



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCINE FERNANDES PALERMO

**BIOACUMULAÇÃO E EFEITOS DO NÍQUELEM UMA
ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL**

Londrina
2012

FRANCINE FERNANDES PALERMO

**BIOACUMULAÇÃO E EFEITOS DO NÍQUELEM UMA
ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa Dra Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2012

FRANCINE FERNANDES PALERMO

**BIOACUMULAÇÃO E EFEITOS DO NÍQUELEM UMA ESPÉCIE DE
PEIXE NEOTROPICAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Estadual de Londrina, como um dos requisitos à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Adalto Bianchini
FURG – Rio Grande - RS

Prof. Dr. Mário Luís Orsi
UEL – Londrina - PR

Londrina, 20 de março de 2012.

Aos meus pais e irmãs por todo
apoio e amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus primeiramente.

Aos meus queridos pais **João Fabio** e **Elza** que sempre me apoiaram e sei que sempre me apoiarão. O meu eterno obrigada por tudo.

Às minhas queridas irmãs **Fabiana** e **Fernanda** que sempre me ajudaram em todos os momentos, e mesmo distante, sei que sempre torceram muito por mim.

À professora **Cláudia**, o meu muito obrigada por me aceitar em sua equipe e por toda atenção e paciência ao longo desta jornada.

À toda **família Iefiana** pela ajuda durante os experimentos e pelos bons momentos dentro e fora do laboratório.

Ao **Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas** da UEL.

À **Estação de Piscicultura** da UEL.

Ao **Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA)** e ao **CNPq** pela bolsa de mestrado concedida.

À minha banca de qualificação: professores **Paulo Meletti**, **Alexandre Oliveira Fernandes da Silva** e **Silvia Helena Sofia**.

À banca examinadora da dissertação: professores **Adalto Bianchini** e **Mário Luís Orsi** por aceitarem o convite e por colaborarem com este trabalho.

E à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

PALERMO, Francine .Fernandes. **Bioacumulação e os efeitos do níquel em uma espécie de peixe neotropical**. 2012. 89 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

Com a crescente poluição aquática, muitos contaminantes vêm causando efeitos deletérios nos organismos devido a sua persistência no ambiente e seu potencial de acumulação na biota, dentre eles destacam-se os metais. Estes podem ser essenciais ao metabolismo de organismos vivos, e, ao mesmo tempo, dependendo de suas concentrações, altamente tóxicos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar o acúmulo de níquel em diversos tecidos do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* e caracterizar os efeitos deste metal em parâmetros de estresse oxidativo, conteúdo de metalotioneínas e na integridade da molécula de DNA utilizando para tal, biomarcadores bioquímicos e genéticos. Juvenis de *P. lineatus* foram submetidos a três diferentes concentrações de níquel (0,025, 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹) ou somente água (grupo controle), em testes semi-estáticos por 24 e 96 h com renovação total da água. Após cada período de exposição os peixes foram anestesiados para a coleta de sangue e mortos por secção medular para a retirada dos órgãos. Para quantificar o acúmulo tecidual do níquel foram utilizados as brânquias, fígado, rim e músculo. Para as análises bioquímicas foram utilizadas as brânquias e fígado, a fim de determinar a atividade da glutathione S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase (GR), bem como a peroxidação lipídica (LPO), o conteúdo de glutathione reduzida (GSH), e metalotioneínas (MT). Para as análises genéticas foram utilizadas células sanguíneas e branquiais a fim de verificar possíveis danos no DNA através do ensaio do cometa. Verificou-se que o acúmulo de Ni foi maior no rim, seguido pelo fígado e brânquias, sendo que o músculo foi o tecido que menos acumulou Ni. Em relação aos peixes do grupo controle verificou-se que o conteúdo de MT aumentou nos peixes expostos ao Ni, nos dois tempos experimentais, tanto nas brânquias quanto no fígado. Com relação às enzimas antioxidantes nas brânquias, houve aumento das atividades da SOD, CAT, GPx, GR e GST. No fígado, houve inibição da atividade da SOD e CAT e ocorrência de peroxidação lipídica. Verificou-se aumento na frequência de danos no DNA das células sanguíneas e branquiais dos peixes expostos ao Ni. Com este trabalho evidencia-se que a concentração máxima de Ni permitida pela legislação brasileira (Resolução CONAMA 357, 2005) para águas doces (0,025 mg Ni.L⁻¹) não é segura para *P. lineatus* podendo ocasionar danos oxidativos e danos no DNA, comprometendo assim a saúde desta espécie.

Palavras-chave: Biomarcadores. Defesas antioxidantes. Ensaio do cometa estresse oxidativo. Genotoxicidade. *Prochilodus lineatus*.

PALERMO, Francine .Fernandes. **Bioaccumulation and effects of nickel in a neotropical fish species**. 2012. 89 f. Dissertation (Master's degree in Biological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

ABSTRACT

With increasing water pollution, many contaminants are causing deleterious effects on organisms due to their persistence in the environment and its potential to accumulate in biota, among them stand out from the metals. These may be essential to the metabolism of living organisms, and at the same time, depending on their concentrations, highly toxic. Therefore, the objective was to determine the accumulation of nickel in various tissues of the neotropical fish *Prochilodus lineatus* and characterize the effects of this metal in oxidative stress parameters, metallothionein content and integrity of the DNA molecule using for that purpose, and biochemical biomarkers genetic. Juveniles of *P. lineatus* were submitted to three different concentrations of nickel (0.025, 0.25 and 2.5 mg l⁻¹) or water alone (control group) in semi-static tests for 24 and 96 h with total renewal of water. After each exposure period the fish were anesthetized to collect blood and killed by spinal section for the removal of organs. To quantify the tissue accumulation of nickel were used gills, liver, kidney and muscle. For biochemical analysis were used gills and liver in order to determine the activity of glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) and and lipid peroxidation (LPO), the content of reduced glutathione (GSH), and metallothionein (MT). For the genetic analyzes were used gill blood cells and to verify possible DNA damage by comet assay. It was found that Ni was greater accumulation in the kidney, followed by the liver and gills, and muscle tissue that has been accumulated less Ni. In relation to the fish in the control group it was found that the content of MT in fish exposed to increased Ni in both experimental times, both in the liver as gills. Regarding the antioxidant enzymes in the gills, there was increased activity of SOD, CAT, GPx, GR and GST. In the liver, there was inhibition of SOD and CAT and the occurrence of lipid peroxidation. An increase in the frequency of DNA damage of blood cells and gill of fish exposed to Ni. This work shows that the maximum concentration of Ni allowed by Brazilian legislation (CONAMA Resolution 357, 2005) for fresh water (0.025 mg Ni.L⁻¹) is not safe for *P. lineatus* may cause oxidative damage and DNA damage, thus compromising the health of this species.

Keywords: Antioxidant defenses. Biomarkers. Comet assay. Genotoxicity. Oxidative stress. *Prochilodus lineatus*.

LISTA DE TABELAS

Artigo

- Tabela 1** – Parâmetros físicos e químicos da água analisados durante o período experimental (24 e 96 h)43
- Tabela 2** – Concentração de níquel total e dissolvido (mg.L^{-1}) na água dos aquários contendo as concentrações nominais de Ni correspondentes a 0 (CTR), 0,025, 0,25 e 2,5 mg.L^{-1} , nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 h.....43
- Tabela 3** – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média \pm EP) nos eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos a 0,025, 0,25 e 2,5 mg.L^{-1} de níquel ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h53
- Tabela 4** – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média \pm EP) nas células branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos a 0,025; 0,25; 2,5 mg.L^{-1} de níquel ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h54
- Tabela 5** – Resultados obtidos para *P. lineatus* expostos a 0,025; 0,25 e 2,5 mg.L^{-1} de níquel por 24 e 96 h. Os sinais = , \uparrow e \downarrow indicam, respectivamente, ausência de diferença, aumento ou redução significativa em relação ao respectivo controle73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Diagrama das possíveis rotas e destinos dos metais depois de absorvidos pelos peixes 16
- Figura 2** – Exemplar de juvenil de *Prochilodus lineatus* 20
- Figura 3** – Diagrama esquemático da entrada dos metais em células eucarióticas. Vide explicação dos números no texto..... 22
- Figura 4** – Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio mostrando que os xenobióticos. podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar danos a proteínas, lipídios e DNA, caso as defesas antioxidantes celulares não sejam capazes de neutralizar seus efeitos. $O_2^{\cdot-}$ - ânion superóxido; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; OH - radical hidroxil; SodMn - superóxido dismutase-manganês; SodCuZn - superóxido dismutase-cobre/zinco; GPx - glutathione peroxidase; CAT – catalase 24
- Figura 5** – defesas antioxidantes após a entrada do xenobiótico no organismo. ERO - espécie reativa de oxigênio; SOD- superóxido dismutase; CAT- catalase; GPx - glutathione peroxidase; GSH – glutathione reduzida; GSSG – glutathione oxidada; GR - glutathione redutase; GST - glutathione S-transferase; $O_2^{\cdot-}$ - ânion radical superóxido; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; $\cdot OH$ -radical hidroxil; G6PDH - glicose 6 fosfato desidrogenase 27
- Figura 6** – Processo de lipoperoxidação. A abstração de átomos de hidrogênio de um ácido graxo polinsaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias polinsaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico 28
- Figura 7** – Diagrama com as possíveis vias de ações dos metais até o DNA e seus efeitos. ERO: Espécie reativa de oxigênio 29

Figura 8 – Danos nos eritrócitos verificados pelo ensaio do cometa. A) Classe 0 (sem danos aparente), B) Classe 1 (cauda curta menor que o diâmetro do núcleo), C) Classe 2 (comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo), D) Classe 3 (comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo).....30

Artigo

Figura 9 – Concentração de níquel ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tecido seco) nos tecidos: rim (A) fígado (B), brânquias (C) e músculo (D) de *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de níquel durante 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$)..... 45

Figura 10 –Concentração de metalotioneína no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de níquel durante 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$)..... 46

Figura 11 –Atividade da SOD (A), CAT (B), GPx (C) no fígado de *Prochilodus lineatus* exposto apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de níquel durante 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$)..... 47

Figura 12 –Atividade da SOD (A), CAT (B), GPx (C) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de níquel durante 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$)..... 48

- Figura 13** –Atividade da GST (A) e GR (B) hepática e conteúdo hepático de GSH (C) em *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel, durante 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).....49
- Figura 14** –Atividade branquial da GST (A) e GR (B) e conteúdo branquial de GSH (C) de *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 mg. L⁻¹ de níquel durante 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$)..... 50
- Figura 15** –Conteúdo de MDA no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos à somente a água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel durante 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$)..... 51
- Figura 16** –Escores médios de danos em células sanguíneas (A) e branquiais (B) de *Prochilodus lineatus* expostos à somente a água (CTR) e 0,025, 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel durante 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0.05$)..... 52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
1.1	CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA	13
1.2	CONTAMINAÇÃO POR METAIS	14
1.3	NÍQUEL	17
1.4	BIOINDICADORES	18
1.5	USO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES	19
1.6	MODELO EXPERIMENTAL: PROCHILODUS LINEATUS	19
1.7	BIOMARCADORES	21
1.7.1	Estresse Oxidativo e Defesas Antioxidantes	23
1.7.2	Peroxidação Lipídica	27
1.7.3	Danos no DNA	29
1.7.4	Metalotioneínas	31
2	OBJETIVOS	32
2.1	OBJETIVOS GERAIS	32
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3	ARTIGO	33
3.1	INTRODUÇÃO	34
3.2	MATERIAL E METÓDOS	36
3.2.1	Animais	36
3.2.2	Testes de Toxicidade e Amostragem	37
3.2.3	Determinação de Níquel nos Tecidos	38
3.2.4	Análises Bioquímicas	38
3.2.4.1	Defesas antioxidantes	38
3.2.4.2	Peroxidação lipídica	39
3.2.4.3	Conteúdo de metalotioneínas	40
3.2.4.4	Concentração de proteína	40
3.2.5	Ensaio do Cometa	40
3.2.6	Análises Estatísticas	42
3.3	RESULTADOS	42
3.3.1	Parâmetros da Água	42

3.3.2	Concentração de Níquel na Água.....	43
3.3.3	Acúmulo de Níquel nos Tecidos	44
3.3.4	Metalotioneínas	46
3.3.5	Defesas Antioxidantes	47
3.3.6	Peroxidação Lipídica	51
3.3.7	Danos no DNA.....	51
3.4	DISCUSSÃO.....	54
3.5	AGRADECIMENTOS	63
REFERÊNCIAS.....		64
CONCLUSÕES GERAIS		72
REFERÊNCIAS.....		74

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

A crescente urbanização e industrialização nas últimas décadas têm gerado consequências indesejáveis aos ecossistemas. Dentre as atividades antrópicas que geram essas alterações destacam-se as atividades domésticas, industriais e agrícolas, que são as maiores responsáveis pelo aumento dos níveis de contaminantes no ambiente aquático (BINEY, 1994; COONEY, 1995; CAJARAVILLE et al., 2000; ZAGATTO, 2006; FREIRE et al., 2008).

Nos últimos anos a preocupação com a contaminação aquática vem recebendo mais atenção tanto das autoridades quanto de pesquisadores, pois o comprometimento de nossos recursos hídricos acaba por comprometer também nossa existência. Segundo Tundisi (2003) a água é o bem natural mais importante e sua ausência exterminaria a vida na terra, pois é ela que determina a dinâmica da natureza e participa de todos os ciclos ecológicos; é o meio de sobrevivência de várias espécies aquáticas úteis ao homem e participa ativamente dos ciclos biogeoquímicos, proporcionando uma grande diversidade biológica.

Os ecossistemas aquáticos são considerados receptores finais de contaminantes liberados no ambiente. A prática de lançar poluentes nos recursos hídricos foi, por muito tempo, considerada a mais barata, prática e eficiente para eliminar os despejos e resíduos (MASON, 1996). Entretanto, esta prática gera grandes quantidades de substâncias tóxicas e prejudiciais a toda biota que se encontra naquele meio, e como consequência gera danos irreversíveis aos ecossistemas aquáticos.

Os contaminantes podem entrar no ambiente aquático por vias diferentes, caracterizando assim dois tipos de poluição: pontual ou difusa (GUEDES, 2011). A poluição pontual tem origem específica, em determinado ponto do corpo hídrico, e os poluentes encontram-se em elevadas concentrações, são exemplos desse tipo de poluição os despejos domésticos, industriais e urbanos. Já na poluição difusa os contaminantes estão dispersos ao longo do rio, não havendo um local específico de origem, e como exemplo temos o escoamento superficial, que pode ter origem agrícola ou urbana. A concentração de material tóxico proveniente da

poluição difusa apresenta-se mais baixa quando comparada com a primeira, mas está sujeita ao acúmulo progressivo com o passar do tempo.

1.2 CONTAMINAÇÃO POR METAIS

Com o aumento das atividades antrópicas e consequente aumento da poluição aquática os diversos poluentes passam a integrar os corpos d'águas de forma constante, e a contaminação da água por metais é uma das que tem trazido maiores preocupações aos pesquisadores e órgãos governamentais envolvidos no controle de poluição (OLIVEIRA et al., 2001). Como consequência da liberação de metais pode-se citar os danos e prejuízos que eles causam à vida animal e vegetal, ocasionando mudanças tanto na riqueza quanto na composição das espécies (BERVOETS et al., 2003; JARDIM, 2008). Apesar de também agir como poluentes, alguns metais apresentam papel fundamental para a realização das funções vitais nos organismos, são os chamados metais essenciais, que, em pequenas quantidades, são necessários para o bom funcionamento desses animais, possuindo importante papel no metabolismo desses organismos. Quando encontrados em níveis excessivos, tais elementos podem ser extremamente tóxicos. São elementos essenciais, cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), iodo (I), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), selênio (Se) e zinco (Zn), que geralmente são usados em processos catalíticos ou em reações redox. Outros metais não exercem função nenhuma no interior dos organismos, e sua acumulação pode provocar diversos distúrbios no seu funcionamento.

A entrada de metais na água e sedimentos pode acontecer de forma natural ou antropogênica. Na primeira, eles podem ser disponibilizados para o meio através de erosões, intemperismo, e erupções vulcânicas. Já na segunda, através das atividades industriais e agrícolas, e podem ser encontrados em ambiente aquáticos oriundos das descargas direta de efluentes, escoamento superficial e lixiviação e também na atmosfera, provenientes dos resíduos de incinerações, queimas, vapores de soldagens e chuva ácida (AGUIAR et al., 2002).

Uma vez lançado no meio esses metais podem permanecer e se acumular no ambiente, pois não possuem propriedades biodegradáveis, e assim, permanecem no ecossistema podendo ser absorvidos pelos animais e vegetais que ali se encontram, e podem provocar intoxicações ao longo da cadeia alimentar

(PEREIRA & EBECKEN, 2009). Os metais podem se acumular no solo e sedimento, podendo assim, potencializar sua toxicidade. O processo de bioacumulação direta ou indireta de metais traços nos organismos aquáticos é significativa, podendo afetar a cadeia alimentar e provavelmente atingindo os peixes (BAIRD, 2002; TAGLIARI et al., 2004; MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2005; BURATINI & BRANDELLI, 2006).

No meio aquático os metais podem passar por diversas alterações químicas e o processo pelo qual se determina a forma que ele será encontrado denomina-se especiação. Esta determinará a disponibilidade desses metais para a biota que ali vive, e assim, dependendo da forma com que o organismo absorve este metal, ele pode ser benéfico ou não (BIANCHINI et al., 2009). Os metais podem ser encontrados livres e dissolvidos, como íons metálicos mono ou polivalentes hidratados; complexados, junto à matéria orgânica e inorgânica; adsorvidos, junto à partículas em suspensão, componentes orgânicos e inorgânicos suspensos na coluna d'água; ou insolúveis, como sulfetos e carbonatos, e que passam pelo organismo sem causar grandes danos (BAIRD, 2002)

Existem alguns fatores químicos e físicos da água que podem interferir no processo de especiação e modificam a toxicidade dos metais. São eles: pH, oxigênio dissolvido, dureza, temperatura, matéria orgânica, salinidade (HEATH, 1995; PAQUIN et al., 2000; BIANCHINI et al., 2009). Outro fator que determina a biodisponibilidade dos metais para os organismos vivos é a capacidade que estes possuem de absorção do metal, e esta irá depender das características e biologia de cada espécie, sendo que, fatores como idade, tamanho, fase de desenvolvimento e estágio de maturação gonadal são determinantes para estabelecer a toxicidade do metal em cada espécie (ATLI & CANLI, 2007; DI GIULIO & HINTON, 2008).

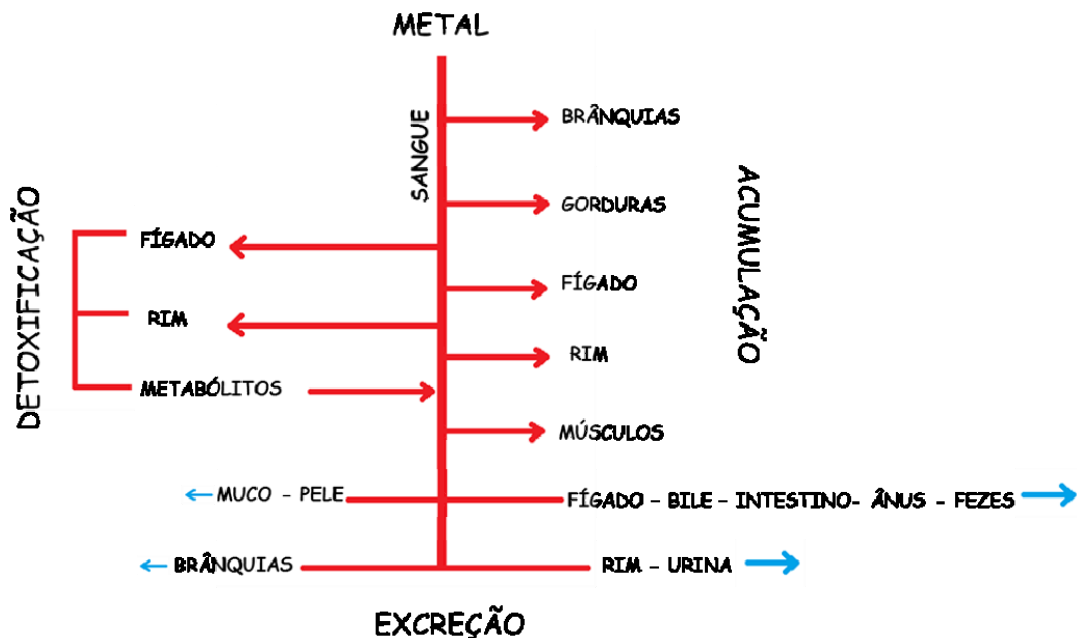
Um caso que chamou a atenção do mundo com relação à intoxicação por metais foi o caso da Baía de Minamata no Japão em 1932, onde milhares de pessoas ficaram intoxicadas por metil-mercúrio, ocasionando muitas mortes e consequências drásticas até nos dias de hoje. Neste caso, ocorreu biomagnificação de mercúrio através da cadeia trófica e como consequência a séria intoxicação de seres humanos que se alimentavam de peixes contaminados. Depois desse acidente o mundo se viu obrigado a controlar os teores de metais nos ambientes aquáticos (VASQUEZ, 1999).

Como consequência da interação entre metais e organismos pode-se listar alguns distúrbios relacionados aos mecanismos fisiológicos e bioquímicos

de peixes, que são importantes para o equilíbrio do ecossistema (ATLI & CANLI, 2007; BASHA & RANI, 2003). Quando os peixes são expostos aos metais pode ocorrer o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem ocasionar estresse oxidativo, e algumas disfunções osmorregulatórias associadas com a inibição de determinadas enzimas e danos aos tecidos (AHMAD, 1995).

Os metais podem ser absorvidos pelos peixes por diversas formas, tais como através da pele, pelas brânquias, via alimentação ou via tomada de água, no caso dos peixes marinhos. Quando absorvidos, esses metais podem se ligar a proteínas e serem transportados pelo sangue, podendo acumular nas brânquias, tecidos adiposos, rins, músculos e fígado. No fígado e no rim os metais podem sofrer detoxificação para serem eliminados através de metabólitos. Estes últimos poderão ser excretados via pele, através da produção de muco; via brânquias; via fígado, através de fezes; e via rim, pela urina. A excreção via fezes e urina é mais significativa do que as duas primeiras vias (HEATH, 1995) (Figura 1).

Figura 1 –Diagrama das possíveis rotas e destinos dos metais depois de absorvidos pelos peixes



Fonte: adaptado de Heath (1995).

1.3 NÍQUEL

O níquel (Ni) é um dos maiores constituintes da crosta terrestre e seus sais são altamente solúveis. É um metal branco-prateado, dúctil, maleável que corresponde ao 24º metal mais abundante da Terra, e o sulfeto é o principal mineral utilizado, contribuindo com mais de 90% do níquel extraído (SILVA, 2001). O Ni é um metal essencial ao homem, animais e plantas, mas em excesso acaba por ser prejudicial (MALIK et al., 2010). Pequenas quantidades de níquel são essenciais para o crescimento normal e reprodução em algumas espécies animais, significando que este metal pode também ser considerado como um oligoelemento (WOO et al., de 2009). Nos animais é importante no crescimento, reprodução, metabolismo do Fe e Zn e para hematopoiese (EVANGELISTA, 2000; COZZOLINO, 2005). Para as plantas o Ni é essencial para a síntese de urease, atuando como cofator desta enzima que catalisa a reação de hidrólise da uréia a duas moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (HAUSINGER, 1993). O Ni, em altas concentrações nas plantas, acaba por inibir a fotossíntese e a respiração (DORDAS et al., 2001).

Dada sua grande resistência mecânica à corrosão e à oxidação o Ni é muito utilizado para proteger peças metálicas, e esta niquelagem é feita através do processo de galvanoplastia. Pode ser utilizado também em ligas ferrosas, material militar e na fabricação de moedas (SILVA, 2001); e é amplamente utilizado nas atividades industriais, tais como: mineração, metalurgia, siderurgia e fabricação de baterias níquel-cádmio, que pode resultar em resíduos com descargas diretas na água e ar (GALVIN, 1996).

O níquel forma uma grande quantidade de compostos e complexos com número de oxidação variando de -1 a $+4$, sendo que o estado de oxidação $+2$ é o mais comum. Os sais de cloreto, nitrato e sulfato de Ni são altamente solúveis. Em águas naturais aeradas, os ânions que limitam a solubilidade deste metal são os fosfatos, carbonatos e hidróxidos. Nas águas que possuem pH alcalino, os compostos de Ni com hidróxidos são solúveis, mantendo a concentração de Ni^{+2} (WHO 2001; CHAU & KULIKOVSKY-CORDEIRO 1995).

Grandes quantidades de Ni são eliminadas através das atividades antropogênicas e são liberadas diretamente nos corpos hídricos, ultrapassando assim, o limite máximo permitido por lei. De acordo com a Resolução CONAMA nº 357 de 2005, a concentração limite de Ni para as águas doces é de $0,025 \text{ mg.L}^{-1}$.

Alguns trabalhos já relataram que a concentração de níquel ultrapassou a permitida acarretando danos ao meio e a biota (RIETZLER et al., 2001; UNIVILLE, 2004).

Há poucas referências bibliográficas sobre a toxicidade do Ni, e aquelas disponíveis referem-se principalmente aos efeitos para mamíferos. Alguns estudos já demonstraram que o Ni pode ser carcinogênico (VALKO, et al., 2006; SIMÕES, 2007), capaz de induzir aberrações cromossômicas em células nos seres humanos e outros mamíferos (COEN et al., 2001). Para animais aquáticos Leonard e colaboradores (2011) estudaram a relação entre a salinidade e toxicidade do Ni, tanto aguda como crônica, para dois crustáceos marinhos. Neste estudo constataram que a salinidade protege contra a toxicidade aguda do Ni, já a crônica no entanto, é independente da salinidade. Outros autores verificaram que o Ni interfere na fisiologia de diferentes espécies de peixes (VALKO et al., 2006; VINODHINI e VARAYANAN, 2009; MALIK, 2010; PARTHIBAN e MUNIYAN, 2011).

1.4 BIOINDICADORES

Devido às intensas descargas de poluentes e compostos químicos provenientes de atividades antropogênicas nos ambientes aquáticos foi necessário criar um método para avaliar as condições ambientais desses ambientes frente à presença desses xenobióticos. Para tal, muitas espécies animais são utilizadas com esse fim, determinando assim o uso de bioindicadores para inferir a qualidade do ambiente em que se encontra.

Autores como Goulart & Callisto (2003), Arias e colaboradores (2007), e Buss (2008) relatam que as metodologias tradicionais de análises físicas, químicas e bacteriológicas da água não são suficientes para a avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, e que essas técnicas apresentam algumas desvantagens, tais como não possuir caráter preditivo de uma possível mudança da qualidade da água sobre as comunidades biológicas; serem pouco eficientes na detecção de alterações na diversidade de habitats e microhabitats; apresentarem descontinuidade temporal e espacial das amostras; não detectarem mudanças sutis do meio pelas análises feitas em diferentes momentos. A fim de resolver estes problemas os aspectos biológicos do ambiente em estudo começaram a fazer parte das análises ambientais, e com isso, os parâmetros biológicos passaram a ser utilizados para medir a qualidade da água, pois os organismos

reagem de acordo com a situação em que se encontra seu meio (BUSS et al., 2003). Dessa forma surgiu o termo bioindicador. De acordo com Van der Oost (2003) define-se bioindicador como um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais de seu hábitat por sua presença ou ausência ou pelo seu comportamento.

Muitos organismos podem ser utilizados como bioindicadores, tendo como critério para a escolha espécies que são representativas nos ecossistemas monitorados (BURGER & GOCHFELD, 2000), além do que ter uma taxonomia bem definida, ser facilmente coletado, apresentar baixa variabilidade genética, baixa mobilidade, e assim, possibilitar os trabalhos em laboratórios (BUSS et al., 2003). Animais como aves, peixes, moluscos, invertebrados aquáticos são amplamente utilizados no monitoramento ambiental.

1.5 USO DE PEIXES COMO BIOINDICADORES

Dentre os vários animais utilizados como bioindicadores os peixes destacam-se em vários estudos, pois eles são muito utilizados na alimentação humana em vários países, possuem grande importância ecológica ocupando uma posição chave na cadeia trófica (FLOTEMERSCH et al., 2006; VIARENGO et al., 2007) e são capazes de bioacumular poluentes

De acordo com Chovanec e colaboradores (2003) os peixes são considerados bons indicadores por apresentarem diversas características favoráveis para essa prática, como por exemplo, estar em intenso contato com a água; a ampla distribuição de algumas espécies; a facilidade de captura; distribuição em diferentes níveis tróficos; possuir tamanho adequado para realização de diversos procedimentos analíticos e relativa longevidade. De acordo com Martinez e colaboradores (2004) estudos com peixes nativos neotropicais ainda são escassos, e assim, pouco se sabe da sensibilidade destes frente a diversos poluentes.

1.6 MODELO EXPERIMENTAL: *PROCHILODUS LINEATUS*

Uma espécie bem-sucedida no biomonitoramento de ambientes aquáticos em regiões neotropicais é o peixe *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1947) (Figura 2). Popularmente é conhecido como curimba ou curimbatá,

pertencente à ordem Characiformes, família Prochilodontidae e superordem Ostariophysi. Possui grande importância econômica na região sudeste e sul do Brasil, sendo muito utilizado na alimentação humana (MARTINEZ, 2006). Em um estudo realizado com diversos pescadores de vinte e dois municípios que fazem divisa entre os estados do Paraná e São Paulo e que realizam suas atividades nos reservatórios de Capivara, Rio Paranapanema e Tibagi, ficou constatada a importância do curimba para a economia desta região, visto que esses peixes ocupam o segundo lugar de espécies mais consumidas (Pilla et al., 2003).

Os peixes da espécie *P. lineatus* possuem escamas acinzentadas escuras na parte superior do dorso e que vão clareando em direção à parte inferior, tornando-as claras. Sua boca é circular e lábio carnoso com dentes pequenos; sua nadadeira dorsal possui um espinho característico; podem atingir de 30 a 80 cm de comprimento e pesar até 6 kg. Esses peixes possuem o hábito detritívoro e aumentam assim a probabilidade de serem contaminados por metais que se encontram acumulados nos sedimentos (MARTINEZ, 2006).

Esta espécie de peixe é restrita a locais pouco impactados e é bastante sensível a ambientes contaminados, demonstrando-se um bioindicador em potencial (MARTINEZ & CÓLUS, 2002). Por tratar-se de uma espécie sensível a diversos xenobióticos, cuja biologia e fisiologia é conhecida, esta espécie já foi alvo de muitos estudos de toxicidade (CAVALCANTE et al., 2008; LANGIANO & MARTINEZ, 2008; CAMARGO et al., 2009; GALINDO et al., 2010, MODESTO et al., 2010; MONTEIRO, et al., 2011; SIMONATO et al., 2011) e também foi escolhido como modelo experimental para o estudo de acúmulo do níquel e seus efeitos genotóxicos e bioquímicos.

Figura 2 – Exemplar de juvenil de *Prochilodus lineatus*.



Fonte: LEFA-UDEL

1.7 BIOMARCADORES

Os metais são agentes tóxicos geralmente encontrados como misturas complexas, dificultando assim a identificação dos seus efeitos específicos da interação com a biota. A fim de superar essa dificuldade, o uso de biomarcadores pode oferecer uma avaliação integrada dos efeitos dos poluentes na população alvo do estudo (FERREIRA et al., 2003). Neste contexto, chama-se de biomarcador qualquer substância, ou seu derivado, estrutura ou processo, que possa ser medido no organismo e que possa prever ou influenciar a incidência de um acontecimento ou doença (WHO, 2001). O uso de biomarcadores está intimamente associado com a ecotoxicologia, um domínio da ciência cujo objetivo é entender e prever efeitos de xenobióticos em comunidades naturais sob pressão antrópica (CHAPMAN, 2002).

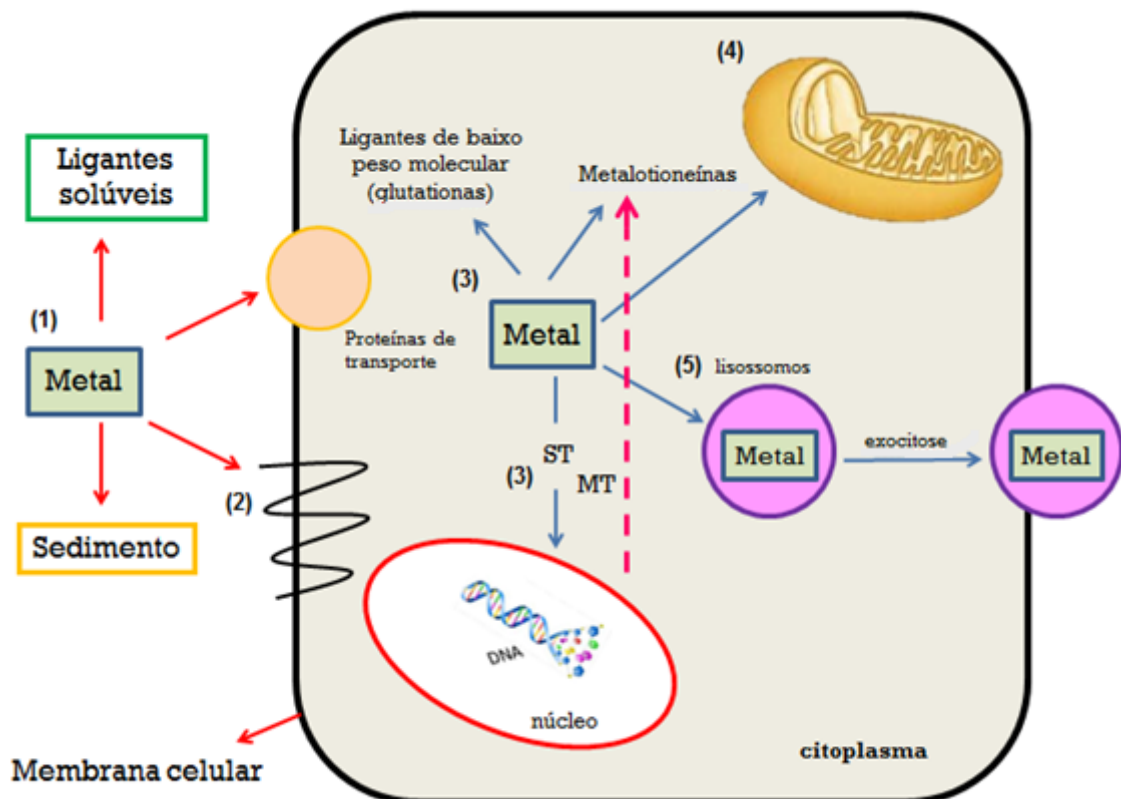
Os biomarcadores refletem a interação entre o sistema biológico e um ou mais contaminantes e são normalmente os primeiros sinais de alterações biológicas a serem detectados. Além disso, são sensíveis a várias classes de poluentes, apresentam alta especificidade e fornecem informações a respeito do efeito metabólico causado pelo contaminante (VAN DER OOST et al., 2003). Dentre os biomarcadores bioquímicos os mais investigados são enzimas envolvidas na detoxificação de xenobióticos e de seus metabólitos, as enzimas de defesa antioxidante, os antioxidantes não enzimáticos, os marcadores de danos oxidativos e a ocorrência de danos no DNA.

Para os metais o uso de biomarcadores é indicado para verificar alterações nas funções moleculares quando eles se encontram em elevadas concentrações no ambiente, e assim, acabam por produzir efeitos tóxicos para a biota. Em nível celular os metais se ligam às proteínas denominadas metalotioneínas (MT), sendo estas consideradas importantes biomarcadores quando se trata de estudo com metais.

A Figura 3 representa um diagrama esquemático do metabolismo e toxicidade de metais em células eucarióticas. Como representado, a captação de metais são resultados da interação entre o íon metálico livre, e diversos grupos ligantes. No ambiente aquático, o metal pode interagir com uma série de ligantes abióticos, tais como o sedimento e ligantes solúveis na coluna d'água (1). Este é um importante controle da absorção de metais pelas células, porque existe uma relação direta entre o íon metálico livre e ativo no meio ambiente e o transporte de metal na

célula (por exemplo, brânquias). Metais geralmente entram nas células através de interações com proteínas ou canais de íons na membrana plasmática (2). Uma vez no citoplasma, o íon metálico livre interage com proteínas de baixo peso molecular (como as glutationas), e com as MTs (3). Este íon também pode se ligar a sítios de transcrição (ST) específicos promotores do gene da MT aumentando a transcrição e, conseqüentemente sua síntese (3). Elevações desses íons livres também podem aumentar a concentração de metais em outros compartimentos celulares que são frequentemente sítios de toxicidade. Por exemplo, na mitocôndria eles podem se ligar às enzimas e complexos de proteínas na cadeia respiratória, reduzindo a conversão de energia, e assim, sua eficiência, pois interrompem a fosforilação oxidativa levando à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) que podem atuar sobre a membrana plasmática, causando peroxidação lipídica (LPO), ou agir diretamente na molécula de DNA causando danos (4). Os metais podem também através dos lisossomos ser exportados diretamente para fora da célula por exocitose (5).

Figura 3 –Diagrama esquemático da entrada dos metais em células eucarióticas. Vide explicação dos números no texto.



Fonte: Adaptado de Di Giulio et al. (1995).

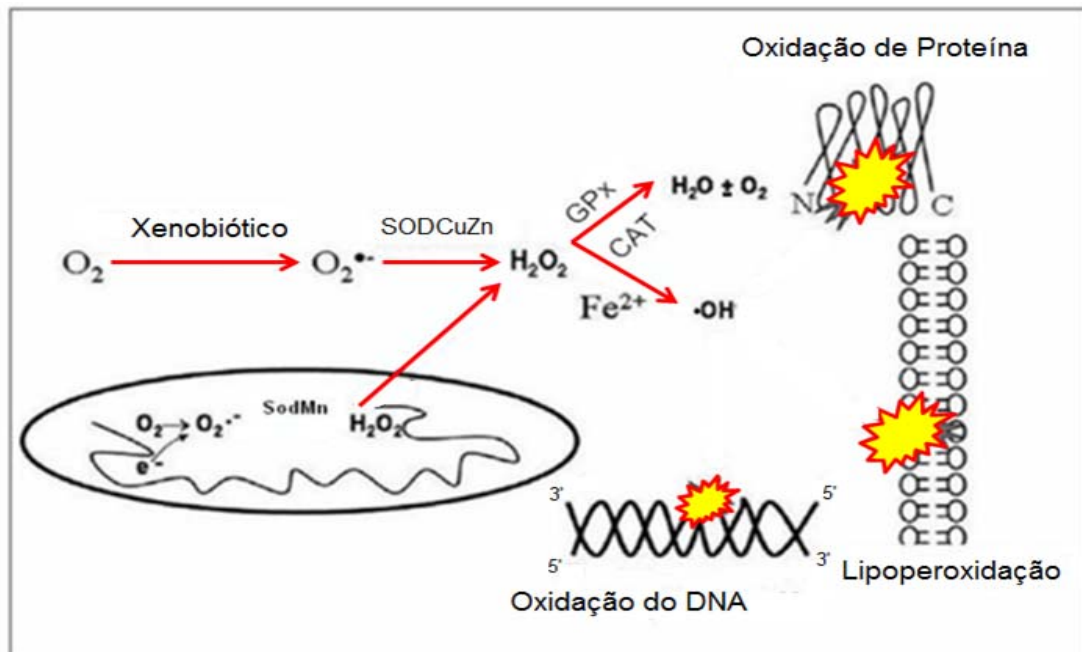
Apesar dos organismos possuírem defesas antioxidantes para proteger os tecidos contra danos oxidativos, se a taxa de produção de ERO exceder a capacidade dos mecanismos de defesa, ocorrerá lesão nas células e dentre elas o DNA (CADET et al., 2003). Estes danos são considerados biomarcadores importantes na avaliação da resposta de organismos expostos a metais. Outros biomarcadores também são amplamente utilizados para avaliar a exposição e os efeitos causados pelos metais, como as defesas antioxidantes.

1.7.1 Estresse Oxidativo e Defesas Antioxidantes

O oxigênio é essencial para a manutenção da vida em organismos aeróbicos, pois é fundamental no processo de produção de energia (ATP). E para tal, as moléculas de oxigênio são reduzidas a água, através de reações de oxidação por complexos que compõem a cadeia respiratória, e como resultado dessas reações podem ser formados vários produtos do metabolismo do oxigênio, dando nome ao que chamamos de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FERRANTE et al., 2008; AMADO et al., 2009). Entre as ERO estão incluídos o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que em altas concentrações podem ser perigosos. Segundo Hermes & Lima (1998) o radical hidroxil é considerado o de maior toxicidade dentre eles e pode promover danos nas membranas, proteínas e ao DNA.

Os danos oxidativos surgem quando os mecanismos de defesa do animal responsáveis pela remoção de ERO são inadequadas ou insuficientes para combater o excesso dessas espécies reativas, prejudicando a capacidade oxidante da célula e promovendo o que chamamos de estresse oxidativo (MASELLA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2006). Dentre os danos causados por esse estresse podemos citar a lipoperoxidação, oxidação de proteínas e danos à molécula de DNA (Figura 4). Estes danos são considerados como biomarcadores importantes na avaliação das alterações de organismos expostos a xenobióticos (MÉNDEZ-ARMENTA & RÍOS, 2007; STURVE et al., 2008).

Figura 4 –Representação esquemática de danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio mostrando que os xenobióticos. podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, as quais podem causar danos a proteínas, lipídios e DNA, caso as defesas antioxidantes celulares não sejam capazes de neutralizar seus efeitos. $O_2^{\cdot-}$ - ânion superóxido; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; $\cdot OH$ - radical hidroxil; SodMn - superóxido dismutase-manganês; SodCuZn - superóxido dismutase-cobre/zinco; GPx - glutathiona peroxidase; CAT - catalase



Fonte: Adaptado de Ramakrishnan et al. (2007).

Os animais apresentam um sistema de defesa antioxidante, responsável pela detoxificação dessas ERO, constituído por defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, que podem reagir com esses intermediários reativos, e também reparar os danos causados pelos mesmos (MARTINEZ, 2006; VALAVANIDIS et al., 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As defesas antioxidantes não enzimáticas possuem baixo peso molecular e são representadas principalmente pelas moléculas hidrossolúveis como o tripeptídeo glutathiona na sua forma reduzida (GSH), o ácido ascórbico (vitamina C), e por moléculas lipossolúveis como o β -caroteno (vitamina B) e o α -tocoferol (vitamina E). Já as defesas enzimáticas são representadas principalmente pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006; STURVE et al., 2008).

A GSH é um tripeptídeo endógeno que atua no sequestro de radicais livres, mas também como cofator para a ação da enzima GPx, que atua na eliminação de peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos, bem como para a ação da GST, que participa da detoxificação de substâncias químicas (HERMES-LIMA, 2004; MARAN et al., 2009). De acordo com Halliwell & Gutteridge (2005) a GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes de defesa antioxidante da célula, conferindo proteção contra danos. Autores como Hermes-Lima (2004) e Martinez (2006) ressaltam que se a disponibilidade de GSH for alterada, a atividade de algumas enzimas, como por exemplo, GST, GPx e GR também podem sofrer alterações em suas atividades.

A GST está associada à desintoxicação de poluentes através da conjugação com GSH (glutathiona), promovendo sua excreção (LACKNER, 2008). A GST é uma família de enzimas multifuncionais, primariamente citosólica, mas também presente no núcleo. São bem distribuídas na natureza, sendo encontradas em bactérias, fungos, plantas e animais. Elas podem ser agrupadas em diferentes classes: alfa, mi, pi, teta e omega, com duas classes menores, sigma e kapa, sendo que em laboratório é geralmente medido a atividade total da GST (HERMES-LIMA, 2004). Esta enzima oferece um papel protetor contra danos oxidativos por conjugar produtos da oxidação de lipídios, como aldeídos e hidroperóxidos com a GSH (BARATA et al., 2005; MASELLA et al., 2005). Os conjugados formados nestas reações de desintoxicação são geralmente excretados na bile, através de mecanismos de extrusão dependentes de ATP, ou podem também ser degradados e acetilados para formar ácidos mercaptúricos, os quais são excretados na urina (HERMES-LIMA, 2004).

A SOD é a primeira via de defesa antioxidante da célula e é encontrada tanto no citosol (CuZn-SOD) quanto no interior das mitocôndrias (Mn-SOD). Constitui uma família de metaloenzimas presentes em todos os organismos aeróbicos e responsáveis por catalisar a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\cdot -}$ em O_2 e H_2O_2 (BARATA et al., 2005; ÜNER et al., 2005; MONTEIRO et al., 2006).

A CAT atua degradando o H_2O_2 em H_2O e O_2 . Esta enzima está presente principalmente nos peroxissomos e também faz parte das enzimas primárias da via antioxidante (BARATA et al., 2005; ORUÇ & USTA, 2007; SAMPAIO et al., 2008). A CAT é específica em reduzir H_2O_2 e quanto maior for a

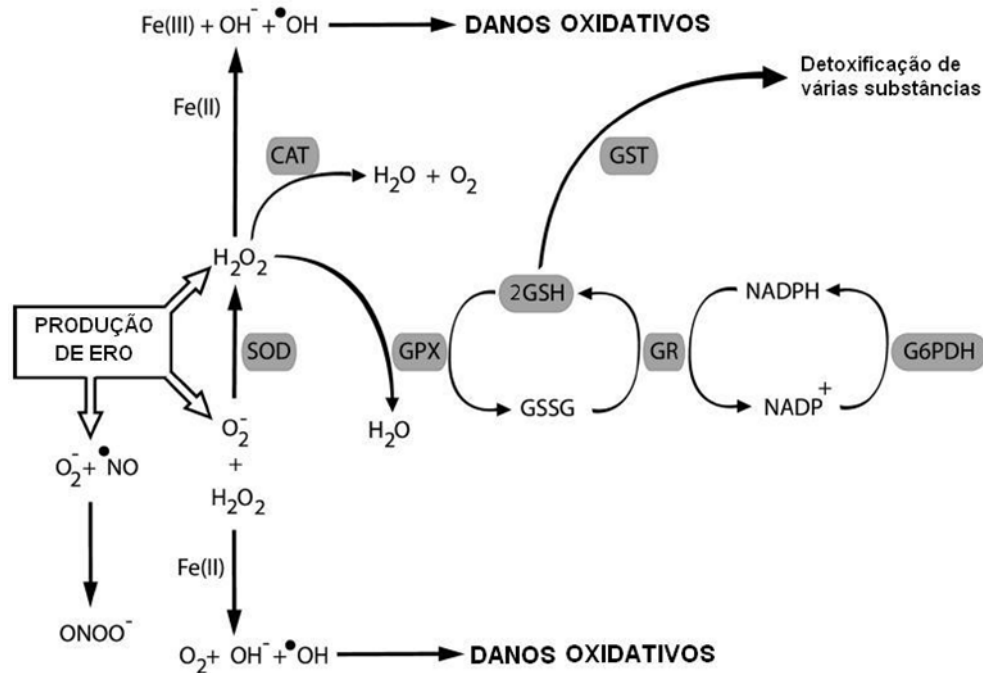
concentração dessa espécie na célula, maior será sua atividade (HERMES-LIMA, 2004).

A enzima que atua sobre o H_2O_2 em baixas concentrações é a GPx, que também metaboliza uma série de hidroperóxidos orgânicos. Esta enzima é encontrada no citosol e na mitocôndria, possui selênio no seu sítio catalítico e utiliza GSH como co-fator para fazer a redução do H_2O_2 a H_2O , envolvendo a oxidação concomitante da GSH para sua forma oxidada (GSSG).

A enzima responsável pela oxidação da GSH para a forma oxidada GSSG, produzida durante o processo catalítico realizado pela GPx, é a GR. Esta enzima é considerada chave no metabolismo da GSH, essencial na manutenção da homeostase GSSG/GSH sob condições de estresse oxidativo (TEKMAN et al., 2008). Esta enzima utiliza os elétrons e prótons do $NADPH^+$ que é reduzido para NADP pela glicose 6 fosfato desidrogenase (G6PDH), promovendo a reciclagem deste tripeptídeo (VAN DER OOST et al. 2003; DI GIULIO & MEYER, 2008). Desta forma pode-se dizer que a GR é uma enzima auxiliar no processo de detoxificação do xenobiótico, porém a sua presença é imprescindível, uma vez que ela mantém a concentração de GSH na célula, podendo-se assim evitar maiores danos ao organismo.

Um esquema que representa a síntese do funcionamento integrado do sistema de defesa antioxidante está apresentado na Figura 5. Depois que o xenobiótico entra no corpo do animal é ativado o sistema de defesa antioxidante para combater as ERO. A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ e o produto desta reação é o H_2O_2 , que é metabolizado pela CAT e/ou pela GPx. A GSH atua como um substrato para as reações da GPx e GST e a GR recicla a GSH às custas de energia. Se o mecanismo de defesa responsável pela remoção das ERO for insuficiente ou inadequado, ocorre o que denominamos de estresse oxidativo, resultando em danos oxidativos como a peroxidação lipídica (LPO), danos ao DNA e oxidação de proteínas (MONTEIRO et al., 2006).

Figura 5 –efesas antioxidantes após a entrada do xenobiótico no organismo. ERO - espécie reativa de oxigênio; SOD- superóxido dismutase; CAT- catalase; GPx - glutathiona peroxidase; GSH – glutathiona reduzida; GSSG – glutathiona oxidada; GR - glutathiona redutase; GST - glutathiona S-transferase; $O_2^{\cdot -}$ - ânion radical superóxido; H_2O_2 - peróxido de hidrogênio; $\cdot OH$ -radical hidroxil; G6PDH - glicose 6 fosfato desidrogenase



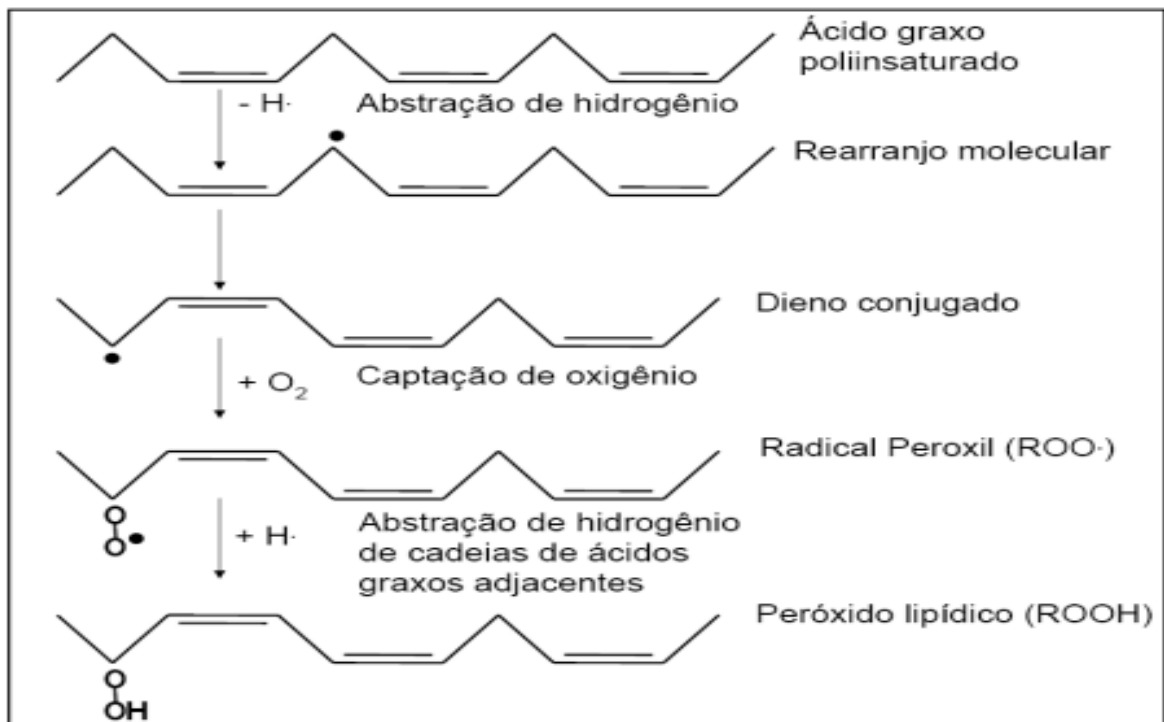
Fonte: Adaptado de Hermes-Lima (2004).

1.7.2 Peroxidação Lipídica

As ERO podem causar danos nas membranas celulares como, por exemplo, devido a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, ocasionando a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LIMA & ABDALLA, 2001; VALAVANIDIS et al., 2006; ORUÇ & USTA, 2007). A peroxidação lipídica (LPO) pode ocorrer como consequência do desequilíbrio entre o sistema antioxidante e o estado pró-oxidante gerado pela toxicidade de metais (BALLESTEROS et al., 2009). O processo de LPO é composto por uma série de reações em cadeia (Figura 6) e é iniciado quando uma ERO retira um átomo de hidrogênio do grupo metileno dos ácidos graxos insaturados (PUFAs), e então o radical formado pode reagir com um átomo de oxigênio formando o radical lipoperoxil, que pode continuar a cadeia ou interagir com outros PUFAs, recomeçando a reação (DI GIULIO & MEYER, 2008).

Como consequência da LPO os danos celulares são muitos, dentre eles podemos listar a perda da integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, resultando assim na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas; alteração no fluxo transmembrana; disfunção no transporte de Na^+/K^+ ; comprometimento dos componentes da matriz extracelular (colágeno, elastina, proteoglicanos) (LIMA & ABDALLA, 2001; BARREIROS et al., 2006). Dentre os produtos finais da LPO está o malondialdeído (MDA), que pode reagir com o ácido tiobarbitúrico (TBA) produzindo substâncias intermediárias coloridas (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ou TBARS) que são usadas para quantificar a peroxidação lipídica (ALMROTH et al., 2005; OROPESA et al., 2009). Níveis elevados de MDA induzem a formação de lipoperóxidos e indicam um aumento da LPO (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006).

Figura 6 – Processo de lipoperoxidação. A abstração de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poliinsaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da abstração de átomos de hidrogênio de cadeias de ácidos graxos adjacentes, transformando-se em um peróxido lipídico

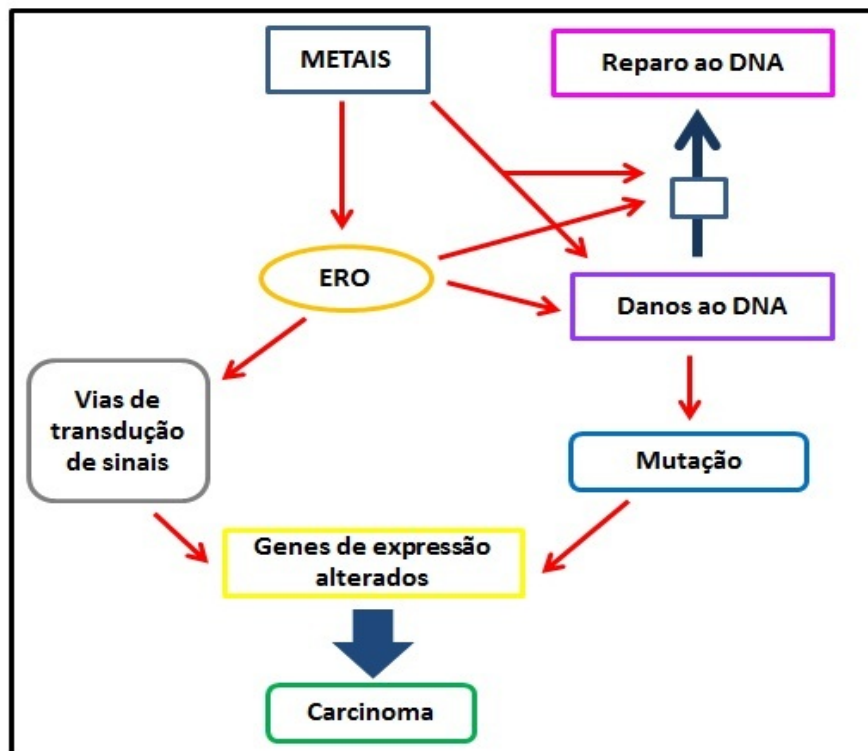


Fonte: Adaptado de Södergren (2000).

1.7.3 Danos no DNA

Existem alguns agentes ambientais que tem a capacidade de interagir e danificar a estrutura da molécula do DNA e são denominados genotóxicos (SHUGART, 2000). Os danos no DNA podem ocorrer devido a diversos agentes, sejam eles endógenos ou exógenos. Os metais podem ser considerados agentes exógenos com grande potencial genotóxico que acabam por provocar danos no DNA de forma direta ou indireta através da formação das ERO (BENASSI, 2004). Os danos gerados pela ação de metais podem ser reparados ou então poderá ocorrer a indução de mutações, aberrações cromossômicas, mal formação embrionária e efeitos a longo prazo, como câncer em animais vertebrados (FRENZILLI et al., 2004) (Figura 7).

Figura 7 –Diagrama com as possíveis vias de ações dos metais até o DNA e seus efeitos. ERO: Espécie reativa de oxigênio



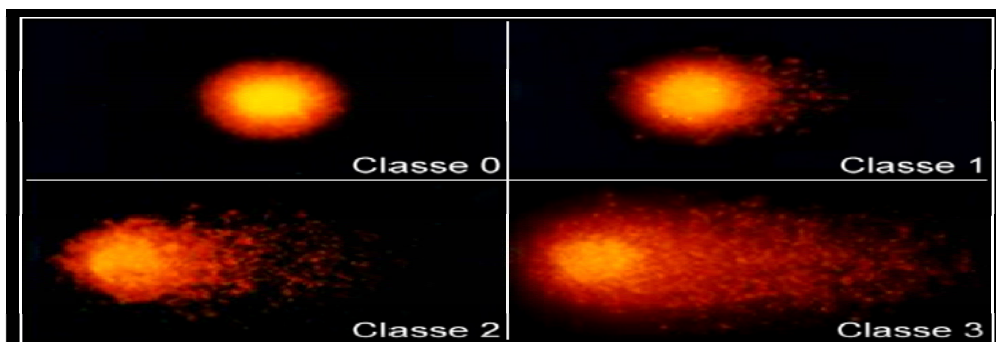
Fonte: Adaptada de Galaris e Evangelou (2002).

Os danos ocasionados por agentes químicos podem ser mensurados através do ensaio do cometa. Este teste é amplamente utilizado em

testes ecotoxicológicos, pois trata-se de um teste de custo relativamente baixo, simples, rápido e sensível (OLIVE & BANATH, 2006; DHAWAN et al., 2009). Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, crosslinks, e quebras resultantes de reparo por excisão (SINGH, 1996; TICE, 2000; SILVA et al., 2000), que são passíveis de reparos, mas se não forem devidamente reparados, poderá ocorrer à indução de mutações. De acordo com Jha (2008) os danos causados ao material genéticos são os mais importantes em nível molecular, e o ensaio do cometa é muito eficiente para detectar essas quebras nas fitas do DNA.

O ensaio do cometa surgiu em 1978 quando Rydeberg & Johanson detectaram os primeiros danos no DNA nas células usando a técnica de eletroforese em gel. Já em 1984 Johanson com ajuda de Ostling modificaram a técnica a fim de avaliar as quebras em fitas duplas sob condições neutras. E 1988 Singh e colaboradores adaptaram o ensaio para condições alcalinas (pH = 13), que determinaria não somente as quebras na fita dupla, mas também quebras nas fitas simples e ainda os sítios álcali-lábeis (DHAWAN et al., 2009). Popularmente conhecido como ensaio do cometa, ele recebe este nome devido à migração dos fragmentos do DNA durante a corrida de eletroforese, nos quais os menores fragmentos migram mais rápidos formando assim longas caudas partindo do núcleo (Figura 8). Muitos são os tecidos que podem ser utilizados para a realização do ensaio do cometa. Para peixe podemos destacar as células sanguíneas, fígados, e brânquias (LEE & STEINERT, 2003).

Figura 8 – Danos nos eritrócitos verificados pelo ensaio do cometa. A) Classe 0 (sem danos aparente), B) Classe 1 (cauda curta menor que o diâmetro do núcleo), C) Classe 2 (comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo), D) Classe 3 (comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo).



1.7.4 Metalotioneínas

As metalotioneínas (MTs) são proteínas citosólicas de baixo peso molecular, presentes em quase todos os organismos vivos. As MTs são ricas em cisteína, aminoácido que possui grupamentos tiol (-SH) em sua estrutura que conferem uma alta afinidade por íons metálicos livres, tornando-as proteínas de grande interesse sob o ponto de vista bioquímico (NORDBERG, 1998). Essas proteínas atuam como quelantes de metais e quando estes se encontram em excesso nas células desempenham um importante papel, atuando na desintoxicação e excreção contribuindo para um aumento na tolerância dos metais (LINDE et al., 2001; GOPAL, 2009).

As MTs estão envolvidas na regulação de metais essenciais, como o cobre e zinco, assim como na desintoxicação de metais não-essenciais (AMIARD et al., 2006). Por isso, as MTs passaram a ter grande importância como biomarcador relacionado com a poluição dos recursos hídricos por metais, principalmente em organismos aquáticos (ANDREWS, 2000). A partir das últimas décadas as metalotioneínas passaram a ser vistas como potenciais biomarcadores de metais em peixes para avaliar a poluição aquática e passaram a ser fundamentais em estudos relacionados com metais (GEORGEN & OLSSSEN 1994; OLSVICK et al., 2000; LANGSTON et al., 2002; SARKAR et al., 2006;. AMIARD et al., 2006; NESTO et al., 2007; FERNANDES et al., 2008).

Além de atuar como quelantes de metais, as MTs apresentam propriedades antioxidantes importantes, inibindo reações de propagação de radicais livres através da ligação seletiva de íons de metais pró-oxidantes, tais como ferro e cobre, e dos potencialmente tóxicos, como cádmio e mercúrio. Além disso, é um potente sequestrador de espécies reativas de oxigênio, limitando as possíveis lesões por elas ocasionadas (SUZUKI et al., 2002).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

✓ Investigar o acúmulo de níquel em diferentes tecidos do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* e caracterizar os efeitos deste metal nas defesas antioxidantes, conteúdo de metalotioneínas e a ocorrência de danos oxidativos e lesões no DNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar testes de toxicidade semi-estáticos e agudos (24 e 96 h) com jovens de *P. lineatus* expostos a três concentrações de níquel (0,025; 0,25 e 2,5 mg Ni.L⁻¹), sendo a menor delas correspondente à concentração máxima deste metal permitida para águas doces brasileiras (Resolução CONAMA 357, 2005);
- ✓ Determinar o acúmulo de níquel nos seguintes tecidos dos peixes: brânquias, fígado, rim e músculo;
- ✓ Avaliar os efeitos do níquel na atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx, GST e GR), conteúdo de antioxidantes não enzimáticos (GSH), ocorrência de danos oxidativos teciduais (peroxidação lipídica) em diferentes tecidos de *P. lineatus*;
- ✓ Determinar a concentração de metalotioneínas em fígado e brânquias de *P. lineatus* após exposição ao níquel;
- ✓ Averiguar se a exposição a diferentes concentrações de níquel produz danos no DNA de eritrócitos e células branquiais de *P. lineatus*

3 ARTIGO

MANUSCRITO EM FASE DE PREPARAÇÃO PARA SUBMISSÃO NO PERIÓDICO
AQUATIC TOXICOLOGY

BIOACUMULAÇÃO E EFEITOS DO NÍQUEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE
NEOTROPICAL

Francine Fernandes Palermo, Cláudia B. R. Martinez

BIOACUMULAÇÃO E EFEITOS DO NÍQUEL EM UMA ESPÉCIE DE PEIXE NEOTROPICAL

Francine Fernandes Palermo¹, Cláudia B. R. Martinez^{1*}

Resumo

Juvenis de *Prochilodus lineatus* foram expostos a diferentes concentrações nominais de níquel (0,025; 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹) e somente a água por 24 e 96 h (com renovação de água a cada 24 h), a fim de verificar os efeitos referentes à bioacumulação deste metal e sua influência em relação às defesas antioxidantes, ao conteúdo de metalotioneínas e a ocorrência de danos no DNA. Após as exposições os animais foram amostrados e os órgãos foram retirados (brânquias, fígado, rim e músculo) para verificação do acúmulo de níquel, e também, para análises bioquímicas (brânquias e fígado) e genéticas (células sanguíneas e branquiais). Os resultados mostraram que o níquel acumulou em diferentes proporções nos órgãos (rim > fígado > brânquias > músculo) variando também de acordo com o tempo experimental. Com relação às defesas antioxidantes pode-se inferir que a exposição ao níquel promoveu alterações em algumas enzimas evidenciando a ocorrência de estresse oxidativo que gerou danos evidenciados através da peroxidação lipídica em fígado, e danos no DNA nos dois tempos experimentais. As metalotioneínas apresentaram aumento em sua atividade confirmando seu papel protetor em relação à presença de metais nas células. Este trabalho mostrou que o níquel ocasionou alterações nas atividades das enzimas antioxidantes e danos no DNA. Assim, pode-se concluir que o níquel é um metal importante para estudos em peixes, visto que, mesmo em baixas concentrações ocasionou danos oxidativos nestes animais, e que a concentração máxima de Ni permitida pela legislação brasileira (Resolução CONAMA 357), que é de 0,025 mg. L⁻¹, não é segura para esta espécie.

Palavras-chave: Acúmulo. Enzimas antioxidantes. Estresse oxidativo. Metalotioneínas. *Prochilodus lineatus*. Danos ao DNA.

3.1 INTRODUÇÃO

Os ambientes aquáticos como rios, lagos e reservatórios recebem constantemente resíduos industriais, urbanos e da agricultura gerados pela atividade humana. Atualmente, a contaminação dos ecossistemas aquáticos por metais é um

¹ Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina. C.P. 6001. CEP: 86051-990. Londrina, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. Tel: +55 43 3371.4650 – Fax: +55 43 4471.4467 E-mail: cbueno@uel.br

problema crítico, pois estes poluentes podem causar efeitos adversos à biota (Almeida et al., 2001; Romani et al., 2003; Ribeiro et al., 2006). Os metais são capazes de induzir estresse oxidativo em organismos aquáticos, incluindo os peixes (Lionetto et al., 2003; Gioda et al., 2007), e assim, estimulam a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), iniciando processos degenerativos e causando danos e mutações ao DNA.

Enzimas como a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD), a glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR) e a glutathione S-transferase (GST) fazem parte do sistema antioxidante presente nas células para proteger o organismo contra os danos causados por essas ERO. As atividades destas enzimas quando alteradas podem ser indicadores de exposição a poluentes aquáticos, bem como ferramentas utilizadas em avaliações toxicológicas (Almeida et al., 2001; Monteiro et al., 2006). O aumento na formação das ERO pode causar danos em muitos constituintes celulares, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídios (Almroth et al., 2005; Bagnyukova et al., 2005).

O níquel (Ni) é um dos metais que pode estar presente em águas contaminadas podendo ser tóxico aos organismos deste ecossistema. É um elemento comumente encontrado na biosfera e é um componente natural presente nas águas doces em virtude da erosão e intemperismo (Eisler, 1998), sua concentração típica em águas doces varia de 0,001 a 0,010 $mg.L^{-1}$ (Galvin, 1996). Entretanto, o níquel e seus compostos são amplamente utilizados em galvanoplastia, na fabricação de aço inoxidável, manufatura de baterias Ni-Cd, moedas, pigmentos, entre outros. Assim, concentrações de níquel em águas superficiais podem chegar a 0,1 $mg.L^{-1}$ e valores ainda mais elevados podem ser encontrados em áreas de mineração (Cetesb, 2010). No Brasil, de acordo com a Resolução CONAMA 357 (2005), o nível máximo de níquel permitido para águas doces é de 0,025 $mg Ni total.L^{-1}$. Em peixes de água doce o acúmulo de níquel pode variar de 10 a 120 $\mu g.g^{-1}$ e sua distribuição varia muito de tecido para tecido (Vos e Hovens, 1986).

Apesar da importância do níquel como contaminante aquático, o conhecimento sobre seus efeitos é muito limitado se comparado com outros metais como o cobre ou o zinco (Deleebeeck et al., 2007). Os mecanismos de toxicidade do níquel para peixes jovens parecem estar associados a um distúrbio respiratório nas

brânquias, causado por alterações estruturais (Pane et al., 2003, 2004), entretanto, muitos efeitos associados à presença do níquel na água precisam ser elucidados. Khangarot e Ray (1990) relataram que os sinais do envenenamento de níquel em peixes incluem movimentos rápidos da boca e dos opérculos e, antes da morte, convulsões e perda de equilíbrio. Ellgaard e colaboradores (1995) descreveram a destruição das lamelas branquiais por níquel iônico e a consequente redução na taxa de ventilação podendo causar hipóxia e morte dos peixes. Outros sinais de intoxicação por níquel em peixes incluem diminuição das concentrações de glicogênio no músculo e fígado, com aumentos simultâneos nos níveis de ácido láctico e de glicose no sangue (Ghazaly 1992).

Os possíveis efeitos genotóxicos do níquel para peixes ainda são amplamente desconhecidos, mas já se sabe que este metal é capaz de causar câncer e mutações em mamíferos (Ptashynski et al., 2002) e produzir efeitos teratogênicos e mutagênicos em anfíbios (Eisler, 1998). Os efeitos tóxicos e carcinogênicos de compostos de níquel já foram associados com danos oxidativos no DNA e proteínas e à inibição das defesas antioxidantes (Rodriguez et al., 1996). Além disso, alguns trabalhos já mostraram que o níquel pode inibir a indução de enzimas da família do citocromo P-450 (Iskan, 1992; Brüscheweiler, 1996) e dessa forma, este metal pode interferir na metabolização de xenobióticos orgânicos. Diante destes fatos e devido à necessidade de informações sobre a toxicidade do níquel em organismos aquáticos o objetivo deste trabalho foi caracterizar o acúmulo de níquel em diferentes tecidos e seus efeitos no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, com enfoque nas defesas antioxidantes, danos no DNA e no conteúdo de metalotioneínas. Esta espécie de peixe foi escolhida por tratar-se de uma espécie sensível a diversos xenobióticos e que possui fisiologia conhecida (Martinez e Cólus, 2002).

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais

Juvenis de *Prochilodus lineatus* pesando $10,16 \pm 0,36$ g e medindo $8,95 \pm 0,87$ (média \pm EP, n= 279) foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) e levados para a sala de bioensaios do

Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA-UDEL), onde foram aclimatados por até uma semana (5 a 7 dias) em tanques de 300 litros, contendo água desclorada e aeração constante, e as condições de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido foram monitoradas. Os animais foram submetidos a um fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro, e alimentados a cada 48 h com ração comercial, sendo que, 48 h antes dos testes de toxicidade e durante o experimento a alimentação foi suspensa.

3.2.2 Testes de Toxicidade e Amostragem

Os animais foram submetidos a testes de toxicidade semi-estáticos, com renovação de água a cada 24 h, por 24 e 96 h. Para cada tempo experimental foram realizados experimentos independentes. Foram utilizados quatro aquários de 100 litros, contendo 8 peixes cada; um dos aquários continha apenas água desclorada (grupo controle ou CTR) e os outros três (grupos experimentais ou EXP) receberam níquel nas seguintes concentrações nominais: 0,025, 0,25 e 2,5 mg Ni.L⁻¹. Utilizou-se cloreto de níquel (marca Synth) para realização dos testes que era adicionado nos aquários 24 h antes dos peixes. Durante as exposições os seguintes parâmetros da água: temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido, foram monitorados.

Durante os testes foram realizadas coletas diárias de água com seringas de vidro, tanto do aquário controle quanto dos experimentais para a determinação da concentração de níquel total e dissolvido. Após a coleta de água as amostras para a detecção de níquel total eram acidificadas (2% HNO₃ da marca FMaia). Para a análise de níquel dissolvido a água coletada era filtrada (malha de 45 µm) e posteriormente acidificada. Após fixadas as amostras de água eram armazenadas em tubos e conservadas na geladeira para análises de acúmulo deste metal.

Após as exposições (24 ou 96 horas) os animais eram anestesiados com benzocaína (0,6 g de benzocaína e 70 mL de álcool adicionados em 2 L de água) e submetidos à retirada de sangue pela veia caudal, com seringas heparinizadas. As amostras de sangue eram armazenadas em tubos plásticos, contendo 700 µL de salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, NaHCO₃ 3,7 mM, Na₂HPO₄ 8,9 mM, NaH₂PO₄ 2,9 mM) e

conservados na geladeira durante o período de amostragem, para em seguida, realizar o ensaio do cometa. Em seguida os peixes eram pesados, medidos e mortos por secção medular para a retirada das brânquias, fígado, rim e músculo para futuras análises.

3.2.3 Determinação de Níquel nos Tecidos

Para a quantificação de níquel foram utilizados os seguintes tecidos: brânquias, fígados, rins e músculos. Os órgãos foram pesados e colocados em tubos criogênicos e mantidos a 60°C até que o peso permanecesse constante, para a obtenção do peso seco. Às amostras de tecido seco foi adicionado ácido nítrico (65% Supra Puro - Merck) na proporção de 1:10 (peso:volume) e as amostras colocados em estufa (60° C) novamente até a digestão completa do tecido. Após a digestão as amostras foram centrifugadas (14.000 x g, 20 min) e o sobrenadante foi armazenado em tubos plásticos para posterior determinação de níquel. As análises foram realizadas utilizando-se um espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (Perkin Elmer – AA700) através de uma curva padrão construída a partir de uma solução padrão de Ni diluída em solução de ácido nítrico 0,2 %. As amostras foram analisadas em duplicatas.

3.2.4 Análises Bioquímicas

Para análises de defesas antioxidantes e peroxidação lipídica foram utilizadas amostras de brânquias e fígado, que foram devidamente pesadas e homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M), pH 7,0, na proporção de 1:5 (peso:volume) para brânquias e 1:10 (peso:volume) para o fígado. Depois de homogeneizadas as amostras foram centrifugadas (13.200 x g, 4°C, 20 min) e em seguida foram separados os sobrenadantes para realização dos ensaios bioquímicos.

3.2.4.1 Defesas antioxidantes

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, proveniente do

sistema xantina/xantina oxidase, em 550 nm a 25° C em pH 7,8, de acordo com McCord e Fridovich (1969). A atividade da enzima foi expressa em U de SOD.mg de proteína⁻¹. Uma unidade (U) de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo c.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada seguindo-se a velocidade de decomposição do H₂O₂, através do decréscimo de absorbância em 240 nm (Beutler, 1975). A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ metabolizado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

A atividade da glutathiona peroxidase (GPx) selênio-dependente foi determinada pelo método de Hopkins e Tudhope (1973), baseado na oxidação do NADPH + H⁺ em presença de H₂O₂, em 340 nm. A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado.min}^{-1}.mg de proteína⁻¹.$

A glutathiona redutase (GR) foi determinada indiretamente pela redução do NADPH mediante a presença da glutathiona oxidada (GSSG), em 340 nm (Carlberg e Mannervik, 1975). A atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{mol NADPH oxidado.min}^{-1}.mg de proteína⁻¹.$

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi determinada de acordo com o método de Beutler e colaboradores (1963). Inicialmente foi adicionado ácido tricloroacético (TCA) às amostras, na proporção de 1:1 (volume:volume com TCA 6%). Após centrifugação (1.200 g), foi adicionado tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 7,9, e DTNB 2,5 mM (5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico) formando o ânion tiolato, determinado em 412 nm. O conteúdo de GSH foi expresso em $\mu\text{g de GSH.mg de proteína}^{-1}$, a partir de uma curva padrão de 10 a 200 $\mu\text{M de GSH}$.

A conjugação de GSH como substrato clorodinitrobenzeno (CDNB), catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm, e a atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado (KEEN et al., 1974). O ensaio enzimático de 1 minuto foi realizado em tampão fosfato de potássio 0,1 mM, pH 7,0 contendo 0,1 mM GSH. Como substrato foi utilizado 100 mM de CDNB. As análises foram feitas em duplicatas e os valores da atividade da enzima expressas em $\text{nmol de CDNB. min}^{-1}.mg⁻¹ de proteína.$

3.2.4.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada pela produção de malondialdeído (MDA) que corresponde a um dos produtos finais da LPO. Foi utilizado o ensaio TBARS, de acordo com Camejo e colaboradores (1998), que consiste em quantificar o MDA pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em 530 nm. A peroxidação lipídica foi expressa em equivalentes de MDA, como $\mu\text{mol MDA.mg de proteína}^{-1}$, usando uma curva padrão de MDA.

3.2.4.3 Conteúdo de metalotioneínas

O conteúdo de metalotioneínas foi determinado pela metodologia descrita por Viarengo e colaboradores (1999) com modificações, utilizando-se como padrão a glutathiona reduzida (GSH). Para esse ensaio foram utilizadas amostras de tecido branquial e hepático homogeneizadas em tampão Tris-HCl 20 mM, contendo sacarose 0,5 Mm e β -Mercaptoetanol 0,01%, pH 8,6. O conteúdo de MTs foi quantificado por espectrofotômetro em 412 nm, utilizando-se o reagente de Ellman (NaCl 2M, DTNB 0,43 M em tampão fosfato 0,2 M; pH 8,0). Os resultados foram expressos em $\mu\text{M GSH.mg de proteína}^{-1}$, a partir de uma curva padrão de GSH.

3.2.4.4 Concentração de proteínas

A concentração de proteína foi determinada de acordo com a metodologia de Lowry e colaboradores (1951) utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 700 nm. Os dados das concentrações de proteínas foram utilizados para a expressão dos resultados obtidos nos demais ensaios bioquímicos.

3.2.5 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Singh e colaboradores (1988), com modificações para as células sanguíneas, de acordo com Vanzella e colaboradores (2007) e para brânquias, de acordo com Cavalcante e colaboradores (2008).

A metodologia para a preparação da suspensão celular foi baseada no protocolo de Kilemade et al. (2004), com modificações de Cavalcante et al.

(2008). As brânquias foram limpas com salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, NaHCO₃ 3,7 mM, Na₂HPO₄ 8,9 mM, NaH₂PO₄ 2,9 mM) e em seguida os filamentos foram seccionados e o material resultante foi mantido, por 15 min, em microtubo contendo tripsina a 0,05 % para a dissociação celular; para cessar esta etapa foi adicionado soro bovino fetal. Em seguida, a solução foi filtrada obtendo-se assim as células em suspensão que posteriormente foi centrifugada (10.000 x g 10 min) e o pellet foi ressuspendido com PBS.

Antes de iniciar o ensaio cometa foram realizados testes de viabilidade celular tanto em células sanguíneas quanto branquiais, utilizando-se o método de exclusão de células pelo corante azul de Trypan 1 %. Para tanto, um volume de 20 µL de amostra foi misturado em 50 µL do corante e analisados em câmara de Neubauer espelhada, discriminando-se as células viáveis (incolores) e as células inviáveis (azuis). O ensaio cometa só foi realizado com amostras apresentando viabilidade de no mínimo 80% (Tice et al., 2000).

Para a realização do ensaio cometa utilizou-se uma mistura de 10 µL de solução contendo as células em suspensão (sanguíneas e/ou branquiais) com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5 %. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal (ponto de fusão de 1,5%), coberta com lamínula, e permaneceu na geladeira por 30 min. Em seguida as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 hora. Após esse tempo as lâminas foram transferidas para cubas de eletroforese contendo solução tampão (0,3 N NaOH/1 mM EDTA, pH > 13) e permaneceram por 30 minutos. Logo depois foram submetidas à eletroforese por 20 minutos (300 mA, 25 V, 1 V.cm⁻¹), sendo que após as lâminas foram neutralizadas com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5), em 3 lavagens de 5 min, e fixadas em etanol por 10 minutos.

Para cada peixe, para cada tipo celular (células sanguíneas ou branquiais), foram feitas duas lâminas. As lâminas foram coradas com gelRed e analisadas em microscópio de fluorescência com objetiva 100X em teste cego. Foram analisadas 100 células por lâmina. Os danos no DNA foram classificados de acordo com Kobayashi e colaboradores (1995), considerando-se o tamanho da cauda do cometa, em 4 classes: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda

curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. A partir dessa classificação foi calculado o escore médio de danos no DNA para cada tecido, de cada indivíduo, pela soma do valor da multiplicação do número de nucleóides encontrados em cada classe pelo valor da classe. Também foi calculado o número de nucleóides danificados através da soma do total de nucleóides encontrados nas classes 1, 2 e 3.

3.2.6 Análises Estatísticas

As diferenças entre o grupo controle e os grupos experimentais de cada tempo de exposição foram comparadas entre si de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade das variâncias). As comparações foram feitas independentes, uma vez que os experimentos de 24 e 96 h foram realizados em datas diferentes. Utilizou-se o teste paramétrico de análise de variância (ANOVA), seguido do teste Student-Newman-Keuls quando necessário, ou o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn's. Foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$. Os resultados foram expressos pela média \pm erro padrão da média.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Parâmetros da Água

Ao longo dos experimentos os valores de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido (OD) foram monitorados a cada 24 horas e não variaram significativamente nesse período (Tabela 1). A água utilizada apresentou dureza de $35 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

Tabela 1 – Parâmetros físicos e químicos da água analisados durante o período experimental (24 e 96 h).

Tratamento	Temperatura (°C)	pH	Condutividade ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	OD ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Aclimação (8)	20,36 ± 1,12	7,12 ± 0,250	82 ± 0,001	7,66 ± 0,660
24 h (8)	21,77 ± 0,85	7,00 ± 0,003	80 ± 0,044	8,07 ± 0,570
48 h (4)	21,53 ± 1,67	7,02 ± 0,080	78 ± 0,004	7,28 ± 0,015
72 h (4)	20,89 ± 2,02	7,00 ± 0,010	79 ± 0,007	7,44 ± 0,080
96 h (4)	21,33 ± 0,80	7,07 ± 0,010	78 ± 0,004	7,34 ± 0,140

Valores indicam a média ± EP e o valor de n entre parênteses.

3.3.2 Concentração de Níquel na Água

Os resultados das concentrações de níquel total e dissolvido na água coletada tanto dos aquários controles quanto nos experimentais, ao longo de toda a exposição (96 h) estão apresentados na Tabela 2. A concentração de níquel total apresentou-se maior que a dissolvida em todas as análises e verificou-se que as concentrações totais detectadas foram muito próximas das nominais.

Tabela 2 – Concentração de níquel total e dissolvido ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) na água dos aquários contendo as concentrações nominais de Ni correspondentes a 0 (CTR), 0,025, 0,25 e 2,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 h.

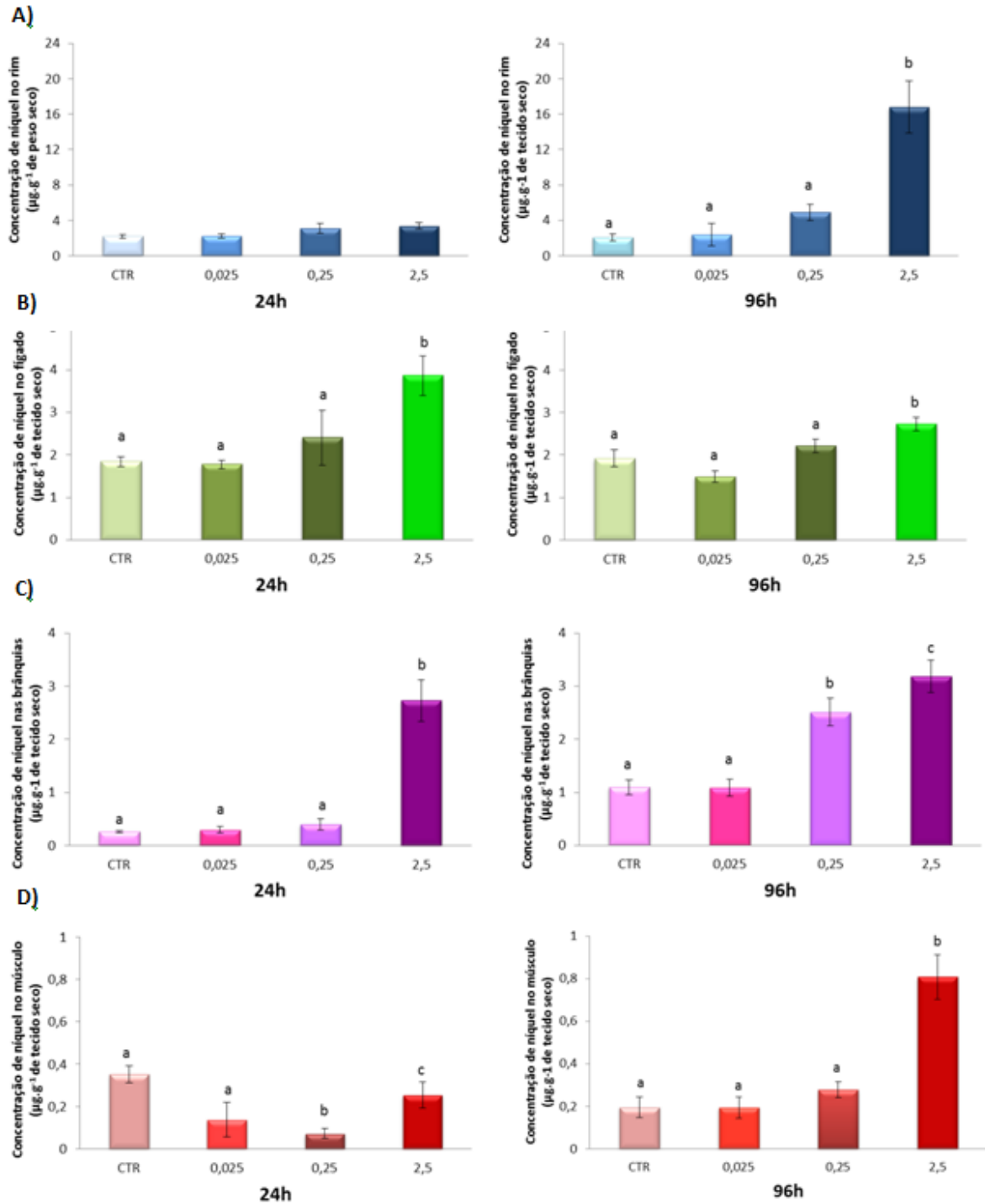
[Ni] nominal ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	[Ni]	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0	Total	ND	ND	ND	ND	ND
	Dissolvido	ND	ND	ND	ND	ND
0,025	Total	0,0241 ± 0,0012	0,023 ± 0,0009	0,0228 ± 0,0017	0,0223 ± 0,0019	0,0218 ± 0,0019
	Dissolvido	0,0237 ± 0,0016	0,022 ± 0,0015	0,0218 ± 0,0087	0,0222 ± 0,0021	0,0196 ± 0,0017
0,25	Total	0,252 ± 0,0014	0,246 ± 0,0016	0,235 ± 0,0017	0,231 ± 0,0021	0,227 ± 0,0018
	Dissolvido	0,233 ± 0,0019	0,221 ± 0,0035	0,224 ± 0,0023	0,219 ± 0,0018	0,211 ± 0,0015
2,5	Total	2,48 ± 0,0024	2,42 ± 0,0018	2,37 ± 0,0019	2,29 ± 0,0018	2,21 ± 0,0014
	Dissolvido	2,37 ± 0,0021	2,31 ± 0,0149	2,22 ± 0,0029	2,17 ± 0,0023	2,21 ± 0,0028

Valores indicam a média ± EP. n = de 8-16. N/D: valores não detectados. Limite de detecção: 0,005 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

3.3.3 Acúmulo de Níquel nos Tecidos

De acordo com as análises dos tecidos (brânquias, fígado, rim e músculos, ficou evidente que no tempo experimental de 96 h houve maior acúmulo nesses tecidos que no menor tempo de exposição (24 h), exceto para fígado, que no tempo 24 h apresentou acúmulo maior que em 96 h. Os diferentes órgãos analisados acumularam o metal de forma distinta, sendo que, o padrão de acúmulo de Ni observado nos tecidos de *P. lineatus*, independente do tempo de exposição, foi rim > fígado > brânquias > músculo. O rim foi o órgão que mais acumulou níquel (2 a 16 $\mu\text{g Ni.g tec}^{-1}$) (Figura 9 A), seguido pelo fígado (1,8 a 3,8 $\mu\text{g Ni.g tec}^{-1}$) (Figura 9 B), brânquias (0,2 a 3,1 $\mu\text{g Ni.g tec}^{-1}$) (Figura 9 C), e músculos (0,07 a 0,8 $\mu\text{g Ni.g tec}^{-1}$) (Figura 9 D). Em todos os órgãos houve aumento significativo do acúmulo de Ni nos peixes expostos a maior concentração (2,5 mg.L^{-1}) quando comparados com seus respectivos controles, nos dois tempos experimentais (24 e 96 h). Ficou evidente também uma tendência de aumento do acúmulo tecidual de níquel com o aumento da concentração do metal na água, tanto em 24 quanto em 96 h. Apenas no rim, o acúmulo de Ni dos animais da exposição de 24 h não variou significativamente entre o grupo CTR e aqueles expostos ao metal.

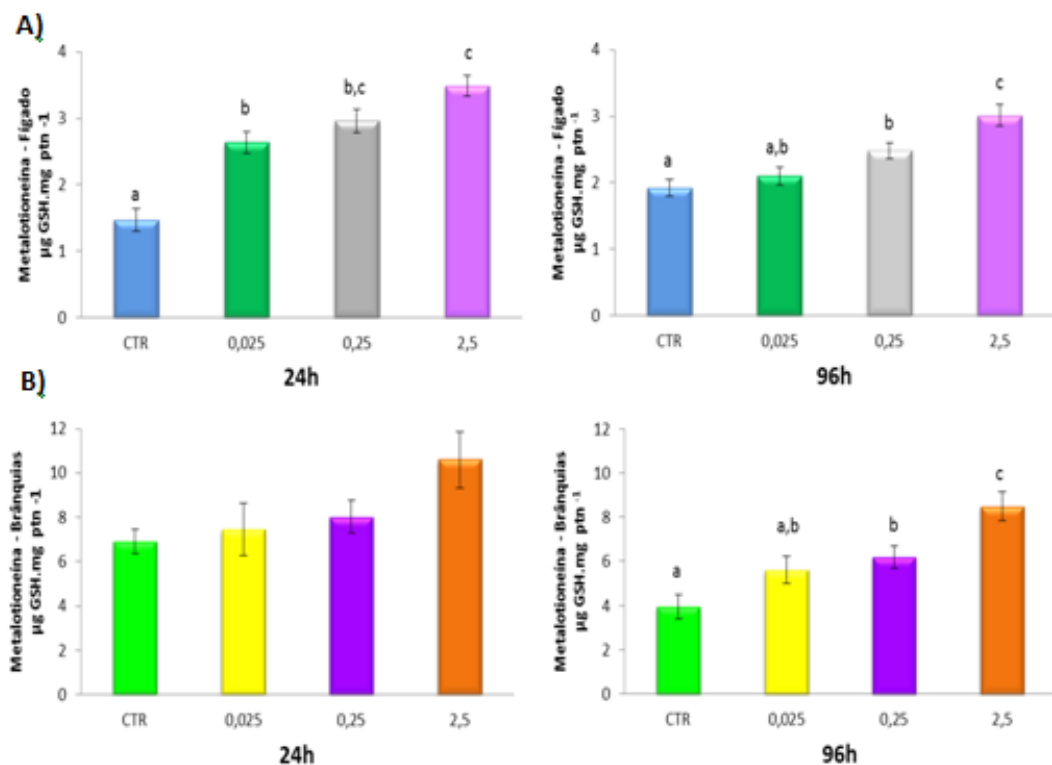
Figura 9 – Concentração de níquel ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tecido seco) nos tecidos: rim (A) fígado (B), brânquias (C) e músculo (D) de *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de níquel durante 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).



3.3.4 Metalotioneínas

Os resultados de concentração de metalotioneínas no fígado (Figura 10 A) e brânquias (Figura 10 B) mostrou que em 24 h os valores foram maiores que em 96 h. Sendo que para o fígado, no primeiro tempo experimental, todas as concentrações de níquel foram significativamente diferentes do CTR. Já para as brânquias, as concentrações de metalotioneína não diferiram significativamente uma das outras após 24 h de exposição, apesar de ficar evidente a tendência de aumento com o aumento da concentração de Ni na água. Após 96 h de exposição às concentrações de 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹, a concentração de MTs, tanto no fígado como nas brânquias, foi significativamente maior em relação aos grupos controle (Figura 10).

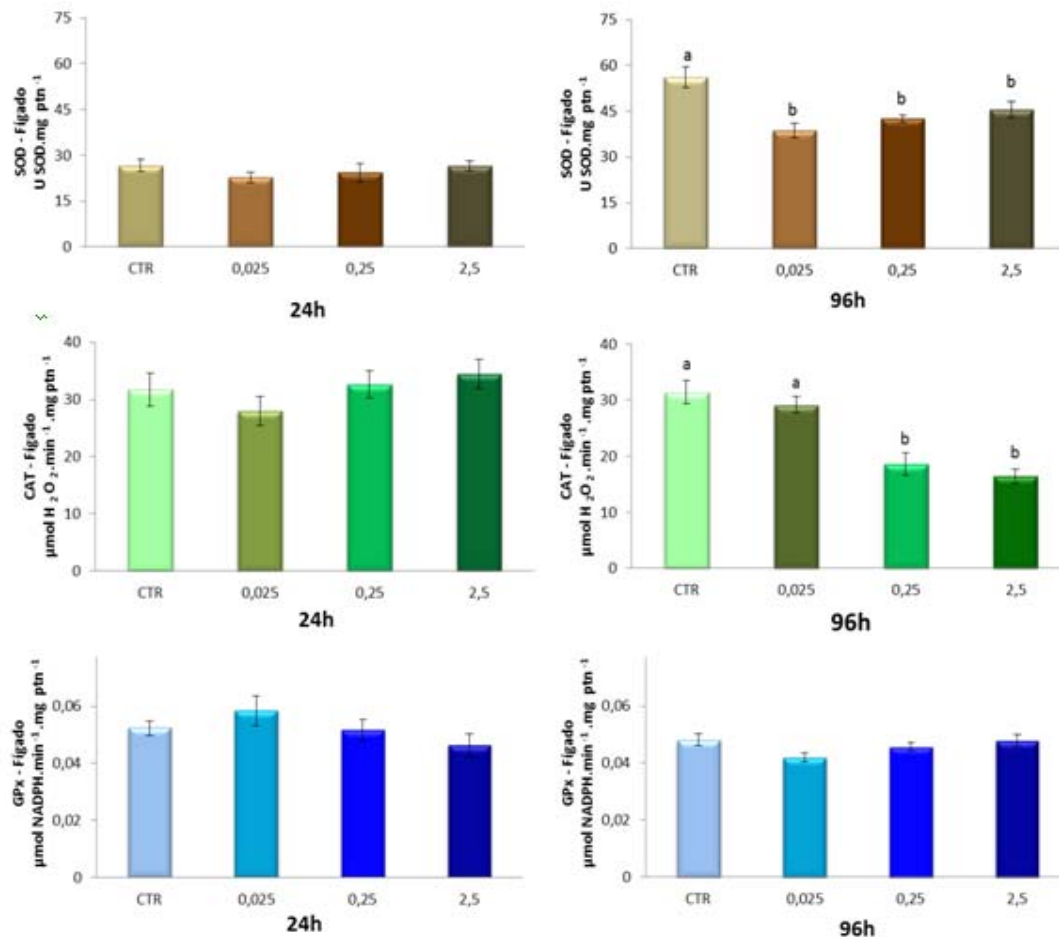
Figura 10 – Concentração de metalotioneína no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel durante 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).



3.3.5 Defesas Antioxidantes

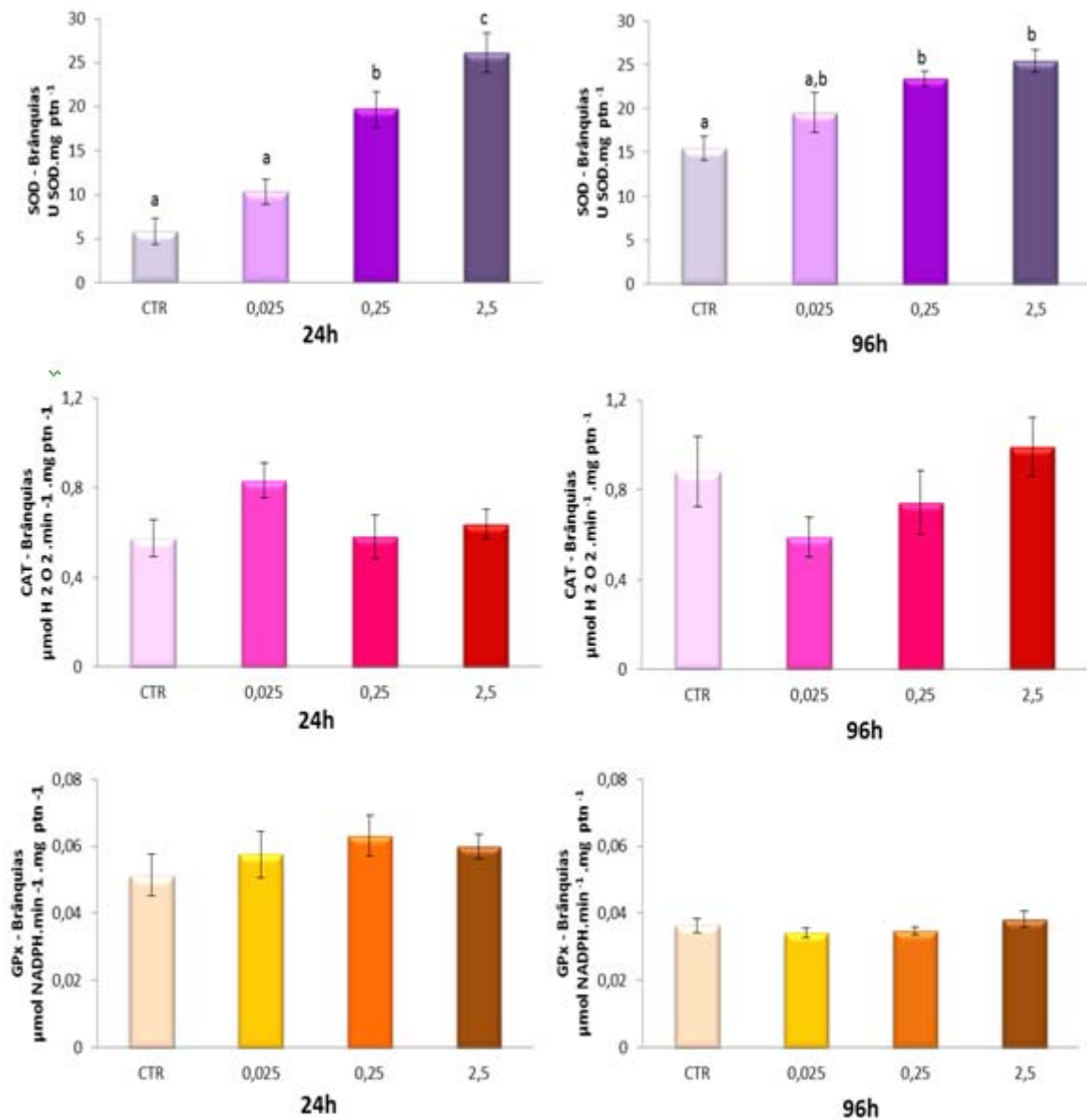
As atividades da SOD e CAT hepáticas não variaram significativamente entre os peixes do grupo CTR e dos grupos expostos ao Ni no tempo experimental de 24 h (Figuras 11 A e 11 B). Após 96 h, a atividade da SOD hepática mostrou redução significativa nos peixes expostos a todas as concentrações de Ni em relação aos peixes do grupo CTR (Figura 11 A). A atividade da CAT hepática, apresentou diminuição significativa após 96 h de exposição a 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de Ni, e quanto maior a concentração de Ni, maior a inibição da atividade enzimática (Figura 11 B) Com relação à atividade hepática da enzima GPx, não foram verificadas variações significativas entre os peixes do grupo CTR e dos grupos Ni em nenhum dos dois tempos experimentais (Figura 11 C).

Figura 11 –Atividade da SOD (A), CAT (B), GPx (C) no fígado de *Prochilodus lineatus* exposto apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel durante 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).



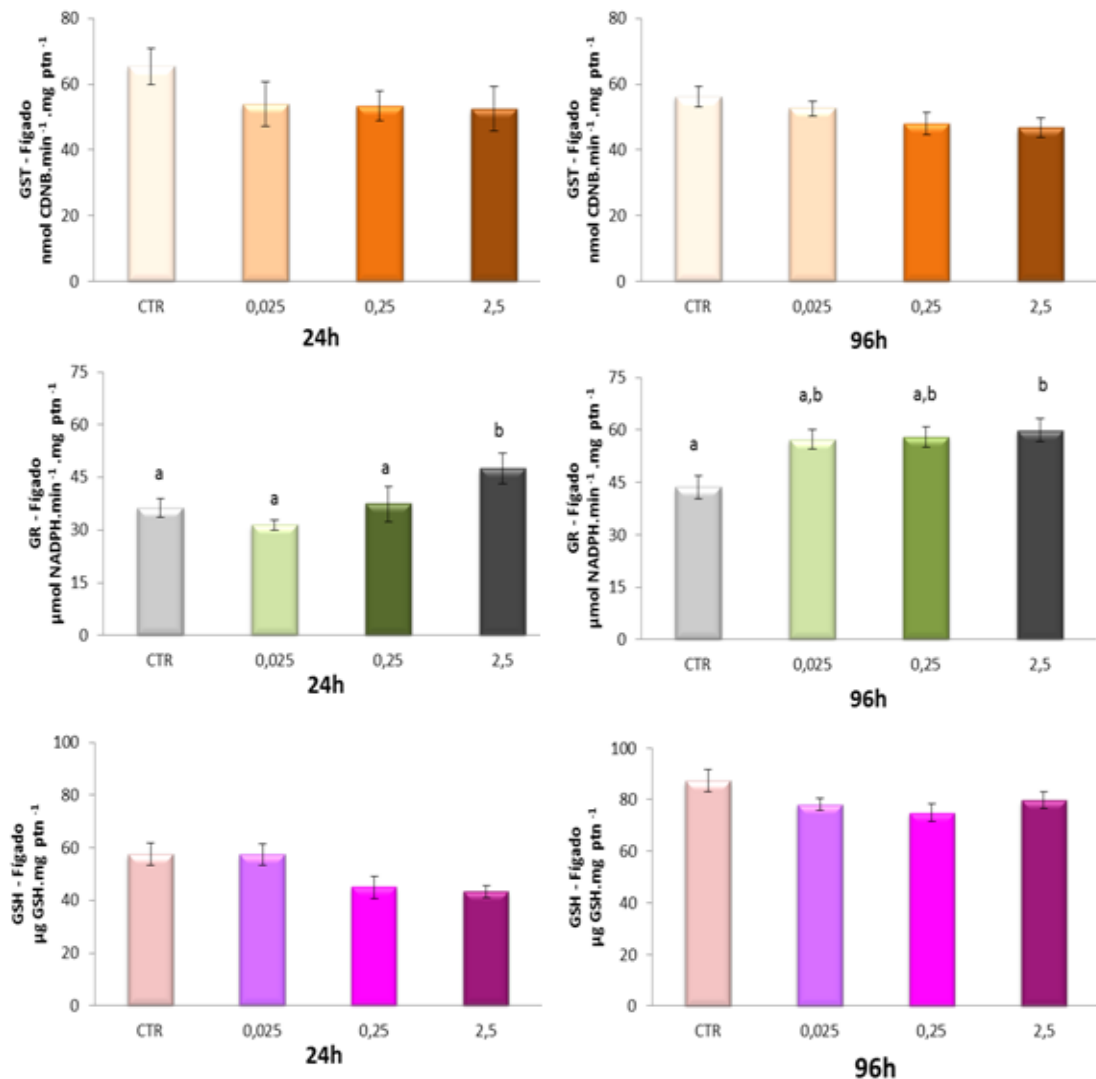
A atividade branquial da SOD aumentou significativamente nos peixes expostos a 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de Ni, após 24 e 96 h de exposição, em relação aos respectivos grupos CTR (Figura 12 A). Já as atividades da CAT e GPx nas brânquias não variaram significativamente entre peixes do grupo CTR e dos grupos expostos ao Ni (Figura 12 B e 12 C).

Figura 12 –Atividade da SOD (A), CAT (B), GPx (C) nas brânquias de *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel durante 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).



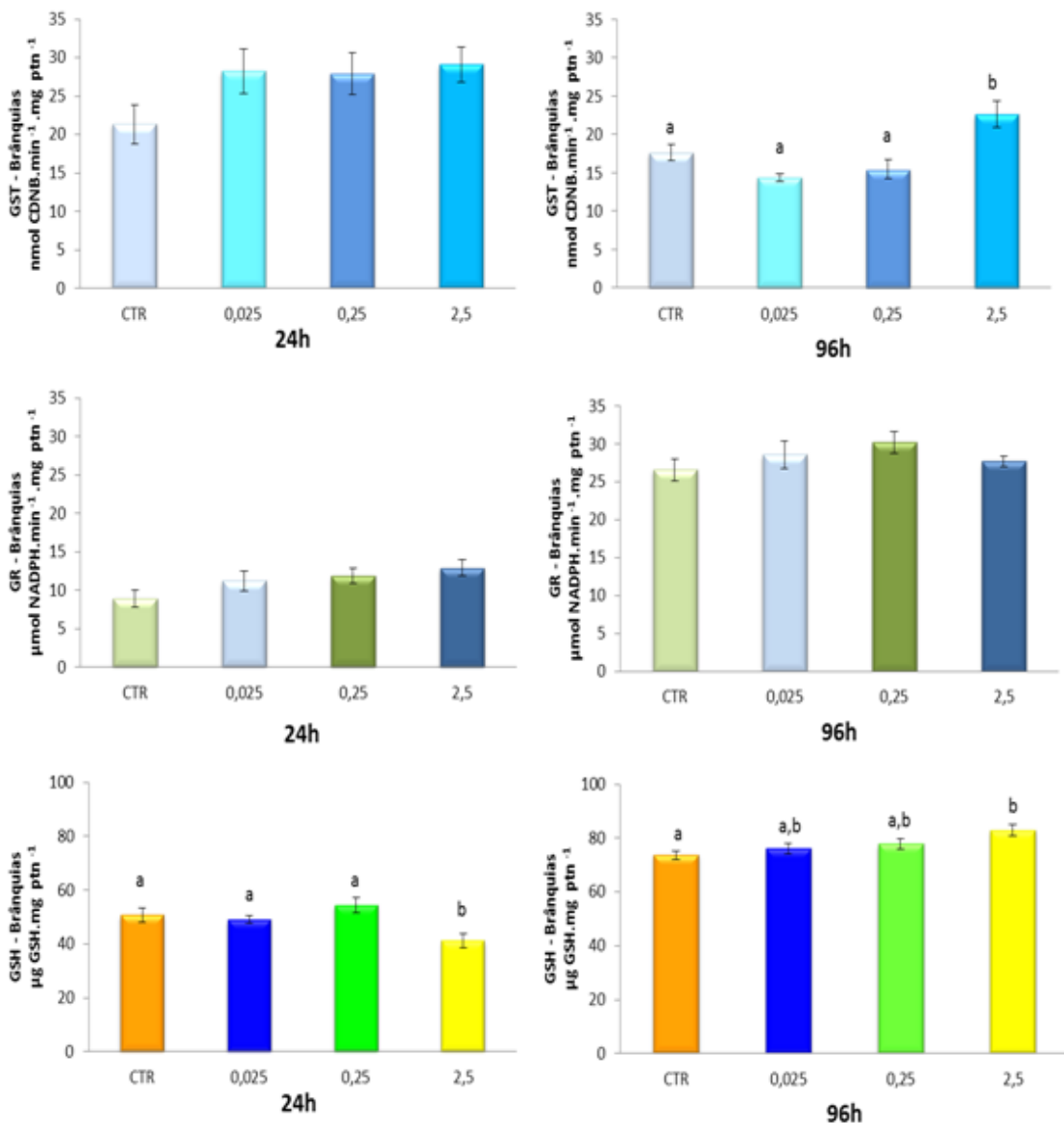
Quanto à atividade da GST no fígado, não foi observada diferença significativa entre os peixes do CTR e dos grupos Ni, em nenhum dos tempos amostrais (Figura 13 A). Por outro lado, a atividade da GR hepática aumentou significativamente nos peixes expostos a maior concentração de níquel, em relação aos respectivos grupos CTR, em ambos os tempos experimentais (Figura 13 B). O conteúdo hepático de GSH não variou significativamente entre os grupos de peixes expostos ao Ni e seus respectivos controles em nenhum tempo experimental (Figura 13 C).

Figura 13 –Atividade da GST (A) e GR (B) hepática e conteúdo hepático de GSH (C) em *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel, durante 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).



Nas brânquias, a atividade da GST não variou significativamente no tempo de 24 h, mas houve aumento da atividade desta enzima após 96 h de exposição a maior concentração de Ni em relação ao CTR (Figura 14 A). A atividade branquial da GR não apresentou nenhuma variação significativa após a exposição ao Ni, em nenhum tempo experimental (Figura 14 B). O conteúdo de GSH nas brânquias também não variou significativamente, após a exposição ao Ni, em nenhum dos tempos de exposição (Figura 14 C).

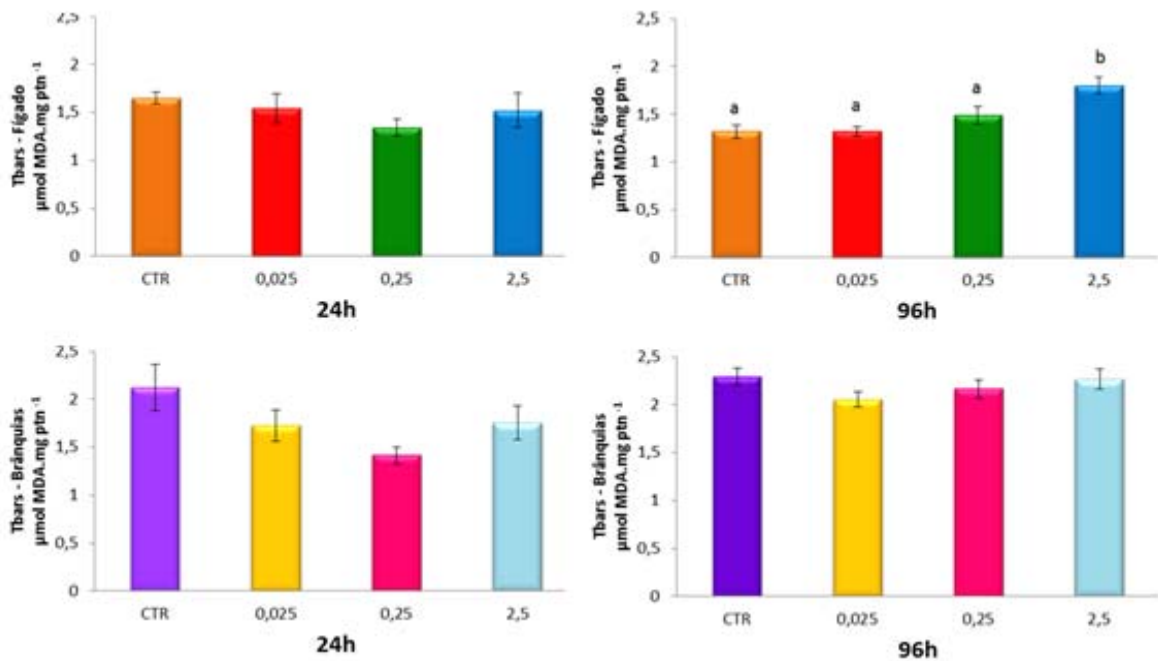
Figura 14 –Atividade branquial da GST (A) e GR (B) e conteúdo branquial de GSH (C) de *Prochilodus lineatus* expostos apenas à água (CTR) e 0,025; 0,25 e 2,5 mg. L⁻¹ de níquel durante 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).



3.3.6 Peroxidação Lipídica

Os resultados do conteúdo de MDA, determinado pelo ensaio TBARS para fígado e brânquias, estão representados na Figura 14. Verificou-se aumento significativo de MDA apenas no fígado dos peixes exposto a maior concentração de Ni testada ($2,5 \text{ mg.L}^{-1}$), durante 96 h (Figura 15 A). Para brânquias não foram constatadas diferenças significativas em nenhum dos tempos experimentais (Figura 15 B).

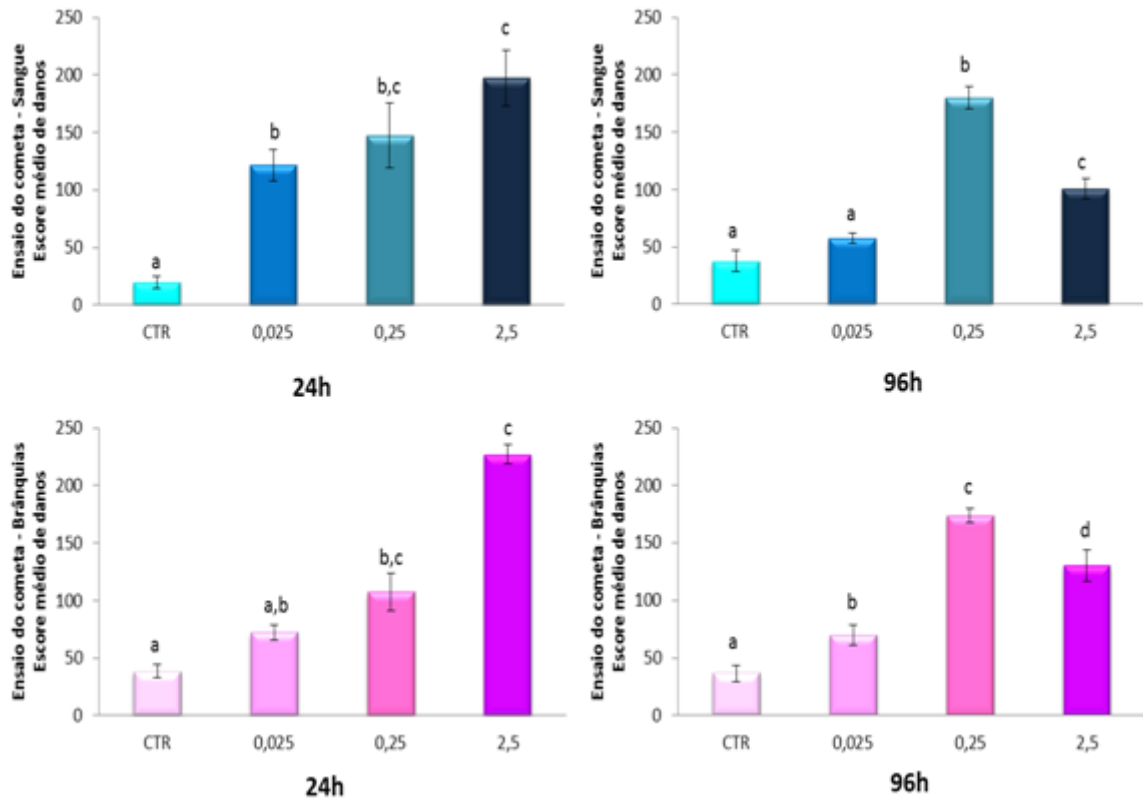
Figura 15 – Conteúdo de MDA no fígado (A) e nas brânquias (B) de *Prochilodus lineatus* expostos à somente a água (CTR) e 0,025; 0,25 e $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de níquel durante 24 e 96h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$).



3.3.7 Danos no DNA

Através do ensaio cometa foram evidenciados os danos no DNA ocasionados pelo Ni em células branquiais e eritrócitos de *P. lineatus*. Na Figura 16 estão os escores médios dos danos no DNA nesses tecidos. Nos dois órgãos analisados foi observado aumento significativo no escore de danos no DNA após 24 e 96 h de exposição às diferentes concentrações de Ni.

Figura 16 – Escores médios de danos em células sanguíneas (A) e branquiais (B) de *Prochilodus lineatus* expostos à somente a água (CTR) e 0,025, 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel durante 24 e 96 h. As barras representam as médias e as linhas verticais o erro padrão. Letras diferentes representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0.05$).



Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da frequência de nucleóides danificados em eritrócitos de *P. lineatus* de acordo com as classes de danos (0, 1, 2 e 3). Nos peixes do grupo CTR observou-se maiores percentuais de nucleóides na classe 0 com 81,13 % (24 h) e 71,88 % (96 h). Na concentração de 0,025 mg.L⁻¹ de Ni houve aumento de nucleóides de classe 1 para 24 h (47,13 %). Em 0,25 mg.L⁻¹ observou-se aumento na frequência de nucleóides de classe 2 em 96 h, com 52,56%. E na concentração de 2,5 mg.L⁻¹ a maior frequência de nucleóides foi na classe 3, com 38,8 % em 24 h. Estes resultados mostram que nas maiores concentrações de Ni foram observados os maiores danos.

Tabela 3 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média ± EP) nos eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos a 0,025, 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.

Tratamento	N	Tempo	CLASSES DE DANOS				Nucleóides danificados (média ± EP)
			0	1	2	3	
CTR	8	24h	81,13	17,75	1,13	0	18,88 ± 4,57 (a)
	8	96h	71,88	19,75	7,13	1,25	28,13 ± 5,98 (A)
0,025	8	24h	19,25	47,13	22,38	10,00	79,50 ± 3,43 (b)
	8	96h	49,38	44,00	6,63	0	50,63 ± 3,22 (A,C)
0,25	7	24h	15,86	42,14	20,71	21,19	84,14 ± 4,46 (b)
	9	96h	7,89	19,33	52,56	18,44	90,33 ± 3,02 (B,C)
2,5	8	24h	8,00	25,13	27,75	38,88	91,75 ± 3,21 (b)
	8	96h	33,63	39,63	19,38	7,38	66,38 ± 3,06 (C)

Letras diferentes (minúsculas para 24 e maiúsculas para 96 h) representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$) com relação aos nucleóides danificados.

Nas brânquias dos peixes do grupo CTR observou-se maiores percentuais de nucleóides na classe 0, com 71,25% em 24 h e 71% em 96 h. Na menor concentração de Ni (0,025 mg.L⁻¹) foi encontrada maior frequência de nucleóides de classe 1 com 56,88% em 24 h. Já na concentração intermediária verificou-se maior frequência de danos na classe 2 (49,13%) em 96 h. Na maior concentração de Ni testada (2,5 mg.L⁻¹) foi observada maior frequência de nucleóides de classe 3, com 54,5% em 24h (Tabela 4).

Tabela 4 – Frequência média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média ± EP) nas células branquiais de *Prochilodus lineatus* expostos a 0,025; 0,25; 2,5 mg.L⁻¹ de níquel ou somente a água (CTR), durante 24 e 96 h.

Tratamento	N	Tempo	CLASSES DE DANOS				Nucleóides danificados (média ± EP)
			0	1	2	3	
CTR	8	24h	71,25	18,88	9,88	0	28,75 ± 3,32 (a)
	8	96h	71,00	22,50	5,38	1,13	29,0 ± 4,35 (A)
0,025	8	24h	35,50	56,88	7,50	0,10	64,50 ± 5,47 (a,b)
	8	96h	43,63	43,88	11,5	1,00	56,38 ± 4,03 (B)
0,25	7	24h	24,00	50,71	19,0	6,29	76,0 ± 5,45 (b)
	9	96h	15,25	20,50	49,13	18,38	88,0 ± 2,00 (C)
2,5	8	24h	4,88	17,25	23,38	54,50	95,13 ± 0,76 (b,c)
	8	96h	24,25	35,75	25,75	14,25	75,75 ± 3,96 (D)

Letras diferentes (minúsculas para 24 e maiúsculas para 96 h) representam diferenças significativas entre as concentrações para o mesmo tempo experimental ($p \leq 0,05$) com relação aos nucleóides danificados.

3.4 DISCUSSÃO

Diante dos resultados apresentados evidenciou-se a importância do estudo dos efeitos do níquel em peixes, pois, além de alterar as defesas antioxidantes, este metal pode causar danos em seu DNA. Já é comprovado que o níquel possui potencial carcinogênico tanto para animais quanto humanos (Ptashynski et al., 2002; Chiu et al., 2004; Malik et al., 2010), comprovando assim a relevância que este metal oferece para estudos. Porém, apesar deste fato, trabalhos referentes à toxicidade deste metal ainda são escassos; e neste sentido o presente trabalho apresenta grande relevância a fim de elucidar os efeitos tóxicos que o níquel exerce sobre um peixe neotropical, muito importante para a economia da região sul e sudeste do Brasil, onde ele é usado na dieta alimentar (Martinez, 2006).

Neste trabalho a menor concentração de níquel à qual os animais foram expostos (0,025 mg.L⁻¹) equivale à concentração máxima de Ni total permitida pelo CONAMA (Resolução 357, de 2005) para águas doces. As outras duas concentrações testadas (0,25 e 2,5 mg.L⁻¹) equivalem a valores 10 e 100 vezes maiores do que a concentração permitida. Concentrações próximas a essas já foram detectadas em corpos de água doce no Brasil. Por exemplo, valores de níquel total

de 0,19 e 0,40 mg.L⁻¹ já foram determinados, respectivamente nos córregos Sarandi e Ressaca, principais tributários da represa da Pampulha em Minas Gerais (Rietzler et al., 2001).

A concentração de níquel dissolvido encontrada nos tempos experimentais analisados reflete a interação entre as características físicas e químicas da água com a quantidade total do metal que foi colocada na mesma. Para explicar como os parâmetros físicos e químicos da água exercem influência na biodisponibilidade e especiação de metais em sistemas aquáticos foi proposta uma ferramenta denominada Modelo do Ligante Biológico (Bianchini et al., 2009). Dentre os parâmetros mais importantes estão a dureza da água, que é inversamente proporcional à toxicidade dos metais (Heat, 1995; Paquin et al., 2000; Bianchini et al., 2009); o pH, que aumenta a toxicidade do metal de acordo com a sua diminuição, pois assim, aumenta a dissociação do metal e eleva as concentrações iônicas deste no meio (Heath, 1995; Bianchini, et al., 2009); a salinidade, onde seus ânions se ligam aos metais e diminuem sua biodisponibilidade (Bianchini, et al., 2009); a temperatura, que está inversamente relacionada com a solubilidade dos compostos químicos na água (Bianchini, et al., 2009); e a matéria orgânica dissolvida na água e sedimento, pois apresenta grupamentos fenólicos e carboxílicos, os quais apresentam alta afinidade pelos metais (Richards et al., 2001; Bianchini, et al., 2009).

Acredita-se que os parâmetros encontrados nas águas dos aquários não tenham interferido nos resultados dos testes, uma vez que eles permaneceram constantes. Pôde-se observar neste trabalho uma diminuição da concentração de Ni na água dos aquários com o passar dos tempos experimentais, pois é esperado que este metal sofra precipitação, complexação, adsorção e/ou absorção, sendo estes processos de especiação comuns para espécies metálicas (Paquin et al., 2000, 2002; Peakall e Burger, 2003; Martinez et al., 2004). Pode-se inferir também que a biota absorveu parte do metal colocado na água, processo denominado de bioacumulação.

A bioacumulação é muito estudada quando se trata de trabalhos relacionados com metais, pois a biota possui a capacidade de absorver e reter substâncias provenientes do meio em que ela se encontra através da via oral, percutânea e/ou respiratória. Além do que, os metais podem se acumular nos tecidos desses animais e ocasionar danos ao seu metabolismo (Vinodhini e

Narayanan, 2008). O acúmulo de metais irá depender de fatores como: concentração da espécie metálica disponível no meio, tempo de exposição em que o animal ficou em contato com o poluente e também dependerá da capacidade de absorção de cada organismo, que varia de espécie para espécie, dependendo assim, da biologia de cada animal (Atli e Canli, 2007; Zhou et al., 2008).

Com relação ao acúmulo de Ni nos tecidos observou-se neste trabalho um maior acúmulo no rim, seguido pelo fígado, brânquias e músculo. Diante destes resultados podemos traçar a cinética deste metal, sendo que, o Ni foi absorvido pelos peixes através das brânquias, que são os primeiros órgãos de contato com o poluente. Com o passar do tempo, essas brânquias apresentaram-se com seus sítios de ligações saturados, e então o metal segue para os órgãos de detoxificação. No rim a concentração de Ni aumentou de acordo com o aumento do tempo experimental. Já no fígado, o animal consegue eliminar o metal com o aumento da exposição, portanto diminuindo o acúmulo neste órgão. Assim, o metal que não foi para esses órgãos acabou por se acumular nos músculos, sendo que este acúmulo foi muito pequeno, sendo estatisticamente insignificante.

Autores como Vinodhini e Narayanan (2008) detectaram em seu trabalho um maior acúmulo de níquel nas brânquias, seguido pelo fígado, rim e músculos de *Cyprinus carpio*. Já Malik e colaboradores (2010) demonstraram que este metal se acumulou de forma distinta nos órgãos de duas espécies de peixes (*Ctenopharyngodon idella* e *Labeo rohita*) sendo que, na primeira espécie o acúmulo seguiu ordem: brânquias > rim > fígado > músculo, e para a outra espécie: fígado > rim > brânquias > músculo. Assim, fica evidente que o acúmulo de níquel pode variar de acordo com a espécie animal em estudo. Em todos os trabalhos mencionados o músculo foi o órgão que menos acumulou níquel, fator este relevante, uma vez que o músculo é a principal fonte de massa de carne consumida na alimentação humana (Nussey et al., 2000; Malik, 2010).

O maior acúmulo de níquel no rim e fígado, conforme observado no presente trabalho, pode estar relacionado com o fato de que após exposição aguda os órgãos com maior atividade metabólica tendem a acumular mais metais em decorrência da presença de proteínas envolvidas em sua eliminação, as metalotioneínas (Klavins et al., 2009). O rim corresponde ao principal órgão de desintoxicação (excreção - via urina) de metais (Vinodhini e Narayanan, 2008). Resultado similar também foi encontrado em mamíferos após a ingestão oral de

níquel, onde o maior teor de acúmulo foi encontrado principalmente nos rins (USPHS 1993). O fígado é considerado um órgão-alvo de grande importância para os peixes, pois participa dos processos de desintoxicação e armazenamento de metais, e estes são finalmente excretados pela bile. O excesso de metal pode estimular a produção de proteínas quelantes de metais, como as metalotioneínas, que são armazenadas nos hepatócitos. O fígado participa da biotransformação e eliminação de xenobióticos e, por isso, pode ser utilizado no biomonitoramento, devido à sua alta sensibilidade a poluentes (Thophon et al., 2003). As brânquias constituem o órgão mediador entre o meio externo e o interior do organismo, sendo assim, constitui um órgão multifuncional com funções vitais, incluindo respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico, e excreção. É através das brânquias que ocorre o contato direto dos organismos com os xenobióticos presentes no meio externo, que é a principal porta de entrada dos metais, e o acúmulo destes podem provocar lesões e danos neste órgão (Bols et al., 2001). O estudo do acúmulo tecidual em brânquias tem sido frequentemente utilizado na avaliação de impactos tanto de habitats marinhos quanto dulcícolas (Evans et al., 2005).

As metalotioneínas são proteínas de baixo peso molecular (5 a 10 KDa) e ricas em cisteínas, que agem como quelantes de metal, protegendo as células de danos ocasionados por este (Coyle, et al., 2002; Nordberg et al., 2007; Sigel, et al., 2009). Além de diminuir o potencial tóxico dos metais, as MT podem atuar como reservas não tóxicas de metais para a síntese de metaloenzimas. De acordo com alguns autores as MT também auxiliam na prevenção do estresse oxidativo, atuando como antioxidante, e limitam as possíveis lesões ocasionadas pelas espécies reativas de oxigênio (Correia et al., 2002; Paris-Palacios et al., 2003; Falfushynska e Stolyar, 2009).

Neste trabalho as análises realizadas em fígados e brânquias de *P. lineatus* demonstraram que em 24 h a produção de MT nas brânquias foi em média duas vezes maior que em fígado, e em 96 h chegou a ser em média três vezes maior. Isto pode indicar que a MT branquial no *P. lineatus* pode atuar como reforço para a eliminação de ERO. Autores demonstram que a maior indução de MT está relacionada com os órgãos envolvidos na captação, acúmulo e excreção, como brânquias e fígado (Roesijadi e Robinson, 1994; Filipovi e Raspor, 2003; Amiard et al., 2006). Giguère e colaboradores (2006) relataram que a MT em indivíduos de

Perca flavescens, induzida por cobre, zinco, níquel e cádmio, juntamente com a bioacumulação destes metais, auxiliou na proteção contra os agentes oxidantes.

Sabe-se que a indução da síntese de MT por metais é uma resposta direta ao aumento da concentração intracelular do metal que é mediada por fatores regulatórios, assim sendo, acredita-se que a presença do níquel tenha estimulado esta síntese por estar em quantidades maiores que as necessárias para o organismo, pois vários estudos em diferentes espécies de peixe e com outros metais têm demonstrado que as MT se ligam a esses íons metálicos e que seus níveis estão correlacionados com os níveis teciduais desses metais (Hylland et al., 1992; Schlenk et al., 1995; Olsvik et al., 2000; Filipovi e Raspor, 2003; De Boeck et al., 2010). A MT também pode ter sido um sistema de defesa importante contra os efeitos danosos do níquel para *P. lineatus*, já que as enzimas antioxidantes tiveram suas atividades inibidas em parte dos tratamentos.

Com relação às defesas antioxidantes enzimáticas de *P. lineatus*, após 96 h de exposição ao níquel, observou-se que a atividade da SOD hepática diminuiu significativamente. Com essa inibição a quantidade de H₂O₂ fica aumentada nas células do fígado, podendo influenciar a atividade das enzimas CAT e GPx. A SOD apresenta sensibilidade ao peróxido de hidrogênio, sendo inativada na presença desse composto (Sampson e Beckman, 2001). Já nas brânquias a atividade da SOD teve aumento significativo e dose dependente nos dois tempos experimentais, quanto maior a concentração de níquel, maior a atividade desta enzima. O aumento desta atividade nas brânquias pode estar ligado a uma resposta de defesa contra as ERO formadas na presença do níquel, evidenciando o esforço do animal para combater essas espécies reativas. Além de Parthiban e Muniyan (2011) apresentaram dados de diminuição da atividade da SOD em fígado da espécie de peixe *Cirrhinus mrigala* expostos durante 30 dias à concentração sub-letal de 3,75 ppm de níquel. Já Vinodhini e Varayanan (2009) evidenciaram o contrário deste trabalho, pois o nível de SOD aumentou em fígados de *Cyprinus carpio* após 16 dias de exposição ao níquel, cádmio, cromo e chumbo evidenciando o estresse crônico provocado pelos metais em estudo. Essa diferença pode ser devido à maior sensibilidade da espécie utilizada por esses autores e o maior tempo experimental.

No fígado a diminuição de SOD foi acompanhada pela diminuição significativa na atividade da CAT em 96 h. Quanto à GPx não foram observadas

diferenças em relação ao CTR, o que pode ser explicado pelo fato desta enzima degradar H_2O_2 quando este se encontra em pequenas quantidades, e supõe-se que existisse grandes quantidades de H_2O_2 devido a inibição da atividade da SOD; portanto a atividade da CAT foi mais afetada, sendo insuficiente ou inibida perante a presença de níquel. A inibição da CAT também pode estar associada à ligação dos metais aos grupamentos-SH da enzima, alterando sua atividade (Atli e Canli, 2007). Romeo e colaboradores (2000) relatam que os metais podem causar alterações na mitocôndria, facilitando a liberação de O_2^- e favorecendo a inibição da CAT. Chandravathy e Reddy (1999) afirmam que o níquel interage com os tecidos e acaba por inibir as atividades das enzimas antioxidantes. Nas brânquias as atividades das enzimas CAT e GPx não tiveram diferenças significativas em relação ao controle.

A glutationa reduzida (GSH) faz parte das defesas antioxidantes não enzimáticas e é considerada um dos principais antioxidantes, participando da primeira linha de defesa contra as ERO, neutralizando diretamente os pró-oxidantes ou como substrato para as reações enzimáticas catalisadas pela GST e GPx (Halliwell e Gutteridge, 2005). Nas brânquias dos peixes expostos a maior concentração de níquel o conteúdo de GSH diminuiu significativamente em 24 e após 96 h sofreu aumento, evidenciando que com o passar do tempo o organismo tentou se proteger contra o estresse oxidativo. O aumento no conteúdo de GSH é considerado benéfico para combater o estresse ambiental (Ballesteros et al., 2009). Nas brânquias a atividade da GR não foi significativa.

No fígado não foi observada variação significativa no conteúdo de GSH. Esse resultado pode ter influenciado no aumento na atividade da GR hepática, que é a enzima responsável em catalisar a redução de GSSG (forma oxidada) em GSH (forma reduzida), necessária para proteção da célula contra as substâncias tóxicas, reduzindo assim, as injúrias celulares (Maran et al. 2009; Modesto et al. 2010). Assim, esse aumento significativo na atividade da GR nos dois tempos experimentais com as maiores concentrações, pode ter ocorrido de forma compensatória, para garantir a manutenção do conteúdo de GSH no tecido hepático.

A enzima GST possui uma função importante na proteção dos tecidos contra os efeitos de xenobióticos (Monteiro et al., 2006; Ferrari et al., 2004). Neste trabalho verificamos que no fígado a atividade da GST não sofreu variação significativa, mas nas brânquias houve um aumento significativo em 96 h na maior concentração. Esse aumento de GST nas brânquias pode ser relacionado

à proteção celular e eliminação dos compostos, já que as brânquias constituem o principal órgão de contato entre meio interno (do organismo) e externo (do ambiente aquático) e é responsável por diversos mecanismos de regulação do peixe, como: as trocas gasosas, excreção via epitélio, regulação ácido-base, transporte de íons, etc. Segundo Ballesteros e colaboradores (2009) os estudos com esta enzima têm se mostrado inconclusivos, e os efeitos dos poluentes mostram grandes diferenças, ora induzindo, ora alterando ou simplesmente sem alteração na atividade desta enzima.

Quando o sistema de defesa antioxidante é insuficiente ou inativado podem ocorrer danos oxidativos como a peroxidação lipídica. O dano oxidativo aos lipídios é uma das consequências geradas pelo estresse oxidativo. No presente trabalho evidenciou-se que a ativação das defesas antioxidantes não foi suficiente para evitar esses danos nas células hepáticas, dado o aumento significativo nos níveis de MDA no fígado, na maior concentração de níquel testada, durante 96 h. O excesso de níquel pode ter interagido com o H_2O_2 resultando em um aumento na concentração de radical hidroxil (reação de Fenton), principal responsável pela peroxidação lipídica (Florence et al., 2002). Este aumento provavelmente está relacionado com a diminuição das atividades hepáticas da SOD e CAT em 96 h, uma vez que Bagnyukova e colaboradores relataram que a diminuição da CAT afeta a reação de Fenton e aumenta a possibilidade de peroxidação lipídica. Com a presença do níquel ocorreu a diminuição dessas enzimas e gerou o que chamamos de estresse oxidativo que acabou inativando tais enzimas. Che e colaboradores (2007) afirmam que o estresse oxidativo causado por metais pode dar origem a modificações estruturais nas enzimas e inativá-las.

É sabido que o níquel pode ocasionar peroxidação lipídica (Ptashynski et al., 2001, 2002). Valko e colaboradores (2006) afirmam que este metal em concentrações consideradas tóxicas para determinadas espécie geram a peroxidação lipídica. Gopal e colaboradores (2009) demonstraram que o cloreto de níquel induziu a peroxidação lipídica em brânquias, fígado, rim e músculo de *Cirrhinus mrigala* durante 28 dias de exposição a este poluente. Parthiban e Muniyan (2011) também constataram diminuição das defesas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) evidenciando que o níquel induziu a LPO na mesma espécie de peixe do trabalho anterior.

A ocorrência de uma situação de lipoperoxidação indica a existência de radicais livres em excesso nas células e é sabido que estes radicais podem inibir as defesas antioxidantes gerando danos ao organismo em questão. (Vutukuru et al., 2006). Esta inibição na atividade hepática das enzimas antioxidantes foi observada no presente estudo, sugerindo um comprometimento nos mecanismos de defesas antioxidantes em resposta ao excesso de geração de espécies reativas de oxigênio ocasionando o dano verificado em 96 h.

Após a análise em ambos os órgãos foi possível perceber que a toxicidade do níquel aumenta significativamente com o aumento do período experimental e observando os resultados quanto à linha de defesa antioxidante no fígado e brânquias após os tempos experimentais, foi possível observar que o sistema de defesa antioxidante foi suficiente para impedir danos oxidativos aos lipídeos somente nas células branquiais, pois nas hepáticas evidenciamos a ocorrência de LPO. As brânquias são o primeiro órgão de contato com os contaminantes na água, e, como tal, é uma das primeiras portas de entrada para os poluentes, dada a sua grande superfície de contato e permeabilidade (Wendelaar Bonga, 1997). Portanto, as suas defesas antioxidantes foram ativadas logo no início da exposição pelo níquel, e assim, foram capazes de evitar a ocorrência de LPO nos tempos analisados. Desta forma foi possível verificar que os órgãos analisados possuem níveis de sensibilidade diferente ao níquel, sendo que o fígado apresentou maior sensibilidade, respondendo mais rápido a este poluente que as brânquias.

O grau de integridade do DNA tem sido proposto como um indicador de genotoxicidade sensível e eficaz para o monitoramento ambiental (Frenzili et al., 2004). No que se refere à utilização de peixes para ensaios de toxicidade, o uso de eritrócitos para avaliar danos no DNA através do ensaio do cometa parece ser vantajoso devido a facilidade de coleta deste material (Sharma et al. 2007) e pelo fato destas células estarem entre as primeiras a sofrer efeitos tóxicos (Ruas et al., 2008). Já em relação ao uso das células branquiais, estas vêm sendo bastante utilizadas devido ao fato deste órgão estar em contato direto com os contaminantes presentes na água. Motivos estes, que levaram a realização dos testes com esses dois tecidos.

Nesse trabalho foi utilizado para mensurar danos nesses tecidos o teste do cometa, sendo ele um dos testes mais utilizados para avaliação de quebras na fita do DNA em animais aquáticos, em exposições in vivo, in vitro e in situ (Ohe et

al., 2004). De acordo com os resultados obtidos foi verificada a ocorrência de danos na molécula de DNA de eritrócitos e brânquias. Com a realização deste teste foi possível evidenciar que o níquel é genotóxico para *P. lineatus*, uma vez que em todas as concentrações de níquel ao qual esta espécie foi submetida no período experimental de 24 e 96 h, foi verificado aumento significativo no escore de dano. Provavelmente, a ativação das defesas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GR) desses peixes não tenha sido suficiente para protegê-lo contra os possíveis efeitos prejudiciais que o níquel é capaz de desencadear no DNA, e assim ocasionaram os danos observados.

Ficou evidente que no tempo experimental de 96 h, tanto em eritrócitos quanto em células branquiais, os danos diminuíram em relação ao tempo experimental de 24 h, este fato de diminuição no maior tempo experimental e na maior concentração em ambos os tecidos pode ser devido à atividade do sistema de reparo do DNA, atuando para reparar as quebras ocasionadas pela exposição do níquel. A fim de lidar com esses danos provocados pelo níquel existem alguns mecanismos de reparos, caso estes não forem ativados, poderá ocorrer morte celular por necrose e apoptose (Sandrini et al., 2009). Pode-se sugerir também que talvez tenha ocorrido morte celular nesse maior tempo experimental, pois os danos diminuíram drasticamente. O trabalho de revisão de Franco (2009) relata que vários estressores ambientais relacionam o estresse oxidativo com a apoptose, dentre esses estressores estão os herbicidas, as partículas que ficam em suspensão na água, radiação, hidrocarbonetos poliaromáticos, os pesticidas, e os metais, que é o enfoque deste trabalho.

Existe um consenso geral que o níquel intracelular acumula-se no núcleo, especialmente a fração nucleolar (NAS 1975; USEPA, 1980). De acordo com Kasprzak (2003) os efeitos epigenéticos do níquel incluem alterações na expressão dos genes resultantes da metilação do DNA e modificação nas histonas, aumentando assim a sua capacidade genotóxica. São raros os estudos que relatam o efeito genotóxico do níquel em peixes. Em estudos com células de ratos expostos de 5 a 40 mg de carbonato de níquel Valko e colaboradores (2006) evidenciaram quebras no DNA. Efeitos semelhantes ocorreram em células de hamster expostas de 2 a 10 mg de cloreto de níquel e em células humanas com sulfato de níquel (OMS 1991).

Em resumo, o presente estudo apresentou evidências de que o níquel alterou as defesas antioxidantes do peixe neotropical *P. lineatus*, e promoveu assim, a ocorrência de peroxidação lipídica no fígado e danos na molécula de DNA em células branquiais e eritrócitos. Os íons metálicos que adentraram o corpo do peixe pela absorção no epitélio e brânquias, atingiram diversos outros tecidos através da circulação sanguínea, acumulando-se em maiores proporções em órgãos que tem a função de retirar a substância tóxica de circulação, proporcionando proteção ao organismo. As metalotioneínas também foram induzidas a fim de minimizar os efeitos provocados por este metal. Os diferentes tratamentos com níquel tiveram efeitos significativos sobre as variantes bioquímicas (SOD, CAT, GST, GSH, e GR), sendo que estes parâmetros podem ser utilizados como biomarcadores de exposição ao níquel a fim de elucidar seus mecanismos de toxicidade, juntamente com o ensaio cometa. Por sua vez,, o peixe em estudo (*P.lineatus*) pode ser considerado como um biomonitor adequado de exposição ao níquel.

3.5 AGRADECIMENTOS

À estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina/PR (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq: 573949/2008-5) pela bolsa de mestrado concedida para F.F.Palermo, e ao CNPq pela bolsa de pesquisador para C.B.R.Martinez. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de F.F.Palermo pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

REFERÊNCIAS

- Almeida, J. A., Novelli, E. L. B., Dal Pai Silva, M., Alves Júnior, R. 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Environ. Pollut.* 114, 169-175.
- Almroth, B. C., Sturve, J., Berglund, A., Förlin, L. 2005. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparous*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 73, 171-180.
- Amiard, J. C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S. 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic. Toxicol.* 76, 160-202.
- Atli, G., Canli, M. 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comp. Biochem. Phys. C*, 145, 282-287.
- Bagnyukova, T. V., Vasyukiv, O. Y., Storey, K. B., Lushchak, V.I 2005. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. *Brain Res.* 1052, 180-186.
- Ballesteros, M. L., Wunderlin, D. A., Bistoni, M. A. 2009. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 99-205.
- Bianchini, A., Martins, S. E., Jorge, M. B. 2009. *O Modelo do Ligante Biótico e suas Aplicações em Ecotoxicologia*, 34p.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B. M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.* 61, 882-890.
- Beutler, E. 1975. *Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods*. New York: Grune & Stratton.
- Bols, N. C., Brubacher, J. L., Ganassin, R.C., Lee, L. E. J. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25 (8), 853-873.
- Brüschweiler, B. J., Würgler, F. E., Fent, K., 1996. Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P450A1 induction in permanent fish hepatoma cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 475-482.
- Camargo, M. M. P., Fernandes, M. N.; Martinez, C. B. R. 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.* 94, 40-46.
- Camejo, G., Wallin, B., Enojärvi, M. 1998. Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates. In: Armstrong D (ed) Free radical and antioxidants protocols. Humana Press, New Jersey, pp.377-387.
- Carlberg, I., Mannervik, B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* 260, 5475- 5480.

- Cavalcante, D. G. S. M., Martinez, C. B. R., Sofia, S. H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41 - 46.
- Chandravathy, V. M., Reddy, S. L. N. 1999. Effect of lead on antioxidant enzymes activities and Lipid peroxidation in old male mice *Mus musculus*. *J. Environ. Biol.* 20, 103-106.
- Che, W., Zhang, Z., Zhang, H., Wu, M., Liang, Y., Liu, F., Li, N., 2007. Compositions and oxidative damage of condensate, particulate and semivolatile organic compounds from gasoline exhausts. *Environ. Toxicol. Phar.* 24, 11-18.
- Chiu, A., Katz, A. J., Beaubier, J. 2004. Nickel in RAND, G.M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology, Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, 1125p., 1995.
- Conama. 2005. *Conselho Nacional do Meio Ambiente*, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, Brasil, 23p.
- Correia A. D., Livingstone D. R., Costa M. H. 2002. Effects of waterborne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Mar. Environ. Res.* 54, 357-360.
- Coyle P., Philcox J. C., Carey L. C., Rofe A. M. 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 59, 627-647.
- De Boeck, G., Eyckmans, M., Lardon, I., Bobbaers. R., Sinha, A.K., Blust, R. 2010. Metal accumulation and metallothionein induction in the spotted dog fish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Phys. A*, 155, 503-508.
- Deleebeeck, N. M. E., Schampelaere, K. A. C., Janssen, C. R. 2007. A bioavailability model predicting the toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) in synthetic and natural waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 67, 1-13.
- Eisler, R. 1998. *Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A Synoptic Review*. US Geological Survey, Biological Resources Division, Biological Science Report.
- Ellgaard, E. G., Ashley, S. E., Langford, A. E., Harlin, D. C. 1995. Kinetic analysis of the swimming behavior of the goldfish, *Carassius auratus*, exposed to nickel; hypoactivity induced by sublethal concentrations. *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* 55, 929-936.
- Evans D. H., Piermarini P .M., Choe K. P. 2005. Multifunctional fish gill: dominant site gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97-177.
- Falfushynska H. I., Stolyar O. B. 2009. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 72, 729-736.

- Federici, G., Shaw, B. J., Handy, R. D. 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415-430.
- Ferrari, J. E. C., Barros, M. M., Pezatto, L. E., Gonçalves, G. S., Hisano, H., Kleemann, G. K. 2004. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. *Acta. Sci. Anim. Sci.* 26 (4), 429-436.
- Filipovi V., Raspor B. 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water Res.* 37 (13), 3253-3262.
- Florence, G., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M. J. 2002. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. *Mar. Environ. Res.* 54, 413-417.
- Franco, R., Sánchez-Ole, R., Reyes-Reyes, E. M., Panayiotidi, M. I. 2009. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mut. Res.* 674, 3-22.
- Frenzili, G., Scarcelli, V., Barga, I., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J. 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbor, *Mutat. Res.* 552 187-195.
- Ghazaly, K. S. 1992. Sublethal effects of nickel on carbohydrate metabolism blood and mineral contents of *Tilapia nilotica*. *Water, Air, and Soil Poll.* 64, 525-532.
- Giguère, A., Campbell, P. G., Hare, L., Couture, P. 2006. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 77, 178-189.
- Gioda, C. R., Lissner, L. A., Pretto, A., Rocha, J. B. T., Schetinger, M. R. C., Neto, J. R., Morsch, V. M., Loro, V. L. 2007. Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere*, 69, 170-175.
- Gopal, R., Narmada, S., Vijayakumar, R., Jaleel, C. A. 2009. Chelating efficacy of CaNa₂ EDTA on nickel-induced toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.) through its effects on glutathione peroxidase, reduced glutathione and lipid peroxidation. *C. R. Biologies*, 332, 685-696.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press, v.1, 851p.
- Heath, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. 2ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 395p.
- Hylland K., Haux C., Hogstrand C. 1992. Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog.* 91, 89-96.
- Hopkins, J., Tudhope, G.R. 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haemat.* 25, 563-575.

- Iscan, M., Coban, T., Eke, B. C. 1992. Responses of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes of mouse, rat and guinea-pig to nickel. *Pharmacol. Toxicol.* 71, 434-442.
- Iscan, M., Eke, B. C., Coban, T. 1993. Combined effects of cadmium and nickel on hepatic glutathione S-transferases in rats. *Comp. Biochem. Phys. C* 104, 453-456.
- Khangarot, B.S., Ray, P.K. 1990. Acute toxicity and toxic interaction of chromium and nickel to common guppy *Poecilia reticulata* (Peters). *B. Environ. Contam. Tox.* 44, 832-839.
- Kaspzark, K. S., Sunderman, F.W., Jr., Salnikow, K. 2003. Nickel carcinogenesis. *Mutat. Res.* 533, 67-97.
- Kilemade, M. F., Hartl, M. G. J., Sheehan, D., Mothersill, C., Van Pelt, F. N. A. M., O'Halloran, J., O'Brien, N.M. 2004. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) as measured by the comet assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 44, 56-64.
- Klavins, M., Potapovics O., Rodinov, V. 2009. Heavy Metals in Fish from Lakes in Latvia: Concentrations and Trends of Changes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 96-100.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MMS Comum.* 3, 103-115.
- Lionetto, M. G., Caricato, R., Giordano, M. E., Pascariello, M. F., Marinosci, L., Schettino, T. 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Poll. Bull.* 46, 324-330.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Malika, N., Biswas, A. K., Qureshi, T. A. 2010. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bophal. *Environ. Monit. Assess.* 160, p. 267-276.
- Maran, E., Fernández, M., Barbieri, P., Font, G., Ruiz, M.J. 2009. Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 72, 922-930.
- Martinez, C. B. R., Nagee, M. Y., Zaia, C. T. B. V., Zaia, D. A. M. 2004. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64 (4), 797-807.
- Martinez, C. B. R. 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água in: Ângela Teresa Silva-Souza (org.) Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá. *Abrapoa*, 43-62.
- Mccord, J. M., Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J. Biol. Chem.* 244, 6049-6055.

- Modesto, Kathya A., Martinez, Cláudia B.R. 2010. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 78, 294-299.
- Monteiro, D. A., Almeida, J. A., Rantin, F. T., Kalinin, A. L. 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 143, 141-149.
- National Academy of Sciences (NAS). 1975. *Medical and biological effects of environmental pollutants. Nickel*. National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 277p.
- Nordberg, G. F., Fowler, B. A., Nordberg, M., Friberg, L. 2007. *Handbook on the Toxicology of Metals*, 3ed, Elsevier, 992p.
- Nussey, G., Van-Vuren, J. H. J., Preez, H. H. 2000. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. *Water SA*. 26 (2), 269-284.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K. 2004. Mutagens in surface waters: a review, *Mutat. Res.* 567, 109-149.
- Olsvik, P. A., Gundersen, P., Andersen, R. A., Zachariassen, K. E. 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. *Aquat. Toxicol.* 50, 301-316.
- Paris-Palacios S., Biagianti-Risbourg S., Vernet G. 2003. Metallothionein induction related to hepatic structural perturbations and antioxidative defenses in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to the fungicide procymidone. *Biomarkers*, 8, 128-141.
- Parthiban, P., Muniyan, M. 2011. Effect of Heavy Metal Nickel on the Lipid Peroxidation and Antioxidant Parameters in the Liver Tissue of *Cirrhinus Mrigala* (Ham.). *Int. J. Dev. Res.* 1, 1-4.
- Paquin, P. R., Santore, R. C., Wu, K.B., Kavvadas, C. D., Di Toro, D.M. 2000. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. *Environ. Sci. Pol.* 3, 175-182.
- Paquin, P. R., Gorsuch, J. W., Apte, S., Batley, G. E., Bowles, K. C., Campbell, P. G. C., Delos, C. G., Di Toro, D. M., Dwyer, R. L., Galvez, F., Gensemer, F. W., Goss, G. G., Hogstrand, C., Janssen, C. R., Mcgeer, J. C., Naddy, R. B., Playle, R. C., Santore, R. C., Schneider, U., Stubblefield, W. A., Wood, C. M., Wu, K. B. 2002. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol.* 133, 3-35.
- Peakall, D., Burger, J. 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 56, 110-121.

- Ptashynski, M. D., Pedlar, R. M., Evans, R. E., Wautier, K. G., Baron, C. B., Klaverkamp, J. F. 2001. Accumulation, distribution, and toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Comp. Biochem. Physiol. C* 130, 145-162.
- Ptashynski, M. D., Pedlar, R. M., Evans, R. E., Baron, C. L. and Klaverkamp, J. F. 2002. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquat. Toxicol.* 58, 229-247.
- Ribeiro, C.A.O., Neto, F. F., Mela, M., Silva, P. H., Randi, M. A. F., Rabitto, I. S., Costa, J.R.M.A., Pelletier, E. 2006. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. *Environ. Res.* 101, 74-80.
- Richards, J. G., Curtis, P. J., Burnison, B. K., Playle, R. C. 2001. Effects of natural organic matter source on reducing metal toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and on metal binding to their gills. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1159-1166.
- Rietzler, A. C., Fonseca, A. L., Lopes, G. P. 2001. Heavy metals in tributaries of Pampulha reservoir, Minas Gerais. *Braz. J. Biol.* 61, 363-370.
- Rodriguez, R. E., Misra, M., Diwan, B. A., Riggs, C. W., Kasprzak, K. S. 1996. Relative susceptibilities of C57BL/6X, (C57BL/6 X C3H/He) F1, and C3H/He mice to acute toxicity and carcinogenicity of nickel subsulfide. *Toxicology* 107, 131-140.
- Roesijadi G., Robinson, W. E. 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. *Aquat. Toxicol. Mol. Biochem. Cell. Persp.* 387-420.
- Romani, R., Antognelli, C., Baldracchini, F., De Santis, A., Isani, G., Giovannini, E., Rosi, G. 2003. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. *Chem. Biol. Interact.* 145, 321-329.
- Romeo, M., Bennani, N., Gnassia-Barelli, M., Lafaurie, M., Girard, J. P. 2000. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol.* 48, 185-194.
- Ruas, C., Carvalho, C., De Araújo, H., Espíndola, E., Fernandes, M. 2008. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 71, 86-93
- Sampson, B. J., Beckman, J. S., 2001. Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu, Zn superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 392, 8-13.
- Sandrini, J. Z., Bianchini, A., Trindade, G. S.; Nery, L. E. M.; Marins, L. F. F. 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.* 95, 285-291.

- Schlenk D., Zhang Y. S., Nix, J. 1995. Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral fish and caged fish species correlates with muscle mercury levels. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 31, 282-286.
- Sharma, S., Nagpude, N. S., Kumar, R., Pandey, S., Srivastava, S. K., Singh, P. J., Mathur, P.K. 2007. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the Comet Assay, *Arch. Environ. Con. Tox.* 53 617–623.
- Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R. K. O. 2009. Metal ions in life Sciences -Metallothioneins and Related Chelators. *Roy. Soc. Chem.* 514p.
- Singh, N. P., Mccoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F. 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Thophon, S., Kruatrachue, M., Upatham, E. S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S., Jarritkhuam, S. 2003. Histopathological alterations of White seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environ. Pollu.* 121.
- U. S. Environmental Protection Agency (USEPA). 1980. *Ambient water quality criteria for nickel*. EPA Report 440/5-80-060. 206p.
- U. S. Public Health Service (USPHS). 1993. *Toxicological profile for nickel*. U.S. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia. Report TP-92/14. 158p.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic M., Mazur, M. 2006. Free radicals metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interaction* 160, 1-40.
- Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., Cólus, I. M. S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 631, 36-43.
- Viarengo, A., Burlando, B., Cavaletto, M., Marchi, B., Ponzano, E., Blasco, J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am. J. Physiol.* 277, 1612-1619.
- Vinodhini R., Narayanan M. 2009. Biochemical changes of antioxidant enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) after heavy metal exposure. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33(4), 273-278.
- Vinodhini R., Narayanan M. 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 5, 179-182.

- Vos, G., Hovens, J. P. C., 1986. Chromium, nickel, copper, zinc, arsenic, selenium, cadmium, mercury and lead in Dutch fishery products (1977- 1984). *Sci. Total Environ.* 55, 25-40.
- Vutukuru, S. S., Chintada, S., Madhavi, K. R., Rao, J. V., Anjaneyulu, Y. 2006. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish *Esomus danricus*. *Fish Physiol. Biochem.* 32, 221–229.
- Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G. 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Anal. Chim. Acta* 606, 135-150.
- Wendelaar Bonga, S. E., Lock, R. A. C., 2008. *The osmoregulatory system*. In: Di Giulio, R.T. e Hilton, D.E. (Eds). *The Toxicology of Fishes*. New York, CRC Press. 8, 401-415.

CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados deste trabalho demonstraram o acúmulo de níquel em tecidos de *P. lineatus* e os órgãos relacionados à captação e desintoxicação do níquel, rim e fígado, foram os que mais acumularam este metal. Na Tabela 5 temos o resumo dos resultados obtidos com relação aos biomarcadores. E baseados nos mesmos evidenciamos que o sistema de defesa antioxidante foi mais eficiente nas brânquias que no fígado, sendo que neste último revelou-se a ocorrência de peroxidação lipídica após 96 h de exposição. Isso pode indicar uma deficiência das defesas antioxidantes do fígado com o passar do tempo experimental. Com relação ao conteúdo de metalotioneínas foram verificados aumentos significativos em ambos os tecidos, uma vez que estas proteínas atuaram a fim de minimizar os danos que o níquel provocaria nas células hepáticas e branquiais. Em contrapartida, observou-se o aumento na ocorrência de danos no DNA das células branquiais e em eritrócitos, evidenciando o potencial genotóxico do níquel. Estes parâmetros se mostraram eficientes biomarcadores para avaliar os efeitos tóxicos do níquel, mesmo em baixas concentrações para os peixes. Com a realização deste trabalho ficou evidente que a concentração máxima de níquel em águas doces naturais, estabelecidas pela Resolução CONAMA 357 (2005) não é segura para a espécie *P. lineatus*.

Tabela 5 – Resultados obtidos para *P. lineatus* expostos a 0,025; 0,25 e 2,5 mg.L⁻¹ de níquel por 24 e 96 h. Os sinais =, ↑ e ↓ indicam, respectivamente, ausência de diferença, aumento ou redução significativa em relação ao respectivo controle.

		Níquel					
		0,025 mg.L ⁻¹		0,25 mg.L ⁻¹		2,5 mg.L ⁻¹	
		24 h	96 h	24 h	96 h	24 h	96 h
Metalotioneínas	Brânquias	=	=	=	↑	=	↑
	Fígado	↑	=	↑	↑	↑	↑
SOD	Brânquias	=	=	↑	↑	↑	↑
	Fígado	=	↓	=	↓	=	↓
CAT	Brânquias	=	=	=	=	=	=
	Fígado	=	=	=	↓	=	↓
GPx	Brânquias	=	=	=	=	=	=
	Fígado	=	=	=	=	=	=
GST	Brânquias	=	=	=	=	=	↑
	Fígado	=	=	=	=	=	=
GR	Brânquias	=	=	=	=	=	=
	Fígado	=	=	=	=	↑	↑
GSH	Brânquias	=	=	=	=	↓	↑
	Fígado	=	=	=	=	=	=
LPO	Brânquias	=	=	=	=	=	=
	Fígado	=	=	=	=	=	↑
Danos no DNA	Brânquias	=	↑	↑	↑	↑	↑
	Sangue	↑	=	↑	↑	↑	↑

SOD: superóxido dismutase; CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; GST: glutathione S-transferase; GR: glutathione reductase; GSH: glutathione reduced; LPO: lipoperoxidação

REFERÊNCIAS GERAIS

- ALMEIDA, J. A., NOVELLI, E. L. B., DAL PAI SILVA, M., ALVES JÚNIOR, R. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Environmental Pollution**, v. 114, p. 169-175, 2001.
- ALMROTH, B. C.; STURVE, J.; BERGLUND, A.; FÖRLIN, L. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 171-180, 2005.
- ANDREWS G. K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, p. 95-104, 2000.
- AGUIAR, M. R. M. P.; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, p. 1145-1154, 2002.
- AHMAD, S. **Antioxidant mechanisms of enzymes and proteins**. AHMAD, S (Ed.). Oxidative stress and antioxidant defenses in biology. Chapman & Hall. p. 238-272, 1995.
- AMADO, L. L.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P. B.; FREITAS, R. F.; ZAFALON, B., FERREIRA, J. L. R.; YUNES, J. S.; MONSERRAT, J. M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science Total Environmental**, v. 407, p. 2115-2123, 2009.
- AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOW, P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 76, 160-202, 2006.
- ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M. MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência e Saúde**, v.12, p. 61-72, 2007.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 145, p. 282-287, 2007.
- BAGNYUKOVA, T. V.; VASYLKIV, O. Y.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Catalase inhibition by amino triazole induces oxidative stress in goldfish brain. **Brain Research**, v. 1052, p. 180-186, 2005.
- BAIRD, C. Química Ambiental, 2 ed., Editora Bookman, 2002.
- BALLESTEROS, M. L.; WUNDERLIN, D. A.; BISTONI, M. A. Oxidative stress responses in different organs of *Jenynsia multidentata* exposed to endosulfan. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 72, 99-205, 2009.
- BARATA, C.; LEKUMBERRI, I.; VILA-ESCALE, M.; PRAT, N.; PORTE, C. Trace metal concentration, antioxidant enzyme activities and susceptibility to oxidative

stress in the tricoptera larvae *Hydropsyche exocellata* from the Llobregat river basin. **Aquatic Toxicology**, v. 74, p. 3-19, 2005.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID J. M.; DAVID J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113-123, 2006.

BASHA, P. S.; RANI, A. U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (tilapia). **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 56, n. 2, p. 218-221, 2003.

BENASSI, J. C. **O uso de bioindicadores e biomarcadores na avaliação do processo de remediação de efluente de lixiviação de carvão mineral utilizando microesferas de quitosana.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 106p., 2004.

BENSON, J. M.; CHENG, Y. S.; EIDSON, A. F.; HAHN, F. H.; HENDERSON, R. H.; PICKRELL J. A. Pulmonary toxicity of nickel subsulfide in F344/N rats exposed for 1-22 days. **Toxicology**, v. 103, p. 9-22, 1995.

BERVOETS, L.; BLUST, R. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. **Environmental Pollution**, v.126, p. 9-19, 2003.

BEUTLER, E.; DUROM, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-890, 1963.

BEUTLER, E. **Red Cell Metabolism: A manual of biochemical methods.** New York: Grune & Straton, 160p., 1975.

BIANCHINI, A.; MARTINS, S. E.; JORGE, M. B. **O Modelo do Ligante Biótico e suas Aplicações em Ecotoxicologia,** FURG, Rio Grande-RS, 34p., 2009.

BINEY, C.; AMUZU, A. T.; CALAMARI, D.; KABA, N.; MBOME, I. L.; NAEVE, H.; OCHUMBA, P. B. O.; OSIBANJO, O.; RADEGONDE, V.; SAAD, M. A. H. Review of heavy metals in the african aquatic environment. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 28, p. 134-159, 1994.

BOLS, N. C.; BRUBACHER, J. L.; GANASSIN, R. C.; LEE, L. E. J. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 25, p. 853-873, 2001.

BRÜSCHWEILER, B. J.; WÜRGLER, F. E.; FENT, K. Inhibitory effects of heavy metals on cytochrome P450A1 induction in permanent fish hepatoma cells. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.31, p. 475-482, 1996.

BURATINI, V. B., BRANDELLI, A. Bioacumulação in: ZAGATTO, P. A., BERTOLETTI, E. (Eds) **Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações.** Ed. Rima, São Carlos, 478p. 2006.

BURGER, J.; GOCHFELD, M. Metal levels in feathers of 12 species of sea birds from Midway Atoll in the northern Pacific Ocean. **Science Total Environmental**, v. 257, p. 37-52, 2000.

BUSS, D. F.; BAPTISTA, D. F.; NESSIMIAN, J. L. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Caderno de Saúde Pública**, v. 19, p. 465-473, 2003.

BUSS, D. F.; OLIVEIRA, R. B.; BAPTISTA, D. F. Monitoramento biológico de ecossistemas aquáticos continentais. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, p. 339-345, 2008.

CADET, J. L.; JAYANTHI, S.; DENG, X. Speed kills: cellular and molecular bases of methamphetamine-induced nerve terminals degeneration and neuronal apoptosis. **FASEB**, v. 17, p.1775–1788, 2003.

CAJARAVILLE, M. P.; BENIANNIO, J. M.; BLASCO, J.; PORTE, C.; SARASQUETE, C.; VIARENGO, A. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. **The Science of the Total Environment**, v. 247, p. 295-311, 2000.

CAMARGO, M. M. P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 40-46. 2009.

CAMEJO, G.; WALLIN, B.; ENOJÄRVI, M. **Analyses of Oxidation and Antioxidants using Microtiter Plates**. In: Amstrong D (ed) Free radical and antioxidants protocols. Humana Press, New Jersey, p. 377-387, 1998.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, p. 5475- 5480, 1975.

CAVALCANTE, D. S. M.; MARTINEZ, C.; SOFIA, S. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, p. 41-46, 2008.

CAMARGO, M. M. P.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, v. 94, p. 40-46, 2009.

CETESB, 2010. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente - Níquel. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Agua/rios/variaveis.asp#niquel>> Acesso em: maio de 2011.

CHANDRAVATHY, V. M.; REDDY, S. L. N. Effect of lead on antioxidant enzymes activities and Lipid peroxidation in old male mice *Mus musculus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 20, p. 103-106, 1999.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the “eco” into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, v. 44, p 7-15, 2002.

CHAU, Y.K.; KULIKOVSKY-CORDEIRO, O. T. R. Occurrence of nickel in the Canadian environment. **Environmental Reviews**, v. 3, p.95-120, 1995.

CHE, W.; ZHANG, Z.; ZHANG, H.; WU, M.; LIANG, Y.; LIU, F.; LI, N. Compositions and oxidative damage of condensate, particulate and semivolatile organic compounds from gasoline exhausts. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 24, p. 11-18, 2007

CHIU, A.; KATZ, A. J.; BEAUBIER, J. Nickel in RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology, Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**, 1125p., 2004.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators in MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. Bioindicators and Biomonitoring. **Elsevier Science**, p. 639-666, 2003.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, Brasil, 23p., 2005.

COONEY, J.D. Freshwater tests. In: RAND, G.M. ed. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment**. 2ed. Taylor & Francis, p. 71-102, 1995.

CORREIA A. D.; LIVINGSTONE D. R.; COSTA M. H. Effects of waterborne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta*. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 357-360, 2002.

COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. Barueri: Manole, 878p., 2005.

COYLE P.; PHILCOX J. C.; CAREY L. C.; ROFE A. M. Metallothionein: the multipurpose protein. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 627-647, 2002.

DE BOECK, G.; EYCKMANS, M.; LARDON, I.; BOBBAERS. R.; SINHA, A. K.; BLUST, R. Metal accumulation and metallothionein induction in the spotted dog fish *Scyliorhinus canicula*. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A**, v. 155, p. 503-508, 2010.

DELEEBEECK, N. M. E.; SCHAMPHELAERE, K. A. C.; JANSSEN, C. R. A bioavailability model predicting the toxicity of nickel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and fathead minnow (*Pimephales promelas*) in synthetic and natural waters. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 67, p. 1-13, 2007.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biology Toxicology**, v. 25, p. 5-32, 2009.

DI GIULIO, R. T.; BENSON, W. H.; SANDERS, B. M.; VAN VELD, P. A. Biochemical Mechanisms: metabolismo, adaptation, and toxicity in RAND, G.M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology, Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**, 1125p., 1995.

DI GIULIO, R. T.; HINTON, D. E (Eds). **The toxicology of fishes**. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York, 1071p., 2008.

DI GIULIO R. T., MEYER J. N. Reactive oxygen species and oxidative stress in DI GIULIO R. T.; HINTON D. E. (eds.): **The Toxicology of Fishes**. CRC Press, Taylor and Francis Group, New York p. 273-324, 2008.

DORDAS, C.; SAH, R.; BRWN, P. H.; ZENG, Q.; H. U. Remobilização de micronutrientes e elementos tóxicos em plantas superiores in FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P.; RAIJ, B. VAN; ABREU, C.A. (Eds.). **Micronutrientes e elementos tóxicos na agricultura**. Jaboticabal, cap. 3, p.43-69, 2001.

EISLER, R., **Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review**. US Geological Survey, Biological Resources Division, Biological Science Report, 1998.

ELLGAARD, E. G.; ASHLEY, S. E.; LANGFORD, A. E.; HARLIN, D. C. Kinetic analysis of the swimming behavior of the goldfish, *Carassius auratus*, exposed to nickel; hypoactivity induced by sublethal concentrations. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 929-936, 1995.

EVANGELISTA, J. **Alimentos: um estudo abrangente**. São Paulo: Editora Atheneu, 450p., 2000.

EVANS D. H.; PIERMARINI P. M.; CHOE K. P. Multifunctional fish gill: dominant site gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**, v. 85, p. 97-177, 2005.

FALFUSHYNSKA H. I.; STOLYAR O. B. Responses of biochemical markers in carp *Cyprinus carpio* from two field sites in Western Ukraine. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 72, p. 729-736, 2009.

FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, v. 84, p. 415-430, 2007.

FERNANDES, D.; BEBIANNO, M. J.; PORTE, C. Hepatic levels of metal and metallothioneins in two commercial fish species of the Northern Iberian shelf. **The Science of the Total Environment**, v. 391, n.1, p. 159-167, 2008.

FERRANTE, I.; RICCI, R.; ALEO, E.; PASSI, S.; CATAUDELLA, S. Can enzymatic antioxidant defences in liver discriminate between wild and sea cage-reared Bluefin Tuna quality? **Aquaculture**, v. 279, p. 182-187, 2008.

FERRARI, J. E. C.; BARROS, M. M.; PEZATTO, L. E.; GONÇALVES, G. S.; HISANO, H.; KLEEMANN, G. K. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, p. 429-436, 2004.

FERREIRA, C. M. Testes de Toxicidade Aquática para Monitoramento Ambiental. **Biológico**, v. 65, n. 1/2, p. 17-18, 2003.

FILIPOVI V.; RASPOR B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. **Water Research**, v. 37, p. 3253-3262, 2003.

FLORENCE, G.; SERAFIM, A.; BARREIRA, L.; BEBIANNO, M. J. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussates*. **Marine Environmental Research**, v. 54, p. 413-417, 2002.

FLOTEMERSCH, J. E.; STRIBLING, J. B.; PAUL, M. J.; SNYDER, B. D. Fish in FLOTEMERSCH, J. E.; STRIBLING, J. B.; PAUL, M. J. **Concepts and approaches for the bioassessment of Non-wadeable Streams and Rivers**. Cincinnati, Ohio: USEPA, p.7.1-7.26, 2006.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLE, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDI, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research**, v. 674, p. 3-22, 2009.

FREIRE, M. M.; SANTOS, V. G.; GINUINO, I. S. F.; ARIAS, A. R. L. Biomarcadores na avaliação da saúde ambiental dos ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 347-354, 2008.

FRENZILI, G.; SCARCELLI, V.; BARGA, I.; NIGRO, M.; FORLIN, L., BOLOGNESI, C.; STURVE, J. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbor. **Mutation Research**, v. 552, p. 187-195, 2004.

FRENZILLI, G.; NIGRO, M.; LYONS; B. P. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. **Mutation Research**, v. 681, p. 80-92, 2009.

GALARIS, D.; EVANGELOU, A. The role of oxidative stress in mechanisms of metal-induced carcinogenesis. **Critical Reviews in Oncology Hematology**. V. 42, p.93-103, 2002.

GALINDO, B. A.; TROILO, G.; CÓLUS, I. M. S.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic Effects of Aluminum on the Neotropical Fish *Prochilodus lineatus*. **Water Air and Soil Pollution**, v. 212, p. 419-428, 2010.

GALVIN, R. M. Occurrence of metals in waters: An overview. **Water SA**, p.7-18, 1996.

GEORGE, S. G.; OLSSSEN, P. E. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution in K. J. M. Kramer (Ed.), **Biological monitoring of coastal waters and estuaries**, Boca Raton: CRC. 151–178, 1994.

GHAZALY, K.S. Sublethal effects of nickel on carbohydrate metabolism blood and mineral contents of *Tilapia nilotica*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v.64, p. 525-532, 1992.

GIGUÉRE, A. Sub-cellular partitioning of cadmium, copper, nickel and zinc in indigenous yellow perch (*Perca flavescens*) sampled along a polymetallic gradient. **Aquatic Toxicology**, v. 77, p.178–189, 2006.

- GIODA, C. R.; LISSNER, L. A.; PRETTO, A.; ROCHA, J. B. T.; SCHETINGER, M. R. C.; NETO, J. R.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. **Chemosphere**, v. 69, p. 170-175, 2007.
- GIULIO, R. T. D.; MEYER, J. N. Reactive oxygen species and oxidative stress. In: GIULIO, R. T. D.; HINTON, D. E. (Eds.). **The Toxicology of fishes**. New York. Taylor & Francis Group, cap. 6, p. 273-324, 2008.
- GOPAL, R.; NARMADA, S.; VIJAYAKUMAR, R.; JALEEL, C. A. Chelating efficacy of CaNa₂ EDTA on nickel-induced toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.) through its effects on glutathione peroxidase, reduced glutathione and lipid peroxidation. **Comptes Rendus des Seances de Societe de Biologie et de Ses Filiales**, v. 332, p. 685-696, 2009.
- GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. **Revista FAPAM**, ano 2, n.1. 2003.
- GUEDES, J. A. Poluição de Rios em Áreas Urbanas. **Ateliê Geográfico Goiânia-GO**, v. 5, n. 14, p. 212-226, 2011.
- GUPTA A., RAI D. K.; PANDEY R. S.; SHARMA B. Analysis of some heavy metals in the riverine water, sediments and fish from river Ganges at Allahabad. **Environmental Monitoring Assessment**, 157: 449-458, 2009.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. Nova York: **Oxford University Press**, v.1, 851p, 2007.
- HAUSINGER, R. P. **Biochemistry of nickel**. Plenum Press, New York. 280p., 1993.
- HEATH, A. G. 1995. **Water Pollution and Fish Physiology**. 2ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 395p.
- HERMES-LIMA, M.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 120, p. 437-448, 1998.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals in STOREY, K.B. (Ed.) **Functional metabolism: regulation and adaptation**. New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 319-368, 2004.
- HOPKINS, J., TUDHOPE, G. R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. **Journal of Haematology**, v. 25, p. 563-575, 1973.
- HYLLAND K.; HAUX C.; HOGSTRAND C. Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. **Marine Ecology Progress**, v. 91, p. 89-96, 1992.
- ISCAN, M.; COBAN, T.; EKE, B. C. Responses of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes of mouse, rat and guinea-pig to nickel. **Pharmacology Toxicology**, v.71, p. 434-442, 1992.

ISCAN, M., EKE, B. C., COBAN, T. Combined effects of cadmium and nickel on hepatic glutathione S-transferases in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 104, p. 453-456, 1993.

JARDIM, G. M.; ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R. Ecotoxicological assessment of water and sediment of the Corumbataí River, SP, Brazil. **Brazilian Journal Biology**, São Carlos, v. 68, n. 1, 2008.

JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207-21, 2008.

KHANGAROT, B. S.; RAY, P. K. Acute toxicity and toxic interaction of chromium and nickel to common guppy *Poecilia reticulata* (Peters). **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 832-839, 1990.

KASPZARK, K. S.; SUNDERMAN, F. W.; JR., SALNIKOW, K. Nickel carcinogenesis. **Mutation Research**, v. 533, p. 67-97, 2003.

KILEMADE, M. F.; HARTL, M. G. J.; SHEEHAN, D.; MOTHERSILL, C.; VAN PELT, F. N. A. M.; O'HALLORAN, J.; O'BRIEN, N. M. Genotoxicity of field-collected intertidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) as measured by the comet assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 44, p. 56-64, 2004.

KLAVINS, M.; POTAPOVICS O.; RODINOV, V. Heavy Metals in Fish from Lakes in Latvia: Concentrations and Trends of Changes. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, p. 96-100, 2009.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. **MMS Comum**, v.3, p. 103-115. 1995.

LACKNER, R. Oxidative stress in fish by environmental pollutants. BRAUNBECK et. al. (Ed.) **Fish Ecotoxicology**. Birkhäuser Verlag, p. 203-224, 2008.

LANGIANO, V. C.; MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 147, p. 222-231, 2008.

LANGSTON, W. J.; CHESMAN, B. S.; BURT, G. R.; POPE, N. D.; MCEVOY, J. Metallothionein in liver of eels *Anguilla anguilla* from the Thames Estuary: An indicator of environmental quality? **Marine Environmental Research**, v. 53, n. 3, p. 263-293, 2002.

LEE, R. F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutation Research**, v. 544, p. 43-64, 2003.

LEONARD, E. M.; BARCAROLLI, I.; SILVA, K. R.; WASIELESKY, W.; WOOD, C. M.; BIANCHINI, A. The effects of salinity on acute and chronic nickel toxicity and bioaccumulation in two euryhaline crustaceans: *Litopenaeus vannamei* and

Excirrolana armata. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 154, p. 409-419, 2011.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, p. 293-303, 2001.

LINDE, A. R.; SÁNCHEZ-GALÁN, S.; VALLÉS-MOTA, J. P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E. Metallothionein as bioindicator of freshwater metal pollution: European eel and Brown trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.49, p. 60-63, 2001.

LIONETTO, M. G.; CARICATO, R.; GIORDANO, M. E.; PASCARIELLO, M. F.; MARINOSCI, L.; SCHETTINO, T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**, v. 46, p. 324-330, 2003.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J.; Protein measurements with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. **Comparative Biochemistry And Physiology Part B**, v. 44, p. 283-289, 2006.

MALIK, N.; BISWAS, A. K.; QURESHI, T. A. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bopal. **Environmental and Monitoring Assessment**, v.160, p. 267-276, 2010.

MANSON, C. F. **Biology of freshwater pollution**. 3ed. Longman, Essex, 1996.

MARAN, E.; FERNÁNDEZ, M.; BARBIERI, P.; FONT, G.; RUIZ, M. J. Effects of four carbamate compounds on antioxidant parameters. **Ecotoxicology Environment Safety**, v. 72, p. 922-930, 2009.

MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. **Biomarcadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do rio Tibagi** in MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.). A bacia do rio Tibagi, p. 551-577, 2002.

MARTINEZ, C. B. R; NAGAE, M. Y.; ZAIA, C. T. B. V.; ZAIA, D. A. M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n.4, p. 797-807, 2004.

MARTINEZ, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água in: Ângela Teresa Silva-Souza (org.) Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá: **Abrapoa**, p. 43-62, 2006.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, E. P.; MARÍA-MOJICA, J. E.; MARTÍNEZ, J. F.; CALVO, D.; ROMERO, D.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J. Cadmium in Feathers of Adults and Blood of Nestlings of three Raptor Species from a Nonpolluted Mediterranean Forest, Southeastern Spain. **Environmental Contamination Toxicology**, v. 74, p. 477, 2005.

MASELLA, R. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, p. 577-586, 2005.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocyte hemocyanin (hemocyanin). **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 6049-6055, 1969.

MENDÉZ-ARMENTA, M.; RÍOS, C. Cadmium neurotoxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 23, p. 350-358, 2007.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, v. 78, p. 294-299, 2010.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 143, p. 141-149, 2006.

MONTEIRO, V.; CAVALCANTE, D. G. S. M.; VILÉLA, M. B. F. A.; SOFIA, S. H.; MARTINEZ, C. B. R. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Aquatic Toxicology**, p. 291-298, 2011.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS). **Medical and biological effects of environmental pollutants**. Nickel. National Research Council, National Academy of Sciences, Washington, D.C. 277p., 1975.

NESTO, N.; ROMANO, S.; MOSCHINO, V.; MAURI, M.; DA ROS, L. Bioaccumulation and biomarker responses of trace metals and micro-organic pollutants in mussels and fish from the Lagoon of Venice, Italy. **Marine Pollution Bulletin**, v. 55, p. 469-484, 2007.

NORDBERG, M. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. **Talanta**, v. 46, p. 243-254, 1998.

NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A., NORDBERG, M.; FRIBERG, L. **Handbook on the Toxicology of Metals**, 3ed, Elsevier, 992p. 2007.

NUSSEY, G.; VAN-VUREN, J. H. J.; PREEZ, H.H. Bioaccumulation of chromium, manganese, nickel and lead in the tissues of the moggel, *Labeo umbratus* (Cyprinidae), from Witbank Dam, Mpumalanga. **Water SA**, v. 26, p. 269-284, 2000.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K. Mutagens in surface waters: a review, **Mutation Research**, v. 567, p. 109-149. 2004.

OLIVE, P. L.; BANATH, J. P. The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, p. 23-9, 2006.

OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; CANO, M. A. O.; JORDÃO, C. P. Absorção e acúmulo de cádmio e seus efeitos sobre o crescimento relativo de plantas de aguapé e de salvinia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 3, 2001.

OLSVIK, P. A.; GUNDERSEN, P.; ANDERSEN, R. A.; ZACHARIASSEN, K. E. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. **Aquatic Toxicology**, v. 50, p. 301-316, 2000.

OROPESA, A. L.; CAMBERO, J. P. G.; SOLER, F. Effect of long-term exposure to simazine on brain and muscle acetylcholinesterase activity of common carp (*Cyprinus carpio*). **Environmental Toxicology**, v. 23, p. 285-293, 2009.

ORUC, E.O.; USTA, D. Evolution of oxidative stress responses and neuro toxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology Pharmacology**, v. 23, p. 48-55, 2007.

PAQUIN, P. R.; SANTORE, R. C.; WU, K. B.; KAVVADAS, C. D.; DI TORO, D. M. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. **Environmental Science and Policy**, v.3, p.175-182, 2000.

PARIS-PALACIOS S.; BIAGIANTI-RISBOURG S.; VERNET G. Metallothionein induction related to hepatic structural perturbations and antioxidative defenses in roach (*Rutilus rutilus*) exposed to the fungicide procymidone. **Biomarkers**, v. 8, p. 128-141, 2003.

PARTHIBAN, P.; MUNIYAN, M. Effect of Heavy Metal Nickel on the Lipid Peroxidation and Antioxidant Parameters in the Liver Tissue of *Cirrhinus Mrigala* (Ham.). **International Journal of Development Research**, v. 1, p. 1-4, 2011.

PAQUIN, P. R.; GORSUCH, J. W.; APTE, S.; BATLEY, G. E.; BOWLES, K.C.; CAMPBELL, P. G. C.; DELOS, C. G.; DI TORO, D. M.; DWYER, R. L.; GALVEZ, F.; GENSEMER, F. W.; GOSS, G. G.; HOGSTRAND, C.; JANSSEN, C. R.; MCGEER, J. C.; NADDY, R. B.; PLAYLE, R. C.; SANTORE, R. C.; SCHNEIDER, U.; STUBBLEFIELD, W. A.; WOOD, C. M.; WU, K. B. The biotic ligand model: a historical overview. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 133, p. 3-35, 2002.

PEAKALL, D.; BURGER, J. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 56, p. 110-121, 2003.

PEREIRA, G. C.; EBECKEN, N. F. F. Knowledge discovering for coastal waters classification. **Expert Systems with Applications**, v. 36, n. 4, p. 8604-8609, 2009.

PILLA, A. T. F.; PEREIRA, L. B.; BARROS, A. A.; MOREIRA, M. S. P.; SIROL, R. N.; BRITTO, S.G. **Caracterização dos Pescadores do Reservatório de Capivara (Rio Paranapanema)** – Publicação Duke Energy, 65p., 2003.

PTASHYNSKI, M. D.; PEDLAR, R. M.; EVANS, R. E.; WAUTIER, K. G.; BARON, C. B.; KLAVERKAMP, J. F. Accumulation, distribution, and toxicology of dietary nickel in

lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) and lake trout (*Salvelinus namaycush*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v.130, p. 145-162, 2001.

PTASHYNSKI, M. D.; PEDLAR, R. M.; EVANS, R. E.; BARON, C. L.; KLAVERKAMP, J. F. Toxicology of dietary nickel in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). **Aquatic Toxicology**, v. 58, p. 229-247, 2002.

RIBEIRO, C. A. O.; NETO, F. F.; MELA, M., SILVA, P. H.; RANDI, M. A. F.; RABITTO, I. S.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E. Hematological findings in neotropical fish *Hoplias malabaricus* exposed to subchronic and dietary doses of methylmercury, inorganic lead, and tributyltin chloride. **Environmental Research**, v. 101, p. 74-80, 2006.

RICHARDS, J. G.; CURTIS, P. J.; BURNISON, B. K.; PLAYLE, R. C. Effects of natural organic matter source on reducing metal toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and on metal binding to their gills. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 20, p. 1159-1166, 2001.

RIETZLER, A. C.; FONSECA, A. L.; LOPES, G. P. Heavy metals in tributaries of Pampulha reservoir, Minas Gerais. **Brazilian Journal Biology**, v. 61, p. 363-370, 2001.

RODRIGUEZ, R. E.; MISRA, M.; DIWAN, B. A.; RIGGS, C. W.; KASPRZAK, K. S. Relative susceptibilities of C57BL/6X, (C57BL/6 X C3H/He) F1, and C3H/He mice to acute toxicity and carcinogenicity of nickel subsulfide. **Toxicology**, v.107, p. 131-140, 1996.

ROESIJADI G.; ROBINSON, W. E. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. **Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives**, p.387-420, 1994.

ROMANI, R.; ANTOGNELLI, C.; BALDRACCHINI, F.; DE SANTIS, A.; ISANI, G.; GIOVANNINI, E.; ROSI, G. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, p. 321-329, 2003.

ROMEO, M.; BENNANI, N.; GNASSIA-BARELLI, M.; LAFAURIE, M.; GIRARD, J. P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**, v. 48, p. 185-194, 2000.

RUAS, C.; CARVALHO, C.; DE ARAÚJO, H.; ESPÍNDOLA, E.; FERNANDES, M. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 71, p. 86-93. 2008.

SAMPAIO, F. G.; BOIJINK, C. L.; OBA, E. T.; SANTOS, L. R. B.; KALININ, A. L.; RANTIN, F. T. Antioxidant defences and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 147, p. 43-51, 2008.

SAMPSON, B. J.; BECKMAN, J. S.; Hydrogen peroxide damages the zinc-binding site of zinc-deficient Cu, Zn superoxide dismutase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 392, p. 8-13, 2001.

SANDRINI, J. Z.; BIANCHINI, A.; TRINDADE, G. S.; NERY, L. E. M.; MARINS, L. F. F. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. **Aquatic Toxicology**, v. 95, p. 285-291, 2009.

SARKAR, A.; RAY, D.; SHRIVASTAVA, A. N.; SARKER, S. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 333-340, 2006.

SCHLENK D.; ZHANG Y. S.; NIX, J. Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral fish and caged fish species correlates with muscle mercury levels. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 31, p. 282-286, 1995.

SHARMA, S.; NAGPUDE, N. S.; KUMAR, R.; PANDEY, S.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, P. J.; MATHUR, P. K. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the Comet Assay, Arch. Environ. Con. Tox. 53 617–623. 2007.

SHUGART, L. R. DNA Damage as a Biomarker of Exposure. **Ecotoxicology**, v. 9, p. 329-340, 2000.

SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O. Metal ions in life Sciences -Metallothioneins and Related Chelators. **Royal Society of Chemistry**, 514p., 2009.

SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; HEUSER, V.; MARINHO, J. R.; ERDTMANN, B. Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 270-278, 2000.

SILVA, C. S. Níquel in Balanço Mineral Brasileiro 2001. Disponível em: <<http://www.dnpm.gov.br/assets/galeriadocumento/balancomineral2001/niquel.pdf>> Acesso em dezembro de 2011.

SIMONATO, J. D.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology**, v. 20, p. 1400-1410, 2011.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v.175, p.184-191, 1988.

SÖDERGREN, E. **Lipid Peroxidation in vivo - Evaluation and Application of Methods for Measurement**. Tese de Doutorado - Universidade de Uppsala – Suécia, 78p., 2000.

STURVE, J.; ALMROTH, B. C.; FÖRLIN, L. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. **Ecotoxicology Environmental Safety**, v. 70, n.3, p. 446-452, 2008.

SUZUKI K. T.; SOMEYA A.; KOMADA Y.; OGRA Y. Roles of metallothionein in copper hemostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. **Journal Inorganic Biochemistry**, v. 88, p.173-82, 2002.

TAGLIARI, K. C.; VARGAS, V. M. F.; ZIMIANI, K.; CECCHINI, R. Oxidative stress damage in the liver of fish and rats receiving an intraperitoneal injection of hexavalent chromium as evaluated by chemiluminescence. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 17, p. 149-157, 2004.

TEKMAN, B.; OZDEMIR, H.; SENTURK, M.; CIFTCI M. Purification and characterization of glutathione reductase from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and inhibition effects of metal ions on enzyme activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 148, p. 117-121, 2008.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

THOPHON, S.; KRUATRACHUE, M.; UPATHAM, E. S.; POKETHITIYOOK, P.; SAHAPHONG, S.; JARRITKHUAN, S. Histopathological alterations of White seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**, v. 121. 2003.

TUNDISI, J. G. Ciclo hidrológico e gerenciamento integrado. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 4, p. 31-33, 2003.

UNER, N.; ORUÇ, E.; SEVGILER, Y. Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 20, p. 99-106, 2005.

UNIVILLE, Universidade da Região de Joinville. **Projeto canal do Linguado: Estudos da Biota Marinha e Química Ambiental da Baía da Babitonga**. Pró-Reitoria de Extensão e Assuntos Comunitários, 368p., 2004.

U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Ambient water quality criteria for nickel. EPA Report 440/5-80-060. 206p., 1980.

U. S. PUBLIC HEALTH SERVICE (USPHS). Toxicological profile for nickel. U.S. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, Georgia. Report TP-92/14. 158p., 1993.

VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 178-189, 2006.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

- VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, p. 57-149, 2003.
- VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C.B.R.; CÓLLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. **Mutation Research**, v. 631, p. 36-43. 2007.
- VAZQUEZ, M. Experimental design approach for the extraction of methylmercury from certified reference materials using microwave energy. **Chemosphere**, v. 39, n. 7, p. 1211-1224, 1999.
- VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CAVALETTO, M.; MARCHI, B.; PONZANO, E., BLASCO, J. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytillus galloprovincialis*. **American Journal of Physiology**, v. 277, p. 1612-1619, 1999.
- VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 146, p. 281-300, 2007.
- VINODHINI R., NARAYANAN M. Biochemical changes of antioxidant enzymes in common carp (*Cyprinus carpio L.*) after heavy metal exposure. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 33, p. 273-278, 2009.
- VINODHINI R., NARAYANAN M. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio (Common carp)*. **International journal of Environmental Science and Technology**, v. 5, p. 179-182, 2008.
- VOS, G.; HOVENS, J. P. C. Chromium, nickel, copper, zinc, arsenic, selenium, cadmium, mercury and lead in Dutch fishery products (1977- 1984). **Science of the Total Environment**, v. 55, p. 25-40, 1986.
- VUTUKURU, S. S.; CHINTADA, S.; MADHAVI, K. R.; RAO, J. V., ANJANEYULU, Y. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish *Esomus danricus*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 32, p. 221-229, 2006.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática: Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. 464p., 2006.
- ZHOU, Q.; ZHANG, J.; FU, J.; SHI, J.; JIANG, G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. **Analytica Chimica Acta**, v. 606, p. 135-150, 2008.
- WENDELAAR BONGA, S. E.; LOCK, R. A. C.; The osmoregulatory system. In: DI GIULIO, R. T.; HILTON, D. E. (Eds). **The Toxicology of Fishes**. New York, CRC Press., p. 401-415, 2008.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. **Environmental Health Criteria**. Geneva: World Health Organization. v. 222, 238p., 2001.

WOO, S.; YUM, S.; PARK, H. S.; LEE, T. K.; RYU, J.C. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 149, p. 289-299, 2009.