



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MILLENA TEREZINHA CABRAL

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ZINCO NO TELEÓSTEO
Prochilodus lineatus:
BIOACUMULAÇÃO E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS,
METABÓLICAS E OSMORREGULATÓRIAS

Londrina
2017

MILLENA TEREZINHA CABRAL

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ZINCO NO TELEÓSTEO
***Prochilodus lineatus*:**
BIOACUMULAÇÃO E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS,
METABÓLICAS E OSMORREGULATÓRIAS

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Cabral, Millena Terezinha.

Efeitos da exposição ao zinco no teleósteo *Prochilodus lineatus* : bioacumulação e alterações hematológicas, metabólicas e osmorregulatórias / Millena Terezinha Cabral. - Londrina, 2017.
71 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Fisiologia animal comparada - Tese. 2. Biomarcadores fisiológicos de contaminação aquática - Tese. 3. Acúmulo de metais em peixes - Tese. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

MILLENA TEREZINHA CABRAL

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO AO ZINCO NO TELEÓSTEO *Prochilodus*
lineatus:
BIOACUMULAÇÃO E ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS,
METABÓLICAS E OSMORREGULATÓRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina como um dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos
Reis Martinez
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Juliana Delatim Simonato Rocha
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Londrina, 24 de março de 2017.

À minha família, que me mostra diariamente a importância da união e do amor;

Ao Rafael, por compreender minhas ausências e se mostrar o melhor companheiro que eu poderia ter.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Claudia, por ser um exemplo de professora e pesquisadora competente e dedicada no que faz. Agradeço a confiança por me aceitar em seu laboratório há mais de cinco anos com muito carinho, e ter contribuído com grande parte do meu crescimento profissional até aqui. Ainda tenho muito o que aprender e espero que a prof.^a Claudia esteja presente nas próximas lições.

Aos meus pais, Edna e Angelo, que sequer tiveram a oportunidade de colocar os pés em uma universidade e pegar um diploma na mão, mas sabem a importância da educação e não medem esforços para que eu e meus irmãos não passemos pelo mesmo. Eles me ensinam diariamente a suportar as adversidades da vida com paciência, humildade e honestidade. Eles são meus exemplos de luta, força e dedicação, por isso, a eles também dedico este trabalho. Eles me incentivam, me apoiam, me aconselham. E a eles serei eternamente grata!

Aos meus irmãos, Michelly e Miguel, que são umas pestes mas que eu não sei viver sem. São eles que me aguentam quando o estresse insiste em bater, são eles que suportam meu mau-humor, mas também são eles que me divertem e me fazem sorrir nestes mesmos momentos. Eu espero que tudo isto que estou fazendo possa servir de exemplo para eles, meus pequenos grandes companheirinhos!

Ao meu namorado, Rafael, que está ao meu lado desde o ensino médio e vivenciou comigo todas as experiências que a graduação e o mestrado trouxeram. Ele é meu ombro pra desabafar e chorar, é aquela mão estendida sempre pronta a me acompanhar, é aquela careta maluca esperando meu gargalhar, é meu amigo e amor.

À minha vizinha, por se preocupar comigo mesmo sem entender essa maluquice de pós-graduação, e por ser o estímulo que precisei nestas últimas semanas.

À minha melhor amiga, Bárbara, aquela doida que sempre chega com as histórias mais engraçadas pra me contar. Mesmo quando tomamos rumos diferentes na vida permanecemos ligadas pelo pensamento e sempre estivemos prontas pra ajudar quando a outra precisasse. E vai ser sempre assim.

Às minhas amigas espiãs, Mariane e Thayse, que sempre trouxeram momentos de descontração quando a caminhada foi difícil, e nutrem nossa amizade com muito carinho, companheirismo e amor.

À Lefiana Thais, pois ela foi muito além de uma simples colega de laboratório e me dividiu comigo conversas maduras e banais durante este período. Tenho certeza que as análises de anidrase carbônica ficaram mais leves por conta disto.

À quase bióloga Laís, por ter cuidado das minhas amostras de acúmulo quando eu estava atolada com a qualificação.

À família LEFA: Angélica, Carlos, Carol, Cássia, Hellen, Laura Fernanda, Laura Lui, Lu, Maria Eduarda, Tiago e Vanessa, pela ajuda em amostragens e análises. Em especial ao pessoal que faz parte da pós-graduação, porque diariamente compartilhamos momentos de angústia e muitos momentos de alegria, de descontração, de macarrões e doces, pelas viagens únicas, pelas festas e “happy hours”. Tenho muito orgulho de dizer que fiz parte deste grupo comprometido e exemplar. Vou guardar com carinho cada lembrança que tenho de cada um!

Ao técnico do LEFA, Wagner Risso, por estar sempre disposto a me ajudar nas análises dos metais e outras amostras dentro do laboratório.

À Prof.^a Dra. Juliana D. S. Rocha, que me acompanha desde as aulas de Fisiologia Animal Comparada na graduação e se tornou um exemplo de professora justa e ética pra mim. Agradeço aos livros que me emprestou e as dicas e conselhos que compartilhou com todos.

À banca examinadora, Prof.^a Dra. Carolina Arruda de Oliveira Freire e Prof.^a Dra. Juliana D. S. Rocha, por aceitarem o convite e me ajudarem a tornar este trabalho digno de se orgulhar.

Aos colegas do programa, pelo compartilhamento de disciplinas e pela ajuda nos trabalhos durante cada uma delas.

Aos professores do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, pela chance de crescer nesta carreira e por proporcionar disciplinas externas que contribuíram com meu crescimento pessoal e profissional.

À Estação de Piscicultura da UEL e à Acqua Norte (Cambará/PR), por fornecer os peixes para este trabalho.

Aos órgãos financiadores, Capes, CNPq e Fundação Araucária, pela concessão de bolsa e apoio financeiro que possibilitaram a realização desta pesquisa.

Finalmente, a Deus, por me sustentar e ser essa força suprema, senhor de todas as coisas!

“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus.”

Eclesiastes 3, 1

CABRAL, Millena Terezinha. **Efeitos da exposição ao zinco no teleosteo *Prochilodus lineatus***: bioacumulação e alterações hematológicas, metabólicas e osmorregulatórias. 2017. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O Zinco (Zn) é um metal essencial para os organismos vivos em quantidades traço, mas pode ser tóxico quando presente em concentrações mais elevadas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a bioacumulação e a ocorrência de alterações hematológicas, metabólicas e osmorregulatórias no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, após exposição ao Zn. Para isto, juvenis foram expostos à água contendo 0,2 (Zn 0,2) e 2,0 (Zn 2,0) mg L⁻¹ de Zn, ou apenas à água (CTR). Após 24, 96 e 168 h de exposição os peixes foram amostrados para a retirada de sangue, brânquias, fígado e rim posterior, nos quais foi feita a determinação do acúmulo de Zn. O sangue também foi utilizado para as análises de hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos (RBC). No plasma foram medidas as concentrações de Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺ e glicose. O fígado foi utilizado para quantificação do glicogênio. E nas brânquias e rim posterior foram determinadas as atividades das enzimas: anidrase carbônica (AC), Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), H⁺-ATPase (HATP), Ca²⁺-ATPase (CaATP) e Mg²⁺-ATPase (MgATP). Após 24 e 96 h de exposição, sangue e brânquias aumentaram significativamente a concentração de Zn em relação aos respectivos CTR. O rim posterior e o fígado aumentaram significativamente a concentração de Zn no grupo Zn 2,0, em relação aos seus grupos CTR, após 96 e 168 h de exposição, respectivamente. O RBC dos peixes dos grupos Zn 0,2 e Zn 2,0 foi significativamente menor do que o grupo CTR após 96 h. O glicogênio hepático diminuiu significativamente no grupo Zn 0,2, em relação ao CTR, após 168 h. A atividade da HATP branquial e renal aumentou significativamente nos grupos Zn 0,2 e 2,0, após 96 h. A atividade da NKA branquial diminuiu significativamente nos grupos Zn 0,2 e 2,0 após 168 h, com consequente aumento na concentração do K⁺. A atividade da CaATP branquial foi significativamente maior nos peixes expostos ao Zn 0,2 por 24 h, com redução significativa do Ca²⁺ neste tempo. Após 168 h, a atividade branquial da CaATP do grupo Zn 2,0 e da MgATP dos grupos Zn 0,2 e 2,0 foram significativamente menores em relação aos grupos CTR, com redução significativa do Mg²⁺ plasmático nestes mesmos grupos. No rim posterior, a atividade da CaATP e da MgATP dos grupos Zn 0,2 e 2,0 diminuiu significativamente após 96 h. Assim, a exposição de *P. lineatus* ao Zn, em concentrações dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira, promoveu acúmulo do metal ao longo das 168 h de exposição, de acordo com o seguinte padrão temporal: 24 e 96 h sangue e brânquias, 96 h rim posterior, 96 e 168 h fígado. Além de reduzir o número de eritrócitos, importante no transporte de gases, o Zn promoveu alterações na atividade branquial e renal de enzimas essenciais para manutenção do equilíbrio iônico e ácido-base, resultando em desajustes nas concentrações plasmáticas principalmente de K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺.

Palavras-chave: ATPases. Brânquias. Íons plasmáticos. Número de eritrócitos. Rim.

CABRAL, Millena Terezinha. **Effects of zinc on the teleost *Prochilodus lineatus*: bioaccumulation and hematological, metabolic and osmoregulatory alterations.** 2017. 71p. Dissertation (Master's degree in Physiological Sciences) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Zinc (Zn) is an essential metal for living organisms in trace amounts but it can be toxic when present in higher concentrations. Thus, the aim of this study was to evaluate the bioaccumulation and the occurrence of hematological, metabolic and osmoregulatory changes on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*, after exposure to Zn. For that, juveniles were exposed to 0.2 (Zn 0.2) and 2.0 (Zn 2.0) mg L⁻¹ Zn, or only to water. After 24, 96 and 168 h of exposure fish were sampled for the withdraw of blood, gills, liver and posterior kidney, where Zn accumulation was determined. In addition, the blood was used for the determination of hematocrit, hemoglobin, and erythrocyte count (RBC). Plasma concentrations of Na⁺, K⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Mg²⁺ and glucose were measured. The liver was used for quantification of hepatic glycogen. In the gills and posterior kidney the activities of carbonic anhydrase (AC), Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), H⁺-ATPase (HATP), Ca²⁺-ATPase (CaATP), Mg²⁺-ATPase (MgATP) were determined. After 24 and 96 h exposure, blood and gills significantly increased the concentration of Zn in relation to the respective CTR. The posterior kidney and the liver showed a significant increase in Zn concentration in fish from Zn 2.0 group, relative to CTR groups, after 96 and 168 h of exposure, respectively. RBC of fish from Zn 0.2 and Zn 2.0 groups were significantly lower than the CTR group after 96 h. Hepatic glycogen decreased significantly in Zn 0.2 group, in relation to the CTR, after 168 h. Gill and renal HATP activity increased significantly in Zn 0.2 and 2.0 groups after 96 h. Gill NKA activity decreased significantly in 0.2 and 2.0 Zn groups after 168 h, with a consequent increase in K⁺ concentration. Gill CaATP activity was significantly higher in fish exposed to Zn 0.2 for 24 h, when a significant decrease on plasma Ca²⁺ was observed. Conversely, after 168 h, branchial CaATP in fish from Zn 2.0 group and MgATP from Zn 0.2 and 2.0 groups were significantly lower in relation to the CTR groups, with a significant reduction of plasma Mg²⁺ in these same groups. In the posterior kidney, CaATP and MgATP in fish from Zn 0.2 and 2.0 groups decreased significantly after 96 h. Thus, the exposure of *P. lineatus* to Zn, in concentrations within the limits allowed by the Brazilian legislation, promoted accumulation of the metal during the 168 h of exposure, according to the following temporal pattern: 24 and 96h blood and gills, 96 h posterior kidney, 96 and 168 h liver. In addition to reducing the erythrocyte count, important in the transport of gases, Zn promoted changes in the gill and renal activity of essential enzymes for the maintenance of the ionic and acid-base balance, resulting in imbalances in plasma concentrations mainly of K⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺.

Keywords: ATPases. Gills. Ions. Metal. Number of red blood cells. Posterior kidney.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Influência da quantidade de metais na sobrevivência dos organismos..... 18
- Figura 2** – Transportadores celulares de Zn 22
- Figura 3** – Modelo simplificado que ilustra os principais transportadores presentes na CRM das brânquias e célula tubular renal dos teleósteos de água doce 24
- Figura 4** – Esquema de um néfron de teleósteo de água doce ilustrando a reabsorção iônica e de solutos, principalmente pelo túbulo proximal, e a produção de grande quantidade de urina 26
- Figura 5** – Foto de um exemplar da espécie de teleósteo dulcícola *Prochilodus lineatus* utilizado neste trabalho 33
- Figura 6** – Esquema ilustrativo da renovação dos meios de exposição dos experimentos de 96 e 168 h, em que as renovações ocorreram a cada 24 h 39
- Figura 7** – Concentração de Zn (média \pm EP; n = 4 – 8) em sangue (A), brânquias (B), fígado (C) e rim (D) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h 48
- Figura 8** – Valores (média \pm EP; n = 5 – 8) de hematócrito (A), hemoglobina (B) e número de eritrócitos (RBC) (C) do sangue de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h 49
- Figura 9** – Concentração (média \pm EP; n = 5 – 8) de glicose plasmática (A) e glicogênio hepático (B) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h 50
- Figura 10** – Concentrações (média \pm EP; n = 4 – 8) de Na⁺ (A), K⁺ (B), Cl⁻ (C), Ca²⁺ (D) e Mg²⁺ (E) no plasma de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h 51

- Figura 11** – Valores (média \pm EP; n = 5 – 8) da atividade das enzimas anidrase carbônica (A), HATP (B), NKA (C), CaATP (D) e MgATP (E) das brânquias de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h53
- Figura 12** – Valores (média \pm EP; n = 5 – 8) da atividade das enzimas anidrase carbônica (A), HATP (B), NKA (C), CaATP (D) e MgATP (E) do rim posterior de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Anidrase Carbônica
Ca ²⁺	Cálcio
CaATP	Ca ²⁺ -ATPase
Cl ⁻	Cloreto
CRM	Célula Rica em Mitocôndria
CTR	Grupo Controle
H ⁺	Próton ou Íon Hidrogênio
HATP	H ⁺ -ATPase
Hb	Hemoglobina
Hcto	Hematócrito
K ⁺	Potássio
Mg ²⁺	Magnésio
MgATP	Mg ²⁺ -ATPase
MTs	Metalotioneínas
Na ⁺	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
NKA	Potássio
RBC	Número de Eritrócitos
Zn	Zinco
Zn 0,2	Grupo exposto a 0,2 mg L ⁻¹ de zinco
Zn 2,0	Grupo exposto a 2,0 mg L ⁻¹ de zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA	17
2.2	METAIS	17
2.2.1	Zinco	19
2.3	OSMORREGULAÇÃO.....	23
2.4	ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA.....	27
2.5	BIOMARCADORES	28
2.5.1	Biomarcadores Fisiológicos	29
2.5.1.1	Parâmetros hematológicos	29
2.5.1.2	Parâmetros osmorregulatórios	30
2.6	MODELO EXPERIMENTAL.....	31
2.6.1	<i>Prochilodus lineatus</i>	32
3	JUSTIFICATIVA	34
4	HIPÓTESE	35
5	OBJETIVOS	36
5.1	OBJETIVO GERAL	36
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
6	MATERIAL E MÉTODOS	37
6.1	ANIMAIS	37
6.2	DEFINIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ZN TESTADAS	37
6.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
6.4	AMOSTRAGEM.....	39
6.5	ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICAS DA ÁGUA	40
6.6	ANÁLISE DE ZN NOS TECIDOS.....	40
6.7	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	40

6.7.1	Hematócrito	40
6.7.2	Hemoglobina	41
6.7.3	Número de Eritrócitos	41
6.8	PARÂMETROS METABÓLICOS	41
6.9	PARÂMETROS IÔNICOS	42
6.10	ANÁLISES ENZIMÁTICAS	42
6.10.1	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase e H ⁺ -ATPase	42
6.10.2	Ca ²⁺ -ATPase e Mg ²⁺ -ATPase	43
6.10.3	Anidrase Carbônica	43
6.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
7	RESULTADOS	45
7.1	ACÚMULO TECIDUAL DE ZN	46
7.2	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	48
7.3	PARÂMETROS METABÓLICOS	49
7.4	PARÂMETROS IÔNICOS	50
7.5	ANÁLISES ENZIMÁTICAS	52
8	DISCUSSÃO	55
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS	64

1 INTRODUÇÃO

Desde o advento da Revolução Industrial houve uma crescente exploração das diferentes matérias-primas para atender a demanda do crescimento populacional e produção de bens de consumo. As consequências incluem descarte de rejeitos e efluentes industriais, muitas vezes sem nenhum tratamento, no ambiente, que tem os corpos hídricos como receptor final. Quando estes rejeitos são liberados em uma quantidade que ultrapassa a capacidade de depuração do ambiente, ocorre a poluição ambiental, que traz sérias consequências ao ecossistema. Os metais podem ser encontrados em ecossistemas aquáticos em consequência de processos naturais e também devido a ação antrópica (ALI et al., 2013).

Os metais são motivo de preocupação devido ao seu impacto tanto na saúde humana, quanto sua persistência no ambiente. Algumas fontes de poluição de metais abrangem fertilizantes e esgotos, mas a principal delas é a industrialização. A presença destes metais na água pode alterar o desenvolvimento, crescimento, reprodução, comportamento e até levar à morte dos organismos que vivem nos ambientes aquáticos. Os metais podem se acumular nos tecidos destes organismos, causando uma série de alterações em sua homeostase, e chegar ao ser humano, que se utiliza de muitas espécies de peixes para alimentação (PALANIAPPAN et al., 2010).

Os ecossistemas de água doce recebem a maior parte desses contaminantes e, como os teleósteos integram este meio, desempenham um importante papel como biomonitores da contaminação por metais (KOUSAR e JAVED, 2014). Os teleósteos de água doce são osmoticamente mais concentrados do que o meio em que vivem, por esta razão estão sujeitos ao influxo de água, que entra através das brânquias por osmose. Para manter o equilíbrio hidroeletrólítico, esses peixes eliminam o excesso de água via rim posterior e captam íons ativamente pelas brânquias, compensando a perda para o ambiente. As ATPases constituem um dos mais importantes transportadores envolvidos nesta homeostase, consumindo de 3 a 28% de toda a energia gasta pelo organismo. Entretanto, a exposição a contaminantes pode interferir nestes processos, causando mudanças nos

parâmetros osmo-iônicos e ocasionando danos que podem resultar na morte dos indivíduos (NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

Assim, considerando-se os problemas gerados pela presença dos metais no ambiente, faz-se necessário estudos que reúnam dados de parâmetros químicos, físicos e também biológicos. Essa análise biológica pode ser realizada empregando-se ferramentas que permitam, a partir de alterações em escalas menores, como moléculas, células, tecidos e órgãos, antecipar os prejuízos em níveis de organização biológica superiores e assim serem utilizadas de modo preventivo (CAJARAVILLE et al., 2000; LAM, 2009).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA

A contínua busca por uma qualidade de vida melhor leva a sociedade a explorar cada vez mais os recursos naturais e usufruir das atividades industriais e urbanas, produzindo rejeitos que podem ser introduzidos acidental ou intencionalmente no ambiente aquático, um meio altamente suscetível à contaminação (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Através de seu ciclo hidrológico e funcionando como um solvente universal, a água dissolve muitos elementos e carrega vários outros em suspensão. Assim, grandes quantidades de contaminantes atingem tanto o solo quanto a água todos os anos (NETO e FERREIRA, 2007). Diversas são as fontes de contaminação de águas superficiais, estas incluem tanto aquelas de origens naturais, como em decorrência de chuvas, escoamento superficial e decomposição de organismos vivos, quanto aquelas provenientes da atividade humana, como liberação de contaminantes oriundos de processos industriais, resíduos domésticos, uso de agrotóxicos, bem como derramamentos acidentais de derivados de petróleo em geral que podem chegar aos corpos hídricos (LINS et al, 2010).

Desta maneira, a conservação dos corpos de água, como seu tamanho e volume, e a manutenção da integridade hidrológica, levando em conta características como pH, oxigênio dissolvido, dureza, são aspectos fundamentais para a preservação da biodiversidade e dos recursos aquáticos (AGOSTINHO et al., 2005).

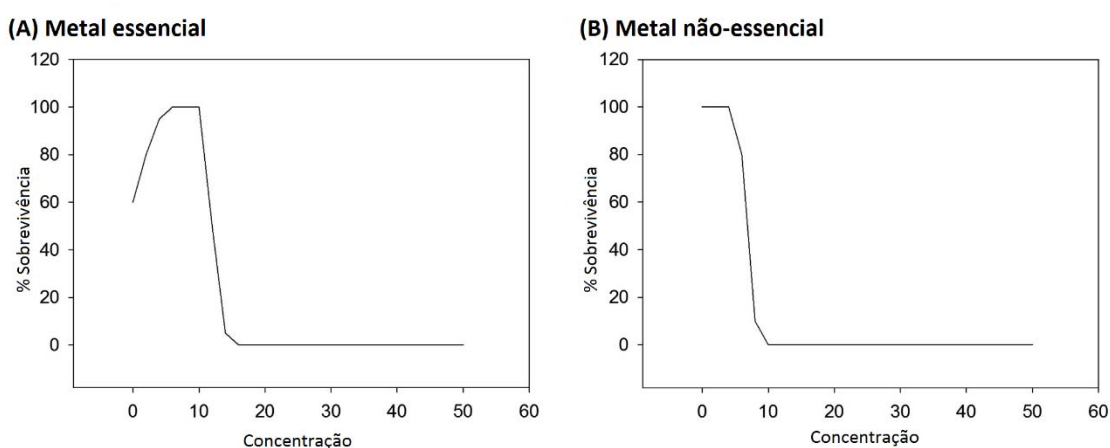
2.2 METAIS

Os metais constituem um dos grupos de contaminantes mais encontrados nos corpos hídricos, podendo atingir a água através de processos naturais, como erosões do solo e intemperismos (JAISHANKAR et al., 2014). Algumas atividades humanas, como utilização de fertilizantes e pesticidas, queima de biomassa de zona rural, combustão de carvão e óleo, incineração, emissões veiculares, e atividades de mineração, fundição e refinamento podem aumentar a concentração dos metais no

ambiente aquático (NIKINMAA, 2014). Neste sentido, uma vez presentes nos corpos hídricos, os metais geralmente apresentam-se em sua forma iônica, seja dissolvidos na coluna d'água ou complexados a moléculas orgânicas, inorgânicas e/ou substâncias particuladas (SHRIVASTAVA et al., 2003; NIKINMAA, 2014).

Os metais podem ser divididos em essenciais e não-essenciais. Metais essenciais como cobre, manganês, ferro e zinco são fundamentais em pequenas quantidades para manter as funções vitais do organismo (CAMPOS et al., 2005), seja para atuarem como cofatores enzimáticos ou participar da composição dos pigmentos carreadores de oxigênio, no entanto, podem se tornar tóxicos em níveis além do necessário (Figura 1A). Por outro lado, metais não-essenciais, como cádmio, chumbo e mercúrio não desempenham nenhuma função biológica e tornam-se tóxicos logo após atingirem um limite de concentração (NIKINMAA, 2014) (Figura 1B). Uma vez internalizado, mecanismos homeostáticos são responsáveis por regular o armazenamento e detoxificação dos metais, por exemplo, através de metalotioneínas, que são proteínas de complexação, do tripeptídeo glutationa, bem como pelo seu transporte por todo o corpo via circulação (HOGSTRAND, 2012).

Figura 1 - Influência da quantidade de metais na sobrevivência dos organismos.



(A) Metal essencial: inicialmente, a sobrevivência aumenta com o aumento da quantidade de metal até atingir um limite máximo. A partir daí qualquer aumento na concentração do metal torna-se tóxica.
 (B) Metal não-essencial: como os organismos não necessitam deste metal, um aumento em sua concentração não afeta o animal de início, entretanto, ele passa a ser tóxico quando a sobrevivência fica comprometida e diminui.

Fonte: Adaptado de Nikinmaa, 2014.

A biodisponibilidade de um metal, ou seja, o quanto deste elemento está disponível para absorção antes de causar algum efeito (NEWMAN e CLEMENTES, 2008), varia entre as espécies biológicas, os metais e a sua especiação, de modo que os organismos aquáticos podem absorver os metais via epitélio branquial, superfície corporal e via alimentação (BJERREGAARD e ANDERSEN, 2007). As propriedades físicas e químicas de um local, como temperatura, oxigênio, pH, dureza e matéria orgânica influenciarão na especiação e solubilidade dos metais. De modo geral, os íons metálicos livres constituem os elementos mais biodisponíveis e, portanto, mais tóxicos (HOGSTRAND, 2012).

Por não sofrerem degradação, os metais permanecem no ecossistema e ficam continuamente disponíveis para a biota (HOGSTRAND, 2012), causando intoxicações e bioacumulação. A bioacumulação é a quantidade de metal resultante após o mesmo passar por processos de captação, translocação ou eliminação no organismo (NEWMAN e CLEMENTES, 2008). Nessa perspectiva, a concentração de um metal pode aumentar conforme sua transferência de um nível trófico a outro, fenômeno conhecido como biomagnificação, podendo atingir predadores de topo de cadeia que são os mais vulneráveis de apresentar efeitos tóxicos (HARE, 2013).

2.2.1 ZINCO

Em meio aos diversos metais essenciais conhecidos, o Zinco (Zn) constitui parte inerente do meio ambiente, estando presente em rochas, solos, ar e água, além das plantas, animais e outros organismos. Naturalmente, os níveis de Zn no solo e rochas variam entre 10 e 300 mg kg⁻¹, e nos rios esse valor cai para menos de 10 µg L⁻¹ até mais de 200 µg L⁻¹ (IZA, 2017). Como segundo mais abundante elemento traço para muitos vertebrados, o Zn é essencial para o funcionamento das células de todos os organismos. Participa de vários processos biológicos como metabolismo de macromoléculas, sistema imune, neurotransmissão e vias de sinalização celular (HOGSTRAND, 2012).

O uso antropogênico do Zn data de muito antes deste ser descoberto em sua forma metálica, e sua utilização por romanos e gregos se dava para fabricação de latão e compostos com fins medicinais. Alguns autores acreditam que a Índia foi o primeiro país a desenvolver fundição a partir de Zn, enquanto outros conferem este

título à China. Independente do país, o fato é que o Zn passou a ser melhor explorado muito mais tardiamente em relação a outros metais como cobre e ferro. Na Europa, a fundição de Zn iniciou-se por volta do século XVIII, chegando aos Estados Unidos em meados da década de 1850 (IZA, 2017).

Atualmente, devido a suas características físicas e químicas, como facilidade de oxidação, maleabilidade, baixo ponto de fusão (419 °C) e fácil combinação com outros metais (MME, 2009), o Zn é amplamente utilizado na indústria, integrando a forma mais eficiente de proteção do aço contra a corrosão (galvanização). Neste sentido, o uso deste metal poupa recursos naturais, prolonga a vida dos materiais e seus produtos. Além de compor os processos de galvanização, o Zn também é utilizado na fundição, materiais de construção, latão, produtos farmacêuticos e cosméticos (ICZ, 2017).

Dados da indústria apontam que os setores de mineração, fundição e refinamento do Zn contribuem com US\$ 18,5 bilhões para a economia do mundo, enquanto que a galvanização colabora com US\$ 7,5 bilhões todo ano (ICZ, 2017). Países do mundo todo participam da extração de Zn, de modo que China, Austrália, Peru, Índia e México constituem os maiores produtores, respondendo por 68,9% de toda a produção mundial (DNPM, 2015). No Brasil, segundo informações do Ministério de Minas e Energia (2009), o consumo deste metal girou em torno de 240.000 toneladas ano⁻¹. Projeções indicam que até 2030 esse número poderá aumentar para 380.000 toneladas ano⁻¹. Assim, o consumo de Zn neste mesmo ano será capaz de atingir 4,12 kg habitante⁻¹ ano⁻¹, valor correspondente ao que é inferido para os Estados Unidos atualmente.

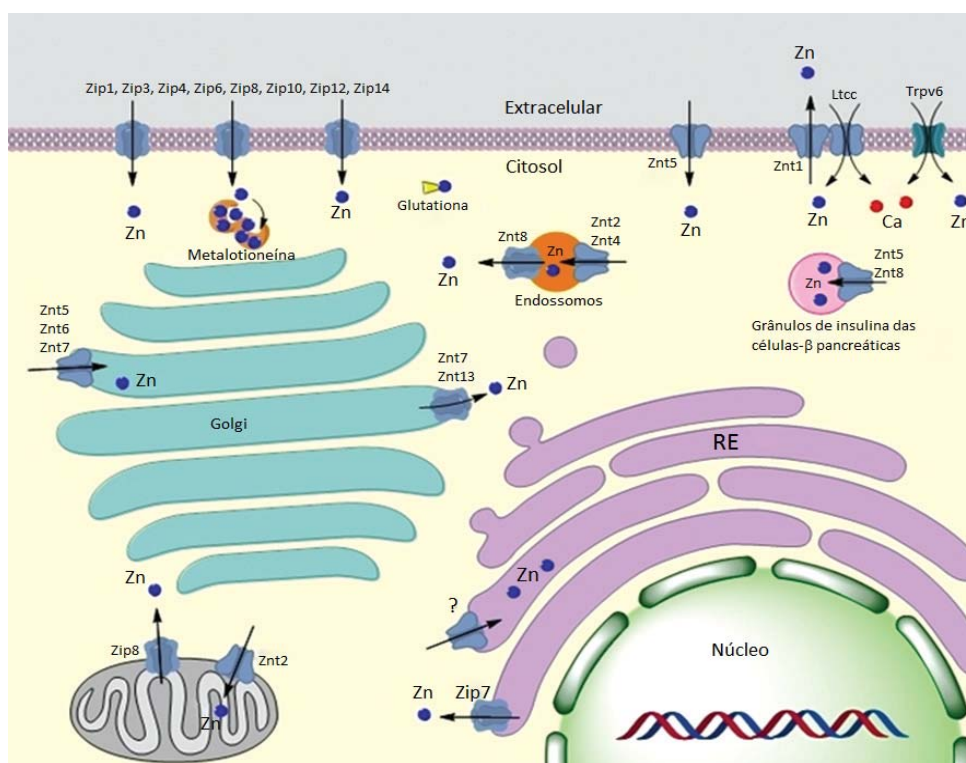
Estudos mostram que as concentrações totais de Zn na água doce vão desde 0,02 µg L⁻¹ em rios isolados para mais de 1 mg L⁻¹ em locais próximos a mineração, galvanoplastia e outras atividades industriais. Na maioria das áreas de águas doces, entretanto, sua concentração raramente excede 50 µg L⁻¹ (HOGSTRAND, 2012). Em suma, fontes difusas vinculadas às atividades antrópicas diárias levam ao aumento das concentrações de Zn nos ecossistemas aquáticos em áreas que são densamente populosas.

Geralmente, a maior parte do Zn existente na água está sob a forma iônica Zn²⁺, que se configura também como a forma mais passível de ser absorvida pelos

organismos e, portanto, mais tóxica (HOGSTRAND, 2012). As brânquias constituem a principal via para a captação de Zn em peixes dulcícolas, e poucas quantidades são captadas via trato gastrointestinal, que é responsável pela maior absorção em peixes marinhos (NIKINMAA, 2014).

Nesta perspectiva, em vários tecidos o movimento de Zn via celular ocorre principalmente por duas famílias de transportadores: Znt (Slc30) e Zip (Slc39) (Figura 2). A família Znt foi a primeira a ser descoberta e sua especificidade se dá pelo transporte de Zn para fora da célula, com exceção da isoforma Znt5 que promove o influxo, e entre os compartimentos celulares. Por outro lado, a família Zip impulsiona a entrada de Zn na célula em condições fisiológicas normais, e cada isoforma age de modo específico em cada tecido (ZHENG et al., 2014). É importante considerar que a isoforma Zip3 é a responsável por transportar Zn^{2+} . Perante uma exposição com excesso de Zn, os transportadores apicais deixam de ser expressos para barrar o influxo do metal e os transportadores basolaterais, como Znt1, é superexpresso a fim de remover o Zn das células, protegendo os compartimentos contra toxicidade (HOGSTRAND, 2012). Embora os diferentes transportadores exerçam a mesma função molecular, seu papel biológico é diverso e se associa conforme sua distribuição específica entre os tecidos e organelas (ZHENG et al., 2014).

Figura 2 - Transportadores celulares de Zn.



O Zn pode entrar nas células por vários transportadores, que incluem aqueles das famílias de proteínas Znt e Zip. Além disso, também compete com Ca^{2+} pelos canais epiteliais de Ca^{2+} (Ltc, Trpv6). No citosol, o Zn é estocado por moléculas como metalotioneínas e glutatona, e movido para locais de armazenamento, incluindo retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi e endossomos. Os transportadores de Zn apresentam vários graus de especificidade tecidual.

Fonte: Adaptado de Hogstrand, 2012.

Além das famílias de transportadores Znt e Zip, o Zn também pode adentrar nas células por outros canais, como pela competição com o Ca^{2+} pelos sítios de ligação dos canais epiteliais (ECaC) presentes na membrana apical das células branquiais. Quando as concentrações de Zn na água estão altas, acredita-se que os canais ECaC captem Zn, entretanto não é possível afirmar se a expressão destes canais é regulada pelas concentrações de Zn (ZHENG et al., 2014).

A detoxificação do Zn envolve a formação de um complexo com compostos contendo grupo sulfidril (-SH). Neste contexto, se encaixam as metalotioneínas (MTs), proteínas ricas em resíduos de cisteína que se complexam com metais, impedindo-os de circular pelo organismo, reduzindo seus efeitos deletérios (VIARENGO et al., 2001). O Zn constitui um dos poucos metais fortemente indutores da produção de MTs (VIARENGO et al., 2001), e age se ligando aos fatores de

transcrição permitindo que estes, por sua vez, se liguem aos elementos de resposta nas regiões promotoras do gene. Esta ligação promove a transcrição do gene que codifica as MTs para que elas possam garantir uma disponibilidade adequada de Zn para as células, de forma que o metal seja liberado quando necessário para a síntese enzimática (NIKINMAA, 2014).

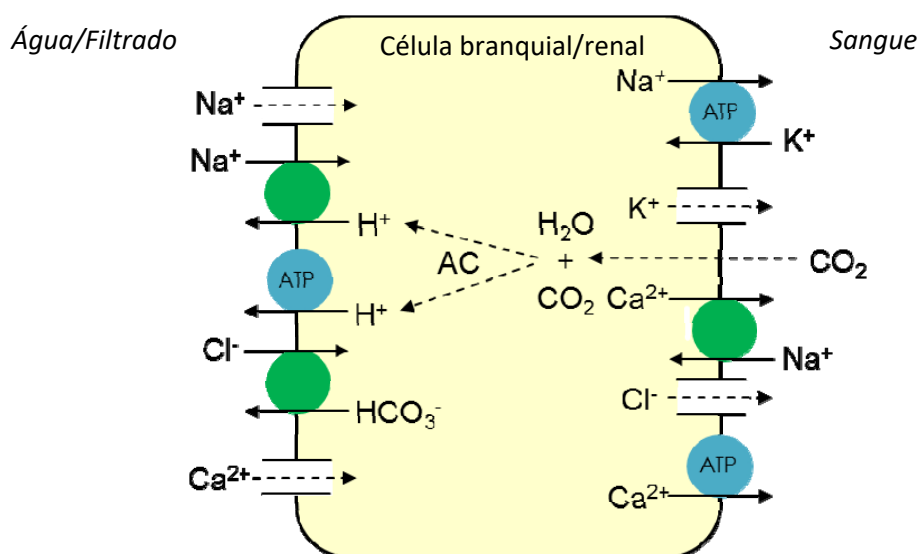
Pouco se sabe sobre as rotas de excreção relacionadas ao Zn, mas acredita-se que as brânquias sejam o principal órgão responsável pela eliminação deste metal. Além disso, o Zn excretado na urina dos peixes chega a representar menos de 1% do total de Zn perdido pelo corpo. O Zn presente nas brânquias, fígado e rim é eliminado rapidamente, enquanto que no restante do corpo esta perda é lenta, podendo chegar a 200 dias (HOGSTRAND, 2012). Apesar destes dados, os mecanismos associados a este processo ainda são desconhecidos.

2.3 OSMORREGULAÇÃO

Teleósteos de água doce possuem concentração osmótica interna maior do que a do ambiente em que vivem. Desta forma, tendem a perder íons por difusão e ganhar água por osmose via brânquias. Entretanto, para contrabalancear essa perda, os animais captam íons ativamente através de células branquiais especializadas. Estas células possuem grande quantidade de mitocôndria a fim de suprir a necessidade energética que esta captação exige, por isto receberam o nome de células ricas em mitocôndrias (CRM). O excesso de água adquirido por osmose é eliminado pela produção substancial de urina pelo rim posterior, além do que, este órgão também ajuda na reabsorção iônica (EVANS et al., 2005).

As CRM possuem diferentes transportadores tanto na membrana apical quanto na basolateral (HIROSE et al., 2003) (Figura 3). O transportador mais abundante é a bomba Na^+/K^+ -ATPase (NKA), presente na membrana basolateral, que carrega três íons sódio (Na^+) de dentro da célula para o plasma e dois íons (K^+) do plasma para o interior celular contra seus gradientes de concentração (HWANG e LEE, 2007). Este movimento auxilia tanto no carregamento da membrana, quanto na mobilização dos íons Na^+ que entraram na célula passivamente pela membrana apical (BRADLEY, 2009).

Figura 3 - Modelo simplificado que ilustra os principais transportadores presentes na CRM das brânquias e célula tubular renal dos teleosteos de água doce.



Os círculos preenchidos com cinza são transportadores que necessitam de ATP. Os círculos preenchidos em laranja são trocadores. Os retângulos em branco correspondem aos canais.

Fonte: Adaptado de Marshall, 2002.

O K^+ é absorvido primariamente via alimentação e sua concentração dentro da célula é maior quando comparada ao meio extracelular (MARTINEZ e SOUZA, 2002). Na membrana basolateral das células existem canais de K^+ que permitem a saída deste íon da célula em direção ao plasma (EVANS, 2008). Estes canais, juntamente com a ação da NKA, mantem estáveis as concentrações intracelulares de K^+ .

A absorção dos íons cloreto (Cl^-) a partir do ambiente acontece via trocador aniônico $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ localizado na membrana apical. O movimento de Cl^- do citoplasma para o meio extracelular ocorre passivamente através de um canal de Cl^- , que é mantido por um gradiente elétrico. A energia que impulsiona essa saída vem do potencial elétrico de membrana criado pela NKA (BRADLEY, 2009). O bicarbonato (HCO_3^-) utilizado na troca com o Cl^- é originado a partir da hidratação do CO_2 pela ação da enzima anidrase carbônica (AC). A AC participa do balanço ácido-base e sua localização pode variar entre os organismos, mas basicamente ela encontra-se aderida a membrana plasmática ou a organelas, bem como está presente no citosol (GILMOUR e PERRY, 2009). Ela catalisa a reação reversível de

hidratação/desidratação do CO_2 , proveniente da respiração, formando ácido carbônico (H_2CO_3), que rapidamente se dissocia em HCO_3^- e H^+ por ser um ácido de baixa estabilidade. Ademais, a AC colabora com a osmorregulação pois seus dois produtos, H^+ e HCO_3^- , participam do contratransporte de Na^+ e Cl^- , respectivamente (GILMOUR e PERRY, 2009). Neste contexto, qualquer perturbação na atividade desta enzima pode levar a prejuízos no equilíbrio ácido-base e ocasionar alterações nas concentrações de Na^+ e Cl^- plasmáticos.

O H^+ formado também atua na regulação do equilíbrio ácido-base. Em teleósteos de água doce este íon é eliminado por uma bomba de prótons conhecida como H^+ -ATPase (HATP). Esta bomba concentra-se primariamente em tipos celulares que contêm grande quantidade de NKA, pois a extrusão de prótons promove um gradiente elétrico favorável à entrada de Na^+ na membrana apical (EVANS, 2008). A acidificação do meio externo criada pela ação da HATP é equilibrada pela saída de HCO_3^- , formando novamente água e CO_2 (BRADLEY, 2009).

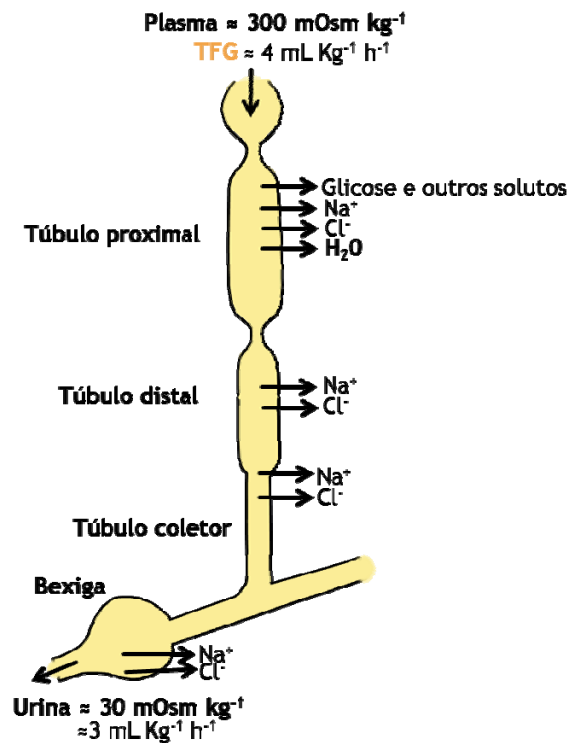
Na contramão do que acontece com vertebrados de respiração aérea que obtêm cálcio (Ca^{2+}) da dieta, os peixes precisam absorvê-lo a partir do ambiente. Na membrana basolateral das células branquiais existe uma Ca^{2+} -ATPase (CaATP) e também um trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que enviam Ca^{2+} para o meio extracelular (PERRY et al., 2003). A ação destes dois transportadores cria um gradiente eletroquímico favorável para a entrada passiva de Ca^{2+} via canais epiteliais de Ca^{2+} (ECaC) presentes membrana apical (ZHENG et al., 2014).

Outro íon divalente presente no meio interno dos teleósteos de água doce é o magnésio (Mg^{2+}). A quantidade de magnésio (Mg^{2+}) presente nos fluidos destes animais é pequena (0,1 ~ 0,3 mM) (HOLMES e DONALDSON, 1969; FLIK et al., 1993), e sua absorção se dá, principalmente, pela alimentação (FLIK et al., 1993). Acredita-se que a concentração intracelular de Mg^{2+} seja maior que a do plasma, assim como acontece com o K^+ (HOLMES e DONALDSON, 1969). O fato de alguns estudos medirem a atividade de uma ATPase relacionada ao movimento deste íon na brânquia (Mg^{2+} -ATPase) não deixa claro como sua absorção realmente ocorre e nem como estes mecanismos são regulados (BIJVELDS et al., 1998; MARSHALL, 2002). Há poucos estudos acerca da função e regulação do íon Mg^{2+} em teleósteos de água doce. Contudo, estudos sugerem que este íon seja importante como co-

fator da enzima NKA, possibilitando a ligação da molécula de ATP ao seu sítio ativo. Qualquer alteração na concentração ou mesmo na ligação do Mg^{2+} à NKA implica, conseqüentemente, em alteração na enzima (FISCHER e GIROUX, 1987), podendo levar à mudanças nas concentrações de Na^+ e K^+ .

Muitas janelas permeiam os processos relacionados ao transporte de íons pelas brânquias (EVANS, 2008). Por esta razão, a caracterização funcional dos transportadores envolvidos na osmorregulação e as vias de transporte específicas de cada íon podem ajudar no estabelecimento de modelos para as diferentes espécies e arquitetar um padrão geral e abrangente para os mecanismos iônicos das células branquiais (HWANG et al., 2011).

Figura 4 - Esquema de um néfron de teleósteo de água doce ilustrando a reabsorção iônica e de solutos, principalmente pelo túbulo proximal, e a produção de grande quantidade de urina.



Fonte: Adaptado de Evans e Claiborne, 2005.

O rim posterior, assim como as brânquias, exerce importante papel na osmorregulação e equilíbrio ácido-base dos teleósteos. Entretanto, a regulação de base (HCO_3^-) é a principal função do rim, ficando a cargo das brânquias equilibrar as

quantidades de ácido (H^+) (PERRY et al., 2003; GILMOUR e PERRY, 2009). Os mecanismos acima descritos para as células branquiais podem ser aplicados para as células renais, com a intenção de produzir urina diluída em grandes volumes (Figura 4). O fato de o rim reabsorver íons do filtrado relaciona-se com a quantidade de energia utilizada para este movimento, pois é mais caro para o organismo absorver íons ativamente pelas células branquiais, já que o gradiente eletroquímico em relação à água é bem maior, do que pelas células renais (HIROSE et al., 2003).

2.4 ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

Pesquisadores do mundo todo estão preocupados com a qualidade da água, um recurso que não é renovável e que tem suas reservas sendo diminuídas por constituir alvo de contaminantes provenientes das atividades humanas (NETO e FERREIRA, 2007), também conhecidas como xenobióticos. A compreensão acerca dos efeitos adversos destes compostos tanto no ambiente quando na biota é o objetivo da Ecotoxicologia, uma ciência que funciona como uma ferramenta de monitoramento ambiental, abrangendo efeitos deletérios de contaminantes desde pequenas escalas, como moléculas, até níveis de organização biológica maiores, como ecossistemas (NEWMAN e CLEMENTS, 2008).

A utilização de ensaios ecotoxicológicos para avaliar o meio ambiente apresenta grande relevância, pois investiga a biodisponibilidade e a interação dos efeitos dos xenobióticos que não são mensuradas pelos parâmetros físicos e químicos. Vale ressaltar que os testes de toxicidade não substituem as análises tradicionais (MAGALHÃES e FILHO, 2008), assim, devem ser realizadas em conjunto. Além disso, estressores ambientais abióticos como temperatura, salinidade, quantidade de nutrientes, e bióticos como espécies invasoras, predação e doenças, podem causar efeitos biológicos que são facilmente confundidos como um resultado da ação do contaminante. Desta forma, os testes de toxicidade com condições laboratoriais controladas constituem a melhor estratégia para avaliar corretamente a capacidade de um contaminante em produzir alterações nos organismos vivos (MARTINS e BIANCHINI, 2011).

Os testes de toxicidade podem ser classificados tanto como agudos quanto como crônicos. Os testes agudos são usados para determinar os efeitos tóxicos de

contaminantes em organismos aquáticos expostos por um curto período de tempo, e procuram estimar a concentração de um contaminante na qual ele é capaz de provocar respostas específicas e mensuráveis, por um período que vai de 24 a 96 horas. Geralmente, o efeito medido é a letalidade ou alguma resposta que a antecede. Por outro lado, os testes crônicos medem os efeitos de contaminantes sobre os organismos por longos períodos, podendo coincidir com o ciclo de vida do animal. Estes testes avaliam os efeitos tóxicos sobre reprodução, desenvolvimento embrionário e crescimento, por exemplo (OLIVI et al., 2008).

Ademais, os testes de toxicidade recebem classificação quanto ao modo de adição dos contaminantes testados. São chamados estáticos quando não há renovação das soluções-teste, semi-estáticos quando as soluções-teste são renovadas periodicamente, e, por fim, há o modo dinâmico, em que as soluções são constantemente renovadas (OLIVI et al., 2008).

Assim, os testes de toxicidade geram resultados que podem auxiliar as agências reguladoras a padronizarem concentrações máximas permitidas para vários compostos, tendo como base seus efeitos em espécies de grande importância ecológica para uma determinada região (MARTINS e BIANCHINI, 2011).

2.5 BIOMARCADORES

Quando expostos a um contaminante, os organismos podem apresentar alterações biológicas, denominadas biomarcadores. Os biomarcadores podem incluir desde respostas em níveis bioquímicos, moleculares e celulares, quanto nos fluidos corpóreos, tecidos, órgãos, indicando então a exposição a um xenobiótico ou efeito deste no organismo (LAM, 2009), de modo que esta alteração não seria detectada no organismo intacto.

Uma das características mais importantes dos biomarcadores de níveis biológicos mais baixos como moléculas e células é a antecipação de mudanças que possam ocorrer em níveis mais elevados, ou seja, população, comunidade ou ecossistema (MONSERRAT et al., 2003). Este aviso antecipado, indicando efeitos subletais, detectado pelos biomarcadores é uma ferramenta utilizada como método preventivo, permitindo que estratégias de remediação sejam adotadas antes que

ocorram impactos ambientais e ecológicos irreversíveis (CAJARAVILLE et al., 2000; NIKINMAA, 2014).

2.5.1 Biomarcadores Fisiológicos

Desde a década de 1970, a Ecotoxicologia Aquática utiliza cada vez mais respostas fisiológicas em seus estudos, tanto com o objetivo de entender porque um organismo se encontra fisiologicamente estressado, quanto para compreender os muitos efeitos subletais que são observados antes de uma provável morte do organismo. Segundo Widdows (1985), as respostas fisiológicas têm três atributos importantes para proporcionar a avaliação da condição de um indivíduo: 1) representam uma integração dos processos celulares e bioquímicos que alteram sua resposta frente às mudanças no ambiente; 2) representam respostas não específicas, mas que são complementares àquelas específicas dos níveis bioquímicos, e 3) são capazes de refletir a deterioração presente no ambiente antes desta atingir níveis de organização maiores, como em populações e comunidades (NEWTON e COPE, 2007).

Hoje em dia, os biomarcadores fisiológicos são utilizados para registrar os efeitos dos poluentes nos organismos, seja pela exposição a metais (LAVANYA et al., 2011; SILVA e MARTINEZ, 2014), agrotóxicos (CEYHUN et al., 2010; LANGIANO e MARTINEZ, 2008) ou outros compostos (NAVARRO e MARTINEZ, 2014).

2.5.1.1 Parâmetros hematológicos

O tecido lamelar branquial é a única barreira entre o sangue que circula pelas brânquias e a água, e qualquer alteração nesta barreira pode refletir em variações no sistema circulatório do animal (ADHIKARI et al., 2004). Neste sentido, a exposição de organismos a poluentes pode induzir mudanças em algumas das variáveis hematológicas, como concentração de hemoglobina (Hb), hematócrito (Hcto) e número de eritrócitos (RBC), sendo estas frequentemente utilizadas para a avaliação da capacidade de transporte de oxigênio na corrente sanguínea (NAVARRO e MARTINEZ, 2014) e agravamento do estado de saúde do organismo

com desenvolvimento de anemia em decorrência da diminuição do RBC ou do Hcto e a redução da concentração de Hb, por exemplo. É importante ressaltar que essas mudanças dependem de inúmeros fatores como a espécie estudada, idade, maturidade sexual e doenças (VOSYLIENÉ, 1999).

Um trabalho realizado com carpa comum (*Cyprinus carpio*) expôs os indivíduos a 20 mg L⁻¹ de Zn por 3 horas e apenas o Hcto apresentou aumento significativo (WITESKA e KOSCIUK, 2003). Quando as espécies de bagre-africano (*Clarias lazera*) e tilápia (*Tilapia zilli*) foram expostos a 22 mg L⁻¹ e 32 mg L⁻¹ de zinco por 96 horas, o Hcto e a concentração de Hb aumentaram. Neste trabalhos, a exposição aguda possivelmente induziu ao aumento destes índices, refletindo uma possível resposta de estresse frente a um contaminante. Estas respostas de estresse podem acarretar alterações osmóticas e mudanças no sistema de regulação iônica com conseqüente redução do pH sanguíneo e levar ao aumento do volume dos eritrócitos, além de secretar mais epinefrina, que leva a contração do baço e resulta na liberação de eritrócitos no sangue, aumentando então o Hcto (VOSYLIENÉ, 1999).

2.5.1.2 Parâmetros osmorregulatórios

Os parâmetros osmorregulatórios estão entre os mais utilizados quando se busca entender a fisiologia de um organismo aquático e são considerados importantes uma vez que a manutenção das condições osmóticas e iônicas intra e extracelulares é fundamental para o funcionamento normal das células (LIMA et al., 2009).

Os sistemas de transporte de íons presentes em todas as células incluem uma série de vias, entre elas, canais, trocadores e ATPases. Como demonstrado anteriormente, uma das ATPases mais importantes para o metabolismo de uma célula é a Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), que tem relevante papel na tomada de íons, uma vez que está relacionada diretamente à manutenção intracelular dos íons sódio e potássio e indiretamente na geração de potencial eletroquímico para a absorção de sódio e cloreto (GONZALEZ et al., 2006; HWANG et al., 2011).

Dados da literatura apontam a capacidade que alguns contaminantes possuem de interferir na atividade da enzima NKA (SUVETHA et al., 2010; ATLI e CANLI, 2011; ROCHA, 2012; TELLIS et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014; SILVA e MARTINEZ, 2014; ATLI et al., 2016; KAYA et al., 2016), promovendo alterações no processo de osmorregulação e nas concentrações iônicas dos organismos aquáticos. A AC (KAYA, 2015), uma enzima fundamental para o equilíbrio ácido-base, pois catalisa as reações de conversão do dióxido de carbono em bicarbonato e vice-versa, controlando o pH fisiológico e o balanço de gases, também pode apresentar alterações frente as exposições por contaminantes (CEYHUN et al., 2011). Segundo Zheng et al. (2014) as enzimas Ca^{2+} e Mg^{2+} -ATPase podem também responder negativamente quando são expostas a contaminantes metálicos. As alterações que ocorrem nestas enzimas podem afetar a concentração de íons plasmáticos, como sódio, potássio, cloreto, cálcio e magnésio, contribuindo para um desequilíbrio na homeostase de todo o organismo. Assim, a análise conjunta de todos estes parâmetros indica possíveis desvios no processo de hiperregulação dos animais de água doce quando expostos a substâncias potencialmente poluidoras.

2.6 MODELO EXPERIMENTAL

Por muito tempo, a avaliação da qualidade dos recursos hídricos se baseou na medida de parâmetros físicos e químicos da água, mas a preocupação e necessidade de detectar e avaliar os impactos sofridos pela biota em ambientes aquáticos contaminados se tornou crescente. Desta maneira, a Resolução CONAMA nº 357/2005 passou a estabelecer a utilização de indicadores biológicos, seja através de organismos e/ou comunidades aquáticas para avaliar a qualidade dos ambientes aquáticos.

Assim, um indicador biológico ou bioindicador é caracterizado como um organismo que fornece informações sobre as condições ambientais por sua presença ou ausência, por seu comportamento (VAN DER OOST et al., 2003). O termo biomonitor é expresso sob situações em que funções vitais e composição química dos organismos são alteradas frente a um contaminante (TOTTI et al., 2007), sendo, portanto, a definição utilizada para o modelo biológico deste trabalho.

Os peixes são animais sensíveis ao aumento na concentração de metais na água, pois combinam efeitos de condições bióticas e abióticas do ambiente (DRAGUN et al., 2009), além de terem ampla distribuição geográfica e habitarem diversos ambientes. Por estas razões, são considerados ótimos modelos biológicos. Em acréscimo, a espécie que será submetida a ensaios de toxicidade necessita que conhecimentos básicos de sua biologia e fisiologia sejam conhecidos para que haja controle de algumas variáveis, como crescimento, desenvolvimento, reprodução e alimentação (MARTINEZ, 2006).

2.6.1 *Prochilodus lineatus*

No Brasil, poucas espécies são utilizadas nos testes de toxicidade, e diversos ensaios fazem uso de espécies exóticas para se determinar os efeitos de um contaminante. Desta maneira, é preciso substituir o uso de espécies exóticas por espécies nativas, especialmente aquelas dulcícolas, já que nosso país possui a maior biodiversidade de peixes de água doce do mundo (MARTINS e BIANCHINI, 2011). Os diversos padrões de efeitos e respostas obtidos para uma determinada espécie não refletem o que pode acontecer em outras devido às diferenças fisiológicas e condições ambientais em que cada uma está inserida (ATLI e CANLI, 2008). Então, pesquisas ecotoxicológicas referentes à ictiofauna neotropical passam a ter destaque no contexto atual.

Uma espécie de teleósteo de água doce neotropical é o *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), pertencente à família Prochilodontidae e popularmente conhecido como curimba ou curimbatá no Brasil (Figura 4). É um peixe amplamente utilizado na alimentação humana, compreende um tamanho que vai de 30 a 45 cm de comprimento e um peso que varia entre 600 a 1200 g, podendo atingir 6 kg. Caracteriza-se como espécie de grande porte e alta fecundidade (MARTINEZ e CÓLUS, 2002). Seu comportamento migratório visando a reprodução que pode cobrir longas distâncias aliado ao seu hábito alimentar detritívoro (SHIBATTA et al., 2007), o tornam suscetível a ação de contaminantes (SPERANZA et al., 2012). Esta espécie pode ser encontrada nas bacias Paraíba do Sul, Paraná e Paraguai, além de ser uma das espécies de maior ocorrência na bacia do Rio Tibagi (SHIBATTA et al., 2007).

Figura 5 - Foto de um exemplar da espécie de teleósteo dulcícola *Prochilodus lineatus* utilizado neste trabalho.



Fonte: LEFA-UEL.

P. lineatus já apresentou alterações fisiológicas, bioquímicas e até mesmo genéticas quando exposto a diversas concentrações de contaminantes inorgânicos, como alumínio (CAMARGO et al., 2009), chumbo (RIBEIRO et al., 2014) e níquel (PALERMO et al., 2015). Portanto, considerando-se sua importância tanto ecológica quanto econômica, e sua abundância no ambiente neotropical, é considerada uma espécie adequada para ensaios toxicológicos.

3 JUSTIFICATIVA

O zinco, mesmo sendo classificado como um elemento essencial, pode apresentar toxicidade aos organismos aquáticos quando presente nos corpos d'água em concentrações acima do necessário. Desta forma, pode afetar negativamente a fisiologia dos animais e levar a alterações na osmorregulação, um mecanismo altamente coordenado e responsável pela homeostase dos animais frente às variações ambientais. Assim, este trabalho buscou mapear o padrão de acúmulo do zinco em diferentes tecidos de *P. lineatus* sob exposições agudas e subcrônicas, bem como entender como as funções osmorregulatórias se comportam na presença do metal.

4 HIPÓTESE

As concentrações de Zn determinadas pelas diretrizes brasileiras, a CONAMA 357/2005, para águas doces serão capazes de levar ao acúmulo do metal nos tecidos de *P. lineatus*, bem como de promover alterações em parâmetros fisiológicos do animal, mostrando-se inadequadas para a espécie.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a dinâmica de acúmulo do Zinco e verificar se o metal, em concentrações previstas na Resolução CONAMA 357/2005, promove alterações hematológicas, metabólicas e osmorregulatórias no peixe neotropical *P. lineatus* em diferentes tempos experimentais.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o acúmulo de Zn em sangue, brânquias, fígado e rim de juvenis de *P. lineatus* expostos ao metal (0,2 e 2,0 mg Zn L⁻¹) durante 24, 96 e 168 h;
 - Verificar se ocorrem alterações nos parâmetros hematológicos (hematócrito, hemoglobina e número de eritrócitos) de *P. lineatus* após as exposições ao Zn;
 - Avaliar se o metal, nas concentrações e tempos testados, influencia a glicemia e a quantidade de glicogênio armazenado no fígado do animal;
1. Averiguar se o Zn promove alterações na atividade branquial e renal das enzimas transportadoras de íons (Na⁺/K⁺-ATPase, H⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase e AC) e nas concentrações plasmáticas de íons (Cl, Na, K, Ca e Mg) de *P. lineatus* após as exposições ao Zn.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 ANIMAIS

Para este trabalho, exemplares juvenis de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) (Valenciennes, 1836) foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL) (n=96) e Piscicultura Acqua Norte (Cambará-PR) (n=48) e transportados em sacos plásticos para o laboratório de bioensaios, medindo (média \pm DP) 12,69 \pm 0,68 cm de comprimento total e pesando 23,15 \pm 3,28 g. No laboratório de bioensaios passaram por um período de aclimação de 6 dias em tanques de 300 L contendo água desclorada e aeração constante, com fotoperíodo de 12 h de claro e 12 h de escuro. A alimentação dos animais ocorreu a cada 48 h com ração comercial (Pirá Mirim QS 1,7 mm, Guabi), sendo suspensa 24 h antes da montagem dos experimentos. Os parâmetros físicos e químicos da água (média \pm DP) foram monitorados continuamente com o auxílio de um medidor multiparâmetro (Horiba, U-50), cujos valores são: temperatura 22,96 \pm 0,28 °C; pH 8,21 \pm 0,52; condutividade 165 μ s cm⁻¹; oxigênio dissolvido 7,55 mg O₂ L⁻¹; TSD 0,107 g L⁻¹.

6.2 DEFINIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ZN TESTADAS

Os testes de toxicidade foram realizados com duas concentrações de Zn calculadas a partir do sal sulfato de zinco (ZnSO₄) de peso molecular igual a 161,4. As concentrações foram baseadas nos limites estabelecidos pela Resolução CONAMA 357/2005. A primeira concentração foi 0,2 mg L⁻¹ de Zn, próxima a 0,18 mg L⁻¹, estabelecida pela resolução como concentração máxima permitida para águas doces de classe 1 e 2, que são águas destinadas ao “abastecimento para consumo humano, à proteção das comunidades aquáticas, incluindo aquelas de áreas indígenas, à recreação, à irrigação, à aquicultura e atividade de pesca” (CONAMA 357/2005). A segunda concentração foi 2,0 mg L⁻¹ de Zn, definida como uma concentração intermediária entre o limite estabelecido para águas doces de classe 1 e 2 e águas doces de 3 e 4 (5,0 mg L⁻¹), que são destinadas também ao “abastecimento humano após tratamento avançado, à irrigação, à pesca amadora, à recreação, à dessedentação de animais, à navegação e harmonia paisagística”

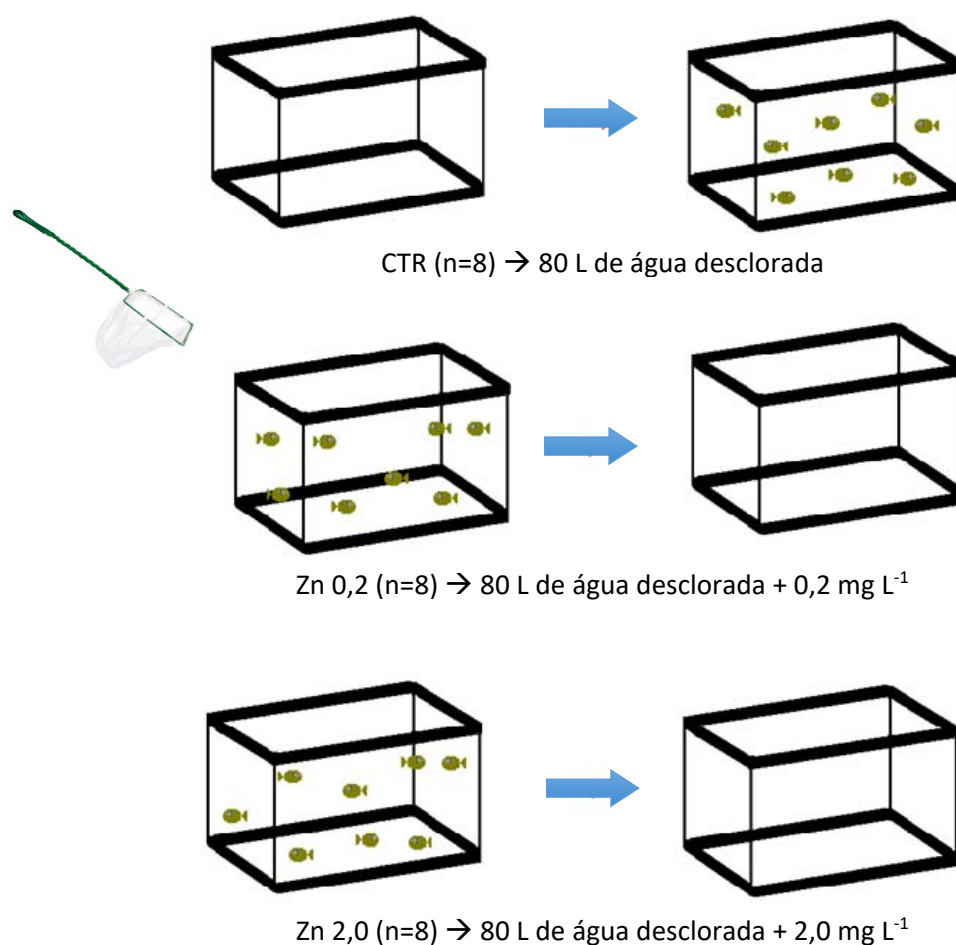
(CONAMA 357/2005). A concentração de 5,0 mg L⁻¹ não foi testada, pois em experimentos anteriores realizados no laboratório observou-se mortalidade dos animais após 24 h de exposição. Ambas as concentrações definidas foram testadas nos tempos de 24, 96 e 168 h.

6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após o período de aclimação, os exemplares de *P. lineatus* foram submetidos a testes de toxicidade aguda (24 e 96 h) e subcrônica (168 h) do tipo semiestático, ou seja, com renovação completa do meio a cada 24 h. Os testes foram realizados em aquários (100 L) contendo 80 L de água desclorada ou água com Zn nas concentrações pré-determinadas. Foram formados três grupos com oito animais em cada: controle (CTR) – contendo apenas água desclorada; Zn 0,2 – contendo água desclorada e Zn na concentração de 0,2 mg L⁻¹; e Zn 2,0 – contendo água desclorada e Zn na concentração de 2,0 mg L⁻¹. Para cada grupo experimental foi feita uma réplica. Os experimentos foram realizados de maneira independente, de modo que em cada tempo testado havia um grupo CTR para seus respectivos grupos experimentais.

Nos experimentos de 96 e 168 h, a cada intervalo de 24 h, os peixes eram transferidos para outro aquário previamente preenchido com o meio de exposição (CTR, Zn 0,2 e Zn 2,0), dessa forma o meio de exposição era totalmente renovado (Figura 5). Durante a transferência, com auxílio de redes, o animal era manuseado o mínimo possível para evitar interferências devido ao estresse de manuseio. Os animais expostos ao Zn durante 168 h foram alimentados com ração comercial a cada 48 h, sendo que este alimento era ofertado 1 h antes da renovação.

Figura 6 - Esquema ilustrativo da renovação dos meios de exposição dos experimentos de 96 e 168 h, em que as renovações ocorreram a cada 24 h.



Fonte: Autora

6.4 AMOSTRAGEM

Após cada exposição, os animais foram retirados dos aquários e anestesiados em benzocaína (0,1 g L⁻¹) para tomada das medidas biométricas. O sangue foi retirado da veia caudal utilizando seringa heparinizada (Hepamax-S). Os peixes foram mortos por secção medular para remoção dos órgãos (brânquia, fígado e rim posterior), que foram armazenados em tubos plásticos, mantidos em gelo no período amostral e acondicionados em ultrafreezer (-70 °C) ao final dos experimentos, até o momento das análises. Logo após a amostragem, o sangue foi utilizado para as análises hematológicas, e em seguida foi centrifugado (1870 g, 15 min) (MCD2000, Hsiangtai) e o plasma, separado e armazenado em freezer (-20 °C) para as demais análises.

Todo o protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (Processo CEUA nº 20408.2013.94).

6.5 ANÁLISES QUÍMICAS E FÍSICAS DA ÁGUA

Diariamente, durante as exposições, temperatura, pH, condutividade, oxigênio dissolvido (OD) e total de sólidos dissolvidos (TSD) foram monitorados por um medidor multiparâmetro (Horiba, U-50). A dureza foi determinada através de um método colorimétrico utilizando EDTA, sendo expressa em mg CaCO₃ L⁻¹. Além disso, no início e ao final de cada renovação, a água dos aquários foi coletada para análise de Zn total e dissolvido, com auxílio de seringas de vidro e armazenada em tubos plásticos de 15 mL, utilizando-se ácido nítrico 0,5% para fixação. Para a análise do metal dissolvido, a água foi filtrada com filtros de 0,45 µm antes da fixação. As amostras foram armazenadas a 4°C, e analisadas usando espectrômetro de absorção atômica com atomizador de chama (AAAnalyst 700, Perkin Elmer).

6.6 ANÁLISE DE ZN NOS TECIDOS

A concentração de Zn foi determinada em amostras de sangue, brânquias, fígado e rim. Após serem retirados, os órgãos foram lavados em água ultrapura, armazenados em tubos criogênicos descontaminados e congelados em freezer -70 °C. Nas análises, primeiramente os tecidos foram pesados e colocados em estufa a 60°C até secar completamente. Para a digestão ácida, foi adicionado ácido nítrico 5N (brânquias – 1 mL; sangue, fígado e rim – 300 µL) e as amostras foram levadas novamente à estufa a 60 °C por 48 h, em tubos criogênicos fechados. A análise de Zn realizou-se após diluição em HNO₃ 0,5% (1:10) utilizando-se espectrômetro de absorção atômica com atomizador de chama (AAAnalyst 700, Perkin Elmer).

6.7 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

6.7.1 Hematócrito

Alíquotas de sangue total foram adicionadas em microcapilares de vidro e centrifugadas (1200 g, 7 min) em centrífuga para microcapilares (Luguimac – S. R.

C., modelo LC-5) para analisar o hematócrito (Hcto). A leitura foi realizada em cartão padronizado através da porcentagem de células vermelhas na amostra.

6.7.2 Hemoglobina

O conteúdo de hemoglobina (Hb) foi examinado utilizando-se método do cianeto de meta-hemoglobina usando kit comercial (Doles, Brasil) em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom) a 540 nm. O conteúdo de Hb foi expresso em g dL⁻¹.

6.7.3 Número de Eritrócitos

Outra alíquota de sangue total foi diluída (1:200) em tampão formol citrato (citrato de sódio em 0,4% de formol) para a quantificação do número de eritrócitos (RBC) por milímetro cúbico de sangue (n° céls mm⁻³). A contagem foi feita em câmara de Neubauer sob microscópio óptico.

6.8 PARÂMETROS METABÓLICOS

O plasma também foi utilizado para analisar a concentração de glicose, que foi determinada com auxílio de kit comercial (Doles e Bioliquid, Brasil) pelo método da glicose oxidase. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Victor³, Perkin Elmer) a 505 nm.

O glicogênio hepático foi quantificado segundo método descrito por Bidinotto et al. (1997). Para isto, amostras de fígado foram incubadas com KOH 6N (5 min, 100 °C). Após dissolução, foram adicionados etanol e K₂SO₄ (10%), as amostras foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em água destilada. A análise foi realizada quanto ao teor de açúcares redutores totais presente nas amostras pelo método hidrolítico ácido de Dubois et al. (1956). A leitura foi feita em espectrofotômetro (Libra S32, Biochrom) a 480 nm.

6.9 PARÂMETROS IÔNICOS

O plasma obtido a partir da centrifugação do sangue total foi utilizado para as análises da concentração de sódio (Na^+), potássio (K^+), cloreto (Cl^-), cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}). A dosagem de Na^+ e K^+ foi determinada em plasma diluído em água deionizada (1:100) usando fotômetro de chama (DM-62, Digimed). A análise de Cl^- foi realizada com auxílio de kit comercial (Labtest Diagnostica e BioClin, Brasil) pelo método do tiocianato de mercúrio, com leitura em espectrofotômetro de microplacas (Victor³, PerkinElmer) a 490 nm. A dosagem de Ca^{2+} e Mg^{2+} foi realizada com amostras de plasma diluídas (1:50) em óxido de lantânio (La_2O_3 0,1%) em espectrômetro de absorção atômica (AAAnalyst 700, Perkin Elmer).

6.10 ANÁLISES ENZIMÁTICAS

6.10.1 Na^+/K^+ -ATPase e H^+ -ATPase

Logo após a retirada das brânquias e rim posterior para análise das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e (H^+ -ATPase) HATP, as amostras foram armazenadas em tubos plásticos contendo tampão SEI (Sacarose 150 mM, EDTA 10 mM, Imidazol 50 mM, pH 7,5) e levados ao ultrafreezer (-70 °C). Para designação da atividade das enzimas, as amostras de brânquia (1:5 p/v) e rim posterior (1:10 p/v) foram homogeneizadas em tampão SEID 0,5% (Sacarose 150 mM, EDTA 10 mM, Imidazol 50 mM, Deoxicolato de sódio 2,4 mM, pH 7,5), centrifugadas (7500 g, 15 min, 4 °C) e o sobrenadante utilizado para as análises segundo Gibbs e Somero (1989) e padronizado para microplacas (Silva e Martinez, 2014). A concentração de proteínas do sobrenadante foi determinada para que houvesse normalização em 1 mg mL^{-1} . A atividade foi mensurada de modo indireto através da diferença no declínio da absorbância pela produção de ADP em virtude da hidrólise do ATP de amostras incubadas em meio de reação (ATP 1 mM, NADH 0,2 mM, Piruvato Quinase 3 U mL^{-1} , Lactato Desidrogenase 2 U mL^{-1} , Frutose-1,6-Difosfato 0,1 mM, Fosfoenolpiruvato 2 mM, pH 9,0) contendo N-etilmaleimida (NEM – 2 mM, inibidor da HATP) ou Ouabaína (2 mM, inibidor da NKA). A absorbância foi lida a cada minuto durante 15 minutos em espectrofotômetro de microplaca (Victor³, Perkin Elmer) a 340 nm. A atividade da NKA foi calculada pela diferença da atividade entre os meios contendo

ou não ouabaína, e a atividade da HATP, pela diferença da atividade entre os meios contendo ou não NEM, sendo os valores expressos em $\mu\text{mol ADP mg ptn}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

6.10.2 Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase

No momento da amostragem, para análise das enzimas Ca^{2+} -ATPase (CaATP) e Mg^{2+} -ATPase (MgATP), as amostras de brânquia e rim posterior foram armazenadas em tampão SEI (Sacarose 150 mM, EDTA 10 mM, Imidazol 50 mM, pH 7,5) e levados ao ultrafreezer (-70 °C). A atividade das enzimas CaATP e MgATP foi mensurada a partir de Vijayavel et al. (2007) com modificações. As brânquias (1:5 p/v) foram homogeneizadas em tampão (Tris 100 mM, Sacarose 500 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, pH 7,6), centrifugadas (10000 g, 20 min, 4 °C), e os sobrenadantes foram utilizados nas análises. O sobrenadante de rim foi o mesmo utilizado para a análise de NKA e HATP. Primeiramente, as amostras foram incubadas em uma solução reativa (NaCl 189 mM, MgCl_2 5 mM, Tris 20 mM, CaCl_2 5 mM, Ouabaína 2 mM, pH 7,6) sem ATP para determinação da concentração de Pi basal na amostra. Em seguida, as amostras foram incubadas em solução reativa (CaATP – NaCl 189 mM, MgCl_2 5 mM, Tris 20 mM, CaCl_2 5 mM, Ouabaína 2 mM, pH 7,6; MgATP – NaCl 189 mM, MgCl_2 5 mM, Tris 20 mM, KCl 14 mM, EDTA 0,2 mM, Ouabaína 2 mM, pH 7,6) contendo ATP (3 mM), onde a atividade foi determinada pela diferença de absorbância entre as amostras com ATP e as amostras sem ATP. A atividade foi determinada pela quantificação de Pi liberado na amostra usando-se uma solução de coloração segundo Ames (1966). As leituras foram realizadas em leitora de microplacas (ELX 800, Bio-Tek Instruments) a 620 nm, sendo os valores expressos em $\mu\text{mol Pi mg prot}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

6.10.3 Anidrase Carbônica

A atividade da AC branquial e renal foi determinada de acordo com Vitale et al. (1999) baseado na catálise de uma solução saturada de CO_2 com liberação de H^+ e conseqüente diminuição do pH. As amostras foram homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão de reação (Manitol 225 mM, Sacarose 75 mM, Tris 10 mM, NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,4) e centrifugadas (7500 g, 15 min, 4° C). Ao sobrenadante foi adicionado

o tampão utilizado para homogeneizar e água saturada com CO₂. A atividade catalítica foi quantificada pelo decaimento do pH a cada 4 s durante 20 s. A inclinação da reta resultante do decaimento do pH forneceu a taxa de reação catalisada, e a leitura do pH na ausência de amostra forneceu a taxa de reação não-catalisada. Os resultados foram expressos em UAC mg ptn⁻¹ min⁻¹.

A concentração de proteínas totais das amostras de brânquia e rim foi determinada conforme Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A absorbância foi lida em leitora de microplacas (ELX 800, Bio-Tek Instruments) a 595 nm.

6.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados de cada parâmetro analisado foram comparados entre os diferentes grupos (CTR x Zn 0,2 x Zn 2,0) para cada tempo experimental (24, 96 e 168 h) através de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Quando houve indicação de diferenças significativas, foram realizados testes de comparações múltiplas, Student-Newman-Keuls para variância paramétrica ou Dunn's para variância não paramétrica. Não foram feitas comparações entre os tempos experimentais, considerando-se que foram experimentos realizados em momentos diferentes com peixes de origens distintas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

7 RESULTADOS

Antes de dar início a apresentação dos resultados obtidos neste trabalho é importante destacar que os animais utilizados nos testes de 24 e 96 h foram fornecidos pela EPUEL, enquanto que os animais empregados no teste de 168 h foram provenientes da piscicultura Acqua Norte.

Em meio aos 144 peixes utilizados para os testes, 6 deles, correspondentes ao grupo exposto a 2,0 mg L⁻¹ de Zn, morreram no experimento de 168 h de exposição, representando 37,5% do n amostral deste grupo.

Os parâmetros da água de cada aquário mantiveram-se estáveis, sem grandes variações, sendo eles: temperatura 21,95 ± 1,36 °C; pH 7,55 ± 0,71; condutividade 133 ± 36,81 µs cm⁻¹; oxigênio dissolvido 8,46 mg O₂ L⁻¹; TSD 0,08 ± 0,02 g L⁻¹; dureza 38,11 ± 3,13 mg CaCO₃ L⁻¹. As concentrações dos íons também foram mensuradas na água: Na⁺ 0,105 ± 0,003 mM; K⁺ 0,022 ± 0,001 mM, Ca²⁺ 0,223 ± 0,001 mM, Mg²⁺ 0,108 ± 0,002 mM.

A média de Zn encontrada nos aquários foi de 0,16 mg L⁻¹ de Zn total e 0,16 mg L⁻¹ de Zn dissolvido no grupo Zn 0,2, e 1,81 mg L⁻¹ de Zn total e 1,78 mg L⁻¹ de Zn dissolvido no grupo Zn 2,0, mas esses valores variaram ao longo dos experimentos (Tabela 1). Nos aquários CTR a concentração de Zn não ultrapassou 0,07 mg L⁻¹.

Tabela 1 - Concentrações de Zn (mg L⁻¹) total e dissolvido na água dos aquários controle (CTR), Zn 0,2 e Zn 2,0 medidas em cada tempo experimental e entre as renovações realizadas nos tempos 96 e 168 h.

TEMPO (h)		CTR		Zn 0,2		Zn 2,0	
		Total	Dissolvido	Total	Dissolvido	Total	Dissolvido
24	I	0,04	0,02	0,17	0,16	1,76	1,70
	F	0,03	0,01	0,17	0,16	1,75	1,69
48	I	0,07	0,02	0,15	0,16	1,80	1,79
	F	0,02	0,01	0,15	0,14	1,79	1,77
72	I	0,04	nd	0,15	0,16	1,79	1,78
	F	0,03	nd	0,16	0,16	1,78	1,79
96	I	0,02	0,01	0,16	0,15	1,79	1,79
	F	0,02	nd	0,16	0,18	1,78	1,75
120	I	0,05	0,01	0,15	0,16	1,93	1,97
	F	0,03	nd	0,14	0,15	1,93	1,90
144	I	0,03	0,03	0,15	0,18	1,94	1,92
	F	0,02	nd	0,16	0,15	1,96	1,84

168	I	0,04	0,01	0,15	0,13	1,92	1,91
	F	0,03	nd	0,14	0,13	1,93	1,95

nd = não detectado; I = inicial; F = final

7.1 ACÚMULO TECIDUAL DE ZN

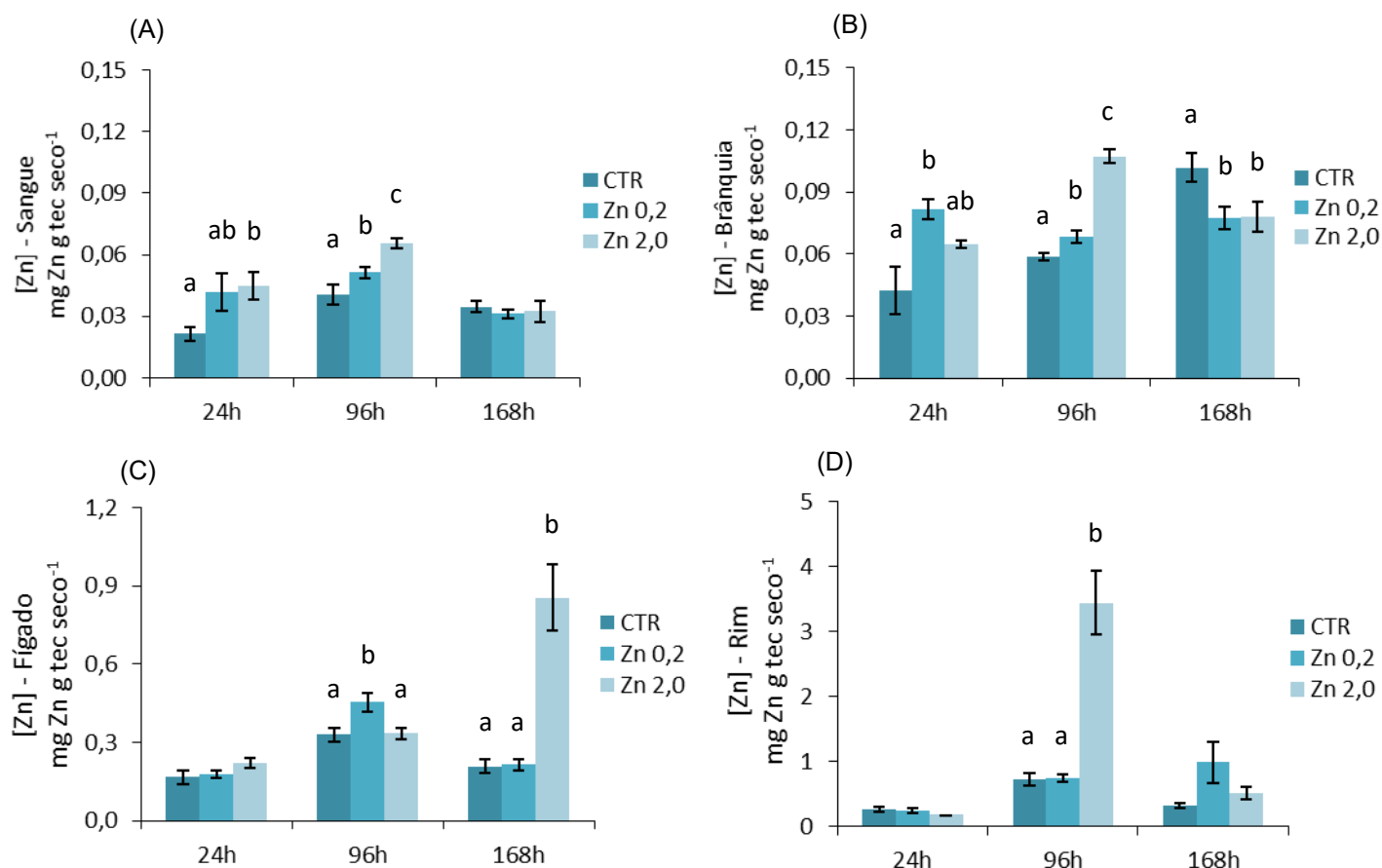
As concentrações de Zn em *P. lineatus* diferiram conforme o tecido analisado (sangue, brânquia, fígado e rim) e, mesmo sem comparação estatística entre os tempo de exposição ao Zn para um mesmo órgão (24, 96 e 168 h), foi possível notar diferenças de acúmulo do metal. De acordo com os resultados encontrados, o padrão de acúmulo de Zn para *P. lineatus* após 168 h foi: sangue = brânquias > rim posterior > fígado.

Por se tratar de um metal essencial, naturalmente os peixes possuem uma quantidade endógena de Zn. Neste trabalho, as concentrações de Zn apresentaram pequenas variações entre um grupo CTR e outro para o mesmo órgão. O sangue dos peixes utilizados neste trabalho apresentou concentrações de Zn que variaram de 0,02 a 0,04 mg Zn g tec seco⁻¹. As brânquias variaram de 0,04 a 0,11 mg Zn g tec seco⁻¹. O fígado apresentou variações de 0,17 a 0,33 mg Zn g tec seco⁻¹. Por fim, o rim posterior apresentou concentrações que oscilaram de 0,26 a 0,72 mg Zn g tec seco⁻¹. Em termos quantitativos, ao longo dos três tempos experimentais, o rim posterior foi o órgão que mais acumulou Zn, sendo 4,8 vezes maior no grupo Zn 2,0 em relação ao seu CTR após 96 h de exposição. Em seguida, o fígado dos peixes do grupo Zn 2,0 acumulou 4,1 vezes mais do que o CTR, em 168 h de exposição. O sangue acumulou 2 vezes mais Zn em comparação ao seu CTR, em apenas 24 h de exposição. Finalmente, as brânquias dos peixes expostos a 0,2 mg L⁻¹ de Zn acumularam 1,9 vezes mais Zn em relação ao CTR, após 24 h.

As concentrações de Zn para os diferentes órgãos analisados (sangue, brânquias, fígado e rim posterior) ao longo de 24, 96 e 168 h mostrou a seguinte dinâmica. O sangue (Figura 6A) dos peixes expostos durante 24 h a 2,0 mg L⁻¹ apresentou concentrações de Zn significativamente maiores do que os peixes do CTR ($p = 0,045$). Em 96 h, a concentração do metal neste órgão apresentou relação dose-dependente ($p < 0,001$), no qual o grupo 0,2 chegou a uma média de 0,051 mg Zn g tec seco⁻¹ e o grupo Zn 2,0 abrangendo 0,066 mg Zn g tec seco⁻¹. Após 168 h de exposição, os valores não apresentaram diferença significativa entre os grupos. A

concentração de Zn nas brânquias (Figura 6B) dos peixes do grupo Zn 0,2 por 24 h mostrou-se significativamente maior do que o CTR ($p = 0,031$), mas permaneceu sem diferenças em relação ao grupo Zn 2,0. Já em 96 h, ambos os grupos expostos ao Zn mostraram aumento significativo em relação ao CTR, em que o grupo Zn 0,2 apresentou em torno de $0,07 \text{ mg Zn g tec seco}^{-1}$ e o grupo Zn 2,0 apresentou $0,11 \text{ mg Zn g tec seco}^{-1}$, contra $0,06 \text{ mg Zn g tec seco}^{-1}$ exibido pelo CTR. Assim como aconteceu com o sangue, estes valores representaram concentração de Zn dose-dependente ($p < 0,001$). Contudo, em 168 h, a concentração de Zn apresentou redução significativa ($p = 0,016$) nos grupos Zn 0,2 e 2,0 quando comparado com o respectivo grupo CTR. O fígado (Figura 6C) dos peixes do grupo Zn 0,2 expostos durante 96 h reteve Zn de modo significativo ($p = 0,016$) em relação ao CTR e ao grupo Zn 2,0, mas foi apenas após 168 h de exposição que o Zn acumulou de maneira acentuada ($p = 0,010$), pois o grupo Zn 2,0 atingiu $0,85 \text{ mg Zn g tec seco}^{-1}$ representando mais de 4 vezes a média encontrada em seu respectivo CTR, que foi de $0,21 \text{ mg Zn g tec seco}^{-1}$. Enfim, o rim posterior (Figura 6D) foi o órgão que apresentou as maiores concentrações de Zn, atingindo uma média de $3,45 \text{ mg Zn g tec seco}^{-1}$ nos peixes do grupo Zn 2,0 após 96 h de exposição ($p = 0,001$) quando comparado com $0,72 \text{ mg Zn g tec seco}^{-1}$ acumulado pelo grupo CTR. Em 168 h observa-se que este órgão já não apresenta mais acúmulo significativo entre os grupos experimentais.

Figura 7 - Concentração de Zn (média \pm EP; $n = 4 - 8$) em sangue (A), brânquias (B), fígado (C) e rim (D) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h.

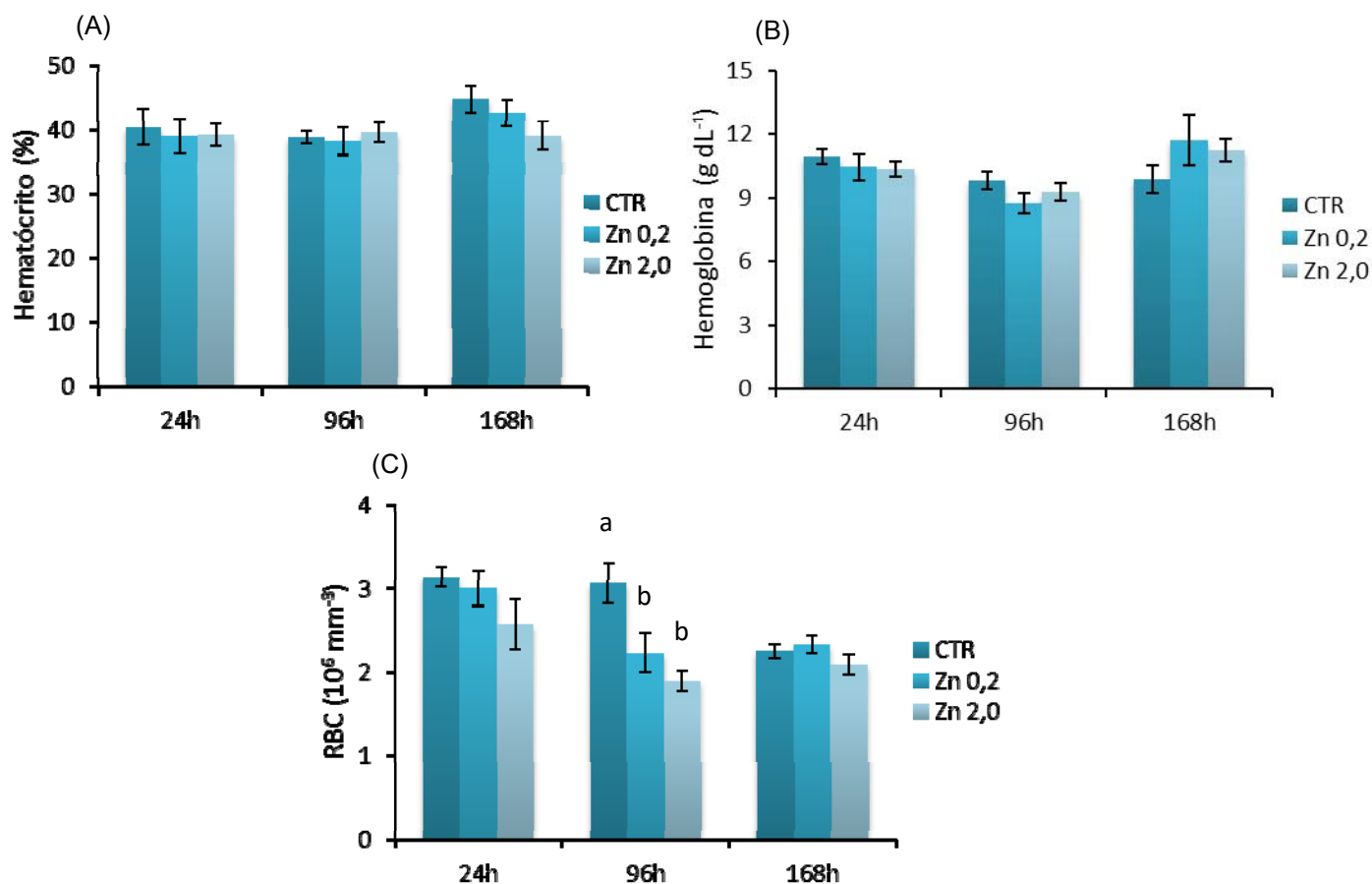


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental ($p < 0,05$). Notar as diferenças nas escalas nos gráficos A, B, C e D.

7.2 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

O Hcto (Figura 7A) e o conteúdo de Hb (Figura 7B) dos peixes expostos ao Zn não apresentaram diferenças significativas em relação aos respectivos grupos CTR, nos diferentes tempos testados. Os valores de RBC (Figura 7C) dos peixes expostos às duas concentrações de Zn em 96 h foram significativamente menores ($p = 0,002$) em relação ao CTR, mas esta diferença não se manteve no tempo de 168 h.

Figura 8 - Valores (média \pm EP; n = 5 – 8) de hematócrito (A), hemoglobina (B) e número de eritrócitos (RBC) (C) do sangue de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h.

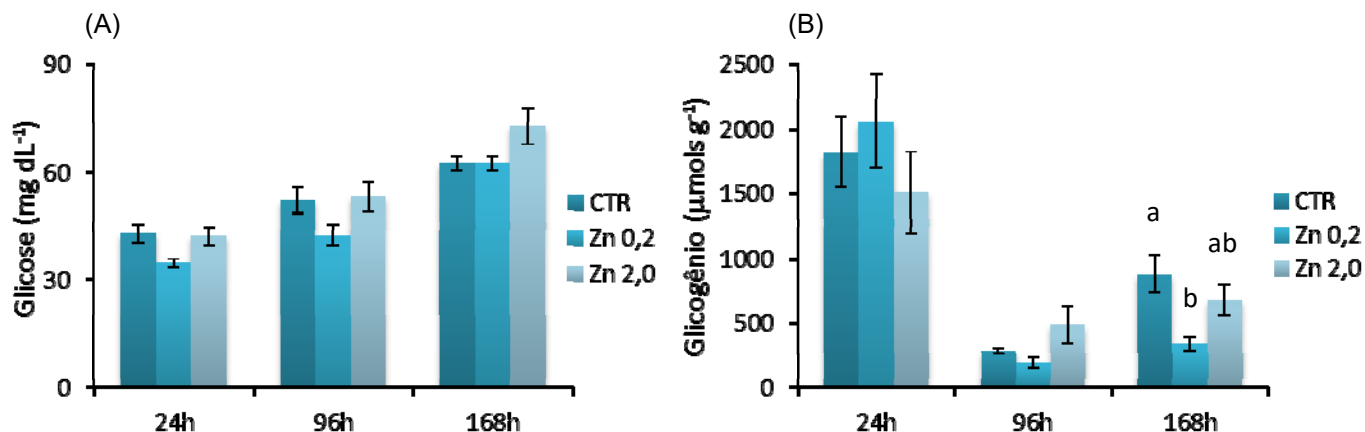


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental ($p < 0,05$). Notar as diferenças nas escalas nos gráficos A, B, C e D.

7.3 PARÂMETROS METABÓLICOS

A concentração plasmática de glicose (Figura 8A) manteve-se sem variações significativas entre os grupos de cada tempo experimental. Em 168 h de exposição, o glicogênio hepático (Figura 8B) dos animais do grupo Zn 0,2 foi significativamente menor ($p = 0,007$) em relação ao CTR. É importante esclarecer que, devido à ausência de alimentação no experimento de 96 h, a quantidade de glicogênio no fígado dos peixes de todos os grupos (CTR, Zn 0,2 e Zn 2,0) foi visivelmente menor em relação aos demais tempos, mesmo sem comparação estatística, sendo parcialmente retomada em 168 h, já que neste teste os animais receberam alimentação a cada 2 dias.

Figura 9 - Concentração (média \pm EP; n = 5 – 8) de glicose plasmática (A) e glicogênio hepático (B) de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h.

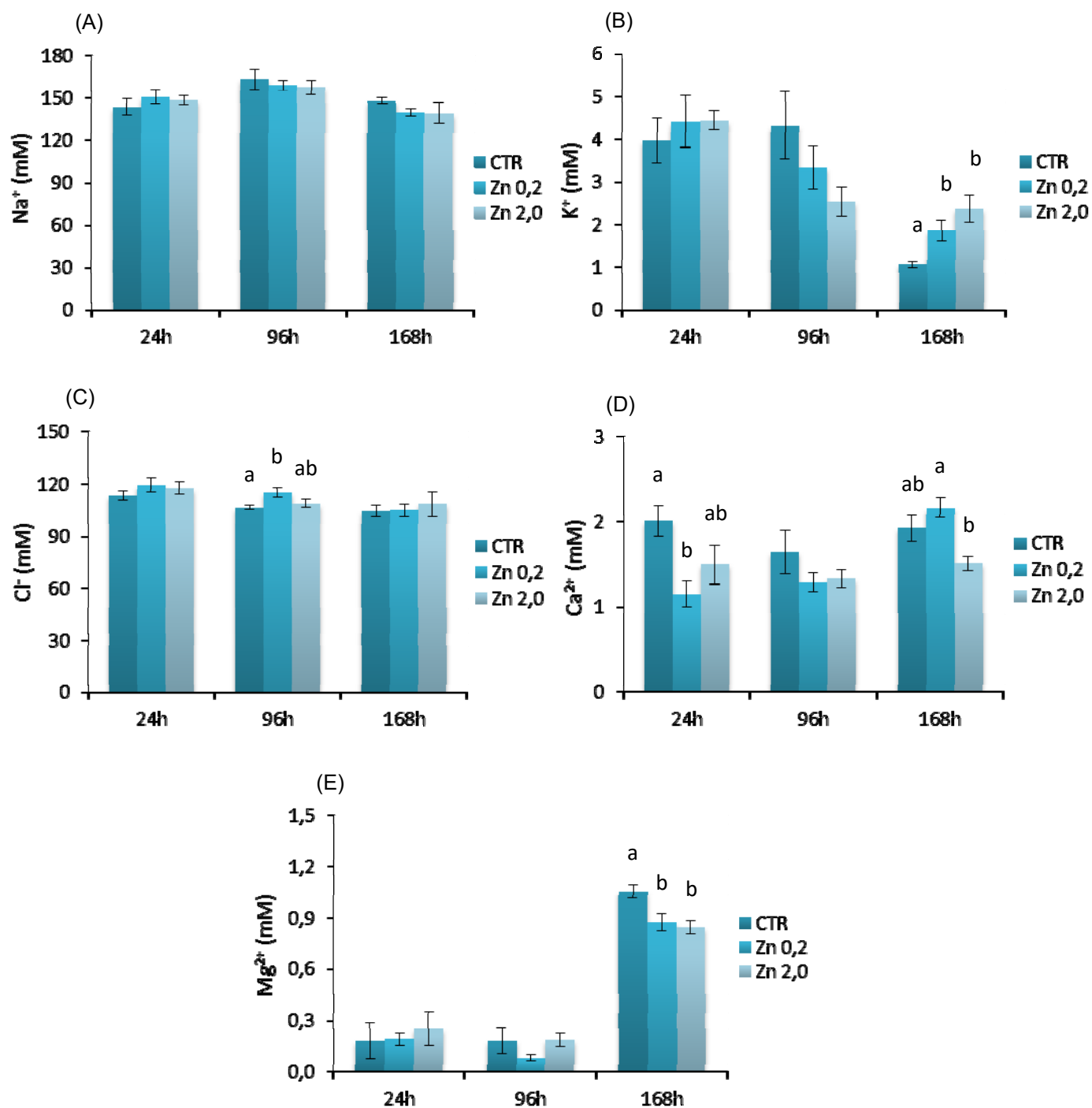


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental (p < 0,05).

7.4 PARÂMETROS IÔNICOS

O Na⁺ (Figura 9A) foi o único íon plasmático que permaneceu sem diferenças significativas entre os grupos, para cada tempo experimental. Já o K⁺ plasmático (Figura 9B) dos animais expostos ao Zn 0,2 e Zn 2,0, durante 168 h, mostrou aumento significativo (p = 0,003) em relação ao CTR. O Cl⁻ (Figura 9C) apresentou aumento significativo pontual, em relação ao CTR, apenas no plasma dos animais do grupo Zn 0,2 exposto por 96 h. A concentração de Ca²⁺ (Figura 9D) mostrou-se significativamente menor (p = 0,035) no plasma dos animais do grupo Zn 0,2, em relação ao CTR, em 24 h. Em 168 h, o Ca²⁺ do grupo Zn 2,0 apresentou redução significativa (p = 0,015) em relação ao grupo Zn 0,2, mas permaneceu estatisticamente igual ao CTR. Por outro lado, os peixes expostos às duas concentrações de Zn durante 168 h apresentaram concentrações de Mg²⁺ significativamente menores (p = 0,008) quando comparados com o CTR (Figura 9E). Mesmo sem análise estatística, é possível notar que os valores de Mg²⁺ no plasma dos peixes dos grupos experimentais de 24 e 96 h foram menores em relação aos peixes dos grupos de 168 h.

Figura 10 - Concentrações (média \pm EP; n = 4 – 8) de Na⁺ (A), K⁺ (B), Cl⁻ (C), Ca²⁺ (D) e Mg²⁺ (E) no plasma de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h.



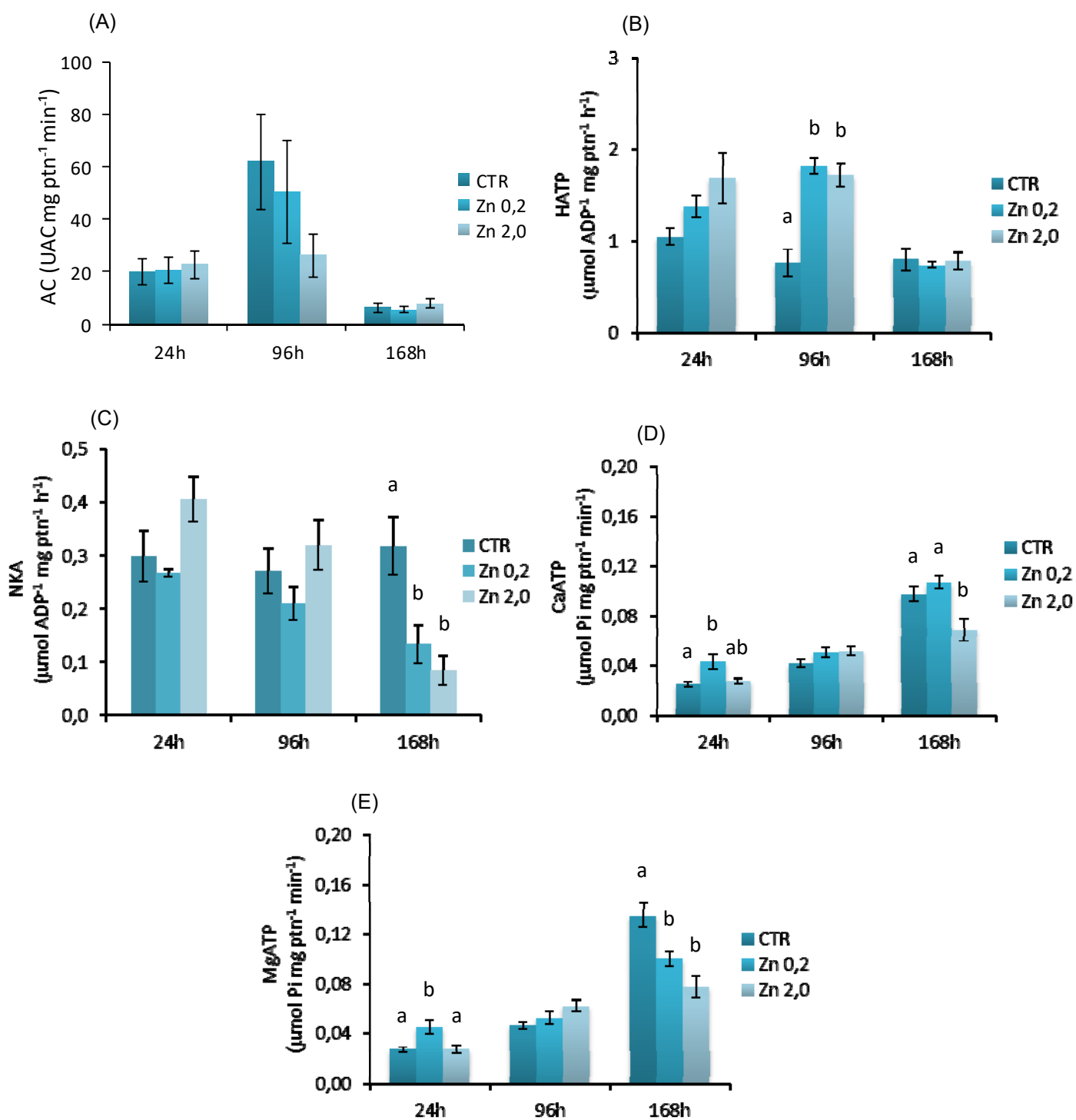
Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental (p < 0,05). Notar as diferenças nas escalas nos gráficos A, B, C e D.

7.5 ANÁLISES ENZIMÁTICAS

Todas as enzimas, com exceção da AC, apontaram variações significativas em pelo menos um dos dois órgãos analisados. A AC branquial (Figura 10A) dos animais não diferiu significativamente entre os grupos testados nos tempos analisados. Entretanto, em 96 h, houve uma tendência de redução na atividade da enzima, principalmente do grupo Zn 2,0 em relação ao CTR. A HATP branquial (Figura 10B) aumentou sua atividade significativamente ($p = 0,002$) nos dois grupos expostos ao Zn após 96 h de exposição. Enquanto que a NKA (Figura 10C), neste mesmo órgão, apresentou redução significativa ($p = 0,004$) em 168 h de exposição às duas concentrações de Zn, chegando a ser 3,7 vezes menor do que o CTR no grupo Zn 2,0. Em 24 h de exposição ao Zn 0,2, a atividade da CaATP (Figura 10D) na brânquia aumentou significativamente ($p = 0,010$) quando comparada ao CTR e à maior concentração (Zn 2,0). Já em 168 h observou-se um declínio significativo ($p = 0,002$) desta enzima na brânquia dos animais do grupo Zn 2,0 em relação ao respectivo CTR e ao grupo Zn 0,2. Por fim, a atividade da MgATP (Figura 10E) aumentou significativamente ($p = 0,003$) na brânquia dos peixes expostos à 0,2 mg L⁻¹ de Zn em referência ao CTR nas primeiras 24 h de exposição. Em contrapartida, sua atividade mostrou-se significativamente reduzida ($p < 0,001$) nas duas concentrações de Zn no tempo de 168 h, sendo que o grupo Zn 2,0 foi 1,7 vezes menor do que o CTR.

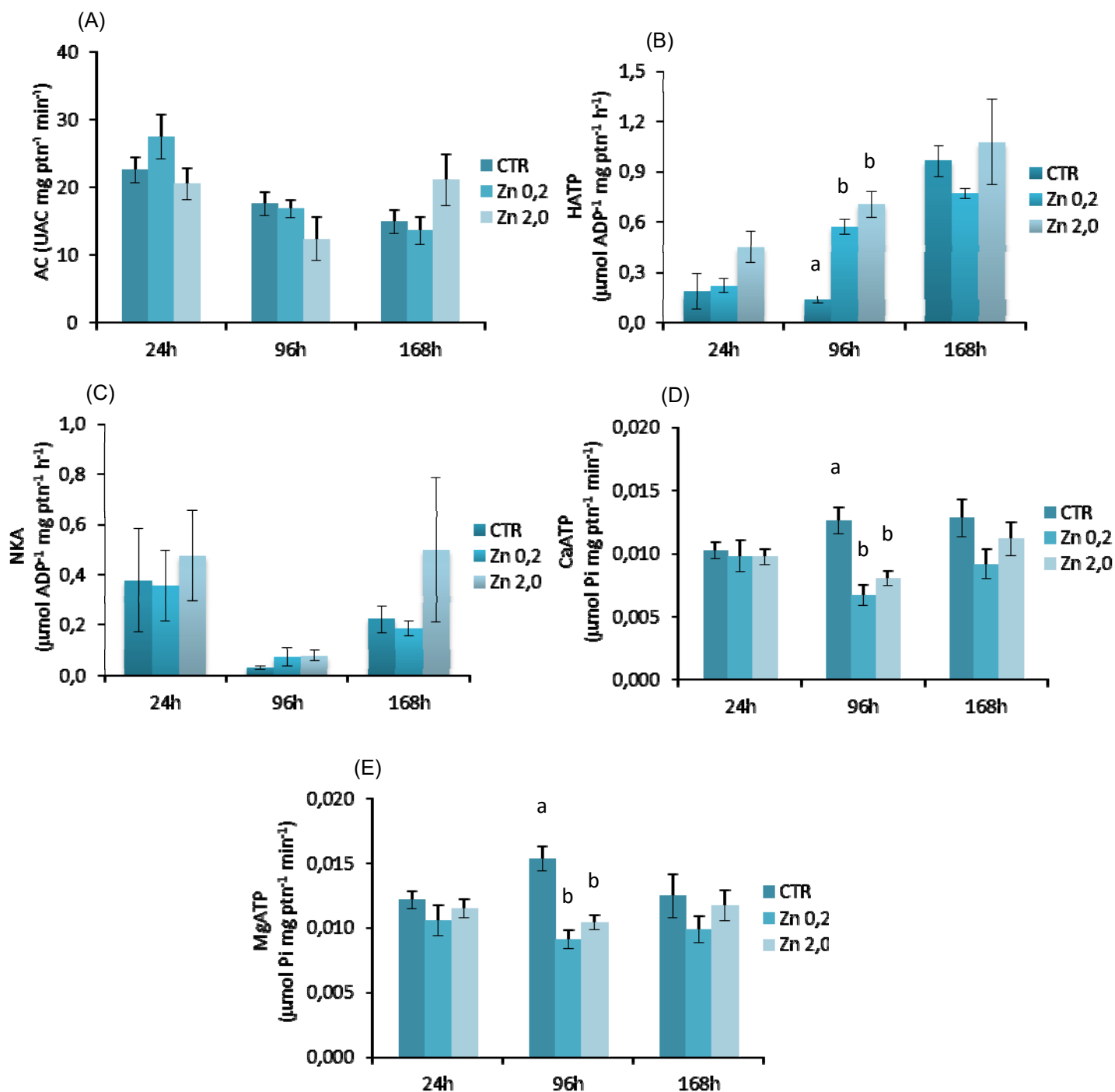
A atividade renal das enzimas AC (Figura 11A) e NKA (Figura 11C) não apresentaram alterações significativas entre os grupos nos tempos testados. Da mesma forma que aconteceu com a brânquia, a HATP renal (Figura 11B) aumentou significativamente ($p < 0,001$) sua atividade após 96 h de exposição nos dois grupos Zn em relação ao CTR. A atividade renal da CaATP (Figura 11D) e da MgATP (Figura 11E) diminuíram significativamente ($p < 0,001$ para ambas) em 96 h, nos dois grupos expostos ao Zn em relação ao seu CTR.

Figura 11 - Valores (média \pm EP; $n = 5 - 8$) da atividade das enzimas anidrase carbônica (A), HATP (B), NKA (C), CaATP (D) e MgATP (E) das brânquias de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h.



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental ($p < 0,05$). Notar as diferenças nas escalas nos gráficos B e C.

Figura 12 - Valores (média \pm EP; $n = 5 - 8$) da atividade das enzimas anidrase carbônica (A), HATP (B), NKA (C), CaATP (D) e MgATP (E) do rim posterior de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou à água contendo 0,2 mg Zn L⁻¹ (Zn 0,2) e 2,0 mg Zn L⁻¹ (Zn 2,0) por 24, 96 e 168 h.



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos para cada tempo experimental ($p < 0,05$). Notar as diferenças nas escalas nos gráficos B e C.

8 DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi observada uma mortalidade de 37,5% dentre os peixes expostos a maior concentração de Zn ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), durante 168 h. Um estudo realizado com as espécies *Rasbora sumatrana* e *Poecilia reticulata* mostrou que a $CL_{50} - 96 \text{ h}$ para cada uma foi $0,46$ e $1,06 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn, respectivamente (SHUHAIMI-OTHMAN et al., 2013). Por outro lado, alevinos de *Oreochromis niloticus* expostos ao Zn apresentaram valores de $CL_{50} - 96\text{h}$ para o metal em torno de $16,18 \text{ mg L}^{-1}$ (TAWHEEL et al., 2013) (Tabela 2). Estas diferenças de concentrações encontradas entre os trabalhos são reflexos das espécies estudadas, sua idade, bem como seu tamanho e biologia, resultando em uma toxicidade particular de Zn para cada organismo.

Tabela 2 - Valores de $CL_{50} - 96\text{h}$ de Zn para três espécies de peixes dulcícolas de ambientes tropicais.

<i>Espécie</i>	<i>Tamanho</i>	<i>CL₅₀ - 96h</i>	<i>Autor</i>
<i>Rasbora sumatrana</i>	4 – 5 cm	$0,46 \text{ mg L}^{-1}$	Shuhaimi-Othman et al., 2013
<i>Poecilia reticulata</i>	2 – 3,5 cm	$1,06 \text{ mg L}^{-1}$	Shuhaimi-Othman et al., 2013
<i>Oreochromis niloticus</i>	3,3 cm	$16,18 \text{ mg L}^{-1}$	Taweel et al., 2013

O Zn só está biodisponível quando o metal se encontra na forma iônica Zn^{2+} , constituindo em torno de 30% de Zn dissolvido na água (HOGSTRAND, 2012). No presente trabalho, os valores de Zn dissolvido determinados na água dos aquários experimentais ficaram muito próximos dos valores totais. Portanto, quase todo o metal adicionado na água estava passível de ser absorvido pelos peixes e causar acumulação e outros efeitos, como será discutido a seguir.

Geralmente, as vias de acumulação de contaminantes incluem absorção a partir da água (brânquia ou pele), ingestão de partículas suspensas ou ingestão de alimento contaminado (EBRAHIMI e TAHERIANFARD, 2011). A via de acúmulo estudada neste trabalho restringiu-se à absorção via brânquia, tanto pelo fato de que estes teleósteos são dulcícolas e, portanto, não bebem água, quanto pela razão de que não foi ofertado alimento contaminado aos animais. Uma vez dentro do

organismo, os contaminantes permanecem nos tecidos e podem ter suas concentrações aumentadas conforme as exposições vão ocorrendo (PALANIAPPAN et al., 2010). Neste estudo, os órgãos analisados estão envolvidos com a osmorregulação e excreção (brânquia e rim posterior), metabolismo energético e detoxificação (fígado) e transporte de gases, nutrientes e hormônios e sistema de defesa (sangue).

Após 24 h de exposição ao Zn, os juvenis de *P. lineatus* já apresentaram aumento da concentração do metal no sangue e nas brânquias. Após 96 h de exposição esse aumento permaneceu, tanto no sangue quanto nas brânquias, de forma dose-dependente. Como o primeiro órgão de contato com a água e, conseqüentemente, alvo de uma contaminação direta (FERNANDES, et al., 2013), as brânquias tendem a mostrar uma maior concentração de Zn em relação aos outros órgãos nos primeiros momentos de exposição (TUNÇSOY e ERDEM, 2014). Por estar envolvida no processo respiratório, de osmorregulação, de balanço ácido-base e de excreção de resíduos de nitrogênio, as brânquias dispõem de uma ampla área de superfície para o movimento das moléculas entre a água e o sangue (CHASIOTIS et al., 2012), sendo alvo de entrada e transferência de contaminantes para toda a circulação.

Contrariamente ao que ocorreu nas exposições agudas, os dois grupos expostos ao Zn apresentaram redução significativa na concentração de Zn na brânquia em relação ao controle após 168 h de exposição. A captação de Zn pela brânquia constitui um processo complexo que necessita de transportadores atuando sob diversas concentrações. Esta complexidade aumenta quando acredita-se que a brânquia seja capaz de excretar o metal presente em concentrações elevadas (FEENEY et al., 2005). Estudos de expressão gênica realizados com exemplares de *Danio rerio* expostos a excesso (5 μ M) de Zn por até 14 dias mostraram que o RNAm do exportador ZnT1 superexpresso após 7 dias desempenha papel preventivo na acumulação de Zn nas células branquiais, ao mesmo passo que o RNAm dos importadores ZIP10 e ZnT5 tem sua expressão reduzida pelo mesmo período a fim de limitar a entrada do metal nas células (ZHENG et al., 2008). Como estes genes são bem conservados ao longo da filogenia, segundo o próprio autor, é possível que tenham sido regulados para manter o interior das células branquiais de

P. lineatus protegido dos efeitos do Zn, e esta ação ter se refletido nos dados de acúmulo do órgão após 168 h.

Logo que o metal sai das células branquiais, a primeira e única rota de acesso é a circulação, por isso faz sentido o sangue também ter apresentado acúmulo de Zn na exposição aguda. Entretanto, ainda é desconhecida a existência de proteínas plasmáticas específicas que distribuem Zn para outros tecidos, mas acredita-se que, pelo menos em mamíferos, grande parte esteja ligada à albumina e à α_2 -macroglobulina (HOGSTRAND, 2012). Estas proteínas poderiam também estar envolvidas no transporte de Zn em teleósteos. Além disso, os eritrócitos possuem grandes quantidades de AC (GILMOUR e PERRY, 2009), que poderiam servir de molécula de ligação ao Zn neste tecido.

Em termos de valores absolutos, o rim posterior foi o órgão de *P. lineatus* que mais acumulou Zn após 96 h de exposição, chegando a atingir uma média 4,8 vezes maior do que o CTR. O rim posterior é considerado alvo da bioacumulação devido a sua alta vascularização, já que é o órgão excretor dos vertebrados e principal responsável pela eliminação do excesso de água (ATLI e CANLI, 2011). Nesta perspectiva, se o sangue que perfunde o néfron está contaminado com Zn, provavelmente o néfron também apresentará esta contaminação se a taxa de acumulação exceder a taxa de eliminação. Além disso, o tecido renal reabsorve Ca^{2+} , para isto conta com canais epiteliais de Ca^{2+} e CaATP (MARTINEZ, 2017) que possuem alta afinidade por metais divalentes, como o Zn.

Quando os animais foram expostos por um tempo mais longo, como 168 h, o Zn acumulou principalmente no fígado. Por ser extremamente especializado em detoxificação de diversos contaminantes e bioacumulação de metais, o fígado produz grandes quantidades de MTs (SHARIATI e SHARIATI, 2011), que regulam o excesso de Zn, protegendo a célula contra sua toxicidade (DECATALDO et al., 2004). Assim, o fígado sequestra e detoxifica o excesso de Zn que entra via brânquias e intestino de teleósteos e acumula o metal, como já reportado em outros estudos com peixes (HATTINK et al. 2006; SHYN et al., 2012). Por isso, o fígado constitui alvo de estudos quando o foco é contaminação metálica.

Exemplares de *Fundulus heteroclitus* expostos a 0,015 e 0,075 mg L⁻¹ de Zn por 7 dias acumularam Zn nas brânquias em ambas as concentrações. O mesmo

ocorreu com o fígado destes animais, que acumulou o metal quase 2,8 vezes mais do que o CTR na exposição a $0,075 \text{ mg L}^{-1}$ de Zn. Entretanto, o rim não apresentou diferenças significativas entre os grupos (SHYN et al., 2012). Por outro lado, Gupta e Srivastava (2006) testaram a toxicidade do Zn em *Channa punctatus* expostos a três concentrações do metal (10, 15 e 25 mg L^{-1}), durante 8, 10 e 15 dias, e encontraram aumento significativo na quantidade de Zn presente no rim dos animais expostos. Estas diferenças mostram uma distribuição variada de Zn nos órgãos em relação à espécie de peixe estudada. Por isso, a necessidade de analisar o padrão de acúmulo de Zn em diversos órgãos de diferentes espécies de peixes.

A diminuição na contagem de eritrócitos (RBC) dos peixes expostos a ambas concentrações de Zn durante 96 h pode ter sido causada pela ocorrência de hemólise. No entanto o Hcto dos peixes expostos ao Zn permaneceu igual ao dos peixes dos grupos CTR, sugerindo que os eritrócitos restantes aumentaram de volume. Este aumento de volume poderia estar relacionado a entrada de água nestas células, já que o Zn possui a capacidade de alterar as propriedades de membrana das células vermelhas, resultando no aumento da permeabilidade à água e consequente inchaço (WITESKA e KOSCIUK, 2003). O Zn também causou diminuição significativa no RBC, mas acompanhada de redução no Hcto, no teleosteo de água doce *Colisa fasciatus* exposto a elevada concentração do metal (100 mg Zn L^{-1}) durante 90 h (MISHRA e SRIVASTAVA, 1979). Por outro lado, Bagdonas e Vosylienė (2006) testaram o efeito do Zn, em três concentrações ($0,24$; $0,47$ e $0,95 \text{ mg Zn L}^{-1}$) e após 96 h de exposição, em parâmetros hematológicos (RBC e conteúdo de Hb) de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e não observaram alterações significativas. O mesmo aconteceu com estudos feitos com carpa comum (*Cyprinus carpio*), que não apresentaram alterações no RBC após 3 h de exposição ao Zn, provavelmente pelo pequeno tempo testado (WITESKA e KOSCIUK, 2003).

Sob condições de estresse como, por exemplo, a exposição à contaminantes, respostas adaptativas são desencadeadas para a manutenção da homeostase do organismo, como a quebra do glicogênio hepático para conservação dos níveis de glicose no plasma e fornecimento de energia (TAKASUSUKI et al., 2004). Embora alguns parâmetros de *P. lineatus* tenham sido alterados na presença de Zn, a glicose plasmática não apresentou alterações significativas, em relação aos respectivos grupos CTR, ao longo dos experimentos. Esse mesmo padrão foi

observado por Öner et al. (2008), que expuseram *Oreochromis niloticus* ao Zn ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$) por vários dias (de 5 a 30 dias) e não observaram alterações significativas na glicemia. Por se tratar de uma fonte primária de energia, a glicose é liberada no sangue cerca de minutos a horas após a exposição a algum agente estressor e é rapidamente utilizada para atender o aumento da demanda energética (ALURU e VIJAYAN, 2009), sendo que, geralmente, em 24 horas não é mais possível visualizar alterações em sua concentração. Além disso, foi nítida a diferença na quantidade de glicogênio no fígado dos peixes expostos ao Zn por 24 e 96 h. Este fato deve estar relacionado ao jejum dos peixes expostos por 96 h, o que acarretou na quebra do glicogênio hepático em todos os grupos experimentais, inclusive o CTR, para manutenção da glicemia em níveis normais. Quando os peixes receberam ração durante 168 h de exposição, houve uma recuperação parcial do glicogênio hepático no grupo CTR, mas não no grupo Zn 0,2, que se mostrou significativamente menor. Neste caso, a presença do Zn pareceu aumentar a demanda energética do organismo, com conseqüente diminuição do glicogênio e conservação dos níveis glicêmicos.

Embora tenha aparecido uma tendência de diminuição na concentração de K^+ plasmático em 96 h, resultados significativos só foram observados em 168 h quando este íon foi significativamente maior nos peixes dos grupos Zn 0,2 e Zn 2,0, em relação ao CTR. O K^+ é um cátion importante para a transmissão do impulso nervoso, para a contração muscular, para o potencial de ação do coração e também para os mecanismos de osmorregulação dos peixes, e seu equilíbrio se dá, principalmente, pela ação da enzima NKA, responsável pela homeostase celular (BALDISSEROTTO et al., 2014). De fato, a redução significativa na atividade da NKA branquial após 168 h de exposição ao Zn poderia estar relacionada com esta hipercalemia. Vários estudos relatam a capacidade que os metais têm de interferir na atividade da NKA branquial de teleósteos dulcícolas, como cobre (ATLI e CANLI, 2011), chumbo (RIBEIRO et al., 2014) e cádmio (SILVA e MARTINEZ, 2014), sendo que a concentração de K^+ plasmático também apresentou aumento no trabalho com chumbo supracitado. Apesar das alterações na concentração de K^+ , o Na^+ plasmático não sofreu alterações significativas em nenhum grupo experimental. Nesta perspectiva, a regulação da concentração de Na^+ não foi prejudicada, uma

vez que além da NKA existem canais e trocadores específicos para este íon que ajudam na manutenção da sua concentração (GRIFFITH, 2017).

A regulação ácido-base em peixes envolve o ajuste das concentrações de H^+ e HCO_3^- entre as células branquiais e a água, e as células renais e o filtrado. Localizada na membrana apical das células, a HATP está intimamente relacionada a este mecanismo, pois secreta H^+ proveniente da atividade da AC intracelular, para o meio externo, controlando o pH do organismo (GILMOUR e PERRY, 2009). Os resultados de aumento na atividade da HATP branquial e renal após exposição ao Zn por 96 h, poderiam indicar um estado de acidose dos animais. Essa acidose pode ter sido consequência do aumento do metabolismo anaeróbico decorrente da redução do RBC, observada também em 96 h. Quando há redução no número de eritrócitos circulantes, a oxigenação dos tecidos se torna prejudicada e instala-se um quadro de hipóxia tecidual. Sem oxigênio, as células lançam mão do metabolismo anaeróbico que tem como consequência a produção de ácido lático (BARRIONUEVO et al., 2010). O ácido lático, por sua vez, leva a diminuição do pH, acarretando em um estado de acidose. Neste momento, o excesso de H^+ é eliminado pelo aumento na atividade da HATP para restabelecer o pH e evitar danos ao organismo (GRIFFITH, 2017).

O Ca^{2+} é essencial para o crescimento e desenvolvimento de estruturas ósseas e regulação das funções fisiológicas, além de funcionar como segundo mensageiro (LIU et al., 2014). Em peixes, este cátion é absorvido a partir da água pelas brânquias, através dos canais epiteliais de Ca^{2+} (ECaC) presentes na membrana apical; sua saída para o plasma envolve transporte ativo através da CaATP e o trocador Na^+/Ca^{2+} , ambos presentes na membrana basolateral das células branquiais (PERRY et al., 2003; HWANG et al., 2011). A atividade da CaATP branquial mostrou-se significativamente aumentada nas primeiras 24 h horas de exposição no grupo Zn 0,2, evidenciando uma resposta compensatória na tentativa de restabelecer as baixas concentrações de Ca^{2+} plasmático encontradas para este grupo neste mesmo tempo. Em 96 h, as concentrações de Ca^{2+} e a atividade da CaATP permaneceram sem alterações significativas em relação ao CTR. Entretanto, na exposição mais prolongada (168 h), a CaATP foi significativamente menor no grupo Zn 2,0, acompanhada por uma diminuição nas concentrações plasmáticas de Ca^{2+} . No rim, a atividade da CaATP apresentou diminuição após 96 h de exposição,

período no qual foi observado o elevado acúmulo renal de Zn. Provavelmente, a interferência do Zn na atividade desta enzima levou a uma perda de Ca^{2+} pela urina, uma vez que o rim não estava reabsorvendo o cátion, ocasionando uma leve hipocalcemia no animal. Outros estudos *in vivo* têm mostrado redução na CaATP após exposição aguda e crônica ao Zn em brânquia, rim e músculo de *O. niloticus*, bem como em trabalhos *in vitro*, que mostraram resultados semelhantes em músculo de *O. niloticus* após exposição aguda ao Zn (ATLI e CANLI, 2007; ATLI e CANLI, 2011). A literatura relaciona a permeabilidade ao Zn^{2+} com diferentes canais de Ca^{2+} , uma vez que o Zn ionizado compete com sítios de ligação de íons divalentes (HOGSTRAND, 2012; BOURON e OBERWINKLER, 2014), incluindo canais de Ca^{2+} voltagem dependente (INOUE et al., 2015). Assim, o que pode ter ocorrido na brânquia e rim posterior é justamente esta competição do metal com o sítio de ligação do Ca^{2+} , que levaram a diminuição na atividade da CaATP envolvida na reabsorção deste cátion.

No epitélio branquial dos teleósteos, a MgATP está associada com a NKA para o transporte de Mg^{2+} e também tem importância para a integridade da membrana e permeabilidade das brânquias (ATLI e CANLI, 2011). Na brânquia, assim como aconteceu com a CaATP em 24 h, a MgATP aumentou sua atividade, sem acarretar qualquer alteração na concentração do Mg^{2+} . Resultados contrários apareceram em 168 h na brânquia, quando a enzima apresentou atividade reduzida na presença do Zn, refletindo nas concentrações de Mg^{2+} , que mostraram-se diminuídas em relação ao CTR. A MgATP renal também apresentou redução significativa em resposta ao Zn em 96 h de exposição, com provável eliminação de Mg^{2+} pela urina. Os poucos estudos que existem relacionando Zn e MgATP apresentam dados distintos ao deste trabalho. Exemplares de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) expostos ao Zn com temperatura em torno de 37 °C por 30 dias apresentaram aumento na atividade da MgATP (WATSON e BEAMISH, 1980). Neste caso, os autores entendem que a alta temperatura pode refletir em alterações na capacidade de ligação da MgATP aos seus substratos. Outro trabalho que expôs *O. niloticus* ao Zn por 5 e 10 dias mostrou aumento na atividade da MgATP no rim, em oposição ao que foi visto no presente trabalho (ATLI e CANLI, 2011). Essas diferenças de resultados podem estar relacionadas às espécies utilizadas,

evidenciando que *P. lineatus* apresenta sensibilidade da NKA, CaATP e MgATP, tanto na brânquia quanto no rim, quando o Zn está presente na água.

Os peixes absorvem Mg^{2+} principalmente a partir da alimentação, sendo que quantidades pouco significativas são captadas pela brânquia (KODZHAHINCHEV et al., 2017). Como os peixes utilizados no tempo experimental de 168 h foram obtidos de uma fonte diferente daqueles de 24 e 96 h, acredita-se que a forma como foram alimentados durante toda sua criação influenciou nas diferenças de concentração do Mg^{2+} plasmático, que foram visíveis mesmo entre os grupos CTR.

Em síntese, os resultados deste trabalho demonstraram que exposições agudas ao Zn promoveram acúmulo do metal no sangue, brânquia e principalmente no rim, enquanto que o fígado acumulou no tempo subcrônico, justamente por ser o órgão de detoxificação e bioacumulação. O Zn acarretou em diminuição na quantidade de eritrócitos do sangue, interferindo, portanto, no transporte de gases. As exposições agudas ao metal também resultaram em aumento da HATP branquial e renal, provavelmente associado ao excesso de H^+ do organismo, resultante de um possível aumento do metabolismo anaeróbico. Exposições mais prolongadas ao Zn levaram a diminuição na atividade da NKA, CaATP e MgATP da brânquia, culminando na incapacidade do peixe em manter os níveis normais de K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , de modo que eles passaram a apresentar, nesta ordem, hipocalcemia, hipocalcemia e hipomagnesemia. Finalmente, o Zn, nas concentrações testadas, previamente estabelecidas pela Resolução CONAMA causa diversos efeitos em *P. lineatus*.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dado o exposto, os resultados obtidos confirmam a hipótese levantada de que o Zn, em uma das concentrações previstas pela legislação brasileira, é prejudicial para *P. lineatus*. Por estas concentrações não se apresentarem seguras para a espécie, torna-se necessária uma revisão destes valores, a fim de evitar futuros prejuízos às populações e até mesmo aos ecossistemas aquáticos como um todo.

Ainda, os resultados apontados neste estudo proporcionaram uma melhor compreensão acerca do padrão de bioacumulação e efeitos osmorregulatórios do Zn no teleósteo de água doce *P. lineatus*, tanto no que diz respeito a exposição aguda, quanto subcrônica. Esta espécie também se consolida como potencial biomonitor para a região neotropical, e os parâmetros analisados, como consistentes biomarcadores para avaliação da contaminação aquática por Zn.

REFERÊNCIAS

- Adhikari, S.; Sarkar, B.; Chatterjee, A.; Mahapatra, C.T.; Ayyappan, S. Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, *Labeo rohita* (Hamilton). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 58:220–226, 2004.
- Agostinho, A.A.; Thomaz, S.M.; Gomes, L.C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Conservation Biology**. 1:646–652, 2005.
- Ali, H.; Khan, E.; Sajad, M.A. Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications. **Chemosphere** 91:869-881, 2013.
- Aluru, N.; Vijayan, M.M. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. **General and Comparative Endocrinology**. 164:142–150, 2009.
- Atli, G.; Canli, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 145:282–287, 2007.
- Atli, G.; Canli, M. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 25:33-38, 2008.
- Atli, G.; Canli, M. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology**. 20:1861–1869, 2011.
- Atli, G.; Canli, E.G.; Eroglu, A.; Dogan, Z.; Canli, M. Cadmium and lead alter the antioxidant and osmoregulation systems in the erythrocyte of fish (*Oreochromis niloticus*). **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. 16:361-369, 2016.
- Bagdonas, E.; Vosyliene, M.Z. A study of toxicity and genotoxicity of copper, zinc and their mixture to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Biologija**. 1:8–13, 2006.
- Baldisserotto, B.; Cyrino J.E.P.; Urbinati, E.C. Regulação Osmótica e Iônica. In: **Biologia e Fisiologia de Peixes Neotropicais de Água Doce**. FUNEP, UNESP, 2014.
- Barrionuevo, W.R.; Fernandes, M.N.; Rocha, O. Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. **Brazilian Journal of Biology**. 70:425-434, 2010.
- Bidinotto, P. M.; Moraes, G.; Souza, R. H. S. Hepatic glycogen and glucose in eight tropical fresh water teleost fish: a procedure for field determinations of micro samples. **Boletim Técnico CEPTA**. 10:53-60, 1997.
- Bijvelds, M.J.C.; Van der Velden, J.A.; Kolar, Z.I.; Flik, G. Magnesium transport in freshwater teleosts. **Journal of Experimental Biology**. 201:1981-1990, 1998.

- Bjerregaard, P.; Andersen, O. Ecotoxicology of metals – Sources, transport, and effects in the ecosystem. In: Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., Friberg, L.T. **Handbook on the Toxicology of Metals**. Academic Press, Elsevier, 2007.
- Bouron, A.; Oberwinkler, J. Contribution of calcium-conducting channels to the transport of zinc ions. **European Journal Physiology**. 466:381–387, 2014.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72:248-254, 1976.
- Bradley, T.J. **Animal Osmoregulation**. Oxford University Press, 2009.
- Cajaraville, M.P.; Bebianno, M.J.; 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. **Science of the Total Environment**. 247:295-311, 2000.
- Camargo, M.M.P.; Fernandes, M.N.; Martinez, C.B.R. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. **Aquatic Toxicology**. 94:40–46, 2009.
- Campos, M.L.; da Silva, F.N.; Neto, A.E.F.; Guilherme, L.R.G.; Marques, J.J.; Antunes, A.S. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. 40:361-367, 2005.
- Ceyhun, S.B.; Senturk, M.; Erdogan, O.; Kufrevioglu, O.I. In vitro and in vivo effects of some pesticides on carbonic anhydrase enzyme from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) gills. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 97:177-181, 2010.
- Ceyhun, S.B.; Sentürk, M.; Yerlikaya, E.; Erdogan, O.; Küfrevioglu, Ö.I.; Ekinci, D. Purification and characterization of carbonic anhydrase from the teleost fish *Dicentrarchus labrax* (European seabass) liver and toxicological effects of metals on enzyme activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 32:69–74, 2011.
- Chasiotis, H.; Kolosov, D.; Bui, P.; Kelly, S.P. Tight junctions, tight junction proteins and paracellular permeability across the gill epithelium of fishes: A review. **Respiratory Physiology & Neurobiology**. 184:269– 281, 2012.
- CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente. **Resolução Nº 357** de 17 de março de 2005.
- Decataldo, A.; Leo, A.D.; Giandomenico, S.; Cardellicchio, N. Association of metals (mercury, cadmium and zinc) with metallothionein-like proteins in storage organs of stranded dolphins from the Mediterranean Sea (Southern Italy). **Journal of Environmental Monitoring**. 6:361–367, 2004.
- DNPM. **Departamento Nacional de Produção Mineral**. Sumário mineral: Zinco. BRASIL. <<http://www.dnpm.gov.br/>> Acesso em fevereiro de 2017.
- Dragun, Z.; Podrug, M.; Raspor, B. Combined use of bioindicators and passive samplers for the assessment of river water contamination with metals. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 57:211-220, 2009.

- Ebrahimi, M.; Taherianfard, M. The effects of heavy metals exposure on reproductive systems of cyprinid fish from Kor River. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**. 10:13-26, 2011.
- Evans, D.H.; Piermarini, P.M.; Choe, K.P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. **Physiological Reviews**. 85:97–177, 2005.
- Evans, D.H. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. **American journal of physiology regulatory integrative and comparative physiology**. 295:704–713, 2008.
- Feeney, G.P.; Zheng, D.; Kille, P.; Hogstrand, C. The phylogeny of teleost ZIP and ZnT zinc transporters and their tissue specific expression and response to zinc in zebrafish. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1732:88–95, 2005.
- Hare, L. Trophic Transfer of Trace Elements. In: Férard, J.F.; Blaise, C. **Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology**. Springer Science, 2013.
- Fernandes, M.N.; Paulino, M.G.; Sakuragui, M.M.; Ramos, C.A; Pereira, C.D.S.; Sadauskas-Henrique, H. Organochlorines and metals induce changes in the mitochondria-rich cells of fish gills: An integrative field study involving chemical, biochemical and morphological analyses. **Aquatic Toxicology**. 126:180– 190, 2013.
- Fischer, P.W.; Giroux, A. Effects of dietary magnesium on sodium-potassium pump action in the heart of rats. **Bureau of Nutritional Sciences**. 252:2091-2095, 1987.
- Flik, G.; van der Velden, J.A.; Dechering, K.J.; Verbost, P.M.; Schoenmakers, T.J.M.; Kolar, Z.I.; Wendelaar-Bonga, S.E. Ca²⁺ and Mg²⁺ Transport in gills and gut of tilapia, *Oreochromis mossambicus*: a review. **Journal of Experimental Zoology**. 265:356-365, 1993.
- Gilmour, K.M.; Perry, S.F. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. **The Journal of Experimental Biology**. 212:1647-1661, 2009.
- Gonzalez, R.J., Wilson, R.W., Wood, C.M. Ion regulation in tropical fishes from ion-poor, acidic black waters. In: Val, A.L.; Almeida Val, V.M.; Randall, D.J. (Ed.). **The Physiology of Tropical Fishes**. Academic Press, 2006.
- Griffith, M.B. Toxicological perspective on the osmoregulation and ionoregulation physiology of major ions by freshwater animals: teleost fish, crustacea, aquatic insects, and Mollusca. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 36:576–600, 2017.
- Gupta, P.; Srivastava, N. Effects of sub-lethal concentrations of zinc on histological changes and bioaccumulation of zinc by kidney of fish *Channa punctatus* (Bloch). **Journal of Environmental Biology**. 27:211-215, 2006.
- Hattink, J.; De Boeck, G.; Blust, R. Toxicity, accumulation, and retention of zinc by carp under normoxic and hypoxic conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 25:87–96, 2006.
- Hirose, S.; Kaneko, T.; Naito, N.; Takei, Y. Molecular biology of major components of chloride cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 136:593–620, 2003.

- Hogstrand, C. Zinc. In: Wood, C., Farrell, A.P., Brauner, C.J. **Fish Physiology**. Academic Press, Elsevier, 2012.
- Holmes, W.N.; Donaldson, E.M. The body compartments and the distribution of electrolytes. In: Hoar, W.S.; Randall, D.J. **Excretion, ionic regulation and metabolism**, Academic Press, 1969.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 148:479–497, 2007.
- Hwang, P.P.; Lee, T.H.; Lin, L.Y. Ion regulation in fish gills: recent progress in the cellular and molecular mechanisms. **American journal of physiology regulatory integrative and comparative physiology impact factor**. 301:28–47, 2011.
- ICZ. **Instituto de metais não ferrosos**. <<http://www.icz.org.br/>> Acesso em fevereiro de 2017.
- Inoue, K.; O'Bryant, Z.; Xiong, Z. Zinc-permeable ion channels: effects on intracellular zinc dynamics and potential physiological/pathophysiological significance. **Current Medical Chemistry**. 22:1248–1257, 2015.
- IZA. **International Zinc Association**. <<http://www.zinc.org/basics/>>. Acesso em fevereiro de 2017.
- Jaishankar, M.; Tseten, T.; Anbalagan, N.; Mathew, B.B.; Beeregowda, K.N. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**. 7(2): 60–72, 2014.
- Kaya, E.D.; Söyüt, H.; Beydemir, S. The toxicological impacts of some heavy metals on carbonic anhydrase from gilthead sea bream (*Sparus aurata*) gills. **Environmental toxicology and pharmacology**. 39:825–832, 2015.
- Kaya, H.; Aydin, F.; Gürkan, M.; Yilmaz, S.; Ates, M.; Demir, V.; Arslan, Z. A comparative toxicity study between small and large size zinc oxide nanoparticles in tilapia (*Oreochromis niloticus*): Organ pathologies, osmoregulatory responses and immunological parameters. **Chemosphere**. 144:571-582, 2016.
- Kodzhahinchev, V.; Kovacevic, D.; Bucking, C. Identification of the putative goldfish (*Carassius auratus*) magnesium transporter SLC41a1 and functional regulation in the gill, kidney, and intestine in response to dietary and environmental manipulations. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 206:69–81, 2017.
- Kousar, S.; Javed, M. Heavy metals toxicity and bioaccumulation patterns in the body organs of four freshwater fish species. **Pakistan Veterinary Journal**. 34:161-164, 2014.
- Lam, P.K.S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**. 52:348–354, 2009.
- 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**. 147:222–231, 2008.
- Lavanya, S.; Ramesh, M.; Kavitha, C.; Malarvizhi, A. Hematological, biochemical and ionoregulatory responses of Indian major carp *Catla catla* during chronic sublethal exposure to inorganic arsenic. **Chemosphere**. 82:977–985, 2011.

- Lima, M.A.; Soares, M.O.; Paiva, C.C.; Osório, F.M.; Porfírio, A.F.; Matthews-Cascon, H. Osmorregulação em moluscos: o caso do bivalve estuarino tropical *Anomalocardia brasiliiana* (Mollusca: Bivalvia). **Conexões: Ciência e Tecnologia**. 5:79-84 2009.
- Lins, J.A.P.N.; Kirschnik, P.G.; Queiroz, V.S.; Cirio, S.M. Uso de peixes como biomarcadores para monitoramento ambiental aquático. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**. 8:469-484, 2010.
- Liu, D.; Guo, H.; Chen.; Wang, Y. Effect of cadmium on the extracellular Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the gill and small intestine of Goldfish *Carassius auratus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 37:672–678, 2014.
- Magalhães, D.P.; Filho, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. 12:355-381, 2008.
- Marshall, W.S. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. **Journal of Experimental Zoology**. 293:264–283, 2002.
- Martinez, C.B.R. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água. In: Silva-Souza, A.T. **Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil**, Maringá: ABRAPOA, 2006.
- Martinez, C.B.R. The kidney. **Reference Module in Life Sciences**, 2017.
- 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. **A Bacia do Rio Tibagi**. Londrina: MC Gráfica, 2002.
- Martinez, C.B.R.; Souza, M.M. Acute effects of nitrite on ion regulation in two neotropical fish species. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 133:151-160, 2002.
- Martins, S. E.; Bianchini, A. J. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. **Journal of Environmental Monitoring**. 13:1866-1875, 2011.
- Mishra, S.; Srivastava, A.K. Hematology as index of sublethal toxicity of zinc in a freshwater teleost. **Environmental Contamination and Toxicology**. 22:695-698, 1979.
- MME, 2009. **Ministério de Minas e Energia**. Relatório Técnico 65: Perfil do zinco. BRASIL. <<http://www.mme.gov.br/>> Acessado em fevereiro de 2017.
- Monserrat, J.M.; Geracitano, L.A.; Bianchini, A. Current and future perspectives using biomarkers to assess pollution in aquatic ecosystems. **Comments on Toxicology**. 9:255-269, 2003.
- Nascimento, C.R.B.; Souza, M.M.; Martinez, C.B.R. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 155:456–461, 2012.
- Navarro, C.D.C.; Martinez, C.B.R. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater

- teleost *Prochilodus lineatus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 165:83–90, 2014.
- Neto, M.L.F.; Ferreira, A.P. Perspectivas da sustentabilidade ambiental diante da contaminação química da água: desafios normativos. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**. 2(4), 2007.
- Newman, M.C.; Clements, W.H. **Ecotoxicology: A Comprehensive Treatment**, CRC Press, 2008.
- Newton, T.J.; Cope, W.G. Biomarker responses of Unionid mussels to environmental contaminants. In: Farris, J.L.; Van Hassel, J.H. **Freshwater bivalve ecotoxicology**. CRC Press, 2007.
- Nikinmaa, M. **An Introduction to Aquatic Toxicology**. Academic Press, Elsevier, 2014.
- Olivi, P.; Costa, C.R.; Botta, C.M.R.; Espindola, E.L.G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. 31:1820-1830, 2008.
- Öner, M.; Atli, G.; Canli, M. Changes in serum biochemical parameters of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following prolonged metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 27:360–366, 2008.
- Palaniappan, P.L.R.M.; Nishanth, T.; Renju, V.B. Bioconcentration of zinc and its effect on the biochemical constituents of the gill tissues of *Labeo rohita*: An FT-IR study. **Infrared Physics & Technology**. 53:103–111, 2010.
- Palermo, F.F.; Risso, W.E.; Simonato, J.D.; Martinez, C.B.R. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 116:19–28, 2015.
- Paulino, M.G.; Sakuragui, M.M.; Fernandes, M.N. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**. 86:1–7, 2012.
- Perry, S.F.; Shahsavarani, A.; Georgalis, T.; Bayaa, M.; Furimsky, M.; Thomas, S.L.Y. Channels, pumps, and exchangers in the gill and kidney of freshwater fishes: their role in ionic and acid-base regulation. **Journal of Experimental Zoology**. 300:53–62, 2003.
- Ribeiro, A.M.; Risso, W.E.; Fernandes, M.N.; Martinez, C.B.R. Lead accumulation and its effects on the branchial physiology of *Prochilodus lineatus*. **Fish Physiology and Biochemistry**. 40:645-57, 2014.
- Rocha, C.T.; Souza, M.M. The influence of lead on different proteins in gill cells from the freshwater bivalve, *Corbicula fluminea*, from defense to repair biomarkers. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 62:56-67, 2012.
- Shariati, F.; Shariati, S. Review on methods for determination of metallothioneins in aquatic organisms. **Biological Trace Element Research**. 141:340–366, 2011.

- Shibatta, O.A.; Gealh, A.M.; Bennemann, S.T. Ichthyofauna from the middle and upper stretches of rio Tibagi basin, Paraná, Brazil. **Biota Neotropica**. 7:125-134, 2007.
- Shrivastava, P.; Saxena, A.; Swarup, A. Heavy metal pollution in a sewage-fed lake of Bhopal, (M. P.) India. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**. 8:1-4, 2003.
- Shuhaimi-Othman, M.; Yakub, A.; Ramle, N.; Abas, A. Comparative toxicity of eight metals. **Toxicology and Industrial Health**. 31:773-782, 2013.
- Shyn, A.; Chalk, S. J.; Smith, K.; Charnock, N.L.; Bielmyer, G.K. Zinc distribution in the organs of adult *Fundulus heteroclitus* after waterborne zinc exposure in freshwater and saltwater. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. 63:544–553, 2012.
- Silva, A.O.F.; Martinez, C.B.R. Acute effects of cadmium on osmoregulation of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*: Enzymes activity and plasma ions. **Aquatic Toxicology**. 156:161–168, 2014.
- Speranza, E.D.; Cappelletti, N.; Migoya, M.C.; Tatone, L.M.; Colombo, J.C. Migratory behaviour of a dominant detritivorous fish *Prochilodus lineatus* evaluated by multivariate biochemical and pollutant data. **Journal of Fish Biology**. 81:848–865, 2012.
- Suvetha, L.; Ramesh, M.; Saravanan, M. Influence of cypermethrin toxicity on ionic regulation and gill Na^+/K^+ -ATPase activity of a freshwater teleost fish *Cyprinus carpio*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 29:44–49, 2010.
- Takasusuki, J.; Araujo, M.R.R.; Fernandes, M.N. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). **Environmental Contamination and Toxicology**. 72:1075-1082, 2004.
- Taweel, A.; Shuhaimi-Othman, M.; Ahmad, A.K. In vivo acute toxicity tests of some metals to tilapia fish (*Oreochromis niloticus*). **Journal of Biological Sciences**. 13:365-371, 2013.
- Tellis, M.S.; Alsop, D.; Wood, C.M. Effects of copper on the acute cortisol response and associated physiology in rainbow trout. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 155:281–289, 2012.
- Totti, A.; Chida, A.Y.; Tomita, H.K.; Porto, J.; Ogura, L.L.; Leal, S. Marcadores de poluição. **Química das Águas**. QFL – 3201. São Paulo, 2007.
- Tunçsoy, M.; Erdem, C. Accumulation of copper, zinc and cadmium in liver, gill and muscle tissues of *Oreochromis niloticus* exposed to these metals separately and in mixture. **Fresenius Environmental Bulletin**. 23:1143-1149, 2014.
- Van Der Oost, R.; Beyer, J.; Vermeulen, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 13:57-149, 2003.
- Viarengo A, Burlando B, Evangelisti V, Mozzone S, Dondero F. Sensitivity and specificity of metallothionein as a biomarker for aquatic environment biomonitoring. In: Garrigues P.H., Barth H, Walker C.H., Narbonne J.F.

- Biomarkers in marine organisms: a practical approach.** Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2001.
- Vosylienė, M.Z. The effect of heavy metals on haematological indices of fish (survey). **Acta Zoologica Lituanica.** 9:76-82, 1999.
- Watson, T.A.; Beamish, F.W.H. Effects of zinc on branchial ATPase activity in vivo in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Comparative Biochemistry Physiology.** 66:77-82, 1980.
- Widdows, J. Physiological measurements. In: Bayne, B.L.; Brown, D.A.; Burns, K.; Dixon, D.R.; Ivanovici, A.; Livingstone, D.R.; Lowe, D.M.; Moore, M.N.; Stebbing, A.R.D.; Widdows, J. (Eds.). **The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals.** Praeger Scientific, 1985.
- Witeska, M.; Kosciuk. The changes in common carp blood after short-term zinc exposure. **Environmental Science and Pollution Research.** 10:284–286, 2003.
- Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações,** Editora Rima, 2. ed., 2008.
- Zheng, D.; Feeney, G.P.; Kille, P.; Hogstrand, C. Regulation of ZIP and ZnT zinc transporters in zebrafish gill: zinc repression of ZIP10 transcription by an intronic MRE cluster. **Physiology Genomics.** 34:205–214, 2008.
- Zheng, D.; Feeney, G.P.; Handy, R.D.; Hogstrand, C.; Kille, P. Uptake epithelia behave in a cell-centric and not systems homeostatic manner in response to zinc depletion and supplementation. **Metallomics.** 6:154—165, 2014.