 g, 20 min, 4° C) para a análise da atividade da

1 acetilcolinesterase (AChE), segundo método descrito por Ellman et al. (1961) e adaptado por Alves-Costa
2 et al. (2007) para leitura em espectrofotômetro de microplacas a 415 nm. A atividade da AChE (nmol
3 DTNB.min⁻¹.mg ptn⁻¹) foi determinada nos tecidos através da reação do iodeto de acetilcolina (9 mM)
4 com reagente de cor contendo ditionitrobenzoato (0,5 mM). O produto da degradação do iodeto de
5 acetilcolina pela AChE, reage com o DTNB formando nitrobenzoato, que foi mensurado
6 espectrofotometricamente a cada 3 minutos pelo tempo total de 6 minutos. A concentração de
7 proteínas totais para a expressão dos resultados foi determinada pelo método descrito por Bradford
8 (1976).

9

10 **f. Análises estatísticas**

11 Para cada um dos tempos experimentais (1, 2, 3, 6, 12 e 24 h) os resultados encontrados de
12 cada parâmetro para os grupos CTR e Pb foram comparados entre si usando o teste t de student ou
13 Mann-Whitney. Os resultados obtidos para cada tratamento (CTR e Pb) também foram comparados
14 entre os tempos experimentais (0, 1, 2, 3, 6, 12 e 24 h) usando análise de variância paramétrica
15 (ANOVA) ou não paramétrica (KruskallWallis). As diferenças, quando indicadas, foram localizadas pelo
16 teste de comparações múltiplas SNK (paramétrico) ou Dunn's (não paramétrico). Como não houve
17 diferença estatística para o acúmulo tecidual de Pb entre os grupos CTR de todos os tempos, estes
18 resultados foram agrupados e comparados com os dados obtidos para os animais expostos ao Pb, em
19 todos os períodos experimentais, também por meio de ANOVA e SNK. O uso da estatística paramétrica
20 ou não paramétrica foi definido dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade
21 de variância). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

22

23 **IV. 2 Resultados**

24

25 **a. Concentração tecidual de Pb**

26 Dentre os 560 animais que foram usados para os experimentos, 12 peixes morreram nos
27 aquários contendo Pb, 3 no tempo de 12 h e 9 em 24 h de exposição. Por meio da dosagem da
28 concentração tecidual de Pb foi possível identificar que, após 24 h de experimento, os tecidos
29 analisados de *P. lineatus* expostos ao Pb apresentaram retenção de metal. Contudo, as concentrações
30 de Pb encontradas diferiram em grande escala de acordo com o tecido e o tempo de exposição. O

1 padrão de acúmulo de Pb nos diferentes tecidos de juvenis de *P. lineatus* após 24 h de exposição,
 2 seguiu a seguinte ordem decrescente: Rim > Células do sangue = Fígado > Músculo.

3 O rim posterior (Fig. IV.1A) foi o órgão que, ao longo das 24 h de exposição, mais acumulou Pb
 4 atingindo valores próximos a 2.500 $\mu\text{g Pb.g tecido seco}^{-1}$. Por outro lado, o tecido com o menor
 5 acúmulo de metal foi o músculo (Fig. IV.1B), que não apresentou aumento na concentração de Pb até 12
 6 h de exposição em relação aos tempos anteriores, mas ao final da 24ª hora reteve quase 3 vezes mais Pb
 7 do que os tempos iniciais, atingindo a média de $63 \pm 7,2 \mu\text{g Pb.g tecido seco}^{-1}$. Da mesma forma, apenas
 8 após 24 h de exposição ao Pb, pôde-se verificar acúmulo do metal no fígado (Fig. IV.1C), chegando a
 9 média de $414 \pm 52,6 \mu\text{g Pb.g tecido seco}^{-1}$, enquanto entre 0 e 12 h de experimento, as concentrações
 10 variaram entre 158 a 212 $\mu\text{g Pb.g tecido seco}^{-1}$. A presença de Pb nas células do sangue (Fig. IV.1D) não
 11 se alterou estatisticamente até a 6ª hora de exposição, mantendo-se entre 280 e 340 $\mu\text{g Pb.g tecido}$

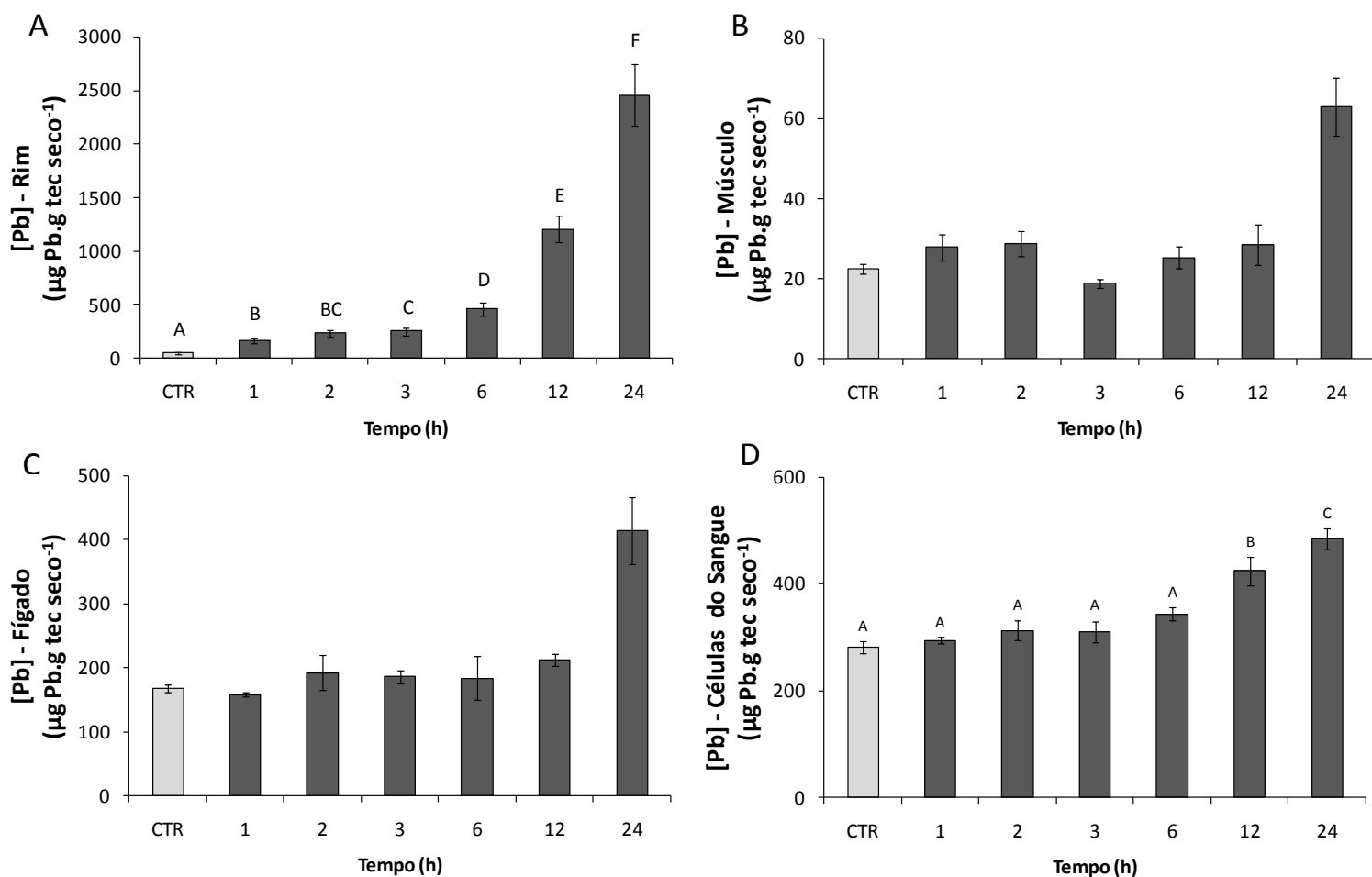


Figura IV.1. Acúmulo de Pb (média \pm EP) nos tecidos renal (A), muscular (B), hepático (C) e nas células sanguíneas (D) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao Pb pelos tempos de 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

1 seco⁻¹, porém, a análise das células dos animais expostos ao Pb por 12 e 24 h, mostraram que o acúmulo
2 de Pb cresceu significativamente, atingindo, em média, valores 72% maiores do que os níveis iniciais.

3

4 **b. Parâmetros hematológicos**

5 A exposição de *P. lineatus* ao Pb ao longo de 24 horas não foi suficiente para causar alterações
6 nos valores de Hcto, Hb e RBC em comparação aos respectivos CTR. Contudo, verificou-se uma variação
7 temporal nos dados de Hct (Fig. IV.2A) em 3 h (19% de aumento em média), e na concentração de Hb
8 (Fig. IV.2B) após 12 h da manipulação dos animais (em média, 30% maior). Por outro lado, no número de
9 eritrócitos (Fig. IV.2C) não houve alterações no decorrer do experimento (média $2,2 \times 10^6$ células. mm^{-3}).

10

11 **c. Parâmetros metabólicos**

12 A glicose plasmática (em g.dL^{-1}) dos animais controle elevou-se discretamente nas primeiras
13 horas de experimento (0 h: $53,6 \pm 2,3$; 2 h: $61 \pm 1,4$), retornando para valores abaixo do nível inicial a
14 partir de 6 h após a montagem dos experimentos (média 6, 12 e 24 h: $43,1 \pm 1,1$), mesmo tempo em que
15 os animais expostos ao Pb apresentaram elevação dos índices glicêmicos entre 52 e 92% (p : 6 h < 0,001;
16 12 h = 0,003; 24 h < 0,001) em comparação com seus respectivos CTR (Fig. IV.3A). Por outro lado, o
17 cortisol plasmático (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *P. lineatus* expostos ao Pb não variou ao longo do tempo (média Pb:
18 $4,0 \pm 0,2$), enquanto os animais CTR apresentaram valores de cortisol mais elevados após 3 e 6 h (0 h:
19 $3,6 \pm 0,3$; 3 h: $6,3 \pm 0,6$; 6 h: $6,1 \pm 0,6$) da montagem do experimento (Fig. IV.3B). Desta forma, foi
20 possível identificar diferença estatística entre os animais CTR e Pb nestes mesmos tempos de
21 experimento (p : 0,014 e 0,022, respectivamente). Já a concentração de lactato no plasma (média CTR:
22 $28 \pm 0,8 \text{ mg.dL}^{-1}$) não variou ao longo do tempo nos animais CTR, contudo, verificou-se aumento
23 significativo entre 24 e 34% nos animais expostos ao Pb por 12 e 24 h (p : 0,016 e 0,016,
24 respectivamente) em comparação aos respectivos CTR (Fig. IV.3C).

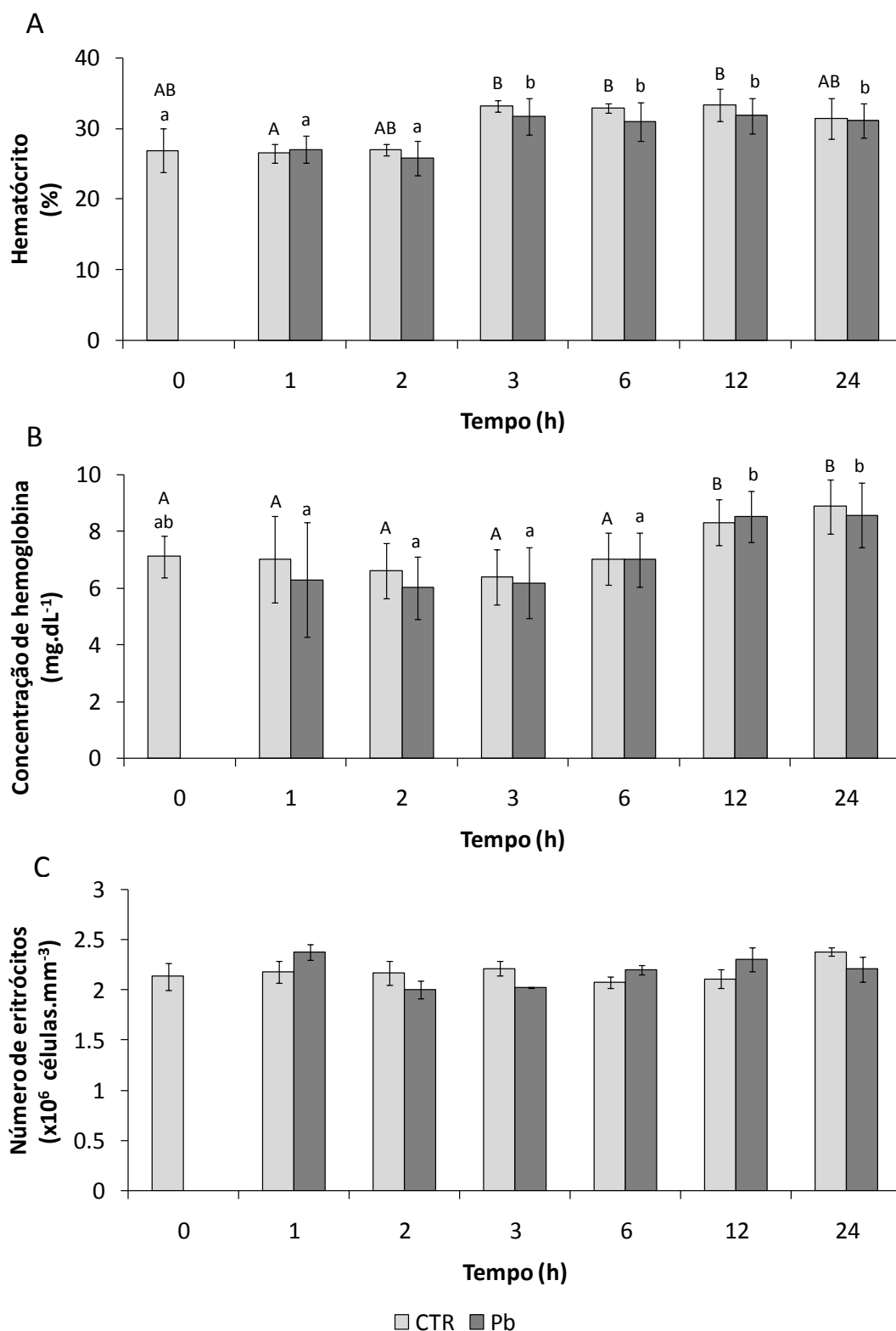


Figura IV.2. Parâmetros hematológicos (média \pm EP): hematócrito (A), conteúdo de hemoglobina (B), número de eritrócitos (C) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao Pb (Pb) pelos tempos de 0, 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos CTR e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos Pb ($p < 0,05$).

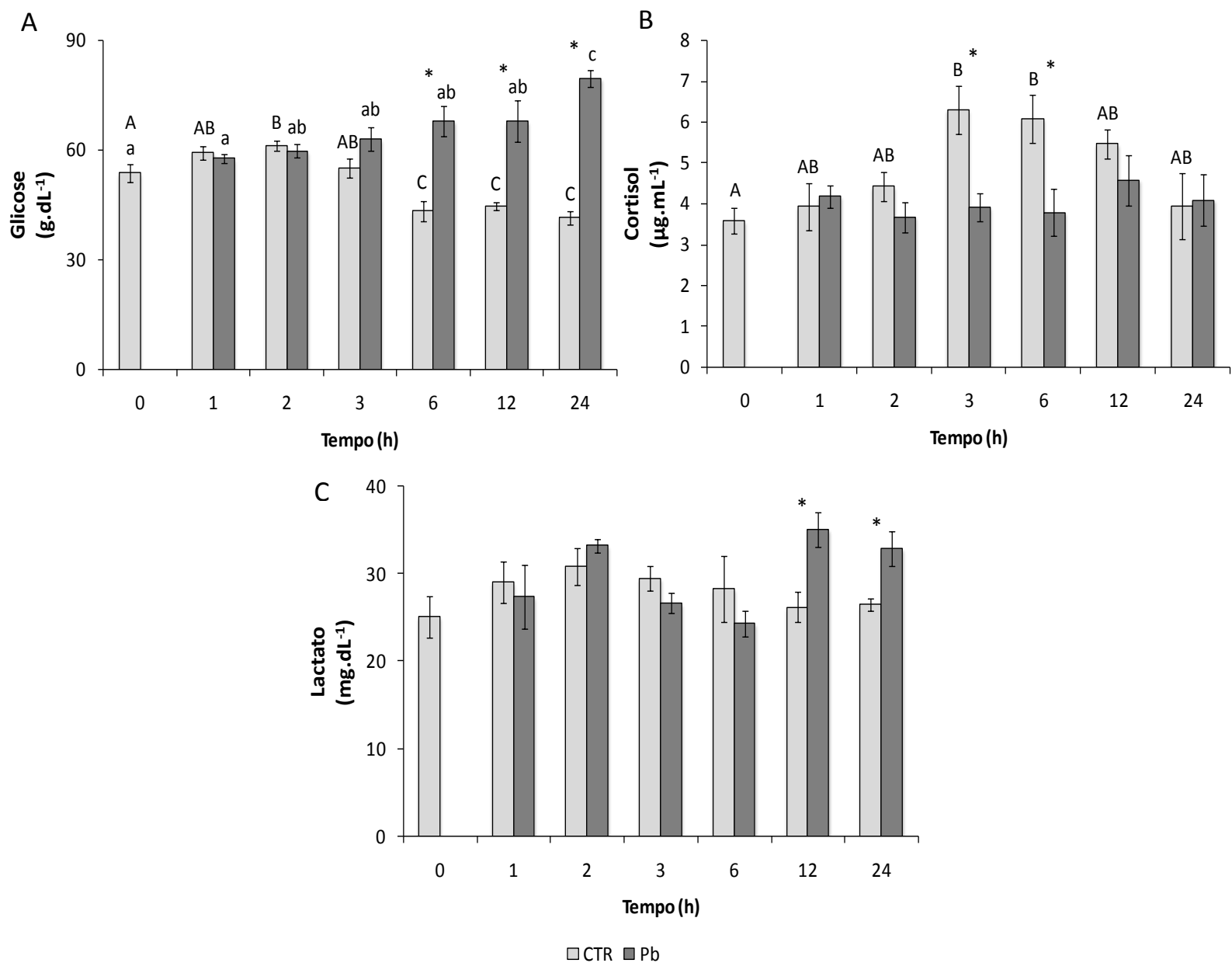


Figura IV.3. Concentrações plasmáticas (média \pm EP) de glicose (A), cortisol (B) e lactato (C) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao Pb (Pb) durante 0, 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos CTR e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos Pb. * indica diferença entre CTR e Pb de um mesmo tempo ($p < 0,05$).

1 **d. Atividade da acetilcolinesterase**

2 A atividade da acetilcolinesterase (AChE) muscular (Fig. IV.4A) e cerebral (Fig. IV.4B) apresentou
 3 uma alta variabilidade entre os tempos experimentais, ainda assim os efeitos do Pb foram bastante
 4 semelhantes para os dois tecidos. Foi identificado um aumento na atividade da AChE no cérebro ($p <$
 5 $0,001$) e no músculo ($p < 0,001$) na 3ª h de exposição ao Pb, em relação aos respectivos CTR. Apesar
 6 deste aumento pontual, houve uma prevalência de inibição da atividade colinesterásica nos dois tecidos
 7 frente à exposição ao Pb ao longo das 24 horas. Constatou-se que a atividade da AChE no músculo dos
 8 animais expostos ao Pb foi entre 28 e 30% menor do que a dos animais expostos somente à água

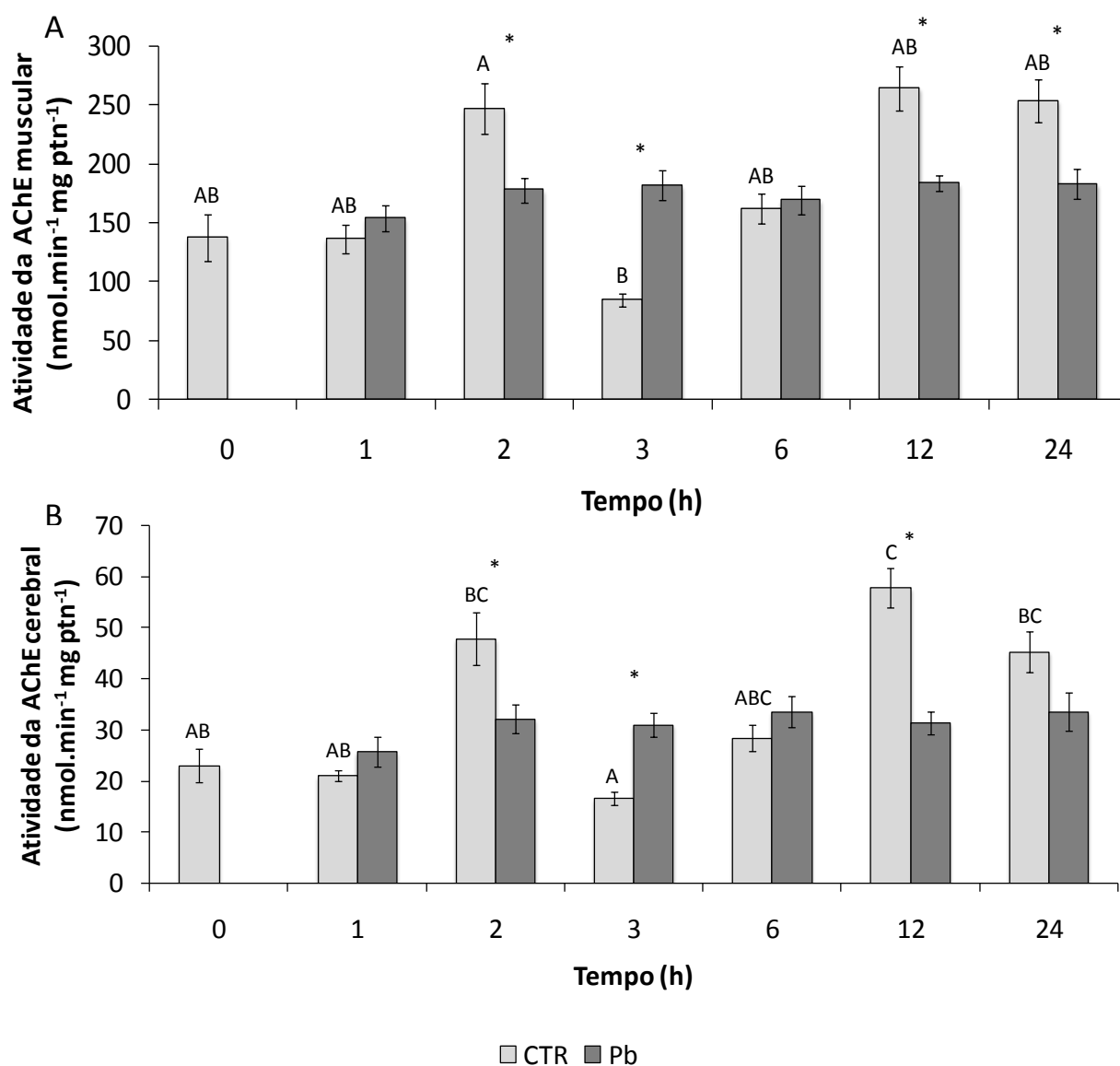


Figura IV.4. Atividade da acetilcolinesterase (AChE) (média \pm EP) no músculo (A) e no cérebro (B) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao Pb (Pb) pelos tempos de 0, 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos CTR, * indica diferença entre CTR e Pb de um mesmo tempo ($p < 0,05$).

1 durante 2 h ($p = 0,019$), 12 h ($p = 0,002$) e 24 h ($p = 0,009$). Já no cérebro, houve inibição da atividade da
 2 AChE de 33 e 46% nos animais expostos ao Pb em relação aos CTR, nos tempos de 2 h ($p = 0,02$) e 12 h
 3 ($p < 0,001$), respectivamente. Apesar de não ser significativamente diferente, após 24 h de exposição ao
 4 Pb, a atividade da AChE cerebral reduziu quase 27% em relação ao CTR ($p = 0,058$).

5

6 e. Proteínas semelhantes à metalotioneínas

7 Os valores absolutos de proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT) nos tecidos renal e
 8 hepático mostraram-se bastante variáveis entre os tempos experimentais, entretanto, a análise dos
 9 resultados (CTR X Pb) considerando-se cada tempo experimental revelou alterações significativas

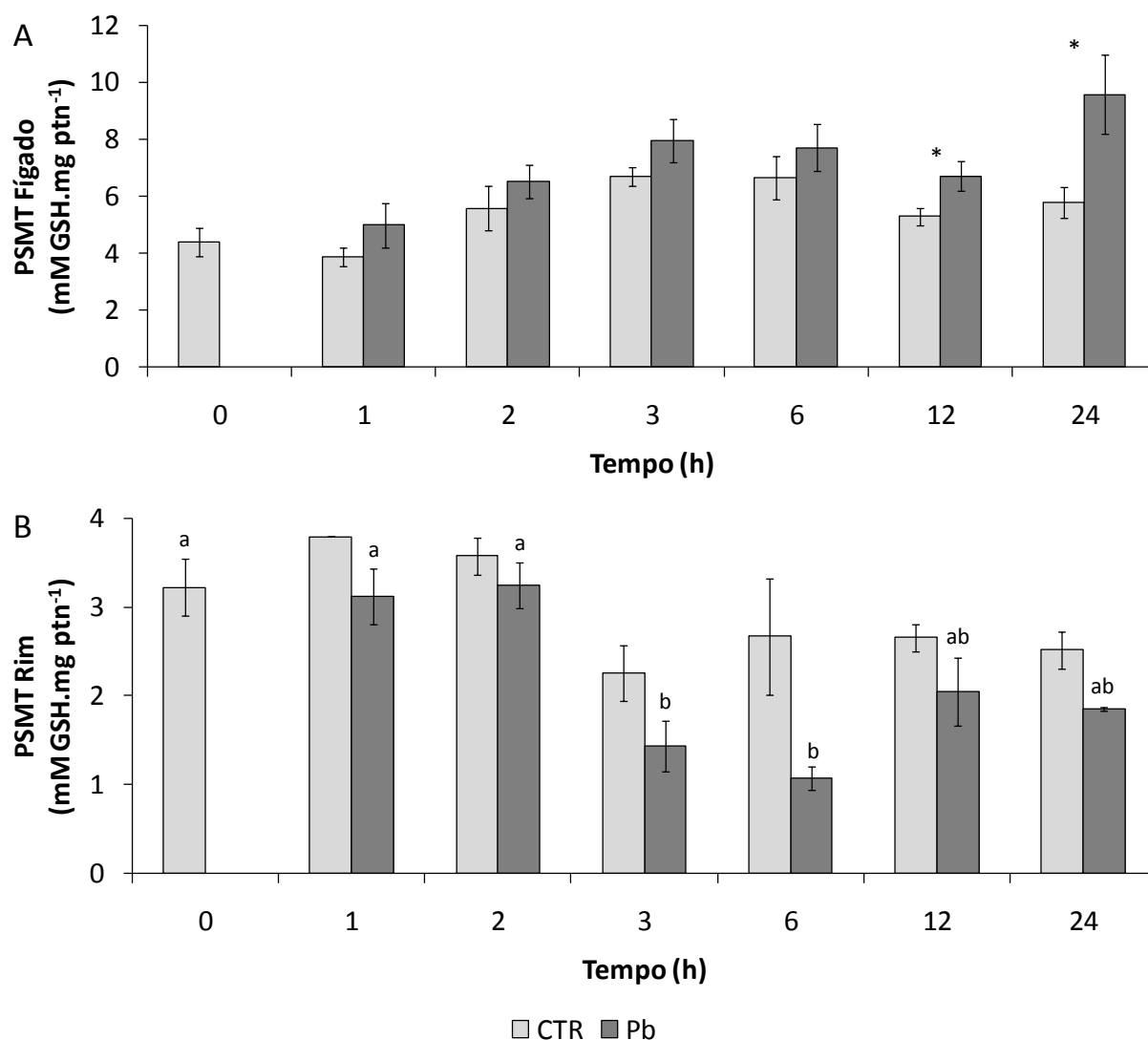


Figura IV.5. Concentrações de proteínas semelhantes à metalotioneínas (média \pm EP) no fígado (A) e no rim posterior (B) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao Pb (Pb) por 0, 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos Pb, * indica diferença entre CTR e Pb de um mesmo tempo ($p < 0,05$).

1 importantes. Os resultados de PSMT no tecido hepático (Fig. IV.5A) dos animais expostos ao metal
2 apresentou aumento significativo de 27 a 65% em relação aos peixes CTR após 12 h ($p = 0,049$) e 24 h (p
3 = 0,023) de exposição, respectivamente, embora os animais expostos ao Pb nos demais tempos já
4 apresentassem valores, em média, 20% maiores do que seus respectivos CTR. O rim posterior (Fig.
5 IV.5B), ao contrário do fígado, não apresentou qualquer alteração significativa, não obstante, uma
6 tendência de redução média de 30% possa ser verificada em todos os tempos experimentais.

7

8 **IV.3 Discussão**

9 A concentração de Pb total encontrada na água dos aquários manteve-se próxima do esperado,
10 refletindo as condições encontradas em ambientes sob influência antrópica (Yabe e Oliveira, 1998;
11 Almeida et al., 2005). Graças às características da água utilizada para os testes toxicológicos, o Pb que
12 permaneceu dissolvido corresponde, em média, a 85% do Pb total adicionado, relacionado à baixa
13 dureza da água, um dos parâmetros mais importantes para a disponibilização do metal (Paquin et al.,
14 2000). Os parâmetros físicos e químicos da água mantiveram-se constantes durante todo o período de
15 aclimação e de experimentos, indicando que as condições laboratoriais proporcionaram a estabilidade
16 necessária para a validade dos testes ecotoxicológicos, excluindo assim a possibilidade de interferentes
17 externos. A quantidade de metal encontrada nos aquários representa menos de 3% da CL_{50} (24 h)
18 determinada por Martinez e colaboradores (2004) para a espécie *Prochilodus lineatus* (126 mg Pb.L^{-1}),
19 porém, trabalhos anteriores demonstraram que, ainda que em baixas concentrações, o Pb seja de
20 interferir nos processos de osmorregulação (Ribeiro et al., 2014) e de estresse oxidativo, e ainda causar
21 efeitos genotóxicos (Monteiro et al., 2011).

22 Ao longo do tempo, o Pb pode ter sua concentração alterada devido à ocorrência de
23 precipitação, adsorção e absorção (Paquin et al., 2000). A absorção pela biota pode acarretar
24 bioacumulação (Van der Oost et al., 2003), promovendo a disfunção de diversos processos fisiológicos
25 (Ay et al., 1999; Rogers et al., 2003; Grosell et al., 2006), podendo, inclusive, comprometer o
26 crescimento (Canli e Atli, 2003; Alves e Wood, 2006) e a reprodução (Yamaguchi et al., 2007), refletindo,
27 mais tardiamente, em efeitos indesejáveis para o ecossistema (Van der Oost et al., 2003). O acúmulo de
28 contaminantes se dá no organismo através de três possíveis vias: absorção pela pele ou brânquias
29 (bioconcentração), ingestão de partículas suspensas, ou ingestão de alimento contaminado
30 (biomagnificação) (Van der Oost et al., 2003). Neste trabalho, a via de acúmulo para *P. lineatus* limita-se

1 à bioconcentração, uma vez que durante o experimento os animais não receberam alimento, e, por se
2 tratar de teleósteos dulcícolas, não há ingestão de água. O acúmulo de metais pode se dar de forma
3 distinta em cada tecido do corpo do animal, diferindo, principalmente, em função do tempo de
4 exposição, do tipo e concentração do metal (Rogers et al., 2003; Rogers e Wood, 2004; Huang et al.,
5 2007), da interação com outros metais (Cicik et al., 2004) e da espécie que está exposta (Huang et al.,
6 2007). A concentração de contaminante nos tecidos pode ser usada com biomarcador de exposição,
7 mas o nível de contaminação da biota é determinado pela cinética de tomada e eliminação do poluente,
8 que são específicas para o contaminante e o organismo (Van der Oost et al., 2003).

9 Em geral, órgãos com taxas metabólicas mais elevadas (Cicik et al., 2004; Klavins et al., 2009;
10 Palaniappan et al., 2009), junto com os que estão diretamente em contato com o poluente (Alves e
11 Wood, 2006), tendem a apresentar maiores concentrações de metal após curtos períodos de exposição.
12 O maior acúmulo de metal no rim posterior observado no presente trabalho coincide com resultados
13 encontrados por outros autores para as espécies *Oreochromis niloticus* (Ay et al., 1999; Rogers et al.,
14 2003) e *Cyprinus carpio* (Huang et al., 2007). Entretanto, exemplares de *P. lineatus* residentes de áreas
15 contaminadas, tiveram maiores níveis de Pb acumulado no fígado (Lombardi et al., 2010), diferindo dos
16 resultados deste trabalho. Essa diferença pode ter origem no tempo de exposição ou na presença de
17 outros elementos na água que podem interagir com o Pb, ou competir com ele pelas vias de entrada no
18 peixe (Paquim et al., 2000), além de haver a possibilidade de o metal adentrar o animal pela via
19 alimentar, atingindo prioritariamente os órgãos relacionados ao sistema digestório e de excreção (Alves
20 et al., 2006; Alves e Wood, 2006).

21 No trabalho desenvolvido por Ribeiro et al. (2014) foi constatado que a exposição de *P. lineatus*
22 ao Pb por 96 h culmina em acúmulo de metal prioritariamente no rim posterior, seguido pelas
23 brânquias. Da mesma forma, as análises de concentração de Pb no tecido branquial dos animais
24 expostos a ele por 24 h, demonstrou que grandes quantidades deste metal ficaram retidas nas
25 brânquias, e serão apresentadas e discutidas adiante, no capítulo VI. As brânquias são importantes
26 portas de entrada para contaminantes presentes na água (Vinodhini e Narayanan, 2008; Palaniappan et
27 al., 2009), e dali o Pb tem acesso aos demais órgãos, por meio da circulação sanguínea (Dai et al., 2012).
28 O Pb atinge o sistema renal graças à grande vascularização que este apresenta, estima-se que entre 9 e
29 14% do metal encontrado no tecido renal de truta arco-íris exposta ao Pb, pela via alimentar, se deva ao
30 Pb associado às células sanguíneas que banham este órgão (Alves et al., 2006), mas esta proporção pode
31 chegar a 20% (Alves e Wood, 2006). A grande quantidade de canais de transporte de cálcio presente no

1 tecido renal pode ser um dos principais motivos para retenção deste elemento (Alves e Wood, 2006; Dai
2 et al., 2012), uma vez que, este tipo de transportador apresenta alta afinidade por metais divalentes,
3 como é o caso do Pb (Patel et al., 2006). O rim posterior exerce importante função na regulação de
4 eletrólitos e água, e também pode apresentar altas taxas de acúmulo de metais devido seu papel
5 excretório, sendo capaz de eliminar, inclusive, íons metálicos desnecessários ao funcionamento do
6 organismo (Patel et al., 2006; Palaniappan et al., 2009), e podendo acumular quantidades
7 significativamente maiores do que o rim anterior (Alves e Wood, 2006; Patel et al., 2006). Além disso,
8 estudos histopatológicos indicaram que a presença deste metal é capaz de induzir a formação de corpos
9 de inclusão nas células dos túbulos renais de ratos (Moore e Goyer, 1974) e aves (Locke et al., 1966).
10 Estes corpos são formações protéicas que atuam no intuito de impedir que o metal continue em
11 circulação, e são descritas por Patel et al. (2006), como uma das razões para a ocorrência de uma grande
12 quantidade de Pb no rim de *O. mykiss* após exposição aguda ao elemento metálico. Neste trabalho, o
13 metal acumulado no rim dos peixes expostos ao Pb aumentou sucessivamente ao longo dos tempos
14 experimentais, chegando a atingir até 48 vezes os níveis do tecido renal dos animais CTR. Em
15 comparação com o fígado, os valores de Pb acumulado após 1 h de exposição apresentaram-se bastante
16 próximos do rim, porém, ao passar das 24 h de experimento, este último órgão apresenta 6 vezes mais
17 Pb do que o tecido hepático, demonstrando, desta forma, que o Pb apresenta uma maior afinidade pelo
18 tecido renal (Patel et al., 2006).

19 Similarmente ao rim, o fígado é um órgão que apresenta alta atividade metabólica, e por este
20 motivo torna-se um órgão-alvo com alta afinidade para o acúmulo de contaminantes em geral. Além
21 disso, graças ao seu papel de órgão de estoque e detoxificação, o fígado é capaz de acumular grandes
22 quantidades de metais (Nussey et al., 2000; Klavins et al., 2009; Palaniappan et al., 2009), e fatalmente
23 acumulará Pb, caso este esteja presente no corpo do animal. Porém, Alves e Wood (2006) sugerem que
24 exista uma maior afinidade do Pb por outros tecidos moles, como o rim ou as brânquias, do que pelo
25 fígado. Os resultados obtidos neste trabalho sustentam esta ideia, demonstrando que, apenas após 24 h
26 de contato com o metal, o fígado passa a apresentar um aumento significativo em relação aos animais
27 que não foram expostos, mantendo níveis abaixo dos encontrados no tecido renal. Contudo, sabe-se
28 que após exposição crônica a uma concentração constante de Pb, o fígado apresenta uma tendência a
29 manter os mesmos níveis ao longo do tempo, indicando que existe um limite a ser atingido (Campana et
30 al., 2003; Alves et al., 2006; Alves e Wood, 2006). Em um trabalho realizado com peixes coletados em
31 áreas contaminadas com Pb, Schmitt et al. (2007) encontraram 99,5% dos animais com grandes
32 quantidades deste metal acumulado no tecido hepático. Porém, a capacidade de 'autodepuração' do

1 fígado, permite que ele reflita as flutuações das concentrações metálicas que ocorrem no ambiente
2 natural (Nussey et al., 2000; Klavins et al., 2009), retendo menos Pb, conforme as concentrações do
3 metal dissolvido na água são reduzidas. Isto acontece graças à sua função excretora exercida por meio
4 da produção da bile, eliminando o Pb com as fezes (ASTDR, 2007; Liu et al., 2008). A bile é conhecida
5 como um eficaz meio de excreção de metabólitos e xenobióticos, e pode ser usada como um eficiente
6 biomarcador (Viarengo et al., 2007). Contudo, a análise da concentração de Pb na bile (dados não
7 mostrados) de *P. lineatus* neste trabalho gerou resultados inconsistentes, possivelmente devido a uma
8 inadequação metodológica.

9 Neste trabalho, os níveis de Pb acumulados no tecido muscular mantiveram-se cerca de 7 vezes
10 menor do que o acumulado nas células do sangue, e quase 40 vezes abaixo do metal retido no rim,
11 resultados similares foram encontrados por Ribeiro et al. (2014). Segundo Palaniappan et al. (2009), os
12 baixos níveis de Pb encontrados no músculo podem ser atribuídos ao seu grande volume quando
13 comparado a outros tecidos, que culmina na distribuição do metal por todo o corpo. Somado a isso, os
14 autores também acreditam que o tecido muscular possa sofrer um rápido processo de
15 descontaminação. Outra possibilidade está na baixa afinidade do tecido muscular pelo Pb (Dai et al.,
16 2012) considerando que é um dos últimos sistemas a acumular o Pb (Vinodhini e Narayanan, 2008).
17 Terra et al. (2008), demonstraram que o músculo de peixes neotropicais de água doce, capturados em
18 rios com altos índices de contaminação, pode apresentar níveis de Pb acima das concentrações
19 recomendadas pela legislação brasileira. Desta forma, a análise de metal acumulado no músculo não
20 deve ser usada como único biomarcador de exposição, mas sim, como uma ferramenta complementar
21 para análises em pesquisas de interesse humano, uma vez que, o consumo de peixes com índices
22 elevados de metal pode ocasionar inúmeras disfunções na saúde do homem (Nussey et al., 2000;
23 ASTDR, 2007; Liu et al., 2008).

24 O Pb que é encontrado por todo o corpo de *P. lineatus* atinge cada órgão por meio da circulação
25 sanguínea, que é o segundo tecido a entrar em contato com o metal dissolvido na água, depois das
26 brânquias. Entre 98 a 99% do Pb do sangue total, encontra-se aderido, ou dentro das hemácias (Alves e
27 Wood, 2006; Alves et al., 2006). Do Pb que adentra o eritrócito, entre 35 e 81% deve se ligar à enzima
28 ácido δ -aminolevulínicosdesidratase (ALA-D) (Skerfving e Bergdahl, 2007), uma enzima presente no
29 interior das células vermelhas, imprescindível para a formação da hemoglobina, e que é sensivelmente
30 inibida na presença de Pb (Schmitt et al., 2007; Kutlu e Sümer, 2008). Entretanto, a quantidade de Pb
31 que interage com a ALA-D é limitada, não sendo possível um aumento indiscriminado de Pb nas células

1 vermelhas (Skerfving e Bergdahl, 2007). Porém, após a saturação das hemácias o Pb começa a se
2 acumular de forma mais significativa no plasma (Alves et al., 2006), e muitas vezes, o sangue total pode
3 atuar como uma reserva do excesso de Pb no organismo (Alves e Wood, 2006), podendo provocar
4 acúmulo de metal em outros órgãos que atuam, ou não, em funções relacionadas com a desintoxicação
5 (Dai et al., 2012). Contudo, os resultados deste trabalho indicam que, nos períodos iniciais de exposição,
6 o sangue atua como via de transporte para que o Pb se acumule em outros órgãos com maior afinidade,
7 antes de ficar retido nas células sanguíneas.

8 Em cada molécula de ALA-D podem se ligar até seis átomos de Pb, porém a ligação de dois
9 átomos já é suficiente para reduzir sua atividade pela metade (Bergdahl et al., 1998). A ALA-D é uma
10 enzima envolvida na produção de hemoglobina, e sua inibição pode acarretar em redução da
11 concentração dessa proteína, seguida da redução dos outros índices hematológicos, como o
12 hematócrito e o número de células vermelhas circulantes (Mager, 2012). Sua atividade decai
13 sensivelmente na presença de Pb (Hodson et al., 1980; Alves-Costa et al., 2007; Schmitt et al., 2007;
14 Kutlu e Sümer, 2008), e já houve registros de redução de sua atividade em *P. lineatus* graças à presença
15 deste metal (Lombardi et al., 2010). No entanto, da mesma maneira que trabalhos anteriores (Martinez
16 et al., 2004; Ribeiro et al., 2014) não mostraram prejuízos dos parâmetros hematimétricos, as análises
17 hematológicas realizadas para a espécie estudada não apontaram para a perda das funções desta
18 enzima na presença de Pb ao longo de 24 horas de exposição. As alterações decorrentes da inibição da
19 atividade da ALA-D são mais perceptíveis após exposição crônica ao Pb (Hodson et al., 1980), como
20 verificado em animais residentes de áreas contaminadas (Schmitt et al., 2007; Lombardi et al., 2010). A
21 exposição ao Pb, pode também ocasionar a morte prematura das células sanguíneas (James et al.,
22 1993), acarretando em extravasamento de íons com consequente alteração de suas concentrações no
23 plasma. Alterações desta natureza foram verificadas no estudo de Ribeiro et al. (2014), no entanto, não
24 foram associadas com a morte de células sanguíneas uma vez que os parâmetros hematológicos
25 mantiveram-se inalterados. Embora seja possível que o Pb promova alterações morfológicas nos
26 eritrócitos de teleósteos após exposição aguda (Serezli et al., 2011), a concentração de hemoglobina, o
27 número e o volume dos eritrócitos, parecem não sofrer influência deste metal em um curto espaço de
28 tempo, já que também a espécie *O. mykiss* não apresentou alterações hematológicas após exposição
29 (Rogers et al., 2003) ou ingestão de Pb (Alves et al., 2006) em 96 h.

30 Além disso, parâmetros hematológicos são marcadores pouco específicos da presença de
31 contaminantes, podendo também responder a outros fatores como doenças ou perturbações

1 ambientais (Van der Oost et al., 2003). Haja vista que alterações temporais foram encontradas nos
2 parâmetros sanguíneos de *P. lineatus* após 3 ou 12 h de exposição à água sem Pb, podendo ser
3 decorrentes do estresse de manipulação na montagem dos experimentos, ou do confinamento
4 resultante do menor volume do aquário. Roch e Bogé (1996) entenderam que modificações bruscas dos
5 fatores ambientais normais podem gerar uma reação de estresse capaz de promover alterações no
6 conteúdo de hemoglobina e no hematócrito após poucos minutos. O aumento do hematócrito
7 verificado em três horas de experimentação em ambas as condições pode ter duas causas básicas,
8 liberação de mais eritrócitos na corrente sanguínea, ou inchaço das células. Com base na estabilidade do
9 número de eritrócitos circulantes ao longo do tempo, verificados através da contagem de RBC, exclui-se
10 a primeira possibilidade. Val et al. (1998) mostraram que o inchaço de eritrócitos de algumas espécies
11 de teleosteos pode ocorrerem resposta à presença de hormônios adrenérgicos, por meio da estimulação
12 do trocador Na^+/H^+ , que tem como consequência o aumento do influxo de sódio para estas células. Por
13 outro lado, o conteúdo de Hb pode ser aumentado pelo estresse de manuseio, como mostraram Beyea
14 et al. (2005) para *Acipenser brevirostrum* a partir de 6 h após a manipulação. A partir destes dados é
15 possível inferir que alguns parâmetros de *P. lineatus* podem sofrer variações decorrentes do manejo, e
16 que devem ser dissociadas da presença de poluentes. Evidenciando, desta forma, a importância de
17 aplicar sempre a presença de um grupo controle sob as mesmas condições de manuseio, para eliminar a
18 possibilidade de conferir ao poluente as alterações de parâmetros fisiológicos decorrentes de variações
19 naturais em resposta ao estresse de manejo.

20 Da mesma forma, a dosagem do cortisol plasmático permitiu verificar que os animais expostos
21 somente à água apresentaram uma variação temporal dos níveis deste hormônio. Possivelmente esta
22 variação esteja mais relacionada com a manutenção dos níveis glicêmicos dos animais durante o período
23 de jejum (Mommsen et al. 1999; Ramesh et al., 2009), do que com uma resposta de estresse à
24 manipulação, visto que a amplitude das alterações é bastante discreta frente aos dados reportados pelo
25 trabalho de Nascimento et al. (2012), que registrou a ocorrência de liberação de grandes quantidades de
26 cortisol em *P. lineatus* após estresse aéreo. Porém, esta mesma variação não foi verificada nos animais
27 expostos ao Pb, sugerindo uma interferência do metal na secreção deste hormônio. Nascimento et al.
28 (2012) descreveram também que o cobre e o herbicida Atrazina atuam como disruptores endócrinos
29 inibindo a resposta de estresse em *P. lineatus*. De forma semelhante, compostos a base de petróleo
30 (Simonato et al., 2008) e herbicidas (Navarro e Martinez, 2014) também provocaram uma inibição da
31 secreção de cortisol nesta mesma espécie após exposição aguda. Uma ampla gama de contaminantes
32 são descritos como disruptores endócrinos (Colborn et al., 1993; Ankley et al., 2009), mas, os relatos de

1 que o Pb esteja entre eles abrangem, mais frequentemente, outros grupos de animais (Hirsch et al.,
2 2010; Georgescu et al., 2011). Além disso, existem relatos de que o Pb seja capaz de promover a
3 secreção de cortisol em teleostes dulcícolas mais tardiamente, após alguns dias de exposição (Rogers
4 et al., 2003; Ramesh et al., 2009). Barton (2002) defende que apenas a medida do cortisol plasmático
5 pode não refletir o grau de estresse experimentado por um peixe, já que representa uma medida
6 instantânea de um processo dinâmico que pode ter tido início em um tempo desconhecido, que
7 antecede o momento da amostragem. Assim, a análise periódica da concentração de cortisol durante as
8 primeiras 24 horas de exposição ao Pb, permitiu identificar sua interferência sobre a secreção deste
9 hormônio no tocante à manutenção homeostática da glicemia.

10 Em contrapartida, a elevação da glicemia atestada nos peixes expostos ao Pb a partir da 6ª hora
11 de exposição contrapõe-se à hipótese que sugere a presença do cortisol como fator desencadeante da
12 hiperglicemia em *P. lineatus* expostos ao Pb (Martinez et al., 2004; Almeida et al., 2005, Ribeiro et al.,
13 2014). Outra hipótese para esta resposta hiperglicêmica pode ser associada ao sistema nervoso
14 autônomo ou aos altos níveis de lactato plasmático encontrados nos animais expostos ao Pb a partir de
15 12 h, que estaria ligada a ocorrência de hipóxia metabólica, promovida por uma limitação no
16 suprimento de oxigênio para todo o organismo (Chowdhury et al., 2004). Deste modo há um desvio na
17 via de metabolização do piruvato em todas as células, que deixa de suprir a via aeróbica, e, na ausência
18 de oxigênio, passa a integrar a síntese energética através da respiração anaeróbica, formando lactato
19 como produto final. O aumento da concentração de hemoglobina nas células sanguíneas sinaliza, muitas
20 vezes, uma situação de hipóxia (Affonso et al., 2003), onde a demanda tecidual por oxigênio é fator
21 desencadeante para uma maior produção de hemoglobina. Caso esta hipótese seja verdadeira, poderia-
22 se afirmar que o estímulo para o aumento da produção desta proteína esteve presente em ambos os
23 tratamentos, e que, enquanto esta estratégia foi eficiente para os animais submetidos à situação CTR,
24 nos peixes expostos ao Pb a eficácia não foi 100% atingida. A ocorrência de aumento na concentração
25 de lactato plasmático após 12 h de exposição sugere a ocorrência de hipóxia metabólica, indicando que
26 a presença do metal esteja, de alguma forma, interferindo na distribuição de oxigênio de tal maneira
27 que, como forma alternativa, o organismo recorra à via anaeróbica para a produção de energia (Affonso
28 et al., 2003). Na mesma linha, Navarro e Martinez (2014) sugerem que a elevação do lactato plasmático
29 em *P. lineatus* mantido por 24 h em água contaminada por um herbicida esteja relacionada com uma
30 situação de hipóxia, onde o animal lança mão de processos anaeróbicos para suprir a demanda
31 energética.

1 O aumento do lactato plasmático também pode estar associado à redução da atividade da
2 acetilcolinesterase muscular nos mesmos períodos de experimento. A interferência do Pb na atividade
3 colinesterásica no músculo indica que esteja ocorrendo uma hiperestimulação deste tecido, exigindo
4 uma grande quantidade de energia e oxigênio. Ainda que as trocas gasosas no tecido branquial
5 estivessem eficientes, o fornecimento de oxigênio, neste caso, poderia ser insuficiente para suprir a
6 demanda. A fonte mais provável de energia para o tecido muscular é o glicogênio armazenado no
7 próprio tecido (Milligan, 1996; Hemre et al., 2002), uma vez que análises apontam para uma maior taxa
8 de depleção do glicogênio muscular de peixes que foram expostos ao Pb (Shamsi, 2014). Em situações
9 como esta, o organismo lança mão de ajustes metabólicos desviando a via glicolítica da cadeia de
10 fosforilação oxidativa, para a fermentação láctica, produzindo lactato como produto final (Milligan,
11 1996). Para manter estável o pH das células musculares, o lactato, produzido em grande quantidade, é
12 eliminado para o sangue (Milligan, 1996) e metabolizado no fígado (Milligan, 1996; Hemre et al., 2002;
13 Enes et al., 2009) ou no rim (Hemre et al., 2002), onde servirá de substrato para a formação de glicose
14 pela via neoglicogênica (Hemre et al., 2002; Enes et al., 2009), através do aumento da atividade
15 reversível da lactato-desidrogenase (Vijayan et al., 1997). A glicose recém-formada nas células hepáticas
16 pode retornar ao sangue para suprir a demanda do tecido nervoso. Portanto, a elevação simultânea de
17 glicose e lactato pode ser resultado de uma via alternativa de produção energética associada ao esforço
18 físico intenso. Desta forma, o aumento da glicose e do lactato sanguíneos em *P. lineatus* expostos ao Pb,
19 constituem respostas secundárias de estresse que neste caso não devem estar diretamente ligadas a
20 alterações hormonais (Barton, 2002).

21 Apesar dos resultados encontrados para *P. lineatus* apresentarem uma grande flutuação ao
22 longo de 24 h, a sensibilidade da AChE para o Pb é suportada por estudos *in vitro* que mostram uma
23 resposta dose-dependente de acordo com a espécie (Rabitto et al., 2005; de Lima et al., 2013). Os peixes
24 são capazes de promover adaptações frente a alterações na atividade da AChE (Pretto et al., 2010),
25 desta feita, um padrão estereotipado de respostas pode não ser comum para todas as espécies (Nunes
26 et al., 2014). Variações da atividade colinesterásica frente à exposição a diferentes espécies metálicas
27 também foram descritas para o molusco *Perna perna* ao longo de alguns dias de experimento (Najimi et
28 al., 1997). O decréscimo na atividade da AChE culmina em alterações comportamentais na habilidade
29 natatória (Payne et al., 1996; Van der Oost et al., 2003; Silva, 2013), respiratória e capacidade de
30 tomada de alimento (Payne et al., 1996), podendo causar desordens de modo a comprometer a
31 sobrevivência da espécie.

1 A redução na atividade da acetilcolinesterase no tecido muscular após a exposição ao Pb indica a
2 ocorrência de uma estimulação excessiva dos nervos colinérgicos, culminando em esforço muscular
3 excessivo (Silva, 2013). Por muito tempo, alterações na atividade da AChE foram atribuídas à presença
4 de compostos orgânicos (Payne et al., 1996; Van der Oost et al., 2003), porém, recentemente diversos
5 trabalhos vem demonstrando que a presença de metais na água também podem desencadear os
6 mesmos efeitos sobre sua atividade (Rabitto et al., 2005; Pretto et al., 2010; Richetti et al., 2011; Mager,
7 2012; de Lima et al., 2013; Silva, 2013). A redução da atividade colinesterásica frequentemente está
8 mais associada a alterações na conformação da enzima (Richetti et al., 2011) ou interação do poluente
9 com os sítios ativos (Najimi et al., 1997; Pretto et al., 2010), do que com sua expressão gênica (Richetti
10 et al., 2011).

11 Para evitar que os efeitos deletérios do Pb de alastrem por todos os órgãos, alguns tecidos são
12 capazes de produzir proteínas de defesa, de baixo peso molecular, cuja função é se ligar aos metais
13 excedentes, essenciais ou não, as metalotioneínas (MT). O Pb é considerado um fraco indutor de MT
14 quando comparado com outros metais como cobre, zinco e cádmio (Campana et al., 2003; Atli e Canli,
15 2008; de Boeck et al., 2010), que têm uma maior afinidade pelos grupamentos sulfidril desta proteína. O
16 aumento da MT em decorrência da presença de metais, geralmente está associada ao aumento de
17 metal acumulado no mesmo órgão (Cicik et al., 2004), entretanto, neste experimento, o fígado dos
18 animais expostos ao Pb, apenas apresentou um aumento significativo de acúmulo em 24 h de exposição,
19 enquanto a dosagem de PSMT apontou para um aumento de sua concentração a partir da 12^a hora.
20 Existem relatos de que o Pb não seja capaz de promover alterações no conteúdo de MT em diversos
21 tecidos (Atli e Canli, 2008), porém, Monteiro et al. (2011) mostraram que o conteúdo de MT no fígado
22 de *P. lineatus* aumentou após 6 e 24 h de exposição a concentrações de Pb próximas às testadas neste
23 trabalho. Outros trabalhos de nosso laboratório demonstraram a sensibilidade da MT hepática,
24 branquial e muscular nesta espécie frente à metais, como o níquel (Palermo, 2012) e o cádmio (Silva,
25 2013). Assim como Carvalho et al. (2004), que encontraram concentrações hepáticas de MT elevadas
26 após exposição de *P. scrofa* (= *lineatus*) ao cobre. De qualquer forma, os resultados encontrados para o
27 conteúdo de PSMT no fígado desta espécie de teleósteo após exposição ao Pb fornecem evidências de
28 que a resposta na síntese destas proteínas seja tempo-dependente, assim como sugere Campana et al.
29 (2003).

30 Por outro lado, a análise de PSMT no rim posterior demonstrou que este tecido não foi capaz de
31 responder da mesma maneira à presença do Pb. Da mesma forma, Ariyoshi et al. (1990) e Campana et

1 al. (2003) não registraram alteração do conteúdo de MT no tecido renal de teleósteos dulcícolas após a
2 exposição ao mesmo metal. Havendo ainda um registro de decréscimo da quantidade de PSMT renal
3 após 5 dias de experimento, neste segundo trabalho. Apesar de este estar entre os órgãos com maior
4 capacidade de retenção de Pb nas primeiras 24 horas de exposição, verificou-se aqui também uma
5 tendência de decréscimo do conteúdo dessas proteínas. Desta feita, conclui-se que, muito
6 provavelmente, a retenção de Pb no tecido renal de *P. lineatus* expostos ao Pb esteja mais associada à
7 presença dos corpos de inclusão (Patel et al., 2006) ou à grande quantidade de canais e carreadores com
8 alta afinidade por este metal (Alves e Wood, 2006; Patel et al., 2006; Dai et al., 2012), do que à
9 capacidade de síntese de MT pelas células renais. Em suma, embora a análise de PSMT no tecido
10 hepático tenha sido eficaz para acusar uma resposta à presença de Pb, não se recomenda a sua
11 aplicação isolada para estudos de biomonitoramento (Campana et al., 2003), uma vez que muitos
12 fatores podem influenciar sua resposta.

13 Em resumo, este estudo traz evidências que o Pb interfere no estado metabólico do peixe *P.*
14 *lineatus* como resultado da neurotoxicidade, podendo ainda provocar disfunção endócrina. Ainda que a
15 concentração de Pb se eleve no sangue, alterações nos parâmetros hematológicos em decorrência do
16 metal não foram verificadas nas primeiras 24 h de exposição. A capacidade de síntese de MT diferiu
17 entre os órgãos de *P. lineatus* após exposição ao chumbo, e parece não estar diretamente relacionada à
18 concentração tecidual de metal. O rim posterior foi o primeiro órgão a acumular chumbo, e apresentou
19 as maiores concentrações do metal após 24 h de exposição, seguido pelo fígado e células sanguíneas, e
20 pelo tecido muscular.

21

22 **IV. 4 Referências Bibliográficas**

23 Affonso EG, Polez VLP, Correa CF, Mazon AF, Araujo MRR, Moraes G, Rantin FT, 2003. Blood parameters
24 and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia. Comp.
25 Biochem. Physiol. 133C, 375–382.

26 Almeida JS, Meletti PC, Martinez CBR, 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on
27 physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp.
28 Biochem. Physiol. 140C, 356-363.

29 Alves LC, Glover CN, Wood CM, 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout
30 (*Oncorhynchus mykiss*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 615-625.

- 1 Alves LC, Wood CM, 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout
2 (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.* 78, 217-232.
- 3 Alves-Costa JRM, Mela M, Silva de Assis HC, Pelletier E, Randi MAF, Oliveira Ribeiro CA, 2007. Enzymatic
4 inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or
5 methylmercury. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 67, 82–88.
- 6 Ankley GT, Bencic DC, Breenc MS, Collette TW, Conollyc RB, Denslowe ND, Edwards SW, Ekmand DR,
7 Garcia-Reyeroe N, Jensena KM, Lazorchak JM, Martinovic´ D, Miller DH, Perkins EJ, Orlando EF,
8 Villeneuvea DL, Wang RL, Watanabe KH, 2009. Endocrine disrupting chemicals in fish: Developing
9 exposure indicators and predictive models of effects based on mechanism of action. *Aquat. Toxicol.*
10 92, 168–178.
- 11 Ariyoshi T, Shiiba S, Hasegawa H, Arizono K, 1990. Profile of metal-binding proteins and hemeoxygenase
12 in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44,
13 643–649.
- 14 Atli G, Canli M, 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish
15 *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 33-38.
- 16 ATSDR - Agency for Toxic Substance and Disease Registry. 2007. Toxicological Profile for Lead, U.S.
17 Department of Health and Humans Services, Public Health Service, Centres for Diseases Control,
18 Atlanta, GA.
- 19 Ay Ö, Kalay M, Tamer L, Canli M, 1999. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish
20 *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62,
21 160-168.
- 22 Barton BA, 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in
23 circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517-525.
- 24 Bergdahl IA, Shaveleva M, Schütz A, Artamonova VG, Skerfving S, 1998. Plasma and blood lead in
25 humans: capacity-limited binding to d-aminolevulinic acid dehydratase and other lead-binding
26 components. *Toxicol. Sci.* 46, 247-253.
- 27 Beyea MM, Benfey TJ, Kieffer JD, 2005. Hematology and stress physiology of juvenile diploid and triploid
28 shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Fish. Physiol. Biochem.* 31, 303-313.
- 29 Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of
30 protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

- 1 Campana O, Sarasquete C, Blasco J, 2003. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and
2 lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicol.*
3 *Environ. Saf.* 55, 116–125.
- 4 Canli M, Atli G, 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size
5 of six Mediterranean fish species. *Environ. Pollut.* 121, 129-136.
- 6 Carvalho CS, Araujo HSS, Fernandes MN, 2004. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*)
7 exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comp. Biochem. Physiol.* 137B, 225-234.
- 8 Chowdhury MJ, Pane EF, Wood CM, 2004. Physiological effects of dietary cadmium acclimation and
9 waterborne cadmium challenge in rainbow trout: respiratory, ionoregulatory, and stress parameters.
10 *Comp. Biochem. Physiol.* 139C, 163–173.
- 11 Cıcık B, Ay Ö, Karayakar F, 2004. Effects of lead and cadmium interactions on the metal accumulation in
12 tissue and organs of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 141-
13 148.
- 14 Colborn T, vom Saal FS, Soto AM, 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in
15 wildlife and humans. *Environ. Health Persp.* 101, 378-384.
- 16 Dai W, Liu S, Fu L, Du H, Xu Z, 2012. Lead (Pb) accumulation, oxidative stress and DNA damage induced
17 by dietary Pb in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* 43, 208–214.
- 18 de Boeck G, Eyckmans M, Lardon I, Bobbaers R, Sinha AK, Blust R, 2010. Metal accumulation and
19 metallothionein induction in the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol.*
20 155A, 503–508.
- 21 de Lima D, Roque GM, Almeida EA, 2013. *In vitro* and *in vivo* inhibition of acetylcholinesterase and
22 carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*). *Mar. Environ. Res.* 91, 45-51.
- 23 Ellman GL, Courtney KD, Andres VJr, Featherstone RM, 1961. A new and rapid colorimetric
24 determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88-95.
- 25 Enes P, Panserat S, Kaushik S, Oliva-Teles A, 2009. Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism
26 in fish. *Fish. Physiol. Biochem.* 35, 519–539.
- 27 Georgescu B, Georgescu C, Dărăban S, Bouaru A, Pașcalău S, 2011. Heavy metals acting as endocrine
28 disrupters. *Anim. Sci. Biotechnol.* 44, 89-93.
- 29 Grosell M, Gerdes R, Brix KV, 2006. Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity
30 in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 143C,
31 473-483.

- 1 Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl A, 2002. Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose
2 metabolism and hepatic enzymes. *Aquacult. Nutr.* 8, 175-194.
- 3 Hirsch HVB, Possidente D, Possidente B, 2010. Pb²⁺: An endocrine disruptor in *Drosophila*? *Physiol.*
4 *Behav.* 99, 254–259.
- 5 Hodson PV, Blunt BR, Whittle DM, 1980. Biochemical monitoring of fish blood as an indicator of
6 biologically available lead. *Thalassia. Jugoslavica.* 16, 389-396.
- 7 Huang ZW, Zhang O, Chen J, Zhuang ZX, Wang XR, 2007. Bioaccumulation of metals and induction of
8 metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium,
9 mercury and lead. *Appl. Organomet. Chem.* 21, 101-107.
- 10 James R, Alagurathinam S, Sampath K, 1993. Haematological changes and oxygen consumption on
11 *Oreochromis mossambicus* exposed to sublethal concentrations of lead. *Indian. J. Fish.* 40, 193-196.
- 12 Klavins M, Potapovics O, Rodinov V, 2009. Heavy metals in fish from lakes in Latvia: concentrations and
13 trends of changes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 96-100.
- 14 Kutlu M, Sümer S, 2008. Some biochemical properties of δ -aminolevulinic acid dehydratase in
15 *Gammarus pulex*. *Food. Chem. Toxicol.* 46, 115-118.
- 16 Liu J, Goyer RA, Waalkers MP, 2008. Toxic effects of metals. In: Klaassen CD (Ed.) Casarett and Doull's
17 *Toxicology. The basic science of poisons.* 7^a ed., McGraw-Hill, New York. pp. 931–980.
- 18 Locke LN, Bagley GE, Irby HD, 1966. Acid-fast intranuclear inclusion bodies in the kidneys of mallards fed
19 lead shot. *Bull. Wildl. Dis. Assoc.* 2, 127-131.
- 20 Lombardi PE, Peri SI, Guerrero NRV, 2010. ALA-D and ALA-D reactivated as biomarkers of lead
21 contamination in the fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73, 1704–1711.
- 22 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurements with the folin phenol
23 reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 24 Mager EM, 2012. Lead. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ, (Eds.) *Homeostasis and toxicology of non-*
25 *essential metals. Fish Physiology series v. 31B.* Academic Press, London. pp 185–236.
- 26 Martinez CBR, Nagae MY, Zaia CTBV, Zaia DAM, 2004. Acute morphological and physiological effects of
27 lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64, 797-807.
- 28 Milligan CL, 1996. Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout. *Comp. Biochem.*
29 *Physiol.* 113A, 51-60.
- 30 Mommsen TP, Vijayama MM, Moon TW, 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and
31 metabolic regulation. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 9, 211-268.

- 1 Monteiro V, Cavalcante DGSM, Viléla MBFA, Sofia SH, Martinez CBR, 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures
2 for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus*
3 *lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291–298.
- 4 Moore J, Goyer RA, 1974. Induced-lead inclusion bodies: composition and probable role in lead
5 metabolism. *Environ. Health. Perspect.* 7, 121-127.
- 6 Najimi S, Bouhaimi A, Daubèze M, Zekhnini A, Pellerin J, Narbonne JF, Moukrim A, 1997. Use of
7 acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in
8 Agadir marine Bay (south of Marocco). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 901-908.
- 9 Nascimento CRB, Souza MM, Martinez CBR, 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress
10 response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 155C, 456-461.
- 11 Navarro CDC, Martinez CBR, 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic,
12 biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comp.*
13 *Biochem. Physiol.* 165C, 83–90.
- 14 Nunes B, Capela RC, Sérgio T, Caldeira C, Gonçalves F, Correia AT, 2014. Effects of chronic exposure to
15 lead, copper, zinc, and cadmium on biomarkers of the European eel, *Anguilla anguilla*. *Environ. Sci.*
16 *Pollut. Res.* 21, 5689-5700.
- 17 Nussey G, Van-Vuren JHJ, Preez HH, 2000. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in
18 the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water SA.*
19 26, 269-284.
- 20 Palaniappan PR, Krishnakumar N, Vadivelu M, 2009. Bioaccumulation of lead and the influence of
21 chelating agents in *Catla catla* fingerlings. *Environ. Chem. Lett.* 7, 51-54.
- 22 Palermo FF, 2012. Bioacumulação e efeitos do níquel em um peixe neotropical. Dissertação (Programa
23 de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 73p.
- 24 Paquin PR, Santore RC, Wu KB, Kavvada CD, Di Toro DM, 2000. The biotic ligand model: a model of the
25 acute toxicity of metals to aquatic life. *Environ. Sci. Policy.* 3, S175–S182.
- 26 Patel M, Rogers JT, Pane EF, Wood CM, 2006. Renal responses to acute lead waterborne exposure in the
27 freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 80, 362-371.
- 28 Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL, 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new
29 future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar.*
30 *Pollut. Bull.* 32, 225-231.

- 1 Pretto A, Loro VL, Morsch VM, Moraes BS, Menezes C, Clasen B, Hoehne L, Dressler V, 2010.
2 Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia*
3 *quelen*) exposed to cadmium. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58, 1008–1014.
- 4 Rabitto IS, Alves Costa JRM, Silva de Assis HC, Pelletier E, Akaishi FM, Anjos A, Randi MAF, Oliveira
5 Ribeiro CA, 2005. Effects of dietary Pb(II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*:
6 histopathological and biochemical findings. Ecotoxicol. Environ. Saf. 60, 147–156.
- 7 Ramesh M, Saravanan M, Kavitha C, 2009. Hormonal responses of the fish, *Cyprinus carpio*, to
8 environmental lead exposure. Afr. J. Biotechnol. 8, 4154-4158.
- 9 Ribeiro AM, Risso WE, Fernandes MN, Martinez CBR, 2014. Lead accumulation and its effects on the
10 branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. Fish. Physiol. Biochem. 40, 645-657.
- 11 Richetti SK, Rosemberg DB, Ventura-Lima J, Monserrat JM, Bogo MR, Bonan CD, 2011.
12 Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal
13 exposure. Neurotoxicol. 32, 116–122.
- 14 Roch H, Bogé G, 1996. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by
15 environmental factors and chemical intoxication. Mar. Environ. Res. 41, 27-43.
- 16 Rogers JT, Richards JG, Wood CM, 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead
17 in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 64, 215-234.
- 18 Rogers JT, Wood CM, 2004. Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater
19 rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol. 207, 813-825.
- 20 Schmitt CJ, Whyte JJ, Roberts AP, Annis ML, May TW, Tillitt DE, 2007. Biomarkers of metals exposure in
21 fish from lead–zinc mining areas of southeastern Missouri, USA. Ecotoxicol. Environ. Saf. 67, 31–47.
- 22 Serezli R, Akhan S, Delihasan-Sonay F, 2011. Acute effects of copper and lead on some blood parameters
23 on Coruh trout (*Salmo coruhensis*). Af. J. Biotechnol. 10, 3204-3209.
- 24 Shamsi MJK, 2014. Ecotoxicology: effect of acute and sub chronic exposure to heavy metals (lead and
25 nickel) and its impact on carbohydrate metabolism (glycogen) in freshwater fish species from Saudi
26 Arabia. Asian. J. Sci. Technol. 5, 332-334.
- 27 Silva AOF, 2013. Exposição aguda do teleósteo *Prochilodus lineatus* ao cádmio: bioacumulação, efeitos
28 genotóxicos, bioquímicos, fisiológicos e comportamentais. Tese de doutorado – Programa
29 Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Brasil.
- 30 Simonato JD, Guedes CLB, Martinez CBR, 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in
31 the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotoxicol. Environ. Saf. 69, 112–120.

- 1 Skerfving S, Bergdahl IA, 2007. Lead. In: Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, (Eds.)
2 Handbook on the toxicology of metals. 3^a ed., Elsevier, Amsterdam. pp. 599-643.
- 3 Terra BF, Araújo FG, Calza CF, Lopes RT, Teixeira TP, 2008. Heavy metal in tissues of three fish species
4 from different trophic levels in a tropical brazilian river. Water. Air. Soil. Pollut. 187, 275-284.
- 5 Val AL, Menezes GC, Wood CM, 1998. Red blood cell adrenergic responses in Amazonian teleosts. J. Fish.
6 Biol. 52, 83–93.
- 7 Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental
8 risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.
- 9 Viarengo A, Burlando B, Cavaletto M, Marchi B, Ponzano E, Blasco J, 1999. Role of metallothionein
10 against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Am. J. Physiol. 277, 1612-1619.
- 11 Vijayan MM, Pereira C, Grau EG, Iwama GK, 1997. Metabolic responses associated with confinement
12 stress in tilapia: the role of cortisol. Comp. Biochem. Physiol. 116C, 89–95.
- 13 Vinodhini R, Narayana M, 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus*
14 *carpio* (Common carp). Int. J. Environ. Sci. Tech. 52, 179-182.
- 15 Yabe MJS, Oliveira E, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de
16 bacias hidrográficas. Quim. Nova. 21, 551-556.
- 17 Yamaguchi S, Miura C, Ito A, Agusa T, Iwata H, Tanabe S, Tuyen BC, Miura T, 2007. Effects of lead,
18 molybdenum, rubidium, arsenic and organochlorines on spermatogenesis in fish: Monitoring at
19 Mekong Delta area and in vitro experiment. Aquat. Toxicol. 83, 43–51.

1 **Capítulo V: Efeitos agudos do chumbo sobre a osmorregulação de *Prochilodus lineatus*: atividade**
2 **enzimática e íons plasmáticos.**

3 Nesta seção estão descritos as análises, resultados e discussão referentes à avaliação dos efeitos do
4 chumbo (Pb) sobre a atividade de enzimas associadas à osmorregulação em brânquia e rim, e na
5 concentração osmótica e de íons no plasma do peixe *P. lineatus* ao longo de 24 horas de exposição.

6

7 **V. 1 Material e métodos**

8

9 **a. Análises osmoiolônicas**

10 Após a finalização dos experimentos, as amostras de sangue foram centrifugadas (1870 g, 10
11 min – MCD2000, Hsiangtai, Taiwan), para a separação do plasma, que foi armazenado a -20° C até a
12 ocasião das análises. As amostras de plasma foram utilizadas para análise da concentração osmótica e
13 de sódio (Na⁺), potássio (K⁺), cloreto (Cl⁻), cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺). A osmolalidade plasmática foi
14 avaliada em osmômetro de congelamento (Osmomat 030, Gonotec, Alemanha). O plasma foi diluído
15 (100x) em água deionizada para a análise dos íons Na⁺ e K⁺ em fotômetro de chama (DM-62, Digmed,
16 Brasil). A análise de Cl⁻ foi feita pelo método do tiocianato de mercúrio, com auxílio de kit comercial
17 (Labtest, Brasil), e a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Victor³, PerkinElmer,
18 USA) a 490 nM. Os íons Ca²⁺ e Mg²⁺ foram quantificados a partir de amostras de plasma diluídas (50x)
19 em modificador óxido de lantânio (La₂O₃ – 0,1%) em EAA (AAnalyst 700, PerkinElmer, EUA), na chama, e
20 calculadas com base em uma curva construída a partir de padrões certificados (Specsol - Ca²⁺: 0,5–10,0
21 mg.L⁻¹, Mg²⁺: 0,2–1,0 mg.L⁻¹).

22

23 **b. Atividade enzimáticas**

24 *Na⁺/K⁺-ATPase e H⁺-ATPase*

25 As amostras de rim posterior e brânquias utilizadas para análise da Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) e H⁺-
26 ATPase foram armazenadas, no momento da amostragem, em tubos plásticos contendo tampão SEI
27 (Sacarose 150 mM, EDTA 10 mM, Imidazol 50 mM, pH 7,5) e guardadas em “ultrafreezer” (-70° C). O
28 tecido renal (1:10 p:v) e filamentos branquiais (1:5 p:v) foram homogeneizados com o tampão SEI

1 contendo deoxicolato de Na^+ (2,4 mM), e centrifugados (7500 g, 15 min, 4° C), e o sobrenadante foi
2 utilizado para a análise das enzimas, a partir de adaptações do protocolo estabelecido por Gibbs e
3 Somero (1989) e padronizado para microplacas (Silva e Martinez, 2014). A concentração de proteínas
4 totais foi determinada no sobrenadante para posterior diluição de modo a normalizar a concentração
5 protéica em 1 mg.mL^{-1} . A atividade das bombas foi mensurada através da diferença no declínio da
6 absorbância em meio de reação (ATP 1 mM, NADH 0,2 mM, piruvato quinase 3 U.mL^{-1} , lactato
7 desidrogenase 2 U.mL^{-1} , frutose, 1, 6, difosfato 0,1 mM, fosfoenol-piruvato 2 mM, pH 9,0), contendo N-
8 etilmaleimida (NEM - 2 mM, inibidor da H^+ -ATPase), ouabaína (2 mM, inibidor da NKA), ou sem
9 inibidores (atividade total das ATPases) em decorrência da quebra de ATP e consequente formação de
10 ADP. A absorbância das amostras, em quadruplicata, foi medida a cada minuto durante 15 minutos (340
11 nm – Victor³, PerkinElmer, USA), e a atividade ATPásica em cada condição foi determinada através da
12 seguinte fórmula: $\{(\text{inclinação} \cdot \text{coeficiente de extinção})/([\text{Proteínas}] \cdot \text{diluição}) \cdot \text{tempo}/1000\}^{-1}$. A atividade
13 da NKA foi calculada pela diferença dos meios contendo ou não ouabaína, e da H^+ -ATPase, pela
14 diferença dos meios com e sem NEM, e expressas em $\mu\text{mol ADP.mg ptn}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

15

16 *Anidrase carbônica*

17 A atividade da anidrase carbônica no tecido renal e nos filamentos branquiais foi determinada
18 segundo Vitale et al. (1999). Para tanto, os tecidos foram homogeneizados (1:10 p:v) em tampão
19 (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, tris-base 10 mM, NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,4) e centrifugados (7500 g,
20 15 min, 4° C). Para análise da atividade da anidrase carbônica foi adicionado ao sobrenadante água
21 saturada com CO_2 . A atividade catalítica da enzima foi quantificada pela variação do pH, determinada
22 durante 20 s, utilizando-se um pHmetro de bancada (Jenway 3510, EUA). A inclinação da reta gerada
23 pela queda do pH ao longo do tempo forneceu a taxa de reação catalisada (TC) e a taxa de reação não-
24 catalisada (TNC) foi obtida pela leitura do pH na ausência de amostra, substituindo-se amostra por
25 tampão. A partir dessas duas medidas a atividade da anidrase carbônica (AC) foi calculada pela fórmula:
26 $\text{AC} = [\text{TC}/\text{TNC} - 1] \cdot \text{mg ptn}^{-1}$.

27 A concentração de proteínas nos tecidos homogeneizados, para a normalização das amostras de
28 NKA e H^+ -ATPase, e para o cálculo da AC, foi determinada segundo método descrito por Lowry e
29 colaboradores (1951), utilizando albumina de soro bovina como referência.

30

1 c. Análises estatísticas

2 Para cada um dos tempos experimentais (1, 2, 3, 6, 12 e 24 h) os resultados de cada parâmetro
3 obtidos para os grupos CTR e Pb foram comparados entre si usando o teste t ou Mann-Whitney. Além
4 disso, os resultados obtidos para cada tratamento (CTR e Pb) também foram comparados entre os
5 tempos experimentais (0, 1, 2, 3, 6, 12 e 24 h), usando análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não
6 paramétrica (KruskalWallis). As diferenças, quando indicadas, foram localizadas pelo teste de
7 comparações múltiplas SNK (paramétrico) ou Dunn's (não paramétrico). O uso da estatística paramétrica
8 ou não paramétrica foi definido dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade
9 de variância). Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

10

11 V. 2 Resultados

12

13 *Osmolalidade e íons*

14 Todos os íons e a osmolalidade mantiveram-se estáveis nos animais que foram expostos somente
15 à água (CTR) no decorrer de todo experimento, não havendo variação temporal estatisticamente
16 significativa em nenhum dos parâmetros apresentados nesta sessão. Porém, a análise desses mesmos
17 parâmetros nos animais expostos ao Pb, quando comparados com seus respectivos CTR, indica que este
18 metal é capaz de interferir nos processos de tomada e/ou retenção de íons, culminando em alterações
19 em quase todos os parâmetros plasmáticos analisados. Houve redução de cerca de 5% na osmolalidade
20 plasmática (Fig. V.1A) (média CTR: $312,6 \pm 2,1$ mOsm.kg⁻¹) dos animais expostos ao Pb após 12 e 24
21 horas (p : 0,038 e 0,026, respectivamente). Possivelmente decorrente da redução de íons plasmáticos
22 como o Na⁺ (Fig. V.1C). O Na⁺ (média CTR: $127,1 \pm 3,3$ mM) aumentou 10% na terceira hora de exposição
23 ($p = 0,035$), mas este efeito foi revertido nos dois tempos amostrais seguintes (6 e 12 h), quando
24 constatou-se redução de até 12% nos níveis de Na⁺ (p : 0,026 e 0,029, respectivamente). Por outro lado,
25 a calcemia (Fig. V.1E) (média CTR: $2,5 \pm 0,13$ mM) de *P. lineatus* expostos ao Pb reduziu cerca de 30% em
26 comparação com seus CTR a partir da primeira hora e esta redução significativa se manteve em todos os
27 tempos subsequentes (p : 1 = 0,005; 2 < 0,001; 3 = 0,002; 6 = 0,001; 12 < 0,001; 24 = 0,001). Enquanto o
28 K⁺ plasmático (Fig. V.1D) (média CTR: $4,4 \pm 0,4$ mM) aumentou em torno de 60% em 12 ($p = 0,011$) e 24
29 horas ($p = 0,046$) de exposição ao Pb, outro íon que apresentou aumento foi o Mg²⁺ (Fig. V.1F), que após
30 manter-se a uma concentração média de $0,89 \pm 0,03$ mM nos animais CTR, elevou-se para $1,02 \pm 0,04$

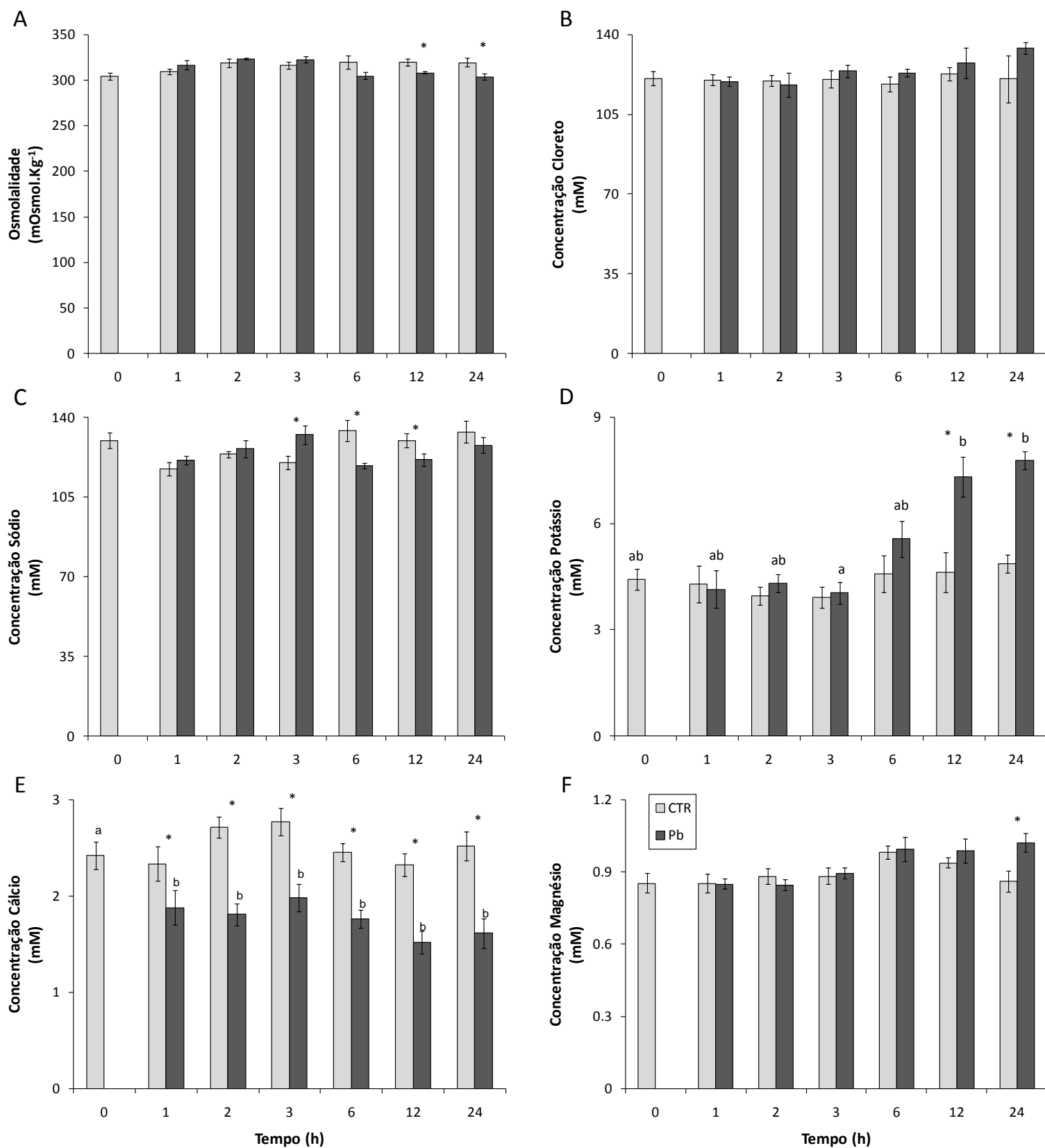


Figura V.1. Parâmetros osmoiônicos (média ± EP) no plasma de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao chumbo pelos tempos de 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Osmolalidade (A), concentrações de cloreto (B), sódio (C), potássio (D), cálcio (E) e magnésio (F) no plasma. Letras minúsculas indicam diferença estatística entre os grupos Pb. * indica diferença entre CTR e Pb de um mesmo tempo ($p < 0,05$).

1 todos os demais parâmetros osmoiônicos, as concentrações de Cl^- (Fig. V.1B) não apresentaram
 2 alteração ao longo das 24 horas de exposição ao Pb, mantendo uma concentração média de $122,1 \pm$
 3 $1,22$ mM em ambos os tratamentos.

4

5 *Enzimas envolvidas na osmorregulação*

6 Os valores absolutos para as atividades enzimáticas renais e branquiais apresentaram-se variáveis
 7 entre os tempos experimentais. Entretanto, a análise entre os tratamentos (CTR x Pb) de um mesmo
 8 tempo experimental apontou a ocorrência de alterações relevantes nas atividades de quase todas as

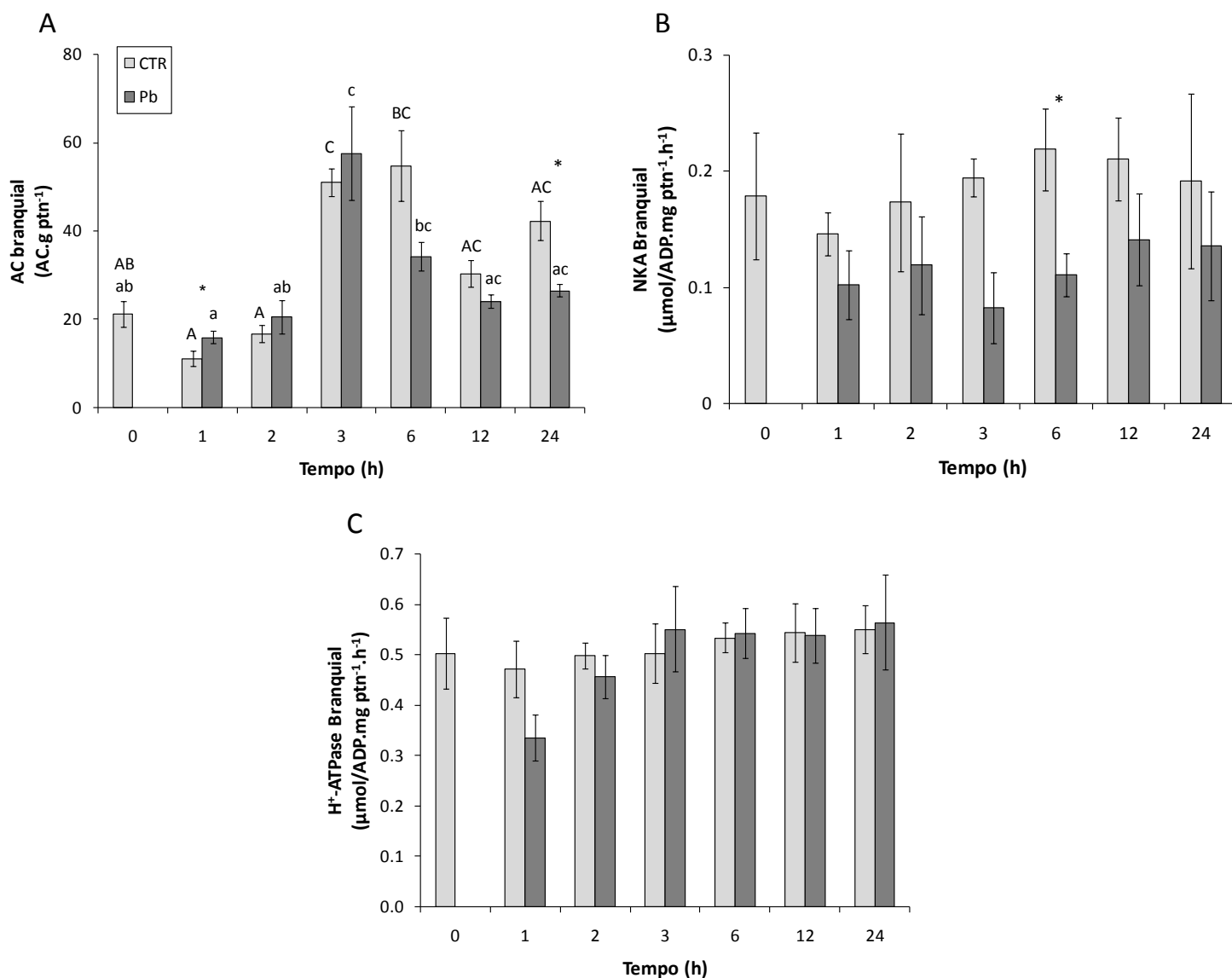


Figura V.2. Atividade (média \pm EP) das enzimas anidrase carbônica (AC) (A), Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (B) e H^+ -ATPase (C) nas brânquias de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao chumbo (Pb) pelos tempos de 0, 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos CTR e letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos Pb. * indica diferença entre CTR e Pb de um mesmo tempo ($p < 0,05$).

1 enzimas analisadas. Após uma elevação transitória na atividade da AC branquial (Fig. V.2A) de mais de
2 40% na primeira hora de exposição ($p = 0,038$), houve uma mudança deste quadro nos tempos seguintes
3 e a atividade da AC dos animais expostos ao Pb não foi significativamente diferente em relação aos
4 respectivos CTR. Porém, no tempo de 24 horas, houve uma redução significativa ($p = 0,019$) de cerca de
5 40% na atividade da AC branquial nos peixes expostos ao Pb, em relação ao respectivo CTR. Apesar de
6 não resultarem em diferenças significativas, observou-se que esta tendência em redução da AC teve
7 início a partir da 6ª h de contato com o poluente. A NKA do epitélio branquial (Fig. V.2B) por outro lado,
8 teve sua atividade significativamente reduzida ($p = 0,014$), em mais de 50% nos animais que ficaram
9 expostos ao Pb por 6 h, embora em todos os demais tempos os peixes expostos ao Pb tenham
10 apresentado uma clara tendência de redução na NKA. Por outro lado, a H⁺-ATPase no tecido branquial
11 dos animais expostos ao Pb (Fig. V.2C) não diferiu de seus CTR ao longo do experimento, e manteve
12 valores, consideravelmente, homogêneos ao longo dos tempos.

13 Já no tecido renal a redução significativa da atividade da AC (Fig. V.3A) foi verificada partir da 6ª
14 hora de exposição ao Pb ($p = 0,04$), quando se constatou um valor 20% menor do que seu CTR. No
15 tempo seguinte (12 h), esta redução foi de 30% ($p = 0,022$), chegando a 75% ($p = 0,02$) após 24 h de
16 exposição ao metal. Os valores encontrados para a atividade da NKA no rim posterior (Fig. V.3B) de *P.*
17 *lineatus* expostos ao Pb foram, em média, 60% menores do que os dos animais CTR desde 1 h de
18 exposição, contudo, devido à variação individual entre os animais de um mesmo grupo, apenas em 24 h
19 de experimento esta redução foi significativa ($p = 0,036$), quando a atividade da NKA nos animais Pb
20 representava apenas 18% daquela dos peixes do grupo CTR. A H⁺-ATPase das células renais (Fig. V.3C)
21 não mostrou indício de alteração até a 3ª hora de experimento, porém, em 6 h de exposição ao Pb, a
22 atividade deste transportador ultrapassou o seu CTR em 56% ($p = 0,016$), mantendo-se ainda elevado no
23 tempo de 12 horas, e chegando a 156% de aumento em 24 h de experimento ($p = 0,015$).

24

25 V. 3 Discussão

26 Os parâmetros físicos e químicos da água mantiveram-se estáveis durante todo o período de
27 aclimatação e de experimentos, indicando que os ensaios laboratoriais proporcionaram as condições
28 necessárias para a validade dos testes. A concentração de Pb total determinada na água dos aquários
29 manteve-se próxima do esperado, refletindo as condições encontradas em ambientes sob influência
30 antrópica (Yabe e Oliveira, 1998; Almeida et al., 2005). Graças às características da água utilizada para os
31 testes toxicológicos, o Pb que permaneceu dissolvido corresponde, em média, a 85% do Pb total

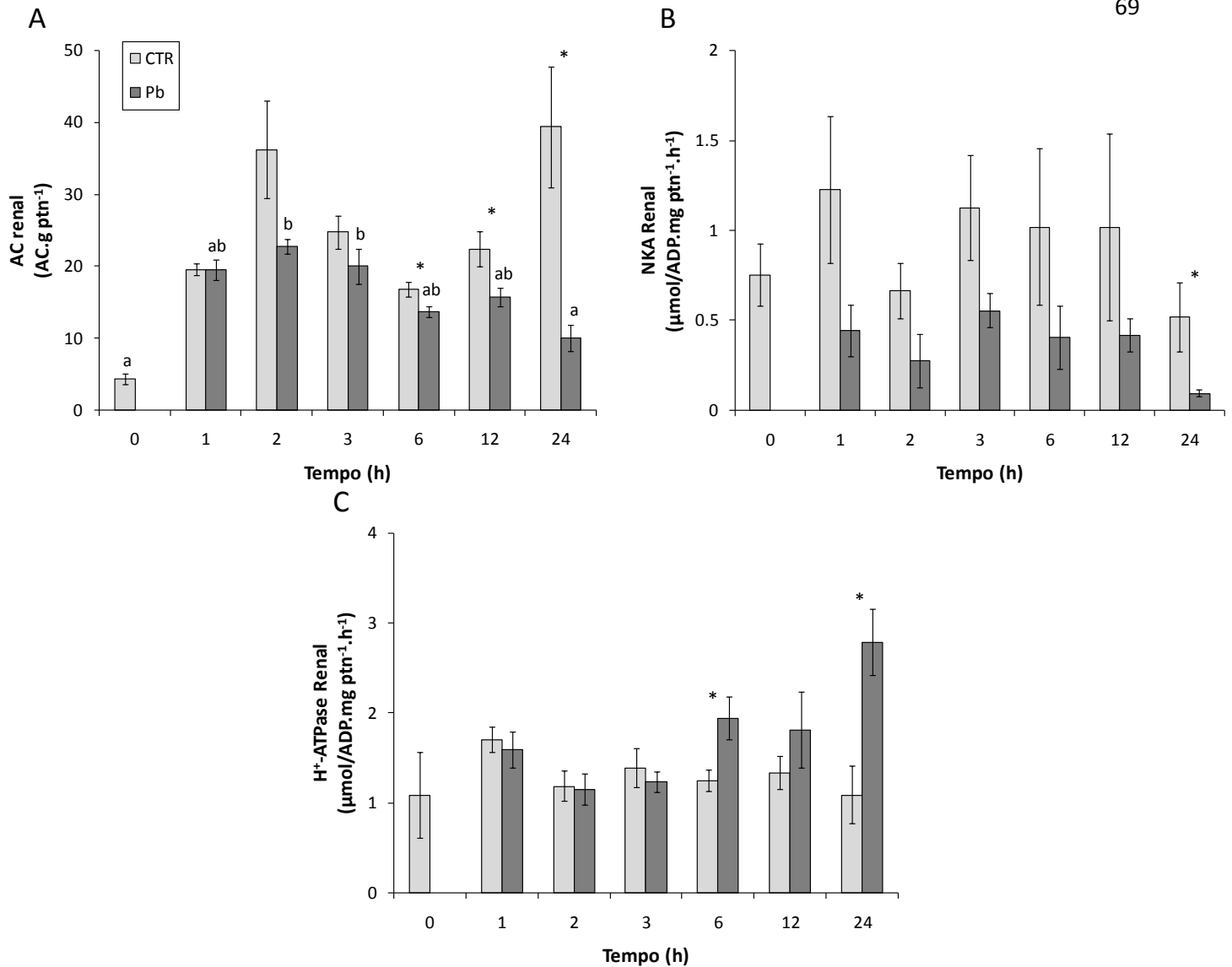


Figura V.3. Atividade (média \pm EP) das enzimas anidrase carbônica (AC) (A), Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (B) e H^+ -ATPase (C) no rim posterior de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao chumbo (Pb) pelos tempos de 0, 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Letras minúsculas diferentes indicam diferença estatística entre os grupos Pb, * indica diferença entre CTR e Pb de um mesmo tempo ($p < 0,05$).

1 adicionado, relacionado à baixa dureza da água, um dos parâmetros mais importantes para a
 2 disponibilização do metal (Paquim et al., 2000). Esta quantidade de metal representa apenas uma
 3 pequena fração da CL_{50} (24 h) relatada para a espécie *Prochilodus lineatus* (Martinez et al., 2004),
 4 porém, outros autores relatam a interferência de concentrações de Pb próximas à concentração
 5 utilizada neste trabalho, nos processos de osmorregulação (Ribeiro et al., 2014), de estresse oxidativo e
 6 seus efeitos genotóxicos (Monteiro et al., 2011) nesta espécie.

7 As alterações verificadas na osmolalidade e nas concentrações plasmáticas de Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}
 8 dos peixes expostos ao Pb devem ter relação com a presença de metal nos órgãos responsáveis pela sua

1 regulação. Isso comprova-se nos capítulos IV e VI que demonstram que o rim e as brânquias apresentam
2 as maiores concentrações de chumbo dentre os tecidos analisados após 24 h de exposição. As brânquias
3 são importantes para a osmorregulação de teleósteos (Perry, 1997; Wilson e Laurent, 2002; Hirose et
4 al., 2003; Evans et al., 2005), e constituem uma das principais portas de entrada para contaminantes
5 presentes na água (Vinodhini e Narayanan, 2008; Palaniappan et al., 2009). Para penetrar nas células
6 branquiais, o Pb dissolvido na água pode se utilizar de canais e transportadores (Tao et al., 1999,
7 MacDonald et al., 2002; Rogers et al., 2005), interferindo, muitas vezes, no seu funcionamento (Rogers e
8 Wood, 2004; Alves e Wood, 2006; Alves et al., 2006). Após a passagem pelas brânquias, o Pb é
9 distribuído, através da corrente sanguínea (Dai et al., 2012), para outros tecidos, atingindo
10 prioritariamente órgãos que apresentam altas taxas metabólicas. O rim posterior desempenha
11 importante função na regulação de eletrólitos e água, e é capaz de exercer papel excretório, inclusive,
12 de íons metálicos desnecessários ao funcionamento do organismo (Alves et al., 2006; Patel et al., 2006;
13 Palaniappan et al., 2009).

14 Devido à grande afinidade do Pb por alguns transportadores e enzimas presentes nos tecidos
15 osmorreguladores dos teleósteos dulcícolas, a interferência na homeostase de eletrólitos plasmáticos é
16 esperada nos animais expostos a este metal (Martinez et al., 2004; Rogers e Wood, 2004; Patel et al.,
17 2006; Mager, 2012; Ribeiro et al., 2014). Sabe-se que a exposição de teleósteos de água doce ao Pb
18 pode resultar em inibição da atividade de enzimas como a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) (Ay et al., 1999; Rogers
19 et al., 2003, 2005; Atli e Canli, 2007), Ca^{2+} -ATPase (Rogers e Wood, 2004; Atli e Canli, 2007) e anidrase
20 carbônica (AC) (Birceanu et al., 2008), resultando em alteração das concentrações de íons no plasma
21 (Evans, 1987; Bury e Wood, 1999; Rogers et al., 2005; Eyckmans et al., 2013). Estas alterações
22 tipicamente culminam em redução da osmolalidade plasmática de teleósteos dulcícolas. E este efeito foi
23 verificado após 12 e 24 h de exposição ao Pb, e se baseia nas alterações das concentrações de Na^+ e Ca^{2+}
24 provocadas pelo metal nestes mesmos períodos. Ademais, o Pb é capaz de promover reduções nas
25 concentrações plasmáticas de fosfatos (Srivastav et al. 2013), proteínas e outros solutos (Martinez et al.,
26 2004; Almeida et al., 2005) que, juntamente com os íons, refletem na concentração osmótica (Monteiro
27 et al., 2005).

28 No entanto, ao contrário do esperado, a concentração de Cl^- no plasma de *P. lineatus* expostos
29 ao Pb não variou ao longo do experimento. A hipocloremia é uma situação caracteristicamente
30 encontrada em animais dulcícolas expostos ao Pb, mais devido ao prejuízo na tomada deste ânion
31 através das brânquias (Rogers et al., 2003, 2005; Mager, 2012), do que pela eliminação através da urina
32 (Patel et al., 2006). Alterações nas concentrações de Cl^- plasmático podem estar associadas a distúrbios

1 na atividade da AC (Evans, 1987; Souza-Bastos e Freire, 2009), que foram verificadas neste trabalho e
2 serão discutidas adiante. Contudo, um trabalho realizado por Ribeiro et al. (2014) mostrou que a
3 exposição de *P. lineatus* ao Pb durante 96 h, causou uma redução transitória no Cl^- plasmático, sem que
4 houvesse mudança na atividade da AC. Em suma, estes achados sugerem que em *P. lineatus* o íon Cl^-
5 não responde à presença de Pb da mesma forma que algumas espécies de regiões temperadas,
6 sugerindo a atuação de outros mecanismos para garantir a regulação do Cl^- .

7 Outro íon plasmático susceptível a alterações na presença do Pb é o Mg^{2+} . Após a contaminação
8 de Pb pela via alimentar, a truta arco-íris apresentou redução do Mg^{2+} plasmático (Alves et al., 2006)
9 devido à competição entre esses íons divalentes pelos sítios de absorção no trato gastrointestinal. A
10 maior parte do Mg^{2+} circulante é absorvida pela via alimentar (Flik et al., 1993; Bijvelds et al., 1998;
11 Bucking e Wood, 2007), sua concentração no plasma de teleósteos dulcícolas é muito baixa (Holmes e
12 Donaldson, 1969) e sua eliminação através da urina é evitada por um eficiente sistema de reabsorção
13 tubular (Hickman e Trump, 1969; Bijvelds et al., 1998). Porém, quando o Pb encontra-se circulando no
14 sangue do animal é possível que haja interferência na reabsorção tubular de Mg^{2+} , da mesma forma que
15 ocorre com outros íons (Patel et al., 2006). Kulac et al. (2013) verificaram que a exposição de
16 *Oreochromis niloticus* ao cobre por um dia promoveu o aumento da Mg^{2+} -ATPase renal, enquanto
17 Rogers et al. (2003) se depararam com aumentos significativos das concentrações de Mg^{2+} plasmático
18 em *O. mykiss* expostas ao Pb por períodos entre 72 e 120 h. A elevação de Mg^{2+} relatada neste último
19 trabalho coincidiu com a redução calcêmica, dando indícios de que exista uma relação de contrabalanço
20 na regulação destes dois cátions divalentes, embora esteja claro que a absorção destes íons ocorra por
21 vias diferentes (Marshall, 2002). Da mesma forma, o aumento da concentração plasmática de Mg^{2+} em
22 *P. lineatus* expostos ao Pb por 24 h coincidiu com a redução de Ca^{2+} . Sabe-se que além da via alimentar,
23 o Mg^{2+} pode ser absorvido ativamente nas brânquias através de processos ainda não totalmente
24 elucidados (Bijvelds et al., 1998; Marshall, 2002), permitindo supor que esteja ocorrendo uma
25 hiperregulação do Mg^{2+} para contrabalancear a hipocalcemia. Da mesma forma que a atividade da Mg^{2+} -
26 ATPase das brânquias e do rim é aumentada após exposição ao cobre (Atli e Canli, 2011a), supõe-se que
27 frente ao Pb o organismo também seja capaz de promover tal resposta. Tanto o Ca^{2+} quanto o Mg^{2+}
28 exercem efeitos protetores nas brânquias expostas ao Pb (MacDonald et al., 2002), assim, a elevação do
29 Mg^{2+} plasmático pode estar ocorrendo no intuito de proteger o animal de danos maiores. Porém, outra
30 possível causa para a elevação plasmática de Mg^{2+} pode estar ligada ao rompimento celular, já que suas
31 concentrações citoplasmáticas são consideravelmente maiores do que no meio extracelular (Holmes e
32 Donaldson, 1969).

1 Em concordância com esta hipótese, os animais expostos ao Pb por 12 e 24 h também
2 apresentaram elevação dos valores plasmáticos de K^+ . Contudo, tanto os resultados apresentados no
3 capítulo IV, quanto experimentos anteriores, revelaram que a exposição de *P. lineatus* ao Pb não foi
4 capaz de promover alterações sanguíneas que sustentassem essa hipótese, ainda que por períodos mais
5 longos (Ribeiro et al., 2014) ou exposição a concentrações mais elevadas de Pb (Martinez et al., 2004).
6 Porém, além do rompimento de eritrócitos, a hipercalemia também pode estar associada a um aumento
7 da permeabilidade da membrana plasmática de células branquiais (Laurén e McDonald, 1985) e
8 musculares (Grosell e Jensen, 2000; Amado et al., 2006) a íons como o K^+ . Tal acontecimento permitiria
9 o extravazamento de K^+ para o meio extracelular, a exemplo do músculo do caranguejo *Dilocarcinus*
10 *pagei*, que após a exposição ao chumbo aumentou a permeabilidade ao K^+ (Amado et al., 2006), do
11 cobre, que também promoveu a redução deste íon nas células dos tecidos branquial e intestinal de
12 *Oreochromis niloticus* (Saglan et al., 2013), ou do níquel que diminuiu as concentrações de Na^+ , K^+ e
13 Mg^{2+} no tecido muscular da mesma espécie (Atli e Canli, 2011a). O que também justificaria o aumento
14 de Mg^{2+} no plasma de *P. lineatus* após a exposição ao Pb. Outra hipótese é que a elevação de K^+
15 plasmático também pode estar associada a alterações na capacidade osmorreguladora exercida pela
16 NKA (Ribeiro et al., 2014).

17 Já é amplamente aceito que o Pb interfere na atividade da bomba de Na^+ e K^+ de órgãos
18 osmorreguladores (Ahern e Morris, 1998; Rogers et al., 2003, 2005; Mager, 2012; Eyckmans et al., 2013;
19 Ribeiro et al., 2014), cuja função para teleósteos dulcícolas é manter a homeostase celular e o potencial
20 de membrana para a captação ativa de íons na água doce (Jobling, 1993). E sendo a NKA diretamente
21 responsável pela manutenção das concentrações de Na^+ e K^+ dentro e fora das células, o prejuízo em sua
22 atividade pode resultar em hipercalemia com concomitante hiponatremia (Jensen et al., 1987). Estes
23 dois efeitos puderam ser verificados em *P. lineatus* expostos ao Pb, com simultânea redução da
24 atividade da NKA renal e branquial. Quando a mesma espécie foi exposta ao nitrito (Martinez e Souza,
25 2002), ou ao cobre (Mazon et al., 2002), resultados semelhantes foram encontrados para estes íons,
26 justificados pela hipótese de interferência na atividade NKA.

27 Reduções importantes nos níveis de Na^+ plasmático já foram reportadas para *P. lineatus* ao
28 longo de 96 h de exposição ao Pb (Martinez et al., 2004; Ribeiro et al., 2014). No presente trabalho, os
29 níveis de Na^+ plasmático flutuaram entre a 3ª e a 12ª hora de exposição a este metal. Rogers et al.
30 (2003) relataram que fluxo de entrada de Na^+ na truta arco-íris sofreu redução desde as primeiras horas
31 de exposição ao Pb, resultando em diminuição plasmática a partir da 72ª hora, quando a atividade da
32 NKA nas brânquias também sofre prejuízo. Baseado nisso, estes autores acreditam que o Pb possa agir

1 sobre a captação desse íon monovalente também por outras vias no epitélio branquial, de forma direta,
2 bloqueando canais de Na^+ ou trocadores Na^+/H^+ , localizados na membrana apical das células, ou
3 inibindo as enzimas H^+ -ATPase ou AC, que atuam na hiperregulação do Na^+ de forma indireta. Porém, os
4 resultados para as atividades destas duas enzimas, sugerem que a mesma relação não se aplica para *P.*
5 *lineatus*, já que as alterações, quando presentes, ocorrem em momentos diferentes. Por fim, a
6 recuperação da natremia verificada no tempo de 24 h, poderia ser justificada por uma resposta renal
7 compensatória, através de aumento na taxa de reabsorção tubular de Na^+ visando a redução da
8 excreção de Na^+ pela urina, conforme já foi verificado por Grosell et al. (1998) e Patel et al. (2006).

9 Evidências apontam que além de interferir na tomada de Na^+ , o Pb pode atuar na
10 permeabilidade iônica do epitélio branquial, resultando em aumento do efluxo de íons (Rogers et al.,
11 2005; Mager, 2012), graças à instabilidade das junções oclusivas. Assim sendo, ainda que a recuperação
12 da atividade da NKA se restabeleça após exposição ao Pb por 96 h (Ribeiro et al., 2014), baixas
13 concentrações de Na^+ ainda podem ser decorrentes de extravasamento iônico por vias paracelulares
14 provocada pelo Pb, e não apenas de dificuldade de sua absorção ativa. Na formação das junções
15 oclusivas do tecido branquial encontram-se proteínas cujas ligações célula-célula são estabilizadas por
16 pontes de Ca^{2+} , o que implica dizer que a ausência de Ca^{2+} é capaz de promover um desajuste na
17 estrutura e função dessas junções (Brown e Davis, 2002). Desta forma, o Ca^{2+} é considerado um íon
18 essencial à manutenção da permeabilidade de tecidos absorptivos (Evans, 1987; Flik e Verboost, 1995;
19 Evans et al., 2005).

20 Neste contexto, a análise das concentrações calcêmicas leva a crer que as brânquias de *P.*
21 *lineatus* tornam-se mais permeáveis a íons quando em contato com o Pb, permitindo o efluxo de íons. A
22 redução dos níveis de Ca^{2+} plasmáticos ocorreu desde a primeira hora de experimentação, corroborando
23 o trabalho de Rogers et al. (2003) que identificaram uma redução no influxo de Ca^{2+} nas brânquias de *O.*
24 *mykiss* desde a 2ª hora de exposição ao Pb. Alterações nos níveis calcêmicos são recorrentes em animais
25 dulcícolas que entram em contato com águas contaminadas por metais, pois estes apresentam papel
26 antagônico no processo de hiperregulação do Ca^{2+} (Bury e Wood, 1999; MacDonald et al., 2002; Rogers
27 e Wood, 2004; Mager, 2012), dificultando sua absorção através das brânquias. Sabe-se que em
28 teleósteos dulcícolas a hiperregulação do Ca^{2+} ocorre, principalmente, através de canais apicais
29 presentes nas CRM do epitélio branquial, e que a tomada deste íon é promovida pela atividade da Ca^{2+} -
30 ATPase e de trocadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ inseridos na porção basolateral da membrana (Perry, 1997; Hirose et
31 al., 2003; Hwang e Lee, 2007). Os canais de Ca^{2+} das células branquiais são descritos como a principal via
32 de entrada do Pb em peixes de água doce (Rogers e Wood, 2004), e evidências apontam que ele

1 também seja capaz de bloquear estes canais. Teoricamente, após adentrar na célula do epitélio
2 branquial, o Pb se utiliza de trocadores de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ou as bombas de Ca^{2+} dependentes de ATP para
3 alcançar o sangue, podendo, da mesma forma, inibir a atividade desses transportadores (MacDonald et
4 al., 2002; Rogers et al., 2003; Atli e Canli, 2007). Em concordância, as alterações calcêmicas verificadas
5 nos peixes expostos ao Pb comprovam a interferência do metal na hiperregulação de Ca^{2+} . Outros
6 pesquisadores também encontraram resultados semelhantes para moluscos (Mosher, 2008), crustáceos
7 (Ahern e Morris, 1999), outras espécies de teleósteos (Rogers et al., 2003; Rogers e Wood, 2004;
8 Srivastav et al., 2013), e humanos (Ong e Lee, 1980; Abam et al., 2008) expostos ao Pb.

9 Contudo, a diminuição do influxo não deve ser o único motivo para a redução imediata do Ca^{2+}
10 plasmático em *P. lineatus*, já que teleósteos dulcícolas dispõem de eficientes mecanismos de reabsorção
11 nos túbulos renais para impedir a perda de íons através da urina (Hickman e Trump, 1969). Desta feita,
12 um grupo de pesquisadores averiguou um aumento da taxa de excreção renal de Ca^{2+} após exposição de
13 *O. mykiss* ao Pb (Rogers et al., 2005). A inibição da Ca^{2+} -ATPase renal, assim como ocorre no tecido
14 branquial (Rogers e Wood, 2004), justificaria este evento. Durante a realização do presente trabalho
15 foram feitas diversas tentativas para a determinação da atividade da Ca^{2+} -ATPase nos tecidos branquial
16 e renal de *P. lineatus*, porém os resultados gerados apresentaram muita variação e foram considerados
17 inconsistentes, e por isso não estão apresentados neste trabalho.

18 Uma das funções primordiais das brânquias é atuar no equilíbrio ácido-base, através da extrusão
19 de H^+ (Evans et al., 2005; Marshall e Grosell, 2006). A eliminação de prótons pelas brânquias pode gerar
20 uma mudança no pH do microambiente da região apical das células (Perry e Gilmour, 2006),
21 favorecendo a entrada de Na^+ (Perry e Fryer, 1997; Hirose et al., 2003; Evans et al., 2005; Gilmour e
22 Perry, 2009). Esta eliminação ocorre via próton-ATPases ou trocadores Na^+/H^+ localizados na membrana
23 apical de todas as células branquiais (Hirose et al., 2003). Os resultados encontrados para *P. lineatus*
24 expostos ao Pb indicam que, a priori, não foram necessários ajustes na atividade da bomba de prótons
25 em prol da regulação ácido-base, e que, portanto, esta não foi a via pela qual a natremia foi prejudicada.
26 A H^+ -ATPase visa controlar o pH celular e sua atividade é estimulada pela presença de Cl^- no meio
27 intracelular (Nelson, 1988), desta forma, a estabilidade deste íon nos animais expostos ao Pb pode ter
28 sido fator determinante para a conservação da atividade da bomba de prótons.

29 Apesar de nenhuma alteração ter sido detectada na capacidade de transporte da H^+ -ATPase nas
30 brânquias, não é possível afirmar que o balanço ácido-base não tenha sofrido prejuízo, uma vez que,
31 com 24 horas de exposição ao Pb, a AC branquial de *P. lineatus* apresentou atividade quase 40% menor
32 do que os animais CTR. Além de esta enzima estar diretamente envolvida com o balanço ácido-base e a

1 respiração, há uma relação indireta com a regulação iônica (Gilmour e Perry, 2009). Como consequência
2 da redução da atividade da AC, pode haver uma depleção no suprimento dos íons H^+ e HCO_3^- , uma vez
3 que a AC é responsável por catalisar a hidratação do CO_2 , dando origem a estes dois elementos (Evans et
4 al., 2005; Perry e Gilmour, 2006; Gilmour e Perry, 2009). Assim sendo, um prejuízo na regulação de Na^+ e
5 Cl^- seria esperado, uma vez que os íons resultantes da atividade da AC atuam como contra-íons para a
6 captação destes. Entretanto, este resultado não foi verificado para a concentração plasmática de Cl^- em
7 *P. lineatus* expostos ao Pb. Estudos demonstraram que, para algumas espécies de teleósteos dulcícolas,
8 a atividade da AC pode estar desvinculada da hiperregulação de Cl^- , sugerindo que outros mecanismos
9 possam ser utilizados para regular a cloremia (Bielmyer et al., 2008). Por outro lado, o trabalho realizado
10 por Ribeiro et al. (2014), que registrou uma alteração transitória na concentração de Cl^- no plasma, não
11 identificou alterações significativas na atividade da AC nas brânquias. Mostrando que as alterações na
12 atividade enzimática da AC branquial e suas consequências para a o Cl^- plasmático são incertas frente à
13 exposição ao Pb. A truta arco-íris exposta a duas concentrações de Pb ao longo de 24 h apresentou uma
14 redução na atividade da AC branquial, dependente do tempo e da concentração de exposição, iniciando-
15 se após 3 h, e mantendo-se reduzida ao longo de 24 horas de experimento (Rogers et al., 2005). Porém,
16 neste mesmo trabalho, concentrações de Pb entre 0,1 e 1 $mg.L^{-1}$ resultaram em graus de inibição
17 semelhantes, sugerindo que a AC apresenta um baixo limiar de sensibilidade para este metal. Somado a
18 isto, os autores relataram a redução de Na^+ e Cl^- plasmáticos, sendo que o Cl^- foi mais afetado do que o
19 Na^+ , diferente do que ocorreu para *P. lineatus*.

20 Existem diversas isoformas da AC, que se distribuem entre o plasma, a membrana das células ou
21 o interior celular (Hirose et al, 2003; Gilmour e Perry, 2009), mas a AC responsável pelo balanço ácido-
22 base no tecido branquial encontra-se no predominantemente no citoplasma (Marshall e Grosell, 2006;
23 Perry e Gilmour, 2006). Neste trabalho, acredita-se que a maior parte da AC mensurada tem origem
24 citosólica, visto que, durante o procedimento analítico, o pellet contendo membranas e organelas é
25 descartado após a centrifugação do homogeneizado. Já foi relatado que a atividade desta enzima em
26 teleósteos dulcícolas é sensivelmente inibida na presença de diversas espécies metálicas (Morgan et al.,
27 1994; Skaggs e Henry, 2002), incluindo o Pb (Rogers et al., 2005). A inibição da função enzimática da AC
28 em teleósteos ocorre quando metais ligam-se com histidinas que ficam expostas em sua estrutura, ou
29 outros aminoácidos próximos ao seu sítio ativo, interagindo com a enzima de forma a competir com seu
30 substrato (Ceyhun et al., 2011). Ou ainda, por se tratar de uma metaloenzima, que depende da presença
31 do zinco como co-fator (Gilmour e Perry, 2009), a AC torna-se susceptível à presença de metais que
32 estejam fora do contexto homeostático (Lindskog, 1997), sendo o Pb um dos metais com maior

1 capacidade de interação com a AC, atrás, apenas, do alumínio e do cobre (Ceyhun et al., 2011). Como
2 consequência da redução da atividade da AC, pode haver um decréscimo na excreção de H^+ ,
3 favorecendo, ainda mais a absorção de Pb, uma vez que a presença de H^+ produz um efeito protetor
4 para o tecido branquial frente ao contato com metais (Playle, 1998).

5 Alterações na atividade da AC frequentemente vem acompanhadas de interferência nas
6 concentrações de íons plasmáticos e na osmolaridade, contudo, pode não ser a única causa para tais
7 distúrbios (Evans, 1987; Bury e Wood, 1999; Rogers et al., 2005). Da mesma forma que a AC, estudos
8 demonstraram que a exposição de teleósteos de água doce ao Pb pode resultar em inibição da atividade
9 da NKA (Ay et al., 1999; Rogers et al., 2003, 2005; Atli e Canli, 2007; de la Torre et al., 2007; Ribeiro et
10 al., 2014). A NKA é responsável pela geração do gradiente eletroquímico que favorece a entrada de
11 Na^+ pela membrana apical, e a redução de sua atividade deve resultar em alterações na concentração
12 deste íon (Ahern e Morris, 1999; Rogers et al., 2003, 2005; Ribeiro et al., 2014). Apesar de uma redução
13 significativa na atividade desta enzima branquial só ser apontada pelo teste estatístico após 6 h de
14 exposição ao Pb, em todos os demais tempos é possível visualizar uma tendência de redução de sua
15 atividade. Este efeito também é verificado para o cobre, o zinco o cromo, a prata e o cádmio nas
16 brânquias de *O. niloticus* (Atli e Canli, 2011a, b), mostrando um marcante efeito inibitório de metais
17 sobre esta enzima. A redução provocada por metais na atividade de ATPases, como a bomba de Na^+ e
18 K^+ , está associada com a interação do contaminante com grupamentos funcionais como carboxil (Ong e
19 Lee, 1980) e sulfidril (Castro-González, 2008; UNEP, 2010), impedindo a ligação da molécula de ATP ao
20 sítio catalítico da enzima. E esta pode ser outra razão para a retenção de Pb neste tecido, como será
21 discutido no capítulo VI.

22 Porém, muito mais do que a interação com a NKA, os maiores responsáveis pela retenção de Pb
23 no tecido branquial são os transportadores envolvidos com a regulação de Ca^{2+} , já que estes dois cátions
24 atuam como antagonistas (Alves et al., 2006; UNEP, 2010; Mager, 2012). Os canais de Ca^{2+} localizados na
25 membrana apical das CRM (Perry, 1997; Hirose et al., 2003) são utilizados como porta de entrada para o
26 Pb, que compete com os íons Ca^{2+} pela absorção (Rogers e Wood, 2004), e acaba por inibir a passagem
27 deste íon por competição (Mager, 2012; Alsop e Wood, 2011). Por outro lado, após penetrar a CRM o Pb
28 pode se dirigir para o plasma através de trocadores Na^+/Ca^{2+} ou da bomba de Ca^{2+} , ancorados na
29 membrana basolateral (Mager, 2012). Estes eventos são apontados como os principais responsáveis
30 pela redução de Ca^{2+} encontrada em teleósteos expostos ao Pb (Rogers et al., 2003; Alves e Wood, 2006;
31 Alsop e Wood, 2011; Mager, 2012; Ribeiro et al., 2014), incluindo este trabalho.

1 O rim posterior exerce, ao lado das brânquias, importante papel na hiperregulação e equilíbrio
2 ácido-base em teleósteos de água doce (Hickman e Trump, 1969; Perry et al., 2003; Gilmour e Perry,
3 2009). Mas ao contrário das brânquias, o rim, que não dispõe de amplo contato com o meio externo,
4 apresenta uma menor sensibilidade às variações do ambiente (Heisler, 1993). Porém, sua alta
5 vascularização torna-o alvo de contaminantes capazes de penetrar na circulação sistêmica (Alves et al.,
6 2006), deixando canais, trocadores e enzimas suscetíveis ao xenobiótico. Dentre as enzimas analisadas
7 no rim posterior de *P. lineatus*, a mais claramente atingida pelo Pb foi a AC, que a partir da 6ª h de
8 exposição apresentou reduções que variaram de 20 a 75% em comparação a seus CTR. Mela et al.
9 (2013) demonstraram que o cobre é capaz de inibir a atividade da AC nas brânquias, mas não no rim, e
10 ao contrário, a atividade da AC renal dos animais expostos ao metal aumentou como mecanismo
11 compensatório no equilíbrio ácido-base. Neste trabalho, por outro lado, os resultados para a atividade
12 da AC do tecido renal mostram, a partir na 2ª hora de exposição, um indício de inibição. A função
13 primordial da AC renal é a atuar na regulação do pH através da reabsorção de HCO_3^- nos túbulos
14 proximais (Perry et al., 2003; Perry e Gilmour, 2006), complementando o balanço ácido-base realizado
15 pelas brânquias. Contudo, sua inibição é capaz de refletir na reabsorção tubular de Na^+ , K^+ e Cl^- (Hickman
16 e Trump, 1969), prejudicando o balanço osmoiônico. As análises das concentrações desses íons no
17 plasma indicam que, a princípio, apenas o Na^+ sofreu reflexo dessa inibição, podendo, o K^+ e o Cl^- serem
18 regulados por outros mecanismos, já que há uma diversidade muito grande de mecanismos de
19 regulação ácido-base em peixes (Marshall e Grosell, 2006).

20 Outro parâmetro importante para a manutenção do equilíbrio ácido-base exercido pelo rim é a
21 presença da bomba de próton na membrana apical das células com borda em escova dos túbulos
22 proximais (Perry e Fryer, 1997). A atividade da H^+ -ATPase renal de *P. lineatus* aumentou de 56 a 156%
23 nos tempos de 6 e 24 h, respectivamente, após a exposição ao Pb. Em condições normais, a regulação
24 ácido-base é exercida prioritariamente pelas brânquias através da excreção de H^+ , com o rim exercendo
25 um papel auxiliar, reabsorvendo o HCO_3^- que é filtrado pelo glomérulo (Perry et al., 2003; Gilmour e
26 Perry, 2009). Entretanto, situações que propiciem desajustes no pH sanguíneo, proporcionam uma
27 maior expressão de H^+ -ATPase renal, sugerindo seu envolvimento com a recaptação do HCO_3^- (Perry e
28 Fryer, 1997; Perry et al., 2003). Além disso, a inibição da atividade da AC renal a partir de 6 h de
29 exposição de *P. lineatus* ao Pb pode causar um prejuízo da regulação ácido-base impedindo a
30 reabsorção tubular deste ânion. Desta forma, a ativação da H^+ -ATPase viria contribuir para a compensar
31 esta perda (Perry e Gilmour, 2006), e o prejuízo na regulação ácido-base. Contudo, da mesma forma que
32 acontece nas brânquias dos teleósteos dulcícolas (Hirose et al., 2003; Evans, 2008), os resultados desse

1 trabalho sugerem o envolvimento da H⁺-ATPase renal também na regulação do Na⁺ plasmático, visto
2 que, após o aumento de sua atividade em 24 h, houve um restabelecimento da natremia.

3 A principal força motriz para a reabsorção tubular de Na⁺ está na presença da NKA na membrana
4 basolateral das células dos túbulos renais (Hickman e Trump, 1969; Marshal e Grosel, 2005). O rim é um
5 dos órgãos mais facilmente prejudicados quanto à redução da atividade da NKA frente à exposição
6 aguda a contaminantes aquáticos (Agrahari e Gopal, 2008; Afsar et al., 2012; Saglan et al., 2013). Os
7 metais são, reconhecidamente, os xenobióticos com maior atuação sobre a atividade da bomba de Na⁺ e
8 K⁺, contudo, a resposta ao contaminante varia de acordo com o órgão (Alves e Wood, 2006; Afsar et al.,
9 2012; Kulac et al., 2013), o tempo de exposição (Nascimento et al., 2012; Kulac et al., 2013), as
10 condições ambientais (Alves e Wood, 2006; Kulac et al., 2013; Saglan et al., 2013), a concentração
11 (Rogers et al., 2005; Kulac et al., 2013) e a espécie metálica (Saglan et al., 2013). Enquanto o cádmio é
12 capaz de reduzir a atividade da NKA no rim, a presença de prata provoca um aumento após exposição
13 aguda (Atli e Canli, 2011b). Porém, o Pb é comprovadamente um inibidor da atividade desta enzima
14 (Mager, 2012), e sua interferência no tecido renal já foi atestada por alguns trabalhos (Patel et al., 2006;
15 Afsar et al., 2012). Desta feita, a redução da atividade renal de NKA nos animais expostos ao Pb vem
16 somar com os demais trabalhos na área, acrescentando que a interferência, que, aparentemente, se
17 inicia já na 1ª hora de exposição ao metal, torna-se efetiva ao final do primeiro dia.

18 A redução na atividade das enzimas osmorregulatórias verificadas no tecido renal em
19 decorrência da exposição ao Pb pode ter origem na alta concentração deste metal encontrada neste
20 tecido, descrita no capítulo IV. A chegada do Pb ao rim justifica-se pela tentativa de eliminação deste
21 metal pela via urinária (Patel et al., 2006; Palaniappan et al., 2009), porém, assim como ocorre nas
22 brânquias, acredita-se que os maiores responsáveis para que o Pb fique ali retido sejam os canais,
23 trocadores e enzimas relacionados com o transporte de Ca²⁺ (Alves et al., 2006). Desta forma, a
24 presença de Pb no rim posterior impede a reabsorção tubular do Ca²⁺, provocando um aumento na
25 excreção desse íon, com consequente redução dos índices calcêmicos (Patel et al., 2006), como
26 registrado para *P. lineatus*. A Ca²⁺-ATPase respondeu ao Cd, Cr e Ag da mesma maneira, com redução da
27 sua atividade em mais de 50% no rim e nas brânquias (Atli e Canli, 2011b). Porém, estudos sugerem que
28 o rim de peixes expostos ao Cd possa responder de forma compensatória em relação à hipocalcemia
29 (Choudhury e Wood, 2007).

30 Os resultados deste trabalho mostram que as alterações nas atividades das enzimas
31 osmorregulatórias nas brânquias e no rim posterior constituem a principal causa dos distúrbios iônicos
32 em decorrência da toxicidade fisiológica do Pb para *P. lineatus*. No entanto, estes resultados ainda são

1 inconclusivos a respeito dos mecanismos de toxicidade do Pb para a desregulação dos íons plasmáticos.
2 Porém, é possível afirmar que os desajustes na homeostase eletrolítica derivam tanto de interferências
3 do metal sobre atividades enzimáticas branquiais, como renais, sendo este último tecido, o mais
4 sensível.

5

6 **V. 4 Referências Bibliográficas**

- 7 Abam E, Okediran BS, Odukoya OO, Adamson I, Ademuyiwa O, 2008. Reversal of ionoregulatory
8 disruptions in occupational lead exposure by vitamin C. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 297-304.
- 9 Afsar S, Govind B, Jaiswal DP, 2012. $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ATPase post exposure recovery from lead intoxicated
10 freshwater fish *Anabastestu dineus*. *J. Exp. Sci.* 3, 01-03.
- 11 Agrahari S, Gopal K, 2008. Inhibition of $\text{Na}^+ \text{K}^+$ -ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa*
12 *punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. *Pestic. Biochem. Physiol.* 92, 57–60.
- 13 Ahern MD, Morris S, 1998. Accumulation of lead and its effects on Na balance in the freshwater crayfish
14 *Cherax destructor*. *J. Exp. Zool.* 281, 270-279.
- 15 Almeida JS, Meletti PC, Martinez CBR, 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on
16 physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp.*
17 *Biochem. Physiol.* 140C, 356-363.
- 18 Alsop D, Wood CM, 2011. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across
19 multiple metals. *Aquat. Toxicol.* 105, 385-393.
- 20 Alves LC, Glover CN, Wood CM, 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout
21 (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 615-625.
- 22 Alves LC, Wood CM, 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout
23 (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.* 78, 217-232.
- 24 Alsop D, Wood CM 2011. Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across
25 multiple metals. *Aquat. Toxicol.* 105, 385-393.

- 1 Amado EM, Freire CA, Souza MM, 2006. Osmoregulation and tissue water regulation in the freshwater
2 red crab *Dilocarcinus pagei* (Crustacea, Decapoda), and the effect of waterborne inorganic lead.
3 *Aquat. Toxicol.* 79, 1–8.
- 4 Atli G, Canli M, 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*.
5 *Comp. Biochem. Physiol.* 145C, 282-287.
- 6 Atli G, Canli M, 2011a. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and
7 muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicol.* 20, 1861-1869.
- 8 Atli G, Canli M, 2011b. Metals (Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+}) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of
9 freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. *Environ. Toxicol.* 28,
10 707-717.
- 11 Ay Ö, Kalay M, Tamer L, Canli M, 1999. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish
12 *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62,
13 160-168.
- 14 Bielmyer GK, Brix KV, Grosell M, 2008. Is Cl^- protection against silver toxicity due to chemical speciation?
15 *Aquat. Toxicol.* 87, 81–87.
- 16 Birceanu O, Chowdhury MJ, Gillis PL, McGeer JC, Wood CM, Wilkie MP, 2008. Modes of metal toxicity
17 and impaired branchial ionoregulation in rainbow trout exposed to mixtures of Pb and Cd in soft
18 water. *Aquat. Toxicol.* 89, 222–231.
- 19 Bijvelds MJC, Van der Velden JA, Kolar ZI, Flik G, 1998. Magnesium transport in freshwater teleosts. *J.*
20 *Exp. Biol.* 201, 1981-1990.
- 21 Brown RC, Davis TP, 2002. Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential
22 mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *J. Am. Heart. Assoc. – Stroke.* 33, 1706-
23 1711.
- 24 Bucking C, Wood CM, 2007. Gastrointestinal transport of Ca^{2+} and Mg^{2+} during the digestion of a single
25 meal in the freshwater rainbow trout. *J. Comp. Physiol.* 177B, 349-360.
- 26 Bury NR, Wood CM, 1999. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the
27 proton-coupled Na^+ channel. *Am. J. Physiol. – Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277, 1385-1391.

- 1 Castro-González MI, Méndez-Armenta M, 2008. Heavy metals: Implications associated to fish
2 consumption. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 26, 263–271.
- 3 Ceyhun SB, Sentürk M, Yerlikaya E, Erdogan O, Küfrevioğlu OI, Ekinci D, 2011. Purification and
4 characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass)
5 liver and toxicological effects of metals on enzyme activity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 32, 69–74.
- 6 Chowdhury MJ, Wood CM, 2007. Renal function in the freshwater rainbow trout after dietary cadmium
7 acclimation and waterborne cadmium challenge. *Comp. Biochem. Physiol.* 145C, 321–332.
- 8 Dai W, Liu S, Fu L, Du H, Xu Z, 2012. Lead (Pb) accumulation, oxidative stress and DNA damage induced
9 by dietary Pb in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquac. Res.* 43, 208–214.
- 10 de la Torre FR, Salibián A, Ferrari L, 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of
11 a freshwater fish. *Chemosphere.* 68, 1582–1590.
- 12 Evans DH, 1987. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants.
13 *Environ. Health. Perspect.* 71, 47-58.
- 14 Evans DH, Piermarini PM, Choe KP, 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange,
15 osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97–177.
- 16 Evans DH, 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith,
17 and Ancel Keys. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 295, R704–R713.
- 18 Eyckmans M, Lardon I, Wood CM, DeBoeck G, 2013. Physiological effects of waterborne lead exposure in
19 spiny dogfish (*Squalus canthias*). *Aquat. Toxicol.* 126, 373-381.
- 20 Flik G, Van der Velden JA, Dechering KJ, Verbost PM, Schoenmakers TJM, Kolar ZI, Wendelaar-Bonga SE,
21 1993. Ca^{2+} and Mg^{2+} transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. *J. Exp.*
22 *Zool.* 265, 356-365.
- 23 Flik G, Verbost PM, 1995. Cellular mechanisms in calcium transport and homeostasis in fish. In:
24 Hochachka PW, Mommsen TP, (Eds.) *Biochemical and Molecular Biology of Fish v.5*. Elsevier Science
25 Publishers, New York. pp.251-263.
- 26 Gibbs A, Somero GN, 1989. Pressure adaptation of Na^+/K^+ -ATPase in gills of marine teleosts. *J. Exp. Biol.*
27 143, 475-492.

- 1 Gilmour KM, Perry SF, 2009. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 212, 1647-
2 1661.
- 3 Grosell MH, Hogstrand C, Wood CM, 1998. Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in
4 both Cu acclimated and non acclimated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 40,
5 275-291.
- 6 Grosell M, Jensen FB, 2000. Uptake and effects of nitrite in the marine teleost fish *Platichthys flesus*.
7 *Aquat. Toxicol.* 50, 97–107.
- 8 Heisler N, 1993. Acid-base regulation. In: Evans DH, (Ed.) *The physiology of fishes*. CRC Press, Boca
9 Raton. pp. 343–378.
- 10 Hickman CP, Trump BF, 1969. The kidney. In: Hoar WS, Randall DJ, (Eds.) *Excretion, ionic regulation, and*
11 *metabolism, Fish Physiology series v. 1*. Academic Press, London. pp. 91–240.
- 12 Hirose S, Kaneko T, Naito N, Takei Y, 2003. Molecular biology of major components of chloride cells.
13 *Comp. Biochem. Physiol.* 136B, 593-620.
- 14 Holmes WN, Donaldson EM, 1969. The body compartments and the distribution of electrolytes. In: Hoar
15 WS, Randall DJ, (Eds.) *Excretion, ionic regulation, and metabolism, Fish Physiology series v. 1*.
16 Academic Press, London. pp. 1–90.
- 17 Hwang PP, Lee TH, 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comp.*
18 *Biochem. Physiol.* 148A, 479-497.
- 19 Jensen FB, Andersen NA, Heisler N, 1987. Effects of nitrite exposure on blood respiratory properties,
20 acid-base and electrolyte regulation in the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Comp. Physiol.* 157B, 533-541.
- 21 Jobling M, 1993. Bioenergetics: feed intake and energy partitioning. In: Rankin JC, Jensen FB, (Eds.) *Fish*
22 *Ecophysiology*. Chapman & Hall, London. pp. 1-44.
- 23 Kulac B, Atli G, Canli M, 2013. Response of ATPases in the osmoregulatory tissues of freshwater fish
24 *Oreochromis niloticus* exposed to copper in increased salinity. *Fish. Physiol. Biochem.* 39, 391–401.
- 25 Laurén DJ, McDonald DG, 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout,
26 *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Comp. Physiol.* 155B, 635-644.

- 1 Lindskog S, 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacol. Thu.* 74, 1-20.
- 2 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, 1951. Protein measurements with the folin phenol
3 reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 4 MacDonald A, Silk L, Schwartz M, Playle RC, 2002. A lead–gill binding model to predict acute lead toxicity
5 to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 227-242.
- 6 Mager EM, 2012. Lead. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ, (Eds.) *Homeostasis and toxicology of non-*
7 *essential metals, Fish Physiology series v. 31B.* Academic Press, London. pp. 185–236.
- 8 Marshall WS, 2002. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective
9 synthesis. *J. Exp. Zool.* 293, 264-283.
- 10 Marshall WS, Grosell M, 2006. Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In: Evans DH,
11 Claiborne JB, (Eds.) *The Physiology of Fishes*, 3^a ed. CRC Press, Boca Raton. pp. 177-230.
- 12 Martinez CBR, Souza MM, 2002. Acute effects of nitrite on ion regulation in two Neotropical fish species.
13 *Comp. Biochem. Physiol.* 133A, 151-160.
- 14 Martinez CBR, Nague MY, Zaia CTBV, Zaia DAM, 2004. Acute morphological and physiological effects of
15 lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64, 797-807.
- 16 Mazon AF, Monteiro EAS, Pinheiro GHD, Fernandes MN, 2002. Hematological and physiological changes
17 induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol.*
18 62A, 621-631.
- 19 Mela M, Guiloski IC, Doria HB, Rabitto IS, Silva CA, Maraschi AC, Prodocimo AC, Freire CA, Randi MAF,
20 Oliveira Ribeiro CA, Silva de Assis HC, 2013. Risks of waterborne copper exposure to a cultivated
21 freshwater Neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 88, 108–116.
- 22 Monteiro SM, Mancera JM, Fontainhas-Fernandes A, Sousa M, 2005. Copper induced alterations of
23 biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Physiol.*
24 141C, 375–383.
- 25 Monteiro V, Cavalcante DGSM, Viléla MBFA, Sofia SH, Martinez CBR, 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures
26 for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus*
27 *lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291–298.

- 1 Morgan IJ, Potts WTW, Oates K, 1994. Intracellular ion concentrations in branchial epithelial cells of
2 brown trout (*Salmo trutta* L.) determined by x-ray microanalysis. J. Exp. Biol. 194, 139-151.
- 3 Mosher S, 2008. Biomarkers of lead exposure in the freshwater mussel *Elliptio complanata* for assessing
4 transportation related impacts. Dissertação de mestrado - North Carolina State University, Estados
5 Unidos.
- 6 Nascimento CRB, Souza MM, Martinez CBR, 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress
7 response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. Comp. Biochem. Physiol. 155C, 456-461.
- 8 Nelson N, 1988. Structure, function, and evolution of proton-ATPases. Plant. Physiol. 86, 1-3.
- 9 Ong CN, Lee WR, 1980. Interaction of calcium and lead in human erythrocytes. Brit. J. Ind. Med. 37, 70-
10 77.
- 11 Palaniappan PR, Krishnakumar N, Vadivelu M, 2009. Bioaccumulation of lead and the influence of
12 chelating agents in *Catla catla* fingerlings. Environ. Chem. Lett. 7, 51-54.
- 13 Paquin PR, Santore RC, Wu KB, Kavvada CD, Di Toro DM, 2000. The biotic ligand model: a model of the
14 acute toxicity of metals to aquatic life. Environ. Sci. Policy. 3, S175-S182.
- 15 Patel M, Rogers JT, Pane EF, Wood CM. 2006. Renal responses to acute lead waterborne exposure in the
16 freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 80, 362-371.
- 17 Perry SF, 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. Ann. Rev.
18 Physiol. 59, 325-47.
- 19 Perry SF, Shahsavarani A, Georgalis T, Bayaa M, Furimsky M, Thomas SLY, 2003. Channels, pumps, and
20 exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. J.
21 Exp. Zool. 300A, 53-62.
- 22 Perry SF, Fryer JN, 1997. Proton pumps in the fish gill and kidney. Fish. Physiol. Biochem. 17, 363-369.
- 23 Perry SF, Gilmour KM, 2006. Acid-base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and
24 emerging models. Resp. Physiol. Neurobi. 154, 199-215.
- 25 Playle RC, 1998. Modelling metal interactions at fish gills. Sci. Total. Environ. 219, 147-163.

- 1 Ribeiro AM, Risso WE, Fernandes MN, Martinez CBR, 2014. Lead accumulation and its effects on the
2 branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 40, 645-657.
- 3 Rogers JT, Patel M, Gilmour KM, Wood CM, 2005. Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and
4 Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. – Reg. Integr. Comp. Physiol.* 289,
5 R463–R472.
- 6 Rogers JT, Richards JG, Wood CM, 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead
7 in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 64, 215-234.
- 8 Rogers JT, Wood CM, 2004. Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater
9 rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 207, 813-825.
- 10 Saglam D, Atli G, Canli M, 2013. Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis*
11 *niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92, 79-
12 86.
- 13 Silva AOF, Martinez CBR, 2014. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost
14 *Prochilodus lineatus*: enzymes activity and plasma ions. *Aquat. Toxicol.* 156, 161-168.
- 15 Skaggs HS, Henry RP, 2002. Inhibition of carbonic anhydrase in the gills of two euryhaline crabs,
16 *Callinectes sapidus* and *Carcinus maenas*, by heavy metals. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 605–612.
- 17 Souza-Bastos LR, Freire CA, 2009. The handling of salt by the neotropical cultures freshwater catfish
18 *Rhamdia quelen*. *Aquaculture.* 289, 167-174.
- 19 Srivastav AK, Rai R, Suzuki N, Mishra D, Srivastav SK, 2013. Effects of lead on the plasma electrolytes of a
20 freshwater fish, *Heteropneustes fossilis*. *Int. Aquat. Res.* 5:4.
- 21 Tao S, Liu C, Dawson R, Cao J, Li B, 1999. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius*
22 *auratus*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 352-357.
- 23 UNEP, 2010. United Nation Environmental Programme. Final review of scientific information on lead.
24 332p.
- 25 Vinodhini R, Narayana M, 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus*
26 *carpio* (Common carp). *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 52, 179-182.

- 1 Vitale AM, Monserrat JM, Castilho P, Rodriguez EM, 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic
2 anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda,
3 Grapsidae). Comp. Biochem. Physiol. 122, 121-129.
- 4 Wilson JM, Laurent P, 2002. Fish gill morphology: inside out. J. Exp. Zool. 293, 192-213.
- 5 Yabe MJS, Oliveira E, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de
6 bacias hidrográficas. Quim. Nova 21, 551-556.

1 **Capítulo VI: Parâmetros morfofuncionais e acúmulo de chumbo nas brânquias de *Prochilodus lineatus* ao**
2 **longo das primeiras 24 horas de exposição ao metal**

3 Nesta seção estão descritos os experimentos, resultados e discussão referentes ao acúmulo de chumbo
4 (Pb), conteúdo de metalotioneínas e as alterações morfológicas promovidas pela exposição ao chumbo
5 nas brânquias de *P. lineatus* avaliadas por meio de análises histopatológicas, imunohistoquímicas, e
6 ultraestruturais.

7

8 **VI. 1 Material e métodos**

9 Os protocolos utilizados neste capítulo para análise da concentração tecidual de chumbo e do
10 conteúdo de proteínas semelhante à metalotioneínas (PSMT) nos filamentos branquiais seguem as
11 descrições encontradas nos tópicos *a* e *d*, respectivamente, localizadas na seção 1 do capítulo IV.

12

13 **a. Análises histopatológicas**

14 Para as análises histopatológicas o segundo arco branquial (n = 6), separado no momento da
15 amostragem, foi fixado em Bouin (4–5 h), conservado em álcool 70%, e processado segundo protocolo
16 histológico de rotina passando por processos de desidratação alcoólica, diafanização em xilol e inclusão
17 em parafina. Os blocos foram cortados em micrótomo manual (American Optical, 820) para montagem
18 das lâminas com 5 µm de espessura, que foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e analisadas em
19 microscópio de luz (Zeiss, Primo Star, Alemanha) com uma câmera acoplada (Zeiss, AxioCamERc 5S,
20 Alemanha) e um sistema computacional de análise e captura de imagens (Zeiss, AxioVision 4.8,
21 Alemanha). A avaliação semi-quantitativa das alterações histológicas branquiais baseou-se na
22 severidade de cada lesão, segundo critério estabelecido por Poleksić e Mitrović-Tutundžić (1994),
23 fornecendo o Índice de Alteração Histológica (IAH). A análise avalia progressivamente o grau de
24 comprometimento da funcionalidade do órgão da seguinte forma: alterações de estágio I, que não
25 comprometem o funcionamento do tecido; de estágio II, mais severas e que prejudicam o
26 funcionamento normal do órgão; e de estágio III, muito severas e irreversíveis. Para o cálculo do IAH de
27 cada animal utilizou-se a seguinte fórmula: $IAH = 10^0 \sum I + 10^1 \sum II + 10^2 \sum III$, de modo que I, II e III
28 correspondem ao número de alterações de estágio I, II e III, respectivamente. A classificação do prejuízo
29 funcional do tecido foi estabelecida segundo o valor obtido para o IAH da seguinte forma: 0 a 10 –

1 funcionamento normal do órgão; 11 a 20 – danos de leves a moderados; 21 a 50 – danos de moderados
2 a severos; 51 a 100 – danos muito severos; > 100 – danos irreparáveis.

3

4 **b. Densidade de células ricas em mitocôndrias (CRM)**

5 A partir dos mesmos blocos confeccionados para as análises histopatológicas, foram montadas
6 lâminas com cortes sagitais de 8 µm de espessura, para processo de marcação imunohistoquímica para
7 Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) de acordo com o protocolo descrito por Dang et al. (2000a). Para tanto, as lâminas
8 foram incubadas com anticorpo monoclonal de rato específico para NKA (IgGα5, Development Studies
9 Hydrion Bank, University of Iowa, USA) e anticorpo secundário Goat anti-mouse Ig peroxidase
10 conjugated (GAMPO) e coradas com diaminobenzidine (DAB-Ni) em tampão tris-salino, contendo H₂O₂
11 (0,03%), posteriormente, foram desidratados e cobertos com lamínulas. As lâminas foram analisadas
12 através de microscopia de luz utilizando os mesmos equipamentos usados para as análises
13 histopatológicas. Foi feita a contagem de CRM distribuídas por área de tecido (mm²) ao longo de 10
14 lamelas selecionadas aleatoriamente, distinguindo sua localização (lamela e filamento) e a intensidade
15 de coloração (clara e escura), que indica baixa atividade da NKA. A área tecidual foi mensurada através
16 de programa computacional (Zeiss, AxioVision 4.8, Alemanha), para a expressão dos resultados (média ±
17 EP) em número de células por mm² de filamento ou lamela. A proporção de células claras nas brônquias
18 também foi calculada e expressa em porcentagem do número total de CRM. Para cada animal foram
19 contadas cinco áreas em cinco cortes histológicos distintos.

20

21 **c. Microscopia eletrônica de varredura e microanálise**

22 O segundo arco branquial de um animal de cada tratamento foi fixado em solução de
23 glutaraldeído 3% e paraformaldeído 2%, diluída em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,3), por 24 h, e depois
24 mantido em solução de glutaraldeído 0,5% (4° C) até o processamento. Os arcos foram lavados com
25 glicerol 16% por 16 h para a retirada do muco e cortados em segmentos de três a quatro filamentos. Um
26 segmento foi fixado com tetróxido de ósmio diluído em tampão fosfato (1%), desidratado em série
27 alcoólica e seco ao ponto crítico com CO₂ (Bal-Tec CPD-030). Os segmentos do arco foram fixados no
28 porta-amostras com fita de carbono, cobertos com ouro por *sputtering* (BalTec SCD 050 Sputter Coater)
29 e observados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200, FEI Company),

1 operando com voltagem de 30 kV e distância de trabalho entre 10,8 e 13,3 mm. Outro arco branquial foi
2 criofraturado com nitrogênio líquido e passou pelos mesmos processos de desidratação e secagem,
3 exceto pela etapa de fixação com ósmio. Os fragmentos de brânquia resultantes da criofratura foram
4 posicionados no porta-amostras com fita de carbono em diferentes posições, observando também
5 fragmentos com a área de fratura paralela ao suporte, permitindo assim a avaliação das regiões interna
6 e externa do tecido. Os fragmentos receberam cobertura de carbono (Bal-Tec SCD 050) para análise
7 qualitativa dos elementos químicos presentes nas diferentes áreas das amostras por espectroscopia de
8 dispersão de energia (EDS), utilizando-se um espectrômetro de raio-x por energia dispersiva (Inca X-
9 Sight, Oxford), nas mesmas distância trabalho e voltagem.

10

11 **d. Análises estatísticas**

12 Os resultados para PSMT foram expressos em porcentagem de seu respectivo CTR e para cada
13 tempo experimental (1, 2, 3, 6, 12 e 24 h) os resultados dos grupos CTR e Pb foram comparados entre si
14 usando o teste t (paramétrico) ou Mann-Whitney (não-paramétrico) e os resultados obtidos para o
15 grupo Pb, nos diferentes tempo experimentais, foram comparados entre si por ANOVA (one-way). Os
16 resultados de concentração de Pb nas brânquias, de IAH e densidade de CRM obtidos para os grupos
17 CTR dos diferentes tempos experimentais foram agrupados, já que não foram constatadas diferenças
18 significativas entre eles (ANOVA, $p < 0,05$). Dependendo do caso, as diferenças entre o grupo CTR e os
19 grupos Pb, nos diferentes períodos experimentais, foram analisadas por ANOVA, seguida pelo teste de
20 comparações múltiplas ou as diferenças entre cada grupo Pb e o grupo CTR foram analisados por meio
21 de teste t ou Mann-Whitney. O uso da estatística paramétrica ou não paramétrica foi definido
22 dependendo da distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Foram
23 considerados significativos valores de $p < 0,05$.

1 VI. 2 Resultados

2

3 *Concentração de chumbo nas brânquias*

4 Os resultados das análises da concentração de chumbo no tecido branquial indicaram que os
 5 animais CTR apresentaram uma concentração média de chumbo de $117 \pm 27 \mu\text{g Pb.g tecido seco}^{-1}$ (Fig.
 6 VI.1). E já na primeira hora, o chumbo nas brânquias dos animais expostos ao metal foi 100% maior do
 7 que daqueles que ficaram na água sem chumbo. Este valor cresceu proporcionalmente em relação ao
 8 tempo de exposição, e os peixes expostos ao Pb por 6 h apresentaram 6 vezes mais chumbo nas
 9 brânquias do que o CTR e após 24 h de exposição a concentração de Pb nas brânquias atingiu a média
 10 de $2.486 \pm 493 \mu\text{g Pb.g de tecido seco}^{-1}$, ou seja, 21 vezes maior que o CTR. A análise estatística mostrou
 11 que a concentração de chumbo nas brânquias aumentou de forma tempo-dependente.

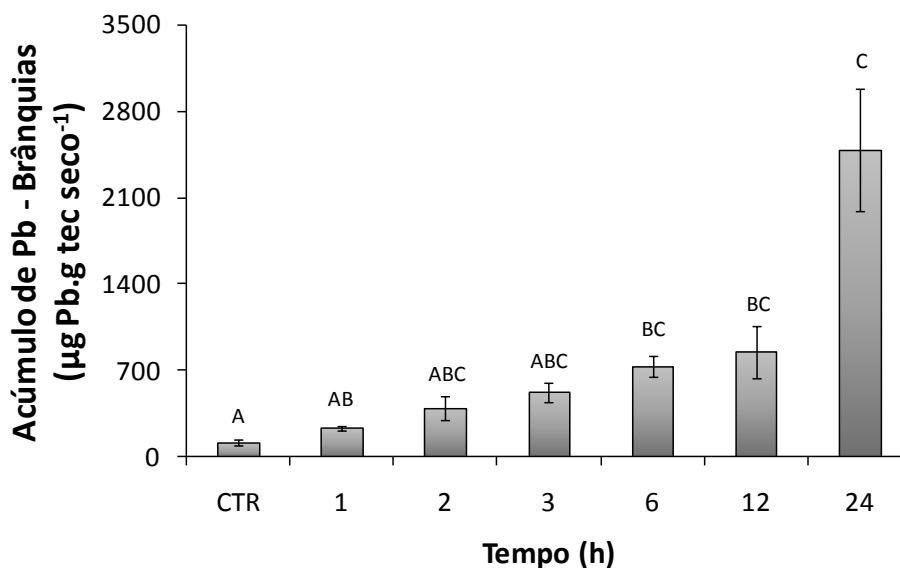


Figura VI.1. Acúmulo de chumbo (média \pm EP) nas brânquias de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou ao chumbo pelos tempos de 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

12 A aplicação da técnica de identificação de elementos nas brânquias através da microanálise por
 13 energia dispersiva de raio-x (EDS), somada à criofatura, permitiu distinguir a ocorrência de chumbo
 14 dentre as porções internas e externas das brânquias. Apesar de sua imprecisão quanto a região
 15 branquial que se analisa, e de sua incapacidade de quantificar os elementos encontrados, a técnica
 16 permitiu identificar a ocorrência de chumbo, dentro dos limites detectáveis pelo aparelho, na área de

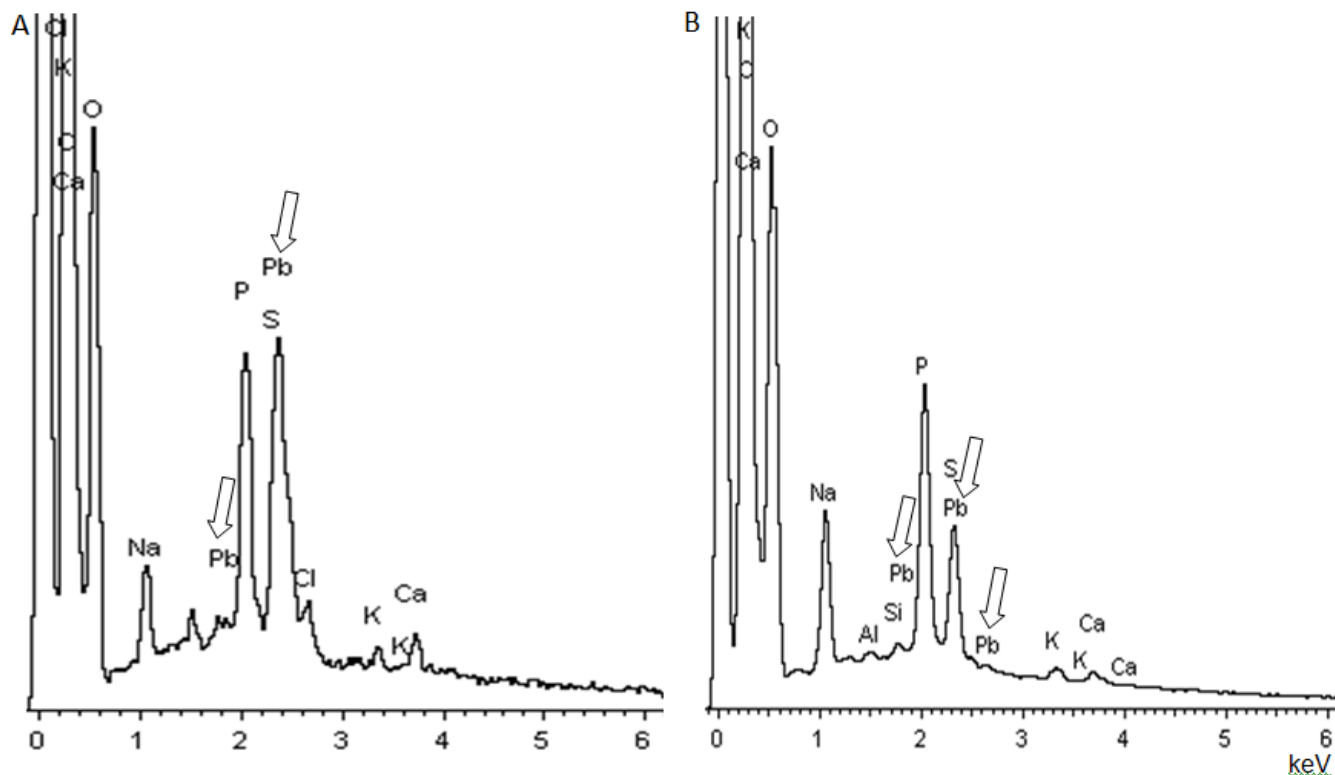


Figura VI.2. Espectros obtidos por microanálise por raios-x ilustrando a presença de Pb na região superficial (A) ou interna (B) das brânquias de *P. lineatus* expostos ao metal. Foram detectados picos característicos de C, K, Ca, O, Na, P, S e Cl em todos os grupos, oriundos da fita de carbono, do fixador utilizado ou da constituição do tecido branquial. Picos de Pb foram observados nas brânquias dos animais expostos ao metal a partir de 6 h de exposição (seta). Os gráficos foram gerados a partir de amostras de brânquias dos animais expostos ao Pb por 24 h.

1 fratura, a partir da 6ª hora de experimentação, e seguintes (Fig. VI.2B). Da mesma forma, a análise da
 2 superfície intacta do filamento, apontou a ocorrência de chumbo de 6 horas de exposição em diante
 3 (Fig. VI.2A). Muito embora a técnica não seja capaz de realizar análises quantitativas, as proporções dos
 4 elementos mostrados através de gráficos indicam que a quantidade de chumbo encontrado tanto na
 5 área interna, quanto na externa, cresceu com o decorrer do tempo de exposição. Ainda foi possível
 6 verificar comparativamente, que após 24 h de exposição ao chumbo a quantidade de metal encontrada
 7 na superfície apical das células epiteliais é maior do que no interior do tecido.

8

9 *Proteínas semelhantes à metalotioneínas*

10 A análise do conteúdo de PSMT (Fig. VI.3) no tecido branquial de *P. lineatus* durante 24 h de
 11 exposição ao chumbo mostrou um aumento significativo de quase 70% na concentração dessas
 12 proteínas após a 3ª h de experimento, em relação aos animais que ficaram expostos somente à água

1 pelo mesmo período. Este aumento persistiu nos períodos posteriores, e atingiu quase 240% da
 2 concentração de PSMT do CTR após 12 h de exposição ao Pb e manteve o dobro do valor do CTR no
 3 tempo seguinte.

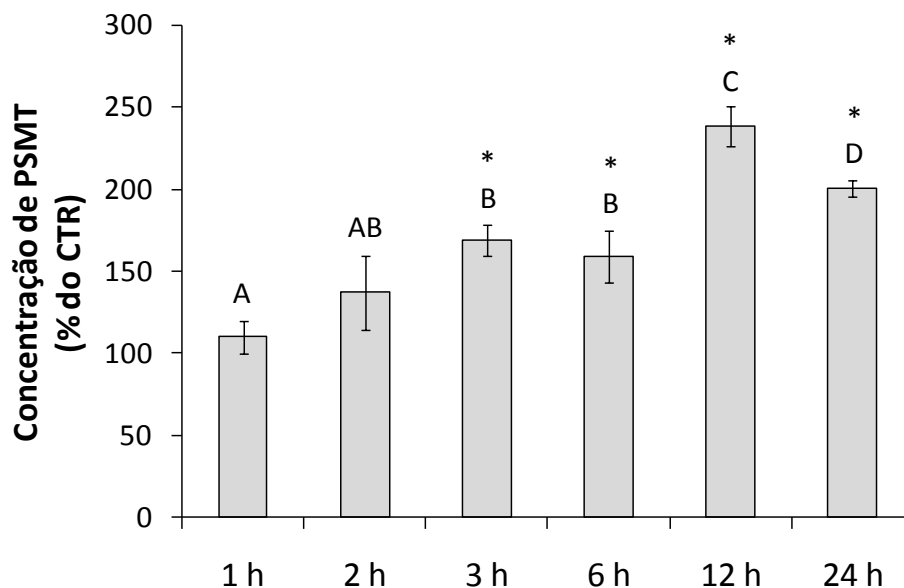


Figura VI.3. Variação (porcentagem do CTR \pm EP) do conteúdo de proteínas semelhantes à metalotioneínas (PSMT) nas brânquias de *P. lineatus* expostos ao chumbo por 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. * indica diferença significativa em relação ao CTR (100%). Letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

4 *Histopatologia*

5 A análise histológica de brânquias de *P. lineatus* do grupo CTR mostrou a histologia normal deste
 6 órgão, com um grande número de filamentos alinhados sustentados por estruturas cartilaginosas, uma
 7 grande população de células indiferenciadas na região interior e células achatadas, denominadas células
 8 pavimentosas (CPV) recobrimo o exterior, e a presença de células mucosas e células ricas em
 9 mitocôndrias (CRM) distribuídas espaçadamente ao longo do filamento. Inúmeras lamelas partem
 10 bilateralmente de cada filamento, formadas por CPV achatadas e de núcleo ovalado, que são unidas e
 11 sustentadas por células pilares, formando canais de circulação sanguínea. Estes canais apresentam
 12 tamanho relativamente constante, por onde circulam as células sanguíneas (Fig. VI.4A).

13 Não houve diferença entre os tipos de alterações encontradas em cada tratamento, porém foi
 14 observada uma maior frequência de algumas delas na condição experimental em comparação ao CTR. A
 15 alteração mais freqüente observada nos vasos sanguíneos nos animais CTR foi a congestão vascular (Fig.
 16 VI.4B), caracterizada pela presença simultânea de um grande número de células sanguíneas no canal

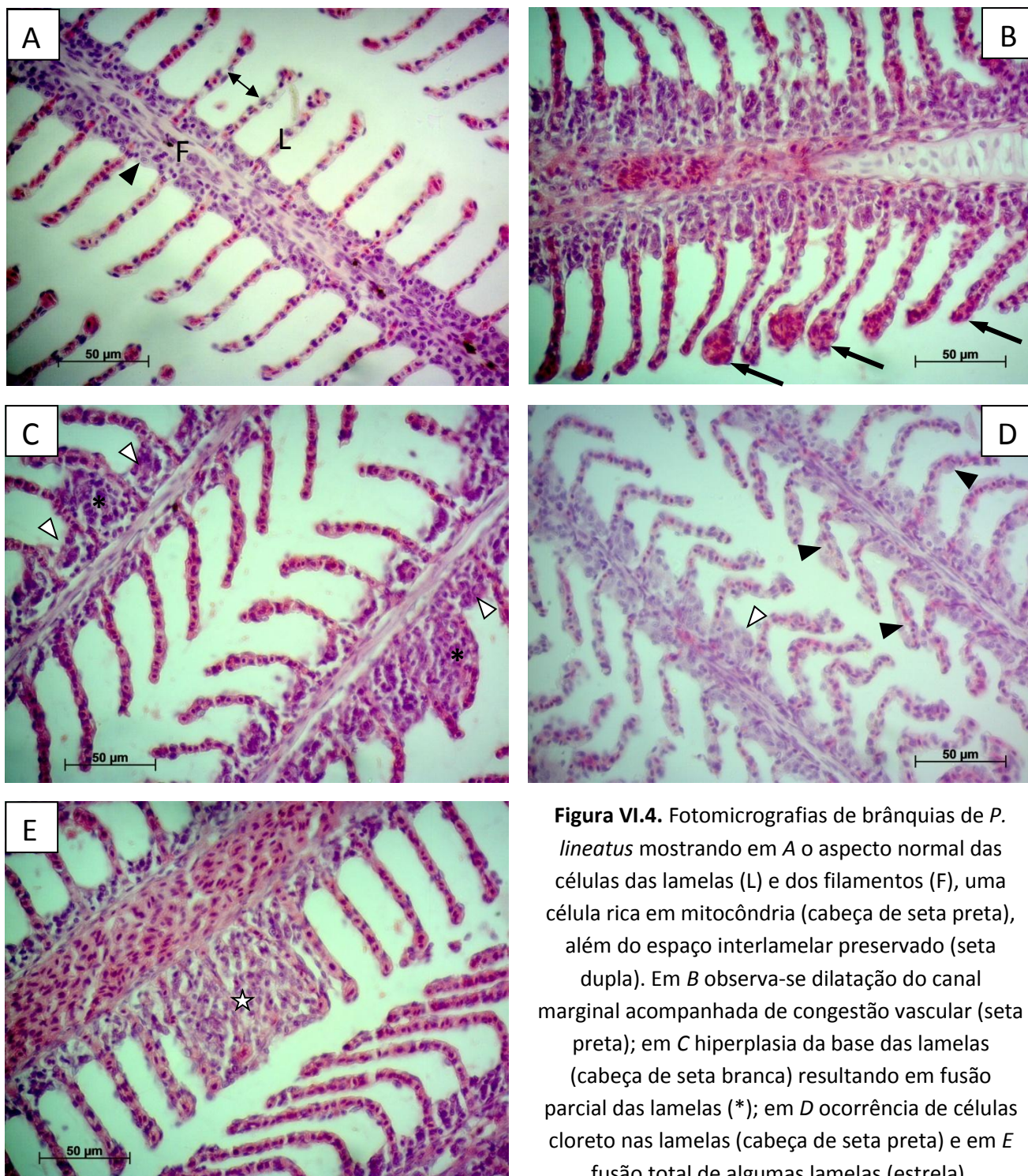


Figura VI.4. Fotomicrografias de brânquias de *P. lineatus* mostrando em A o aspecto normal das células das lamelas (L) e dos filamentos (F), uma célula rica em mitocôndria (cabeça de seta preta), além do espaço interlamelar preservado (seta dupla). Em B observa-se dilatação do canal marginal acompanhada de congestão vascular (seta preta); em C hiperplasia da base das lamelas (cabeça de seta branca) resultando em fusão parcial das lamelas (*); em D ocorrência de células cloreto nas lamelas (cabeça de seta preta) e em E fusão total de algumas lamelas (estrela).

1 marginal. Já dentre as alterações epiteliais, a mais frequentemente encontrada foi a hiperplasia na base
 2 das lamelas (Fig. VI.4C), caracterizada pela proliferação das células do filamento, privando os primeiros
 3 canais sanguíneos do contato com a água. Já para os animais expostos ao chumbo, a hiperplasia na base
 4 das lamelas e a hiperplasia das lamelas (Fig. VI.4C e D) foram as alterações epiteliais mais frequentes, a
 5 primeira já descrita anteriormente, e a segunda, caracterizada pela proliferação de células ao longo das
 6 lamelas, provocando um aumento da distância de difusão entre a água e o sangue. Por outro lado, nos
 7 vasos sanguíneos, a dilatação no canal marginal foi a alteração mais comum, onde o capilar mais distal
 8 da lamela apresenta a luz maior do que os demais capilares (Fig. VI.4E), podendo ou não ser
 9 acompanhado de congestão vascular. Outras alterações epiteliais e de vasos sanguíneos encontradas
 10 em uma menor frequência estão descritas na Tabela VI.1 e classificadas segundo seu estágio de
 11 severidade. Os valores do IAH (Fig. VI.5) de *P. lineatus* expostos ao chumbo ficaram entre 1,4 a 2 vezes
 12 maior do que a média dos CTR (média CTR: $1,65 \pm 0,32$) e em todos os tempo foram significativamente
 13 maiores que o CTR (p : 1 h = 0,023, 2 h = 0,005, 3 h = 0,050, 6 h = 0,003, 12 h < 0,001, 24 h = 0,005).
 14 Entretanto, esses valores de IAH não ultrapassaram 4, sendo classificados como baixo grau de
 15 severidade, sem prejuízo funcional para o órgão.

Tabela VI.1. Principais alterações histológicas encontradas nas brânquias de *P. lineatus* expostos ao chumbo durante 1, 2, 3, 6, 12 e 24h, e seus respectivos estágios de severidade.

Alterações histológicas branquiais	Estágio
Dilatação do canal marginal	I
Congestão vascular	I
Adelgaçamento do epitélio	I
Hipertrofia de células epiteliais	I
Hiperplasia da base da lamela	I
Hiperplasia da lamela	I
Elevação da lamela secundária	I
Fusão parcial das lamelas	I
Fusão completa de algumas lamelas	I
Aneurisma	II

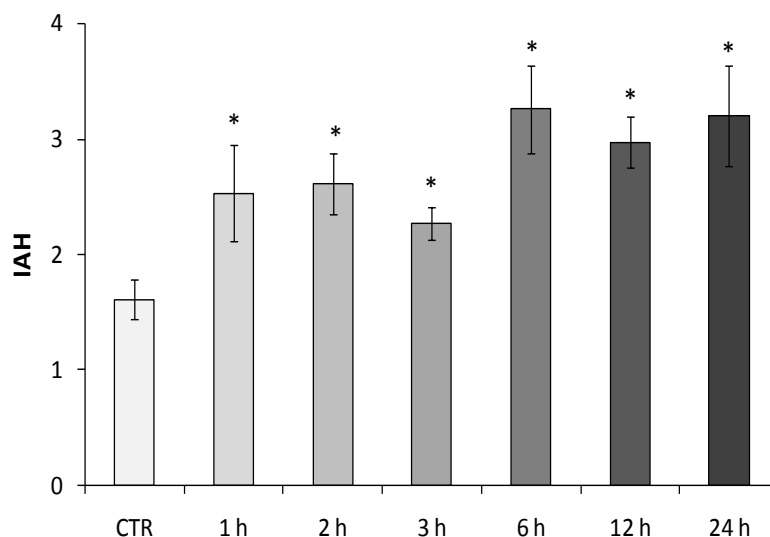


Figura VI.5. Índice de alterações histológicas (IAH) calculado (média ± EP) para as brânquias de *P. lineatus* expostos somente à água (CTR) ou ao chumbo pelos tempos de 1, 2, 3, 6, 12 e 24 h. * indica diferença estatística em relação ao grupo CTR ($p < 0,05$).

1 *Ultra-estrutura branquial*

2 Os filamentos branquiais de *P. lineatus* são recobertos por células epiteliais com limites bem
 3 definidos, cuja membrana plasmática apical apresenta evaginações dispersas assimetricamente de
 4 forma pontual ou linear concêntrica, formando uma rede de microcristas com aparente função de
 5 retenção de muco (Fig. VI.6A), tanto nas regiões desprovidas de lamelas, quanto na região interlamelar.
 6 Todavia, nas brânquias dos animais que ficaram expostos ao chumbo, a partir de 2 h a quantidade e o
 7 comprimento das microcristas apresentaram um ligeiro aumento e sua espessura também aumentou
 8 em 12 e 24 h (Fig. VI.6D).

9 As lamelas branquiais apresentam-se como dobras do epitélio branquial que elevam-se em mais
 10 de uma altura em relação ao filamento, formando quase um ângulo reto. Elas são predominantemente
 11 recobertas pelo mesmo tipo de célula presente no filamento, nestas, porém, estão ausentes as
 12 microcristas, sendo possível identificar elevações pontuais de formato arredondado, chamadas
 13 microvilosidades (Fig. VI.6B). Tais estruturas apresentaram-se mais pontiagudas nos animais que ficaram
 14 expostos ao chumbo por 12 ou 24 h (Fig. VI.6D).

15 As células ricas em mitocôndrias (CRM) nas brânquias dos animais CTR são encontradas
 16 preferencialmente nos filamentos, sendo possível identificar um pequeno número presente nas lamelas
 17 (Fig. VI.6A), estas células apresentam formato achatado, podendo ser encontradas alojadas em
 18 pequenas depressões com reduzida porção de sua membrana apical exposta. As CRM são ladeadas por

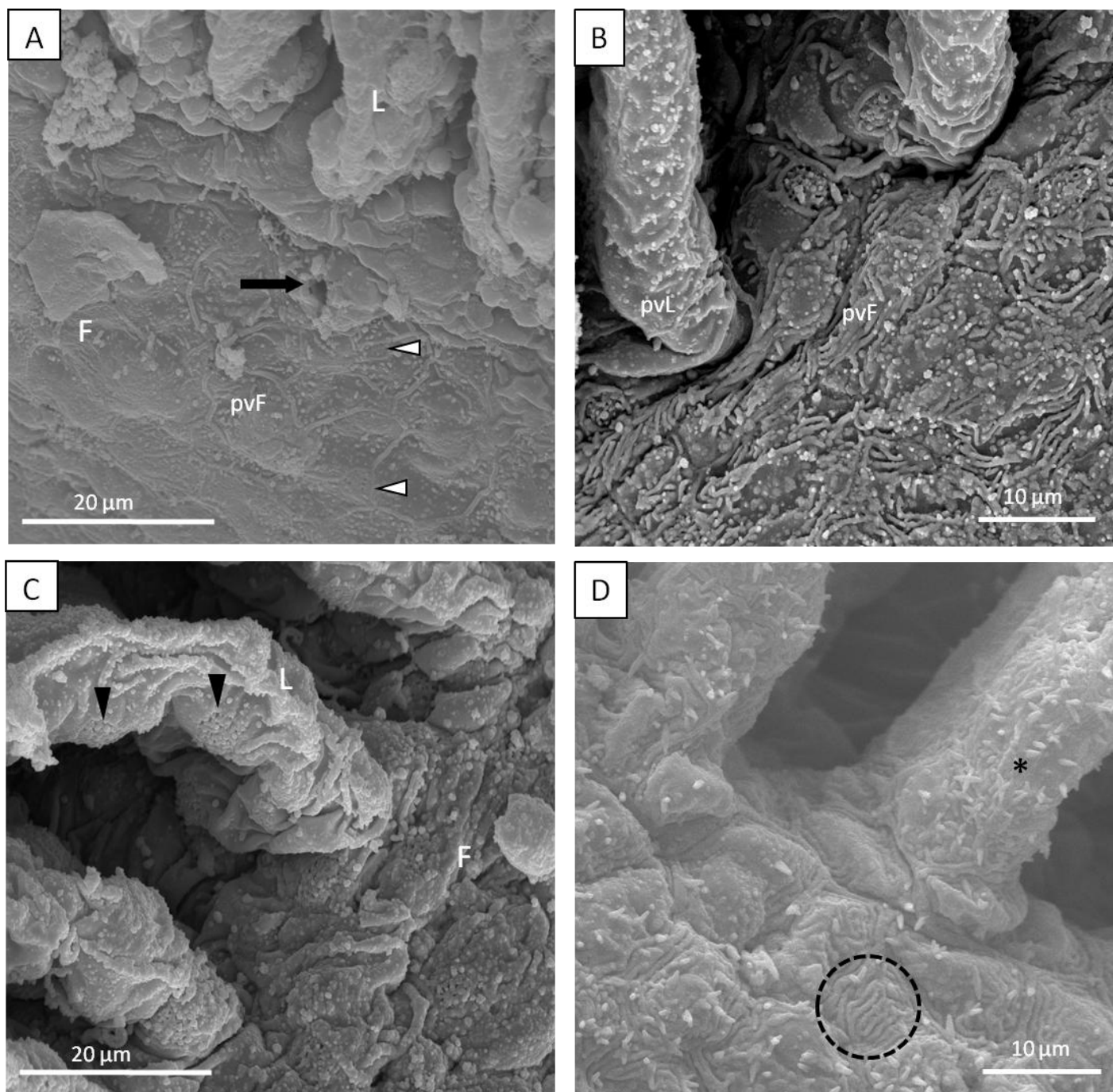


Figura VI.6. Eletromicrografias representativas de filamentos (F) branquiais de *P. lineatus*, no ponto de inserção das lamelas (L). Em um exemplar do grupo CTR (A) nota-se a presença de microcristas pontuais nas células pavimentosas dos filamentos (pvF), célula mucosa (seta preta) e células ricas em mitocôndrias (cabeça de seta branca) principalmente no filamento. Os animais expostos ao chumbo por 2 h (B) apresentaram um padrão mais complexo de microcristas nas células pavimentosas nos filamentos (pvF) e ausência de alteração nas lamelas (pvL). Após 3 h de exposição ao chumbo (C) foi possível observar o aumento de células ricas em mitocôndrias (cabeça de seta preta) nas lamelas. Os peixes expostos ao chumbo por 24 h (D) apresentaram um espessamento das microcristas das células pavimentosas no filamento (círculo) e microvilosidades nas células pavimentosas das lamelas com formato pontiagudo (*). Para maior clareza das imagens somente algumas células foram rotuladas.

1 algumas células epiteliais pavimentosas que as recobrem em grande parte, permitindo regular a área de
2 contato com o ambiente externo. Na membrana apical das CRM são visualizados um grande número de
3 invaginações conferindo a elas a aparência de esponja. Esse tipo celular distribui-se ao longo de todo o
4 filamento, com exceção da porção exterior desprovida de lamelas, onde suas aparições são raras. A
5 partir da 3ª hora de exposição ao chumbo foi identificado um aumento da frequência desse tipo celular
6 nas lamelas. Estas células apresentaram um formato mais arredondado, destacando-se da superfície em
7 comparação aos demais tipos celulares (Fig. VI.6C). Um terceiro tipo celular identificado foi a célula
8 mucosa (Fig. VI.6A). Estas células se localizam na área dos filamentos desprovida de lamelas e
9 apresentam formato cônico, elevando-se do epitélio com uma grande abertura, através da qual não é
10 possível visualizar seu interior. Embora o local de maior abundância desse tipo celular seja a região
11 exterior dos filamentos, algumas ocorrências de células mucosas foram verificadas na região medial.
12 Visualmente não foram verificadas alterações na morfologia, densidade ou distribuição deste tipo
13 celular.

14

15 *Células ricas em mitocôndrias (CRM)*

16 A técnica de imunohistoquímica para NKA permitiu identificar a ocorrência de um grande
17 número de CRM na área do filamento desprovida de lamelas, como pôde ser verificado através da MEV.
18 Contudo, para a análise de densidade celular discutida neste trabalho, foram consideradas apenas as
19 CRM presentes nas áreas onde as lamelas estão presentes. As células ricas em mitocôndrias nas
20 brânquias de *P. lineatus* apresentam-se tipicamente na região interlamelar dos filamentos, com
21 ocorrências menos freqüente nas lamelas (Fig. VI.7A), com uma proporção de aproximadamente de 75%
22 do total de células distribuídas ao longo dos filamentos nos animais que não foram expostos ao chumbo.
23 Porém, com a exposição ao Pb, verificou-se uma alteração na proporção de CRM entre as lamelas e os
24 filamentos (Fig. VI.7B), em todos os tempos experimentais. A análise do número absoluto, em relação à
25 área de tecido, mostrou uma redução gradual no número de CRM nos filamentos ao longo de todo o
26 experimento, partindo de uma média de 3285 ± 184 células nos CTR, para 2039 ± 694 cc. μm^{-2} após 24 h
27 de exposição ao Pb, sendo que diferença significativa foi verificada a partir da 3ª hora de
28 experimentação (p : 3 h = 0,018, 6 h = 0,050, 12 h = 0,043, 24 h = 0,025) (Fig. VI.8A). Além disso, já na
29 primeira hora de exposição houve uma redução na proporção de CRM nos filamentos, que passaram de
30 55% para 41% em 3 h de exposição ao metal (Fig. VI.8B). Simultaneamente, o número de CRM nas
31 lamelas (média CTR 1.399 cc. μm^{-2}) aumentou em média 70% em relação ao CTR nos tempos de 1 ($p <$

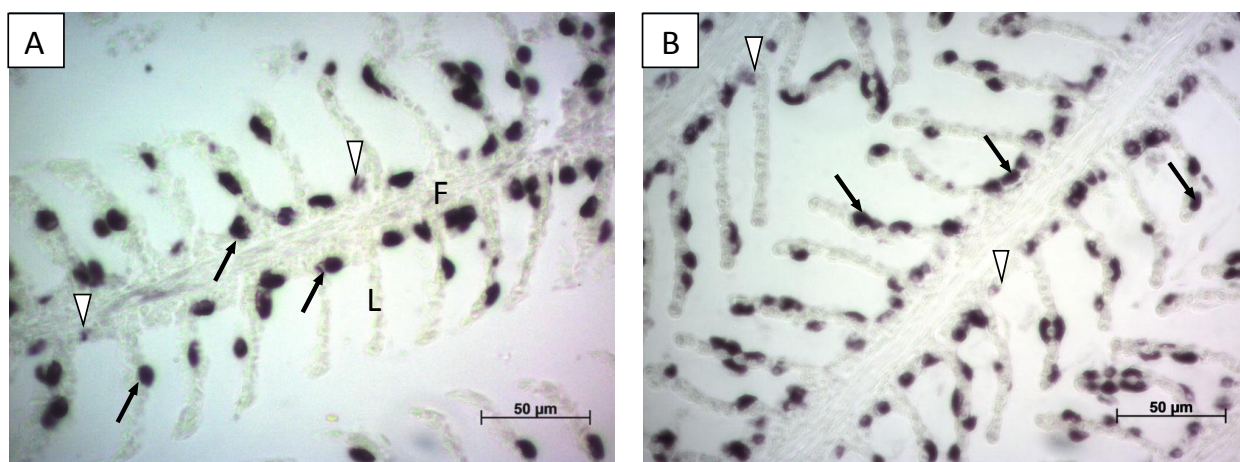


Figura VI.7. Localização imunohistoquímica da enzima $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ nas células ricas em mitocôndrias (CRM) de *P. lineatus* dos aquários CTR (A) ou expostos ao Pb por 24 h (B). Nota-se um predomínio de células que apresentam forte imunoreatividade para $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ (seta preta), e algumas células fracamente coradas (cabeça de seta). Verifica-se um aumento no número de CRM nas lamelas dos peixes expostos ao Pb. Para maior clareza das imagens somente algumas células foram indicadas.

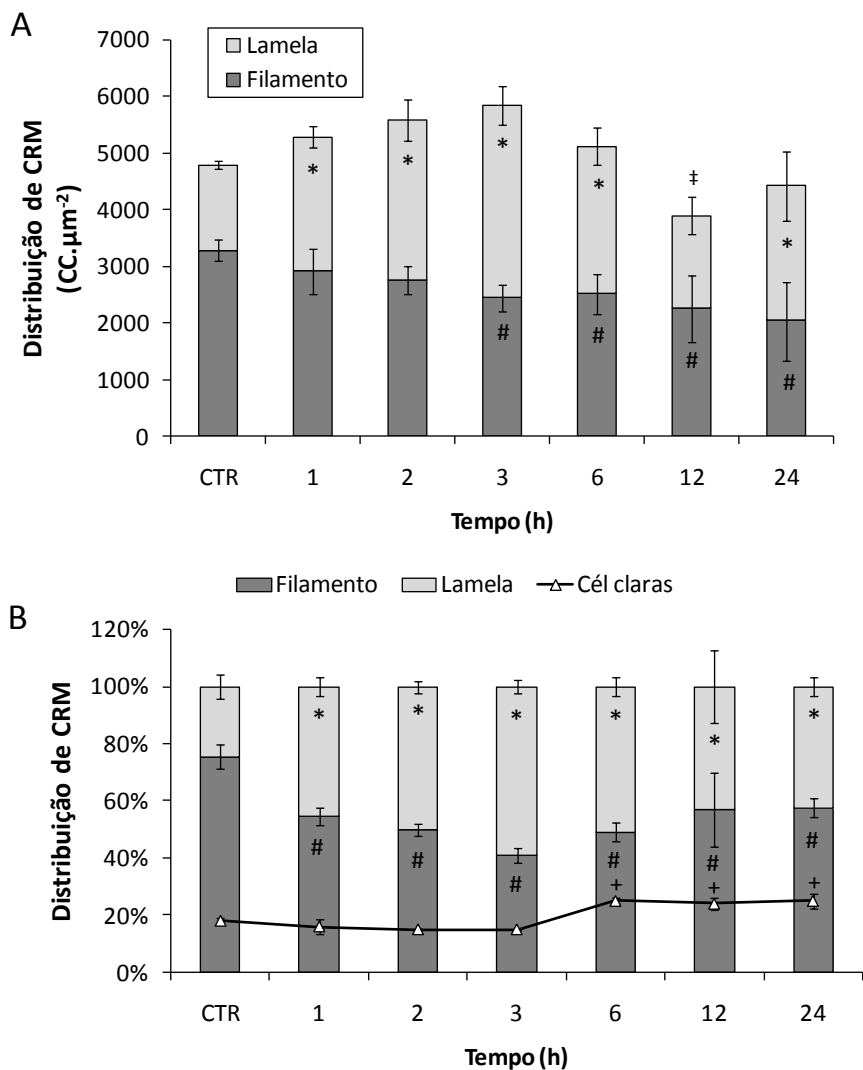


Figura VI.8. Densidade e localização (A) (média \pm EP) de células ricas em mitocôndrias (CRM) nas brânquias de *P. lineatus* expostos à água (CTR) ou ao chumbo por 1, 2, 3, 6, 12 ou 24 h. Proporção de distribuição das CRM entre as lamelas e os filamentos, e proporção de células claras (B) nas brânquias de *P. lineatus* expostos ao chumbo ou à água nas mesmas condições. Símbolos indicam diferença estatística em relação ao CTR ($p < 0,05$) nas lamelas (*), nos filamentos (#), no número total de células (‡) e na proporção de CRM claras (+).

1 0,001), 2 ($p = 0,002$), 3 ($p < 0,001$), 6 ($p = 0,003$) e 24 ($p = 0,003$) horas (Fig. VI.8A). Além disso, foi
2 observado, por meio da diferença de coloração, que aproximadamente 18% das células apresentavam
3 coloração mais clara nos animais CTR (Fig. VI.8B) e constatou-se um aumento na proporção de CRM
4 claras (Fig. VI.8B) a partir de 6 h de experimento (p : 6 h = 0,002, 12 h = 0,020, 24 h = 0,017), quando
5 estas passaram a representar cerca de 25% do total de células. Porém, a distribuição de células claras
6 permaneceu inalterada ao longo do tempo, em média 60% nos filamentos e 40% nas lamelas (dados não
7 mostrados).

8

9 VI. 3 Discussão

10 A proposta deste trabalho foi identificar a ocorrência de alterações morfológicas branquiais
11 dentro de 24 horas em *P. lineatus* após a exposição ao Pb. A concentração de Pb utilizada neste
12 experimento correspondeu a 70% da concentração encontrada por Yabe e Oliveira (1998) na bacia do
13 ribeirão Cambé (Londrina – PR, Brasil), onde também já foram verificadas altas concentrações do metal
14 associada ao sedimento (Almeida et al., 2005). Graças às características da água utilizada para os testes
15 toxicológicos, como dureza e a concentração de carbono orgânico baixas, que são parâmetros
16 importantes para a disponibilização do metal (Paquim et al., 2002), o chumbo que permaneceu
17 dissolvido corresponde, em média, a 85% do chumbo total adicionado. Tal concentração já foi testada
18 para esta espécie de teleosteo por Ribeiro et al. (2014), que, no decorrer de 96 h de exposição, além de
19 verificarem alterações de ordem osmorregulatórias e metabólicas, também reportaram alteração na
20 distribuição das CRM branquiais, e acúmulo de chumbo acentuado neste tecido. Além disso, outro
21 trabalho do mesmo grupo (Monteiro et al., 2011), também reportou efeitos genotóxicos desta
22 concentração de chumbo para as brânquias e outros tecidos, e o aumento do conteúdo de
23 metalotioneínas (MT) no tecido hepático. Por fim, as alterações histológicas branquiais dose-
24 dependente também já foram reportadas para *P. lineatus* após 96 horas de exposição ao Pb (Martinez
25 et al., 2004).

26 A concentração total de metais na água não representa os reais riscos para a saúde da biota,
27 uma vez que a porção dissolvida destes elementos é que fica biodisponível. Metais dissolvidos estão
28 sujeitos à precipitação, adsorção e absorção, estes fenômenos fazem com que sua concentração e
29 disponibilidade se reduza ao longo do tempo (Paquim et al., 2002), mas o experimento de 24 horas, não
30 demonstrou ser tempo suficiente para se observar esta diminuição. Apesar disso, pode-se afirmar que a

1 absorção pela biota ocorreu, uma vez que, a análise do tecido branquial por espectrofotometria de
2 absorção atômica, apontou para a presença de concentrações elevadas de chumbo desde a primeira
3 hora de exposição. Órgãos que estão diretamente em contato com o poluente tendem a apresentar
4 grandes concentrações de metal após curto período de exposição (Alves e Wood, 2006; Suiçmez et al.,
5 2006; Palaniappan et al., 2008; Mager, 2012), justificando o rápido e acentuado aumento de Pb
6 encontrado nas brânquias de *P. lineatus* que tiveram contato com este contaminante. Estudos
7 envolvendo espécies de teleósteos de região temperada demonstraram que as brânquias são um dos
8 órgãos com maior acúmulo de metal após exposição curta (Ay et al., 1999; Rogers et al., 2003; Suiçmez
9 et al., 2006; Huang et al., 2007), além disso, Lombardi et al. (2010) estudando *P. lineatus* residentes de
10 áreas contaminadas, encontraram concentrações de chumbo consideráveis, demonstrando que, mesmo
11 após exposição crônica, este tecido permanece alvo do metal.

12 As brânquias são importantes como porta de entrada para contaminantes presentes na água
13 (Vinodhini e Narayanan, 2008; Palaniappan et al., 2009; Mager, 2012), e, conseqüentemente, o primeiro
14 órgão capaz de reter metais em peixes de água doce (Rogers e Wood, 2004; Rogers et al., 2003; 2005;
15 Grosell et al., 2006; Spokas et al., 2006), destacando-se como bons indicadores de qualidade de água
16 (Palaniappan et al., 2009). O grupo de Tao (1999) descreveu que para penetrar nas células branquiais, o
17 chumbo dissolvido na água adere ao muco, que é produzido com o intuito de criar uma barreira de
18 proteção para a entrada de contaminantes (Dang et al., 1999, Cicik et al., 2004), e dali entra nas células
19 através de proteínas transportadoras ou por processos fagocíticos. Desta forma, o aumento da
20 concentração de chumbo nas brânquias pode ser reflexo de uma maior produção de muco no tecido
21 branquial (Palaniappan et al., 2009; Mager, 2012). Além disso, a função excretora da brânquia cria um
22 microambiente com pH propício para que o chumbo se dissocie de partículas às quais pode estar
23 aderido, tornando-se mais biodisponível (Playle, 1998; Tao et al., 1999). Inúmeros fatores contribuem
24 para o acúmulo de chumbo gradual encontrado nas brânquias de *P. lineatus*, uma vez que os agentes
25 responsáveis pelo transporte de íons possuem alta afinidade por este metal (Playle, 1998; Nussey et al.,
26 2000; Mager, 2012). As semelhanças químicas entre o chumbo e o íon cálcio, fazem deste primeiro um
27 forte competidor pelos canais responsáveis pela absorção do metal essencial (Rogers e Wood, 2003;
28 Alves e Wood, 2006; Alves et al., 2006; Mager, 2012), podendo, muitas vezes, prejudicar funções
29 dependentes das concentrações ideais de cálcio plasmático. Apesar de os níveis de Pb aumentarem
30 gradualmente ao longo de todo o período de exposição, sabe-se que nem todo o metal que atravessa o
31 tecido branquial fica ali retido, uma vez que grandes quantidades deste poluente podem também ser

1 encontradas em outros tecidos moles, e também no sangue (Mager, 2012; Ribeiro et al., 2014), como,
2 de fato, foi verificado e apresentado pelo capítulo IV deste trabalho.

3 O aumento da concentração metálica em um tecido, geralmente é associado ao aumento de MT
4 (Cicik et al., 2004). Apesar de muitos pesquisadores defenderem o uso prioritário do tecido hepático
5 para a quantificação de MT (Palaniappan et al., 2009; Cretì et al., 2010; Mieiro et al., 2011), as brânquias
6 de *P. lineatus* apresentaram-se bastante responsivas à presença do chumbo. Alguns autores reportam
7 que as brânquias não são o tecido ideal para quantificar MT (Hamza-Chaffai et al., 1997; Falfushynska e
8 Stoliar, 2009; Cretì et al., 2010; Mieiro et al., 2011), entretanto, de Boeck e colaboradores (2010)
9 constataram que a síntese destas moléculas nas brânquias frente à exposição ao cobre é muito
10 particular de cada espécie, e pode variar em função do tempo de exposição. Os resultados encontrados
11 no presente estudo mostram que a síntese de PSMT nos filamentos branquiais de *P. lineatus* expostos
12 ao Pb, apresentou aumento significativo a partir da 3ª hora de exposição, elevando-se ainda mais nos
13 tempos subsequentes. O conteúdo de MT nas brânquias dos animais expostos ao Pb foi,
14 aproximadamente, o dobro em relação aos animais que ficaram somente na água desde a 6ª hora de
15 exposição, esta rápida resposta das brânquias pode estar no fato destas acumulem Pb desde o
16 primeiro contato com o mesmo.

17 Dang (1999) e Alvarado (2006 e 2007) e suas equipes descobriram, através da marcação
18 imunohistoquímica, que a maior parte da MT produzida pelas brânquias de *Scophthalmus maximus*,
19 após exposição a diferentes espécies metálicas, é sintetizada pelas CRM. Somado a isso, Dang et al.
20 (1999) reporta que a expressão de MT ocorre nos estágios iniciais de diferenciação celular no epitélio
21 branquial, e mantém-se expressa pelo resto do ciclo de vida da célula. Os resultados encontrados no
22 presente trabalho corroboram estes postulados, uma vez que a marcação imunohistoquímica para NKA
23 indicou o processo de diferenciação das CRM. Assim sendo, especula-se que o aumento de PSMT
24 encontrado no tecido branquial dos peixes expostos ao metal esteja também relacionado à renovação
25 na população de CRM branquiais ou outros tipos celulares. Por fim, Alvarado et al. (2006) sugerem que
26 muitas metodologias aplicadas na análise de MT sejam capazes de camuflar uma possível elevação na
27 síntese desta proteína. Desta forma, embora a MT tenha sido eficaz para demonstrar efeitos do Pb nas
28 brânquias do peixe a ele exposto, não se recomenda a sua aplicação isolada para estudos de
29 biomonitoramento (Campana et al., 2003; Mieiro et al., 2011), uma vez que muitos fatores podem
30 influenciar sua resposta.

31 A produção de MT capacita esses animais a tolerar ambientes contaminados, uma vez que estas
32 proteínas são capazes de sequestrar o metal e tirá-lo de circulação. A presença de grupamentos

1 sulfidrila, contendo um grande número de resíduos de cisteína, que apresentam grande afinidade por
2 espécies metálicas, permite às MT quelarem uma grande quantidade de íons metálicos, essenciais ou
3 não essenciais (Roesijadi, 1996; Van der Oost et al., 2003; Capdevila et al., 2012). Porém, estas proteínas
4 permanecem alojadas no interior de organelas celulares, sendo possível, que, devido sua atuação, o
5 metal fique retido no meio intracelular, como foi verificado pelas análises de EDS, que identificou a
6 presença de chumbo no interior do tecido branquial após 6 h de exposição. O uso da técnica de
7 detecção de elementos em pequenas amostras, aliado à MEV, é defendido como ferramenta importante
8 e de grande potencial para estudos fisiológicos e toxicológicos em brânquias de peixes (Olson, 1996).

9 O fato de estar diretamente em contato com a água e com os contaminantes nela presentes
10 obriga as brânquias a apresentarem alguns sistemas de defesa, a fim de que a distância de difusão entre
11 os xenobióticos e o sangue seja aumentada (Suiçmez et al., 2006). Algumas vezes, essas defesas
12 representam “más adaptações”, uma vez que também dificultam a passagem de oxigênio e íons
13 importantes a homeostase, podendo ocasionar desequilíbrio osmoiônico (Martinez et al., 2004). Apesar
14 de se acreditar que as alterações histológicas ocorram após exposição aguda somente quando os níveis
15 de contaminantes forem altos suficientes, e que baixas concentrações só são capazes de provocar
16 alterações em exposição crônica (Van der Oost, 2003), neste trabalho verificou-se que concentrações
17 bem abaixo da CL₅₀ (96 h) para *P. lineatus* (Martinez et al., 2004), são capazes de dar início a um
18 processo de anomalias no epitélio branquial nas primeiras horas, visto que, em qualquer tempo de
19 exposição ao chumbo, verificou-se um IAH maior do que na condição CTR. Contudo, os valores de IAH
20 ainda apresentam-se abaixo de níveis considerados danosos à saúde do animal, indicando as funções
21 branquiais que neste estágio não sofreram prejuízos inerentes.

22 Um levantamento feito por Mallat (1985) constatou que as alterações branquiais mais comuns
23 frente à exposição aguda a compostos irritantes ocorrem em âmbito de epitélio, sendo as lesões que
24 atingem os vasos, menos frequentes. Das anomalias epiteliais encontradas em *P. lineatus* expostos ao
25 Pb, as mais comuns foram hiperplasia do epitélio dos filamentos e lamelas, resultando em alguns casos,
26 em fusão lamelar. Este conjunto de alterações está entre as mais frequentemente reportadas para
27 teleósteos dulcícolas expostos a contaminantes (Mallat, 1985), e foram também encontradas por
28 Suiçmez et al. (2006) para *Oncorhynchus mykiss* e por Martinez et al. (2004) para *P. lineatus* expostos a
29 concentrações mais elevadas de chumbo. Porém, estes últimos autores reportaram, ainda, alterações
30 mais severas, que, comprovadamente, foram capazes de comprometer o bom funcionamento do órgão.
31 Experimentos *in situ* com a mesma espécie em trechos de um rio contaminado por efluentes domésticos

1 e industriais, também provocaram alterações na morfologia das brânquias, e outros tecidos, com maior
2 incidência de lesões de primeiro estágio (Camargo e Martinez, 2007).

3 De forma semelhante, a exposição de *P. scrofa* (= *lineatus*) ao cobre por 96 h, culminou em
4 alterações severas do tecido branquial capazes de interferir nos processos de tomada iônica e trocas de
5 gases (Mazon et al., 2002a, b). As alterações reportadas por este grupo de pesquisadores também foram
6 averiguadas por meio de análise através de técnicas de microscopia eletrônica de transmissão e
7 varredura, que apontaram para uma grande incidência de processos necróticos e apoptóticos dentre as
8 CPV e CRM. Em contrapartida, a aplicação da técnica de imunohistoquímica para NKA permitiu verificar
9 que não houve alteração no número dessas células no epitélio branquial, sugerindo uma intensa
10 renovação desse tipo celular (Mazon et al., 2002a). A morte de CRM em brânquias de *P. lineatus*
11 também foi descrita por Camargo e Martinez (2009) após exposição ao alumínio, em uma tentativa de
12 eliminação do metal nelas adsorvido. De forma semelhante, este trabalho mostrou, através da
13 marcação imunohistoquímica para NKA, que a exposição de *P. lineatus* ao Pb ao longo de 24 h, parece
14 alterar as CRM branquiais quanto a sua distribuição.

15 As CRM estão localizadas tipicamente no epitélio do filamento, com poucas células presentes
16 nas lamelas (Laurent, 1984; Perry, 1997), porém sob condições como liberação de cortisol, hormônio do
17 crescimento, prolactina, ou exposição à água pobre em íons, pode ocorrer um aumento destas células
18 no epitélio das lamelas (Perry, 1997; Goss et al., 1998). Os resultados encontrados neste trabalho
19 sugerem que este aumento se deva à transferência de CRM diferenciadas da região do filamento em
20 direção às lamelas, já que um decaimento da densidade de CRM nos filamentos em detrimento de um
21 acréscimo desse tipo celular junto às lamelas foi observado desde as primeiras horas, sugerindo a
22 pronta migração de células entre estas regiões da brânquia. Em seu artigo de revisão Hirose et al. (2003)
23 sugerem que as CRM que migram para as lamelas são células do tipo β , especializadas em absorção,
24 uma vez que um dos estímulos para que esta migração ocorra é de ordem osmorregulatória (Perry,
25 1997; Dang et al., 2000a), desordem esta que já foi verificada para *P. lineatus* ao ser exposto ao Pb
26 (Martinez et al., 2004; Ribeiro et al., 2014).

27 Observou-se um grande número de células marcadas pela técnica imunohistoquímica para NKA
28 em *P. lineatus* expostos ao Pb localizadas na base dos filamentos, onde ocorre a diferenciação desse tipo
29 celular, assim como das demais células do epitélio branquial (Dang et al., 1999, 2000b). A priori, células
30 fracamente coradas por esta técnica são consideradas em processos necróticos ou apoptóticos (Dang et
31 al., 2000b). A contagem diferencial de células quanto à intensidade de coloração indicou que, a partir de
32 6 h de exposição ao chumbo, ocorreu um aumento no percentual de células claras, de 16% para 25%,

1 tanto nas lamelas quanto nos filamentos. Isso indica que as defesas exercidas pela MT e outros processo
2 bioquímicos ativados pela célula (Monteiro et al., 2011), foram incapazes de resguardar 100% dessas
3 células, chegando ao ponto de reduzir significativamente o número total de CRM nas brânquias de *P.*
4 *lineatus* expostos por 12 h ao Pb. Concomitantemente, houve um aparente início de recuperação do
5 percentual de CRM localizadas no filamento, sugerindo o início do processo de diferenciação celular a
6 partir de células tronco localizadas na base dos filamentos.

7 Tal alteração, no entanto, não pôde ser confirmada através da técnica de MEV, uma vez que, as
8 novas células formadas levam entre 2 e 5 dias para emergir até a superfície do filamento, e, a partir dali,
9 se movimentar em direção às lamelas (Dang et al., 1999). Contudo, a identificação de um maior número
10 de CRM que se destacam das demais nas lamelas das brânquias dos animais expostos ao Pb a partir de 3
11 h, reforça a ideia de migração das células a partir do filamento. Outra observação proporcionada pela
12 MEV é decorrente da análise descritiva da ultraestrutura das células epiteliais da brânquia, que permitiu
13 identificar o aumento em número e espessura das microcristas das CPV que recobrem o filamento após
14 exposição ao chumbo. Estas estruturas já foram descritas por diversos autores com função de conferir
15 plasticidade à célula, permitindo distensão da membrana (Olson, 1996), o aumento da superfície celular
16 funcional (Hughes e Wright, 1970; Lewis, 1979; Goss et al., 1998; Evans et al., 2005), e a retenção de
17 muco (Hughes e Wright, 1970; Lewis, 1979; Olson, 1996). Em contato com poluentes, as CPV dos
18 filamentos branquiais apresentam uma resposta estereotipada de redução até o completo
19 desaparecimento das microcristas (Mallatt, 1985; Mazon et al., 2002a; Marcato et al., 2014), contudo, a
20 exposição a um herbicida induziu a proliferação destas estruturas em *P. lineatus* (Paulino et al., 2012),
21 no intuito de aumentar a retenção de muco, contribuindo para a impermeabilidade tecidual. De forma
22 semelhante, as brânquias dos animais expostos ao Pb, a partir de 2 h também apresentaram alterações
23 quanto à quantidade e comprimento das microcristas, sendo que, após 12 h de exposição ao chumbo,
24 foi identificado ainda o espessamento das mesmas. O tamanho e formato das microcristas podem ser
25 afetados pela salinidade, eletrólitos e hormônios (Olson, 1996), e o aumento da concentração de gás
26 carbônico sanguíneo ou o aumento do cortisol plasmático também são situações onde foi verificada a
27 multiplicação das microvilosidades na membrana apical das CPV (Goss et al., 1994). Desta forma, estas
28 alterações sugerem que o Pb esteja promovendo alterações internas que refletem rapidamente na
29 ultraestrutura das células branquiais no intuito de restabelecer a eficiência funcional do tecido.

30 As CPV correspondem a mais de 90% da superfície do filamento branquial (Goss et al., 1998;
31 Wilson e Laurent, 2002; Evans et al., 2005), e evidências sugerem o seu envolvimento na regulação

1 ácido-base (Goss et al., 1994; Goss et al., 1998; Wilson e Laurent, 2002) e hiperregulação de sódio (Goss
2 et al., 1998; Evans et al., 2005). Para que ocorra a captação deste íon, a célula se utiliza de um potencial
3 elétrico gerado pela eliminação de íons hidrogênio através da H⁺-ATPase tipo V apical (Evans et al.,
4 2005), mas quando as necessidades da célula suplantam a capacidade de transporte desses
5 transportadores, vesículas localizadas logo abaixo da membrana fundem-se à mesma acrescentando
6 uma nova população de dessas ATPases (Goss et al., 1998; Wilson e Laurent, 2002). Esta resposta
7 aumentaria as microcristas da superfície apical, uma vez que novos fragmentos de membrana são
8 adicionados estendendo a área de absorção. Da mesma forma que Goss et al. (1998) sugeriram que as
9 alterações morfológicas que ocorrem na célula pavimentosa durante exposição à hipercapnia refletem
10 mudanças na necessidade de transporte, especula-se que, também o Pb, devido à sua conhecida
11 capacidade de desregulação do íon sódio (Rogers et al., 2003; Martinez et al., 2004; Rogers e Wood,
12 2004; Rogers et al., 2005; Alves e Wood, 2006; Ribeiro et al., 2014), possa estar provocando tais
13 respostas. Esta hipótese vai ao encontro das concentrações de sódio plasmático apresentadas no
14 capítulo V, que mostra uma recuperação da natremia em 24 h, após a redução ocorrida em 6 e 12 h de
15 exposição ao metal. Contudo a determinação da atividade da H⁺-ATPase no tecido branquial não condiz
16 com este aumento. A exposição de *Channa punctata* a uma mistura de metais por períodos de 7 a 15
17 dias, revelou um aumento na produção de muco somado a dilatação das microcristas das CPV
18 filamentosas, na tentativa de prevenir a entrada de metais. Além disso, após 30 dias de exposição, os
19 autores também reportaram uma má-formação da arquitetura das microcristas, mas que não refletiram
20 em um desequilíbrio homeostático para o animal (Pandey et al., 2008).

21 Quanto ao aumento das microvilosidades encontrado nas CPV lamelares dos animais expostos
22 ao Pb, acredita-se que sua presença confira a elas plasticidade e flexibilidade, permitindo o aumento da
23 superfície celular e a curvatura da lamela, sem que haja dano às membranas, ou necessidade de síntese
24 de lipídeos e proteínas (Olson, 1996). A topografia das CPV das lamelas varia muito entre as espécies
25 com base em características filogenéticas e fisiológicas, podendo apresentar microvilosidades pontuais,
26 ou elevações que formam linhas concêntricas aparentando impressão digital, ou ainda ser totalmente
27 desprovidas dessas especializações de membrana (Olson, 1996). Porém, o padrão das microvilosidades
28 na superfície das células lamelares pode ser alterado por doses crônicas de metais (Kendall e Dale,
29 1979). Goss et al. (1998) percebeu que uma espécie de peixe, que, em condições normais, não
30 apresenta qualquer tipo de elevação na membrana apical das CPV das lamelas, passa a desenvolver
31 microvilosidades quando exposto à hipercapnia. Ao encontro disso, Lewis (1979) reportou que a
32 redução dessas estruturas nas CPV lamelares prejudica a eficiência das trocas gasosas. Desta maneira, a

1 contribuição das microvilosidades nesse tipo celular para a captação de oxigênio e excreção de gás
2 carbônico, torna-se inegável, sugerindo que o surgimento dessas estruturas nas CPV dos animais
3 expostos ao chumbo possa ser resposta a uma situação de hipóxia provocada pelas alterações
4 branquiais encontradas (Mallat, 1985). Desta forma, as alterações da superfície das CPV das lamelas
5 descritas nos animais expostos ao Pb, podem indicar uma resposta a uma suposta redução na eficiência
6 de trocas gasosas no epitélio respiratório.

7 As análises empregadas neste trabalho revelaram-se ferramentas adequadas para a detecção de
8 alterações morfológicas causadas pela curta exposição ao Pb nas brânquias de *P. lineatus*, reafirmando a
9 importância da verificação de ocorrências histopatológicas em tecidos de íntimo contato com agentes
10 poluidores. O contato com o Pb estimulou a produção de MT no tecido branquial a partir de 3 h de
11 exposição, indicando que, ao contrário da maioria das espécies teleósteas, o Pb foi um bom indutor para
12 a síntese desta proteína nas brânquias. A presença da MT no tecido branquial pode ter sido uma das
13 prováveis causas da presença de chumbo no meio intracelular a partir de 6 h de exposição detectado via
14 EDS, já que a técnica espectrofotométrica de absorção atômica, apesar de já ter apontado para um
15 aumento do metal desde a primeira hora de exposição, não permite a distinção da localização do
16 mesmo. Este trabalho também sugere que o aumento da concentração de MT esteja relacionado com as
17 alterações que envolvem as CRM, uma vez que é durante o processo de diferenciação desse tipo celular
18 que ocorre a síntese intensa desta proteína. A marcação para NKA permitiu identificar a migração das
19 CRM dos filamentos em direção às lamelas após poucas horas de contato com o chumbo, bem como a
20 ocorrência de diferenciação celular nos filamentos da 6ª hora de exposição em diante. Outras alterações
21 histopatológicas também foram verificadas, contudo de baixo grau de severidade sobre o
22 funcionamento do órgão. Porém, as análises de MEV permitiram identificar a ocorrência de alterações
23 ultra-estruturais na morfologia da membrana plasmática das CPV, que podem ser reflexo de desvios da
24 homeostase de gases e/ou íons plasmáticos.

25

26 **VI. 4 Referências Bibliográficas**

27 Almeida JS, Meletti PC, Martinez CBR, 2005. Acute effects of sediments taken from an urban stream on
28 physiological and biochemical parameters of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp.
29 Biochem. Physiol. 140C, 356-363.

30 Alvarado NE, Cancio I, Hylland K, Marigómez I, Soto M, 2007. Immunolocalization of metallothioneins in
31 different tissues of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd. Histol. Histopathol. 22, 719-728.

- 1 Alvarado NE, Quesada I, Hylland K, Marigómez I, Soto M, 2006. Quantitative changes in metallothionein
2 expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn
3 and after a depuration treatment. *Aquat. Toxicol.* 77, 64-77.
- 4 Alves LC, Wood CM, 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout
5 (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.* 78, 217–232.
- 6 Alves LC, Glover CN, Wood CM, 2006. Dietary Pb accumulation in juvenile freshwater rainbow trout
7 (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 615–625.
- 8 Ay Ö, Kalay M, Tamer L, Canli M, 1999. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish
9 *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na, K-ATPase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62,
10 160–168.
- 11 Camargo MMP, Martinez CBR, 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged
12 in an urban stream. *Neotrop. Ichthyol.* 5, 327-336.
- 13 Camargo MMP, Fernandes M.N, Martinez CBR, 2009. How aluminium exposure promotes
14 osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.*
15 94, 40-46.
- 16 Campana O, Sarasquete C, Blasco J, 2003. Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and
17 lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicol.*
18 *Environ. Saf.* 55, 116–125.
- 19 Capdevila M, Bofil R, Palacios Ò, Atrian S, 2012. State-of-the-art of metallothioneins at the beginning of
20 the 21st century. *Coordin. Chem. Rev.* 256, 46-62.
- 21 Cicik B, Ay Ö, Karayakar F, 2004. Effects of lead and cadmium interactions on the metal accumulation in
22 tissue and organs of the Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 141–
23 148.
- 24 Cretì P, Trinchella F, Scudiero R, 2010. Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in
25 tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environ. Monitor.*
26 *Assess.* 165, 321-329.
- 27 Dang Z, Lock RAC, Flik G, Wendelaar-Bonga SE, 1999. Metallothionein response in gills of *Oreochromis*
28 *mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Am. J. Physiol.* 277, R320-R331.

- 1 Dang Z, Balm PHM, Flik G, Wendelaar-Bonga SE, Lock, RAC, 2000a. Cortisol increases Na^+/K^+ -ATPase
2 density in plasma membranes of gill chloride cells in the freshwater tilapia *Oreochromis*
3 *mossambicus*. J. Exp. Biol. 203, 2349-2355.
- 4 Dang Z, Lock RAC, Flik G, Wendelaar-Bonga SE, 2000b. Na^+/K^+ -ATPase immunoreactivity in branchial
5 chloride cells of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper. J. Exp. Biol. 203, 379-387.
- 6 de Boeck G, Eyckmans M, Lardon I, Bobbaers R, Sinha AK, Blust R, 2010. Metal accumulation and
7 metallothionein induction in the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. Comp. Biochem. Physiol.
8 155A, 503–508.
- 9 Evans DH, Piermarini PM, Choe KP, 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange,
10 osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. Physiol. Rev. 85, 97-177.
- 11 Falfushynska HI, Stoliar OB, 2009. Function of metallothioneins in carp *Cyprinus carpio* from two field
12 sites in Western Ukraine. Ecotoxicol. Environ. Saf. 72, 1425–1432.
- 13 Goss GG, Laurent P, Perry SF, 1994. Gill morphology during hypercapnia in brown bullhead (*Ictalurus*
14 *nebulosus*): role of chloride cells and pavement cells in acid-base regulation. J. Fish. Biol. 45, 705-
15 718.
- 16 Goss GG, Perry SF, Fryer JN, Laurent P, 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater
17 fishes. Comp. Biochem. Physiol. 119A, 107-115.
- 18 Grosell M, Gerdes R, Brix KV, 2006. Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity
19 in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. Comp. Biochem. Physiol. 143C,
20 473–483.
- 21 Hamza-Chaffai A, Amiard-Triquet C, El Abed A, 1997. Metallothionein-like protein: Is it an efficient
22 biomarker of metal contamination? A case study based on fish from the Tunisian Coast. Arch.
23 Environ. Contam. Toxicol. 33, 53–62.
- 24 Hirose S, Kaneko T, Naito N, Takei Y, 2003. Molecular biology of major components of chloride cells.
25 Comp. Biochem. Physiol. 136B, 593–620.
- 26 Huang ZW, Zhang O, Chen J, Zhuang ZX, Wang XR, 2007. Bioaccumulation of metals and induction of
27 metallothioneins in selected tissues of common carp (*Cyprinus carpio* L.) co-exposed to cadmium,
28 mercury and lead. Appl. Organomet. Chem. 21, 101-107.

- 1 Hughes GM, Wright DE, 1970. A comparative study of the ultrastructure of the water-blood pathway in
2 the secondary lamellae of teleost and elasmobranch fishes - benthic forms. *Zellforsch.* 104, 478-493.
- 3 Kendall MW, Dale JE, 1979. Scanning and transmission electron microscopic observations of rainbow
4 trout (*Salmo gairdneil*) gill. *J. Fish Res. Board.* 36, 1072-1079.
- 5 Laurent P, 1984. Gill internal morphology. In: Hoar WS, Randall DJ, (Eds.), *Gills. Fish Physiology series v.*
6 *10A.* Academic Press, London. pp. 73-183.
- 7 Lewis SV, 1979. A scanning electron microscope study of the gills of the air-breathing catfish, *Clarias*
8 *batrachus* L. *J. Fish Biol.* 15, 381-84.
- 9 Lombardi PE, Peri SI, Guerreiro NRV, 2010. Trace metal levels in *Prochilodus lineatus* collected from the
10 La Plata River, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* 160, 47-59.
- 11 Mager EM, 2012. Lead. In: Wood CM, Farrell AP, Brauner CJ, (Eds.), *Homeostasis and toxicology of non-*
12 *essential metals.* *Fish Physiology series v.* 31B. Academic Press, London. pp. 185–236.
- 13 Mallatt J, 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review.
14 *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 42, 630-648.
- 15 Marcato ACC, Yabuki AT, Fontanetti CS, 2014. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in
16 *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. *Environ.*
17 *Sci. Pollut. Res. in press.*
- 18 Martinez CBR, Nague MY, Zaia CTBV, Zaia DAM, 2004. Acute morphological and physiological effects of
19 lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64, 797-807.
- 20 Mazon AF, Cerqueira CCC, Fernandes MN, 2002a. Gill cellular changes induced by copper exposure in the
21 south american tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *Environ. Res.* 88A, 52-63.
- 22 Mazon AF, Monteiro EAS, Pinheiro GHD, Fernandes MN, 2002b. Hematological and physiological changes
23 induced by short-term exposure to copper in the freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Braz. J. Biol.* 62,
24 621-631.
- 25 Mieiro CL, Bervoets L, Joosen S, Blust R, Duarte AC, Pereira ME, Pacheco M, 2011. Metallothioneins
26 failed to reflect mercury external levels of exposure and bioaccumulation in marine fish –
27 Considerations on tissue and species specific responses. *Chemosphere.* 85, 114–121.

- 1 Monteiro V, Cavalcante DGSM, Viléla MBFA, Sofia SH, Martinez CBR, 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures
2 for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus*
3 *lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 104, 291–298.
- 4 Nussey G, Van Vuren JHJ, Du Preez HH, 2000. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead
5 in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water.*
6 *SA.* 26, 269–284.
- 7 Olson KR, 1996. Scanning electron microscopy on the fish gill. In: Dutta HM, Datta-Mushi JS, (Eds.) *Fish*
8 *morphology: horizon of new research.* CRC Press, Boca Raton. pp. 31-44.
- 9 Palaniappan PLRM, Sabhanayakam S, Krishnakumar N, Vadivelu M, 2008. Morphological changes due to
10 lead exposure and the influence of DMSA on the gill tissues of the freshwater fish, *Catla catla*. *Food.*
11 *Chem. Toxicol.* 46, 2440–2444.
- 12 Palaniappan PLRM, Krishnakumar N, Vadivelu M, 2009. Bioaccumulation of lead and the influence of
13 chelating agents in *Catla catla* fingerlings. *Environ. Chem. Lett.* 7, 51-54.
- 14 Pandey S, Parvez S, Ansari RA, Ali M, Kaur M, Hayat F, Ahmad F, Raisuddin S, 2008. Effects of exposure to
15 multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater
16 fish, *Channa punctata* Bloch. *Chem. Biol. Interac.* 174, 183–192.
- 17 Paquin PR, Gorsuch JW, Apte S, Batley GE, Bowles KC, Campbell PGC, Delos CG, Di Toro DM, Dwyer RL,
18 Galvez F, Gensemer RW, Goss GG, Hogstrand C, Janssen CR, McGeer JC, Naddy RB, Playle RC,
19 Santore RC, Schneider U, Stubblefield WA, Wood CM, Wu BK, 2002. The biotic ligand model: a
20 historical overview. *Comp. Biochem. Physiol.* 133C, 3–35.
- 21 Paulino MG, Sakuragui MM, Fernandes MN, 2012. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in
22 a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere.* 86, 1-7.
- 23 Playle RC, 1998. Modelling metal interactions at fish gills. *Sci. Total. Environ.* 219, 147-163.
- 24 Perry SF, 1997. The chloride cell: structure and function in the gill of freshwater fishes. *Annu. Rev.*
25 *Physiol.* 59, 325-347.
- 26 Poleksić V, Mitrović-Tutundžić V, 1994. Fish gills as a monitor of sublethal and chronic effects of
27 pollution. In: Müller R, Lloyd R, (Eds.) *Sublethal and Chronic effects of pollutants on freshwater fish.*
28 *Fishing News Books, Oxford.* pp. 339-352.

- 1 Ribeiro AM, Risso WE, Fernandes MN, Martinez CBR, 2014. Lead accumulation and its effects on the
2 branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. Fish. Physiol. Biochem. 40, 645-657.
- 3 Roesijadi G, 1996. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. Comp. Biochem. Physiol. 113C,
4 117-123.
- 5 Rogers JT, Wood CM, 2004. Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater
6 rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol. 207, 813–825.
- 7 Rogers JT, Richards JG, Wood CM, 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead
8 in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat. Toxicol. 64, 215–234.
- 9 Rogers JT, Patel M, Gilmour KM, Wood CM, 2005. Mechanisms behind Pb-induced disruption of Na⁺ and
10 Cl⁻ balance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 289,
11 R463–R472.
- 12 Suiçmez M, Kayim M, Köseoglu D, Hasdemir E, 2006. Toxic effects of lead on the liver and gills of
13 *Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1972. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 77, 551-558.
- 14 Spokas EG, Spur BW, Smith H, Kemp FW, Bogden JD, 2006. Tissue lead concentration during chronic
15 exposure of *Pimephales promelas* (Fathead Minnow) to lead nitrite on aquarium water. Environ. Sci.
16 Technol. 40, 6852-6858.
- 17 Tao S, Liu C, Dawson R, Cao J, Li B, 1999. Uptake of particulate lead via the gills of fish (*Carassius*
18 *auratus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 37, 352-357.
- 19 Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE, 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental
20 risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.
- 21 Vinodhini R, Narayanan R, 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus*
22 *carpio* (Common carp). Int. J. Environ. Sci. Tech. 5, 179–182.
- 23 Wilson JM, Laurent P, 2002. Fish Gill Morphology: inside out. J. Exp. Zool. 293, 192-213.
- 24 Yabe MJS, Oliveira E, 1998. Metais pesados em águas superficiais como estratégia de caracterização de
25 bacias hidrográficas. Quim. Nova 21, 551-556.

1 **Capítulo VII: Considerações finais**

2

3 A hipótese central deste trabalho foi confirmada: o chumbo, em concentrações ecologicamente
4 relevantes no ambiente dulcícola, pode se acumular e provocar distúrbios metabólicos,
5 osmorregulatórios e morfofuncionais em peixes, nas primeiras 24 horas de exposição.

6 A compilação dos resultados mostrou que o *P. lineatus* é uma espécie susceptível à presença de
7 Pb em concentrações próximas a 3,5 mg Pb total.L⁻¹, que é uma concentração já detectada em trechos
8 urbanos de cursos de água na região norte do Paraná. As primeiras 24 horas de exposição ao Pb
9 constituíram condições capazes de promover desregulações em diferentes parâmetros, acarretando
10 alterações na homeostase. Desta forma, o emprego desta espécie como biomonitor mostrou-se
11 recomendável, graças à pronta responsividade de seus parâmetros fisiológicos ao metal em um curto
12 período de tempo.

13 Os resultados produzidos neste trabalho acrescentam relevantes observações quanto aos
14 efeitos do Pb na fisiologia branquial. O acúmulo de Pb nas brânquias de *P. lineatus* destacou-se em
15 relação aos demais tecidos, promovendo um aumento de proteínas semelhantes a metalotioneínas
16 (PSMT). A presença destas proteínas, porém, não foi suficiente para impedir a interferência do metal
17 sobre a capacidade hiper-reguladora do tecido branquial, refletindo em alterações nos íons plasmáticos.
18 No intuito de restabelecer a concentração iônica homeostática, as células ricas em mitocôndria nas
19 brânquias migraram em direção às lamelas, enquanto as células pavimentosas apresentaram um
20 aumento da superfície de absorção. Estes ajustes, no entanto não refletiram, a priori, em um retorno
21 aos níveis iônicos homeostáticos, uma vez que o desbalanço iônico é também reflexo da interferência na
22 capacidade osmorregulatória do rim posterior. O tecido renal também foi alvo prioritário do Pb, mas, ao
23 contrário das brânquias, não contou com a presença das PSMT. Por outro lado, o aumento do conteúdo
24 dessas proteínas foi verificado no tecido hepático, que apresentou acúmulo substancial de Pb ao final da
25 24ª h de exposição. Desta forma, entende-se que a simples presença do metal não é o fator
26 determinante para a síntese de MT, mas a capacidade de cada tecido em produzir estas proteínas na
27 presença do Pb, que deixa de ser visto como um fraco indutor.

28 Para alcançar os órgãos internos o Pb é distribuído através do sangue, que, apesar constituir
29 excelentes biomarcadores para a exposição ao Pb, não apresentou alterações nos parâmetros
30 hematológicos em decorrência da presença do metal, nas primeiras 24 horas de exposição. Por outro
31 lado, apesar de poucos estudos acusarem o potencial neurotóxico do Pb, houve uma redução da
32 atividade da acetilcolinesterase (AChE) no músculo e no cérebro. Este efeito resultou em desbalanço

1 metabólico, provavelmente em virtude da hiperatividade muscular, que gerou um aumento do lactato
2 sanguíneo e uma hiperglicemia, resultante da neoglicogênese hepática. Diferente do que sugeriam
3 estudos anteriores, este trabalho traz uma nova perspectiva em torno da hiperglicemia encontrada nos
4 teleósteos expostos ao chumbo, ao mesmo tempo em que indicou a capacidade de disrupção endócrina
5 deste metal.

6 Por fim, os resultados apresentados neste trabalho proporcionaram o melhor entendimento dos
7 efeitos deletérios e respostas fisiológicas promovidas pela curta exposição ao Pb no teleósteo dulcícola
8 neotropical *P. lineatus*. Fornecendo, desta forma, ferramentas para o desenvolvimento de modelos
9 capazes de prever os efeitos do Pb sobre esta espécie, como um modelo de espécie biomonitora
10 neotropical.