



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA EMANUELA RODRIGUES ALVES DOS SANTOS

**EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E FISIOLÓGICOS
DO CROMO E SEU ACÚMULO NO PEIXE NEOTROPICAL
*PROCHILODUS LINEATUS***

Londrina
2013

FERNANDA EMANUELA RODRIGUES ALVES DOS SANTOS

**EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E FISIOLÓGICOS
DO CROMO E SEU ACÚMULO NO PEIXE NEOTROPICAL
*PROCHILODUS LINEATUS***

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

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

Londrina
2013

**Catlogação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S237e Santos, Fernanda Emanuela Rodrigues Alves dos.
Efeitos bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos do cromo e seu acúmulo no peixe neotropical *Prochilodus lineatus* / Fernanda Emanuela Rodrigues Alves dos Santos. – Londrina, 2013.
71 f. : il.

Orientador: Cláudia Bueno dos Reis Martinez.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2013.
Inclui bibliografia.

1. *Prochilodus lineatus* – Teses. 2. Marcadores biológicos – Teses. 3. Peixe – Efeito dos metais – Teses. 4. Stress oxidativo – Teses. 5. Regulação osmótica – Teses. I. Martinez, Cláudia Bueno dos Reis. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. III. Título.

CDU 597.554.1

FERNANDA EMANUELA RODRIGUES ALVES DOS SANTOS

**EFEITOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E FISIOLÓGICOS DO
CROMO E SEU ACÚMULO NO PEIXE NEOTROPICAL
*PROCHILODUS LINEATUS***

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

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Bueno dos
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Mário Luis Orsi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Londrina, 22 de março de 2013.

DEDICO

À minha **mãe**, meu porto seguro,
pelo amor incondicional, pelo incentivo inesgotável
e pela imensa ajuda durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente.

À minha mãe **Terezinha** e meu pai **Ademar** (*in memoriam*) que sempre foram meus exemplos de vida e jamais deixaram de me apoiar. O meu eterno, muitíssimo obrigada.

Aos meus irmãos **David** e **Herbert** por todo carinho e companheirismo que a distância jamais apagou.

A toda minha família, em especial à minha tia **Odila** e minha avó **Rosalina** que sempre me ajudaram e se preocuparam comigo.

À professora **Cláudia** pela atenção, paciência e pelo conhecimento transmitido durante esses anos.

A todos os meus **amigos do LEFA** por toda ajuda e pelos ótimos e inesquecíveis momentos compartilhados ao longo desse período.

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

À **Estação de Piscicultura** da UEL.

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

À minha banca de qualificação: professores **Juliana Delantim Simonato** e **Paulo César Meletti**.

À minha banca de defesa da dissertação: professores **Marisa Narciso Fernandes** e **Mário Luís Orsi**.

E a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram e colaboraram com a realização deste trabalho.

SANTOS, F.E.R.A. Efeitos bioquímicos, genotóxicos e fisiológicos do cromo e seu acúmulo no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. 2013. 71 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Zootecnia, Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O cromo é um metal de grande importância econômica, utilizado principalmente em atividades de galvanoplastia e curtimento de couro que geram grande volume de efluentes contendo o metal e que acabam atingindo os recursos hídricos. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar o acúmulo de cromo em diferentes tecidos da espécie neotropical *Prochilodus lineatus* e caracterizar os efeitos deste metal em parâmetros genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos do animal. Para tal, juvenis de *P. lineatus* foram expostos à três concentrações nominais de cromo: 50, 100 e 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50, Cr 100 e Cr 150, respectivamente) ou somente à água (controle) por 24 h. A menor concentração testada, 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$, corresponde a concentração máxima permitida para este metal para águas doces brasileiras conforme Resolução CONAMA 357 (2005). Após a exposição os peixes foram amostrados para a coleta de sangue e para a retirada dos órgãos. Para quantificar o acúmulo tecidual do cromo foram utilizados as brânquias, fígado, rim, músculo e as células do sangue. Para as análises genotóxicas foram utilizadas células sanguíneas, a fim de verificar possíveis danos no DNA por meio do ensaio do cometa. As brânquias e o fígado foram utilizadas para a determinação do conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO). A quantificação de metalotioneínas (MTs) foi realizada nas brânquias, fígado, rim e músculo. Amostras de sangue foram utilizadas para as análises de parâmetros hematológicos e as concentrações dos íons Na^+ , K^+ , Cl^- e Ca^{2+} , assim como a osmolalidade e glicemia, foram avaliadas no plasma. A atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (NKA) e anidrase carbônica (CA) foram mensuradas nas brânquias. Os resultados mostraram que o acúmulo de cromo foi maior nas brânquias e o conteúdo de MTs foi maior no fígado dos peixes dos três grupos expostos ao cromo. Houve diminuição de GSH no tecido hepático dos grupos Cr 100 e Cr 150 e a LPO, nos três grupos experimentais, foi mais baixa em relação ao grupo controle. Verificou-se aumento de danos no DNA das células sanguíneas dos peixes expostos ao cromo. Dentre os parâmetros hematológicos, o número de eritrócitos por mm^3 de sangue (RBC) foi menor nos três grupos expostos ao cromo, mas o hematócrito foi menor apenas no grupo Cr 150. A concentração de hemoglobina não sofreu alterações significativas. A concentração de K^+ aumentou nos grupos Cr 100 e Cr 150. A concentração de Cl^- diminuiu no grupo Cr 50 e a de Ca^{2+} diminuiu nos grupos Cr 100 e Cr 150. A osmolalidade foi maior em relação ao controle no grupo Cr 150, mas a glicemia não sofreu alterações. Ambas as enzimas branquiais analisadas sofreram redução em sua atividade: NKA diminuiu nos grupos Cr 100 e Cr 150 e a AC no grupo Cr 150, em relação ao grupo controle. Assim, este trabalho nos possibilita inferir que o cromo, nas concentrações testadas, pode ocasionar danos no DNA, alterações em parâmetros oxidativos e no equilíbrio osmoiônico de *P. lineatus* e ainda, que a concentração máxima de cromo permitida pela legislação brasileira para águas doces pode comprometer a saúde deste peixe neotropical.

Palavras-chave: Biomarcadores. Estresse oxidativo. Hematologia. Metalotioneínas. Osmorregulação. Teste do cometa.

SANTOS, F.E.R.A. The biochemical, physiological and genotoxic effects of chromium and its accumulation in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. 2013. 71 p. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Zoologia, Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

ABSTRACT

Chromium is a metal of great economic importance, used mainly during electroplating and leather tanning that generates large volumes of effluent containing metal that eventually can reach water bodies. Thus, the objective of this study was to determine the accumulation of chromium in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus* and investigate its effects on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the animal. Juveniles of *P. lineatus* were exposed to three nominal chromium concentrations: 50, 100 and 150 μL^{-1} (Cr 50, Cr 100 and Cr 150, respectively) or only to water (control) in static acute toxicity tests for 24 h. The lowest concentration tested (50 μL^{-1}) corresponds to the maximum chromium concentration allowed by the Brazilian guidelines (CONAMA 357, 2005) for freshwater. After the exposure period, the fish were sampled for the withdrawn of blood and removal of organs. The chromium accumulation was measured in gills, liver, kidney, muscle and blood cells. Red blood cells were also used for genotoxic analysis, in order to verify DNA damage by using the comet assay. Gills and liver samples were used for the determination of reduced glutathione content (GSH) and lipid peroxidation (LPO); the content of metallothioneins was measured in gills, liver, kidney and muscle. Blood samples were used for the hematologic analysis and the determination of plasma ions (Na^+ , K^+ , Cl^- and Ca^{2+}) and glucose concentrations as well as osmolality. The activity of the enzymes Na^+/K^+ -ATPase (NKA) and carbonic anhydrase (CA) were measured in the gills. The results showed that chromium accumulation was larger in the gills and MT content was larger in the liver of fish exposed to the three chromium concentrations tested. There was a decrease in GSH in the hepatic tissue of fish from the groups Cr 100 and Cr 150 and in LPO in fish from all experimental groups, in relation to control group. An increase in DNA damage was verified in blood cells of fish exposed to chromium. The number of red blood cells per mm^3 of blood was lower in fish from all chromium groups in relation to control, but the hematocrit was lower only in the group Cr 150. Hemoglobin content did not show any significant alteration. Plasma K^+ concentration increased in fish from Cr 100 and Cr 150. On the other hand, plasma Cl^- decreased in fish from Cr 50 and Ca^{2+} decreased in fish from Cr 100 and Cr 150. Plasma osmolality was higher in fish from the group Cr 150 in relation to control, but plasma glucose did not show any significant alteration. Both branchial enzymes showed reduced activity after chromium exposure when compared to respective control: NKA decrease in fish from Cr 100 and Cr 150 and AC in fish from Cr 150. In conclusion, this work showed that chromium, in the concentrations tested, can promote DNA damages, significant changes in oxidative parameters and osmoionic imbalances in *P. lineatus* and further, that the maximum concentration of chromium permitted by Brazilian law for freshwaters can impair the health of this Neotropical fish.

Keywords: Biomarkers. Comet assay. Hematology. Metallothioneins. Osmoregulation. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Indivíduo juvenil de *Prochilodus lineatus*. (Fonte: LEFA/UEL) 14
- Figura 2** - Processo de lipoperoxidação 17
- Figura 3** - Classificação visual dos cometas de acordo com o grau de dano no DNA. As caudas representam a migração do material genético danificado. A - dano 0 (sem danos); B - dano 1; C - dano 2; D - dano 3 (máximo dano)..... 19
- Figura 4** - Concentração (média \pm EP, n: 6-8) de GSH (A) e MDA (B) no fígado de *P. lineatus* após 24 h de exposição ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).....33
- Figura 5** - Concentração de metalotioneínas (média \pm EP, n: 5-7) no fígado (A), brânquias (B), rim (C) e músculo (D) de *P. lineatus* após 24 h de exposição ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).....34
- Figura 6** - Concentração de cromo (média \pm EP, n: 5-8) no fígado (A), brânquias (B), rim (C), músculo (D) e células do sangue (E) de *P. lineatus* após 24 h de exposição ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).....35
- Figura 7** - Escore de danos (média \pm EP, n = 8) em eritrócitos de *P. lineatus* após 24 h de exposição ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).....36
- Figura 8** - Parâmetros hematológicos (média \pm EP, n = 5-8): hematócrito (A), concentração de hemoglobina (B) e número de eritrócitos (C) de *P. lineatus* expostos ao cromo nas concentrações de 50

	$\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR) durante 24h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$)	53
Figura 9 -	Concentração plasmática (média \pm EP, n = 6-8) de sódio (A), potássio (B), cloreto (C) e cálcio (D) de <i>P. lineatus</i> expostos ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR) durante 24h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$)	54
Figura 10 -	Concentração (média \pm EP, n = 6-8) osmótica e de glicose no plasma de <i>P. lineatus</i> expostos ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR) durante 24h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$)	55
Figura 11 -	Atividade (média \pm EP, n = 6-7) das enzimas Na^+/K^+ -ATPase (A) e anidrase carbônica (B) em brânquias de <i>P. lineatus</i> expostos ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR) durante 24h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).....	55

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	11
1.1	Contaminação aquática por metais	11
1.2	Cromo	12
1.3	Modelo experimental	13
1.4	Biomarcadores	14
1.4.1	Estresse oxidativo e defesas antioxidantes	15
1.4.1.1	Peroxidação lipídica (LPO)	16
1.4.1.2	Danos no DNA	18
1.4.1.3	Metalotioneínas (MTs)	19
1.5	Acúmulo de metais nos tecidos	20
1.6	Parâmetros hematológicos	21
1.7	Parâmetros osmoiônicos	21
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	MANUSCRITO I: EFEITOS DO CROMO NO TELEÓSTEO <i>Prochilodus lineatus</i> : DANOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E ACÚMULO EM DIFERENTES TECIDOS	24
	RESUMO	25
3.1	INTRODUÇÃO	26
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	28
3.2.1	Manutenção dos animais e exposição ao cromo	28
3.2.2	Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO)	29
3.2.3	Quantificação de proteínas semelhantes às metalotioneínas	29
3.2.4	Quantificação de cromo nos tecidos e na água	30
3.2.5	Quantificação de danos no DNA – Ensaio do cometa	30
3.2.6	Análises estatísticas	31
3.3	RESULTADOS	32
3.3.1	Parâmetros da água	32
3.3.2	Conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica	32
3.3.3	Concentração de proteínas semelhantes às metalotioneínas	33
3.3.4	Acúmulo de cromo nos tecidos	34
3.3.5	Danos no DNA	36
3.4	DISCUSSÃO	37
3.5	CONCLUSÕES	41

3.6	AGRADECIMENTOS.....	41
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
4	MANUSCRITO II: ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E OSMORREGULATÓRIAS CAUSADAS PELO CROMO NO TELEÓSTEO <i>Prochilodus lineatus</i>	45
	RESUMO	46
4.1	INTRODUÇÃO.....	47
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.2.1	Aclimação dos peixes e exposição ao cromo	49
4.2.2	Análise dos parâmetros hematológicos	50
4.2.3	Análise da osmolalidade e concentração de íons e glicose no plasma	50
4.2.4	Determinação da atividade das enzimas Na ⁺ /K ⁺ - ATPase (NKA) e Anidrase Carbônica (AC).....	50
4.2.5	Análise estatística.....	51
4.3	RESULTADOS	52
4.3.1	Parâmetros da água	52
4.3.2	Parâmetros hematológicos	52
4.3.3	Íons plasmáticos, osmolalidade e glicemia	54
4.3.4	Atividade branquial da Na ⁺ /K ⁺ - ATPase e Anidrase Carbônica.....	55
4.4	DISCUSSÃO.....	56
4.5	CONCLUSÕES.....	59
4.6	AGRADECIMENTOS.....	59
4.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59
5	CONCLUSÕES GERAIS	63
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	64

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Contaminação aquática por metais

A crescente urbanização e industrialização nas últimas décadas têm gerado consequências indesejáveis aos ecossistemas (GUPTA et al., 2009). Os ambientes aquáticos são os principais alvos de despejos e dejetos e acabam recebendo diretamente os agentes químicos provenientes de indústrias e centros domésticos além de escoamentos superficiais urbanos e agrícolas (DORNFELD, 2006).

Sedimentos contaminados, fontes difusas e fontes pontuais são as três classes básicas de fonte de poluição no ambiente. As descargas diretas de efluentes industriais e urbanos no ambiente aquático são denominadas fontes pontuais de poluição e as fontes difusas, por sua vez, são caracterizadas pela entrada de contaminantes por diversos pontos de origem como os lençóis freáticos, deposição atmosférica e resíduos agrícolas (DOUST et al., 1994).

Entre as muitas substâncias tóxicas que afetam os ecossistemas aquáticos estão os metais, que vêm recebendo atenção especial por se tratarem de contaminantes que não são biodegradados ou biotransformados, permanecendo dentro do ecossistema e de cadeias alimentares (SMITH, 1993). Uma vez no ambiente, os metais podem ser transportados através de vários processos, dependendo de sua origem, de suas propriedades físico-químicas e das quantidades presentes (SUNDA & HUNTSMAN, 1998). Alguns estudos sugerem que grande parte dos metais lançados em ambientes aquáticos acaba sendo depositada no sedimento sob formas não biodisponíveis, diminuindo a concentração disponível à biota (CALMANO et al., 1993). Entretanto, animais filtradores e detritívoros podem apresentar concentrações elevadas de metais em seus tecidos, uma vez que esses contaminantes são substâncias tóxicas e bioacumulativas, caracterizando uma via de entrada para os metais nas cadeias alimentares (REEVE, 1994).

Os metais ocorrem naturalmente em baixas concentrações, na ordem de nanogramas a microgramas por litro (BINEY, 1994) e alguns deles apresentam papel fundamental para a realização das funções vitais são os chamados metais essenciais que, em pequenas quantidades, são necessários para o bom funcionamento do organismo, possuindo importante papel no metabolismo desses

organismos. Entretanto, quando encontrados em níveis excessivos, tais elementos podem ser extremamente tóxicos (ROESIJADI & ROBINSON, 1993).

Como consequência da interação entre metais e organismos pode-se citar alguns distúrbios relacionados aos mecanismos fisiológicos e bioquímicos dos peixes, que são organismos importantes para o equilíbrio do ecossistema (ATLI & CANLI, 2007; BASHA & RANI, 2003). Os metais podem ser absorvidos por esses animais através do tegumento, pelas brânquias, via alimentação ou via tomada de água, no caso dos peixes marinhos. Quando absorvidas, essas substâncias podem se ligar a proteínas e serem transportadas pelo sangue, podendo se acumular nas brânquias, tecido adiposo, rim, músculo e fígado (HEATH, 1995).

1.2 Cromo

O cromo foi descoberto na Rússia em 1765 por P. S. Pallas, mas foi isolado somente em 1797 pelo químico francês Louis-Nicholas Vauquelin a partir do tratamento de crocoita ($PbCrO_4$) com ácido clorídrico (ARFSTEN et al., 1998). Alguns anos depois, o químico alemão Tassaert encontrou o cromo em um novo minério: a cromita ($FeCr_2O_4$). A partir de então vários compostos de cromo passaram a ser utilizados e, em 1820, o dicromato de potássio já era um dos mais empregados como pigmento da indústria têxtil (ARFSTEN et al., 1998).

A produção mundial de cromita, em 2010, foi de 22,52 Mt, 14,51% superior a 2009 (BRASIL, 2011). Os principais segmentos que utilizam o cromo são as indústrias químicas e as indústrias de aço, de ligas de ferro e de refratários. Dependendo do teor em Cr_2O_3 (óxido de cromo III) e da razão Cr/Fe, a cromita é classificada como metalúrgica, química ou refratária. O cromo não tem substituto na fabricação de aços inoxidáveis ou na produção de superligas devido aos custos mais elevados e de aplicações limitadas de outros elementos (BRASIL, 2009).

A maior parte da produção global de cromita, cerca de 94%, é absorvida pela indústria metalúrgica na produção de ligas de ferro-cromo, essencial para a produção de aço inoxidável e ligas especiais. A indústria de refratários e a produção de areia de fundição respondem pela demanda de 4% da produção global deste mesmo minério. Os tijolos refratários são empregados no revestimento de fornos metalúrgicos, no refinamento das ligas dos metais não-ferrosos, na fabricação de vidros e na produção de cimento. A indústria química responde pela demanda

remanescente de 2%. A principal aplicação é a produção de pigmentos empregados em atividades de curtimento couros e de tecidos e na eletroplastia (BRASIL, 2009).

O cromo pode ser encontrado em alguns estados de oxidação, onde os mais importantes são o Cr^{+2} (reduzido), Cr^{+3} (mais estável) e o Cr^{+6} (oxidante) (BARCELO et al., 1985). Uma vez absorvido pelo organismo, o Cr^{+6} pode sofrer redução metabólica no interior da célula pela ação de redutores como o ácido ascórbico (STANDEVEN & WETTERHAHN, 1992), grupos tiol de baixo peso molecular como a glutatona reduzida (GSH) (KORTENKAMP et al., 1996) e cisteína (QUIEVRYN et al., 2003).

Através desses agentes redutores ocorre a transferência de uma série de elétrons resultando em intermediários de Cr^{+6} até o Cr^{+3} (STEARNS et al., 1995) que é uma molécula capaz de formar ligações com aminoácidos, DNA e RNA ou proteínas (WOLF et al., 1989), induzir mutações (YANG et al., 1992) e distribuir-se nos tecidos em função de sua quantidade (MERTZ, 1969).

O Cr^{+3} é encontrado em muitos suplementos alimentares e considerado um micronutriente necessário para atividade metabólica da insulina (ANDERSON, 1981). Acredita-se que o cromo é capaz de aumentar a ligação da insulina com as células aumentando o número de receptores (ANDERSON, 1998). Já o Cr^{+6} é mais tóxico que o Cr^{+3} (BAGCHI et al., 2002; BLASIAK e KOWALIC, 2000; VALKO et al., 2005; LUSHCHAK et al., 2009) e atravessa as membranas celulares com mais facilidade através de carregadores não específicos (DANIELSSON et al., 1982).

1.3 Modelo experimental

Muitos organismos podem ser utilizados como bioindicadores, tendo como critério para a escolha espécies que sejam representativas dos ecossistemas a serem monitorados (BURGER & GOCHFELD, 2000), que tenham uma taxonomia e biologia bem definidas e que sejam facilmente coletadas, facilitando assim os trabalhos laboratoriais (BUSS et al., 2003). Dentre os vários organismos utilizados para o monitoramento da qualidade dos ecossistemas aquáticos os peixes destacam-se em vários estudos, pois são muito utilizados na alimentação humana e possuem grande importância ecológica, ocupando uma posição chave na cadeia trófica (FLOTEMERSCH et al., 2006; VIARENGO et al., 2007).

A espécie *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes, Prochilodontidae), também conhecida como curimba ou curimbatá, é uma espécie de médio a grande porte e está incluída dentre as migradoras de longa distância do Rio Paraná (AGOSTINHO & JULIO JUNIOR, 1999) (Fig.1). Esses peixes são considerados importantes na pesca artesanal e comercial em vários rios brasileiros (AGOSTINHO et al., 2007), além de desempenharem importante função na cadeia trófica pela participação de seus ovos, larvas, alevinos e adultos na dieta de aves aquáticas e peixes predadores (PEREIRA et al., 2004). Encontrada em rios e lagoas marginais, essa espécie alimenta-se de detritos e sedimentos (HAHN et al., 2004).

Esta espécie é considerada um ótimo bioindicador, uma vez que mostra-se bastante sensível à presença de poluentes aquáticos, podendo ser, portanto, empregada com sucesso em testes de toxicidade (WINKALER et al., 2001; MARTINEZ e CÓLUS, 2002).

Figura 1 – Indivíduo juvenil de *Prochilodus lineatus*



(Fonte: LEFA/UEL).

1.4 Biomarcadores

O uso de biomarcadores está intimamente associado com a Ecotoxicologia, um domínio da ciência cujo objetivo é entender e prever efeitos de contaminantes em comunidades naturais sob pressão antrópica (CHAPMAN, 2002). Biomarcadores são definidos como alterações biológicas decorrentes da exposição a estressores, evidenciadas como alterações bioquímicas, celulares, histológicas, fisiológicas ou comportamentais (DEPLEDGE, 1992). As características mais importantes dos biomarcadores envolvem o fato de permitirem a identificação das interações que ocorrem entre os contaminantes e os organismos vivos, e a possibilidade de

mensurar os efeitos subletais permitindo a prática de ações remediadoras e preventivas (JESUS & CARVALHO, 2008).

Os biomarcadores podem ser classificados como de efeito, suscetibilidade ou exposição. Os biomarcadores de efeito não são específicos em relação aos estressores e não fornecem informações sobre a sua natureza, mas evidenciam a ocorrência de uma alteração que poderá ser reversível a partir do momento em que o estressor cessar a atuação (WINZER et al., 2001). Os biomarcadores de suscetibilidade podem ser definidos como indicadores de processos que causam variações de respostas ao longo do tempo (BARRET et al., 1997). Já os biomarcadores de exposição são alterações biológicas que evidenciam a exposição dos organismos a um poluente. Exemplos de biomarcadores de exposição são alguns parâmetros bioquímicos, como as enzimas presentes no tecido hepático, envolvidas na detoxificação de contaminantes e seus metabólitos, englobando as enzimas de biotransformação de fase I e fase II, cofatores e enzimas antioxidantes (LECH & VODICNIK 1985).

1.4.1 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes

O oxigênio é fundamental no processo de produção de energia (ATP) nos organismos aeróbicos. As moléculas de oxigênio são reduzidas a água, através de reações de oxidação por complexos que compõem a cadeia respiratória e, a partir dessas reações, vários produtos do metabolismo do oxigênio podem ser formados, dando origem às espécies reativas de oxigênio (ERO) (FERRANTE et al., 2008; AMADO et al., 2009) como o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), iniciando processos degenerativos.

Os danos oxidativos surgem quando os mecanismos de defesa do animal responsáveis pela remoção de ERO são inadequados ou insuficientes para combater seu excesso, prejudicando a capacidade oxidante da célula e promovendo o que chamamos de estresse oxidativo (MASELLA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2006).

Mecanismos antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos são responsáveis pela neutralização das ERO a fim de proteger os componentes celulares de possíveis danos oxidativos (VALAVANIDIS et al., 2006). As defesas antioxidantes não enzimáticas possuem baixo peso molecular e são representadas principalmente

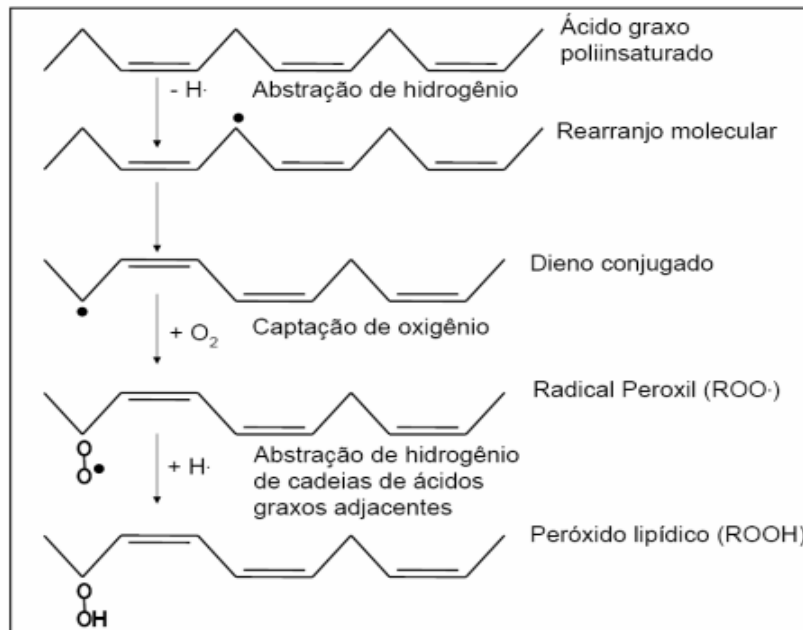
por moléculas hidrossolúveis como o tripeptídeo glutathiona na sua forma reduzida (GSH) e o ácido ascórbico (vitamina C), e por moléculas lipossolúveis como o β -caroteno (vitamina B) e o α -tocoferol (vitamina E). As defesas enzimáticas, por sua vez, compreendem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) (LUSHCHAK & BAGNYUKOVA, 2006; STURVE et al., 2008).

A GSH, o principal antioxidante não-enzimático, é um tripeptídeo endógeno, composto por gamma-glutamil-cisteinil-glicina, que atua na síntese de proteínas e DNA, no transporte de aminoácidos e como cofator essencial para a ação da enzima GPx, que age na eliminação de peróxido de hidrogênio, de hidroperóxidos orgânicos e da GST, que participa da detoxificação de substâncias químicas (HERMES-LIMA, 2004; MARAN et al., 2009). A GSH também corresponde a uma forma não tóxica de armazenamento de cisteínas e defesa contra moléculas oxidantes e contaminantes com potenciais danosos, como os metais (ATLI & CANLI, 2008). Sua capacidade antioxidante se dá pelo grupamento tiol (SH) reativo da cisteína, o qual também pode ser encontrado em proteínas (PSH) ou em tióis de baixo peso molecular (NPSH) (REISCHL et al., 2007).

1.4.1.1 Peroxidação lipídica (LPO)

Os fosfolipídios de membrana dos organismos aeróbicos podem ser alvo de oxidantes (VALAVANIDIS et al., 2006). Esse processo denomina-se peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO) e é composto por uma série de reações em cadeia (HERMES-LIMA, 2004) (Fig. 2) iniciadas quando uma ERO retira um átomo de hidrogênio do grupo metileno dos ácidos graxos insaturados (PUFAs), e o radical formado reage com um átomo de oxigênio formando o radical lipoperoxil, que pode continuar a cadeia ou interagir com outros PUFAs, recomeçando a reação (DI GIULIO & MEYER, 2008). Como consequência da LPO pode haver perda da integridade da membrana com aumento de sua permeabilidade, resultando na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas, alteração no fluxo transmembrana, disfunção no transporte de Na^+/K^+ e comprometimento dos componentes da matriz extracelular, como colágeno, elastina e proteoglicanas (LIMA & ABDALLA, 2001; BARREIROS et al., 2006).

Figura 2 - Processo de lipoperoxidação. A retirada de átomos de hidrogênio de um ácido graxo poli-insaturado (neste esquema representado por três ligações duplas) leva à formação de um dieno conjugado por rearranjo molecular. Esta molécula pode sofrer o ataque de oxigênio, formando um radical peroxil. Este radical pode continuar o ciclo de lipoperoxidação através da retirada de átomos de hidrogênio de cadeias poli-insaturadas próximas, transformando-se em um peróxido lipídico.



(Adaptado de SÖDERGREN, 2000).

Entre os produtos finais formados durante o processo de LPO destacam-se os hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonanal (4-HNE). Alguns estudos mostram que níveis elevados de 4-HNE (acima de 1 μM) atuam em processos citotóxicos e genotóxicos, provocando danos mitocondriais, inibindo a ação de chaperonas e algumas isoformas de citocromos P450 (CYP2E1 e CYP1A1), síntese de DNA e de proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Já o MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, ocasionando modificações de resíduos de aminoácidos. Ele ainda pode reagir com bases de DNA gerando lesões mutagênicas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). O MDA é capaz de reagir com o ácido tiobarbitúrico sob altas temperaturas e baixo pH, gerando um produto de cor que pode ser quantificado por espectrofotometria, sendo utilizado como método de detecção de LPO (HERMES-LIMA, 2004).

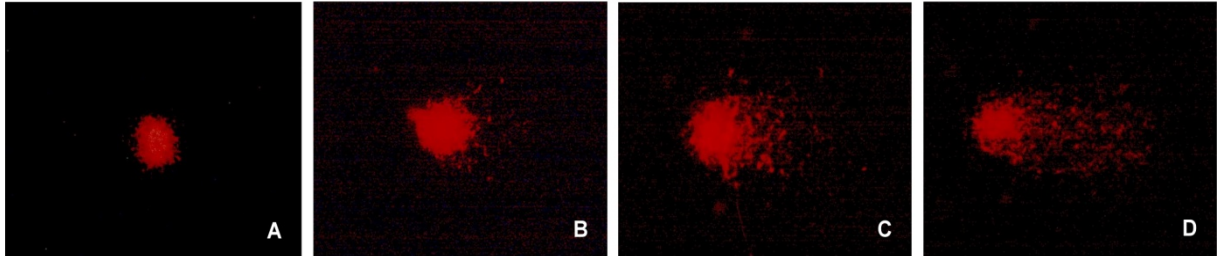
1.4.1.2 Danos no DNA

Os danos no DNA podem ocorrer devido a diversos agentes, sejam eles endógenos ou exógenos. Os metais podem ser considerados agentes exógenos com grande potencial genotóxico que podem provocar danos no DNA de forma direta e também através da formação das ERO (BENASSI, 2004). Os danos mais facilmente detectados no DNA são quebras (simples ou duplas), danos alcali-lábeis, crosslinks, e quebras resultantes de reparo por excisão (TICE, 2000; SILVA et al., 2000).

A detecção dessas quebras no material genético pode ser uma ótima ferramenta no monitoramento dos efeitos subletais de poluentes em animais aquáticos, uma vez que existem testes, como por exemplo, o ensaio do cometa, que são sensíveis para detectar esse tipo de dano (OHE et al., 2004; CAVALCANTE et al., 2008).

O teste do cometa surgiu em 1978 quando Rydeberg e Johanson detectaram pela primeira vez danos no DNA em células usando a técnica de eletroforese em gel. Em 1984 Johanson com ajuda de Ostling modificaram a técnica e puderam avaliar as quebras em fitas duplas sob condições neutras. E em 1988 Singh e colaboradores adaptaram o ensaio para condições alcalinas (pH = 13), determinando não somente as quebras na fita dupla, mas também quebras nas fitas simples e os sítios álcali-lábeis (DHAWAN et al., 2009). O princípio desta técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não apresentar dano migrará de forma homogênea durante a corrida de eletroforese formando um círculo. Caso o DNA apresente dano serão formados fragmentos de diversos tamanhos de modo que os fragmentos menores migrem mais rapidamente em relação aos maiores originando a figura típica de um cometa (OLIVE et al., 1990) (Fig. 3). Muitos são os tecidos que podem ser utilizados para a realização do ensaio do cometa, para peixe podemos destacar as células sanguíneas, fígado e brânquias (LEE & STEINERT, 2003).

Figura 3 - Classificação visual dos cometas de acordo com o grau de dano no DNA. As caudas representam a migração do material genético danificado. A - dano 0 (sem danos); B - dano 1; C - dano 2; D - dano 3 (máximo dano).



1.4.1.3 Metalotioneínas (MTs)

Outro importante antioxidante, as Metalotioneínas (MTs), são uma classe de proteínas citosólicas de baixo peso molecular (em torno de 6 – 7 kDa) e de estrutura composta de uma única cadeia de aminoácidos dos quais 20 são cisteínas, que representam em torno de 30% do total de aminoácidos. A abundância de ligantes tiol (-SH) dos resíduos de cisteína presentes na estrutura das MTs confere a essas proteínas uma alta afinidade por íons metálicos livres (NORDBERG, 1998). Essas proteínas também estão envolvidas na regulação de metais essenciais, como o cobre e zinco, assim como na desintoxicação de metais não-essenciais (AMIARD et al., 2006). As MTs atuam como quelantes de metais e quando estes se encontram em excesso nas células desempenham um importante papel, atuando na desintoxicação e excreção, aumentando a tolerância aos metais (LINDE et. al., 2001; GOPAL, 2009).

O uso das MTs como biomarcadores no monitoramento da poluição por metais evidencia o papel dessas proteínas como indicadoras de concentrações subletais de íons metálicos e, conseqüentemente, da relevância biológica da presença destes poluentes em ambientes aquáticos (CHAN, 1995). Além de atuar como quelantes de metais, as MTs apresentam propriedades antioxidantes importantes, inibindo reações de propagação de radicais livres através da ligação seletiva de íons de metais pró-oxidantes, tais como ferro e cobre, e dos potencialmente tóxicos, como cádmio e mercúrio. Além disso, é um potente inibidor de espécies reativas de oxigênio, limitando as possíveis lesões por elas ocasionadas (SUZUKI et al., 2002).

Em peixes, os esforços para estabelecer o papel das MTs têm focado na função da proteína na redução da toxicidade de metais (HOGSTRAND & HAUX, 1991). Vários órgãos de peixes expostos a metais podem apresentar aumento na concentração de MTs e o fígado é geralmente o órgão com concentrações mais altas, pois os tecidos envolvidos com a absorção de metais, estoque e excreção são os que possuem maior capacidade de sintetizar MTs (OLSVIK et al., 2000). No entanto, a grande influência dos metais em promover a indução de MT pode variar de acordo com a espécie, tecido e condições experimentais (ROESIJADI & ROBINSON, 1994; FILIPOVI & RASPOR, 2003).

1.5 Acúmulo de metais nos tecidos

O acúmulo de metais nos tecidos ocorre em relação direta com sua concentração no ambiente, o período de exposição e as características da água, como concentração de íons, pH, dureza e temperatura (ATLI & CANLI, 2007). Além disso, a concentração de metal no organismo do peixe também varia conforme seu tamanho, idade, hábito alimentar, hábitat, variação sazonal e condições de saúde (JALLEL et al., 1996).

A absorção de contaminantes através do meio circundante através da tomada direta pelas brânquias ou pele denomina-se bioconcentração, enquanto a absorção pelo meio e também pela ingestão de partículas suspensas e pelo consumo de alimentos contaminados é chamada de bioacumulação (DALLINGER et al., 1987; MANCE, 1990). Quando a concentração no tecido de um organismo é maior que aquele no alimento ou no nível trófico adjacente, ocorre o que chamamos de biomagnificação (REINFELDER et al., 1998).

Nos peixes a estreita relação entre o ambiente aquático e a superfície epitelial implica em que o tecido branquial, a pele e o intestino sejam os primeiros a entrar em contato com os poluentes, tornando estes órgãos potenciais indicadores de qualidade ambiental (MAZON & FERNANDES, 2001). O acúmulo de metais pelas brânquias é determinado pela combinação entre o metal absorvido pela superfície branquial e a subsequente transferência à corrente sanguínea (MAZON & FERNANDES, 1999).

1.6 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros do sangue como número de eritrócitos, concentração de hemoglobina e hematócrito são considerados indicadores fisiológicos importantes para avaliação da saúde de peixes expostos a substâncias tóxicas (ADHIKARI et al., 2004; JESUS & CARVALHO et al., 2008). Desordens hematológicas são caracterizadas por alterações na estrutura das células, como modificações nucleares e mudanças em sua conformação, e também por desordens na função celular, como nos mecanismos de coagulação (CLAUSS et al., 2008).

Índices como o conteúdo de hemoglobina (Hb), o número de eritrócitos (RBC) e hematócrito podem sofrer alterações após a exposição do animal a um agente estressor. A baixa concentração de hemoglobina, assim como a redução do número de eritrócitos, são possíveis causas do quadro de anemia desenvolvido por animais expostos a contaminantes (HEATH, 1995). Já o hematócrito refere-se ao volume ocupado pelas células vermelhas sanguíneas e diferentes espécies de peixes podem apresentar grande variação neste parâmetro (STREIT, 1998). Um aumento do valor do hematócrito pode ser causado, por exemplo, por danos nas brânquias em decorrência de hipóxia interna, ocorrendo, neste caso, um inchaço dos eritrócitos (HEATH, 1995).

1.7 Parâmetros osmoiônicos

Distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica são aspectos característicos de estresse em peixes. Isso ocorre devido à relação entre os fluidos corpóreos nas brânquias e o ambiente aquático (WENDELAAR-BONGA, 1997). Muitos agentes estressores, como os metais, afetam a estrutura branquial causando danos às trocas gasosas e ao balanço hidromineral destes animais (WENDELAAR-BONGA, 1997).

As principais células branquiais relacionadas aos mecanismos de osmorregulação e ao equilíbrio ácido-base são as chamadas células cloreto (CC). Estas células são ricas em mitocôndrias e possuem diversas ATPases como a Na^+/K^+ -ATPase (CLAIRBONE et al., 2002), que é sensível a diversos tipos de contaminantes podendo ser utilizada para o monitoramento das condições ambientais (STAGG et al., 1992). A metaloenzima anidrase carbônica (AC), por sua

vez, é a principal enzima branquial relacionada ao equilíbrio ácido-base, sendo responsável por catalisar a hidratação do gás carbônico, gerando ácido carbônico, que em pH fisiológico se dissocia em próton hidrogênio e o ânion bicarbonato (PERRY & GILMOUR, 2006). O zinco, o metal central da AC, pode ser deslocado por outros metais levando a uma alteração em sua estrutura tridimensional podendo potencialmente afetar sua atividade causando prejuízos ao organismo (BROOKS & MILLS, 2003).

Teleósteos de água doce captam ativamente íons como Na^+ e Cl^- através de superfícies osmorregulatórias, principalmente o epitélio branquial, e produzem um grande volume de urina diluída. Desta maneira estes animais compensam o ganho osmótico de fluidos e a perda difusa de íons (MARSHAL, 2002). Assim, a osmolalidade plasmática, as concentrações individuais dos íons sódio (Na^+), cloreto (Cl^-) e potássio (K^+), são variáveis fisiológicas utilizadas como indicadores de efeitos subletais de poluentes em peixes.

Deste modo, a avaliação dos efeitos do cromo no ambiente aquático torna-se necessária a fim de qualificar e quantificar os possíveis efeitos do cromo para a espécie *P. lineatus* e, conseqüentemente, para o ecossistema através de testes e ensaios capazes de mensurar alterações bioquímicas, genotóxicas e fisiológicas além do acúmulo deste metal em diferentes órgãos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Verificar o acúmulo de cromo em diferentes tecidos e os efeitos deste metal em parâmetros genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos do peixe da espécie *Prochilodus lineatus*.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o acúmulo de cromo em diferentes tecidos de *P. lineatus* expostos ao cromo (50, 100 e 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$) durante 24 h (período que corresponde à fase de choque onde ocorrem mudanças que atuam como mecanismos compensatórios no organismo com o propósito de preservar a função dos órgãos vitais);
- Examinar o possível efeito genotóxico do cromo por meio da análise da ocorrência de danos no DNA em eritrócitos de *P. lineatus*.
- Verificar se ocorre alteração no conteúdo de metalotioneínas em brânquias, fígado, rim e músculo de *P. lineatus* após exposição ao cromo;
- Avaliar os possíveis efeitos do cromo no conteúdo do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) e na ocorrência de danos oxidativos teciduais (peroxidação lipídica) no fígado dos peixes;
- Averiguar se a exposição aguda ao cromo promove alterações osmoiônicas e na atividade branquial das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica;
- Investigar os efeitos do cromo em parâmetros hematológicos e na glicemia de *P. lineatus*.

3 MANUSCRITO I

EFEITOS DO CROMO NO TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus*: DANOS BIOQUÍMICOS, GENOTÓXICOS E ACÚMULO EM DIFERENTES TECIDOS

Fernanda Emanuela Rodrigues Alves dos Santos, Cláudia B. R. Martinez^{*}
Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina.
C.P. 6001. CEP: 86051-990. Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência. Tel: +55 43 3371.4650 – Fax: +55 43 4471.4467
E-mail: cbueno@uel.br

Manuscrito a ser encaminhado para publicação no periódico *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*.

RESUMO

Os efeitos do cromo foram avaliados em peixes jovens da espécie *Prochilodus lineatus* expostos às concentrações nominais de 50, 100 e 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cromo. Após 24 h de exposição os animais foram amostrados para a retirada de sangue, brânquias, fígado, rim e músculo para as análises. Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO) foram avaliados no tecido hepático e para a análise da concentração de proteínas semelhantes às metalotioneínas (MTs) foram usadas brânquias, fígado, rim e músculo. A concentração de cromo foi determinada nas brânquias, fígado, rim, músculo e também nas células do sangue. A ocorrência de danos no DNA foi analisada nos eritrócitos por meio do teste do cometa. Os resultados mostraram que em 24 h de exposição o cromo acumulou-se somente nas brânquias dos animais expostos. Com relação à GSH verificou-se que a exposição ao cromo promoveu diminuição desse antioxidante no fígado dos peixes, entretanto os níveis de LPO mantiveram-se abaixo daqueles encontrados no grupo controle, indicando não haver danos oxidativos nas membranas celulares. Por outro lado foi evidenciado aumento na ocorrência de danos no DNA dos eritrócitos dos peixes expostos às três concentrações de cromo testadas. Ocorreu também aumento de MTs no fígado dos animais, indicando o papel protetor destas proteínas à presença de cromo. Em resumo, este trabalho mostrou que o cromo pode acumular-se nas brânquias de *P. lineatus*, induzir a síntese de metalotioneínas, alterar os níveis de GSH nas células e causar danos ao DNA dessa espécie. Assim, pode-se concluir que o cromo, mesmo em baixas concentrações, pode ocasionar danos na espécie neotropical *P. lineatus* e que a concentração máxima de Cr permitida pela legislação brasileira, que é de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, não é segura para esta espécie.

Palavras-chave: danos no DNA, estresse oxidativo, glutathiona, lipoperoxidação, metalotioneínas, teste do cometa.

3.1 INTRODUÇÃO

A poluição por metais tornou-se um sério problema de saúde pública e ambiental devido aos grandes volumes de resíduos liberados nos corpos hídricos a partir de processos industriais (Vutukuru et al., 2007). O cromo é um metal de transição que, apesar de existir sob diversos estados de oxidação, as formas mais comuns são a trivalente (Cr^{3+}) e a hexavalente (Cr^{6+}) que apresentam propriedades químicas diferentes, sendo a forma hexavalente considerada a forma mais tóxica, ocorrendo associada ao oxigênio como íons cromato (CrO_4^{2-}) ou dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (Cervantes et al., 2001). Naturalmente, no ar atmosférico, as concentrações de cromo encontradas são menores que $0,1 \mu\text{g}.\text{m}^3$, e em águas não contaminadas os valores estão na faixa de $1,0 \mu\text{g}$ a poucos $\mu\text{g}.\text{L}^{-1}$. Na água do mar as concentrações encontradas variam entre 1 e $10 \mu\text{g}.\text{kg}^{-1}$. Na maioria dos solos, o cromo é encontrado em baixas concentrações, $2-60 \text{mg}.\text{kg}^{-1}$, e somente uma fração desse total está disponível para as plantas (WHO, 1988). A elevada concentração de cromo nos ecossistemas aquáticos está atribuída a atividades como a galvanoplastia e o curtimento de peles que utilizam este metal como subproduto e acabam lançando seus efluentes em corpos d'água (Kotas e Stasicka, 2000). No Brasil, de acordo com a Resolução CONAMA 357 (2005), o valor máximo de cromo total permitido em águas doces é de $50 \mu\text{g}.\text{L}^{-1}$.

Em peixes teleósteos a entrada de substâncias tóxicas se dá via brânquias, tegumento ou alimentação, e o acúmulo ocorre de forma não homogênea nos diferentes órgãos e tecidos (Alves e Wood, 2006). Uma vez no ambiente aquático, o cromo pode acumular-se nos organismos em concentrações muito elevadas que geralmente atingem órgãos metabolicamente ativos como o fígado, rins e brânquias (Svecevieius, 2007) e induzir a expressão de proteínas como as metalotioneínas, responsáveis por controlar a distribuição de metais circulantes no organismo (Di Giulio et al., 1995; Viarengo et al., 2007).

Os metais como o cromo também podem estimular a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) como o ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, em grandes quantidades, podem causar sérios prejuízos ao metabolismo de peixes (Lionetto et al., 2003; Gioda et al., 2007). Esses animais possuem um sistema de defesa antioxidante, responsável pela neutralização das ERO, constituído por defesas antioxidantes enzimáticas e não

enzimáticas, que podem reagir com intermediários reativos, e também reparar os danos causados por eles (Martinez, 2006; Valavanidis et al., 2006; Halliwell e Gutteridge, 2007).

As principais defesas antioxidantes enzimáticas dos organismos são representadas pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), enquanto as defesas não enzimáticas são moléculas de baixo peso molecular, lipossolúveis como o β -caroteno (vitamina B) e o α -tocoferol (vitamina E) ou hidrossolúveis, como o ácido ascórbico (vitamina C) e o tripeptídeo glutathione na sua forma reduzida (GSH) (Lushchak e Bagnyukova, 2006). A GSH atua na defesa contra moléculas oxidantes e contaminantes potencialmente danosos, como os metais, além de participar da síntese de proteínas e DNA, transporte de aminoácidos, manutenção do *status* tiol-dissulfeto e como um cofator essencial para algumas enzimas. As atividades ou concentrações desses antioxidantes quando alteradas podem ser indicadoras de exposição a poluentes, bem como ferramentas utilizadas em avaliações toxicológicas (Almeida et al., 2001; Monteiro et al., 2006).

Entretanto, se esses mecanismos responsáveis pela neutralização das ERO forem insuficientes ou até mesmo inadequados, ocorre o estresse oxidativo, que pode resultar em danos ao DNA, oxidação de proteínas e peroxidação de lipídios (LPO) (Monteiro et al., 2006). O processo de LPO decorre de uma série de reações nos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares que são sensíveis à oxidação ocasionada pelas ERO devido às suas duplas ligações (Hermes-Lima, 2004). A LPO é iniciada principalmente por radicais hidroxil, especialmente por reações catalisadas por metais de transição (Valavanidis et al., 2006).

Diferentes efeitos e respostas a contaminantes, como os metais, podem ser observados de acordo com a espécie analisada em função de sua fisiologia e das condições ambientais a que está adaptada (Atli e Canli, 2008). Assim, algumas espécies de peixe da região neotropical revelam-se bioindicadores em potencial, por terem alguns de seus parâmetros sensivelmente alterados em presença de contaminantes aquáticos (Sampaio et al., 2008). *Prochilodus lineatus* é uma das principais espécies encontradas a partir da porção média do Rio Paraná ao Estuário La Plata (Quirós e Cuch, 1989; Quirós, 1990). Quirós e Cuch (1989) estimaram que, em média, 73% do total das capturas durante o período 1945-1984 foi composto por *P. lineatus*. Popularmente conhecido como curimba, essa espécie possui hábito

detritívoro estando em constante contato com sedimentos (Cazenave et al. 2009) e, conseqüentemente, exposto aos contaminantes que podem estar depositados nesses compartimentos.

Portanto, devido ao fato das altas concentrações de cromo serem consideradas uma ameaça aos ambientes aquáticos e aos organismos que habitam esses ecossistemas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência nos parâmetros genotóxicos, bioquímicos e fisiológicos deste metal sobre a espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus*.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Manutenção dos animais e exposição ao cromo

Exemplares jovens de curimba, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, PR, Brasil. Os animais foram aclimatados por cinco dias em tanques contendo 300 L de água desclorada e aerada. Durante esse período os parâmetros da água foram continuamente monitorados e os valores (média \pm EP) foram: pH 6,8 \pm 0,6, condutividade 75 \pm 10 $\mu\text{s cm}^{-1}$, oxigênio dissolvido 7,8 \pm 0,13 mg O₂ L⁻¹, temperatura 19,05 \pm 0,68 °C e a dureza da água manteve-se em 36 mgCaCO₃.L⁻¹. Os peixes foram alimentados com ração comercial no segundo e quarto dias de aclimação.

Para analisar a concentração de cromo total e dissolvido a que os peixes foram expostos, a água dos aquários experimentais e controle foi coletada com o auxílio de seringa de vidro nos tempos 0 e 24 h. Para as análises de cromo total a água coletada foi armazenada em tubos plásticos com a adição de 0,5% de ácido nítrico. Já para as análises do cromo dissolvido, as amostras foram filtradas (0,45 μm), acidificadas (0,5% HNO₃) e armazenadas. As amostras foram mantidas a 4°C até as análises de cromo em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA-AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA).

Os peixes foram submetidos a testes estáticos de toxicidade aguda por 24 h. Esse tempo corresponde à *fase de choque*, um período inicial de mudanças que atuam como mecanismos compensatórios no organismo com o propósito de preservar a função dos órgãos vitais. Os animais foram divididos em grupos de 8

indivíduos e colocados em aquários contendo 80 L de água desclorada e aerada. Um grupo controle (CTR) foi exposto somente à água e três grupos experimentais foram expostos às seguintes concentrações nominais de cromo obtidas a partir do dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$): $50 \mu g.L^{-1}$ (Cr 50), $100 \mu g.L^{-1}$ (Cr 100) e $150 \mu g.L^{-1}$ (Cr 150). A menor concentração testada, $50 \mu g.L^{-1}$, corresponde a concentração máxima permitida para este metal para águas doces brasileiras de classes 1, 2, 3 e 4 (Resolução CONAMA 357, 2005). O grupo controle foi amostrado simultaneamente aos grupos expostos ao cromo.

Após as 24 h de exposição os peixes foram retirados dos aquários e anestesiados com benzocaína ($0,1 g.L^{-1}$) para a retirada de sangue pela veia caudal. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para a retirada das brânquias, fígado, rim e músculo, que foram congelados em ultrafreezer ($-80^\circ C$) até o momento das análises.

3.2.2 Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica (LPO)

O fígado foi pesado, homogeneizado em tampão fosfato de potássio ($0,1 M$; pH 7,0), centrifugado (20 min, $14700 g$, $4^\circ C$) e o sobrenadante foi separado para quantificação de glutathiona reduzida, GSH, e LPO. A concentração de GSH foi determinada de acordo com o método de Beutler et al. (1963) pela reação da glutathiona com o 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzóico (DTNB), formando o tiolato (TNB) de cor amarelada, em 412 nm. A GSH foi expressa em μg de GSH.mg de proteína $^{-1}$, a partir de uma curva padrão para a GSH. A LPO foi estimada pela produção de malondialdeído (MDA), de acordo com o método descrito por Federici et al. (2007), que consiste em quantificar o MDA pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em 530 nm. A peroxidação lipídica foi expressa em equivalentes de MDA, como μmol MDA.mg de proteína $^{-1}$, usando uma curva padrão de MDA.

3.2.3 Quantificação de proteínas semelhantes às metalotioneínas

A concentração de MTs foi avaliada em amostras de brânquias, fígado, rim e músculo por meio da medida de concentração de grupamentos-SH, segundo a metodologia descrita por Viarengo et al. (1997). Os tecidos foram homogeneizados (1:5-m/v para fígado e 1:3-m/v para demais tecidos) em tampão (Sacarose $0,5 M$,

Tris 26 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonil 0,5 mM, β -mercaptaetanol 1,3 mM) e centrifugados por 45 minutos (21300 g; 4 °C), o sobrenadante foi submetido a fracionamento etanol/clorofórmio ácido para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificada. Nesta fração foram quantificados os grupos sulfidril (-SH) utilizando-se o reagente de Ellman, em espectrofotômetro a 412 nm. A glutathiona reduzida (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de metalotioneínas foi expresso em nmol de GSH mg de proteína⁻¹.

3.2.4 Quantificação de cromo nos tecidos e na água

A concentração de cromo foi determinada em amostras de brânquias, fígado, rim, músculo e células do sangue. O sangue foi centrifugado (18600 g; 10 min) para a separação das células. As amostras de tecidos e células sanguíneas foram pesadas e mantidas em estufa a 60° C até sua secagem total. Depois de secos, os tecidos foram imersos em ácido nítrico (65% Supra Puro – Merck) 1N na proporção de 1:5 (peso: vol.), e mantidos a 60° C durante 48 h. Após esse período as amostras foram centrifugadas (14000 × g, 20 min) e o sobrenadante foi diluído em HNO₃ 1% para posterior quantificação do metal. As concentrações do metal foram determinadas por atomização eletrotérmica em espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA) através de uma curva padrão construída a partir de uma solução padrão com concentrações de cromo dissolvido de 0 a 45 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ diluída em solução de ácido nítrico 0,2 %. As amostras foram analisadas em duplicatas.

3.2.5 Quantificação de danos no DNA – Ensaio do cometa

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, com base na metodologia descrita por Singh et al. (1988) e com modificações descritas por Vanzella et al. (2007). Após a amostragem, o sangue foi adicionado à salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, NaHCO₃ 3,7 mM, Na₂HPO₄ 8,9 mM, NaH₂PO₄ 2,9 mM) e misturado com agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal, coberta com lamínula, e permaneceu na geladeira por 30 min. Em seguida as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução

de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 hora. Após esse tempo as lâminas foram transferidas para cubas de eletroforese contendo solução tampão (0,3 N NaOH/1 mM EDTA, pH > 13) e permaneceram por 30 minutos. Logo depois foram submetidas à eletroforese por 20 minutos (300 mA, 25 V, 1 V.cm⁻¹), sendo que após as lâminas foram neutralizadas com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5), em 3 lavagens de 5 min, e fixadas em etanol por 10 minutos.

Para as análises, as lâminas foram coradas com o corante GelRed (Uniscience) e cobertas com lamínula. Foram examinadas em microscópio de fluorescência na objetiva de 40x em teste cego. Foram analisados 100 nucleóides por lâmina. Baseado em Kobayashi et al. (1995), os danos no DNA foram classificados visualmente conforme a migração dos fragmentos de DNA em quatro classes: 0: sem dano visível; 1: cauda menor que o diâmetro do núcleo; 2: comprimento de cauda de 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; 3: comprimento da cauda maior que duas vezes o diâmetro do núcleo. Para cada peixe o escore foi calculado multiplicando-se o número dos nucleóides observados em cada classe de dano pelo valor da classe (0, 1, 2 e 3), gerando um valor entre 0 e 300.

3.2.6 Análises estatísticas

Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos (CTR X Cr 50 X Cr 100 X Cr 150) foram comparados entre si através de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Quando houve indicação de diferenças significativas elas foram localizadas utilizando-se o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Parâmetros da água

Ao longo dos experimentos os valores de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido (OD) foram monitorados e não variaram significativamente. Mantiveram-se os valores (média \pm erro padrão) de temperatura $19,9 \pm 1,33$ °C, pH $6,81 \pm 0,26$, condutividade 75 ± 2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; OD $7,69 \pm 0,29$ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e a dureza manteve-se em 36 $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$.

As médias das concentrações de cromo total na água coletada dos aquários experimentais Cr 50, Cr 100 e Cr 150 em 0 e 24h foram de 107,4; 100,7 e 97,93%, respectivamente, do valor das concentrações nominais (Tabela 2). Já as concentrações de cromo dissolvido nos grupos foram de 104,8; 99,2 e 87,52% das nominais. Na água dos aquários do grupo CTR o cromo não foi detectado.

Tabela 1 - Concentrações de cromo total e dissolvido ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) na água dos aquários contendo as concentrações nominais de Cr correspondentes a 0 (CTR), 50, 100 e 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, no período de 24 h.

[Cr] nominal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	[Cr]	0 h	24 h
0	Total	ND	ND
	Dissolvido	ND	ND
50	Total	54,10	52,94
	Dissolvido	52,49	52,32
100	Total	102,85	98,72
	Dissolvido	100,70	97,79
150	Total	150,95	142,85
	Dissolvido	133,90	128,66

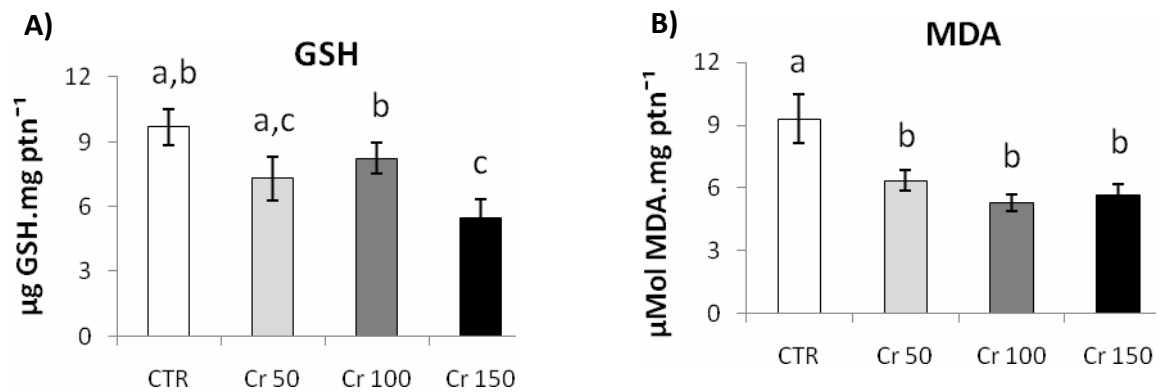
Valores indicam a média. N/D: valores não detectados. Valor de n = 2.

3.3.2 Conteúdo de glutatona reduzida (GSH) e peroxidação lipídica

O cromo promoveu diminuição na concentração de GSH no fígado dos animais do grupo Cr 150 em relação ao grupo controle (Fig. 4A).

Os peixes pertencentes aos três grupos experimentais (Cr 50, Cr 100 e Cr 150) apresentaram redução na concentração de MDA no fígado quando comparados ao seu respectivo controle (Fig. 4B).

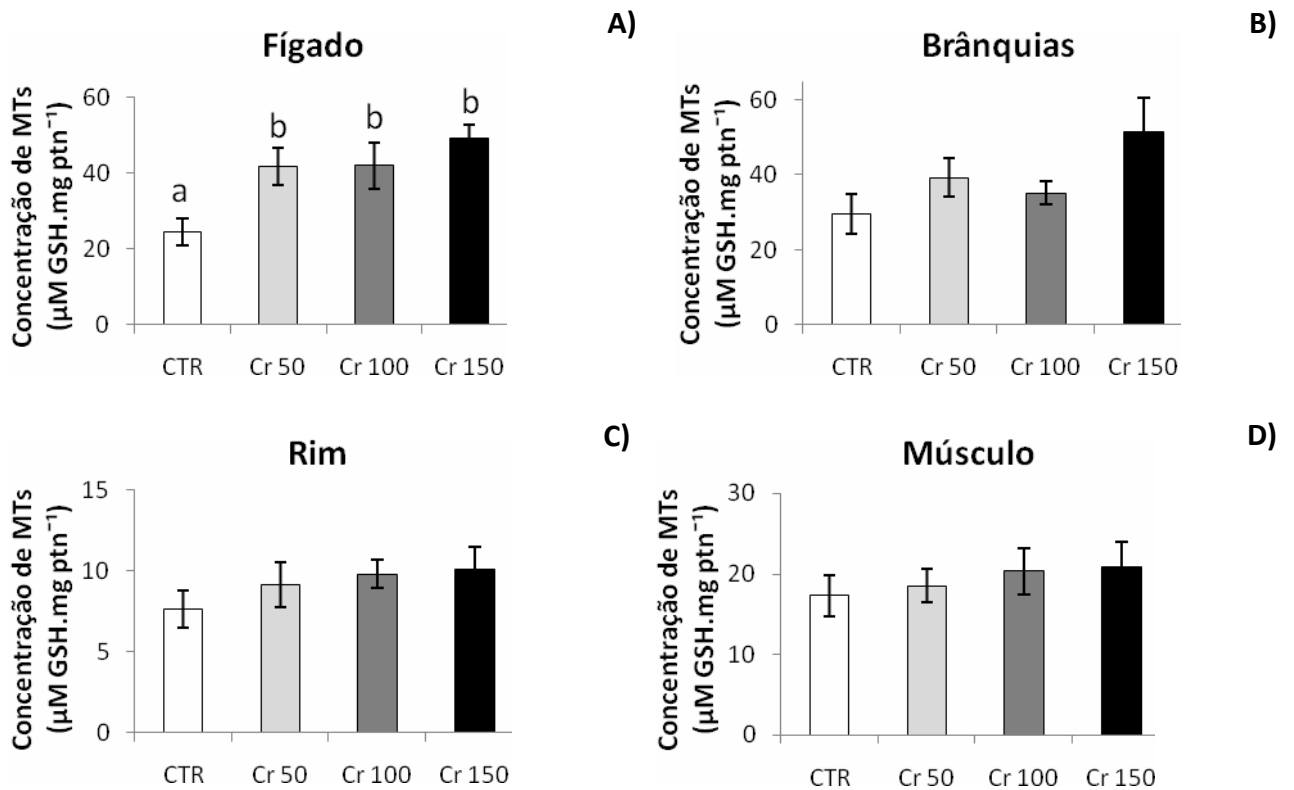
Figura 4 - Concentração (média \pm EP, n: 6-8) de GSH (A) e MDA (B) no fígado de *P. lineatus* após 24 h de exposição ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).



3.3.3 Concentração de proteínas semelhantes às metalotioneínas

Os resultados da concentração de MTs mostraram um aumento destas proteínas apenas no fígado dos indivíduos dos três grupos experimentais (Cr 50, Cr 100 e Cr 150) quando comparados ao grupo controle (Fig. 5A). Os demais tecidos analisados, como brânquias (Fig. 5B), rim (Fig. 5C) e músculo (Fig. 5D) não apresentaram variação significativa no conteúdo de MTs após a exposição ao cromo.

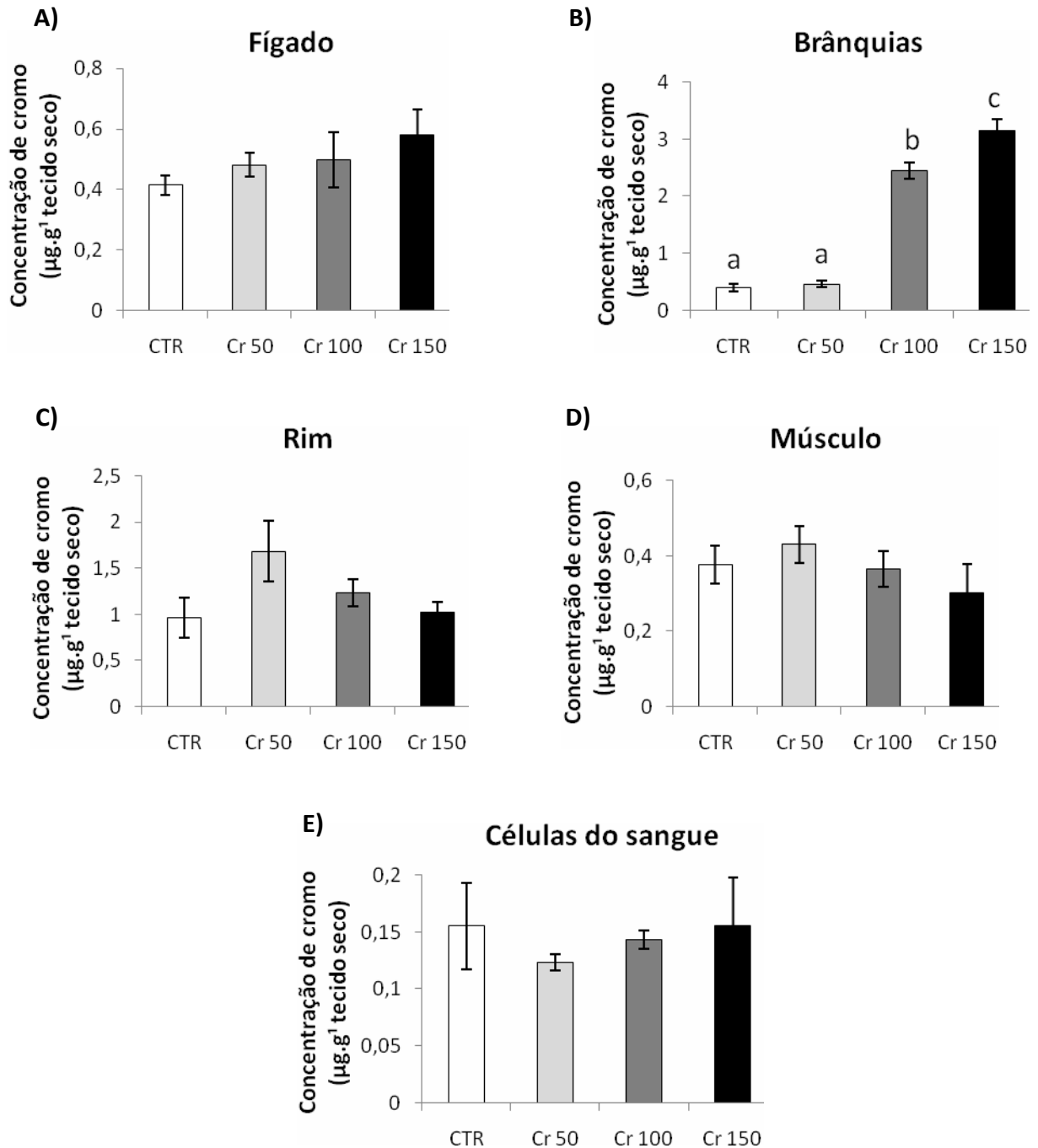
Figura 5 - Concentração de metalotioneínas (média \pm EP, n: 5-7) no fígado (A), brânquias (B), rim (C) e músculo (D) de *P. lineatus* após 24 h de exposição ao cromo nas concentrações de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), $150 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).



3.3.4 Acúmulo de cromo nos tecidos

Aumento significativo na concentração de cromo foi observado apenas nas brânquias dos animais dos grupos Cr 100 e Cr 150 em relação ao grupo controle (Fig. 6B). Nos demais tecidos analisados, como fígado (Fig. 6A), rim (Fig. 6C), músculo (Fig. 6D) e nas células sanguíneas (Fig. 6E) não houve variação significativa na concentração tecidual de cromo após a exposição às diferentes concentrações do metal.

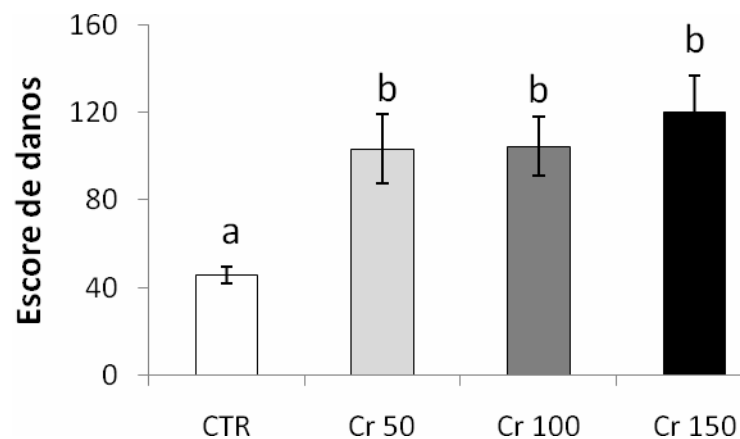
Figura 6 - Concentração de cromo (média \pm EP, n: 5-8) no fígado (A), brânquias (B), rim (C), músculo (D) e células do sangue (E) de *P. lineatus* após 24 h de exposição ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).



3.3.5 Danos no DNA

O cromo promoveu danos no DNA dos eritrócitos dos peixes dos três grupos experimentais (Cr 50, Cr 100 e Cr 150) quando comparados ao grupo controle (Fig.7).

Figura 7 - Escore de danos (média \pm EP, n = 8) em eritrócitos de *P. lineatus* após 24 h de exposição ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR). Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).



Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da frequência de nucleóides danificados em eritrócitos de *P. lineatus* de acordo com as classes de danos (0, 1, 2 e 3). É possível observar que o número de nucleóides de classe 0 diminuiu com o aumento da concentração de cromo enquanto a frequência de nucleóides de classes 2 e 3 aumentou conforme o aumento da concentração do metal. O número de nucleóides danificados foi significativamente maior nos três grupos experimentais (Cr 50, Cr 100 e Cr 150) quando comparados ao grupo controle.

Tabela 2 - Frequência (%) média de nucleóides danificados observados em cada uma das classes do cometa (0, 1, 2 e 3) e número de nucleóides danificados (média \pm EP) nos eritrócitos de *Prochilodus lineatus* expostos a 50, 100 e 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cromo ou somente a água (CTR), durante 24 h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).

Tratamento	N	CLASSES DE DANOS				Nucleóides danificados (média \pm EP)
		0	1	2	3	
CTR	8	60,37	33,62	6	0	45,62 \pm 3,30 (a)
Cr 50	8	29,37	40,37	27,87	2,37	103,25 \pm 13,69 (b)
Cr 100	8	27,12	43,25	27,50	2,12	104,62 \pm 11,90 (b)
Cr 150	8	23,25	39,75	30,50	6,50	120,25 \pm 14,47 (b)

3.4 DISCUSSÃO

A bioacumulação se dá pela capacidade da biota em absorver e reter substâncias provenientes do meio em que ela se encontra através da via oral, percutânea e/ou respiratória. Além disso, os metais podem se acumular nos tecidos desses animais e ocasionar danos ao seu metabolismo (Vinodhini e Narayanan, 2008). No presente estudo o cromo acumulou-se somente nas brânquias dos peixes expostos às duas maiores concentrações do metal (100 e 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Isso demonstra que o cromo pode acumular-se primeiramente no tecido branquial pelo contato direto desses órgãos com a água circundante e, conseqüentemente, com o metal ali presente. As brânquias constituem uma interface entre o meio externo e o interior do organismo e representam um órgão multifuncional com funções vitais, incluindo respiração, osmorregulação, equilíbrio ácido-básico, e também excreção. É através das brânquias que ocorre o contato direto dos organismos com os contaminantes presentes no meio externo, que é a principal porta de entrada dos metais, e o acúmulo destes podem provocar lesões e danos neste órgão (Bols et al., 2001). Ciftci et al. (2010) também observaram acúmulo de cromo em brânquias de peixes da espécie *Oreochromis niloticus* expostos a 1 mg.L^{-1} de cromo durante 96 h. O fígado demonstrou acúmulo de cromo superior àquele encontrado nas brânquias quando as concentrações de cromo na água foram mais elevadas (2,0 e 4,0 mg.L^{-1}). Os autores sugerem que a capacidade de acumulação do tecido branquial, no entanto é ultrapassado em períodos prolongados de exposição quando o metal é

transferido para o tecido hepático para a desintoxicação e para o tecido renal para ser excretado.

Yilmaz et al. (2010) compararam os níveis de cromo no músculo, pele e brânquias de *Oreochromis aureus* e constataram que, em todas as concentrações avaliadas (10, 15, 20, 25 e 30 mg.L⁻¹), as brânquias possuíam maiores níveis do metal após 28 a 30 dias de exposição seguidas da pele e músculo (dados da água: pH 7.6 ± 0,3; dureza 135 ± 5,8 mgCaCO₃.L⁻¹). No presente trabalho não foram constatados níveis significativos de cromo no músculo de *P. lineatus*, sugerindo que este tecido pode ser o último sítio de acúmulo do metal via metabolismo e que, barreiras como a pele e o muco comumente secretado por esses animais, podem impedir a penetração ou a impregnação direta no tecido muscular.

Estudos com diferentes espécies de peixe já mostraram que as concentrações teciduais de metais podem estar relacionadas também aos níveis de metalotioneínas (MTs) (Hylland et al., 1992; Schlenk et al., 1995; Olsvik et al., 2000; Filipovi e Raspor, 2003; De Boeck et al., 2010). As MTs são proteínas de baixo peso molecular, responsáveis por capturar as partículas metálicas circulantes no organismo (Di Giulio et al., 1995; Viarengo et al., 2007) e alguns autores demonstraram que a maior indução de MTs em peixes se dá, principalmente, em órgãos como brânquias e fígado (Roesijadi e Robinson, 1994; Filipovi e Raspor, 2003; Amiard et al., 2006). Além de diminuir o potencial tóxico dos metais, as MTs podem atuar como reservas não tóxicas de metais para a síntese de metaloenzimas. De acordo com alguns autores as MTs também auxiliam na prevenção do estresse oxidativo, atuando como antioxidante, e limitam as possíveis lesões ocasionadas pelas espécies reativas de oxigênio (Paris-Palacios et al., 2003; Falfushynska e Stolyar, 2009).

As análises realizadas no fígado, brânquias, rim e músculo de *P. lineatus* demonstraram que em 24 h de exposição ao cromo a concentração de MTs no fígado foi maior nos três grupos expostos ao cromo quando comparados ao grupo controle. Acredita-se que a presença do cromo tenha provocado a síntese de MTs, que é uma resposta direta ao aumento da concentração intracelular do metal. Esse aumento pode estar relacionado ao seu papel protetor, mantendo baixa a concentração de metais livres a fim de evitar possíveis danos ao organismo (Ryu et al., 2003). Os tecidos normalmente envolvidos com a absorção, estoque e excreção de metais, como brânquias, fígado e rim, apresentam maior capacidade de sintetizar

MTs (Amiard et al., 2006). Roberts e Oris (2004) expuseram a espécie *Oncorhynchus mykiss* a $10,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de cromo e verificaram a expressão do gene da MT nas brânquias e no fígado dos animais expostos durante 0; 0,5; 1; 2; 7; 14; 21 e 28 dias. Os autores observaram que o tecido hepático demonstrou uma capacidade muito maior para a produção de MTs. Fleet et al. (1990) afirmam que o cromo trivalente é capaz de induzir a síntese de MTs em maior escala do que o cromo hexavalente. Dessa maneira, pode-se inferir que as brânquias têm contato com o cromo presente no meio na sua forma hexavalente e, à medida que o metal é transportado pelo organismo, é reduzido e chega ao fígado na forma trivalente estimulando maior síntese de MTs nesse órgão.

Um estudo realizado com peixes da mesma espécie utilizada no presente trabalho, *Prochilodus scrofa*, expôs esses animais ao cobre em uma temperatura de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e também averiguou um aumento da concentração de MTs no fígado desses animais durante exposição de 96 h ao metal (Carvalho et al., 2004). Assim, essas proteínas representam um sistema de defesa importante contra os efeitos de metais, como o cromo, para a espécie *P. lineatus*, uma vez que a defesa antioxidante avaliada neste estudo teve sua atividade diminuída no tecido hepático dos peixes em um dos grupos experimentais. Pode-se inferir que nesta espécie o fígado, considerado um órgão-alvo de grande importância para os peixes por participar dos processos de desintoxicação e armazenamento de metais, é mais sensível a metais quando comparado a outros órgãos como, por exemplo, as brânquias, que são o primeiro órgão de contato com os contaminantes na água.

O cromo, bem como outros metais com valências variáveis, pode induzir processos formadores de radicais livres em animais, incluindo peixes. O Cr^{+6} é reduzido intracelularmente aos intermediários Cr^{+5} , Cr^{+4} e, finalmente, para Cr^{+3} com maior estabilidade (Krumshnabel e Nawaz, 2004). Diversos redutores intracelulares têm sido sugeridos como contribuintes para a redução de Cr^{+6} , o qual pode diretamente induzir um aumento na produção de ERO através de mecanismos de ciclagem redox (Shi e Dalal, 1990) ou indiretamente, interagindo com mitocôndrias (Pourahmad et al., 2003).

A glutatona reduzida (GSH) faz parte das defesas antioxidantes não enzimáticas e é considerada um dos principais antioxidantes, participando da primeira linha de defesa contra as ERO, neutralizando diretamente os pró-oxidantes ou como cofator para algumas reações enzimáticas (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Durante a redução de Cr^{6+} a GSH é oxidada para a glutathiona oxidada (GSSG), que, normalmente, é reciclada de volta para GSH pela atividade da glutathiona-redutase utilizando NADPH como o doador de elétrons (Gunaratnam e Grant, 2001). Nas exposições ao cromo foi observada diminuição dos níveis de GSH no fígado dos animais do grupo Cr 150 quando comparados ao grupo controle. Decréscimos significativos, principalmente no fígado, são indicadores de um metabolismo alterado por contaminantes e de toxicidade causada por metabólitos eletrofílicos (Plummer et al., 1991). O decréscimo observado no nível de GSH pode ser atribuído à diminuição ou inibição da capacidade da GR de reciclar a GSSG que, conseqüentemente, tem sua concentração dentro da célula diminuída, causando também a redução de GSH (Gunaratnam & Grant, 2001; Li et al., 2010a).

As ERO também podem promover a peroxidação lipídica (LPO) que é amplamente utilizada como indicadora de estresse oxidativo em animais aquáticos, e é relatada como um dos principais contribuintes para a perda da função celular em animais sob esse tipo de estresse (Li et al., 2010b). Os níveis de MDA no fígado dos peixes expostos ao cromo foram mais baixos em comparação aos níveis encontrados no grupo controle. Isso foi averiguado também por Li et al. (2011) com peixes da espécie *Oncorhynchus mykiss* expostos ao cromo em experimentos *in vivo* e *in vitro* que demonstraram diminuição da peroxidação lipídica. A resposta inicial de diminuição dos níveis de LPO pode ter ocorrido devido a estimulação de sistemas antioxidantes não testados neste estudo. Essa hipótese é demonstrada por Lushchak et al. (2008) que observaram baixo potencial do cromo em induzir LPO no fígado de peixes da espécie *Carassius auratus* após 96 horas de exposição às concentrações de 1, 5, 10 e 50 mg.L^{-1} de dicromato de potássio. Esse estudo também relatou uma redução na atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que podem estar associadas à ação antioxidante que evitou a LPO no estudo com *P. lineatus*.

As análises genotóxicas dos eritrócitos dos peixes expostos ao cromo revelaram danos nos três grupos experimentais em relação ao grupo controle. O maior número de nucleóides danificados apresentavam danos de classe 1. O mesmo foi observado por Velma & Tchounwou (2010) que constataram um aumento nos danos no DNA do fígado e rim de *Carassius auratus* de acordo com o aumento da concentração de cromo. Isso demonstra que o cromo é capaz de atingir e danificar o DNA de vários órgãos de diferentes espécies de peixe. O Cr^{+6} por si só

não é capaz de reagir com a molécula de DNA, no entanto, os radicais e metabólitos produzidos durante sua redução podem posteriormente causar prejuízos ao DNA como quebras de cadeia, cross-links DNA-proteína e DNA-DNA e modificações nucleares (Kasprzak, 1995).

3.5 CONCLUSÕES

Diante do exposto, é possível inferir que o cromo acumulou-se nas brânquias dos animais após 24 h de exposição, demonstrando o contato direto desses órgãos com o meio e, conseqüentemente, com o contaminante em questão. Houve aumento da concentração de metalotioneínas no fígado indicando a presença do cromo nos organismos. O metal também causou danos no DNA dos eritrócitos dos indivíduos avaliados evidenciando seu potencial genotóxico. Esses resultados mostram que o limite máximo permitido para águas brasileiras pela Resolução CONAMA 357/2005 não é segura para a espécie *P. lineatus*.

3.6 AGRADECIMENTOS

À estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina/PR (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq) pela bolsa de mestrado concedida. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de F.E.R.A.Santos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, L.C., Wood, C.M., 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.* 78, 217 - 232.
- Almeida, J.A., Novelli, E.L.B., Dal, P.S.M., Alves Júnior, R., 2001. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Environ. Pollu.* 114, 169 - 175.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic. Toxicol.* 76, 160 - 202.
- Atli, G., Canli, M., 2008. Characterization of branchial Na,K-ATPase from three freshwater fish species (*Oreochromis niloticus*, *Cyprinus carpio* and *Oncorhynchus mykiss*). *Turk. J. Zool.* 32, 299 - 304.

- Beutler, E., O. Durom, B. M. Kelly. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *Clin. Chem. Lab. Med.* 61, 882 - 890.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E.J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25 (8), 853 - 873.
- Carvalho, C.S., Araujo, H.S.S., Fernandes, M.N., 2004. Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comp. Biochem. Physiol. B* . 137, 225 - 234.
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Parma, M.J., Scarabotti, P., Wunderlin, D., 2009. Multiple biomarkers responses in *Prochilodus lineatus* allowed assessing changes in the water quality of Salado River basin (Santa Fe, Argentina). *Environ. Pollut.* 157, 3025 - 3033.
- Cervantes, J.C., Garcia, C., Devars, S., 2001. Interaction of chromium with microorganisms and plant. *FEMS Microbiology Reviews.* 25, 335-347.
- Ciftci, N., Cicik, B., Erdem, C., Ay, O., Gunalp, C., 2010. Accumulation of Chromium in Liver, Gill and Muscle Tissues of *Oreochromis niloticus*. *J.A.V.A.* 9 (14), 1958 - 1960.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio ambiente, 2005. Resolução nº357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, Brasil.
- De Boeck, G., Eyckmans, M., Lardon, I., Bobbaers, R., Sinha, A.K., Blust, R., 2010. Metal accumulation and metallothionein induction in the spotted dog fish *Scyliorhinus canicula*. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 155, 503 - 508.
- Di Giulio, R.T., Benson, W.H., Sanders, B.M., Van Veld, P.A., 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation, and toxicity. In: RAND, G. M. *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment.* 523 - 561.
- Falfushynska, H.I., Stoliar, O.B., 2009. Function of Metallothioneins in Carp *Cyprinus carpio* from Two Field Sites in Western Ukraine. *Ecotox. Environ. Safe.* 72, 1425 - 1432.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.* 84, 415 - 430.
- Filipovi, V., Raspor, B., 2003. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water Res.* 37 (13), 3253 - 3262.
- Fleet, J.C., Golemboski, K.A., Dietert, R.R., Andrews, G.K., McCormick, C.C., 1990. Induction of hepatic metallothionein by intraperitoneal metal injection: an associated inflammatory response. *Am. J. Physiol.* 258, 926 - 933.
- Gioda, C.R., Lissner, L.A., Pretto, A., Rocha, J.B.T., Schetinger, M.R.C., Neto, J.R., Morsch, V.M., Loro, V.L., 2007. Exposure to sublethal concentrations of Zn (II) and Cu (II) changes biochemical parameters in *Leporinus obtusidens*. *Chemosphere.* 69, 170 - 175.
- Gunaratnam, M., Grant, M.H., 2001. The role of glutathione reductase in the cytotoxicity of chromium (VI) in isolated rat hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 134, 191 - 202.
- Halliwell, B., Gutteridge, J., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Nova York: Oxford University Press. 1, 851.
- Hermes-Lima, M., 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals in STOREY, K.B. (Ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation.* New York, John Wiley & Sons, Inc. p. 319-368.
- Hylland, K., Haux, C., Hogstrand, C., 1992. Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog.* 91, 89 - 96.

- Kasprzak, K.S., 1995. Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest.*, 13, 411 - 430.
- Kobayashi, H., Sugiyama, C., Morikawa, Y., Hayashi, M., Sofuni, T.A., 1995. Comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis. *MM Supplement*. 3, 103 - 115.
- Kota, J., Stasicka, Z., 2000. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environmental pollution*. 107, 263 - 283.
- Krumschnabel, G., Nawaz, M., 2004. Acute toxicity of hexavalent chromium in isolated teleost hepatocytes. *Aquat Toxicol.* 70, 159 - 67.
- Li, Z.H., Zlabek, V., Velisek, J., Grabic, R., Machova, J., Randak, T., 2010a. Modulation of antioxidant defence system in brain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after chronic carbamazepine treatment. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 151, 137 - 141.
- Li, Z.H., Li, P., Randak, T., 2010b. Effect of a human pharmaceutical carbamazepine on antioxidant responses in brain of a model teleost in vitro: An efficient approach to biomonitoring. *J. Appl. Toxicol.* 30, 644 - 648.
- Li, Z.H., Li, P., Randak, T., 2011. Evaluating the toxicity of environmental concentrations of waterborne chromium (VI) to a model teleost, *Oncorhynchus mykiss*: a comparative study of in vivo and in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 402 - 407.
- Lionetto, M.G., Caricato, R., Giordano, M.E., Pascariello, M.F., Marinosci, L., Schettino, T., 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 324 - 330.
- Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., 2006. Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 44, 283 - 289.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Nykorak, M.Z., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2008. The effect of potassium dichromate on free radical processes in goldfish: Possible protective role of glutathione. *Aquatic Toxicol.* 87, 108 - 114.
- Martinez, C.B.R., 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água in: Ângela Teresa Silva-Souza (org.) Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. *Maringá. Abrapoa*, 43 - 62.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol. C*. 143, 141 - 149.
- Olsvik, P.A., Gundersen, P., Andersen, R.A., Zachariassen, K.E., 2000. Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. *Aquat. Toxicol.* 50, 301 - 316.
- Paris-Palacios, S., Biagianti-Risbourg, S., Vernet, G., 2003. Metallothionein Induction Related to Hepatic Structural Perturbations and Antioxidative Defences in Roach (*Rutilus rutilus*) Exposed to the Fungicide Procymidone. *Biomarkers*. 8, 128 - 141.
- Plummer, J.L., Smith, B.R., Sies, H., Bend, J.R., 1991. Chemical depletion of glutathione in vivo. *Meth. Enzimol.* 77, 50 - 59.
- Pourahmad, M., O'Brien, P.J., Jokar, F., Daraei, B., 2003. Carcinogenic metal induced sites of reactive oxygen species formation in hepatocytes. *Toxicol. Vitro.* 17, 803 - 810.
- Roberts, A.P., Oris, J.T., 2004. Multiple biomarker response in rainbow trout during exposure to hexavalent chromium. *Comp. Biochem. Physiol. C*. 138, 221 - 228.
- Roesijadi, G., Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. *Aquat. Toxicol. Mol. Biochem. Cell. Persp.* 387 - 420.

- Quirós, R., Cuch, S., 1989. The fisheries and limnology of the lower Plata basin. In *Proceedings of the International Large River Symposium* (Dodge, D. P., ed.). *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 106, 429–443.
- Quirós, R., 1990. The Paraná River Basin development and the changes in the lower basin fisheries. *Interciencia* 15, 442–451.
- Ryu, S.K., Park, J.S., Lee, I.S., 2003. Purification and characterization of a copper-binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 134, 101 - 107.
- Sampaio, F.G., Bojink, C.L., Oba, E.T., Santos, L.R.B., Kalinin, A.L., Ratin, F.T., 2008. Antioxidant defenses and biochemical changes in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) in response to single and combined copper and hypoxia exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 147, 43 - 51.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A single technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184 - 191.
- Schlenk, D., Zhang, Y.S., Nix, J., 1995. Expression of hepatic metallothionein messenger RNA in feral fish and caged fish species correlates with muscle mercury levels. *Ecotoxicol. Environ. Safe.* 31, 282 - 286.
- Shi, X.L., Dalal, N.S., 1990. Glutathione reductase functions as vanadate(V) reductase. *Arch Biochem Biophys.* 278(1), 288 - 290.
- Svecevičius, G., 2007. Avoidance response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to hexavalent chromium solutions. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79, 596 - 600.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 178 - 189.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 631, 36 - 43.
- Velma, V., Tchounwou, P.B., 2010. Chromium induced biochemical, genotoxic and histopathologic effects in liver and kidney of Goldfish, *Carassius auratus*. *Mutat. Res.* 698(1-2), 43 - 51.
- Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, F., 1997. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: a application to Mediterranean and Antarctic mollusks. *Mar. Environ. Res.* 44, 69 - 84.
- Viarengo, A., Lowe, D., Bolognesi, C., Koehler, A., 2007. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 46, 281 - 300.
- Vinodhini, R., Narayanan, M., 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 5 (2), 179 - 182.
- Vutukuru, S.S., Prabhath, N.A., Raghavender, M., Yerramilli, A., 2007. Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 4(3), 224 - 227.
- [WHO] World Health Organization, 1988. Chromium. *Environmental Health Criteria*, 61.
- Yilmaz, A.B., Turan, C., Toker, T., 2010. Uptake and distribution of hexavalent chromium in tissues (gill, skin and muscle) of a freshwater fish, Tilapia, *Oreochromis aureus*. *J. Environ. Chem. Ecotox.* 2, 28 - 33.

4 MANUSCRITO II**ALTERAÇÕES HEMATOLÓGICAS E OSMORREGULATÓRIAS CAUSADAS
PELO CROMO NO TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus***

Fernanda Emanuela Rodrigues Alves dos Santos, Cláudia B. R. Martinez*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina.
C.P. 6001. CEP: 86051-990. Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência. Tel: +55 43 3371.4650 – Fax: +55 43 4471.4467
E-mail: cbueno@uel.br

Manuscrito a ser encaminhado para publicação no periódico *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology*.

RESUMO

O cromo é um metal muito utilizado em atividades industriais e considerado altamente tóxico. O presente estudo avaliou os efeitos deste metal na espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus* expostos durante 24 horas às concentrações de 50, 100 e 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cromo, utilizando biomarcadores fisiológicos. Os parâmetros hematológicos analisados revelaram uma diminuição significativa no número de eritrócitos de todos os grupos expostos ao cromo. Esses dados juntamente com a diminuição do índice do hematócrito e da elevação na concentração do íon potássio no plasma podem indicar a ocorrência de hemólise. Entretanto, a enzima Na^+/K^+ -ATPase teve sua atividade reduzida nos mesmos grupos experimentais em que a concentração de K^+ esteve elevada, sugerindo que sua inatividade também contribuiu com o aumento do íon no plasma desses animais. A anidrase carbônica apresentou redução em sua atividade resultando em desequilíbrios iônicos que foram constatados através da concentração de Cl^- no plasma que diminuiu após 24 h de exposição ao cromo. A diminuição na concentração de cálcio plasmático mostrou que o metal foi capaz de interferir nos mecanismos responsáveis pela hiperregulação deste íon que, por sua vez, pode ter prejudicado estruturas responsáveis pela regulação de outros íons. Esses resultados mostram que o cromo é capaz de causar alterações hematológicas e osmoiônicas na espécie *P. lineatus* podendo ocasionar graves danos em sua fisiologia e que a concentração máxima de Cr permitida pela legislação brasileira (Resolução CONAMA 357), que é de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, não é segura para esta espécie.

Palavras-chave: anidrase carbônica, íons plasmáticos, hematócrito, hemólise, hiperregulação, Na^+/K^+ -ATPase.

4.1 INTRODUÇÃO

Os metais constituem um importante grupo de poluentes aquáticos devido à sua propriedade bioacumulativa e não-biodegradável (Vutukuru et al., 2007). O cromo presente no ambiente é geralmente de origem antropogênica, proveniente de indústrias e atividades de manufatura (Dorn et al., 1987; Svecevicius, 2009). Sua forma hexavalente é considerada tóxica devido à sua facilidade para atravessar membranas celulares. Dentro da célula, o cromo hexavalente é reduzido a sua forma trivalente que possui alto potencial mutagênico e pode causar sérios danos ao organismo (Farag et al., 2006; Li et al., 2010c). Nos peixes, os efeitos do cromo podem envolver perturbações hematológicas, bioquímicas e de genotoxicidade (Van Vuren et al., 1994; Arunkumar et al., 2000; Krishnani et al., 2003; Teles et al., 2005).

Biomarcadores hematológicos são frequentemente utilizados para detectar e diagnosticar os efeitos subletais em peixes expostos a diferentes substâncias tóxicas, uma vez que o sangue é altamente suscetível às mudanças que podem ocorrer no meio. O cromo tem um efeito adverso sobre os parâmetros hematológicos desses animais (Öner et al., 2009; Zaki et al., 2009) e os danos às células sanguíneas associadas a este metal incluem alterações no hematócrito, hemoglobinas, diminuição da contagem de eritrócitos (Firat e Kargin, 2009) e hipoglicemia.

Uma vez dentro do animal, o metal também pode interferir também na fisiologia do organismo causando prejuízos às brânquias que são responsáveis pela tomada ativa de íons nos peixes de água doce (Evans, 1987). Devido à íntima relação entre os fluídos corpóreos e o ambiente aquático nas brânquias, distúrbios no balanço hídrico e na homeostase iônica são aspectos característicos de estresse em peixes (Wendelaar-Bonga, 1997). A metaloenzima anidrase carbônica (AC) é uma enzima que pode ser encontrada aderida à membrana plasmática ou a organelas celulares e no citosol das células branquiais (Gilmour e Perry, 2009). A AC está relacionada ao equilíbrio ácido-base, sendo responsável por catalisar a hidratação do gás carbônico, gerando ácido carbônico, que em pH fisiológico se dissocia em próton hidrogênio e o ânion bicarbonato (Perry e Gllmour, 2006) que, por sua vez, atuam como contra-íons na tomada de sódio e cloreto do meio (Goss et al., 1998).

Do mesmo modo, a Na^+/K^+ -ATPase (NKA) branquial pode sofrer alterações provocadas por metais resultando em desordens no fluxo de íons (Skidmore, 1970). A NKA atua retirando da célula três íons sódio em troca de dois íons potássio do plasma sendo necessário grande suprimento de energia (ATP) disponível (Perry, 1997). Para que a molécula de ATP se ligue ao seu respectivo sítio de ligação, é necessária a presença de um íon magnésio, que irá atuar como cofator da enzima. A ausência, a substituição ou a interferência na ligação deste íon implica em inatividade da enzima (Fischer e Giroux, 1987). Outros fatores como as concentrações dos íons sódio e potássio também são reguladoras da atividade da NKA (Atli e Canli, 2008). Portanto, a interferência do metal na concentração ou no fluxo de íons pode, conseqüentemente, alterar também as enzimas relacionadas a eles.

Para o monitoramento dos ecossistemas, muitos organismos podem ser utilizados como bioindicadores, tendo como critério para a escolha de espécies que sejam representativas nos ambientes analisados (Burger e Gochfeld, 2000) além terem uma taxonomia bem definida, apresentar baixa variabilidade genética e baixa mobilidade para possibilitar os trabalhos em laboratório (Buss et al., 2003). Peixes da espécie neotropical *Prochilodus lineatus* possuem hábito alimentar detritívoro, o que torna grande a probabilidade de serem contaminados por metais e outras substâncias que possam estar depositadas ou aderidas aos sedimentos (Martinez, 2006). Conhecida como curimba essa espécie é migradora da bacia do rio Paraná e é considerada a quarta espécie mais importante em desembarques de peixes no reservatório de Itaipu (Agostinho et al., 1994) sendo, portanto, uma ótima espécie para estudos ecotoxicológicos.

Deste modo, devido ao grande volume de efluentes gerado por atividades que utilizam o cromo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos deste metal sobre os parâmetros hematológicos e iônicos, bem como na atividade de duas enzimas relacionadas à osmorregulação do peixe *Prochilodus lineatus*.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Aclimação dos peixes e exposição ao cromo

Indivíduos juvenis da espécie *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) foram cedidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, PR. Os peixes passaram por período de cinco dias de aclimação em tanques contendo 300 L de água desclorada e aerada. Os parâmetros da água foram continuamente monitorados durante esse período (pH $6,8 \pm 0,6$; condutividade $75 \pm 10 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$; oxigênio dissolvido $7,8 \pm 0,13 \text{ mg O}_2\cdot\text{L}^{-1}$; temperatura $19,05 \pm 0,68 \text{ }^\circ\text{C}$ e dureza $36 \text{ mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$). A alimentação dos animais com ração comercial ocorreu no segundo e quarto dias de aclimação e foi suspensa durante os testes de toxicidade.

Para as análises da concentração de cromo total e dissolvido, a água dos aquários experimentais e controle foi coletada com o auxílio de seringa de vidro nos tempos 0 e 24 h. Para as análises de cromo total a água coletada foi armazenada em tubos plásticos com a adição de 0,5% de ácido nítrico. Já para as análises do cromo dissolvido, as amostras foram filtradas ($0,45 \mu\text{m}$), acidificadas (0,5% HNO_3) e armazenadas. As amostras foram mantidas a 4°C até as análises de cromo em espectrofotômetro de absorção atômica (EAA-AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA).

Os animais foram submetidos a testes estáticos de toxicidade aguda por 24 h. Os peixes foram colocados, em grupos de 8 indivíduos, em aquários contendo 80 L de água aerada e desclorada. Um grupo controle (CTR) foi exposto somente à água e três grupos experimentais foram expostos às seguintes concentrações nominais de cromo obtidas a partir do dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$): $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cr 50), $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cr 100) e $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Cr 150). A menor concentração testada, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, corresponde a concentração máxima permitida para este metal para águas doces brasileiras (Resolução CONAMA 357, 2005). O grupo controle foi amostrado simultaneamente aos grupos expostos ao cromo.

Após as 24 h de exposição os peixes foram retirados dos aquários e anestesiados com benzocaína ($0,1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) para coleta de sangue pela veia caudal. Em seguida, os animais foram mortos por secção medular para retirada das brânquias, as quais foram mantidas congeladas em ultrafreezer (-80°C) até o momento das análises.

4.2.2 Análise dos parâmetros hematológicos

Alíquotas de sangue total foram utilizadas para a determinação do hematócrito, número de eritrócitos e conteúdo de hemoglobina. O hematócrito foi determinado de acordo com a técnica do microhematócrito, em capilares heparinizados após centrifugação por 5 min. O número de eritrócitos por mm^3 de sangue (RBC) foi determinado utilizando-se amostras de sangue fixadas em tampão formol-citrato (citrato de sódio diluído em 0,4% de formol em solução) e a contagem foi feita em câmara de Neubauer no microscópio óptico (400x). O conteúdo de hemoglobina foi determinado pelo método da cianometahemoglobina com kit comercial (Labtest, Brasil) em espectrofotômetro (leitura em 540 nm).

4.2.3 Análise da osmolalidade e concentração de íons e glicose no plasma

Após centrifugação (10 min, 10000 g) do sangue total, o plasma foi separado e congelado a -20°C para as análises. A osmolalidade foi medida por congelamento usando um osmômetro (Osmomat 030, Gonotec, Alemanha). A glicemia foi determinada usando-se o método colorimétrico pela glicose-oxidase com auxílio do kit comercial (Labtest, Brasil) em espectrofotômetro (leitura em 505 nm). As análises de sódio e potássio plasmáticos foram realizadas com amostras de plasma diluídas em água deionizada, em fotômetro de chama (900, Analyser, Brasil). A concentração de cloreto foi determinada pelo método do tiocianato de mercúrio com auxílio de kit comercial (Labtest, Brasil) em espectrofotômetro de microplacas (470 nm, Victor 3, Perkin Elmer, USA). O íon cálcio foi analisado em amostras de plasma diluídas, utilizando-se o óxido de lantânio como modificador, em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (AAAnalyst 700, Perkin Elmer, USA).

4.2.4 Determinação da atividade das enzimas Na^+/K^+ - ATPase (NKA) e Anidrase Carbônica (AC)

Os filamentos branquiais foram separados dos arcos, homogeneizados em solução Sacarose-EDTA-Imidazol (1:10 p:v) e centrifugados (7500 g, 15 min, 4°C). O sobrenadante foi usado para medir atividade da enzima NKA segundo o protocolo estabelecido por Quabius et al., (1997). Neste método mede-se a atividade da enzima de modo indireto, através da produção de fosfato inorgânico proveniente da

quebra de ATP, em amostras incubadas com KCl e com ouabaína, e como padrão foi utilizada uma solução padrão de fósforo 650 μM (Sigma). Os ensaios foram realizados em leitora de microplacas (ELx 800, BioTek, USA) em 620 nm e a atividade da enzima foi expressa em $\mu\text{M Pi.mg proteína}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

A atividade da anidrase carbônica nos filamentos branquiais foi determinada segundo Vitale et al. (1999). Para tanto, os filamentos branquiais foram homogeneizados (1:10 p:v) com solução de reação (manitol 225 mM, sacarose 75 mM, tris-base 10 mM, NaH_2PO_4 10 mM, pH 7,4), centrifugados (7500 g, 15 min, 4° C) e ao sobrenadante foi adicionado a mesma solução da homogeneização, resfriada a 4° C, e água saturada com CO_2 . A atividade catalítica da enzima foi quantificada pela acidificação do meio saturado com CO_2 durante 20 s, utilizando um pHmetro de bancada (Jenway 3510, EUA). A inclinação da reta gerada pela queda do pH ao longo do tempo forneceu a taxa de reação catalisada (TC) e a taxa de reação não-catalizada (TNC) foi obtida pela leitura do pH na ausência de amostra, substituindo-se amostra por tampão. A partir dessas duas medidas a atividade da anidrase carbônica (AC) foi calculada pela fórmula: $\text{AC} = [\text{TC}/\text{TNC} - 1].\text{mg}^{-1}$ de proteína.

A concentração de proteínas das amostras, para a expressão dos resultados das atividades da NKA e AC, foi determinada segundo Lowry et al. (1951), utilizando soro albumina bovina como referência

4.2.5 Análise estatística

Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos (CTR X Cr 50 X Cr 100 X Cr 150) foram comparados entre si através de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não-paramétrica (Kruskall-Wallis), de acordo com a distribuição dos dados (normalidade e homogeneidade de variância). Quando houve indicação de diferenças significativas elas foram localizadas utilizando-se o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK). Foram considerados significativos valores de $P < 0,05$.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Parâmetros da água

Ao longo dos experimentos os valores de temperatura, pH, condutividade e oxigênio dissolvido (OD) foram monitorados e não variaram significativamente nesse período. Mantiveram-se os valores (média \pm erro padrão): temperatura $19,9 \pm 1,33$ °C, pH $6,81 \pm 0,26$, condutividade 75 ± 2 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, OD $7,69 \pm 0,29$ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e dureza 36 $\text{mgCaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$.

As médias das concentrações de cromo total na água coletada dos aquários experimentais Cr 50, Cr 100 e Cr 150 em 0 e 24h foram de 107,4; 100,7 e 97,93%, respectivamente, do valor das concentrações nominais (Tabela 2). Já as concentrações de cromo dissolvido nos grupos foram de 104,8; 99,2 e 87,52% das nominais. Na água dos aquários do grupo CTR o cromo não foi detectado.

Tabela 2 - Concentrações de cromo total e dissolvido ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) na água dos aquários contendo as concentrações nominais de Cr correspondentes a 0 (CTR), 50, 100 e 150 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, no período de 24 h.

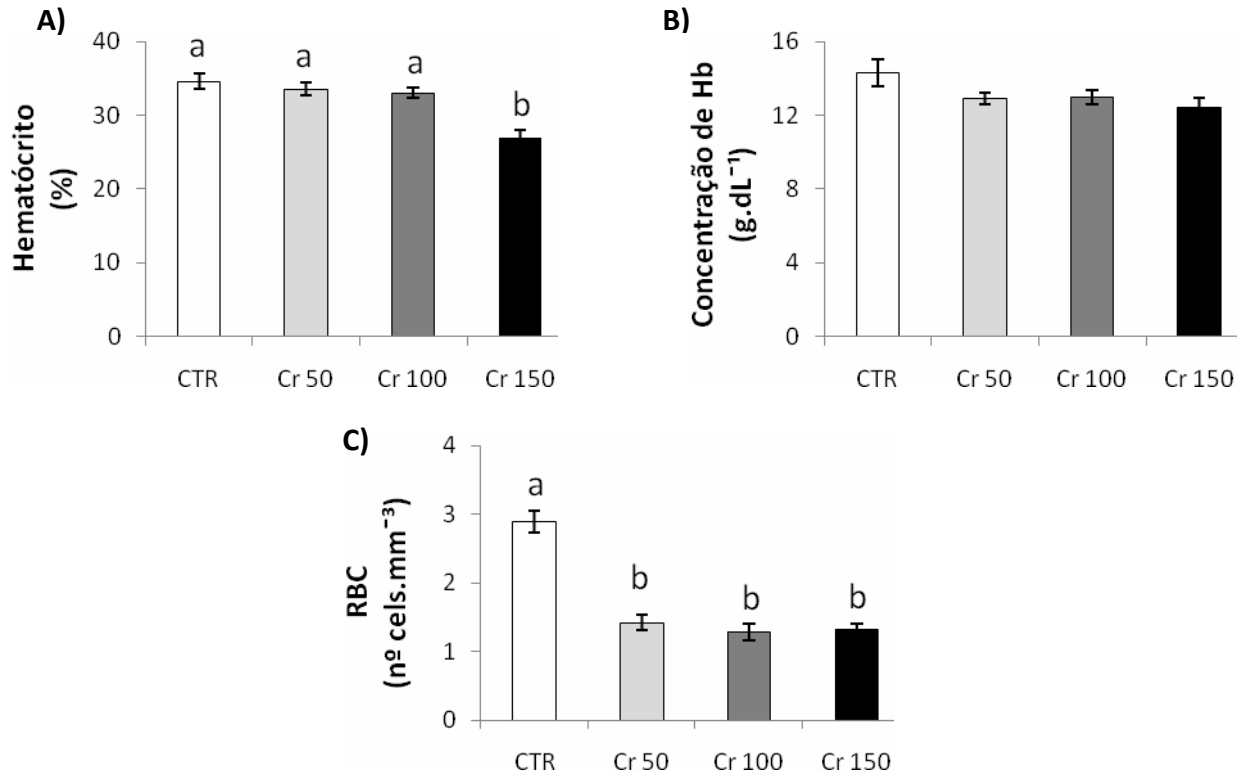
[Cr] nominal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		0	50	100	150
Total	0h	ND	54,10	102,85	150,95
	24h	ND	52,94	98,72	142,85
Dissolvido	0h	ND	52,49	100,70	133,90
	24h	ND	52,32	97,79	128,66

Valores indicam a média. N/D: valores não detectados. Valor de n = 2.

4.3.2 Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos analisados revelaram uma queda significativa no hematócrito do grupo Cr 150 em relação ao grupo controle (Fig. 8A). A concentração de hemoglobina por sua vez manteve-se constante (Fig. 8B) enquanto o número de eritrócitos diminuiu em todos os grupos experimentais (Cr 50, Cr 100 e Cr 150), quando comparados aos seus respectivos controles (Fig. 8C).

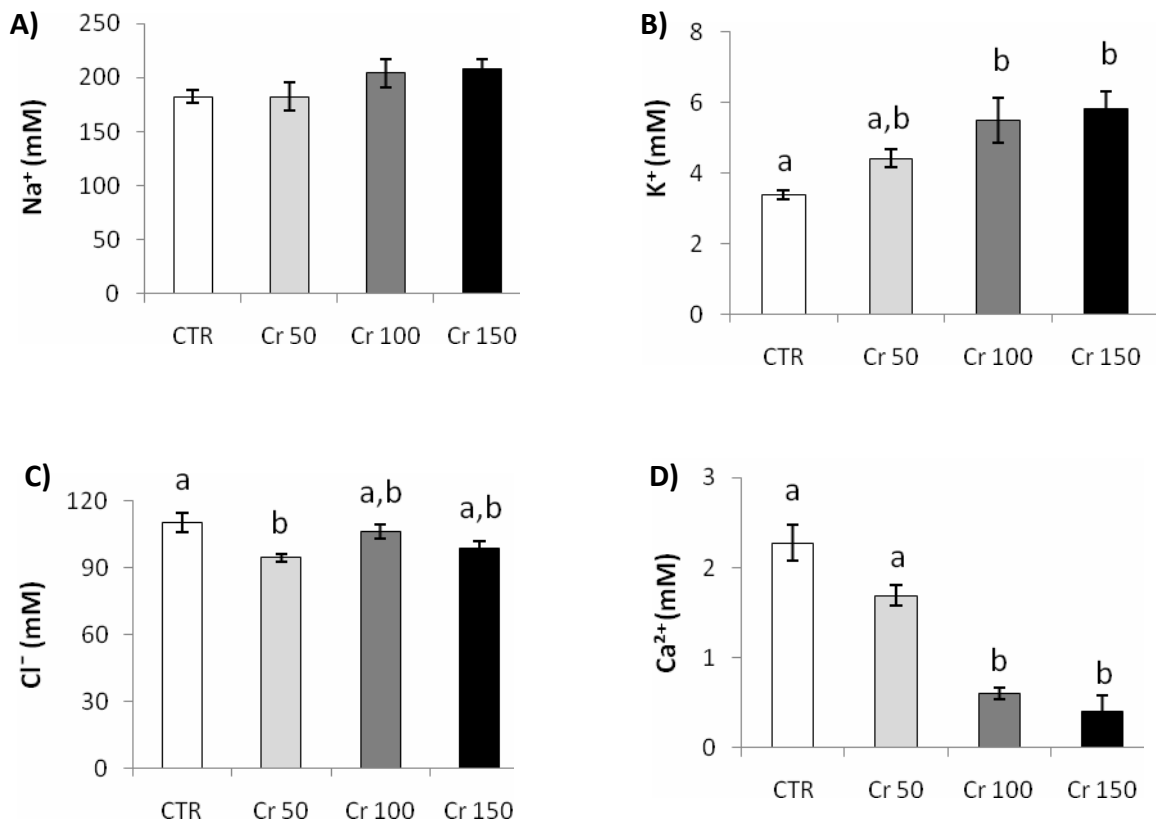
Figura 8 - Parâmetros hematológicos (média \pm EP, n = 5-8): hematócrito (A), concentração de hemoglobina (B) e número de eritrócitos (C) de *P. lineatus* expostos ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR) durante 24h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).



4.3.3 Íons plasmáticos, osmolalidade e glicemia

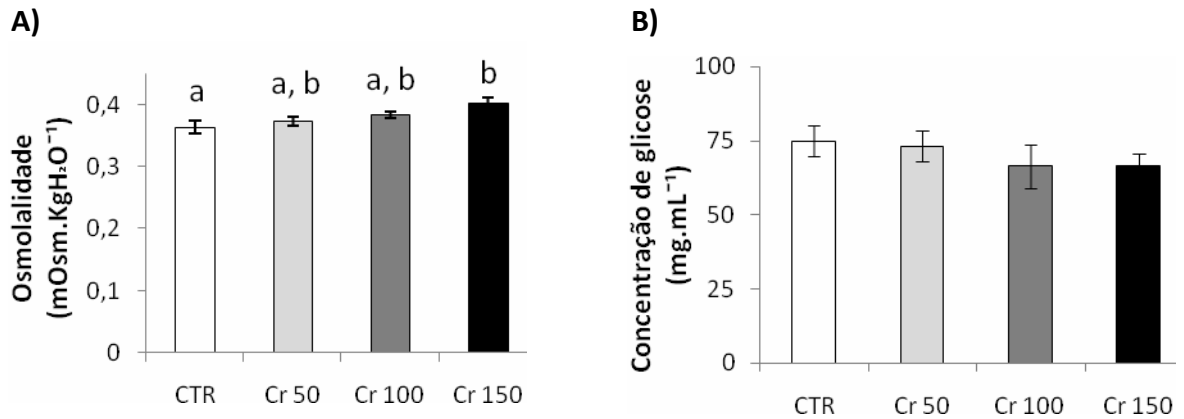
A concentração de Na^+ plasmático se manteve constante em todos os grupos experimentais avaliados (Fig. 9A). Os níveis de K^+ aumentaram e foram significativamente mais altos em relação ao controle nos grupos Cr 100 e Cr 150 (Fig. 9B). O Cl^- teve sua concentração reduzida significativamente apenas no grupo Cr 50 (Fig. 9C) enquanto a concentração de Ca^{2+} apresentou redução significativa nos grupos Cr 100 e Cr 150 em relação ao controle (Fig. 9D).

Figura 9 - Concentração plasmática (média \pm EP, $n = 6-8$) de sódio (A), potássio (B), cloreto (C) e cálcio (D) de *P. lineatus* expostos ao cromo nas concentrações de $50 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), $150 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR) durante 24h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).



A osmolalidade aumentou apenas no grupo Cr 150 onde foi maior que o grupo controle (Fig. 10A). Os níveis de glicose se mantiveram constantes em todos os grupos (Fig. 10B).

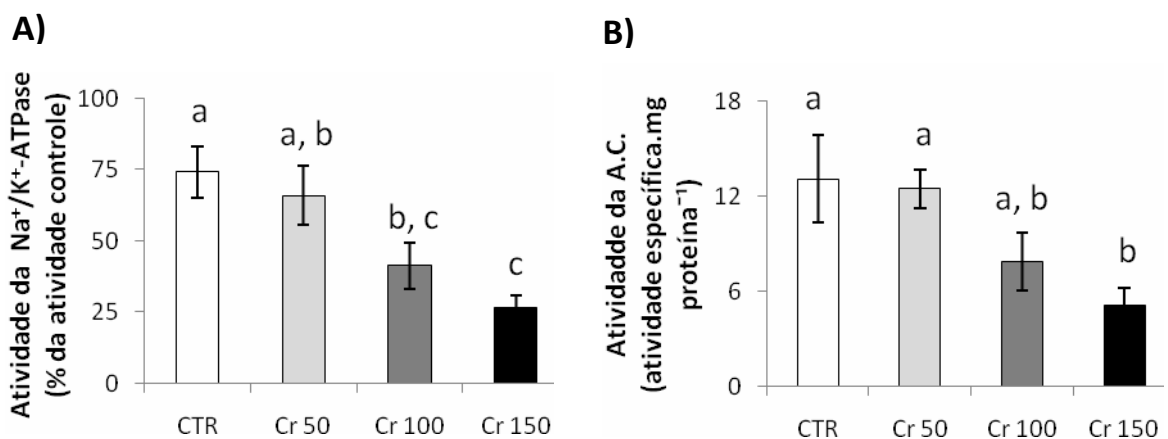
Figura 10 - Concentração (média \pm EP, n = 6-8) osmótica e de glicose no plasma de *P. lineatus* expostos ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR) durante 24h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P < 0,05$).



4.3.4 Atividade branquial da Na⁺/K⁺-ATPase e Anidrase Carbônica

Ambas as enzimas analisadas nas brânquias diminuíram em relação ao grupo controle. A Na⁺/K⁺-ATPase teve sua atividade significativamente reduzida significativamente nos grupos Cr 100 e Cr 150 (Fig. 11A), e a atividade da AC foi menor nos três grupos experimentais quando comparados ao controle (Fig. 11B).

Figura 11 - Atividade (média \pm EP, n = 6-7) das enzimas Na⁺/K⁺-ATPase (A) e anidrase carbônica (B) em brânquias de *P. lineatus* expostos ao cromo nas concentrações de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 50), 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 100), 150 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Cr 150) ou apenas à água (CTR) durante 24h. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os grupos ($P \leq 0,05$).



4.4 DISCUSSÃO

Diante dos resultados apresentados evidenciou-se a importância do estudo dos efeitos do cromo em peixes, pois além de prejudicar os parâmetros hematológicos, ocasionando hemólise de eritrócitos e dificuldades no transporte de oxigênio, o metal inibe a atividade de enzimas branquiais causando alterações também na concentração de íons plasmáticos em peixes.

Neste trabalho foi observado que o número de eritrócitos (RBC) de *P. lineatus* diminuiu nos peixes expostos a todas as concentrações de cromo testadas e que os valores do hematócrito também diminuíram nos peixes do grupo Cr 150 em relação ao grupo controle. Shaheen e Akhtar (2012) obtiveram resultados semelhantes quando expuseram peixes da espécie *Cyprinus carpio* a 6 diferentes concentrações de cromo por longo período de exposição (6 meses) e observaram quedas significativas no número de RBC de todos os grupos. Esta diminuição no número de RBC pode estar associada a uma queda na própria taxa de produção ou a perdas causadas por hemólise (Vosyliene e Jankaite, 2006). No presente trabalho, a ocorrência de hemólise é sustentada pela concentração do íon potássio (K^+) que aumentou nos grupos Cr 100 e Cr 150. A determinação dos níveis de K^+ livre no plasma, um íon normalmente intracelular, serve como marcador bioquímico indicativo de hemólise, quando detectado acima dos níveis normais. Entretanto, a diminuição na contagem de eritrócitos nos grupos Cr 50 e Cr 100, que não apresentaram o índice do hematócrito alterado, pode ser explicada pelo aumento de volume sofrido por eritrócitos maduros em presença do cromo. Esse fato foi observado por Tejendra e Jagdish (1987) que expuseram a espécie *Barbus conchoni* a $117,8 \text{ mg.L}^{-1}$ de dicromato de potássio durante 12 e 24 h. O cromo pode influenciar o ganho de água nessas células fazendo com que aumentem de volume e, conseqüentemente, alterem o índice do hematócrito. Os autores sugerem também que o cromo pode interferir na hematopoiese das células sanguíneas desses peixes devido a presença de vacúolos nos eritrócitos e de células com formatos anormais.

Apesar da concentração de hemoglobina não ter demonstrado diferenças significativas em relação ao seu grupo controle mesmo com a diminuição do número de eritrócitos observada neste trabalho, autores afirmam que o cromo pode competir com o ferro pela ligação com a transferrina, proteína responsável pelo transporte de

ferro recém-absorvido (Campbell et al., 1997; Trumbo et al., 2001), e ocasionar diminuição na concentração de hemoglobinas e, conseqüentemente, problemas no transporte de oxigênio do organismo e hipóxia dos tecidos.

Assim como os parâmetros hematológicos, a hiperglicemia é uma resposta comum a diversos estressores em peixes e tem sido considerada como indicador de exposição subletal a poluentes (Wendelaar-Bonga, 1997). Alterações nos níveis glicêmicos podem representar a mobilização de energia em resposta a fatores de estresse temporários, tais como variações ambientais ou a presença de contaminantes na água (Lohner et al., 2001). Shaheen e Akhtar (2012) expuseram a espécie *Cyprinus carpio* a 25, 50, 75, 100, 125 e 150 mg/L⁻¹ de cromato de potássio por um período de 6 meses de exposição e observaram uma redução dose-dependente nos níveis de glicose no sangue desses animais e atribuíram essa diminuição gradual a um aumento de energia devido ao estresse oxidativo. Os níveis de glicemia observados no presente trabalho não se mostraram alterados quando comparados ao grupo controle, indicando que a concentração de cromo utilizada não deve ter sido alta o suficiente ou que o período de exposição foi relativamente curto para que esse parâmetro fosse alterado em *P. lineatus*.

A enzima Na⁺/K⁺-ATPase (NKA) teve sua atividade reduzida, sendo diferente do seu controle nos grupos Cr 100 e Cr 150. As alterações na atividade desta enzima ocorrem antes de uma disfunção osmorregulatória mais proeminente, assim, a determinação da atividade da NKA pode ser utilizada como um aviso precoce da contaminação por poluentes (Ay et al., 1999). A inibição desta enzima pelo cromo deve dificultar o transporte ativo de íons através da membrana provocando uma falha nos mecanismos osmorregulatórios das brânquias (Thaker et al., 1996). Li et al. (2011), avaliaram os efeitos do cromo sobre esta enzima na espécie *Oncorhynchus mykiss* durante 7 dias de exposição. Utilizando as concentrações de 50, 100 e 200 µg.L⁻¹, seus resultados também demonstraram uma queda na atividade da NKA, porém, essa diminuição não foi significativa quando comparada ao grupo controle. Os autores sugerem que apesar da NKA branquial ter sido ligeiramente inibida na concentração de Cr mais alta, os peixes parecem tolerar o estresse induzido pelo metal nessas concentrações. Isso demonstra que a espécie *P. lineatus* é mais sensível aos efeitos do cromo que foram mais proeminentes e surgiram em um menor período de exposição. Além disso, essa inibição da NKA em

P. lineatus, juntamente com a ocorrência de hemólise citada anteriormente, também pode ter contribuído com o aumento da concentração de K^+ .

Outra importante enzima, a anidrase carbônica (AC), também teve sua atividade diminuída, o grupo Cr 150 foi significativamente diferente de seu controle. A interação de metais com a AC pode alterar sua função catalítica, levando a falhas de suas funções fisiológicas, e conseqüentemente, alterando todo seu sistema metabólico específico (Vitale et al., 1999). Nos peixes dulcícolas, essa enzima possui grande relevância para a osmorregulação onde, através da hidratação do CO_2 , fornece os íons bicarbonato (HCO_3^-) e hidrogênio (H^+) para as células branquiais onde são trocados por cloreto (Cl^-) ou sódio (Na^+), respectivamente, ou transportados ativamente para fora da célula através da H^+ -ATPase permitindo a absorção de íons (Evans 2008). Apesar da concentração de Cl^- em *P. lineatus* ter demonstrado diferenças significativas apenas no grupo Cr 50, um período maior de exposição ao metal poderia evidenciar alterações iônicas mais proeminentes, uma vez que o desequilíbrio osmótico pode provocar diminuição da atividade da enzima AC. Além disso, o possível quadro de hipóxia já citado também pode ocasionar a inibição da AC pela diminuição da entrada de O_2 no organismo e conseqüente redução na produção de CO_2 , substrato da enzima.

Em teleósteos dulcícolas, o epitélio das brânquias é considerado impermeável a íons e outras moléculas graças às junções oclusivas formadas por componentes que visam manter a polaridade e a impermeabilidade da membrana plasmática (Foskett et al., 1983; Evans, 2005). Essas junções oclusivas são formadas por proteínas onde as ligações célula-célula são mantidas por pontes de cálcio (Schneerberger e Lynch, 1984; Rajasekaran et al., 2001; Brown e Davis, 2002). Metais como cobalto, zinco, cádmio e chumbo demonstraram utilizar a via de absorção do cálcio para penetrar o animal (Bury & Wood, 1999; Macdonald et al., 2002; Rogers & Wood, 2004) prejudicando a hiperregulação deste íon (Evans, 1987). Os resultados de exposição ao cromo demonstraram uma diminuição na concentração de cálcio plasmático em *P. lineatus* submetidos às duas maiores concentrações, sugerindo que cromo foi capaz de interferir nos mecanismos responsáveis pela hiperregulação deste íon que, por sua vez, pode refletir nas junções oclusivas e na regulação de outros íons.

A osmolalidade plasmática desses peixes, por sua vez, pode ter aumentado no grupo Cr 150 em relação ao grupo controle devido ao movimento de água no

plasma ocasionado pelo desequilíbrio iônico. Quando a concentração de íons no plasma se torna menor que a concentração nas células sanguíneas, a água passa do plasma às células diminuindo seu volume e aumentando, portanto, sua concentração.

4.5 CONCLUSÕES

Diante do exposto, é possível inferir que o cromo é capaz de causar alterações hematológicas como a diminuição do número de eritrócitos, hematócrito e hemólise, danos osmorregulatórios diminuindo a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica e alterações nos níveis dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- em peixes da espécie *P. lineatus* expostos durante 24 h a este metal. Esses resultados mostram que o limite máximo permitido para águas brasileiras pela Resolução CONAMA 357/2005 não é segura para a espécie *P. lineatus* e que a contaminação por cromo pode afetar outras espécies através da cadeia trófica chegando até o homem.

4.6 AGRADECIMENTOS

À Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina/PR (EPUEL) pelo fornecimento dos peixes. Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Toxicologia Aquática (INCT-TA, CNPq) pela bolsa de mestrado concedida. Este trabalho faz parte da dissertação de mestrado de F.E.R.A.Santos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A.A., Júlio Jr., H.F., Petrere Jr., M., 1994. Itaipu reservoir (Brazil): Impacts of impoundment on the fish and fisheries. In: *Rehabilitation of Freshwater Fisheries* (Cowxi, G., ed.). Fishing News Book, Bodmin, UK, pp. 177-184
- Arunkumar, R.I., Rajasekaran, P., Michael, R.D., 2000. Differential effects of chromium compounds on the immune response of the African mouth breeder *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Fish Shellfish Immunol.* 10, 667 - 676.
- Atli, G., Canli, M., 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 33 - 38.

- Ay, O., Kalay, M., Tamer, L., Canli, M., 1999. Copper and lead accumulation in tissues of freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 62, 160 - 168.
- Brown, R.C., Davis, T.P., 2002. Calcium modulation of adherens and tight junction function: a potential mechanism for blood-brain barrier disruption after stroke. *J. Am. Heart. Assoc.* 33, 1706 - 1711.
- Burch, K.J., Phelps, S.J., Constance, T.D., 1991. Effect of an infusion device on the integrity of whole blood and packed red blood cells. *ASHP.* 48, 92 - 7.
- Burger, J., Gochfeld, M., 2000. Metal levels in feathers of 12 species of sea birds from Midway Atoll in the northern Pacific Ocean. *Science Total Environ.* 257, 37 - 52.
- Bury, N.R., Wood, C.M., 1999. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is via the proton-coupled Na channel. *Am J Physiol – Regul. Integr. Physiol.* 277, 1385 - 1391.
- Buss, D.F., Baptista, D.F., Nessimian, J.L., 2003. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. *Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro.* 19, 465 - 473.
- Campbell, W.W., Bcard, J.L., Joseph, L.J., Davey, S.L., Evans W.J., 1997. Chromium picolinate supplementation and resistive training by older men: Effects on iron-status and hematologic indexes. *Am. J. Pub. Health.* 87, 1984 - 1988.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio ambiente, 2005. Resolução nº357, de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente, Brasil.
- Dorn, P.B., Rodgers, J.H.J., Jop, K.M., Raia, J.C., Dickson, K.L., 1987. Hexavalent chromium as a reference toxicant in effluent toxicity tests. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 435 - 444
- Evans, D.H., 1987. The fish Gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 71, 47 - 58.
- Evans, D.H., Piermarini, P.M., Choe, K.P., 2005. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation and excretion of nitrogenous waste. *Physiol. Rev.* 85, 97 - 177.
- Evans, D.H., 2008. Teleost fish osmoregulation: what have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. *Am. J. Physiol. – Reg. Integr. Comp. Physiol.* 295, R704-713.
- Farag, A.M., May, T., Marty, G.D., Easton, M., Harper, D.D., Little, E.E., Cleveland, L., 2006. The effect of chronic chromium exposure on the health of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquat. Toxicol.* 76, 246 - 257.
- Fischer, P.W., Giroux, A., 1987. Effects of dietary magnesium on sodium-potassium pump action in the hearts of rats. *J. Nutr.* 117, 2091 - 2095
- Firat, O., Cogun, H.Y., Aslanyavrusu, S., Kargin, F., 2009. Antioxidant responses and metal accumulation in tissues of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Zn, Cd and Zn plus Cd exposures. *J. Appl. Toxicol.* 29, 295 - 301.
- Foskett, J.K., Bern, H.A., Machen, T.E., Conner, M., 1983. Chloride cells and the hormonal control of teleost fish osmoregulation. *J. Exp. Biol.* 106, 255 - 281.
- Gilmour, K.M., Perry, S.F., 2009. Carbonic anhydrase in blood ion acid-base regulation in fish. *J. Exp. Biol.* 212, 1647 - 1661.
- Goss, G.G., Perry, S.F., Fryer, J.N., Laurent, P., 1998. Gill morphology and acid-base regulation in freshwater fishes. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 119 (1), 107 - 115.

- Krishnani, K.K., Azad, I.S., Kailasam, M., Thirunavukkarasu, A.R., Gupta, B.P., Joseph, K.O., Muralidhar, M., Abraham, M., 2003. Acute toxicity of some heavy metals to *Lates calcarifer* fry with a note on its histopathological manifestations. *J. Environ. Sci. Health. A.* 38, 645 - 655.
- Li, Z.H., Li, P., Dzyuba, B., Randak, T., 2010c. Influence of environmental related concentrations of heavy metals on motility parameters and antioxidant responses in sturgeon sperm. *Chem. Biol. Interact.* 188, 473 - 477.
- Li, Z.H., Li, P., Randak, T., 2011. Evaluating the toxicity of environmental concentrations of waterborne chromium (VI) to a model teleost, *oncorhynchus mykiss*: a comparative study of in vivo and in vitro. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 402 - 407.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265 - 275.
- MacDonald, A., Silk, L., Schwartz, M., Playle, R.C., 2002. A lead-gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp Biochem Physiol. C.* 133, 227 - 242.
- Martinez, C.B.R., 2006. Parâmetros bioquímicos de peixes para avaliação da qualidade da água in: Ângela Teresa Silva-Souza (org.) Sanidade de Organismos Aquáticos no Brasil. Maringá. *Abrapoa*, 43 - 62.
- Nolan, D.T., 2000. Skin response of fish to stressors. Ph. D Thesis. Catholic University of Nijmegen, Holland.
- Öner, M., Atli, G., Canli, M., 2009. Effects of metal (Ag, Cd, Cr, Cu, Zn) exposures on some enzymatic and non-enzymatic indicators in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Bullet. Environ. Contam. Toxicol.* 82(3), 317 - 321.
- Perry, S.F., 1997. The chloride cell: structure and function in the gills of freshwater fishes. *Annu. Rev. Physiol.* 45, 325 - 347.
- Perry, S.F., Gilmour, K.M., 2006. Acid–base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 199 - 215.
- Quabius, E.S., Balm, P.H.M., Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocr.* 108, 472 - 482.
- Rajasekaran, S.A., Palmer, L.G., Moon, S.Y., Peralta-Soler, A., Apodaca, G.L., Harper, J.F., Zheng, Y., Rajasekaran, A.K., 2001. Na,K-ATPase activity is required for formation of tight junctions, desmosomes, and induction of polarity in epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 12, 3717 - 3732.
- Rogers, J.T., Wood, C.M., 2004. Characterization of branchial lead-calcium interactions in the freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, 207, 813 - 825.
- Schneerberger, E.E., Lynch, R.D., 1984. Tight junctions: their structure, composition and function. *J. Am. Heart. Ass. – Circ. Res.* 55, 723 - 733.
- Shaheen, T., Akhtar, T., 2012. Assessment of chromium toxicity in *Cyprinus carpio* through hematological and biochemical blood markers. *Turk J Zool.* 36(5), 682 - 690.
- Skidmore, J.F., 1970. Respiration and osmoregulation in rainbow trout with gills damaged by zinc sulphate. *J. Exp. Biol.* 52, 481 - 494.
- Svecevicus, G., 2009. Use of behavioral responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in identifying sublethal exposure to hexavalent chromium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 82, 564 - 568.

- Thaker, J., Chhaya, J., Nuzhat, S., Mittal, R., Mansuri, A.P., Kundu, R., 1996. Effects of chromium(VI) on some ion-dependent ATPases in gills, kidney and intestine of a coastal teleost *Periophthalmus dipes*. *Toxicol.* 112, 237 - 244.
- Tejendra, S., Jagdish, C.P., 1987. Hematological and pathological effects of chromium toxicosis in the freshwater fish, *Barbus conchonus*. *Water Air Soil Pollut.* 35(3-4), 241 - 250.
- Teles, M., Pacheco, M., Santos, M.A., 2005. Physiological and genetic responses of European eel (*Anguilla anguilla* L.) to short-term chromium or copper exposure— influence of pre-exposure to a PAH-like compound. *Environ. Toxicol.* 20 (1), 92 - 99.
- Trumbo, P., Yates, A.A., Schlicker, S., Poos, M., 2001. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *J. Am. Diet. Assoc.* 101(3), 294 - 301.
- Van Vuren, J.H., Van der Merwe, M., Du Preez, H.H., 1994. The effect of copper on the blood chemistry of *Clarias gariepinus* (Clariidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29, 187 - 199.
- Vitale, A.M., Monserrat, J.M., Castilho, P., Rodriguez, E.M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 122, 121 - 129.
- Vosyliene, M.D., Jankaite, A., 2006. Effect of heavy metal model mixture on rainbow trout biological parameters. *Ecologija* 4, 12 - 17.
- Vutukuru, S.S., Prabhath, N.A., Raghavender, M., Yerramilli, A., 2007. Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* 4, 224 - 227.
- Wendelaar-Bonga, S.E., 1997. The stress in fish. *Physiol. Rev.* 77, 591 - 625.
- Zaki, M.S., Moustafa, S., Rashad, H., Sharaf, N., 2009. Assessment of hazardous effect of pollution on *Oreochromis niloticus* including hematological, biochemical and immunological parameters. *J. Agricult. Environ. Sci.* 3(1), 91 - 95.

5 CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo apresentou evidências de que o cromo no ambiente aquático é tóxico para a espécie *P. lineatus*. O metal causou diminuição da GSH além de aumentar a concentração de metalotioneínas no fígado dos animais expostos indicando que a presença do cromo pode ter induzido a síntese dessas proteínas. O metal acumulou-se nas brânquias dos peixes, demonstrando a sensibilidade desses órgãos em contato com o meio contaminado. O cromo também foi capaz de causar alterações hematológicas como a diminuição do número de eritrócitos e hematócrito, hemólise, danos osmorregulatórios diminuindo a atividade das enzimas Na^+/K^+ -ATPase e anidrase carbônica e alterações nos níveis dos íons Na^+ , K^+ e Cl^- plasmáticos. O metal causou danos no DNA dos eritrócitos dos peixes, evidenciando seu potencial genotóxico. Esses resultados mostram que o cromo pode reduzir as defesas antioxidantes e causar prejuízos na fisiologia dos peixes e que o limite máximo permitido para águas brasileiras pela Resolução CONAMA 357/2005 não é segura para a espécie *P. lineatus*.

REFERÊNCIAS GERAIS

- 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*, v. 58, n. 2, p. 220–226, 2004.
- AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO Jr. H. F. Peixes da bacia do Alto Rio Paraná. In: Lowe-McConnell, R.H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo: EDUSP. 1999.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, C. L.; PELICICE, F. M. *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. EDUEM, Maringá, PR, Brasil. 2007.
- AMADO, L. L.; GARCIA, M. L.; RAMOS, P. B.; FREITAS, R. F.; ZAFALON, B., FERREIRA, J. L.R.; YUNES, J. S.; MONSERRAT, J. M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science Total Environmental*, v. 407, p. 2115-2123, 2009.
- AMIARD, J. C.; AMIARD-TRIQUET, C.; BARKA, S.; PELLERIN, J.; RAINBOW, P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, v. 76, p. 160-202, 2006.
- ANDERSON, R. Nutritional role of chromium. *The Science of the Total Environment*. v. 17, p. 13-29, 1981.
- ANDERSON, R. A. Chromium, Glucose Intolerance and Diabetes. *Journal of the American College of Nutrition*, v. 17, p. 548-555, 1998.
- ARFSTEN, D. P.; AYLWARD, L. L.; KARCH, N. J. Chromium. In: Zelikoff, J. T.; Thomas, P. T. *Immunotoxicology of environmental and occupational metals*. London: Taylor & Francis, p. 63-92, 1998.
- ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)*, v. 145, p. 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*, v. 25, p. 33–38, 2008.
- BAGCHI, D.; STOHS, S.J.; DOWNS, B.W., BAGCHI, M.; PREUSS, H.G. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology*, v. 180, p. 5–22, 2002.
- BLASIAK, J.; KOWALIK, J. A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. *Mutation Research*, v. 469, p. 135–145. 2000

BARCELO, J.; POSCHENRIEDER, C.; GUNSE, B. Effect of chromium (VI) on mineral element composition of bush beans. *Journal of Nutrition*, v. 8, n. 17, p. 211-217, 1985.

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

BARRETT, J. C.; VAINIO, H.; PEAKALL, D.; GOLDSTEIN, B. D. 12TH Meeting of the scientific group on methodologies for the safety evaluation of chemical: susceptibility to environmental hazards. *Environmental Health Perspective*, v. 105, p. 699-737, 1997.

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

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

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

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Perfil da mineração de cromo. Brasil, 2009.

BRASIL. Departamento Nacional de Produção Mineral. Sumário mineral - cromo. Brasil, 2011.

BROOKS, S. J., MILLS, C. L. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)*, v. 135, p. 527-537, 2003.

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

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

CALMANO, W.; HONG, J.; FORSTNER, U. Binding and mobilization of heavy metal in contaminated sediments affected by pH and redox potential. *Water Science Technology*, v. 28 (8-9), p. 223-235, 1993.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*, v. 655, p. 41-46, 2008.

CHAN, K. M. Metallothionein: Potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, v. 31, n. 4-12, p. 411-415, 1995.

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

CLAIRBONE, J. B.; EDWARDS, S. L.; MORRISON-SHETLAR, A.I. Acid-base regulation in fishes: Cellular and molecular mechanisms. *Journal of Experimental Zoology*, v. 293, p. 302–319, 2002.

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish. *Veterinary Clinics: Exotic Animal*, v. 11, p. 445-462, 2008.

CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente/Ministério do Meio Ambiente. Resolução No 357 de 17 de março de 2005.

DALLINGER, R.; PROSI, F.; SEGNER, H.; BACK, H. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish: a review and a proposal for further research. *Oecologia*. Berlin, n. 73, p. 91-98, 1987.

DANIELSSON, B. R. G.; HASSOUN, E.; DENCKER, L. Embryo toxicity of chromium: distribution in pregnant mice and effects on embryonic cells in vitro. *Archives Toxicology*, v. 51, p. 233–245, 1982.

DEPLEDGE, M. H. Conceptual paradigms in marine ecotoxicology. In: *Proceedings of the 12TH Baltic Marine Biologists Symposium*. Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark, p. 47-52, 1992.

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

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

DORNFELD, C. B. Utilização de *Chironomus SP* (Diptera, Chironomidae) para a avaliação da qualidade de sedimentos e contaminação por metais. São Carlos. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo. 2006.

DOUST, J. L.; SCHMIDT, M.; DOUST, L. L. Biological assessment of aquatic pollution: a review, with emphasis on plants as biomonitors. *Biological Reviews*, v. 69, p. 147-189, 1994.

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

- FILIPOVI V., RASPOR B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water Research*, 37 (13), p. 3253-3262. 2003.
- FLOTEMERSCH, J. E.; STRIBLING, J. B.; PAUL, M. J.; SNYDER, B. D. in FLOTEMERSCH, J. E.; STRIBLING, J. B.; PAUL, M. J. Concepts and approaches for the bioassessment of Non-wadeable Streams and Rivers. Cincinnati, Ohio: USEPA, p. 7.1-7.26, 2006.
- GOPAL, R.; NARMADA, S.; VIJAYAKUMAR, R.; JALEEL, C. A. Chelating efficacy of CaNa_2EDTA on nickel-induced toxicity in *Cirrhinus mrigala* (Ham.) through its effects on glutathione peroxidase, reduced glutathione and lipid peroxidation. *Comptes Rendus des Seances de Societe de Biologie et de Ses Filiales*, v. 332, p. 685–696, 2009.
- GUPTA A.; RAI D.K.; PANDEY R.S.; SHARMA B. Analysis of some heavy metals in the riverine water, sediments and fish from river Ganges at Allahabad. *Environmental Monitoring Assessment*, 157: 449-458, 2009.
- HAHN, N. S.; FUGI, R.; ANDRIAN, I. F. Trophic ecology of the fish assemblages. In: Thomaz, S. M.; Agostinho, A. A.; Hahn, N. S. (Ed). *The upper Paraná River and its floodplain: physical aspects, ecology and conservation*. Leiden, The Netherlands: Backhuys Publishers, p. 247-269, 2004.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Nova York: Oxford University Press, v. 1, p. 851, 2007.
- HEATH, A.G. 1995. *Water Pollution and Fish Physiology*. 2ed. CRC Press, Inc, Boca Raton, New York, London, Tokyo, 395p.
- HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals in STOREY, K.B. (Ed.) *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New York, John Wiley & Sons, Inc., p. 319-368, 2004.
- HOGSTRAND C.; HAUX, C. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 100, p. 137–141, 1991.
- JALLEL; ASHRAF, M.; AFZAL, M. Pollution status of the Indus river, Pakistan, through heavy metal and macronutrient contents of fish, sediment and water. Pergamon. Paquistão, n. 6, p. 1337-1344, 1996.
- JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). *Oecologia Brasiliensis*, v. 12, p. 680-693, 2008.
- KORTENKAMP, A.; CASADEVALL, M.; FAUX.; S.P.; JENNER, A.; SAHYER, R. O. J.; WOODBRIDGES, N.; O'BRIENS, P. A. A role for molecular oxygen in formation of DNA damage during the reduction of the carcinogen chromium(VI) by glutathione. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 329, n. 2, p. 199-207, 1996.

LECH, J. J.; VODICNIK, M. J. Biotransformation. p. 526-557. In: Rand, G. M.; Petrocelli, S. R. (eds.). *Fundamentals of Aquatic Toxicology; Methods and Applications*. Hemisphere Publishing Corporation, New York, p. 666, 1985.

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

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

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

LUSHCHAK, V. I.; BAGNYUKOVA, T. V. Heat shock affects free radical processes in goldfish tissues. I. Oxidative stress markers. *Comparative Biochemistry Physiology*, v. 143, p. 30–35, 2006.

LUSHCHAK, O.V.; Kubrak, O.I.; Lozinsky, O.V.; Storey, J.M.; Storey, K.B.; Lushchak, V.I. Chromium(III) induces oxidative stress in goldfish liver and kidney. *Aquatic Toxicology*, v. 93, n. 1, p. 45-52, 2009.

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

MARSHALL, W. S. Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, v. 293, p. 264–283, 2002.

MARTINEZ, C.B.R.; CÓLUS, I.M.S. Bioindicadores em peixes neotropicais para o monitoramento da poluição aquática na bacia do Rio Tibagi. In: MEDRI, M.E.; BIANCHINI, E.; SHIBATTA, O.A.; PIMENTA, J.A. (Eds.) *A bacia do rio Tibagi*. Londrina, c. 29, p. 551-557, 2002.

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

MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N. Toxicity and differential tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 63, p. 797 – 804, 1999.

MAZON, A. F.; FERNANDES, M. N. Toxicity and diferencial tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 63, pp. 797-804, 2001.

MERTZ, W. Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiological Reviews*, v. 42, n. 2, p. 163-238, 1969.

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

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

OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P.; DURAND, R. E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the “comet” assay. *Radiation Research*, v. 122, p. 86 – 94, 1990.

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

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

PEREIRA, B.L.; CINTRA, B.; FONSECA, V.E.; LUNA, H.S. Índice gonadosomático como indicador do período reprodutivo de *Prochilodus lineatus* nos rios Aquidauana e Miranda. 2004.

PERRY, S. F.; GILMOUR, K. M. Acid–base balance and CO₂ excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v.154, p.199–215, 2006.

QUIEVRYN, G.; PETERSON, E.; MESSER, J.; ZHITKOVICH, A. Genotoxicity and mutagenicity of chromium (VI) ascorbat-generate DNA adducts in human and bacterial cells. *Biochemistry*, v. 42, n. 4, p. 1062-1070, 2003.

REEVE, R. N. *Environmental Analysis*. ACOL. Ed John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, 1994.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; WILHELM FILHO, D. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comparative Biochemistry and Physiology (C)*, v. 146, n .1-2, p. 22-53, 2007.

REINFELDER, J. R.; FISHER, N. S.; LUOMA, S. N.; NICHOLS, J. W.; WANG, W. X. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. *Science of the Total Environment*. USA, n. 219, p. 117-135, 1998.

ROESIJADI, G.; ROBINSON, W. E. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation, and release. In: Malins, D.C. & Ostrander, G.K. (Eds). *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*. Boca Raton. p. 387-419, 1993.

- ROESIJADI G.; ROBINSON, W. E. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular perspectives*, p. 387-420, 1994.
- SILVA, J.; FREITAS, T. R. O.; HEUSER, V.; MARINHO, J. R.; ERDTMANN, B. Genotoxicity Biomonitoring in Coal Regions Using Wild Rodent *Ctenomys torquatus* by Comet Assay and Micronucleus Test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 270-278, 2000.
- SMITH, R. P. Heavy metals. In: *A Primer of Environmental Toxicology*. Lea & Febiger, p. 142-150, 1993.
- SÖDERGREN, E. Lipid Peroxidation in vivo - Evaluation and Application of Methods for Measurement. Tese de Doutorado - Universidade de Uppsala – Suécia, 78p., 2000.
- STAGG, R. M.; RUSIN, J.; BROWN, F. Na⁺, K⁺-ATPase activity in the gills of the flounder (*Platichthys flesus* L.) in relation to mercury contamination in the firth of forth. *Environmental research*, v. 33, p. 255-266, 1992.
- STANDEVEN, A. M.; WETTERHAHN, K. E. Ascorbate is the principal reductant of chromium (VI) in a rat lung ultrafiltrates and cytosols, and mediates chromium-DNA binding in vitro. *Carcinogenesis*, v. 13, n.8, p.1319-1324, 1992.
- STEARNS, D. M.; KENNEDY, L. J.; COURTNEY, K. D.; GIAGRANDE, P. H.; PHIEFFER, L. S.; WATTERHAHN, K. E. Reduction of chromium (VI) by ascorbate leads to chromium-DNA binding and DNA breaks in vitro. *Biochemistry*, v. 34, n. 9, p. 910-919, 1995.
- STREIT, B. Bioaccumulation of contaminants in fish. In: BRAUNBECK, T.; HINTON, D.E.; STREIT, B. (Eds.). *Fish ecotoxicology*. Bekhäuser, p. 353-387, 1998.
- STURVE, J.; ALMROTH, B. C.; FÖRLIN, L. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 70, n.3, p. 446-452, 2008.
- SUNDA, W. G.; HUNTSMAN, S. A. Processes regulating cellular metal accumulation and physiological effects: Phytoplankton as model systems. *The Science of the Total Environment*, v. 219, p. 165-181, 1998.
- SUZUKI K. T.; SOMEYA A.; KOMADA Y.; OGRA Y. Roles of metallothionein in copper hemostasis: responses to Cu-deficient diets in mice. *Journal Inorganic Biochemistry*, v. 88, p.173-82, 2002.
- TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, p. 206-221, 2000.

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

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M.T. Metals, toxicity and oxidative stress. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 1161–1208, 2005.

VIARENGO, A.; LOWE, D.; BOLOGNESI, C.; FABBRI, E.; KOEHLER, A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 146, p. 281-300, 2007.

WENDELAAR BONGA, S. E. The stress in fish. *Physiol. Rev.* v. 77, p. 591–625. 1997.

WINKALER, E.U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H.C.; MARTINEZ, C.B.R. Biomarcadores histológicos e fisiológicas para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. *Acta Scientiarum. Maringá*, v. 23, n. 2, p. 507-514, 2001.

WINZER, K.; WINSTON, G. W.; BECKER, W.; VAN NOORDEN, C. J. F.; KOCHER, A. Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic Toxicology*, v. 52, p. 143–155, 2001.

WOLF, T.; KASEMANN, R.; OTTENWÄLDER, H. Molecular interaction of different chromium species with nucleotides and nucleic acids. *Carcinogenesis*, v. 10, n. 4, p. 655-659, 1989.

YANG, J. L.; HSIEH, Y. C.; Wu, C. W.; LEE, T. C. Mutational specificity of chromium(VI) compounds in the hprt locus of Chinese hamster ovary-K1 cells. *Carcinogenesis*, v. 13, n. 11, p. 2053-2057, 1992.