RAFAELA ARAÚJO VICENTINI

DEFESAS ANTIOXIDANTES E ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NO CURIMBA, *PROCHILODUS LINEATUS*, EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO AGUDA AO COBRE

Londrina
2011

RAFAELA ARAÚJO VICENTINI

DEFESAS ANTIOXIDANTES E ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NO CURIMBA, *PROCHILODUS LINEATUS*, EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO AGUDA AO COBRE

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina
2011

RAFAELA ARAÚJO VICENTINI

DEFESAS ANTIOXIDANTES E ALTERAÇÕES FUNCIONAIS NO CURIMBA, *PROCHILODUS LINEATUS*, EM RESPOSTA À EXPOSIÇÃO AGUDA AO COBRE

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia na Instituição Associada Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

BANCA EXAMINADORA

_____
Prof. Dra. Claudia Bueno dos Reis Martinez
UEL – Londrina - PR

_____
Prof. Dr. Adalto Bianchini
UEL – Londrina - PR

_____
Prof. Dr. Rodrigo Cabral Luiz
UEL – Londrina - PR

Londrina, 21 de Fevereiro de 2011.

Dedicatória

Aos meus pais Irineu e Edna pelo
dom da vida, por todo estimulo
e amor incondicional.
A minha irmã Marcela pelo amor
e amizade.
Ao meu namorado Lucas por ser
quem é e por existir. Te amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof[a]. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez pela oportunidade de trabalhar em sua equipe, pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho e pela compreensão e paciência que teve comigo.

Ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas por ter me possibilitado a realização desse mestrado, especialmente a Dani por todo apoio, toda ajuda e toda amizade.

A Estação de Piscicultura da UEL (EPUEL) por fornecer os peixinhos para a execução deste trabalho.

A banca examinadora, Prof. Dr. Adalto Bianchini e Prof. Dr.Rodrigo Cabral Luiz pela disponibilidade em colaborar com este trabalho.

Aos (MUITOS) colegas do LEFA pela ajuda nas amostragens e pela companhia durante estes dois anos.

Aos colegas de multicêntrico, pelas confabulações durante a FESBE e pela parceria de botes errados.

Á Cássia Maria (Vulgo Mãe) e ao Thiago por tornar as viagens a USP-SP e as visitas a CEPUSP bem mais divertidas.

As professoras do programa multicêntrico principalmente a profa. Helenir Medri por todo apoio e amizade. Sempre vou ser muito grata.

A profa. Silvia Ponzoni, pelas conversas, pela amizade e pelo exemplo e admiração que eu sempre vou sentir por você. Muito Obrigada.

A minha amiga Lê, por todo apoio e por essa amizade de uma vida. E as meninas da biomed, a Carol, a Renatinha e a Dulce Maria (Mariana) por essa amizade. Adoro vocês.

Ao meu namorado pela paciência, ajuda, companheirismo, amor, enfim... por ser este namorado perfeito que eu amo muito.

A minha família, por ser esta mola que me empurra pra frente, meu alicerce e meu exemplo de vida.

Ao CNPq e ao INCT-TA pelo apoio financeiro

E finalmente, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Eu não errei dez mil vezes.
Eu, com sucesso,
descobri dez mil maneiras
que não funcionam”.

Thomas A. Edison

VICENTINI, R. A. **Defesas antioxidantes e alterações funcionais no Curimba, *Prochilodus lineatus*, em reposta à exposição aguda ao cobre.** 2011. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O cobre é um dos metais de maior interesse para o estudo dos efeitos prejudiciais da poluição sobre a fisiologia dos peixes. A presença do cobre na água doce pode ser decorrente de inserções naturais e/ou antrópicas. A fim de caracterizar os efeitos de uma exposição aguda a este metal, exemplares jovens de peixes da espécie *Prochilodus lineatus* (17,15 ± 1,06 cm; 11,82 ± 0,24 g; N=64) foram distribuídos em aquários de vidro de 80 L (n=8 peixes por aquário) e expostos, durante 48 h ou 96 h, apenas a água (grupo controle) ou a uma concentração nominal de cobre de 20 □g.L^{-1}(grupo experimental). As exposições foram realizadas em sistema estático e durante o experimento amostras de água dos aquários foram coletadas para a análise da concentração de cobre total e dissolvido. Durante o período experimental a concentração de cobre dissolvido variou de 12,6 µg.L^{-1} no tempo 0 a 8,65 µg.L^{-1} em 96h. As concentrações obtidas encontram-se dentro do limite estabelecido pela legislação brasileira, de 9 e 13 µg. L^{-1} para as águas de Classe 1 e Classe 3 respectivamente. As análises de cobre tecidual mostraram que seu acúmulo foi tempo e tecido-específico. O tecido hepático foi o que apresentou maior acúmulo do metal, seguido dos tecidos renal, branquial e muscular; e nos tecidos renal, branquial e muscular houve aumento significativo no conteúdo de cobre após 96 h de exposição, em relação à exposição de 48 h. Pôde-se observar elevação significativa no conteúdo de metalotioneína nos animais expostos ao cobre durante 48 e 96 h, em relação aos peixes do grupo controle, em todos os tecidos analisados (fígado, brânquias e músculo). As alterações nos parâmetros de estresse oxidativo também se mostraram tecido-específicas. No fígado, após 48 h de exposição ao cobre, não foram verificadas alterações em nenhum dos parâmetros analisados, porém após 96 horas, as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutationa peroxidase (GPx) e glutationa S-transferase (GST) se mostraram inibidas, e também foi observada diminuição na concentração da glutationa reduzida (GSH). Todas essas alterações resultaram em peroxidação lipídica, conforme indicado pelo aumento significativo na concentração de MDA no fígado dos peixes após 96 h de exposição ao cobre. No tecido branquial as respostas ao cobre já foram verificadas a partir de 48 h de exposição, quando foram observados o aumento da atividade da SOD e do conteúdo de GSH e o decréscimo da atividade da GST. Após 96 h, foram observadas aumento na atividade das enzimas GPx e CAT, acompanhados de diminuição na concentração de GSH levando a danos oxidativos (aumento de TBARS). Os resultados do teste do cometa mostraram que a concentração de cobre testada, nos dois tempos de exposição, promoveu aumento significativo na ocorrência de danos no DNA nos eritrócitos de *P. lineatus*. As análises dos parâmetros de estresse, glicemia e cortisol, mostraram que o cobre causou diminuição significativa do cortisol plasmático após 96 h, mas não promoveu nenhuma alteração na glicêmica. Com relação às enzimas envolvidas na osmorregulação, verificou-se que a exposição ao cobre reduziu a atividade da Na+/K+ ATPase renal após os dois períodos experimentais e nas brânquias apenas

após 96 horas. A atividade da anidrase carbônica branquial também foi reduzida após 96 h de exposição ao metal. Após 96 h de exposição ao cobre foi constatado aumento da concentração de K^+ e a diminuição da concentração plasmática de Na^+, acompanhada pela diminuição da osmolaridade. A análise dos parâmetros hematológicos nos peixes do grupo experimental indicou diminuição significativa do hematócrito com consequente aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) em 48 horas. Após 96 horas, os parâmetros hematológicos nos peixes do grupo experimental foram semelhantes aos observados no grupo controle. Assim, com este trabalho foi possível verificar que a concentração-limite de cobre estipulada pela legislação brasileira mostrou-se capaz de promover acúmulo tecidual de cobre, alterações no metabolismo oxidativo, danos no DNA e distúrbios osmo-iônicos em *P. lineatus* comprometendo significativamente a saúde dos animais.

Palavras-Chave: Biomarcadores. Danos de DNA. Estresse oxidativo. Metal. Osmorregulação. Peixe neotropical. Resposta de estresse.

VICENTINI, R. A. **Antioxidant defenses and functional alterations in Curimba, *Prochilodus lineatus*, in response to copper acute exposure.** 2011. 106 f. Master Dissertation (Master in Physiological Sciences). State University of Londrina, Londrina.

ABSTRACT

Copper is one metal of great interest to study the effects of pollution on fish physiology. It is present in freshwater as a result of inputs from natural and/or anthropic sources. Copper exposure can be harmful to fish. In order to characterize the effects of acute copper exposure, juveniles curimbas *Prochilodus lineatus* (17.15 ± 1.06 cm, 11.82 ± 0.24 g, N=64) were distributed into experimental aquaria (N = 8 fish per aquarium; 80L). Fish were exposed for 48 h or 96 h only to water (control group) or water with copper at a nominal concentration of 20 $\mu g.L^{-1}$ (experimental group) in a static system without renew of the experimental medium. Throughout the experiment, samples were collected from both control and experimental aquaria to measure of total and dissolved copper concentration. Concentration of water analysis showed that fish were exposed to a concentration of dissolved copper ranging from 12.6 $\mu g.L^{-1}$ at the beginning of the experiment and 8.65 $\mu g.L^{-1}$ after 96h. These concentrations are in agreement with the limit established the Brazilian regulation, i.e., 9 and 13 $\mu g.\ L^{-1}$, for Class 1 and Class 3 waters, respectively. Tissue copper concentration analysis showed that copper accumulation was time and tissue-specific. Liver showed higher copper accumulation followed by kidney, gill and muscle. Kidney, gills and muscle also showed a significant increase in copper content after 96 h of exposure in respect to the 48 h exposure. In all tissues analysed (liver, gills and muscle), it was observed in the experimental fish increase in metallothionein concentration. Responses of oxidative metabolism to copper exposure also proved to be tissue-specific. In liver, after 48 h exposure to copper, there were no significant changes in the parameters analyzed. However, the enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione S-transferase (GST) were inhibited, after 96 h of exposure. It was also observed a decrease in the concentration of reduced glutathione (GSH). All these changes resulted in lipid peroxidation, as indicated by the significant increase in MDA concentration in liver of fish exposed for 96 h to copper. In gills, responses to copper exposure were found after 48 h exposure, when an increased of SOD activity and GSH level, as well as a decreased of GST activity were observed. After 96 h, an increase in GPx and CAT activity was observed , paralleled by a decrease in GSH concentration, which led to oxidative damage (increased TBARS levels). Results from comet assay showed that copper concentration tested caused a significant increase in DNA damage in erythrocytes of *P. lineatus* after both 48 and 96 h of exposure. Analyses of stress parameters (blood glucose and cortisol) showed that copper caused a significant decrease in plasma cortisol after 96 h of exposure, but did not cause any change in plasma glucose. Regarding enzymes involved in osmoregulation, it was found that copper exposure reduced the kidney Na+/K+-ATPase activity after both experimental periods, and in gills only after 96 h of exposure. Gill carbonic anhydrase activity was also reduced after 96 h of metal exposure. An increase in plama K^+ concentration of and a decrease in plasma Na^+ level were also observed after 96 h exposure to copper, which were paralleled by a

decrease in plasma osmolarity. Hematological parameters analysis in fish exposed to copper showed a significant decrease in hematocrit with a consequent increase in mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) after 48 h of exposure. After 96 h, the hematological parameters of fish exposed to copper were similar to those observed in those from the control group. Taken all together, results from the present study clearly showed the water quality criteria for copper established by the Brazilian Regulations has shown to cause significant tissue metal accumulation, changes in oxidative metabolism, DNA damage and disturbances in osmo-ionic balance of *P. lineatus,* compromising the fish health.

Keywords: Biomarkers. DNA damage. Metal. Neotropical fish. Osmoregulation. Oxidative stress. Stress response.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros químicos e físicos da água analisadas durante o período experimental (48 e 96 h) 56

Tabela 2 - Concentrações (ug. L-1) de cobre total e dissolvido na água dos aquários experimentais e controles.....56

Tabela 3 - Parâmetros da água utilizada no cálculo do Cu+2.....58

Tabela 4 - Total de nucleóides observados em eritrócitos de Prochilodus lineatus expostos ao cobre (20 µg.L-1 – EXP) ou mantidos em água sem adição de cobre (CTR) média ±E.P. de nucleóides danificados por animal para cada tempo experimental (48 e 96 h).....66

Tabela 5 - Índices hematimétricos em Prochilodus lineatus expostos ao cobre (20 ug.L-1 -EXP) ou mantidos em água sem adição de cobre (controle) por 48 e 96 h. VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média 72

LISTA DE FÍGURAS

Figura 1 - Diagrama conceitual das formas químicas do cobre e do modelo cobre - ligante biótico 22
Figura 2 - Relação entre as análises físico-químicas e biológicas com suas causas e seus efeitos sobre os ecossistemas.....25
Figura 3 - Características necessárias as espécies bioindicadoras 27
Figura 4 - Relação entre sensibilidade da resposta e sua relevância ecológica ao longo do tempo, considerando-se diferentes níveis de organização biológica.....28
Figura 5 - Modelo de bioacumulação em organismos aquáticos.....30
Figura 6 - Rotas de acúmulo do cobre em diversos tecidos.....32
Figura 7 - Modelo de atuação dos antioxidantes na proteção contra as espécies reativas de oxigênio 37
Figura 8 - Influência dos íons cobre sobre a estrutura do DNA.....39
Figura 9 - Modelo da captação de íons em células cloreto de peixes teleósteos 42
Figura 10 - Modelo experimental - Juvenil de Prochilodus lineatus.....45
Figura 11 - Decaimento das concentrações de cobre total e dissolvido em amostras de água obtidas dos aquários experimentais no decorrer do experimento. As amostras coletadas a cada 24 horas e o resultado expresso em μg.L-1 de cobre 57
Figura 12 - Concentração de cobre (mg.g-1 tecido úmido) no A) fígado, B) brânquias, C) rim, D) músculo deP.lineatus expostos apenas à água (Controle) ou ao cobre, na concentração nominal de 20 μg.L-1 (Experimental), durante 48 e 96 h.....59
Figura 13 - Concentração de metalotioneína (expressa por grupamentos μM SH. mg proteína-1) em A) fígado, B) brânquias e C) músculo de P. lineatus expostos a uma concentração nominal de cobre de 20 ug.L-1 (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h 60
Figura 14 - Atividade branquial das enzimas antioxidantes primárias: A) superóxido dismutase (SOD), B) catalase (CAT) e C) glutationa peroxidase (GPx) de P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre

(Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h.....61
Figura 15 - Análise da concentração branquial de A) glutationa reduzida – GSH e B) atividade hepática da enzima GST em P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h 62
Figura 16 - Quantificação de MDA (indicador de peroxidação lipídica) em brânquias de P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h.....63
Figura 17 - Atividade hepática das enzimas antioxidantes primárias: A) superóxido dismutase (SOD), B) catalase (CAT) e C) glutationa peroxidase (GPx) de P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h.....64
Figura 18 - Análise da concentração hepática de A) glutationa reduzida – GSH e B) atividade hepática da enzima de biotransformação GST em P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h.....65
Figura 19 - Quantificação de MDA (indicador de peroxidação lipídica) em fígado de P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. Dados expressos por média ± E.P. 65
Figura 20 - Escore de danos em eritrócitos P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h 66
Figura 21 - Atividade das enzimas relacionadas à osmorregulação - A) Na+/K+ ATPase renal e B) branquial P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h 67
Figura 22 - Atividade da enzima relacionada à osmorregulação e ao equilíbrio ácido-base- Anidrase carbônica de P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h 68
Figura 23 - Concentração plasmática dos seguintes íons: A) sódio; B) Potássio em P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h.....68

Figura 24 - Concentração plasmática dos seguintes íons: A) Cálcio; B) Cloreto e C) análise da osmolaridade em amostras em P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h.....69
Figura 25 - Parâmetros de estresse – A) Glicose e B) cortisol obtidos através da análise de amostras de plasma obtidas de P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h 70
Figura 26 - Parâmetros sanguíneos para P. lineatus expostos a 20 ug.L-1 de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. A) Hematócrito, B) número de eritrócitos e C) concentração de hemoglobina.....71

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ABAP	2,2´- azo bis (2 metilpropinamida) dihidroclorido
AC	Anidrase Carbônica
Ag	Prata
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina bovina sérica
BLM	Modelo do ligante biológico
CC	Células cloreto
Cd	Cádmio
Ca2+	Íon cálcio
CAT	Catalase
CDNB	Clorodinitrobenzeno
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CL50-96h	Concentração letal média em 96 horas
COD	Carbono orgânico dissolvido
Cu+	Íon cuproso
Cu2+	Íon cúprico
CuCl2.2H2O	Cloreto de cobre diidratado
CTR	Grupo controle
CYP	Citocromo P450
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTNB	5,5'-ditiobis-2-acido nitrobenzoico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
E.P.	Erro padrão
EXP	Grupo experimental
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida

GSSG	Glutationa oxidada
GST	Glutationa S-Transferase
H2O2	Peróxido de hidrogênio
H+	Íon hidrogênio
Hb	Hemoglobina
HCO3-	Íon bicarbonato
HCM	Hemoglobina corpuscular média
Hct	Hematócrito
H2DCF-DA	2´7´-diclorofluorescina diacetato
HNO3	Ácido Nítrico
K+	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio
LPO	Lipoperoxidação
LaO3	Óxido de lantânio
MDA	Malondialdeído
MT	Metalotioneína
Na+	Íon sódio
NADP+	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
Na+/K+ ATPase	Enzima sódio potássio ATPase
NaN3	Azida sódica
NaOH	Hidróxido de sódio
O2	Oxigênio molecular
O2.-•	Ânion superóxido
•OH	Radical hidroxil
RBC	Número de eritrócitos
SEI	Tampão sacarose-EDTA-Imidazol
SH	Grupamento tiol
SOD	Superóxido dismutase
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano-hidrocloreto
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
Tx	Taxa
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1INTRODUÇÃO 17
1.1 CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA 18
1.2 CONTAMINAÇÃO POR METAIS – COM ÊNFASE PARA O COBRE 18
1.3 TOXICIDADE DO COBRE 21
1.4 BIOINDICADORES 24
1.5 BIOMARCADORES 28
1.5.1 Biomarcadores de Exposição a Metais 29
1.5.2 Biomarcadores de Estresse Oxidativo 33
1.5.3 Biomarcadores Genotóxicos 38
1.5.4 Biomarcadores Fisiológicos 41
1.6 MODELO EXPERIMENTAL 44

2 OBJETIVOS GERAIS 46
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 46

3 MATERIAIS E MÉTODOS 47
3.1 PROTOCOLOS E CONDIÇÕES ESPERIMENTAIS 47
3.2 DETERMINAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA 47
3.3 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS E ARMAZENAMENTO 48
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO COBRE NOS TECIDOS 48
3.5 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO 49
3.5.1 Análises das Defesas Antioxidantes 49
3.5.1.1 Superóxido dismutase (SOD) 49
3.5.1.2 Catalase (CAT) 49
3.5.1.3 Glutationa peroxidase (GPX) 50
3.5.1.4 Glutationa s-transferase (GST) 50
3.5.2 Determinação do Conteúdo de Glutationa Reduzida e Metalotioneína 50
3.5.3 Peroxidação Lipídica 51
3.6 ANÁLISE DE DANOS NO DNA: TESTE DO COMETA 51
3.7 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS 53
3.8 PARÂMETROS DE ESTRESSE – GLICEMIA E CORTISOL 53
3.9 ENZIMAS ENVOLVIDAS NA OSMORREGULAÇÃO 54

3.10 Parâmetros Osmo-Iônicos 55
3.11 Análises Estatísticas 55

4 RESULTADOS 56
4.1 Acúmulo de Metais nos Tecidos 58
4.2 Metalotioneína 59
4.3 Parâmetros oxidativos 61
4.4 Genotoxicidade 66
4.5 Atividade da Na+/K+ ATPase e Anidrase Carbônica 67
4.6 Parâmetros Osmo-Iônicos 68
4.7 Parâmetros de Respostas de Estresse 70
4.8 Parâmetros Hematológicos 70

5 DISCUSSÃO 73
5.1 Acúmulo de Metais nos Tecidos 74
5.2 Metalotioneína 75
5.3 Parâmetros Oxidativos 76
5.4 Genotoxicidade 80
5.5 Atividade das Enzimas Na+/K+ ATPase e Anidrase Carbônica 81
5.6 Parâmetros Osmo-Iônicos 83
5.7 Parâmetros de Respostas de Estresse 85
5.8 Parâmetros Hematológicos 87
5.9 Integração de Resultados 88

6 CONCLUSÕES 90

REFERÊNCIAS 91

1 INTRODUÇÃO

Durante séculos o desenvolvimento econômico decorrente da Revolução Industrial impediu que os problemas ambientais fossem considerados. O meio ambiente era predominantemente visto como acessório do desenvolvimento, e não como parte intrínseca dele. A poluição e os impactos ambientais do desenvolvimento desordenado eram visíveis, mas os benefícios proporcionados pelo progresso os justificavam como um “mal necessário”, algo com que se deveria resignar (GOLDEMBERG, 2004).

A partir das décadas de 1960 e 1970, o desenvolvimento condicionado pelo sistema econômico do pós-guerra da década de 1940 e pela noção de progresso e crescimento ilimitado foi alvo de grandes questionamentos, gerando um intenso debate social e ambiental, iniciado pelos países desenvolvidos do hemisfério norte, e posteriormente difundido em nível mundial. Foi constatada a fragilidade deste sistema em diversos setores, como no âmbito social, no qual não ocorreu a redução da pobreza, e na esfera ambiental, onde o desenvolvimento e uso irracional dos recursos naturais levaram à degradação e escassez dos mesmos (SCOTTO; CARVALHO; GUIMARÃES, 2007).

A partir da conscientização do aumento da degradação dos recursos ambientais houve a criação de órgãos ambientais nacionais, passando de dez para a cerca de mil o número de países que contavam com este tipo de organização entre o início das décadas de 1970 e 1980. Além das agências oficiais, órgãos não-governamentais tiveram amplo crescimento, de aproximadamente 2.500 organizações em 1972 para aproximadamente 15.000 em 1981 (SCOTTO; CARVALHO; GUIMARÃES, 2007).

Com o avanço tecnológico da década de 1980, o aperfeiçoamento dos métodos de diagnóstico dos problemas ambientais e o impulso dos movimentos ecológicos, a questão central voltou-se para a sobrevivência da espécie humana no planeta. Assim, o debate que havia se centrado basicamente nos impactos adversos que o meio ambiente sofria por causa do desenvolvimento deu origem a uma nova questão: quais seriam as perspectivas de desenvolvimento a partir de um meio ambiente degradado? Era preciso assim agir de forma responsável em relação ao meio ambiente, de modo a garantir os recursos naturais necessários à sobrevivência das futuras gerações. Nascia a partir dessa idéia o conceito de *Desenvolvimento*

Sustentável.

Em 1992, a Conferência de Dublin teve como tema principal a preocupação com a água, tendo-se como questão-alvo o papel da atividade humana como mais um fator atuante sobre os ecossistemas aquáticos, considerando-se que estes se tornam cada vez mais delicados e pressionados por inúmeros fatores, como alterações climáticas, crescimento populacional, demanda por água e a própria poluição (MEYBECK, 2003). Mesmo os lençóis freáticos, que cobrem vastas extensões ao longo do globo, demonstram sinais de contaminação pela sua elevada exploração entre 1950 e 1990, salinização, urbanização e intensificação da agricultura e da indústria (FOSTER, CHILTON, 2003).

1.1 Contaminação Aquática

Os corpos de água doce naturais são os principais locais de descarga das maiorias das substâncias tóxicas geradas pelas atividades agrícolas, domésticas e industriais (COONEY, 1995). Sedimentos contaminados, fontes difusas e fontes pontuais são as três classes básicas de fonte de poluição, que se diferenciam pela maneira com que entram no ambiente (DOUST; SCHMIDT; DOUST, 1994). As descargas diretas de efluentes industriais e urbanos no ambiente aquático caracterizam as fontes pontuais de poluição. Já as fontes difusas de poluição referem-se à entrada de contaminantes por diversos pontos de origem como lençóis de água, deposição atmosférica e resíduos agrícolas (DOUST *et al.,* 1994).

Uma das principais fontes de poluentes aquáticos é constituída pela descarga direta de efluentes industriais. Nestes estão presentes compostos químicos como: metais, metalóides, compostos inorgânicos, compostos orgânicos, detergentes sintéticos, pesticidas e radionucleotídeos- que podem ser acumulados em níveis tóxicos no ambiente (RAND *et al.*, 1995).

1.2 Contaminação por Metais – com Ênfase para o Cobre

Com o advento da Revolução Industrial, expressivas mudanças ocorreram na química das águas. Sendo de fundamental importância o papel da mineração e a produção de carvão na contaminação das águas, resultando em

aumento de sua concentração de metais (LLOYD, 1992). Os metais pertencem a um grupo de elementos cujos ciclos hidrológicos sofrem grande influência antrópica (LANDIS; YU, 1995). O contínuo aumento na concentração de metais em ambientes aquáticos pode ser atribuído principalmente a industrialização, aliada ao rápido crescimento populacional, bem como o crescimento de algumas atividades agrícolas (BISINOTI et al., 2004).

As principais fontes de contaminação aquática por metais derivam da metalurgia, mineração, fundição, galvanoplastia, indústrias de couro, gases liberados pela queima de combustíveis fósseis, a fabricação e descarte de baterias, entre outros. Nas últimas cinco décadas, foram liberadas na biosfera 22.000 t de cádmio, 939.000 t de cobre, 783.000 t de chumbo e 1.350.000 t de zinco, como produto da industrialização global (SINGH et al., 2003). Estes contaminantes podem causar efeitos adversos aos organismos. Além disso, causam prejuízos aos ecossistemas aquáticos, pois tendem a se acumular na biota aquática.

A concentração de metais nos organismos aquáticos é mais alta que a concentração presente no ecossistema (LAWS, 2000). Este fenômeno, conhecido como bioacumulação, refere-se ao acumulo em diferentes tecidos dos íons metálicos tomados do ambiente pelo organismo. Metais também se tornam mais concentrados nos níveis tróficos mais altos. Virtualmente, todos os metais são tóxicos aos organismos aquáticos, e devido aos seus efeitos prejudiciais são considerados uma das mais tóxicas formas de poluição aquática (LAWS, 2000). Os metais podem causar sérios impactos aos sistemas metabólicos, fisiológicos e até mesmo estruturais, nos organismos a eles expostos. Entretanto, alguns metais, quando em concentrações adequadas, são considerados essenciais aos organismos (TORT, 1987). O cobre é um exemplo de metal que é essencial para a homeostase do organismo (COUSINS, 1985), porém em concentrações que ultrapassam o limiar fisiológico, o cobre pode se tornar um elemento danoso à biota aquática (NRIAGU, 1988). Dentre os metais o cobre é um dos mais tóxicos à biota de água doce, podendo freqüentemente se acumular nos organismos causando danos irreversíveis a algumas espécies em concentrações supra-fisiológicas.

O cobre (Cu) é abundante no ambiente e essencial para o crescimento normal e metabolismo de todos os organismos. Níveis anormais de cobre podem variar desde níveis tão baixos, capazes de induzir uma deficiência nutricional, até níveis tão alto que podem o tornar agudamente tóxico (EISLER,

2007). O montante de cobre que anualmente entra nos ecossistemas é desconhecido, mas estima-se que este valor varie entre 0,2 a 1,8 milhões de toneladas e 80,7% deste total é depositado no compartimento terrestre, 15,7% é depositado na hidrosfera e 3,6% na atmosfera. O tempo de residência do cobre em oceanos é de 1500 anos. No solo, ele pode ser retido por 1000 anos e sendo que ele, no ar, persiste por 13 dias. O cobre na atmosfera resulta principalmente (73%) de atividades antrópicas, como a extração de cobre e a combustão de combustíveis fósseis, sendo que o restante provém de fontes naturais, como poeira trazida pelo vento, partículas vulcânicas e deteriorização de vegetação. A entrada de cobre nos ecossistemas aquáticos aumentou acentuadamente durante o século passado e ocorre principalmente devido à descarga de resíduos em águas salinas, descargas industriais em águas doces e lixiviação. Em áreas industriais a precipitação atmosférica também constitui uma fonte significativa de cobre para o ambiente aquático. Além disto, o cobre também é utilizado no controle de algas de água doce e macrófitas (U.S.EPA, 2007), como medida profilática no controle de caramujos que atuam como hospedeiro de parasitas, assim como no controle de parasitas externos de peixes (EISLER, 2007). Na agricultura, o cobre faz parte da formulação de diversos pesticidas, apesar do prejuízo que pode causar à biota (ROMEU-MORENO et al., 1994).

O cobre é um metal essencial aos organismos (GROSELL et al., 2007) e sua natureza redox permite sua utilização em diversos processos enzimáticos (GROSELL; WOOD, 2002). O cobre também participa da constituição de muitas enzimas essenciais incluindo tirosinase, dopamina beta-hidroxilase, Cu-Zn superóxido dismutase, citocromo c e ceruloplasmina, bem como em diversos complexos cobre-proteínas (EISLER, 2007). Além disto, o cobre apresenta papel significativo na formação óssea e de tecidos cerebrais, é vital na absorção do ferro e é necessário para a síntese de hemoglobina (ROBINSON, 1996). Para os peixes, uma parte do cobre requerida é suprida pela alimentação, mas as brânquias também apresentam um papel significativo. Segundo Kamunde e colaboradores (2002), juvenis de truta arco-íris alimentados com uma dieta pobre em cobre obtiveram mais de 60% do cobre requerido através das brânquias em condições normais.

1.3 TOXICIDADE DO COBRE

Os efeitos de uma espécie metálica sobre a biota dependem fortemente das formas físicas e químicas do metal no sistema, ou seja, sua especiação (CAMPBELL, 1995). A especiação, por sua vez, está relacionada com a diferenciação entre os estados de oxidação e também com a distribuição do metal, entre compostos orgânicos e inorgânicos, afetando seu transporte, biodisponibilidade e, conseqüentemente, sua toxicidade (TEMPLETON et al., 2000). A distribuição de metais na coluna de água também é influenciada por diversos fenômenos físico-químicos tais como complexação, adsorção, dessorção, precipitação, entre outros (VASCONCELOS et al., 2002; MANSILLA-RIVERA; NRIAGU, 2003). As interações de metais com a matéria orgânica dissolvida ou o material particulado em suspensão, por exemplo, levam a não-biodisponibilidade do metal (ALLEN; HANSEN, 1996).

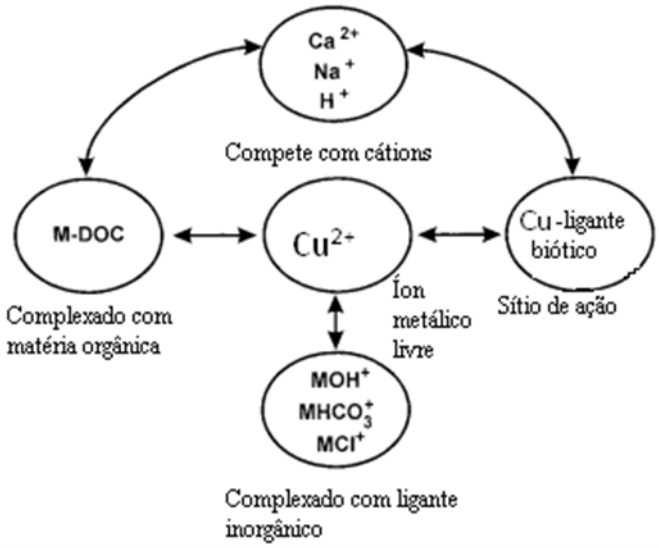
No caso do cobre, sua toxicidade dependerá das características do ambiente de exposição, da sua forma química e de sua interação com a espécie exposta. O modo de absorção vai afetar o modo como o metal agirá no organismo e exercerá sua toxicidade (SANCHEZ et al., 2005). McGeer e colaboradores (2003) evidenciaram que a complexação por substâncias húmicas aquáticas atenuou a biodisponibilidade do cobre para peixes submetidos à exposição crônica com o metal. A disponibilidade do cobre à biota é determinada pela presença do íon livre em solução (CHAKOUMAKOS et al., 1979) e sua toxicidade está fortemente relacionada com a concentração do íon livre e não a sua concentração total (HOWARTH E SPRAGUE, 1978; PAGENKOPF, 1983).

No ambiente aquático, o cobre ocorre em quatro estados oxidativo: Cu^{0}, Cu^{1+}, Cu^{2+}, e Cu^{3+} (ATSDR, 1990), e as duas formam mais comuns são o íon cuproso (Cu^{1+}) e o cúprico (Cu^{2+}). O íon cuproso existe somente em solução, em um estado complexado, geralmente na forma tetraédrica. Nesse estado, apresenta alta afinidade por enxofre e nitrogênio (EISLER, 2007). O estado oxidativo mais comum do cobre encontrado na água é na forma de íon cúprico, sendo este, o estado que mais interessa aos toxicologistas aquáticos por ser a forma mais tóxica do cobre. Entretanto, por ser sensível a complexação, o íon cúprico torna-se menos disponível no ambiente aquático na presença de quelantes orgânicos e alta salinidade.

A toxicidade dos metais em organismos aquáticos ocorre como

resultado da interação do íon metálico livre com o sítio biológico ativo, representado pela formação do complexo metal-ligante biótico. Para os peixes, o ligante biótico apresenta-se como locais na superfície da membrana branquial. A ligação dos metais no ligante biótico pode resultar em interrupção de processos osmorregulatórios do organismo podendo levar a mortalidade destes. Os metais livres, como o íon cobre, podem competir pelos sítios de ligação, com cátions essenciais. Portanto, a presença de íons metálicos livres em solução pode induzir a toxicidade dependendo principalmente da sua concentração e da força com que se ligam ao ligante biótico (DI TORO et al. 2001) (Fig.1).

Figura 1 - Diagrama conceitual das formas químicas do cobre e do modelo cobre-ligante biótico.



Fonte: Adaptada de Di Toro, 2001.

As brânquias constituem a principal via de absorção de metais e por apresentarem baixa afinidade aos mesmos, permitem um grande fluxo de metais através do epitélio branquial (EISLER, 1998). A tomada de cobre pelas brânquias é acompanhada por um processo de oxido-redução, no qual o íon Cu^{2+} em contato com a membrana de transporte é reduzido a Cu^{+}, sendo esta reação catalizada por substâncias com grupamentos sulfidrilas (BOGDANOVA et al., 1999).

Grosell e Wood (2002) identificaram dois possíveis caminhos para a absorção de cobre via brânquias: as vias sódio-sensível e sódio-insensível. Ambas

apresentam cinéticas de saturação semelhantes e apresentam baixa afinidade ao cobre (Km 7.1 nmol. L^{-1} para a via sódio-sensível e 9.5 nmol. L^{-1} Cu para a via sódio insensível). A via sódio- sensível é inibida por drogas análogas a amilorida e bafolimicina A, sugerindo que o cobre entre nas células através de um canal semelhante ao canal epitelial de sódio (Enac). A via sódio-insensível ainda é desconhecida. Porém, já foi descrita em diversos organismos como fungos, mamíferos e peixes, uma proteína, com alta afinidade ao cobre (família Ctr), que poderia estar relacionada com a absorção branquial de cobre em peixes (BURY; WALKER; GLOVER, 2003). O gene responsável pela expressão da proteína Ctr foi identificado em *Danio rerio,* e foi verificado que a proteína apresenta distribuição ampla no organismo (HERNÁNDEZ; ALLENDE, 2008).

O epitélio branquial é normalmente coberto com uma matriz celular contendo uma variedade de glicoproteínas e, como uma maneira de se proteger frente a estímulos danosos, a constituição e a concentração de muco pode aumentar. O muco protetor é continuamente retirado pelo fluxo de água na respiração e reposto por novo muco secretado pelas células (TAO et al., 2000; TAKASUSUKI et al., 2004). Os metais podem se ligar ao muco branquial diminuindo assim sua disponibilidade e consequentemente sua toxicidade (VARANASI; MARKEY, 1978).

Um estudo realizado por Pelgrom et al. (1995) com tilápias mossâmbicas expostas ao cobre mostrou um aumento significativo da concentração de cobre nas brânquias e no plasma, mas não nas células sanguíneas. Estes resultados sugerem que o cobre que entra via branquial é transportado pelo plasma e indicam a presença de proteínas transportadoras de cobre na corrente sanguínea (ceruloplasmina). Porém os autores não observaram relação entre a concentração de ceruloplasmina plasmática e a concentração de cobre na água.

O cobre está entre os metais mais tóxicos para peixes (MATSUO et al., 2005; NUNES et al., 2010). Sua toxicidade já foi estudada para diferentes espécies, por exemplo, para a truta arco-íris (Oncorhynchus mykiss) a LC_{50} (96h) de cobre é 210 □g.L^{-1} (DE BOECK et al., 2004) e para o curimba (Prochilodus lineatus) LC_{50} (96h) é 29 □g.L^{-1}(MAZON; FERNANDES, 1999). A legislação brasileira, por meio da Resolução Conama 357, determina que para águas doces o limite de cobre dissolvido permitido varia de 9 a 13 □g.L^{-1} (CONAMA, 2005). De acordo com relatório recente, a maioria dos rios no estado de São Paulo apresenta

concentrações de cobre que variam de 10 a 20 □g.L^{-1} (SAMPAIO et al., 2008; CETESB, 2009).

A exposição a concentrações elevadas de cobre resulta em várias disfunções no organismo, tais como diminuição no ganho de peso, menor crescimento, piora na conversão alimentar, elevada morte de embriões, alterações histopatológicas no fígado e brânquias, além de distúrbios hematológicos e na regulação iônica. O cobre, também é um catalisador de reações que produzem radicais livres que oxidam lipídios insaturados, tendo efeito direto na estrutura e na função da membrana das células (FERRARI et al., 2004; NUNES et al., 2010). Acredita-se que sua toxicidade também provém da interação do íon cobre com sítios específicos, como resíduos de histidina, cisteína e metionina, em moléculas com funções biológicas importantes resultando em disfunções em suas atividades (BOPP; ABICHT; KNAUER, 2008).

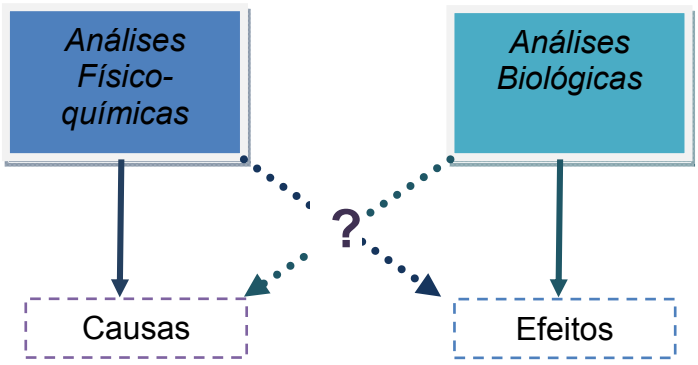
1.4 BIOINDICADORES

A detecção precoce de uma exposição pode diminuir significativamente a ocorrência de efeitos adversos na saúde. As informações provenientes do monitoramento da exposição ambiental ou ocupacional possibilitam a implantação de medidas de prevenção e controle apropriadas (AMORIM, 2003). Através da medição de alterações nas concentrações de variáveis físicas e químicas, associada com a avaliação de variáveis microbiológicas, tem sido realizada a avaliação de impactos ambientais em ecossistemas aquáticos, constituindo uma ferramenta fundamental na classificação e enquadramento de rios e córregos em classes de qualidade de água e padrões de potabilidade e balneabilidade humanas. Porém, este sistema apresenta algumas desvantagens, como a descontinuidade temporal e espacial das amostragens, além de ser pouco eficiente na detecção de alterações na diversidade de hábitats e microhábitats e insuficiente na determinação das conseqüências da alteração da qualidade de água sobre as comunidades biológicas (GOULART; CALLISTO, 2003).

A partir da década de 1970, pesquisadores e gestores de recursos hídricos da Europa Ocidental e América do Norte argumentam que as metodologias tradicionais de classificação de águas, baseadas em características físicas, químicas e bacteriológicas, não são suficientes para atender aos usos múltiplos da água. Para

a realização de avaliações eficientes é de fundamental importância a aplicação de análises integradas da qualidade da água, integrando as metodologias tradicionais de avaliação aos aspectos biológicos do sistema (ARIAS et al., 2007; BUSS et al., 2008)(Fig.2).

Figura 2 - Relação entre as análises físico-químicas e biológicas com suas causas e seus efeitos sobre os ecossistemas



Fonte: Adaptado de Buss et al., 2008

O uso de parâmetros biológicos para medir a qualidade da água se baseia nas respostas dos organismos em relação ao meio onde vivem. Os ambientes aquáticos estão sujeitos a inúmeras perturbações, naturais ou antropogênicas, às quais a biota aquática pode reagir de inúmeras formas (BUSS et al., 2003). Muitos compostos lançados nos ambientes aquáticos podem sofrer biomagnificação nos distintos níveis tróficos através da cadeia alimentar, podendo, mesmo estando dentro das normas legais de lançamento de efluentes, degradar as inter-relações biológicas, extinguindo espécies e gerando problemas de qualidade de vida para as populações que utilizam aquele recurso (BUSS et al., 2003); ou ainda podem agir em locais distantes de seu ponto de descarga, em áreas onde não há atividade humana significativa (SARKAR et al., 2006; FREIRE et al., 2008).

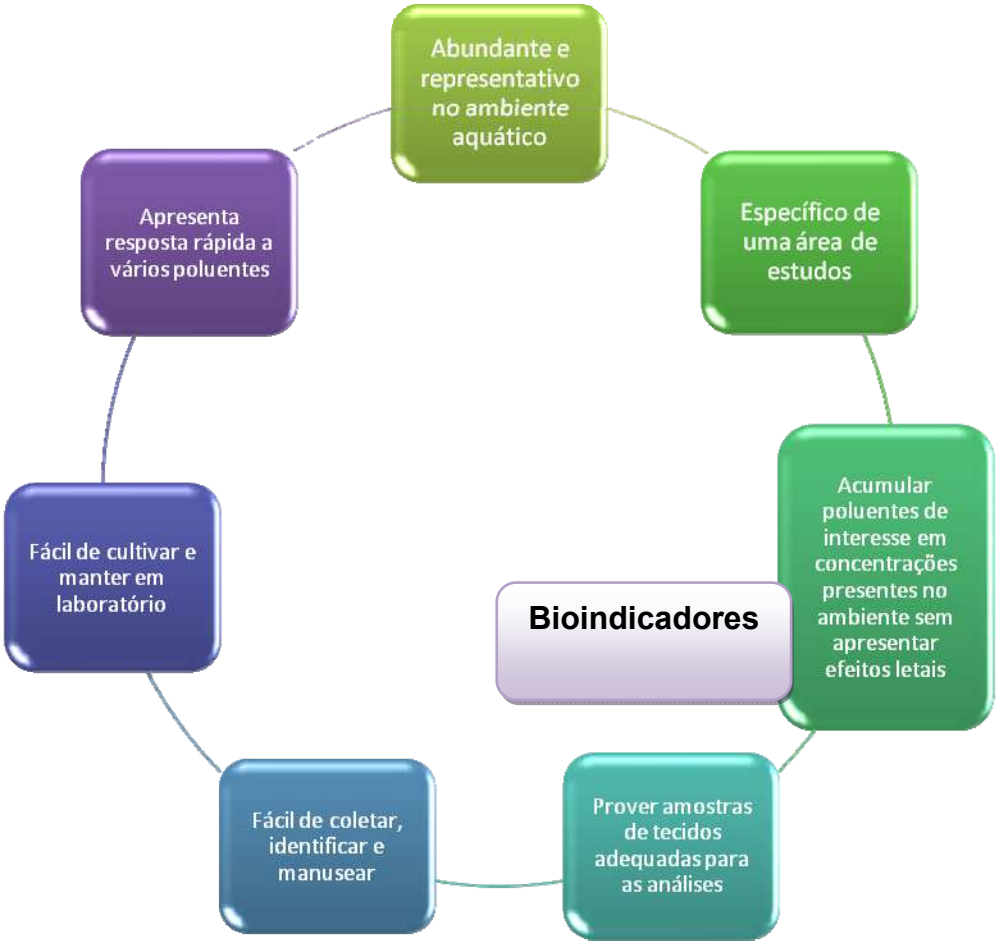
As comunidades dos ecossistemas aquáticos são formadas por organismos que apresentam adaptações evolutivas à algumas condições ambientais e apresentam limites de tolerância às alterações destas condições (ALBA-TERCEDOR, 1996). Assim, essas comunidades podem refletir a integridade ecológica dos ecossistemas, associando os efeitos dos diferentes agentes impactantes e fornecendo uma medida integrada dos impactos (BARBOUR et al.,

1999). Por isso, os indicadores biológicos são muito úteis por sua especificidade em relação a certos tipos de impacto, já que inúmeras espécies são comprovadamente sensíveis a um tipo de poluente, mas tolerantes a outros (WASHINGTON, 1984).

Os organismos aquáticos podem fornecer informações importantes sobre a qualidade da água ao longo do tempo, especialmente quando compostos químicos estão presentes em baixa concentração. Esses organismos integram suas respostas através do tempo e podem reagir aos efeitos aos poluentes e/ou estressores combinados, podendo então ser considerados como monitores da qualidade da água em tempo integral (CHAPMAN, 2002). Os bioindicadores são tidos como espécie ou grupo de espécies que por sua presença ou ausência podem fornecer informações sobre a qualidade ambiental. Para serem caracterizados como tal, os organismos devem preencher uma série de critérios pré-estabelecidos para ser utilizado em estudos ecotoxicológicos (Fig.3) (ARIAS et al., 2007).

Os peixes são importantes recursos naturais, apresentam grande importância ecológica e representam componentes essenciais dos sistemas aquáticos, são economicamente valiosos e fornecem aos seres humanos uma fonte de recreação e alimentação (KENNEDY, 1995). Nesse contexto, os peixes são largamente utilizados para descrever as características de sistemas aquáticos e para obter informações sobre alterações do habitat por diversas razões; dentre elas pode-se citar: intenso contato com a água, tamanho adequado para realização de diversos procedimentos analíticos, relativa longevidade, distribuição em diferentes níveis tróficos, facilidade de captura e pelo fato de algumas espécies apresentarem uma ampla distribuição (CHOVANEC; HOFER; SCHIEMER, 2003).

Figura 3 - Características necessárias para as espécies bioindicadoras



Fonte: Adaptado de Arias et al., 2007.

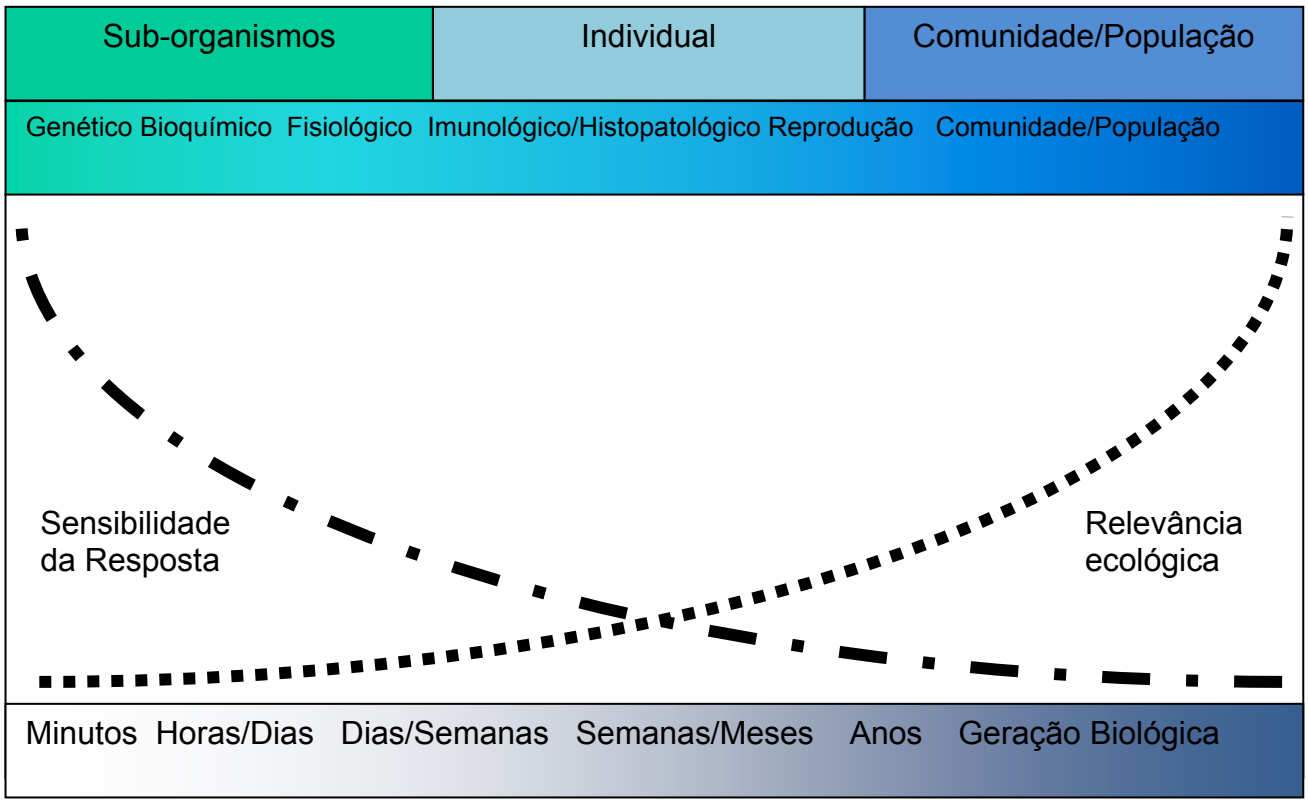
Investigações sobre os efeitos de xenobióticos em peixes e processos relacionados à sua absorção química, seu metabolismo e excreção são relativamente recentes e extremamente defasados em relação ao entendimento destes mecanismos em relação aos mamíferos. A compreensão dos processos bioquímicos e moleculares envolvidos na toxicocinética dos xenobióticos é necessária em várias áreas da toxicologia aquática, incluindo a investigação dos mecanismos de ação tóxica e a compreensão dos possíveis efeitos de parâmetros ambientais relevantes sobre a toxicocinética dos xenobióticos nestes organismos (KENNEDY, 1995). O conhecimento acerca da sensibilidade de espécies de peixes neotropicais a poluentes em ecossistemas tropicais de água doce ainda é limitado devido aos relativos poucos estudos utilizando-se espécies nativas (MARTINEZ et al., 2004).

1.5 BIOMARCADORES

Para avaliar os impactos dos poluentes na qualidade ambiental é pertinente que sejam determinados os efeitos que estas substâncias causam nos organismos vivos característicos destes ecossistemas (WELLS et al., 2001), e diversos níveis de organização biológica podem ser utilizados na avaliação da qualidade ambiental, de genes ao funcionamento de ecossistemas (BUSS; OLIVEIRA; BAPTISTA, 2008).

Substâncias tóxicas lançadas no ambiente são capazes de interagir com o organismo vivo levando a múltiplas alterações, que podem gerar graves consequências nas populações, comunidades ou ecossistemas, dependendo do grau de contaminação e do tempo de exposição (Fig.4) (JESUS; CARVALHO, 2008).

Figura 4 - Relação entre sensibilidade da resposta e sua relevância ecológica ao longo do tempo, considerando-se diferentes níveis de organização biológica



Fonte: adaptado de Adams, 2002

Quando analisados em níveis organizacionais inferiores, como por exemplo, alterações moleculares e bioquímicas, os efeitos dos contaminantes ocorrem mais rapidamente, além disso, a especificidade das respostas e a

compreensão sobre os efeitos são geralmente maiores nos níveis mais baixos de organização (ARIAS et al., 2007). A análise das alterações ao nível bioquímico ou fisiológico permite a detecção mais rápida e específica da presença de diversos compostos tóxicos, permitindo uma identificação precoce das alterações, antes que os efeitos deletérios alcancem níveis de organização mais altos (MONSERRAT; GERACITANO; BIANCHINI, 2003, MONSERRAT et al., 2007).

Diversas moléculas biológicas, assim como a atividade de algumas enzimas, podem indicar a exposição de um organismo a poluentes e são denominados biomarcadores de exposição, já os biomarcadores de efeito referem-se à magnitude da resposta de um organismo a um poluente (RUAS et al., 2008). Os biomarcadores também podem ser classificados como específicos ou não específicos. O uso de biomarcadores como a metalotioneína, é grandemente empregado para indicar a presença de contaminação por metais (GIGUÈRE et al., 2003) por outro lado, diversos poluentes podem modificar direta ou indiretamente o balanço entre a concentração de pró-oxidantes e antioxidantes. Assim, a determinação de lesões oxidativas, tais como danos no DNA, oxidação de proteínas e oxidação de lipídios, e/ou das respostas de antioxidantes em espécies aquáticas, é comumente empregada como um biomarcador não especifico (GERACITANO et al., 2004; MONSERRAT et al., 2007). Os biomarcadores vêm sendo utilizados com sucesso, em estudos de campo, para detectar áreas impactadas onde misturas complexas de poluentes são usualmente encontradas (GERACITANO et al., 2004; AMADO et al., 2006).

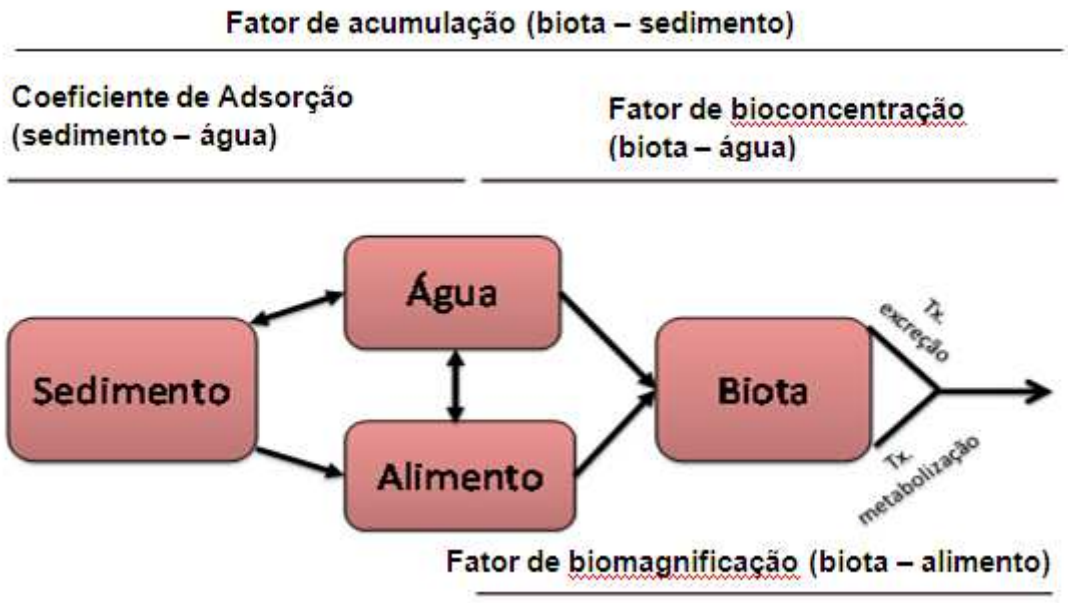
1.5.1 Biomarcadores de Exposição a Metais

Estudos sobre assimilação, acumulação e excreção são fundamentais para compreender os efeitos de poluentes, como os metais, em organismos aquáticos (MCDONALD; WOOD, 1993). O acúmulo de metais nos tecidos ocorre em relação direta com a concentração do mesmo no ambiente, a duração da exposição e as características da água, como concentração de íons, pH, dureza e temperatura (ATLI; CANLI, 2007). Além disso, o processo cumulativo de metais também está relacionado com as características do próprio animal, como a idade e o tamanho do animal. Liang e colaboradores (1999) demonstraram que o acúmulo de metais em vísceras de algumas espécies de peixes de água doce, como

a carpa comum, carpa prateada, e a tilápia, é inversamente proporcional ao tamanho dos peixes. É sugerido que a energia metabólica, determinante do acúmulo de metais em peixes, está relacionada com o comprimento, que por sua vez influencia a velocidade metabólica de absorção e excreção. Peixes menores possuem uma velocidade de absorção maior dos metais, e estes se concentram nas vísceras (GROSELL; NIELSEN; BIANCHINI, 2002).

A bioacumulação em organismos aquáticos pode ocorrer por diferentes mecanismos: através da tomada direta pelas brânquias ou pele (bioconcentração), via ingestão de partículas suspensas e pelo consumo de alimentos contaminados (biomagnificação) (Fig. 5) (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Figura 5 - Modelo de bioacumulação em organismos aquáticos



Fonte: Adaptado de Van Der Oost, Beyer e Vermeulen, 2003

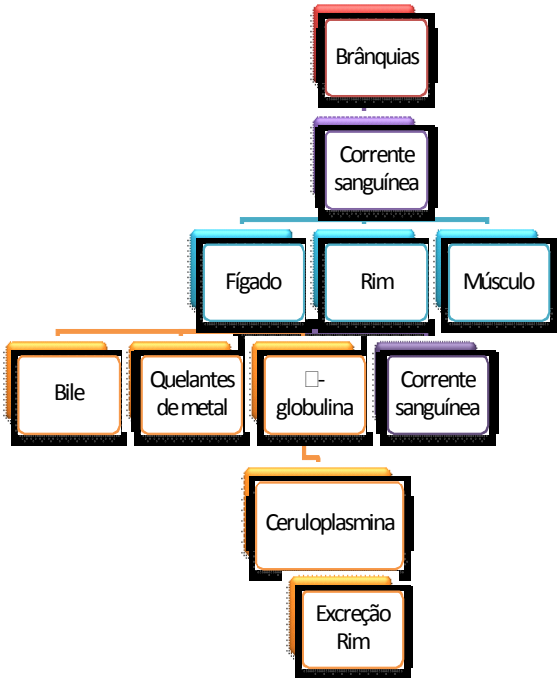
Nos peixes, a estreita relação entre o ambiente aquático e a superfície epitelial implica em que o tecido branquial, a pele e o intestino sejam os primeiros a entrar em contato com os poluentes, tornando estes órgãos potenciais indicadores de qualidade ambiental (MAZON; FERNANDES, 2001). As brânquias possuem uma larga superfície de contato com o meio externo e uma barreira muito fina que separa o meio externo do meio interno do animal. Por isso, esse órgão é considerado a principal via de tomada de íons cobre, principalmente quando se trata

de peixes de água doce (MAZON et al.,1998). O acúmulo de metais pelas brânquias é determinado pela combinação entre o metal absorvido pela superfície branquial e a subseqüente transferência a corrente sanguínea (MAZON; FERNANDES, 1999).

O fígado é um dos órgãos mais prejudicados pela exposição ao cobre, uma vez que neste órgão são realizadas várias reações bioquímicas, incluindo o metabolismo dos metais. Desta forma, o fígado acaba acumulando grande parte dos metais absorvidos (LINDE et al., 1998). O rim também possui um papel importante na excreção de compostos tóxicos, sendo também afetado pela presença excessiva de íons cobre no ambiente. O acúmulo de cobre é mais intenso no fígado seguido pelo rim e brânquias (MAZON; FERNANDES, 1999).

Os metais captados pelas brânquias, e menos intensamente, pela pele, são transportados via corrente sanguínea, metabolizados no fígado e excretados através da bile. Um aumento na concentração de metais no ambiente pode estimular a produção de proteínas quelantes de metais, como as metalotioneínas, as quais, após ligação ao cobre, são estocadas em hepatócitos. O excesso de metais é ligado a □-globulina produzida no fígado, produzindo ceruloplasmina e excretada através do rim. Quando a exposição ao cobre é muito intensa a ponto de exceder a capacidade hepática de remoção, mais íons cobre podem ser transportados através da corrente sanguínea até outros órgãos (Fig.6) (MAZON; FERNANDES, 1999). Alguns estudos já mostraram um mesmo padrão no acúmulo de cobre nos órgãos de diferentes espécies de peixes, como a tilápia Oreochromis mossambicus (PELGROM et al., 1995; AY et al., 1999) e a carpa, *Cyprinus carpio* (YAMAMOTO et al., 1977).

Figura 6 - Rotas de acúmulo do cobre em diversos tecidos



Fonte: Adaptado de Mazon e Fernandes, 1999

As MTs são proteínas de baixo peso molecular (6000–7000 Da) e ricas em cisteínas, responsáveis pelo controle homeostático da disponibilidade de metais nos sistemas biológicos através da ligação de seus grupamentos tiol (-SH) aos de metais pertencentes às famílias IB e IIB da Tabela Periódica. Essas proteínas são capazes de proteger a estrutura celular de interações não específicas com metais traço e promover a detoxificação de metais em excesso no interior da célula (VIARENGO; CANESI, 1991; ROESIJADI, 1996; VIARENGO; NOTT, 1993).

As MTs ocorrem naturalmente nos tecidos e desempenham papel importante na reserva de metais essenciais para satisfazer demandas enzimáticas e metabólicas (ATLI; CANLI, 2008); sua síntese pode ser induzida tanto por metais essenciais como não essenciais. 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).

As MTs são muito conservadas evolutivamente e amplamente distribuídas entre espécies de vertebrados e invertebrados (ROESIJADI, 1996;

TESSIER; BLAIS, 1996). A afinidade dos íons metálicos aos sítios de ligação da MTs segue a seguinte ordem: Zn < Pb < Cd < Cu, Ag, Hg (KAGI; SCHAFFER, 1988). Segundo Amiard e colaboradores (2006) a ligação do cobre com o grupamento sulfidrila é uma das mais estáveis dentre os demais metais, resistindo a degradação e diminuindo a possibilidade de outros metais se ligarem a MTs. Assim, as MTs podem agir como proteínas antioxidantes, pois indisponibilizam o cobre, evitando assim a geração de espécies reativas de oxigênio ou pela própria ação redox dos resíduos de cisteínas (ENGLISH; STOREY, 2003).

Compostos oxidantes são capazes de promover a ativação de genes envolvidos com a síntese de MTs, sugerindo a participação das MTs nos sistemas de defesa antioxidantes (ENGLISH; STOREY, 2003). Porém, um estudo realizado por Fabisiak et al. (1999) demonstrou que o peróxido de hidrogênio pode influenciar as ligações cobre-MT, diminuindo a capacidade da proteína de sequestrar o cobre e agravando a situação de estresse oxidativo instaurado nas células. Além de metais a síntese das metalotioneínas também pode ser estimulada por outros agentes endógenos ou exógenos; por exemplo, quando o organismo é submetido ao frio ou calor, e também atividade física em excesso (VIARENGO et al., 1999). Portanto as funções das MTs podem variar de forma espécie-específica e estresse- específica (ENGLISH; STOREY, 2003).

1.5.2.Biomarcadores de Estresse Oxidativo

O oxigênio é uma molécula fundamental para os organismos aeróbios, utilizada tanto na produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos, como na membrana celular de muitas bactérias, e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Na sua forma atômica o oxigênio é considerado um radical livre e em sua forma molecular é um bi-radical, devido aos seus elétrons desemparelhados, característica que permite reações de oxido-redução (DAVIES, 2000). O metabolismo celular do O_2 é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) que em excesso pode causar diversos danos em nível intracelular e extracelular, criando o chamado “paradoxo do oxigênio” devido ao balanço existente entre suas vantagens e desvantagens (AMADO et al., 2009).

A produção de ERO é regulada por mecanismos antioxidantes

enzimáticos e não-enzimáticos a fim de proteger os componentes celulares de possíveis danos oxidativos. Porém, durante os processos fisiológicos normais, cerca de 2 a 3% das ERO produzidas escapam do escudo protetor fornecido pelos antioxidantes. O desbalanço entre as espécies de oxigênio produzidas e a atividade antioxidante gera uma situação denominada estresse oxidativo (VALAVANIDIS et al., 2006), ou seja, a saúde de um organismo esta relacionada com a produção de ERO e de antioxidantes para combatê-los (DAUTREMEPUITS et al., 2009). Agentes químicos presentes no ambiente podem induzir direta ou indiretamente a produção de ERO. A indução do estresse oxidativo já foi observada após exposição a diversos poluentes como, por exemplo, metais (VALKO et al., 2006).

Dentre as espécies reativas mais importantes destacam-se o ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), sendo o radical hidroxil o responsável por danos como peroxidação de membranas, de proteínas e danos no DNA (VALAVANIDIS et al., 2006). Diariamente, cerca de 4% do oxigênio consumido pelos vertebrados é convertido em ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$), na mitocôndria, pela adição de um elétron ao seu orbital mais externo. Ao sofrer uma redução, o $O_2^{-\bullet}$ dá origem ao peróxido de hidrogênio (Reação A) (H_2O_2) e esta redução pode ocorrer de forma espontânea ou catalizada pela enzima Superóxido dismutase (SOD) sendo a primeira enzima da via antioxidante (HERMES-LIMA, 2004).

$$2\ O_2^{-\bullet} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2 \quad (\textbf{Reação A})$$

A SOD é uma metaloenzima que age sobre o radical $O_2^{-\bullet}$ dismutando-o em H_2O_2 e assim protegendo em até 97% os alvos do ataque do ânion superóxido. Em eucariotos são encontradas quatro isoformas de SOD, duas principais, a isoforma SOD-CuZn encontrada no citosol e que possui cobre e zinco em seu sítio ativo (Reação B), e a isoforma SOD-Mn, encontrada na mitocôndria e que possui o manganês em seu sítio ativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Sanchez *et al.*, (2005) sugerem que frente à exposição ao cobre, a SOD apresenta uma resposta extremamente rápida, por possuir esse metal em sua constituição.

$$\text{Enzima-Cu}^{+2} + O^{2-\bullet} \rightarrow \text{Enzima-Cu}^{1+} + O_2$$
$$\text{Enzima-Cu}^{1+} + O^{2-\bullet} + 2H^{+} \rightarrow \text{Enzima-Cu}^{2+} + H_2O_2$$
$$O^{2-\bullet} + O^{2-\bullet} + 2H^{+} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2 \text{ (**Reação B**)}$$

A atividade da SOD pode ser tida como pró-oxidante visto que pode fornecer peróxido de hidrogênio para a formação de radical hidroxil, através da reação de Fenton (Reação C) e reação de Haber Weiss (Reação D). Estas reações ocorrem na presença de metais como o cobre e o ferro (HERMES-LIMA, 2004).

$$H_2O_2 + Fe^{+2}/Cu^{+} \rightarrow Fe^{+3}/Cu^{+2} + OH^{-} + {}^{\bullet}OH \text{ (**Reação C**)}$$

$$O_2^{-} + H_2O_2 + Fe^{+3}/Cu^{+2} \rightarrow Fe^{+2}/Cu^{+}\ O_2 + OH^{-} + {}^{\bullet}OH \text{ (**Reação D**)}$$
$$O_2^{-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + OH^{-} + {}^{\bullet}OH$$

O peróxido de hidrogênio por sua vez pode ser decomposto em oxigênio e água pela enzima catalase (CAT) (Reação E). Esta enzima encontra-se em abundância nos peroxissomos e é amplamente distribuída dentre os tipos celulares, principalmente no fígado e sangue dos vertebrados (SCANDALIOS, 2005; ATLI *et al.,* 2006). A CAT é específica em dismutar o H_2O_2 e sua atividade aumenta diretamente com o aumento da concentração dessa espécie reativa intracelularmente e por possuir alto Km, a CAT é dificilmente saturada pelo substrato (SCANDALIOS, 2005).

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2 \text{ (**Reação E**)}$$

Quando em concentrações mais baixas, o H_2O_2 geralmente é metabolizado pela Glutationa Peroxidase (GPx). A GPx é uma enzima que possui quatro isoformas e é encontrada no citosol e na mitocôndria e possui selênio no seu sítio catalítico. A GPx oxida a glutationa (GSH) utilizando como substrato o H_2O_2 (reação F) e também outros peróxidos (HERMES-LIMA, 2004). A GPx é amplamente utilizada como biomarcador, o que demonstra a obtenção de resultados expressivos em diversas situações de estresse, seja por compostos orgânicos ou inorgânicos.

$$2\ GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$$ (**Reação F**)

As enzimas descritas anteriormente correspondem ao sistema de defesa antioxidante primário. A Glutationa S-Transferase (GST) pertence a uma família de proteínas responsável pela conjugação de xenobióticos eletrofílicos com a GSH, reduzindo sua toxicidade, a fim de torná-los mais hidrofílicos, permitindo que o sistema de transporte elimine estes conjugados para o meio extracelular, metabolizados pela via do ácido mercaptúrico (BUCHELI; FENT, 1995). A GST pode atuar como isomerases, peroxidases e ainda como tiol transferases (COGO et al., 2009).

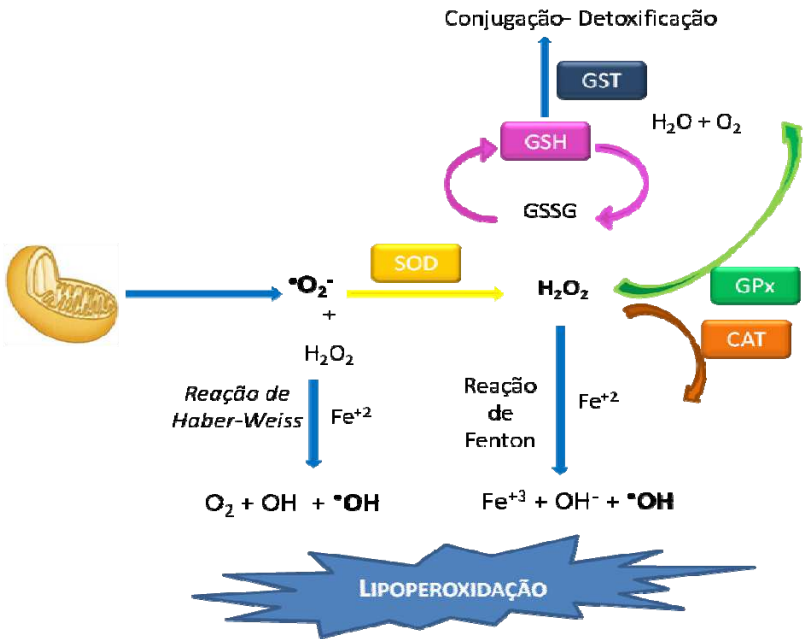
A GST é muito utilizada no monitoramento ambiental, principalmente de ambientes expostos a metais. Acredita-se que essa exposição pode levar a inibição da enzima como resultado da desestabilização de membranas lisossômicas, provocada pela exposição aos metais e radicais livres, o que pode resultar em ruptura da membrana com liberação de diversos radicais e íons ácidos que prejudicam a atividade da enzima (COGO et al. 2009).

O antioxidante celular mais abundante é a Glutationa (γ-L-glutamil-L-cisteinil-glicina), um tripeptídeo encontrado nas células geralmente em sua forma reduzida (GSH), o qual age como um redutor intracelular e nucleofílico. Atua na síntese de proteínas e DNA, transporte de aminoácidos, manutenção do *status* tiol-dissulfeto, transdução de sinal e como um co-fator essencial para uma serie de enzimas. Ela também corresponde à uma forma não tóxica de armazenamento de cisteínas e defesa contra moléculas oxidantes e xenobióticos com potênciais danosos, como os metais. Estudos sugerem que a concentração de GSH pode estar aumentada ou diminuída em peixes frente à exposição a metais em tecidos diferentes (ATLI; CANLI, 2008). Este antioxidante não enzimático também participa como co-fator para a GST no processo de biotransformação II; participa do processo de detoxificação sendo oxidada pela GPx e também pode atuar como quelante de metais reduzindo assim sua toxicidade (ATLI; CANLI, 2008).

As defesas antioxidantes (Fig. 7) podem ser induzidas, como também podem ser esgotadas frente a substâncias pró-oxidantes, dependendo do tempo e intensidade da exposição. Ao mesmo tempo, a alteração nestas defesas também está relacionada às diferentes classes de xenobióticos, de fatores

ambientais e biológicos (WINSTON; DIGIULIO, 1991).

Figura 7 - Modelo de atuação dos antioxidantes na proteção contra as espécies reativas de oxigênio



Fonte: Adaptado de Hermes Lima, 2004

Os fosfolipídios de membrana dos organismos aeróbicos são freqüentemente alvo de oxidantes de fontes endógenas e exógenas e as membranas com lipídios peroxidados representam uma constante ameaça às células aeróbicas. Células contem antioxidantes a fim de prevenir o inicio da peroxidação lipídica e uma variedade de mecanismos para tentar manter a integridade das membranas e a homeostase, reparando os danos oxidativos em componentes lipídicos (VALAVANIDIS et al., 2006).

O processo de peroxidação lipídica é composto por uma série de reações em cadeia, especialmente nos ácidos graxos poli-insaturados, que são muito sensíveis a oxidação pelas espécies reativas de oxigênio devido a presença de suas duplas ligações (HERMES-LIMA, 2004). A peroxidação lipídica é iniciada principalmente por radicais hidroxil, especialmente por reações catalisadas por metais de transição. Metais como os íons ferro e cobre, que em presença do H_2O_2 pode produzir $^{\bullet}OH$ através da reação de Haber-Weiss (VALAVANIDIS et al., 2006).

O término deste processo cíclico de lipoperoxidação pode ocorrer por diversos fatores, tais como a neutralização de radicais por antioxidantes, a formação de produtos não radicalares, o consumo dos reagentes, dentre outros.

Entre os produtos finais formados durante o processo de lipoperoxidação destacam-se os hidrocarbonetos e os aldeídos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal (4-HNE). Acredita-se que níveis elevados de 4-HNE (acima de 1 μM) atuem 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). Entretanto, o 4-HNE também é um potente indutor de defesas antioxidantes. Já o MDA pode atacar proteínas quando presente em ambientes de baixo pH, resultando em modificações de inúmeros resíduos de aminoácidos, especialmente lisina. Ele ainda pode reagir com bases de DNA, especialmente a guanina, 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 com cor rosa que pode ser quantificado por espectrofotometria, servindo de base para método de detecção de produtos finais de lipoperoxidação (HERMES-LIMA, 2004).

A exposição a diversos tipos de contaminante é capaz de aumentar a peroxidação lipídica como já visto por Pandey et al. (2008), cujo trabalho mostrou um aumento na peroxidação lipídica após exposição de Channa punctata a uma mistura com diversos metais traços; por Leão et al. (2008) após a exposição à microcistinas e por Tony et al. (2010), que utilizaram um herbicida para a verificação da peroxidação lipídica em Cyprinus carpio.

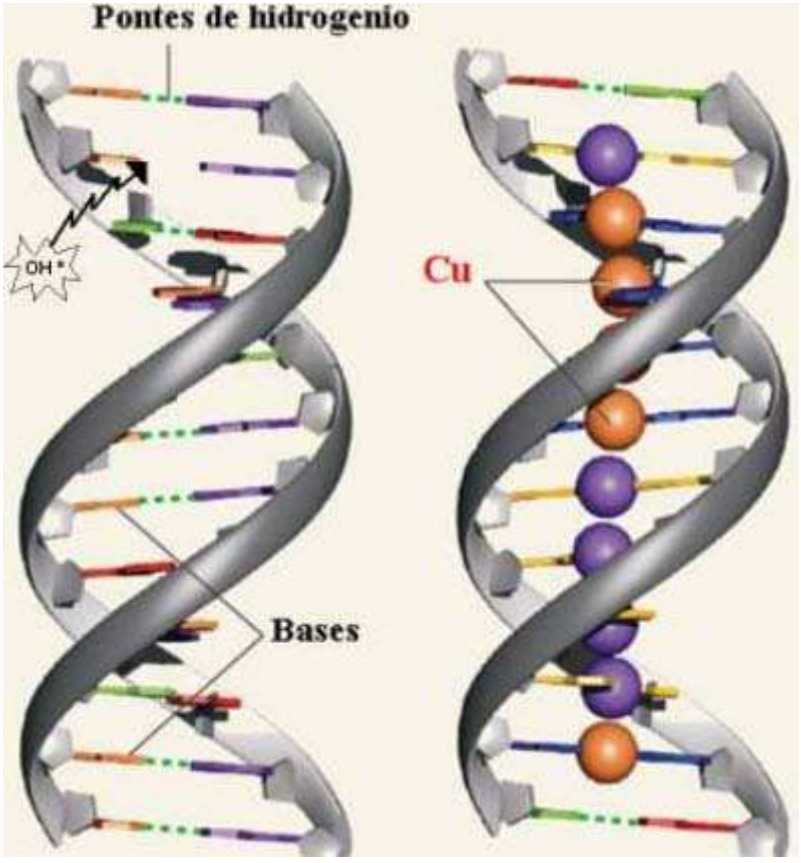
Respostas antioxidantes e parâmetros de estresse oxidativo vêm sendo utilizados como biomarcadores de exposição a poluentes, visto que muitos poluentes são conhecidos por aumentar a quantidade de ERO intracelular através de diferentes mecanismos, incluindo o ciclo redox, o metabolismo oxidativo dependente de citocromo P-450 e a reação de Fenton, na presença de alguns metais de transição (AMADO et al., 2009)

1.5.3 Biomarcadores Genotóxicos

As biomoléculas como o DNA são ricas em elétrons capazes de

gerar uma atração por íons metálicos, deficientes em elétrons. A interação entre eles resultam em compostos altamente estáveis (STOHS; BAGCHI, 1995). Metais como ferro, cobre e cromo podem produzir espécies reativas de oxigênio, as quais podem induzir peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas e danos no DNA. Além disso, o estresse oxidativo também pode afetar diversas rotas metabólicas, incluindo aquelas envolvidas no reparo do DNA (GAETKE; CHOW, 2003). Na presença de redutores biológicos, os íons cobre podem ser reduzidos a Cu^{+}, sendo capazes de catalisar a formação de radicais hidroxil que reagem rapidamente com a desoxirribose do DNA, levando a quebra da fita (LIU et al., 1999). Os radicais livres atacam todas as posições do açúcar da desoxirribose levando a quebras em uma ou duas fitas do DNA (MULLER, 2006) (Fig. 8).

Figura 8 - Influência dos íons cobre sobre a estrutura do DNA



Fonte: adaptado de Muller, 2006

É alto o interesse científico no ensaio cometa para demonstrar danos no DNA induzidos por contaminantes (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998). Este ensaio investiga danos no DNA através da determinação da migração do DNA de células depois de uma corrida eletroforética (SINGH et al., 1988). O nome cometa refere-se à formação de uma longa cauda com os fragmentos de DNA deixados após a passagem da corrente elétrica (BOMBAIL; GORDON; BATTY, 2001).

O ensaio cometa tem sido utilizado como uma ferramenta para o monitoramento ambiental, na demonstração da genotoxicidade de substâncias e para investigar impactos na integridade do DNA, reparo e recuperação em diversas espécies. Este ensaio apresenta algumas vantagens, em relação a outros testes de genotoxicidade: (i) qualquer tipo de tecido com células nucleadas pode ser usado, (ii) são necessárias pequenas quantidades de amostras e (iii) o ensaio é rápido, sensível e de baixo custo (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

O princípio desta técnica baseia-se no fato de que o DNA da célula que não apresentar dano migrará de forma homogênea formando um círculo. Caso o DNA apresente dano serão formados fragmentos de diversos tamanhos, de modo que, na eletroforese, os fragmentos menores migrem mais rapidamente em relação aos fragmentos maiores. Ocorrendo um dano intenso no material celular, muitos fragmentos de diversos tamanhos serão formados e migrarão em velocidades diferentes, originando a figura típica de um cometa (OLIVE; BANÁTH; DURAND, 1990).

Sob condições neutras (pH 7,5) os cometas apresentam caudas mais densas enquanto que sob condições alcalinas (pH>10) estas são mais dispersas (KLAUDE et al., 1996). O ensaio cometa realizado sob condições alcalinas permite a detecção de quebras em fita simples do DNA. Estima-se que com cerca de mais ou menos 200 quebras na fita de DNA de uma célula o teste mostre sua sensibilidade. Este número de quebras é menor do que os detectados por outros métodos existentes (OLIVE et al., 1992). Os tecidos mais utilizados no teste do cometa são o sangue, devido à relativa facilidade na obtenção, hepático, por se tratar do principal órgão do metabolismo, branquial, devido ao seu contínuo contato com a fase aquosa e renal, tecido produtor de sangue em peixes (BELPAEME; COOREMAN; KIRSCH-VOLDERS, 1998).

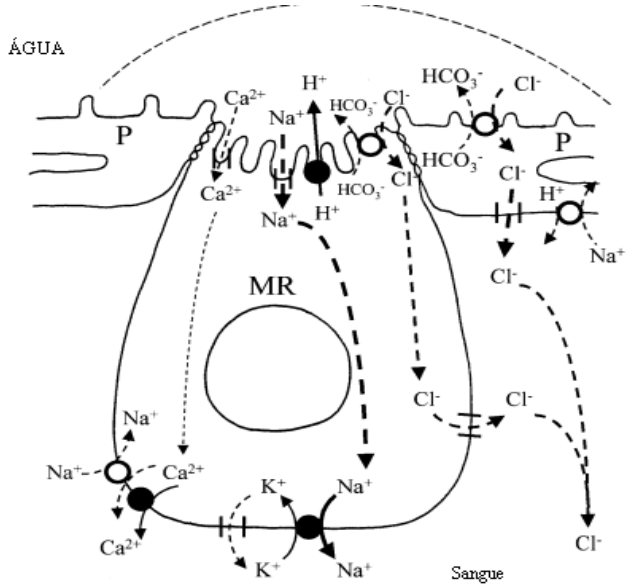
1.5.4 Biomarcadores Fisiológicos

Comparado aos animais terrestres, os peixes dulcícolas têm que lidar com um maior desafio osmótico, pois vivem em um ambiente cerca de 100 vezes menos concentrado que seu meio interno, assim, os teleósteos precisam ser altamente eficazes com os mecanismos iônicos/osmorregulatórios a fim de manter seus fluidos corpóreos em homeostase (HWANG; LEE, 2007). Os teleósteos 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 este animais compensam o ganho osmótico de fluidos e a perda difusa de íons (MARSHAL, 2002).

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 brânquia é um órgão multifuncional com uma anatomia extremamente complexa. Suas funções em animais dulcícolas são respiração, excreção de excretas nitrogenadas, balanço acido-básico e osmorregulação (GROSELL *et al.*, 2004). Muitos agentes estressores afetam a estrutura branquial, direta ou indiretamente com conseqüente dano as trocas gasosas e o balanço hidromineral destes animais em águas poluídas (WENDELAAR BONGA, 1997).

As principais células brânquias relacionadas aos mecanismos de osmorregulação e o equilíbrio ácido-base são as chamadas células cloreto (CC). Estas células são ricas em mitocôndrias e possuem diversas ATPases como a Na^+/K^+ ATPase e a Ca^{2+} ATPase, além de diversos canais para o transporte de íons (CLAIRBONE; EDWARDS; MORRISON-SHETLAR, 2002) (Fig. 9).

Figura 9 - Modelo da captação de íons em células cloreto de peixes teleósteos dulcícolas



Fonte: Adaptado de Marshall, 2002

Metais podem produzir disfunções osmorregulatórias e nos mecanismos de regulação ácido-base, estudos propõem que estes sintomas sejam secundários à interação dos metais a receptores específicos de membrana. O cobre pode potencialmente se ligar a canais de sódio epiteliais, diminuindo a atividade da enzima Na^+/K^+ATPase e alterando as concentrações dos íons plasmáticos. Estudos comprovaram que o Cu^{2+} livre pode ligar-se covalentemente ao grupamento-SH na Na^+/K^+ ATPase causando alterações conformacionais na proteína (WU et al., 2007). Além disso, o cobre, assim como outros metais, pode deslocar o íon cálcio dos sítios de ligação na membrana levando a uma desestruturação da mesma, o que pode resultar em um aumento das perdas difusas dos íons (ARELLANO; STORCH; SARASQUETE, 1999; GROSELL; NIELSEN; BIANCHINI, 2002).

A regulação ácido-base branquial está intimamente relacionada a regulação iônica, relacionando excreção de ácido e base com a absorção de íons Na^+ e Cl^-. A absorção de Na^+ está relacionada à excreção de H^+ e a absorção de Cl^-, com a excreção de HCO_3^-. A metaloenzima anidrase carbônica (AC) 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, como o cobre, levando a uma alteração na estrutura tridimensional da proteína podendo potencialmente afetar sua atividade (BROOKS; MILLS, 2003). Desta forma, é possível verificar alteração na atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase e anidrase carbônica, bem como nas concentrações iônicas após condições estressantes.

O cortisol é o principal hormônio envolvido no estresse em peixes. Sua síntese e liberação são controladas pelo eixo hipotálamo-pituitária–interrenal (HPI) e apresenta papel importante na aclimatação de peixes em ambientes poluídos por metais, estimula a síntese de metalotioneínas, estimula a proliferação e diferenciação das células cloreto e também estimula a expressão de Na^+/K^+ATPase nestas células (WU et al., 2007). Muitos efeitos hematológicos da exposição ao cobre (hiperglicemia e elevação do hematócrito) são típicos de uma reposta não especifica ao estresse (MAZON et al., 2000).

A hiperglicemia é uma resposta comum a diversos estressores em peixes de água doce e tem sido considerada como indicador de exposição sub-letal a poluentes. O cortisol afeta o metabolismo dos carboidratos, levando a respostas hiperglicêmicas (WENDELAAR BONGA, 1997). A exposição ao cobre afeta o processo de captação de oxigênio por alterações histopatológicas nas brânquias o que pode acarretar em um aumento na glicemia, através da glicogenólise, para suprir a demanda energética na detoxificação e reparo dos processos de exposição ao cobre (MAZON et al., 2002).

Os parâmetros do sangue são considerados indicadores fisiológicos e consequentemente são importantes no diagnóstico do estado estrutural e funcional do peixe exposto a substância tóxica (ADHIKARI et al., 2004; JESUS E CARVALHO et al., 2008). As análises hematológicas são frequentemente utilizadas para detectar alterações fisiológicas em resposta a diferentes condições de estresse, como a exposição a metais (SAMPAIO et al., 2008). Entretanto, a ausência de estudos sobre a caracterização de células sanguíneas e outros valores hematológicos em diferentes espécies de peixes representa uma barreira para se usar esta ferramenta na investigação do efeito de contaminantes em peixes (MELA et al., 2007; JESUS E CARVALHO et al., 2008).

Desordens hematológicas são caracterizadas por alterações na estrutura ou função das células sanguíneas ou nos mecanismos de coagulação (CLAUSS; DOVE; ARNOLD, 2008). Os íons metálicos são conhecidos por estimular

a eritropoiese (O'CONNOR; FROMM, 1975; NUSSEY; VAN VUREN; DU PREEZ, 1995). As alterações hematológicas são evidentes dentre os efeitos tóxicos do cobre, podendo ocorrer variações no número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, de forma transitória ou não.

A eritropoiese, ou seja, o aumento do número de hemácias no sangue é o primeiro mecanismo através do qual o peixe responde a uma situação de hipóxia. A liberação de eritroblastos usualmente resulta do aumento da taxa de catabolismo das células sanguíneas vermelhas, como durante intoxicação por cobre (NUSSEY; VAN VUREN; DU PREEZ, 1995), e já foi observado em peixes expostos a mercúrio (O'CONNOR; FROMM, 1975). Um segundo mecanismo pelo qual os peixes compensam uma oxigenação pobre durante a hipóxia é através da liberação de um grande número de hemácias via estimulação beta adrenérgica em tecidos hematopoiéticos (WEPENER et al., 1992).

Uma das conseqüências mais conhecidas do excesso de cobre é o dano peroxidativo de membranas lipídicas, o que pode gerar alterações nos parâmetros sanguíneos, como hemoglobina e hematócrito. Segundo Mazon e colaboradores (2002) peixes da espécie *Prochilodus scrofa* expostos as concentrações de 25 e 29 □g.L-1 de cobre apresentaram aumento no hematócrito e no número de eritrócitos (RBC), sendo que alterações na concentração de hemoglobina só foram verificadas na concentração mais alta.

1.6 MODELO EXPERIMENTAL

Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1847), popularmente conhecido como curimbatá ou curimba, é uma espécie da ictiofauna de região neotropical, pertencente à ordem Characiformes, família Prochilodontidae, considerado uma das espécies mais abundantes e importantes da região Sul e Sudeste do Brasil, sendo bastante utilizado na alimentação humana (Fig. 10). A espécie apresenta potencial pesqueiro, desova entre os meses de novembro a janeiro e em suas migrações pode vencer grandes obstáculos e desníveis (AGOSTINHO; JULIO JUNIOR, 1999). São peixes de escamas ásperas e de cor cinza-esverdeadas, mais escuras no dorso tornando-se amareladas no ventre. A boca é circular e se projeta levemente para frente, com lábios carnosos, sobre os quais estão implantados numerosos dentes diminutos dispostos em fileiras. Pode alcançar um tamanho médio de 30 cm de

comprimento total (BERTOLETTI, 1985).

Figura 10 - Modelo experimental - Juvenil de *Prochilodus lineatus*

Fonte: LEFA/UEL

P. lineatus é uma espécie migratória e os adultos habitam águas abertas de regiões dos rios Paraná, Uruguai e rio de La Plata, podendo ser encontrados também em ambientes lênticos e semi-lênticos conectados aos rios, para a alimentação e o crescimento dos jovens (AGOSTINHO et al., 1993). Os curimbas formam grandes cardumes e realizam migração rio acima na época da reprodução, que em geral, concentra-se nas estações das chuvas (SVERLIJ et al., 1993). O comportamento migratório desta espécie favorece o contato com águas presentes em diversos trechos do rio, favorecendo o encontro de diversos ambientes com várias combinações de poluentes (TAKASUSUKI et al., 2004). Este peixe demonstra elevada tolerância a variações de temperatura e de pH, apresentando um ótimo potencial para a piscicultura. Entretanto, devido ao hábito alimentar detritívoro, a probabilidade de serem contaminados por metais que se encontram acumulados aos sedimentos é grande (BARRIONUEVO; FERNANDES, 1995; MARTINEZ, 2006). A espécie em estudo apresenta importância econômica e social para as pescas artesanal, de subsistência e esportiva, por apresentarem carne saborosa sendo muito procuradas pela população ribeirinha (BARBIERI et al., 2008). A utilização dessa espécie em estudos na área de ecotoxicologia aquática deve-se a características como: animal de biologia e fisiologia conhecidas, além de ser sensível aos efeitos de poluentes e pelo fato desses peixes serem capazes de bioacumulação devido à exposição direta (tomada xenobióticos via brânquias) e/ou através da alimentação (RAND; PETROCELLI, 1985).

2 OBJETIVOS GERAIS

Investigar de forma integrada a dinâmica de acumulação do cobre e seus efeitos em uma espécie de peixe nativa do Brasil, com ênfase nas defesas antioxidantes, ocorrência de danos oxidativos e nos mecanismos de hiper-regulação osmótica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar testes de exposição aguda (48 e 96 h) com juvenis de *P. lineatus* expostos à concentração nominal de 20 □g.L^{-1}de cobre;
- Determinar o acúmulo de cobre em diferentes tecidos;
- Verificar se a exposição ao cobre promove alterações na atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx e GST) e na concentração do antioxidante não enzimático GSH e avaliar a ocorrência de peroxidação lipídica nas brânquias e no fígado de *P. lineatus* após exposição ao cobre;
- Averiguar se a exposição ao metal produz danos no DNA de eritrócitos de *P. lineatus*, através do Teste do Cometa;
- Determinar a concentração de metalotioneínas em fígado, brânquias e músculos de *P. lineatus* após exposição ao cobre;
- Avaliar parâmetros hematológicos (hematócrito, conteúdo de hemoglobina e número de eritrócitos) e de resposta de estresse (cortisol plasmático e glicemia) em *P. lineatus* expostos ao cobre;
- Analisar a atividade da Na^+/K^+ATPase e Anidrase Carbônica e parâmetros osmo-iônicos (osmolaridade e concentrações plasmáticas de íons Na^+, K^+, Cl^- e Ca^{2+}) em *P. Lineatus* após exposição ao cobre.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROTOCOLOS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Exemplares juvenis de curimba, *Prochilodus lineatus*, foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da UEL (EPUEL). Os peixes foram aclimatados na sala de bioensaio do Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA-UEL). Durante o período de aclimatação (de 5 a 7 dias), os animais foram mantidos em tanques (300L) equipados com sistema de aeração mantendo o ambiente normóxico (aproximadamente 7 $mgO_2.L^{-1}$), com temperatura (25 ± 2°C) e pH (7,2 ± 0,15) constantes e fotoperíodo de 12h luz: 12h escuro. Os peixes foram alimentados com ração comercial com 36% de proteína (Guabi®, BR), em dias alternados. A alimentação foi suspensa 48 h antes do início do período experimental. Os animais foram submetidos a testes de exposição aguda, do tipo estático, durante 48 e 96 horas. Para cada tempo experimental foram realizados experimentos independentes. Grupos de peixes (n=8; 17,15 ± 1,06 cm; 11,82 ± 0,24 g) foram randomicamente distribuídos em aquários contendo apenas água desclorada (grupo controle) ou em aquários contendo cobre, em uma concentração nominal de 20 □g.L^{-1}. A fonte de cobre utilizada foi o cloreto de cobre diidratado (Acròs, Alemanha). Este valor foi definido com base na CL_{50}-96 horas, de 29 ± 3 □g.L^{-1}, determinada por Mazon & Fernandes (1999) para a espécie objeto deste estudo. Os parâmetros temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade e pH da água dos aquários foram monitorados com o uso de um analisador de água multiparâmetros (Horiba U-52).

3.2 DETERMINAÇÃO DE COBRE NA ÁGUA

Amostras de água dos aquários controles e experimentais foram coletadas, utilizando seringas de vidro, e acidificadas com ácido nítrico 2% para a determinação da concentração total de cobre presente nas amostras. Para a determinação da concentração de cobre dissolvido, amostras de água coletadas foram filtradas (0,45 μm) e posteriormente acidificadas em ácido nítrico 2%. As coletas de água foram realizadas a cada 24 h, desde o início dos experimentos (tempo 0). As medidas de cobre foram feitas por atomização eletrotérmica em espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite (Perkin Elmer–AA700)

utilizando-se lâmpada de cobre de cátodo oco (limite de detecção = 0,014 $\mu g.L^{-1}$). Como referência foi utilizada uma curva padrão construída com base na leitura de seis diferentes concentrações de cobre (0, 1, 5, 10, 15, 20 $\mu g.L^{-1}$) feitas a partir de um padrão de cobre 1000 mg Cu. L^{-1} ($CuCl_2$ em H_2O) (Titrisol®).

3.3 Obtenção das Amostras e Armazenamento

Ao término do período experimental, os animais dos grupos CTR e EXP foram anestesiados (solução de 0,6 g de benzocaína em 70 mL de álcool, diluída em 2 litros de água) para a retirada do sangue através da veia caudal, com o uso de seringa de 1 mL heparinizadas. Uma alíquota de 10 μL de sangue total foi armazenada em tubos de plástico contendo 700μL de salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 126,6mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, $NaHCO_3$ 3,7 mM, Na_2HPO_4 8,9 mM, NaH_2PO_4 2,9 mM) e mantida no gelo para posterior realização do Teste do Cometa. O restante do sangue foi armazenado para a determinação dos parâmetros hematológicos e para a obtenção do plasma, para avaliação dos parâmetros de resposta de estresse e determinação das concentrações iônicas. Após a retirada do sangue os animais foram mortos por secção medular, e após serem medidos e pesados, foram retiradas as brânquias, fígado, rim e amostra do músculo axial branco, armazenadas em ultrafreezer (-70^oC) até a determinação do acúmulo de cobre e demais análises, conforme descrição a seguir.

3.4 Quantificação do Cobre nos Tecidos

Para a análise da concentração de cobre nos tecidos foram obtidas amostras de tecido branquial, renal, hepático e muscular. Após a amostragem o tecido branquial foi lavado com salina. Os órgãos foram dispostos sobre papel de filtro para a retirada do excesso de água e então pesados e imersos em ácido nítrico (65% Supra Puro – Merck) 1N na proporção de 1:5 (peso: vol.), e deixados em estufa durante 48 h a 60° C. Após esse período as amostras foram centrifugadas a 14000 × g por 20 min. e o sobrenadante foi diluído em HNO_3 1% para posterior quantificação do metal, segundo Alves e Wood (2006). As concentrações do metal foram determinadas por atomização eletrotérmica em espectrofotômetro de

absorção atômica com forno de grafite (Perkin Elmer – AA700) utilizando-se lâmpada de cobre de cátodo oco. As concentrações das amostras analisadas foram calculadas com base na leitura de sete diferentes concentrações (0, 5,10, 20, 40, 50, 60 □g.L^{-1}) do padrão de cobre 1000 mg Cu.L^{-1} ($CuCl_2$ em H_2O) (Titrisol®).

3.5 PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO

3.5.1 Análises das Defesas Antioxidantes

Amostras de brânquia e fígado foram pesadas, homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (0,1 M; pH 7,0), centrifugadas (20 min., 14700 x *g*, 4°C) e o sobrenadante foi separado para a realização dos ensaios bioquímicos.

3.5.1.1 Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada pela inibição da taxa de redução do citocromo c pelo radical superóxido, gerado pelo sistema xantina-xantina oxidase, em pH 7,8 a 25°C, em 550 nm (MCCORD E FRIDOVICH, 1969). A quantidade de xantina empregada foi aquela capaz de produzir uma velocidade de redução do citocromo c a 550 nm de 0,025 U.A./min. A atividade da enzima foi expressa em U de SOD por mg de proteína. Uma unidade de SOD representa a quantidade de enzima necessária para produzir 50% de inibição da taxa de redução do citocromo c.

3.5.1.2 Catalase

A atividade da catalase (CAT) foi determinada seguindo-se a velocidade de decomposição da H_2O_2, através do decréscimo de absorbância, em 240 nm (BEUTLER, 1975). O ensaio enzimático de 60 s foi realizado utilizando um tampão específico com EDTA 5 mM e Tris-HCl 1 M pH 8,0 contendo H_2O_2. A atividade da enzima foi expressa em µmol H_2O_2 metabolizado. min^{-1}.mg de $proteína^{-1}$.

3.5.1.3 Glutationa peroxidase (GPx)

A atividade da glutationa peroxidase (GPx) foi baseada na oxidação do NADPH + H^+ em presença de H_2O_2, em 340 nm, de acordo com a metodologia de Hopkins e Tudhope (1973). A enzima, ao utilizar GSH para degradar um peróxido gera glutationa oxidada (GSSG), que por sua vez, é reduzida pela glutationa redutase, adicionada ao meio de reação, com o consumo de NADPH. O ensaio enzimático de um minuto é realizado em tampão fosfato de potássio 0,1 mM, EDTA 2 mM, pH 7,0 contendo 0,2 mM de NADPH, 1 mM GSH, 0,1U.mL^{-1}de GR e 5 mM de NaN_3. A atividade da enzima foi expressa em μmol NADPH oxidado. min^{-1}.mg de proteína $^{-1}$.

3.5.1.4 Glutationa s-transferase (GST)

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

3.5.2 Determinação do Conteúdo de Glutationa Reduzida e Metalotioneína

A concentração de glutationa reduzida (GSH) foi determinada pela reação da glutationa com o 5,5'-ditiobis-2-acido nitrobenzoico (DTNB), formando o tiolato (TNB) de cor amarelada, que foi determinado em 412 nm. A GSH foi expressa em ug de GSH.mg de proteína $^{-1}$, a partir de uma curva padrão para a GSH.

A concentração das metalotioneína (MT) foi estimada através da concentração de grupamentos sulfidrilas (VIARENGO et al., 1997). Para esse ensaio o tecido branquial, hepático e muscular foi homogeneizado em tampão Tris-HCl 20mM, contendo sacarose 0,5Mm e ß-Mercaptoetanol 0,01%, pH 8,6. O conteúdo de MT foi quantificado espectrofotometricamente, utilizando-se o reagente de Ellman (NaCl 2M, DTNB 0,43 M em tampão fosfato 0,2M; pH 8,0). Os resultados foram

expressos em 412 nm e foi expresso em µM GSH.mg de proteína^{-1}, a partir de uma curva padrão para a GSH.

3.5.3 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi estimada pela produção de malondialdeído (MDA), que é um dos produtos finais deste processo oxidativo. O conteúdo de MDA foi determinado através do ensaio TBARS, que mede as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), em 530 nm, de acordo com o método descrito em Federici (2007). A peroxidação lipídica foi expressa em equivalentes de malondialdeído (MDA), como µmol MDA. mg de proteína^{-1}, usando uma curva padrão de MDA.

3.6 Análise de Danos no DNA: Teste do Cometa

Antes da realização do teste do cometa foi realizado um teste de viabilidade celular, utilizando-se a metodologia da exclusão de células pelo corante azul de Trypan, a fim de se avaliar a integridade das células sanguíneas. Durante a amostragem, 10 µL de sangue foram adicionados a 700 µL de salina tamponada (PBS), desta solução, foram utilizado 20 µL da solução contendo sangue com 40µL do corante azul de Trypan; em seguida alíquotas destas misturas foram colocadas em uma câmara de Neubauer e analisadas em microscópio de luz. Foram contadas 100 células, discriminando as células brancas (célula viável) das células azuis. A mudança de coloração da célula para azul indica que a célula não possui mais a sua membrana íntegra, permitindo a passagem do corante por esta. Foram consideradas viáveis amostras com células sanguíneas com, pelo menos, 80% de viabilidade.

O ensaio do cometa foi realizado segundo metodologia descrita por Singh et al. (1988) modificado por Vanzella et al. (2007) para o tecido sanguíneo. Um volume de 10 µL da solução de sangue diluída em PBS, previamente preparada na amostragem, foi misturado com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (100 mg em 20 mL PBS) que estava mantida em banho-maria a 37ºC. Essa mistura foi dividida e pipetada sobre duas lâminas de vidro, previamente cobertas com uma película de agarose normal 1,5% (300 mg em 20 mL PBS), que foram cobertas com lamínula. As lâminas foram colocadas no refrigerador por 30 minutos

para permitir a completa solidificação da agarose contendo as células. Após, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram colocadas em uma solução de lise recém preparada (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 h. Após a lise, as lâminas foram colocadas em uma cuba de eletroforese horizontal e uma solução tampão recém preparada (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) foi adicionada à cuba, que permaneceu por 30 minutos, em gelo dentro de um recipiente escuro, para evitar entrada de luz. Em seguida, as lâminas foram expostas por 20 minutos, a 4ºC, às condições de eletroforese: 25 V, com a corrente elétrica ajustada para 300 mA, através da alteração lenta do nível de tampão da cuba. Após a eletroforese, as lâminas foram cobertas com tampão de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 5 minutos, sendo esse passo repetido por mais 2 vezes. Após a terceira neutralização, as lâminas foram secas em posição inclinada e fixadas com etanol durante 10 minutos. Por fim, as lâminas foram estocadas na geladeira por, no máximo, 30 dias.

Para análise, cada lâmina foi corada com 50 μL do corante gelRed (Uniscience) e examinada no microscópio de fluorescência em objetiva de 100X. Foram confeccionadas duas lâminas por animal. Utilizando-se lâminas codificadas, a fim de fazer um teste cego, foram analisadas 100 nucleóides por animal. Para cada nucleóide analisado os danos ao DNA foram classificados em 4 classes, de acordo com Kobayashi (1995), considerando-se o tamanho da cauda do cometa: classe 0 = sem dano aparente; classe 1 = cauda curta menor que o diâmetro do núcleo; classe 2 = comprimento da cauda correspondendo a uma ou duas vezes o diâmetro do núcleo; classe 3 = comprimento da cauda maior que o dobro do diâmetro do núcleo. Com base nesta análise, as células receberam escores de 0 (dano mínimo = nenhuma célula danificada) a 3 (dano máximo). Para o cálculo do escore de dano, o número de células em cada classe (0, 1, 2 ou 3) foi multiplicado pelo valor de cada classe e o escore foi calculado pela fórmula: (0xA) + (1xB) + (2xC) + (3xD), onde: A, B, C e D correspondem ao número de células em cada uma das classes. Assim, o valor de escore pode variar de um mínimo de 0 e um valor máximo de 300. Também foi calculado para cada animal o número de nucleóides danificados, que corresponde à soma das células observadas com danos de classes 1, 2 e 3. Para cada grupo experimental, calculou-se o número médio de nucleóides danificados, pela média do número de nucleóides danificados considerando-se todos os animais de cada grupo.

3.7 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Uma alíquota do sangue total foi utilizada para determinação de hemoglobina e hematócrito e contagem de eritrócitos. O hematócrito foi determinado pela técnica de centrifugação de microcapilares. Para a determinação do número de eritrócitos (RBC), 5 □L do sangue total foi adicionado a 1 mL de tampão formol-citrato de sódio (3,8 g de citrato de sódio; 2,0 ml de formol 40% e água Milli-Q q.s.p.100 ml). A contagem foi realizada em câmara de Neubauer por microscopia óptica. A dosagem de hemoglobina (Hb) foi feita em espectrofotômetro, em 540 nm, utilizando-se o reagente de Drabkin (1 g bicarbonato de sódio, 0,05g cianeto de potássio, 0,2 g de ferrocianeto de potássio e água destilada q.s.p 1L). Os resultados obtidos foram expressos em % para o hematócrito, em células.10^6 por mm^3 para o RBC e a em $g.dL^{-1}$ para a Hb.

Os índices hematiméticos foram calculados a partir dos dados do hematócrito, concentração de Hb e RBC. O volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram calculadas da seguinte forma:

VCM (□m^3)= hematócrito (%) x RBC (milhões/mm^3)
HCM (pg)= Hb (g/dL) x 10/RBC (milhões/mm^3)
CHCM (%)= Hb (g/dL) x 100/hematócrito (%)

Após centrifugação do sangue total, o plasma foi separado e congelado a - 20°C para posterior análise de parâmetros fisiológicos.

3.8 PARÂMETROS DE ESTRESSE – GLICEMIA E CORTISOL

A concentração de glicose plasmática foi determinada pelo método da glicose oxidase (Kit Labtest 34), em espectrofotômetro em 505 nm. A concentração de proteínas totais foi determinada de acordo com método descrito por Lowry et al. (1951), utilizando-se uma curva de calibração com valores conhecidos de albumina bovina sérica (BSA).

Os níveis de cortisol plasmático foram determinados através de ensaio imunoenzimático utilizando-se kit comercial (AccuBind- Monobind Inc.). O

procedimento segue o princípio básico do imunoensaio enzimático, no qual há competição entre um antígeno não marcado e um antígeno marcado com enzima por um número fixo de sítios de ligação no anticorpo. A quantidade de antígeno marcado com enzima ligada ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da substância não marcada, que esta sendo analisada na amostra. O material não ligado é removido por decantação e lavagem das cavidades da microplaca. As dosagens do cortisol nas amostras de plasma foram realizadas com a utilização de leitora de microplaca em 450 nm e a utilização de uma leitura em 620 nm para minimizar imperfeições nos poços. Os resultados foram expressos em $ng.mL^{-1}$ de cortisol.

3.9 Enzimas Envolvidas na Osmorregulação

A atividade da Na^+/K^+-ATPase foi determinada em frações de homogeneizados das brânquias e rim pelo método descrito por Quabius et al. (1997) e adaptado para leitora de microplaca por Nolan (2000). Após a amostragem, os tecidos foram armazenados em ultrafreezer (- 70°C) imersos em tampão SEI (Sacarose 0,3 mM, Na_2EDTA 0,1 mM e Imidazol 30mM). As amostras foram homogeneizadas em tampão SEI contendo Triton (1:1000) e centrifugadas (15 min, 11730 x*g*, 4°C). O sobrenadante foi utilizado no ensaio, que se baseia na produção de Pi (fosfato inorgânico) a partir do ATP utilizado pela Na^+/K^+-ATPase. Todas as amostras foram incubadas em tampão contendo KCl (que estimula a enzima) e tampão contendo ouabaína (que inibe a enzima). Foi utilizado como padrão uma solução de fosfato 0,65 mM. A leitura foi realizada em 620 nm e atividade da enzima foi expressa em □M $Pi.mg.h^{-1}$. Seguindo-se o mesmo procedimento, foi utilizada uma amostra de rim de rato para a validação dos tampões de incubação devido a alta concentração da Na^+/K^+-ATPase.

A atividade da anidrase carbônica (AC) foi determinada segundo método estabelecido por Vitale *et al.* (1999). As amostras foram homogeneizadas com tampão específico (225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM de Tris-Base e 10 mM de NaH_2PO_4), centrifugadas (8 min, 11300 *g*, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado no ensaio.O método consiste na quantificação da atividade da AC pela diminuição do pH, utilizando-se água saturada com CO_2, medido durante 20 s. Uma reta de regressão linear do pH em função do tempo foi estabelecida, e a inclinação

desta reta corresponde à taxa de reação catalizada (TC). Para calcular a atividade da anidrase carbônica (AAC) utiliza-se a formula: AAC = [TC/TNC-1]/mg proteína total, onde TC é a taxa catalisada e TNC é a taxa não catalisada.

3.10 PARÂMETROS OSMO-IÔNICOS

As concentrações plasmáticas de Na^+ e o K^+ foram determinadas em plasma diluído 1:100 com o uso de um fotômetro de chama Analyser 900 utilizando-se uma curva padrão feita a partir de soluções estoque de NaCl (100 mM) e KCl (100 mM). A concentração do íon cloreto foi determinada por método colorimétrico, utilizando-se kit comercial (Labtest) em espectrofotômetro em 490 nm. A concentração de cálcio foi determinada por atomização por chama em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (Perkin Elmer Analist – 700), utilizando-se óxido de lantânio como modificador. As amostras de plasma foram diluídas 1:50 com óxido de lantânio e HCl (2,93 g de La_2O_3 diluído em 250 mL de HCl q.s.p. 500 mL água destilada). Foi realizada uma curva de calibração utilizando uma solução padrão de cálcio 1000 $mg.L^{-1}$ ($CaCL_2$ em 6,5% de HCl) (Titrisol®) em sete diferentes concentrações (0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25 $mg.L^{-1}$). O limite de detecção do aparelho para a dosagem de cálcio na chama é de 1,5 $\mu g.L^{-1}$.

A osmolaridade foi determinada em osmômetro baseado na depressão do ponto de congelamento (Osmomat 030) utilizando-se 50 □L de amostra de plasma.

3.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados obtidos para o grupo experimental e controle, em cada tempo de exposição, foram comparados por meio do teste paramétrico t de Student's ou do teste não paramétrico de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos dados (normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias). Foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$. Os resultados foram expressos pela média ± erro padrão da média.

4 RESULTADOS

Durante todo o período experimental os valores de temperatura, oxigênio dissolvido, condutividade, dureza e pH mantiveram-se constantes e não variaram significativamente entre o grupo experimental e controle. A tabela 1 apresenta as médias dos valores obtidos para os parâmetros analisados para os aquários controles e experimentais utilizados neste trabalho.

Tabela 1 - Parâmetros químicos e físicos da água analisados durante o período experimental (48 e 96 h).

Parâmetros	Controle	Experimental
pH	7,35 ± 0,11	7,10 ± 0,36
Condutividade (□S.cm^{-1})	114 ± 10,06	108,5 ± 6,96
Temperatura (◦C)	22,68 ± 0,29	22,68 ± 0,54
Oxigênio dissolvido (mgO_2.L^{-1})	7,03 ± 0,08	7,32 ± 0,06

Valores indicam média ± Erro padrão (n=6)

Os resultados das análises das amostras de água coletadas nos aquários experimentais e controles em relação às concentrações de cobre total e dissolvido, ao longo do período de exposição, estão apresentados na Tabela 2. A concentração de cobre dissolvido (□g.L^{-1}) diminuiu em relação à concentração nominal (20□g.L^{-1}) em 36% no final do período de 48 h, chegando a uma redução de 52% no final do período experimental de 96 h.

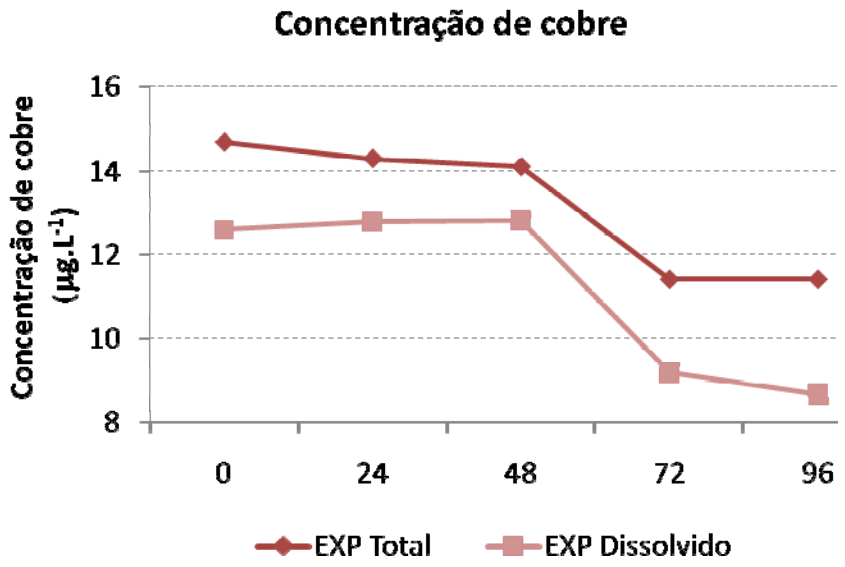
Tabela 2 - Concentração de cobre (μg. L^{-1}) total e dissolvido na água dos aquários dos grupos controle(CTR) e experimental (EXP), coletada no início (T0) e durante o experimento, após 24 (T24), 48 (T48), 72 (T72) e 96 h (T 96).

COBRE	**T0**	**T24**	**T48**	**T72**	**T96**
CTR total	ND	ND	ND	ND	ND
CTR dissolvido	ND	ND	ND	ND	ND
EXP total	14,68 ± 1,92	14,29 ± 2,42	14,09 ± 2,30	11,40 ± 0,34	11,44 ± 0,59
EXP dissolvido	12,59 ± 2,01	11,79 ± 2,15	11,81 ± 2,59	9,19 ± 1,80	8,66 ± 1,31

ND: Concentração de cobre não detectável. Dados expressos por media ± erro padrão (n=6)

No decorrer do período experimental, foi possível averiguar, através da coleta e análise de amostras de água contidas nos aquários experimentais, um decaimento contínuo nos níveis de cobre total e dissolvido presentes nos aquários, como mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Concentrações de cobre total e dissolvido nas amostras de água dos aquários experimentais no decorrer do experimento. As amostras foram coletadas a cada 24 horas e o resultado está expresso em □g.L^{-1} de cobre.



Utilizando-se o modelo do ligante biótico (BLM), com base nos dados dos parâmetros da água utilizada nos experimento (Tabela 3) e nas concentrações de cobre dissolvido (Fig. 11), foi calculada a concentração de cobre livre (Cu^{2+}) resultante igual a $3{,}18.10^{-9}$ mol.L^{-1}, para um valor cobre dissolvido de $3{,}15.\ 10^{-7}$ mol.L^{-1}.

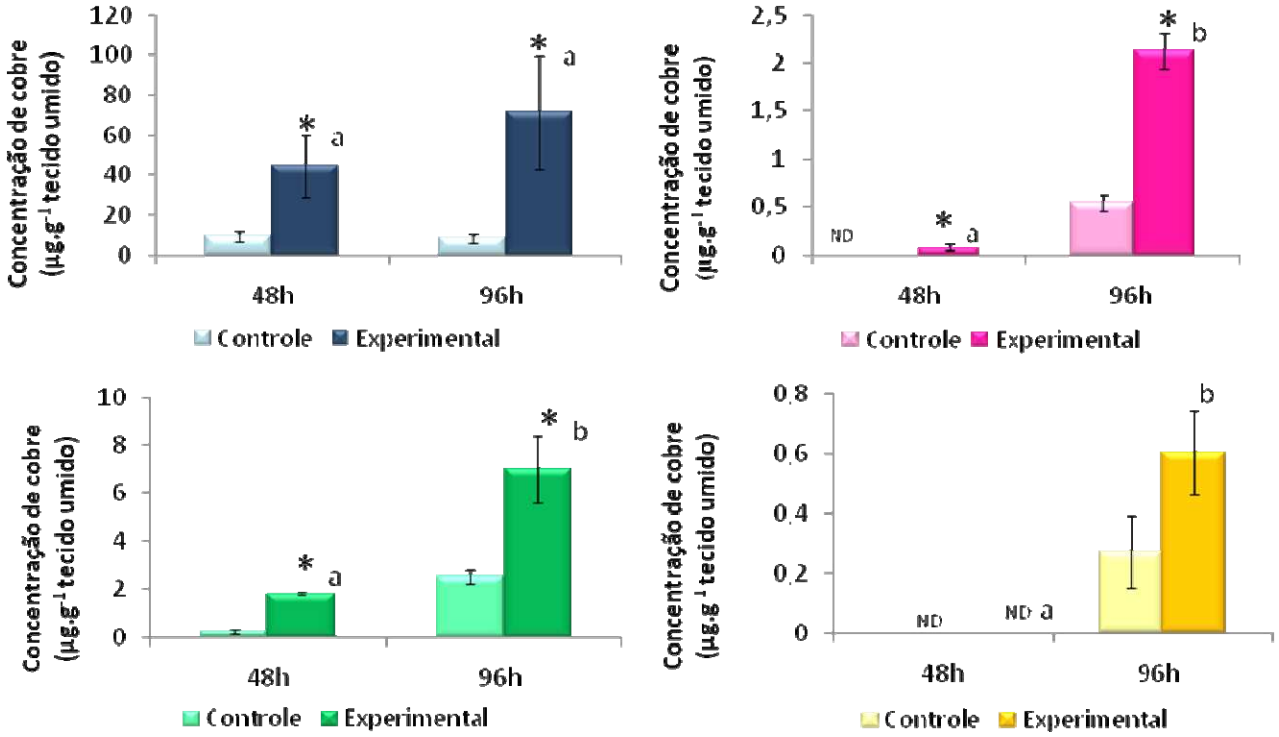
Tabela 3 - Parâmetros da água utilizada na especiação do cobre utilizando-se o modelo do ligante biótico (BLM)

Parâmetro	Média ± DP
pH	7,1 ± 0,36
Carbono orgânico dissolvido	1,35 ± 0,25 $mg.L^{-1}$
Alcalinidade	53 ± 4,24 mg/L de $CaCO_3$
Concentração de Na^+	49,00 ± 18,38 $mg.L^{-1}$
Concentração de K^+	0,2245 ± 0,01 $mg.L^{-1}$
Concentração de SO_4^{2-}	1,42 ± 0,02 $mg.L^{-1}$
Concentração de Ca^{2+}	0,80 ± 0,08 $mg.L^{-1}$
Concentração de Mg^{2+}	7,30 ± 2,40 $mg.L^{-1}$
Concentração de Cl^-	90,93 ± 7,96 $mg.L^{-1}$

4.1 Acúmulo de Metais nos Tecidos

A partir da análise das amostras dos tecidos hepático, branquial, renal e muscular foi verificado que em 96 h o acúmulo de cobre foi mais pronunciado que em 48 h. Os diferentes órgãos analisados acumularam o metal em proporções distintas; o fígado foi o órgão que acumulou as maiores quantidades de cobre (em média de 45 a 71 □g/g), seguido pelo rim (de 2 a 7 □g/g), brânquias (0,1 a 2 □g/g) e músculo (de 0 a 0,6 □g/g) (Fig. 12 A,B,C,D). Com exceção do tecido muscular, os demais tecidos analisados dos peixes expostos ao cobre, por 48 e 96 h, apresentaram aumento significativo no conteúdo de cobre em relação aos tecidos dos animais expostos apenas à água (Fig. 12 A, B, C). Com o aumento do tempo de exposição, as brânquias, o rim e o músculo apresentaram aumento significativo no acúmulo de cobre; no entanto, para o fígado este aumento, associado ao maior período de exposição, não foi significativo.

Figura 12 - Concentração de cobre (□g.g^{-1} tecido úmido) no A) fígado, B) brânquias, C) rim, D) músculo de*P. lineatus* expostos apenas à água (Controle) ou ao cobre, na concentração nominal de 20 µg.L^{-1} (Experimental), durante 48 e 96 h. Barras representam a média e as linhas verticais o EP (n=6-8). * indica diferença em relação ao respectivo controle e letras diferentes indicam diferença entre o grupo experimental de 48 h e 96 h (Teste t, P<0,05).

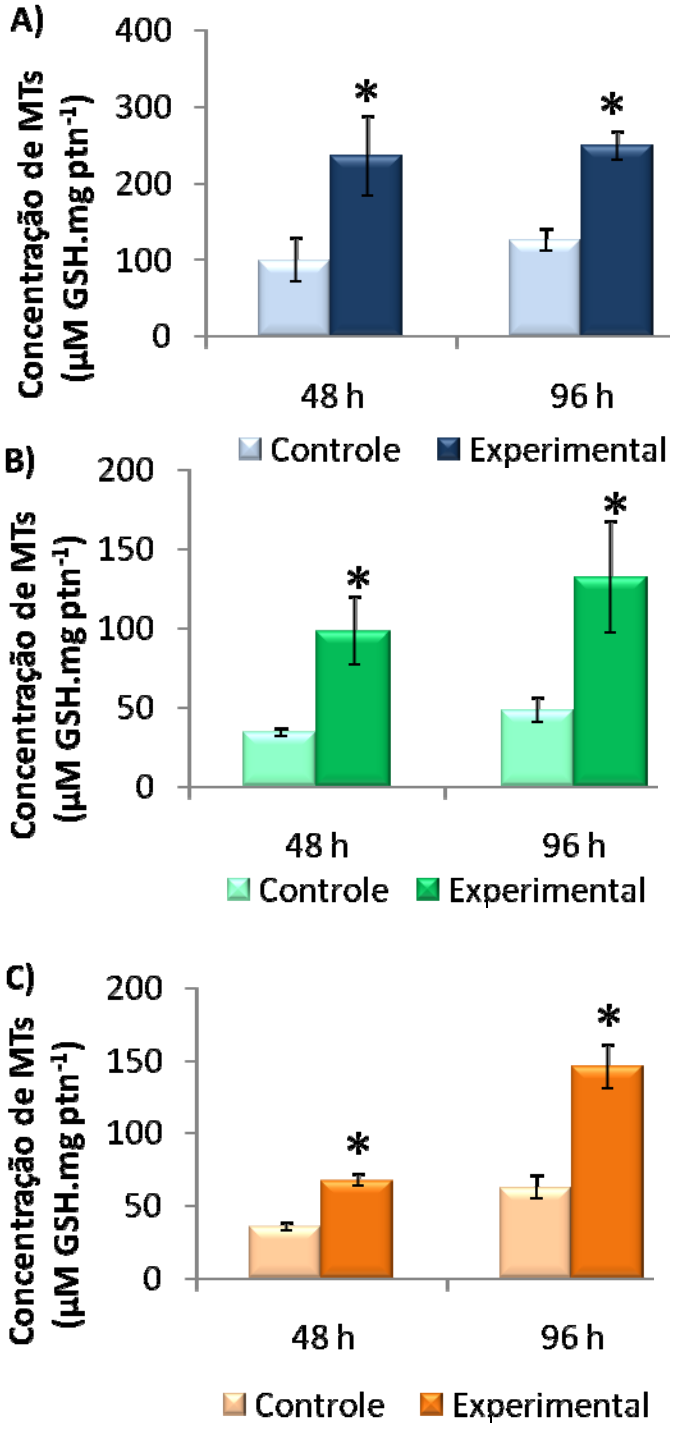


4.2 METALOTIONEÍNAS

A Figura 13 apresenta os valores de concentração de metalotioneína (MT) em fígado, brânquias e músculo de *P. lineatus* expostos ao cobre durante 48 e 96 h. Avaliando-se a concentração de metalotioneínas no fígado dos peixes foi verificado um aumento significativo de 137% após 48 h e de 97% após 96 h de exposição ao cobre, em relação aos respectivos controles (Fig. 13 A). A concentração de MT manteve-se em torno de 236 a 249 µM GSH.mg ptn^{-1} no fígado dos peixes expostos ao cobre e em torno de 100 a 126 µM GSH.mg ptn^{-1} no fígado dos peixes do grupo controle. No tecido branquial, esse aumento foi de 191% em 48 h e 175% em 96 h (Fig. 13 B). A concentração de metalotioneínas neste órgão variou de 98 (48 h) a 132 µM GSH. mg ptn^{-1} (96 h) nos animais experimentais e de 34 (48 h) a 48 µM SH.mg ptn^{-1} (96 h) nos peixes expostos somente a água. No músculo, o aumento da concentração de MTs muscular elevou-se com o tempo,

aumentando em 90% (após 48 h) e 133% (após 96 h) em relação ao grupo controle (Fig. 13 C). Devido ao tamanho reduzido do rim dos exemplares de *P. lineatus* amostrados neste trabalho, não foi possível a realização do ensaio para a determinação da concentração de MTs neste órgão.

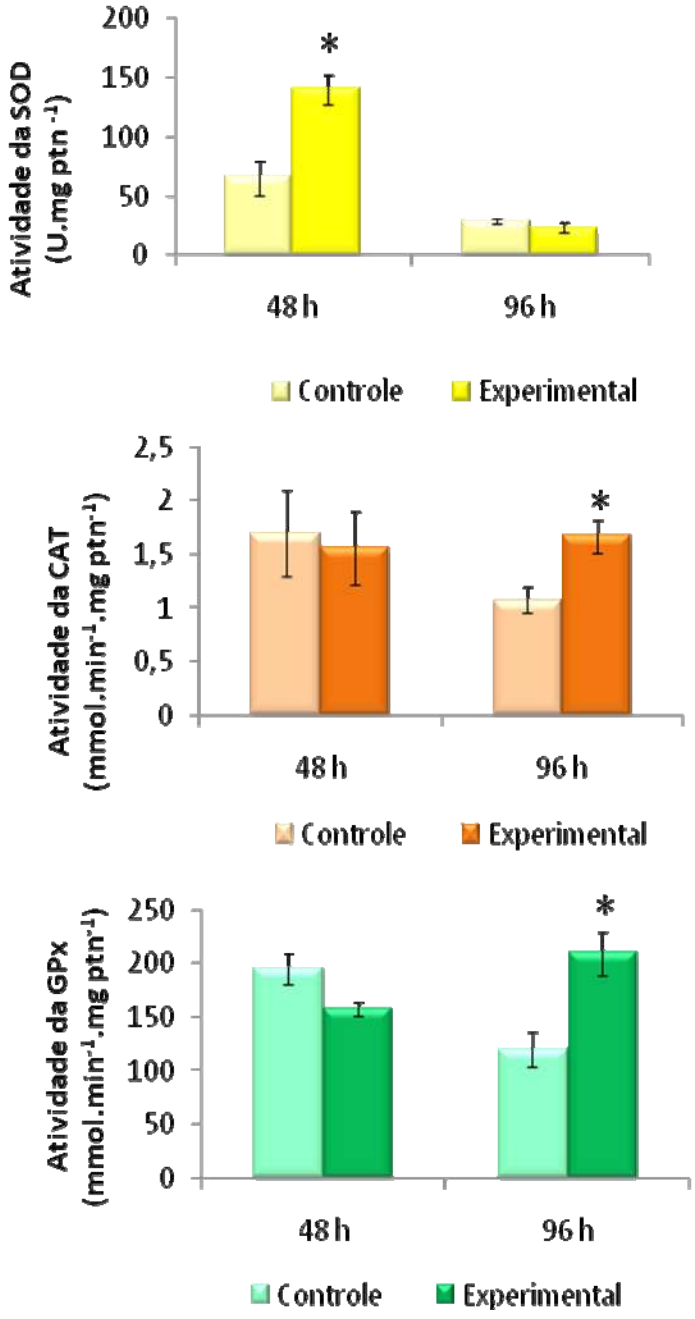
Figura 13 - Concentração de metalotioneínas em A) fígado, B) brânquias e C) músculo de *P. lineatus* expostos a uma concentração nominal de cobre de 20 ug.L^{-1} (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



4.3 PARÂMETROS OXIDATIVOS

Os parâmetros oxidativos avaliados na brânquia de *P. lineatus* expostos a 20 μg.L^{-1} de cobre em diferentes tempos experimentais (48 e 96 h) estão apresentados nas figuras 14 - 15.

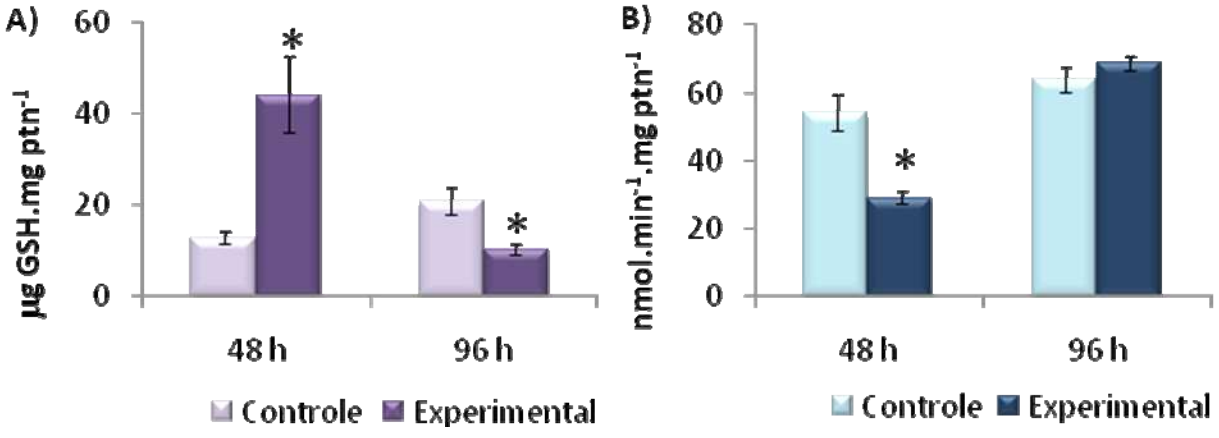
Figura 14 - Atividade branquial de enzimas antioxidantes primárias: A) superóxido dismutase (SOD), B) catalase (CAT) e C) glutationa peroxidase (GPx) de *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-7). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



As respostas do metabolismo oxidativos decorrentes da exposição ao cobre nos tempo de 48 h mostraram que, quando comparados ao controle, os peixes apresentaram valores semelhantes de CAT e GPx com aumento de 114% na atividade da enzima SOD. Após o período experimental de 96 h foi possível observar a intensificação das respostas antioxidantes primárias. A atividade da SOD mostrou-se inalterada (Fig. 14 A) e a atividade das enzimas CAT (Fig. 14 B) e GPx (Fig. 14 C) aumentaram cerca de 55% e 75 % respectivamente, relação ao controle.

Com relação ao conteúdo de glutationa reduzida e atividade da glutationa S- transferase, após exposição de *P. lineatus* ao cobre durante 48 h, a concentração branquial de glutationa reduzida mostrou-se aumentada em 339% (Fig. 15 A) acompanhada de diminuição em 46% da atividade da GST (Fig. 15 B), contudo após 96 horas, foi observada uma diminuição em 50% da concentração do antioxidante não enzimático GSH (Fig. 15 A), sem alterações na atividade da enzima de biotransformação GST (Fig.15 B).

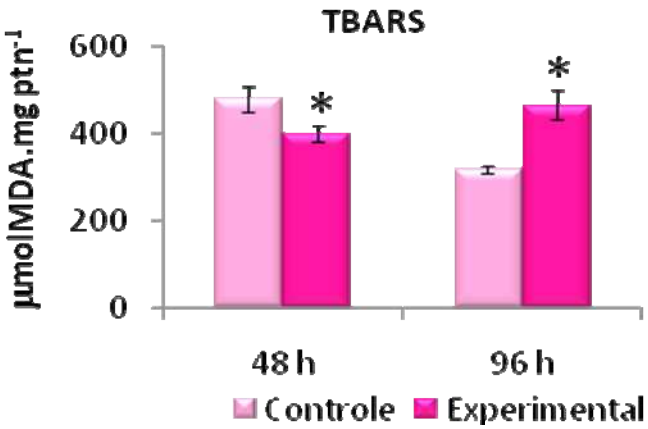
Figura 15 - Análise da concentração branquial de A) glutationa reduzida – GSH e B) atividade branquial da Glutationa S-transferase em *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-7). *Diferente do respectivo controle (GSH-Teste t, $p<0,05$; GST- Mann-Whitney, $p<0,05$).



Quando confrontado os dados fornecidos pelo ensaio TBARS realizado nas brânquias dos peixes dos grupos controle (água) e experimental (Cobre) foi identificada uma diminuição de 17% na concentração de MDA nos animais expostos por 48 horas ao cobre, porem, após 96 h foi identificado aumento

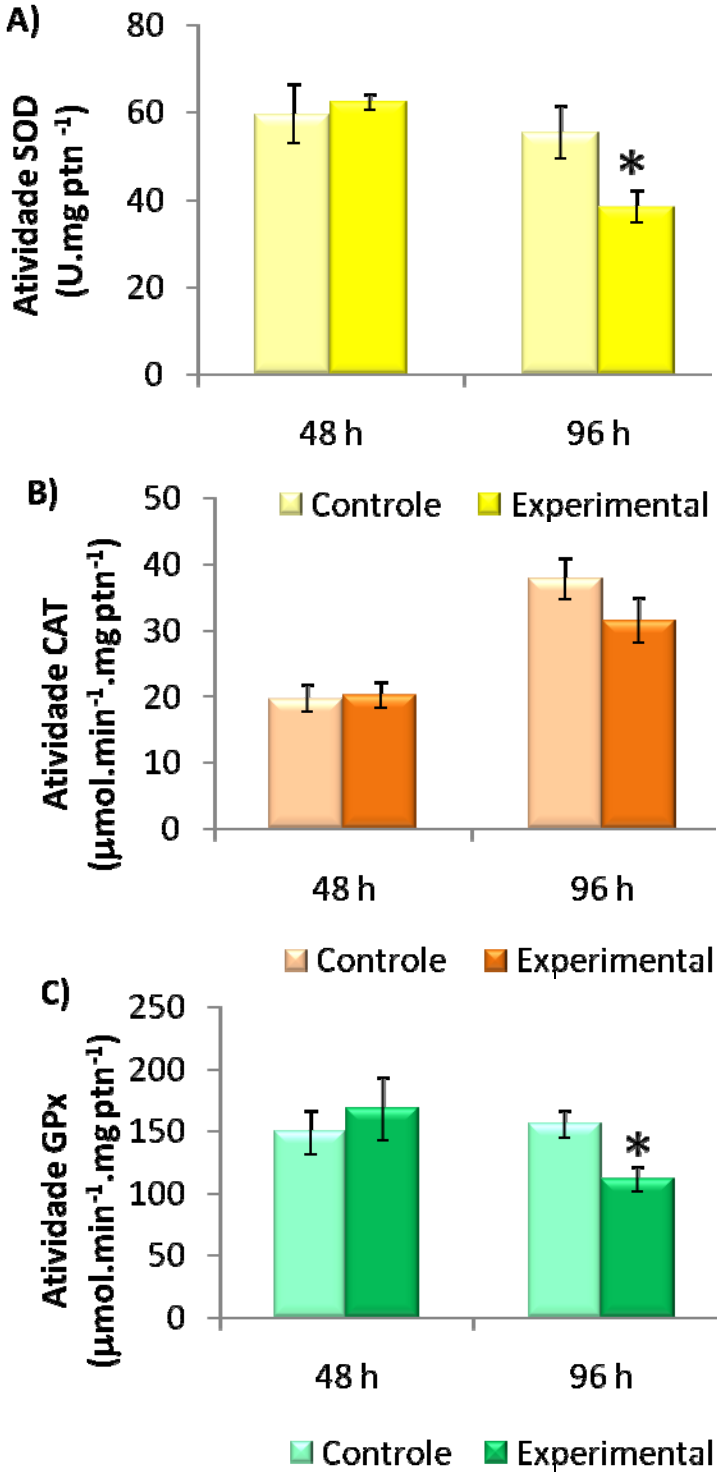
da peroxidação lipídica, devido ao aumento da concentração de aproximadamente 47% na concentração de MDA (Fig.16).

Figura 16 - Quantificação de MDA (indicador de peroxidação lipídica) em brânquias de *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



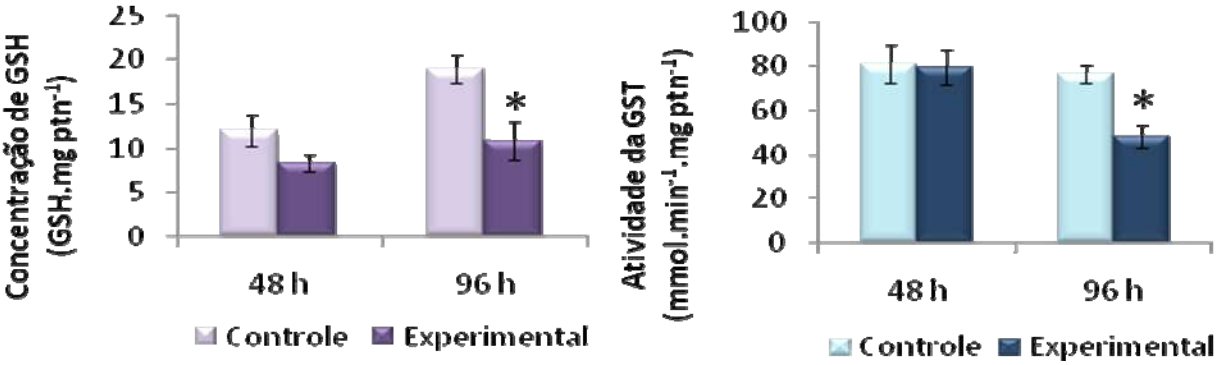
Nas amostras hepáticas foi constadado que a atividade das enzimas antioxidantes primárias (SOD, CAT e GPx) não foram alteradas em 48 h de exposição ao cobre (Fig. 16). Todavia, após 96 h de exposição *P. lineatus* ao metal foi verificada uma diminuição de 31% na atividade da SOD (Fig. 17 A) e de 29% na atividade da GPx (Fig.17 B).

Figura 17 - Atividade hepática das enzimas antioxidantes primárias: A) superóxido dismutase (SOD), B) catalase (CAT) e C) glutationa peroxidase (GPx) de *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle)durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



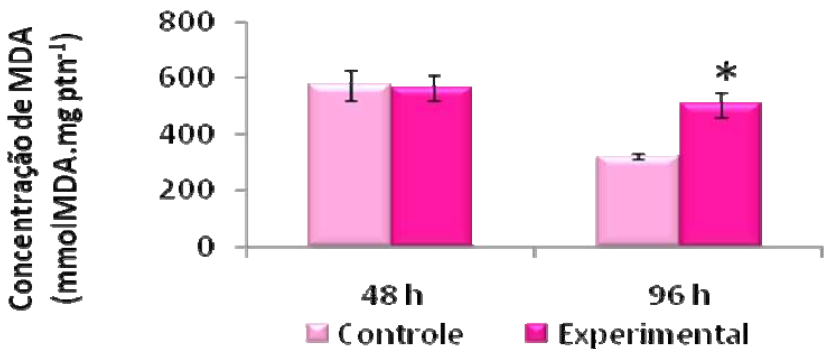
Avaliando a concentração do agente antioxidante não enzimático GSH e a atividade hepática da enzima de biotransformação GST, denotou-se que não foram observadas variações significativas nestes dois parâmetros após 48 h de exposição ao cobre. No entanto, foi observada uma redução da concentração do tripeptídeo GSH em 43% (Fig. 18 A), acompanhada de uma redução de 37% na atividade da GST (Fig. 18 B), quando comparado ao controle após 96h de exposição ao cobre.

Figura 18 - Análise da concentração hepática de A) glutationa reduzida – GSH e B) atividade hepática da enzima GST em *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



As alterações observadas nos mecanismos antioxidantes hepáticos em *P. lineatus* após 96 h de exposição ao cobre culminaram em aumento nos danos aos lipídios, representados pelo resultado do ensaio TBARS que apresentou um aumento de 56% na concentração de MDA (Fig.19). Após 48 h de exposição ao metal, não foram observadas alterações significativas (Fig. 19).

Figura 19 - Quantificação de MDA (indicador de peroxidação lipídica) em fígado de *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



4.4 GENOTOXICIDADE

Os resultados obtidos através do teste do cometa, em células sanguíneas de *P. lineatus* mostraram um aumento de 153% no escore de dano obtido nos peixes expostos por 48 h de ao cobre quando comparado ao controle. Esta resposta foi mantida após 96 h de exposição, apresentando um aumento de 185% escore de dano (Fig. 20).

Analisando a intensidade das lesões nos eritrócitos foi possível averiguar que após 48 h de exposição ao cobre, os eritrócitos apresentaram mais lesões de classe 1 e 2, apresentando um grande numero de eritrócitos classe 0. Após 96h, é possível verificar que o numero de lesões de classe 2 e 3 aumentou significativamente, consequentemente diminuindo a quantidade de eritrócitos classe 0 (Tabela 4)

Figura 20 - Escore de danos em eritrócitos P. lineatus expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 . As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).

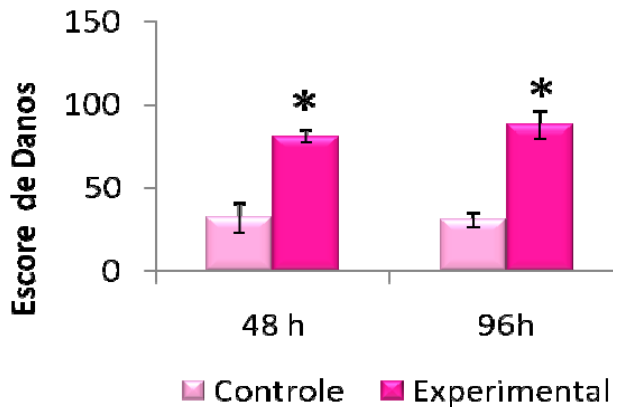


Tabela 4 - Total de nucleóides observados em eritrócitos de Prochilodus lineatus expostos ao cobre (20 □g.L^{-1} – EXP) ou mantidos em água sem adição de cobre (CTR) média ±E.P. de nucleóides danificados por animal para cada tempo experimental (48 e 96 h)

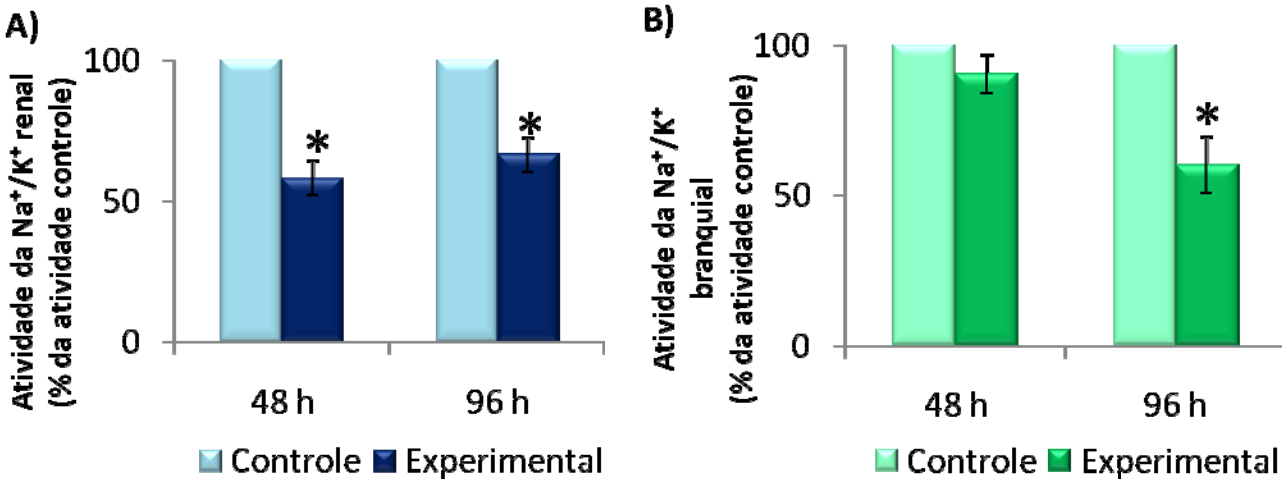
Teste do Cometa							
Tempo (h)	**Tratamento**	**n**	**0**	**1**	**2**	**3**	**média ± E.P.**
48	CTR	7	436	262	2	0	32 ± 9,05
	EXP	8	335	385	77	3	80,83 ± 3,34*
96	CTR	7	417	148	29	6	30,83 ± 4,63
	EXP	7	126	181	189	104	87,83 ± 8,58*

* Valores significativamente diferentes de seus respectivos controles (Teste t, p<0,05)

4.5 Atividade da Na+/K+ ATPase e Anidrase Carbônica

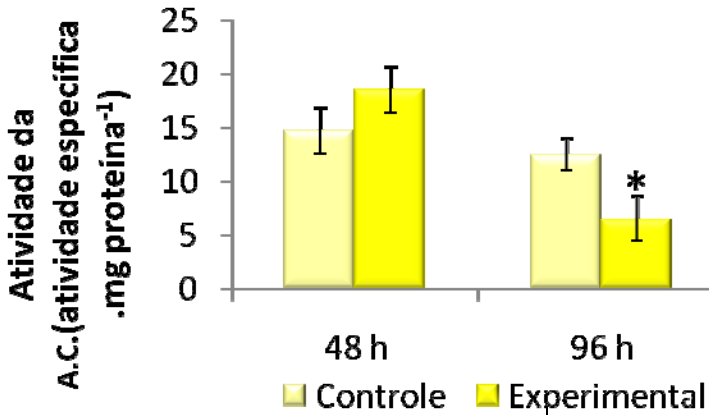
A Figura 23 apresenta os resultados de Na^+/K^+ATPase renal e branquial. Avaliando-se a atividade da Na^+/K^+ATPase renal (Fig. 21 A), a partir de 48 h observamos uma diminuição significativa em sua atividade em 42% quando comparada ao controle (0,76 ± 0,07 mM Pi.mg ptn^{-1} e 1,31± 0,03mM Pi.mg ptn^{-1}, experimental e controle respectivamente) e 33% em 96 h (1,41 ± 0,13 mM Pi.mg ptn^{-1} e 2,12± 0,28mM Pi.mg ptn^{-1}, experimental e controle respectivamente). Porém, uma redução significativa na atividade da Na^+/K^+ATPase branquial (Fig. 21 B) só foi obtida após 96h de exposição ao cobre (2,05 ± 0,32 mM Pi.mg ptn^{-1} e 3,41 ± 0,29mM Pi.mg ptn^{-1}, experimental e controle respectivamente).

Figura 21 - Atividade das enzimas relacionadas à osmorregulação - Na^+/K^+ATPase renal (A) e branquial (B) *P. lineatus* expostos a 20 $ug.L^{-1}$ de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 . As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



A atividade da enzima anidrase carbônica também foi avaliada em exemplares de curimba após exposição ao cobre em 48 h e 96 h. O tecido branquial foi o único utilizado para esta análise devido à escassez do tecido renal no animal alvo do estudo. Após 48 h de exposição, não foi observada nenhuma alteração na atividade da AC no tecido branquial de animais experimentais quando comparados ao controle, contudo após 96 horas foi obtida uma diminuição na atividade da enzima anidrase carbônica em 48% com relação ao respectivo controle (Fig.22).

Figura 22 - Atividade da enzima Anidrase carbônica em brânquias de *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



4.6 PARÂMETROS OSMO-IÔNICOS

A figura 23 apresenta os resultados referentes à concentração plasmática dos íons Na^+, K^+ (Fig. 23 A e B respectivamente). A figura 24 (A, B e C) refere-se aos resultados obtidos para os íons Ca^{2+}, Cl^- e osmolaridade. Em 48 h não foram observadas nenhuma alteração nas variáveis analisadas. Os peixes expostos ao cobre por 96 h apresentaram concentração de Na^+ plasmático reduzido em 12 % (Fig. 23 A), concentração de K^+ plasmático 22% acima do controle (Fig. 23 B) e valores de osmolaridade 9% abaixo do controle (Fig. 24 C), quando comparado ao controle não havendo variação nos demais íons mensurados.

Figura 23 - Concentração plasmática dos seguintes íons: A) sódio e B) Potássio em *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 h. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).

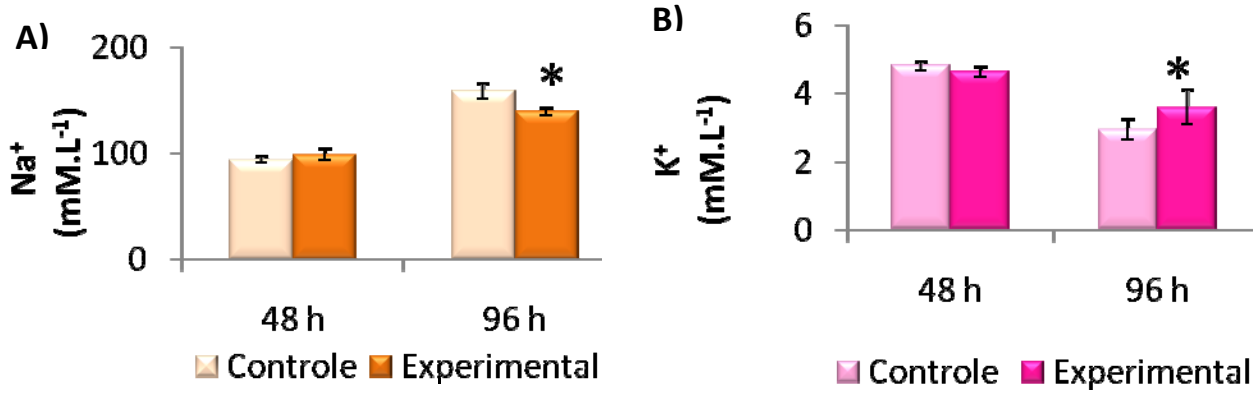
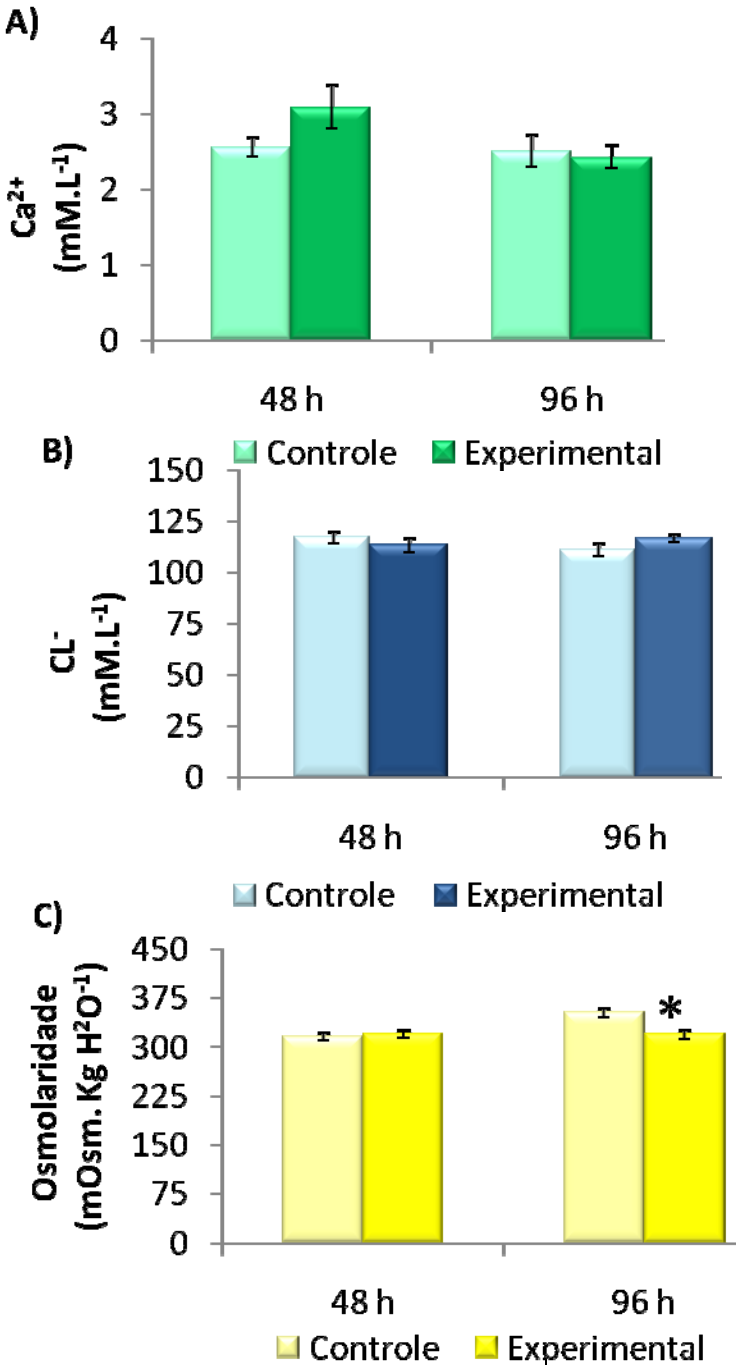


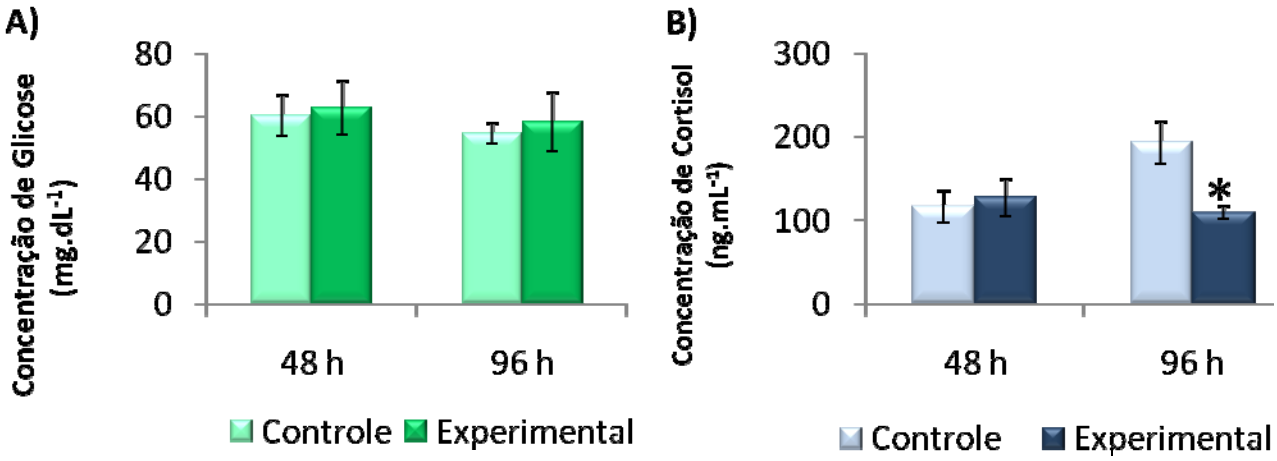
Figura 24 - Concentração plasmática dos seguintes íons : A) Cálcio; B) Cloreto e C) análise da osmolaridade em amostras em *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 . As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Cálcio: Mann-Whitney, $p<0,05$; Cloreto e osmolaridade: Teste t, $p<0,05$).



4.7 PARÂMETROS DE RESPOSTA DE ESTRESSE

A glicemia dos animais expostos ao metal não foi alterada em nenhum dos tempos experimentais (48 e 96 h). Em 96 h a glicemia normal foi acompanhada por uma diminuição nos níveis plasmáticos de cortisol de cerca de 57%. Em 48 h não foi verificado alterações nos níveis de cortisol plasmático quando comparados ao controle (Fig.25).

Figura 25 - Parâmetros de estresse – A) Glicose e B) cortisol obtidos através da análise de amostras de plasma obtidas de *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96 . As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).



4.8 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

A figura 26 apresenta os resultados dos parâmetros hematológicos analisados e a Tabela 4, os valores de CHCM, VCM e HCM. Em 48 h horas de exposição ao cobre somente o Hct e o CHCM apresentaram alterações, sendo estas, diminuição do Hct (em torno de 22%) e aumento do CHCM (em torno de 37%), em comparaçao ao controle. Após 96 horas não foram observadas mudanças em nenhum desses parâmetros em relação ao controle.

Figura 26 - Parâmetros sanguíneos para *P. lineatus* expostos a 20 ug.L^{-1} de cobre (Experimental) ou apenas à água (Controle) durante 48 e 96. A) Hematócrito, B) número de eritrócitos e C) concentração de hemoglobina. As barras representam a média e as linhas verticais o E.P. (n=6-8). *Diferente do respectivo controle (Teste t, p<0,05).

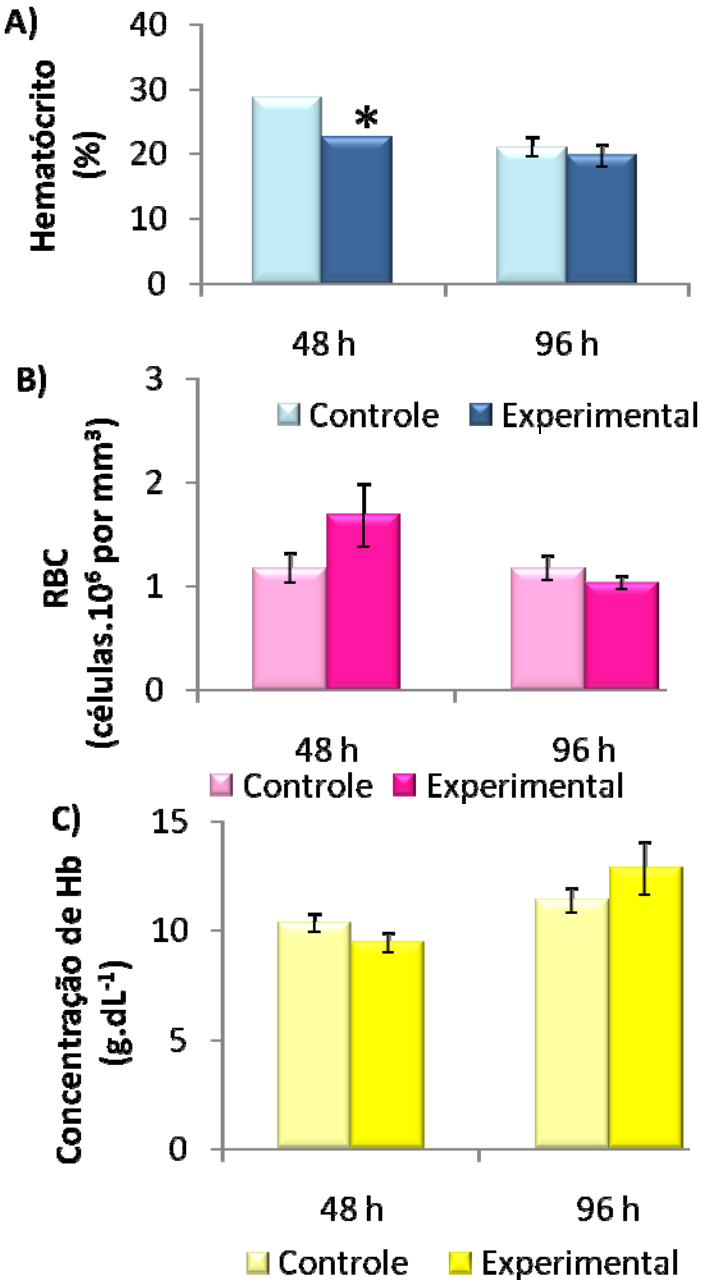


Tabela 5 - Índices hematimétricos em *Prochilodus lineatus* expostos ao cobre (20 ug.L^{-1} - EXP) ou mantidos em água sem adição de cobre (controle) por 48 e 96 h. VCM: Volume corpuscular médio; HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração de hemoglobina corpuscular média

	VCM	HCM	CHCM
48 h			
Controle	173,23 ± 42,11	58,82 ± 17,78	34,01 ± 2,23
Experimental	157,04 ± 40,96	60,43 ± 9,17	46,63 ± 2,49
96 h			
Controle	196,22 ± 26,61	106,25 ± 15,55	56,52 ± 5,95
Experimental	196,82 ± 22,53	125,91 ± 11,62	68,12 ± 8,88

Dados expressos em média E.P.* Valores significativamente diferentes de seus respectivos controles (Teste t, $p<0,05$)

5 DISCUSSÃO

De acordo com a legislação brasileira (CONAMA, 357), a quantidade de cobre dissolvido nas águas deve permanecer dentro de uma estreita faixa de concentração (9 a 13 $\mu g.L^{-1}$) a fim de proteger os organismos que dela dependem. Neste trabalho, os peixes foram expostos à uma concentração de cobre dissolvido dentro da estipulada pela resolução 357. Uma ampla gama de concentrações de cobre podem exercer aspectos tóxicos que variam de acordo com as propriedades físico-químicas da água, a especiação do metal e a tolerância de diversas espécies ao metal (SANTORE et al.,2001; MATSUO et al.,2005).

A análise das concentrações de cobre dissolvido obtidas nas amostras de água dos aquários utilizados, nos diferentes tempos experimentais, a partir do inicio tempo experimental (tempo 0) mostrou um decréscimo progressivo na concentração de cobre dissolvido. Em água naturais, a especiação do cobre pode ser influenciada por fenômenos físico-químicos, como a complexação por ligantes orgânicos e inorgânicos, a adsorção por oxi-hidróxidos metálicos e argilominerais e as reações de troca que ocorrem na interface água-sedimento. Sua interação com matéria orgânica dissolvida ou com o material particulado em suspensão pode levar à formação de espécies ditas não biodisponíveis do metal (SCHEFFER; SODRÉ; GRASSI, 2007). Acredita-se que com o decorrer do período experimental, a concentração de cobre dissolvido tenha sido influenciada por alguns desses fatores como a adsorção dos íons ao vidro do aquário, a interação com a matéria orgânica dissolvida bem como a interação entre o cobre dissolvido e o ligante biológico em questão, o peixe.

Em águas doces, o modelo do ligante biótico é um modelo matemático que prediz a toxicidade do cobre levando em consideração diversos parâmetros da água como dureza, concentração de matéria orgânica dissolvida, pH, temperatura, íons livres e sulfatos (PAQUIN et al. 2002). Diante da importância deste modelo na determinação da toxicidade do cobre, a água utilizada nos experimentos foi analisada. No presente trabalho, com base nas características da água utilizada estipuladas, foi verificado que do total de cobre dissolvido ($3,147.\ 10^{-7} mol.L^{-1}$) houve uma diferença de cerca de duas ordens na concentração referente ao íon cúprico ($3,181.10^{-9} mol.L^{-1}$), responsável pelos efeitos tóxicos do metal. Segundo Templeton e colaboradores (2000), considera-se como dissolvida toda espécie que é separada

de uma amostra de água natural por meio da filtração em uma membrana de 0,45 µm de porosidade, porém o termo mais apropriado para esta fração seria “filtrável”, uma vez que colóides também são contabilizados nesta fração (FLORENCE, 1982).

5.1 Acúmulo de Metais nos Tecidos

Peixes são capazes de absorver e reter metais dissolvidos a partir da água por transporte ativo ou passivo. Os efeitos tóxicos dos metais ocorrem após os mecanismos de excreção, armazenamento, metabolismo e processos de detoxificação não serem suficientes para contrapor as taxas de captação (AY *et al.* 1999). O padrão de acúmulo de cobre observado neste trabalho em tecidos de *P.lineatus* expostos a 20 □g.L^{-1}, de cobre já foi descritos, para várias espécies como a tilápia (*Oreochromis mossambicus*), a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e a carpa comum (*Cyprinus carpio*), expostos a diferentes concentrações de cobre e experimentos de exposição aguda (PELGROM et al. 1995; DE BOECK; VLAEMINCK; BLUST, 1997).

A presença de cobre nos tecidos analisados, em ambos os tempos experimentais, foi mais proeminente no fígado, seguido pelo rim e pelas brânquias. Devido sua grande área de contato com o meio externo e sua superfície delgada e permeável, as brânquias oferecem a principal via de absorção de cobre, seguida pela epiderme, em peixes dulcícolas. O metal acumulado nas brânquias está relacionado com a taxa de metal absorvida pela superfície da brânquia e a quantidade desse metal que é transferida continuamente à corrente sanguínea. O cobre presente na corrente sanguínea alcança o fígado onde é excretado através da bile. O fígado e o rim são órgãos importantes nos processos de detoxificação e excreção de poluentes. O excesso de metal pode estimular a produção de proteínas quelantes de metais, como as metalotioneínas, que são armazenadas nos hepatócitos, ou ainda, podem se ligar a □-globulina no fígado, produzindo ceruloplasmina. A ceruloplasmina é excretada através do rim. Quando a intensidade da exposição de cobre supera a capacidade hepática de detoxificação, o metal excedente retorna a corrente sanguínea podendo atingir outros órgãos (MAZON; FERNANDES, 1999). No músculo branco não foi verificado aumento da concentração de cobre nos animais experimentais em relação ao controle. Estudos sugerem que o acúmulo no músculo torna-se importante apenas quando a

capacidade máxima de armazenamento do fígado é atingida (DE BOECK; VLAEMINCK; BLUST, 1997).

Corroborando com os dados encontrados no presente trabalho, estudos realizados utilizando-se exemplares de *Oreochromis niloticus* expostos a diversas concentrações de cobre, apresentaram acúmulo do metal maior no tecido hepático, branquial e muscular respectivamente, tendo relação direta ao tempo de exposição (ÇOGUN; KARGIN, 2004).

5.2 METALOTIONEÍNA

Duas grandes adaptações podem ocorrem após exposição a metais afetando a biodisponibilidade desses às células, uma delas é um processo citoplasmático envolvendo a produção de proteínas específicas para a ligação dos metais (PEAKALL; BURGER, 2003). A indução de proteínas quelantes denominadas metalotioneínas (MTs), é uma das respostas bioquímicas mais estudas em diversas espécies, tais como moluscos peixes e crustáceos, sugerindo o potencial uso de concentrações de MTs em organismos como biomarcadores de exposição a metais (AMIARD et al., 2006). A MT apresenta diversas funções como controle homeostático de metais de transição e detoxificação de metais (CARVALHO; ARAUJO; FERNADES, 2004).

Neste trabalho, ao expor exemplares de curimba ao cobre por 48 horas, foram observados aumentos significativos nas concentrações de MTs nos tecidos branquiais, hepático e muscular. Após período experimental de 96 horas o aumento na concentração de MTs foi ainda mais pronunciado. Estes resultados estão de acordo com o que é descrito na literatura e corroboram com os dados obtidos neste estudo, relacionados com o acumulo de cobre. O aumento da MT nestes tecidos está relacionado ao seu papel protetor, mantendo a concentração de metais não livres baixa a fim de evitar alterações induzidas por esses metais (RYU; PARK; LEE, 2003), aumentando assim sua tolerância (LINDE et al. 2001). Além de diminuírem o potencial tóxico dos metais, as MTs podem atuar como reserva não tóxicas de metais para a síntese de metaloenzimas, proteger contra radiação ionizante e auxiliar na prevenção do estresse oxidativo. Os tecidos normalmente envolvidos com a absorção, estoque e excreção de metais apresentam alta capacidade de sintetizar MTs (AMIARD et al. 2006). Linde e colaboradores (2001)

observaram a indução da síntese de MTs por metais através da análise hepática de exemplares de truta marrom (Salmo trutta) coletados em pontos poluídos e não poluídos com metais (Cu, Cd, Zn, Pb e Hg), no Rio Ferrerias ao norte da Espanha. Já foi relatado que o cobre induz a expressão de metalotioneína em diversas espécies de peixes como tilápias, truta, cação (Scyliorhinus canicula), (DANG et al. 1999; OLSVIK et al. 2000; LINDE et al., 2001; ATLI; CANLI, 2008; DE BOECK et al. 2010). Um estudo realizado com a mesma espécie de peixe do presente trabalho Prochilodus scrofa expostos ao cobre a 30°C mostrou um aumento da concentração de MTs (CARVALHO; ARAUJO; FERNADES, 2004).

5.3 PARÂMETROS OXIDATIVOS

Devido sua habilidade de doar ou receber elétrons, modificando seu estado oxidativo, os metais são tóxicos principalmente por sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (ERO). Assim, a exposição a um único metal pode resultar em acúmulo do mesmo e conseqüente geração de danos oxidativos. Diferentes órgãos respondem de maneira especifica ao acúmulo de metais e suas respostas tem sido documentadas em diversos modelos in vivo (LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2008). Além de estimular o aumento da concentração de ERO nos órgãos alvos, os metais podem ainda diminuir a capacidade antioxidante das células. As enzimas antioxidantes contribuem para a manutenção de um nível relativamente baixo de radicais hidróxil gerados através da reação de Haber-Weiss utilizando o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio na presença de íons metálicos como o cobre (Cu^{2+}) e o ferro (Fe^{3+}) (ATLI et al. 2006). Em peixes existem relatos de que o cobre pode tanto estimular quanto inibir as enzimas antioxidantes, dependendo da concentração, da espécie e/ou da via de exposição (SANCHEZ et al., 2005).

A brânquia é o primeiro órgão a ser afetado após exposição a metais. Paradoxalmente, apresenta alta vulnerabilidade a compostos tóxicos devido sua ampla área de contato com o meio externo, facilitando a interação e absorção dos poluentes, contudo não apresenta um sistema de detoxificação tão robusto quanto o fígado (PANDEY et al., 2008). Avaliando as defesas antioxidantes de exemplares de P. lineatus expostos a 20 □g.L^{-1} de cobre por 48 horas, verificou-se que, comparado ao grupo controle, houve um aumento da atividade da superóxido

dismutase (SOD) e da concentração de glutationa reduzida (GSH). O aumento da atividade da SOD pelo cobre pode estar relacionado com a participação do cobre na constituição de uma isoforma da enzima (YIM; CHOCK; STADTMAN, 1993). Esse resultado corrobora com os resultados obtidos em diversos estudos com várias espécies de peixes. Pedrajas e colaboradores (1995) observaram, após injeção intraperitoneal de cobre, aumento da atividade da SOD em exemplares de Dourada (Sparus aurata). Após exposição do "stickleback", Gasterosteus aculeatus aculeatus, às concentrações de cobre de 0, 25, 100 e 200 □g.L^{-1}, Sanchez et al. (2005) observaram um rápido aumento na atividade da SOD. Diversos autores sugerem o papel do cobre como estimulante da síntese de SOD dentre eles, Cho e colaboradores (2006), que obtiveram um aumento do mRNA da SOD induzido por cobre em Oplegnathus fasciatus, e Kim et al. (2007) que mostraram um aumento do transcrito Cu-Zn SOD em brânquias de Haliotis discus discus após exposição a 10 □M de cobre. A síntese de GSH ocorre no fígado e atinge outros órgãos através de sua liberação na corrente sanguínea (ATLI; CANLI, 2008), aliado ao fato que o cobre absorvido do meio aquático pelas brânquias é transferido imediatamente ao fígado sugerem que os níveis de GSH aumentado no tecido branquial observados neste trabalho sejam uma resposta protetora hepática ao incremento de cobre no organismo uma vez que a GSH atua como quelante de metais evitando seus efeitos danosos às células.

Por outro lado, foi verificada diminuição da atividade da enzima glutationa S-transferase (GST), - este resultado pode estar relacionado com o fato de que seu substrato (GSH) está indisponível (ligado ao cobre) ou sendo oxidado por radicais livres, impossibilitando a atuação da GST. Além disso, Letelier e colaboradores (2006), em estudo realizado com frações citosólicas de fígados de ratos expostos a concentrações micromolares de cobre, observaram que o cobre pode interagir com resíduos de cisteína presentes na GST inibindo-a e /ou diminuindo sua afinidade a GSH. Ainda, em concordância com o aumento da atividade da SOD verificada, estudos mostram que o excesso de peróxido de hidrogênio pode inibir a atividade da GST (LETELIER et al., 2006).

Contrariando os resultados obtidos (aumento da SOD e da GSH) e os dados descritos pela literatura os quais mostram que o cobre é responsável por aumento das espécies reativas de oxigênio, obtivemos diminuição da peroxidação lipídica mensurada pelo ensaio TBARS. A diminuição da quantidade de MDA obtido

nos animais experimentais comparados ao controle sugere que as defesas antioxidantes e os antioxidantes não enzimáticos foram eficazes no combate aos possíveis danos causados pelo cobre, não resultando em danos estruturais.

Após 96 horas de exposição ao cobre, as respostas antioxidantes nas brânquias não foram suficientes resultando no estabelecimento do processo de estresse oxidativo. Foram observados aumento da atividade das enzimas antioxidante CAT e GPx, que pode estar relacionado ao aumento na atividade da SOD em 48 horas, gerando mais peróxido de hidrogênio nas células levando assim ao estimulo das enzimas responsáveis por sua metabolização e inibição da atividade enzima SOD (VALAVANIDIS et al., 2006). A SOD mostrou-se inalterada neste momento, porém se considerarmos que houve um aumento na síntese da enzima, estimulado pelo cobre, como descrito acima, a inibição pode ter ocorrido sem alterar significativamente sua atividade quando comparada ao respectivo controle. O aumento da atividade da CAT e GPx em resposta a exposição ao cobre já foram relatadas em diversos estudos. Atli e colaboradores (2006) demonstraram o efeito de diversos metais na CAT. A atividade da enzima CAT mostrou-se aumentada após 96 horas de exposição de exemplares trutas arco-íris (Oreochromis niloticus) a 25□g.L^{-1} de cobre. Sanchez et al. (2005) também observaram um aumento na atividade da CAT e GPx após exposição do “stickleback”, G. aculeatus aculeatus, às concentrações de cobre de 0, 25, 100, 200 □g.L^{-1}.

Com o aumento da atividade da GPx mostrou-se uma diminuição na concentração do antioxidante não-enzimático GSH sendo este utilizado para a metabolização do peróxido de hidrogênio. A GPx catalisa o metabolismo de um grande número de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e do H_20_2 para água, envolvendo a oxidação concomitante da GSH para sua forma oxidada (GSSG). O cobre colabora desta diminuição da concentração de GSH disponível ligando-se ao grupamento-SH de maneira espontânea e independente da atuação de qualquer enzima (HARRIS, 2000). A diminuição dos níveis de GSH nas brânquias de P. lineatus expostas a concentração de 20 □M Cu após o período de 96 horas pode estar relacionado ao uso da GSH na estabilização dos íons cobre impedindo a geração de radicais livres através de seu ciclo redox, além do uso pela GPx. Ahmad et al. (2005) observaram diminuição dos níveis de GSH no rim e brânquias de Anguilla anguilla expostas as concentrações de 1,0 e 2,5 □M Cu sustentando os danos encontrados no presente trabalho.

Apesar de todos os esforços realizados pelos animais a fim de manterem suas defesas antioxidantes capazes de lidar com o dano resultante do excesso de cobre, foi observado neste trabalho, após 96 horas, um aumento dos danos peroxidativos nas brânquias, representados por um aumento na concentração de malondialdeído. O excesso de cobre pode ter interagido com o H_2O_2 resultando em um aumento na concentração de radical hidroxil (reação de Fenton), principal responsável pela peroxidação lipídica (FLORENCE et al., 2002), indicando que o aumento observado na atividade das enzimas responsáveis pela detoxificação do peróxido de hidrogênio não foi suficiente para deter os danos causados pelo cobre. Vutukuru e colaboradores (2006) também observaram aumento na peroxidação lipídica em vísceras de Esomus danricus expostos a 5,5 $mg.L^{-1}$ de cobre após 24 e 96 horas.

O fígado é o principal órgão de detoxificação e excreção de poluentes nos organismos (MAZON; FERNANDES, 1999). Consequentemente, ele é altamente especializado e equipado com diversos mecanismos a fim de evitar maiores danos a suas células. No presente trabalho, após 48 horas de exposição de exemplares de P.lineatus a 20 □$g.L^{-1}$ de cobre não foram verificadas alterações significativas nos parâmetros bioquímicos referentes ao estresse oxidativo avaliados. Possivelmente, após este período, grande parte do cobre absorvido pelas brânquias e transferido via corrente sanguínea ao fígado foi seqüestrado- devido às altas concentrações de metalotioneína presentes neste órgão, e assim, o cobre pode ter sido usado no metabolismo ou excretado via bile, não causando nenhum dano às células. Todavia, após 96 horas de exposição, a capacidade de armazenamento e de remoção do cobre parecem ter sido ultrapassadas, resultando em prejuízos as células. Foi constatada inibição de grande parte das defesas antioxidantes da célula, culminando em dano peroxidativo. Foi observada diminuição da atividade da SOD aliada à diminuição da atividade da enzima GPx, diminuição da concentração do tripeptídeo GSH, diminuição da atividade da enzima GST, resultando no aumento de MDA.

A inibição da SOD já foi descrita em fígados de carpas após 48 h de exposição ao cobre por injeção intraperitoneal (VARANKA, et al., 2001) em resposta a um possível excesso na concentração de ânions superóxido. A diminuição da atividade da GPx está correlacionada com a diminuição de seu substrato GSH assim como a atividade da GST também está relacionada a esta diminuição. Resultados

semelhantes foram encontrados em “zebrafish” (Danio rerio) expostos a 40 e 140 □g.L^{-1} de $CuSO_4$ por duas semanas (PARIS-PALACIOS et al., 2000) e carpa comum exposta as concentrações nominais de 100 e 250 □g.L^{-1} após 96 h (DAUTREMEPUITS; BETOULLE; VERNET, 2002). A ocorrência de uma situação de lipoperoxidação indica a existência de radicais livres em excesso e é sabido que estes radicais podem inibir as defesas antioxidantes agravando a situação do organismo em questão. Uma diminuição consistente nos na atividade das enzimas antioxidantes foi observada no presente estudo, sugerindo um comprometimento nos mecanismos de defesas antioxidantes em resposta ao excesso de geração de espécies reativas de oxigênio (VUTUKURU et al., 2006).

Após a análise em ambos os órgãos foi possível perceber que a toxicidade do cobre aumenta significativamente com o aumento do período experimental. Além disso, foi possível verificar que os órgãos analisados possuem níveis de sensibilidade diferente ao cobre. As brânquias apresentam uma grande área superficial em contato direto com a água, sujeitas à ação direta de substâncias tóxica enquanto o fígado é o órgão central para detoxificação de poluentes, portanto mais preparado para lidar com a possível interação com estes compostos com intuito de diminuir sua ação danosa. No presente estudo, foi possível verificar essa maior sensibilidade nas brânquias, como foi observado nos animais do presente estudo, que após 48 h já apresentaram respostas branquiais ao poluente. Enquanto o fígado só apresentou alterações após 96 h de exposição ao cobre.

5.4 GENOTOXICIDADE

O cobre em excesso, pode aumentar a concentração de espécies reativas de oxigênio (ERO). No caso da molécula de DNA, as ERO podem alterar tanto a estrutura de dupla hélice do DNA quanto à estrutura das bases nitrogenadas, resultando em mutações e quebras das fitas de DNA (CERVANTES- CERVANTES et al., 2005). A fim de lidar com esses danos, existem vários mecanismos de reparo. Contudo, se o DNA não for reparado pode ocorrer a morte celular como por necrose e apoptose (SANDRINI et al. 2009). Além de seus efeitos indiretos, através da formação de espécies reativas de oxigênio, o cobre pode causar danos ao DNA ligando-se a ele e formando aductos (UEDA et al., 1998).

Poucos estudos existem sobre o papel do cobre na formação de danos ao DNA em diferentes espécies de peixes. Os resultados obtidos com *P. lineatus* após exposição ao cobre em um período experimental de 48 horas e de 96 horas mostraram que o cobre foi um fator determinante na indução de danos no DNA. Santos e colaboradores (2010) constataram, através do teste do cometa danos no DNA de eritrócitos de *G. aculeatus aculeatus* expostos a diferentes concentrações de cobre (3.2-128 µg de Cu/L por 4 dias), mesmo na menor concentração. Estudos anteriores realizados com células branquiais de truta arco-íris e com DNA de bacteriófagos λ mostraram associação entre o aumento de radicais livres causados pelo cobre e o aumento nos danos no DNA (CERVANTES-CERVANTES et al., 2004; BOPP; ABICHT; KNAUER, 2008).

Os resultados deste trabalho mostram claramente que o íon cobre pode se comportar como um agente genotóxico. Devido à capacidade do cobre em gerar espécies reativas de oxigênio evidenciado neste estudo, é sugerido que os danos no DNA tenham sido gerados por interferência direta do cobre, através da formação de aductos, ou de forma indireta, pelas ERO que segundo Labieniec e colaboradores (2009) através da redução do íon cuproso para o íon cúprico, o qual torna-se capaz de se ligar a sítios no DNA. A reação entre DNA-Cu^{+} e o H_2O_2 gera radicais hidroxil que podem ocasionar danos nas fitas de DNA.

5.5 Atividade das Enzimas Na^{+}/K^{+} ATPase e Anidrase Carbônica

O cobre é considerado um agente tóxico que altera as funções osmorregulatórias. Alvo dos metais, o grupamento sulfidril de proteínas (-SH) e de enzimas tende a ser oxidado pela ação de metais, afetando as pontes de hidrogênio e a conformação estrutural. Dependendo do local, estas interações têm o potencial de diminuir a atividade de enzimas (BROOKS; MILLS, 2003). Estudos sugerem que o Cu^{2+} livre pode se ligar covalentemente aos grupamentos-SH da enzima Na^{+}/K^{+} ATPase causando alterações conformacionais na proteína mesmo em animais expostos a uma concentração sub-letal de cobre por um período curto de tempo (WU et al., 2007), também interage com o íon Mg^{2+}, co-fator da atividade da enzima (LI et al., 1998).Em peixes dulcícola, estas alterações podem causar redução na concentração plasmática de sódio em consequência da redução no influxo de sódio e a inibição da atividade da enzima Na^{+}/K^{+}ATPase (BROOKS; MILLS, 2003). As

alterações na atividade desta enzima ocorrem antes de uma disfunção osmorregulatória mais proeminente, assim, a determinação da atividade da $Na^+/K+$ ATPase pode ser utilizada como um aviso precoce da contaminação por poluentes (AY et al., 1999).

No presente trabalho, a atividade da enzima Na^+/K^+ATPase em rim de P. lineatus mostrou-se inibida após 48 horas de exposição a 20 □g.L^{-1} de cobre (concentração nominal) e esta inibição manteve-se até 96 horas de exposição enquanto a brânquia só apresentou alteração significativa após 96 horas de exposição. Segundo Kuhnert e colaboradores (1976) a atividade renal da enzima Na^+/K^+ATPase em trutas arco-íris mostrou-se diminuída após 48 horas de exposição ao cromo, sem mostrar qualquer alteração com a atividade da enzima branquial. Assim como no presente trabalho, o rim mostrou-se mais susceptível a ação do metal do que as brânquias. Estudos sugerem que a alteração na atividade da Na^+/K^+ ATPase, frente à exposição a metais, está relacionada com o acúmulo do mesmo nos órgãos alvos (SANTORI et al., 2001) e foi verificado no presente trabalho que o acúmulo de cobre no rim foi mais pronunciado do que o acúmulo nas brânquias. Além disso, o rim é o principal órgão responsável pela excreção do cobre (GROSELL; HOGSTRAND; WOOD, 1998).

A inibição da atividade da Na^+/K^+ ATPase branquial pela exposição ao cobre também foi descrita em diversas espécies, como em tilápia mossâmbica, tilápia do Nilo e truta arco-íris (PELGRON et al., 1995; MONTEIRO et al., 2005; MCGEER et al., 2000). Estudos sugerem que quantidades significativas de metalotioneína podem estar relacionadas à proteção das enzimas e proteínas intracelulares, como, por exemplo, a Na^+/K^+ ATPase e a anidrase carbônica. As MT podem se ligar inicialmente ao cobre, impedindo a ligação do metal com os componentes intracelulares, atuando como uma barreira de proteção branquial (DANG et al., 1999). Entretanto, após 96 horas de exposição esse mecanismo protetor parece não ter sido suficiente para combater os danos da exposição ao cobre. Contribuindo para sua ação danosa, o cobre pode levar a alterações estruturais nas células cloreto. Como descrito por Mazon, Cerqueira e Fernandes (2002), exemplares de P. scrofa expostos a 20 □g.L^{-1} de cobre apresentaram diversos danos teciduais como hipertrofia e hiperplasia de células cloreto, fusão lamelar e hiperplasia dos filamentos branquiais podendo resultar em disfunção dos mecanismos osmorregulatórios.

A excreção de dióxido de carbono e a regulação do equilíbrio ácido-básico em peixes estão intimamente relacionadas através da reação reversível do CO_2 com a H_2O: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$. Essa reação é catalizada pela enzima anidrase carbônica (AC) (PERRY; GILMOUR, 2006). Metais são considerados fortes inibidores da atividade desta enzima. A união de metais com a A.C pode alterar sua função catalítica, levando a falhas de suas funções fisiológicas, e conseqüentemente alterando todo seu sistema metabólico específico (VITALE et al., 1999). A anidrase carbônica apresenta o metal zinco como parte integral da proteína, quando em contato com metais como o cobre, pode ocorrer um deslocamento do zinco por competição (BROOKS; MILLS, 2003).

No presente trabalho, foi observada uma inibição da atividade da enzima anidrase carbônica branquial após 96 horas de exposição ao cobre. Esse resultado está em concordância com a inibição verificada na Na^+/K^+ ATPase branquial. A brânquia, em associação com as proteínas íon específicas e com a AC, é considerada um importante local de compensação metabólica participando da regulação do pH fisiológico (GEORGALIS et al., 2006). A AC branquial tem um importante papel em peixes de água doce controlando a excreção ácida através das trocas de Cl^- e Na^+ por HCO_3^- e H^+, respectivamente. A excreção de CO_2 em trutas e em outros teleósteos dulcícolas depende exclusivamente da AC citosólica (GEORGALIS et al., 2006).

Segundo Sarraf e colaboradores (2005) o íon Cu^{2+} pode se ligar a três outros sítios na anidrase carbônica além do sítio principal, essas ligações podem resultar em mudanças estruturais menores, o que não causa o total desdobramento da enzima, mas, pode ser capaz de aumentar a propensão à agregação, resultando em uma redução da estabilidade e, consequentemente, uma diminuição paralela da atividade da enzima.

5.6 Parâmetros Osmo-Iônicos

Como mostrado anteriormente, o cobre é capaz de exercer efeitos deletérios em enzimas relacionadas com a homeostase iônica nos animais a ele expostos. Em peixes dulcícolas, as brânquias constituem o principal local de toxicidade dos metais, nesses órgãos eles inibem as enzimas de transporte de íons na membrana basolateral. Para exercer sua ação tóxica, o metal deve entrar na

brânquia pela região apical das células e há evidencias que a rota de entrada de metais nas brânquias está relacionada ao processo de tomada de cátions, o qual é perturbado por metais como o Pb, Cd, Zn, Ag e o próprio Cu (BURY; WOOD, 1999).

Neste trabalho, o período experimental de 48 horas não foi suficiente para a observação de alterações nas concentrações plasmáticas dos íons estudados. Todavia, após 96 horas de exposição ao cobre, foi observada redução na concentração do Na^+ e aumento do K^+ com conseqüente alteração na osmolaridade dos animais. Esses dados corroboram com dados da literatura para diversas espécies de peixes como para a tilápia do Nilo (MONTEIRO et al., 2005), a truta arco-iris (EVANS, 1987), a tilápia mossâmbica (PELGROM et al., 1995) e o próprio curimba (MAZON et al., 2002), após exposição ao cobre. Em peixes, o cobre parece estar relacionado com a diminuição da concentração de íons Na^+ e Cl^- no plasma. Diversos fatores podem culminar na variação dos íons plasmáticos. Como discutido anteriormente, a exposição ao cobre pode resultar em inibição de enzimas importantes na regulação iônica dos peixes dulcícolas. A inibição da Na^+/K^+ATPase tanto renal quanto branquial deve ter sido responsável pela diminuição do Na^+ plasmático e aumento do K^+ plasmático observados. No presente trabalho, a diminuição da atividade da Na^+/K^+ATPase renal pode ter reduzido a reabsorção de sódio da urina, ocasionando em excreção de uma urina mais concentrada. Isto aliado a diminuição da captação de sódio presente na água pelas brânquias devido a inibição da Na^+/K^+ATPase branquial, resultou em diminuição da concentração plasmática de sódio e consequentemente diminuição da osmolaridade. A inibição da anidrase carbônica, por sua vez, diminui a concentração de H^+, diminuindo a atividade do trocador Na^+-H^+, o que também pode estar relacionado com a diminuição do Na^+ plasmático. Além dos mecanismos analisados neste estudo, a diminuição do Na^+ plasmático pode estar relacionado com outras vias. Grosell e Wood (2002) utilizando truta arco-iris, identificaram dois caminhos através do qual o cobre pode ser absorvido: via sódio-dependente e via sódio-independente. A via sódio-dependente ocorre através do canal epitelial de sódio (ENaC). O cobre livre disponível na água, como cátion divalente (Cu^{+2}), é reduzido em contato com a brânquia (Cu^+) podendo ser absorvido através do ENaC diminuindo a absorção de Na^+ (BURY et al. 2003). A inibição da tomada de Na^+, também parece estar envolvida com a redução do trocador Na^+/NH_4^+ uma vez que a concentração de amônia plasmática encontra-se aumentada após tratamento com cobre (EVANS,

1987). Entretanto, mais estudos são necessários para a validação destas hipóteses no modelo experimental proposto por este trabalho.

Com relação ao cloreto e cálcio, não foram observada alterações significativas após exposição ao cobre. Esses resultados sugerem que a concentração de cobre utilizada e/ou o tempo de exposição não foram suficientes para ocasionar danos nos transportes desses íons. Sabe-se que uma vez que um efeito secundário da exposição a uma alta concentração de cobre é o deslocamento dos íons Ca^{2+} dos sítios aniônicos presentes nas junções ocludentes permitindo que os íons Cl^- e Na^+ se difundam através do epitélio branquial (EVANS, 1987).

Acompanhando a variação na concentração plasmática de Na^+ após 96 horas de exposição ao cobre, também foi observada uma diminuição na osmolaridade plasmática. Esses resultados estão em concordância com os resultados encontrados na literatura. Nussey e colaboradores (1995) observaram diminuição da osmolaridade após 96 h de exposição ao cobre na tilápia (O. mossambicus), Monteiro e colaborados (2005) também observaram o mesmo efeito em Oreochromis niloticus expostos ao cobre. Uma vez que o cobre interrompe o transporte iônico, há um aumento da permeabilidade do epitélio levando a um influxo de água e um efluxo de íons levando a uma diminuição da osmolaridade (MONTEIRO et al., 2005). Entretanto, no presente estudo a diminuição da osmolaridade está relacionada apenas a diminuição do sódio plasmática uma vez que a concentração de cloreto permaneceu inalterada.

5.7 Parâmetros de Resposta de Estresse

O contato entre os organismos e o ambiente aquático contaminado pode desencadear mudanças em diversos parâmetros metabólicos. O estresse é um mecanismo fisiológico compensatório em que o organismo apresenta respostas aos agentes estressores, podendo afetar parâmetros bioquímicos tanto no sangue como em outros tecidos (PICKERING; POTTINGER, 1995). Os níveis plasmáticos de glicose e cortisol podem se mostrar alterados depois da exposição a um xenobiótico (DE SMET; BLUST, 2001).

A exposição ao cobre pode resultar em mobilização do glicogênio hepático, aumentando a glicemia (HEATH, 1991). Estudos mostram que exposição a concentrações elevadas de cobre podem resultar em alterações na glicemia, como

evidenciado por Pelgrom e colaboradores (1995) após exposição de O. mossambicus a 50, 100 e 200 □g.L^{-1} de cobre, no qual somente a exposição ao valor mais elevado resultou hiperglicemia. Entretanto, no presente trabalho, os curimbas expostos ao cobre não apresentaram aumento nas concentrações plasmáticas de glicose em nenhum dos tempos experimentais. Trutas arco-íris após exposição de 16 □g.L^{-1} de cobre também não mostraram alterações na glicose plasmática, assim como Dicentrarchus labrax (ROCHE; BOGÉ, 1996) e P.scrofa expostos ao cobre (MAZON, 2000). Esses estudos sugerem que a concentração de cobre utilizada neste estudo não deve ter sido alta o suficiente para promover alterações na glicemia de P. lineatus.

Outro marcador clássico utilizado para a determinação de situações de estresse em peixes é o cortisol, comumente usado como indicador de estresse em peixes por apresentar rápida elevação em resposta a vários estressores (RAMESH et al., 2007). Diversos metais apresentam a capacidade de levar aumentar o cortisol plasmático como o chumbo (RAMESH; SARAVANAN; KAVITHA, 2009), o alumínio (PERRY; WOOD, 1985) e próprio cobre (WENDELAAR BONGA, 1997; RAMESH et al., 2007). Porém, no presente estudo não foram observada alterações nos níveis de cortisol plasmático após 48 horas de exposição ao cobre. Por outro lado, os animais experimentais quando comparados com o controle, após 96 horas de exposição ao cobre apresentaram redução significativa dos níveis de cortisol. Gagnon e colaboradores (2006) observaram que após exposição crônica ao cobre, os níveis basais de cortisol não foram alterados em trutas arco-íris, porém, quando desafiados a um estresse, os animais expostos ao Cu apresentaram inibição do aumento do cortisol esperado frente ao estressor, sugerindo que o Cu pode alterar a secreção de ACTH pela glândula pituitária, além de apresentar potencial adrenotóxico, inibindo a capacidade secretória. Além disso, estudos já mostraram que uma exposição crônica ao cobre pode levar a alterações sensoriais, inibindo o estimulo aferente de estresse, no hipotálamo, diminuindo assim a responsividade ao estresse levando a diminuição da síntese de cortisol (HANDY, 2003). Os resultados obtidos em 96 horas podem estar relacionados com os estudos acima. No momento da amostragem a liberação de cortisol gerada pelo estresse da captura pode ter sido atenuada pelos efeitos do cobre em alguns dos mecanismos liberadores de cortisol. A incapacidade de responder aos estressores torna o animal muito mais susceptível na manutenção de sua homeostase (HANDY, 2003). No presente trabalho, os

resultados sugerem que a alteração obtida nos níveis de cortisol pode estar relacionada com um aumento nos níveis do controle e não necessariamente com uma redução nos níveis plasmático de cortisol nos animais experimentais.

5.8 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

Alterações nos parâmetros hematológicos podem refletir respostas adaptativas e compensatórias de um organismo a um dado estímulo, sendo indicadores de estresse, do contato de substâncias tóxicas ou metais (TAKASUSUKI et al., 2004). Neste trabalho, a exposição os peixes expostos ao cobre durante 48 horas mostraram redução significativa do hematócrito acompanhada de uma tendência ao aumento do número de eritrócitos (RBC) e um aumento na concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM). Após 96 horas de exposição, não foi verificada nenhuma alteração nos parâmetros analisados. Corroborando os resultados encontrados, Tavares-Dias e colaboradores (2002) observaram diminuição do hematócrito em pacus (*Piaractus mesopotamicus)* expostos de 0,5 ou 1,0 $mg.L^{-1}$ de cobre no período de 24 horas. Nussey et al. (1995), após expor exemplares de tilápia mossâmbica por 96 h ao cobre (0,40 $mg.L^{-1}$), observaram um aumento no número de eritrócitos, sem nenhuma alteração nos demais parâmetros, indicando que nesta situação o cobre provavelmente estimulou a eritropoiese.

Segundo Cerqueira e Fernandes (2000) a exposição de P. scrofa a 20 □$g.L^{-1}$de cobre por 96 horas resultou em aumento no numero de eritrócitos, na concentração de hemoglobina e no hematócrito, esse aumento pode ser interpretado como uma mudança compensatória para aumentar a captação de oxigênio. A fim de compensar a presença de muco e/ ou a diminuição do número de eritrócitos, que levam a uma diminuição da capacidade de oxigenação, os peixes podem, durante a hipóxia, estimular a liberação de um grande número de hemácias, via estimulação beta adrenérgica em tecidos hematopoiéticos (WEPENER et al., 1992), levando a um aumento do número de células sanguíneas na corrente sanguínea, que consequentemente resulta em uma aumento da concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e/ou aumento na concentração de hemoglobina (Hb). Além disso, estudos sugerem que as células sanguíneas vermelhas podem se agregar nas brânquias danificadas, levando a uma redução no número de eritrócitos

circulantes em peixes estressados, o que associado a uma diminuída captação de oxigênio, pode ter sido suficiente para estimular a liberação de novas células sanguíneas (NUSSEY et al., 1995). No presente trabalho foi observada, após 48 h de exposição ao cobre, diminuição do HCT, associada a uma tendência no aumento do numero de eritrócitos e a presença de muco, sugerem um aumento no numero de eritrócitos imaturos (portanto de menor tamanho) na corrente sanguínea na tentativa de restabelecer a oxigenação adequada aos tecidos.

Contudo, os resultados obtidos após 96 horas indicam que, as alterações hematológicas mostraram-se transitórias, retornando aos níveis semelhantes ao do controle, sugerindo uma possível adaptação do animal a presença do cobre. Após 4 semanas de exposição a 0,4 $mg.L^{-1}$ de cobre, Nussey et al.(1995) também observaram restauração dos valores hematológicos em tilápias.

5.9 Integração de Resultados

A partir dos resultados obtidos foi possível observar que após 48 h de exposição de Prochilodus lineatus a 20 µg.L-1 cobre, os íons cobre, absorvidos pelas brânquias, foram em parte quelados pela MT ou GSH, e em parte transportados via corrente sanguínea até o fígado, rim e músculo. Além disso, o aumento na concentração intracelular de cobre possivelmente estimulou o aumento da atividade da SOD e/ou sua síntese. Os mecanismos osmorregulatórios, bem como as concentrações iônicas plasmáticas, não foram alteradas, provavelmente este resultado está relacionado à dinâmica de absorção cobre. O contato com o cobre no ambiente pode ter resultado em um aumento na liberação de muco, levando a uma situação de hipóxia, a qual pode ter estimulado uma contração esplênica adrenérgica, aumentando assim o numero de células sanguíneas de menor tamanho. Foi constatado que o cobre foi capaz de interagir (direta e;ou indiretamente) como as moléculas de DNA gerar alterações nos eritrócitos resultando em alterações. O fígado é o principal órgão de armazenamento e detoxificação dos íons cobre, e o aumento no aporte de íons metálicos estimulou os mecanismos protetores como o aumento da concentração de MT e o aumento da síntese e liberação de GSH, com o intuito de proteger as brânquias. Estas defesas foram aparentemente eficiente na detoxificação do cobre, pois não houve envolvimento de enzimas antioxidantes. Os resultados também sugeriram que o

excesso de cobre foi encaminhado ao rim para excreção, visto que foi possível verificar que este órgão foi o segundo maior local de acúmulo de cobre e apresentou alterações na atividade da Na+/K+ - ATPase em 48 h.

Porém, após um período mais prolongado de exposição (96 h), foi verificado um aumento no acúmulo de cobre e na concentração de MT, mas os mecanismos de defesa e adaptação mostraram-se prejudicados. Tanto as brânquias quanto o fígado apresentaram danos de membrana resultantes do processo de estresse oxidativo. Além disso, os mecanismos osmorregulatórios analisados em brânquias e rim foram alterados, levando a ocorrência de alterações nas concentrações plasmáticas dos íons Na+ e K+ e diminuição da osmolaridade. As alterações nos eritrócitos avaliados pelo ensaio do cometa mantiveram a diferença significativa comparada ao controle, contudo os demais parâmetros sanguíneos mantiveram-se estáveis.

Os presentes resultados sugerem que as consequências provenientes da exposição ao cobre foram se intensificando em razão do tempo, mostrando um esgotamento dos mecanismos dos quais os animais lançaram mão frente ao estimulo nocivo.

6 CONCLUSÕES

- As concentrações de cobre determinadas como limite para as águas doces, pela Resolução CONAMA 357, podem promover alterações bioquímicas e genotoxicidade, bem como e interferir na osmorregulação do peixe neotropical *Prochilodus lineatus* e, portanto, não são seguras para esta espécie;
- O acúmulo de cobre mostrou-se tecido-específico de acordo com a seguinte ordem: fígado > rim > brânquias > músculo branco;
- Devido às variações na concentração de metalotioneínas (MTs) em resposta ao cobre, as MTs podem ser consideradas como bons biomarcadores de exposição ao cobre, mostrando-se tempo e tecido dependentes.
- A concentração de cobre dissolvido variou de 9 a 13 $\mu g.L^{-1}$ induziu alterações em biomarcadores do estresse oxidativo, que se intensificaram com o aumento do tempo de exposição e foram tecido-específicas, sendo as brânquias mais sensíveis que o fígado;
- Os resultados obtidos indicaram genotoxicidade do cobre, o qual causou danos no DNA dos eritrócitos:
- O cobre causou alterações osmorregulatórias em *P. lineatus* e o rim mostrou-se mais sensível, possivelmente por ser o 2° maior local de acúmulo do metal;
- Os parâmetros de respostas de estresse (glicemia e cortisol) não foram susceptíveis à concentração de cobre utilizada;
- Os parâmetros hematológicos foram transitoriamente influenciados pela exposição ao cobre, que não foi longa ou intensa suficientemente para induzir danos mais proeminentes.

REFERÊNCIAS

ADAMS, S. M. Biological indicators of aquatic ecosystem stress: Introduction and overview. In: ADAMS, S. M. (Ed.). *Biological Indicators of aquatic ecosystem stress*. American Fisheries Society, Maryland, 2002. p.1-11.

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 JUNIOR, H. F. Peixes da Bacia do Alto Rio Paraná. In: LOWE-McCONNEL, R. H. (Ed.). *Estudos Ecológicos de comunidades de peixes tropicais.* São Paulo: EDUSP, 1999. p. 374-400.

AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A. E. A. M.; GOMES, L. C.; OKADA, E. K. Estratificación espacial y comportamiento de *Prochilodus scrofa* en distintas fases del ciclo de vida, en la planicie de inundación del alto río Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brasil. *Revue d'Hydrobiologie Tropicale,* v. *26,* p.79-90, 1993.

AHMAD, I.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A. *Anguilla anguilla L*. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without b-naphthoflavone pre-exposure. *Chemosphere*, v. 61, p. 267–275, 2005.

ALBA-TERCEDOR J. Macroinvertebrados acuáticos y calidad de las aguas de los ríos. *IV SIAGA, Almeria*, v. 2, p. 203-213, 1996.

ALLEN, H. E.; HANSEN, D. J. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. *Water Environmental Research*, v. 68, p. 42-52, 1996.

ALVES, A.; WOOD, C. M. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquatic Toxicology*, v. 78, p. 217–232, 2006.

AMADO, L. L.; DA ROSA, C. E.; MEIRELLES LEITE, A.; MORAES, L.; VAZ PIRES, W.; PINHO,G. L. L.; MARTINS, C. M. G.; ROBALDO, R. B.; NERY, L. E. M.; MONSERRAT, J. M.; BIANCHINI, A.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A. Biomarkers in croakers Micropogonias furnieri (Teleostei, Scianidae) from polluted and non-polluted areas from the Patos Lagoon estuary (Southern Brazil): evidences of genotoxicand immunological effects. *Marine Pollution Bulletin*, v. 52, p.199–206, 2006.

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 peroxyl radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of the totl enviroment*, 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.

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais.*Revista Brasileira de Epidemiologia*,v. 6, p. 1-13, 2003.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological Changes and Copper Accumulation in Liver and Gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 44, p. 62-72, 1999.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C.; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M. M.; EGLER, M. MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência e Saúde*, v. 12, p. 61-72, 2007.

ATLI, G.; ALPTEKIN, O.; TÜKEL, S.; CANLI, M. Response of catalase activity to Ag^{+}, Cd^{2+}, Cr^{6+}, Cu^{2+}AND Zn^{2+} in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 143, p. 218-224, 2006.

ATLI, G.; CANLI, M. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comparative Biochemestry and Phisiology Part C, v. 145, p. 282-287, 2007.

ATLI, G.; CANLI, M. (2008). Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures*. Environmental Toxicology and Pharmacology*, v.25, p.33–38

ATSDR (1990).Toxicological profile for copper, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

AY, O.; KALAY, M.; TAMER, L.; CANLI, M. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na,K-ATPase activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* v. 62, p. 160-168, 1999.

BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A.; TEIXEIRA-FILHO, A.REstratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimbatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. *Acta Scientiarum: Biological Sciences*, v. 26, n. 2, p. 169-174, 2008.

BARBOUR, M.T.; GERRITSEN, J.; SNYDER, B.D.; STRIBLING, J. BRapid Bioassessment Protocols for Use in Streams and Wadeable Rivers: Periphyton, Benthic Macroinvertebrates and Fish, 2 ed. EPA 841-B-99-002. *U.S. Environmental Protection Agency; Office of Water; Washington,* D.C.WASHINGTON*,* 1984.

BARRIONUEVO, W.R., FERNANDES, M.N. (1995). Critical thermal maxima and minima for curimbatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner) of two different sizes. *Aquaculture Research*, v.26, pp.447-450.

BELPAEME, K.; COOREMAN, K.; KIRSCH-VOLDERS, M. Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. Mutation Research, v. 415, p. 167-184,1998.

BERTOLETTI, J. J. Aspectos sistemáticos e biológicos da ictiofauna do rio Uruguai. *Veritas*, v. 30, p. 93-129, 1985.

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

BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. O comportamento do metilmercúrio no ambiente. *Química Nova*, v. 27, p. 593-600, 2004.

BOGDANOVA, A. Y.; VIRKKI, L. V.; GUSEV, G. P.; NIKINMAA, M. Copper effects on ion transport across lamprey erythrocyte membrane: Cl^-/OH^- exchange induced by cuprous ions. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 159, p. 204–213, 1999.

BOMBAIL, V.; AW, D.; GORDON, E.; BATTY, J. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (Pholis gunnellus) erythrocytes from the Firth of Forth, Scotland. *Chemosphere*, v. 44, p. 383-392, 2001.

BOPP, S. K.; ABICHT, H. K.; KNAUER,KCopper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. Aquatic Toxicology, v. 86, p. 197-204, 2008.

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

BUCHELI, T.B.; FENT, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Sciences and Technolology*. v. 25, pp. 201-268.

BURY, N. R.; WOOD, C. M. Mechanism of branchial apical silver uptake by rainbow trout is *via* the proton-coupled Na^+channel. *American Journal of Physiology*, v. 277, p.1385-1391,1999.

BURY, N. R.; WALKER, P. A.; GLOVER, C. N. Nutritive metal uptake in teleost fish, *Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 11-23, 2003.

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

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

CAMPBELL, P. G. C. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. In: TESSIER, A.; TURNER, D. R. (Ed.) *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*, John Wiley & Sons, 1995. p. 45–102.

CARVALHO, C. S.; ARAUJO, H. S. S.; FERNANDES, M. N. Hepatic metalothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4,5 and pH 8,0. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, v. 137, p. 225-234, 2004

CLAUSS, T. M.; DOVE, A. D. M.; ARNOLD, J. E. Hematologic disorders of fish.

Veterinary Clinics: Exotic Animal, v. 11, p. 445-462, 2008.

CHAKOUMAKOS, C.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V.Toxicity of copper to cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH, and hardness. *Environmental Science Technology*. v. 13, p. 213-219, 1979.

CHAPMAN, P. MIntegrating toxicology and ecology: putting the ‘‘eco’’ into ecotoxicology. *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p.7-15, 2002.

CHOVANEC, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Fish as bioindicators. In: MARKERT, B.A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G..*Bioindicators and Biomonitors*. Netherlands: Elsevier Science, 2003. p. 639-66.

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.

CERVANTES-CERVANTES, M.; CALDERÓIN-SALINAS, J.V.; ALBORES, A.; MUÑOZ-SÁNCHEZ, J. Copper increases the damage to DNA and proteins caused by reactive oxygen species. *Biological Trace Element Research*, v.103, p. 229-248, 2005.

CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade ambiental. São Paulo: CETESB, 2009. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br> Acesso em: dez. 2010.

CHO, Y. S.; CHOI, B. N.; KIM, K. H.; KIM, S. K.; KIM, D. S.; BANG, I. C. Differential expression of Cu/Zn superoxide dismutase mRNA during exposures to heavy metals in rockbream (Oplegnathus fasciatus) *Aquaculture*, v. 253**,** p. 667–679, 2006.

COGO, A. J. D.; SIQUEIRA, A. F.; RAMOS, A. C.; CRUZ, Z. M. A.; SILVA, A. G. Utilização de enzimas do estresse oxidativo como biomarcadoras de impactos ambientais. *Natureza on line*, v. 7, p. 37-42, 2009. Disponível em: <http://www.naturezaonline.com.br>. Acesso em: set. 2010.

ÇOGUN, H. Y.; KARGIN, FEffects of pH on the mortality and accumulation of copper in tissues of *Oreochromis niloticus*. *Chemosphere*, v. 55, p. 277-282, 2004.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. Ministério do Meio Ambiente. **Resolução 357-2005**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: dez. 2010.

COONEY, J. D. Freshwater tests. In: RAND, G. M. (Ed.) *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.* 2. ed. Taylor & Francis, 1995. p.71-102. (

COUSINS, R. J. Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiological Review*, v. 65, p. 238-309, 1985.

DAVIES, K. J. Oxidative stress, antioxidant defenses and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*. v. 50, p. 279–289, 2000.

DANG, Z.; LOCK, R.; FLIK, G.; WENDELAAR BONGA, S. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *American Journal of Physiology*, v. 277, p. 320–331, 1999.

DAUTREMEPUITS, C.; BETOULLE, S.; VERNET, G. Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio L.*) by *Ptychobothrium sp*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1573, p. 4-8, 2002.

DAUTREMEPUITS, C.; MARCOGLIESE, D.J.; GENDRON, A.D.; DAUTREMEPUITS, M. F. Gill and head kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St.Lawrence River, Canada. *Science of the Total Environment*, v. 407, p. 1055–1064, 2009.

DE BOECK, G.; VLAEMINCK, A.; BLUST, R. Effects of sublethal copper exposure on copper accumulation, growth, food consumption, energy stores and nucleic acid content in common carp. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 33, p. 415-422, 1997.

DE BOECK, G.; MEEUS, W.; COEN, W.D.; BLUST, R. Tissue-specific Cu bioaccumulation patterns and differences in sensitivity to waterborne Cu in three freshwater fish: rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), common carp (Cyprinus carpio), and gibel carp (Carassius auratus gibelio). *Aquatic Toxicology*, v. 70, p. 179–188, 2004.

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*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A*, v.155, pp.503–508.

DE SMET, H.; BLUST, R. Stress Responses and Changes in Protein Metabolism in Carp *Cyprinus carpio* during Cadmium Exposure. *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 48, p. 255-262, 2001.

DI TORO, D. M.; ALLEN, H. E.; BERGMAN, H. L.; MEYER, J. S.; PAQUIN, P.; SANTORE, R. C. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals.1.Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry,* v. 20, p. 2383–2396, 2001.

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

EISLER, R. Copper. In: EISLER, R. (ed.). *Eisler's encyclopedia of environmentally hazardous priority chemicals*. Elsevier, 2007. p 161-200.

ENGLISH, T. E.; STOREY, K. B. Freezing and anoxia stresses induce expression of metallothionein in the footmuscle and hepatopancreas of the marine gastropod *Littorina littorea*. *The Journal of Experimental Biology*, v. 206, p. 2517-2524, 2003.

EVANS, D. H. The Fish Gill: Site of Action and Model for Toxic Effects of Environmental Pollutants. *Environmental Health Perspectives*, v. 71, p. 47-58, 1987.

FABISIAK, J. P.; TYURIN, V. A.; TYURINA, Y. Y.; BORISENKO, G. G.; KOROTAEVA, A.; PITT, B. R.; LAZO, J. S.; KAGAN, V. E. Redox Regulation of Copper-Metallothionein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 363, p. 171-181, 1999.

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

FERRARI, J. E. C.; BARROS, M. M.; PEZATTO, L. E.; GONÇALVES, G. S.; HISANO, H.; KLEEMANN, G. K. Níveis de cobre em dietas para a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus. Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 26, n. 4, p. 429-436, 2004.

FLORENCE, T. M. The speciation of trace elements in waters. *Talanta*, v. 29, p. 345-364, 1982.

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

FOSTER, S. S.; CHILTON, P. J. Groundwater: the processes and global significance of aquifer degradation. *Philosophical transactions of the* Royal Society *of,* London. *Series* B*, Biological sciences*, v. 358, p.1957-1972, 2003.

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

GAETKE, L. M.; CHOW, C. K. Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients. Toxicology, v.189, pp. 147-163, 2003.

GAGNON, A.; JUMARIE, C.; HONTELA, A. Effects of Cu on plasma cortisol and cortisol secretion by adrenocortical cells of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *Aquatic Toxicology,* v.78, n. 1, p. 59-65, 2006.

GERACITANO, L. A.; BOCCHETTI, R.; MONSERRAT, J. M.; REGOLI, F.; BIANCHINI, AOxidative stress responses in two populations of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) after acute and chronic exposure to copper. Marine Environmental Research, v. 58, p.1–17, 2004.

GIGUÈRE, A.; COUILLARD, .Y; CAMPBELL, P. G. C.; PERCEVAL, O; HARE.L; PINEL-ALLOUL, B.; PELLERIN, J. Steady-state distribution of metals among metallothionein and other cytosolic ligands and links to cytotoxicity in bivalves living along a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, v. 64, p.185–200, 2003.

GOULART, M.; CALLISTO, M. Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental. *Revista da FAPAM*, ano 2, n. 1, 2003.

GOLDEMBERG, J.; BARBOSA, L. M. A legislação ambiental no Brasil e em São Paulo. *Revista Eco*, Ed.96, n. 21, v. 16, 2004.

GROSELL, M.; HOGSTRAND, C.; WOOD, C. M. Renal Cu and Na excretion and hepatic Cu metabolism in both Cu acclimated and non acclimated rainbow trout *(Oncorhyncus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, v. 40, p. 275-291, 1998.

GROSELL, M.; NIELSEN, C.; BIANCHINI, A. Sodium turnover rate determines sensitivity to acute copper and silver exposure in freshwater animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 133, p.287–303, 2002.

GROSELL, M.; WOOD, C. M. Copper uptake across rainbow trout gills: mechanisms of apical entry. *The Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 1179–1188, 2002.

GROSELL, M.; BLANCHARD, J.; BRIX, K. V.; GERDES, R. Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. *Aquatic Toxicology*, v. 84, p. 162-172, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. *Nova York: Oxford University Press,* v. 1, p. 851, 2007.

HANDY, R.D. Chronic effects of copper exposure versus endocrine toxicity: two sides of the same toxicological process? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A,* v. 135, p. 25–38, 2003.

HARRIS, E. D. Cellular copper transport and metabolism. *Annual Review of Nutrition*, v. 20, p. 291-310, 2000.

HEATH, A. G. Effect of water-borne copper on physiological responses of bluegill (*Lepomis macrochirus*) to acute hypoxic stress and subsequent recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 100, p. 559-564, 1991.

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., 2004. p. 319-368.

HERNÁNDEZ, P. P.; ALLENDE, M. LZebrafish (*Danio rerio*) as a model for studying the genetic basis of copper toxicity, deficiency, and metabolism. The, v. 88, p. 835-839, 2008.

HOPKINS, J.; TUDHOPE, G.R. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *Journal of Haematology*, v. 25, p. 563-575, 1973.

HOWARTH, R. S.; SPRAGUE, J. BCopper lethality to rainbow trout in waters of various hardness and pH. Water Researche. v. 12, p. 455-462, 1978.

HWANG, P. P.; LEE, T. H. New insights into fish ion regulation and mitochondria-rich cells, *Comparative Biochemistry. Physiology Part A*, v. 148, p. 479–497, 2007.

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.

KÄGI, J. H. R.; SCHÄFFER, A. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, v. 27, p. 8509-8515, 1988.

KAMUNDE, C.; GROSELL, M.; HIGGS, D.; WOOD, C. M. Copper metabolism in actively growing rainbow, trout (*Oncorhynchus mykiss*): interactions between dietary and waterborne copper uptake. *Journal of Experimental Biology*, v. 205, p. 279-290, 2002.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 20, p. 6183-6188, 1976.

KENNEDY, C. R. Richness and diversity of macroparasite communities in tropical eels *Anguilla reinhardtii* in Queensland, Australia. *Parasitology*, v. 111, p. 233-245, 1995.

KIM,K.Y.; LEE, S. Y.; CHO,Y. S.; BANG,I. C.; KIM,K. H.; KIM,D. S.; NAM,Y. K. Molecular characterization and mRNA expression during metal exposure and thermal stress of copper/zinc- and manganese-superoxide dismutases in disk abalone, Haliotis discus discus. *Fish & Shellfish Immunology*, v. 23, p.1043-1059, 2007.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖN, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research – DNA Repair, Amsterdam*, v. 363, p. 89-96, 1996.

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

KUHNERT, P. M.; KUHNERT, B. R.; STOKES, R. M. The effect of in vivo chromium exposure in Na^{+}/K^{+}- and Mg^{2+}-ATPase activity in several tissues of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 15, p. 383-390, 1976.

LABIENEC, M.; MILOWSKA, K.; BALCERCZYK, A.; RUCINSKA, A.; SADOWSKA, M.; JOKIEL. M.; BRICHON, G.; GABRYELAK, T. Interactions of free copper (II) ions alone or in complex with iron (III) ions with erythrocytes of marine fish *Dicentrarchus labrax*. *Cell Biology International*, v. 33, p. 941-948, 2009.

LANDIS, W .G.; YU, M. H. *Introduction to Environmental Toxicology: impacts of chemicals upon ecological system*. Lewis publishers, USA. 1995.

LAWS, A. E. Metals. In: LAWIS, A. E. E. D. *Aquatic pollution: an introdutory text*. 3. ed. University of hawaii.an interscience publishers,2000. p. 351-415.

LEÃO, J. C.; GERACITANO, L. A.; MONSERRAT, J. M.; AMADO, L. L.; YUNES, J. S.). Microcystin induced oxidative stress in *Laeonereis acuta* (polychaeta, nereididae). *Marine Environmental Research*, v. 66, p. 92–94,2008.

LI, J.; QUABIUS, E. S.; WENDELAAR-BONGA, S. E.; FLIK, G.; LOCK, R. A. C. Effects of waterborne copper on branchial chloride cells Na^{+}/K^{+}-ATPase activies in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquatic Toxicology*, v. 43, p. 1-11,

1998.

LIANG, Y.; CHEUNG, R. Y. H.; WONG, M. H. Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish: bioaccumulation of trace metals in fish. *Water Research*, v. 33, p. 2690-2700, 1999.

LINDE, A. R.; SANCHEZ-GALAN, S.; IZQUIERDO J. I.; ARRIBAS, P.; MARANON E. Brown trout as biomonitor of heavy metal pollution: Effect of age on the reliability of the assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 40, p. 120-125, 1998.

LINDE, A. R.; SÁNCHEZ-GALÁN, S.; VALLÉS-MOTA, J. P.; GARCIA-VÁZQUEZ, E. Metallothionein as bioindicator of freshwater pollution: european eel and brown trout. *Ecotoxicology And Environmental Safety*, v. 49, p. 60-73, 2001.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. EThe role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Resarch*, v. 674, p. 137-147, 2009.

LIU, C.; ZHOU, J.; LI, Q.; WNAG, L.; LIAO, Z.; XU, H. DNA damage by copper (II) complexes: coordination - structural dependence of reactivities. Journal of Biochemistry, v. 75, p. 233-240, 1999.

LLOYD, R. *Pollution and Freshwater Fish*. Fishing News Books. A Division of Blackwell Scientific Publications Limited, Great Britain. 1992. p.176.

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

MANSILLA-RIVERA, I.; NRIAGU, J. O. Copper complexation and toxicity to phytoplankton in the Huron River, a Lake Erie tributary. *Journal of Great Lakes Research*, v. 29, p. 105-115, 2003.

MARSHALL, W. S. Na^{+}, Cl^{-}, Ca^{2+} and Zn^{2+} Transport by Fish Gills: Retrospective Review and Prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, v. 293, p. 264–283, 2002.

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

MATSUO, A. Y O.; WOOD, C. M.; VAL, A. L. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquatic Toxicology*, v. 74, p. 351-364, 2005.

MAZON, A. F., FERNANDES, M. N.; NOLASCO, M. A.; SEVERI, W. Functional morphology of gills and respiratory area two active rheophilic fish species, *Plagioscion squamosissimus* and *Prochilodus scrofa*. *Journal of Fish Biology*, v. 52, p. 50-61, 1998.

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 differencial tissue accumulation of copper in the tropical freshwater fish, *Prochilodus scrofa* (Prochilodontidae).*Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,* v. 63, p. 797-804, 2001.

MAZON, A. F., MONTEIRO, E. A. S., PINHEIRO, G. H. D., FERNANDES, M. N. Hematological and physiological changes induced by short-term exposure to copper in freshwater fish, *Prochilodus scrofa*. *Brazilian Journal of Biology,* v. 63, p. 621–631, 2002.

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

MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: RANKIN, J. C.; JENSEN, F. B. (Ed.). *Fish ecophysiology*. London Chapman and Hall, 1993. p. 297-321.

MCGEER, J. C.; SZEBEDINSZKY, C.; MCDONALD, D. G.; WOOD, C. M. The role of dissolved organic carbon in moderating the bioavailability and toxicity of Cu to rainbow trout during chronic waterborne exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology -Part C:Toxicology and Pharmacology*, v.133, p.147-160, 2003.

MELA, M.; RANDI, M. A. F; VENTURA, D. F; CARVALHO, C. E. V; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropicalfish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 68, p. 426–435, 2007.

MEYBECK, M. Global analysis of river systems: from Earth system controls to Anthropocene syndromes. *Philosophical Transactions of the* Royal Society of London B*: Biological Sciences*, v. 358, p. 1935-1955, 2003.

MONSERRAT,J. M.; GERACITANO, L. A.; BIANCHINI, A. Current and future perspective using biomarkers to asses pollution in aquatic ecosystems. *Comments on Toxicology*, v. 9, p. 255-269, 2003.

MONSERRAT, J. M.; MARTÍNEZ, P. E.; GERACITANO, L. A.; AMADO, L. L.; MARTINS, C. M. G; PINHO, G. L. L.; CHAVES, I. S; FERREIRA-CARVO, M.; VENTURA-LIMA, J.; BIANCHINI, A. Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 146, p. 221-234, 2007.

MONTEIRO, S. M.; MANCERA, J. M.; FONTAÍNHAS-FERNANDES, A.; SOUSA, M. Copper induced alterations of biochemical parameters in the gill and plasma of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 141, p. 375–383, 2005.

MULLER, J. Chemistry: Metals line up to DNA. *Nature*, v. 444, p. 698, 2006.

NRIAGU, J.O.; PACYNA, J.M. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, v. 333, p. 134-139,1988.

NOLAN, D. T. Skin response of fish to stressors.Ph. D Thesis. Holland: Catholic University of Nijmegen, 2000.

NUNES, P. M. Q.; FOIZER, E. R.; GOMES, L. C.; CHIPPARI-GOMES, A. R. Avaliação da toxicidade do cobre para o piauçu (*Leporinus macrocephalus*, Garavello & Britski, 1988) por meio de parâmetros leucocitários e enzimáticos. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 32, p. 87-92, 2010.

NUSSEY, G.; VAN VUREN, J. H. J.; DU PREEZ, H.HEffect of copper on the haematology and osmoregulation of the Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae).*Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v. 111, n. 3, p. 369-380, 1995.

O'CONNOR, D. V.; FROMM, P. 0. The effect of methyl mercury on gill metabolism and blood parameters of rainbow trout. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 13, p. 406-411, 1975.

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.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*, v. 198, p. 259-267, 1992.

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.

PAGENKOPF, G. K. Gill surface interaction model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environmental Science Technology,* v. 17, p. 342–347, 1983.

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

PARIS-PALACIOS, S.; BIAGIANTI-RISBOURG, S.; VERNET, G. Biochemical and (ultra)structural hepatic perturbations of *Brachydanio rerio* (Teleostei, Cyprinidae) exposed to two sublethal concentrations of copper sulfate. *Aquatic Toxicology,* v. 50, p. 109-124, 2000.

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

PEDRAJAS, J. R.; PEINADO, J.; LOPEZ-BAREA, J. Oxidative stress in fish exposed

to model xenobiotics: oxidatively modified forms of Cu,Zn-superoxide dismutaseas potential biomarkers. *Chemico-Biological Interactions*, v. 98, p. 267–282, 1995.

PELGROM, S. M. G. J.; LOCK, R. A. C.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Integrated physiological response of tilapia, *Oreochromis mossambicus*, to sublethal copper exposure. *Aquatic Toxicology*, v. 32, p. 303-320, 1995.

PERRY, S. F.; GILMOUR, K. M. Acid–base balance and CO 2 excretion in fish: Unanswered questions and emerging models. *Respiratory Physiology & Neurobiology*, v. 154, p.199–215, 2006.

PICKERING, A. D.; POTTINGER, T. G. Biochemical effects of stress. Hochachka and Mommsen (Ed.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, v. 5, p. 349-378, 1995.

QUABIUS, E. S.; BALM, P. H. M.; WENDELAAR BONGA, S. E. Interrenal stress responsiveness of tilapia (Oreochromis mossambicus) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *General and Comparative Endocrinology,* v. 108, p. 472-482, (1997).

RAMESH, M.; SENTHIL KUMARAN, S.; KAVITH, C.; SARAVANAN, M.; MUSTAFA, A. Primary stress responses of common carp, *Cyprinus carpio,* exposed to copper toxicity. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, v. 37, p. 81–85, 2007.

RAMESH, M; SARAVANAN, M.; KAVITHA, C. Hormonal responses of the fish*, Cyprinus carpio*, to environmental lead exposure. *African Journal of Biotechnology*, v. 8, p. 4154-4158, 2009.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND,G. M. (Ed.). *Fundamentals of aquatic toxicology: Effects, environmental fate and risk assessment.* 2. ed. Taylor & Francis, 1995. p. 3-67.

ROBINSON, W. E.; RYAN, D. K.; SULLIVAN, P. A.; BOGGS, C. C. Cadmium transport in the blood plasma of two marine bivalves. *Environmental Toxicology Chemistry*, v. 16, p. 1195-1202, 1996.

ROCHE, H.; BOGÉ, G. Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, v. 41, p. 27-43, 1996.

ROESIJADI, G. Metallothionein and its role in toxic metal regulation. Comparative Biochemestry and Physiology Part C, v. 113, p. 117-123, 1996.

ROMEU-MORENO, A.; AGUILAR, A.; AROLA, L.; MAS, A. Respiratory toxicity of copper. *Environmental Health Perspectives,* v. 102, p. 339-340, 1994.

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

RYU, S. K.; PARK, J. S.; LEE, I. S. Purification and characterization of a copper-

binding protein from Asian periwinkle *Littorina brevicula*. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 134, p. 101–107, 2003.

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

SANCHEZ, W.; PALLUEL, O.; MEUNIER, L.; COQUERY, M.; PORCHER J.-M.; AIT-AISSA, S.). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels, *Environmental Toxicology and Pharmacology,* v. 19, p. 177–183, 2005.

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

SANTORE, R. C.; DI TORO, D. M.; PAQUIN, P. R.; ALLEN, H. E.; MEYER, J. S. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and daphnia. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, p. 2397–2402, 2001.

SANTOS, E. M.; BALL, J. S.; WILLIAMS, T. D.; WU, H.; ORTEGA, F.; AERLE, R. V.; KATSIADAKI, I.; FALCIANI, F.; VIANT, M. R.; CHIPMAN, J. K.; TYLER, C. R. Identifying Health Impacts of Exposure to Copper Using Transcriptomics and Metabolomics in a Fish Model. *Environmental Science and Technology*, v. 44, p. 820–826, 2010.

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

SARRAF, N. S.; MAMAGHANI-RAD, S,; KARBASSI, F.; SABOURY, A. A. Thermodynamic Studies on the Interaction of Copper Ions with Carbonic Anhydrase. *Bulletin of Korean Chemistry Society*, v. 26, p. 1051-1056, 2005.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant genes defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHEFFER, E. W. O.; SODRÉ, F. F.; GRASSI, M. T. Fatores que governam a especiação do cobre em ambientes aquáticos urbanos: evidências da contribuição de sulfetos solúveis. *Química Nova,* v. 30, p. 332-338, 2007.

SCOTTO, G.; CARVALHO, I. C. D. M.; GUIMARÃES, L. B. Desenvolvimento Sustentável. *Petrópolis: Vozes*, 2007. v. 1, p.107.

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

SINGH, O. V.; LABANA, S.; PANDEY, G.; BUDHIRAJA, R.; JAIN, R.K. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, p. 405–412, 2003.

STOHS, S.J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metals ions. Free *Radical Biology and Medicine*, v. 18, p. 321-336, 1995.

SVERLIJ, S. B.; ESPINACH ROS, A.; ORTI, G. Sinopsis de los datos biologicos y pesqueros del sabalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847). Roma: FAO, 1993. (Sinopsis sobre la Pesca, n. 145)

TAKASUSUKI, J.; ARAUJO, M. R. R.; FERNANDES, M. N. Effect of water pH on copper toxicity in the neotropical fish, Prochilodus scrofa (Prochilodontidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 72, p. 1075–1082, 2004.

TAO, S.; LONG, A.; LIU, C.; DAWSON, R. The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology Environmental Safety*, v. 47, p. 59-64, 2000.

TEMPLETON, D. M.; ARIESE, F.; CORNELIS, R.; DANIELSSON, L. G.; MUNTAU, H.; VAN LEEUWEN, H. P.; ŁOBIŃSKI, RGuidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. *Pure and Applied Chemistry,* v. 72, p. 1453-1470, 2000.

TESSIER, C.; BLAIS, J. S. Determination of Cadmium–Metallothioneins in Zebra Mussels Exposed to Subchronic Concentrations of Cd^{2+}. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 33, p. 246-252, 1996.

TONI, C.; MENEZES, C. C.; LORO, V.L.; CLASEN, B. E.; CATTANEO, R.; SANTI, A.; PRETTO, A.; ZANELLA, R.; LETEMPERGER, J. Oxidative stress biomarkers in *Cyprinus carpio* exposed to commercial herbicide bispyribac-sodium. *Journal of Applied Toxicology*, v. 30, p. 590–595, 2010.

TORT, L.; TORRES, P.; FLOS, R.Effects on dogfish haematology and liver composition after acute copper exposure. *Comparative Biochemistry Physiology Part C*, v.87, p. 349 353, 1987.

U.S. EPA. AQUATIC LIFE AMBIENT FRESHWATER QUALITY CRITERIA - COPPER. U.S. Environmental Protection Agency. *Federal Register 7440-50-8*, Feb., 2007.

UEDA, J.; TAKAI, M.; SHIMAZU, Y.; OZAWA, T. Reactive oxygen species generated from the reaction of copper(ii) complexes with biological reductants cause DNA strand scission. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.357, p. 231-239, 1998.

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. 178-18, 2006.

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

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N.P.E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 13, p. 57-149, 2003.

VANZELLA, T. P.; MARTINEZ, C. B. R.; CÓLUS, I. M. S. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research*, v.631, pp.36–43, 2007.

VARANASI, U.; MARKEY, D. Uptake and release of lead and cadmium in skin and mucus of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).*Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 60, p. 467- 478, 1978.

VARANKA, Z.; ROJIK, I.; VARANKA, I.; NEMCSÓK, J.; ÁBRAHÁM, M. Biochemical and morphological changes in carp (*Cyprinus carpio L*.) liver following exposure to copper sulfate and tannic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, v.128, pp.467-478, 2001.

VASCONCELOS, M. T. S. D; LEAL, M. F. C; VAN DEN BERG, C. M. G. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake, and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Marine Chemistry*, v. 77, p. 187-210, 2002.

VIARENGO, A.; CANESI, L. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture,* v.94, p. 368-375, 1991.

VIARENGO, A.; NOTT, J. A. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry Physiology Part C*, v. 104, p. 355-372, 1993.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: an application to Mediterranean and Antarctic molluscs. *Marine Environmental Research*, v. 44, p. 69-84, 1997.

VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CAVALETTO, M.; MARCHI, B.; PONZANO, E.; BLASCO, J. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytillus galloprovincialis*. *American Journal of Physiology*, v. 277, p. 1612-1619, 1999.

VITALE, A. M.; MONSERRAT, J. M.; CASTILHO, P.; RODRIGUEZ, E. M. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comparative Biochemistry Physiology Part C*, v.122, pp. 121–129, 1999.

VUTUKURU, S. S.; CHINTADA, S.; MADHAVI, K. R.; RAO, J. V.; ANJANEYULU, Y. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and *lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, Esomusdanricus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, v. 32, p. 221–229, 2006.

WASHINGTON, H. G. Diversity, biotic and similarity indices. A review with special relevance to aquatic ecosystems. *Water Research*, v. 18, p. 653-694, 1984.

WELLS, P. G.; DEPLEDGE, M. H.; BUTLER, J. N.; MANOCK, J. J.; KNAP, A. H.

Rapid toxicity assessment and biomonitoring of marine contaminants - exploiting the potential of rapid biomarker assays and microscale toxicity tests. *Marine Pollution Bulletin*, v. 42, p. 799-804, 2001.

WINSTON, G. W.; DIGIULIO, R. T. (1991). Prooxidant and Antioxidant Mechanisms in Aquatic Organisms. *Aquatic Toxicology*, v.19, pp.137-161.

WU, R. S. S.; LAU, T. C.; WEND, K. M.; FUNG.P. H.; KO, P. H.; KENNETH, M. Y. L. An 'artificial mussel' for monitoring heavy metals in marine environments. *Environmental Pollution*, v. 145, p. 104-110, 2007.

YIM, M. B.; CHOCK, P. B.; STADTMAN, E. R. Enzyme function of copper, zinc superoxide dismutase as a free radical generator. *Journal of Biology and Che*mestry, v. 268, p. 4099-4105, 1993.