



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

---

ALEXANDRE OLIVEIRA FERNANDES DA SILVA

**EXPOSIÇÃO AGUDA DO TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus*  
AO CÁDMIO:**

BIOACUMULAÇÃO, EFEITOS GENOTÓXICOS,  
BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS

ALEXANDRE OLIVEIRA FERNANDES DA SILVA

**EXPOSIÇÃO AGUDA DO TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus*  
AO CÁDMIO:  
BIOACUMULAÇÃO, EFEITOS GENOTÓXICOS,  
BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez

Londrina  
2013

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

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S586e Silva, Alexandre Oliveira Fernandes da.  
Exposição aguda do teleósteo *Prochilodus lineatus* ao cádmio : bioacumulação,  
efeitos genotóxicos, bioquímicos, fisiológicos e comportamentais / Alexandre  
Oliveira Fernandes da Silva. – Londrina, 2013.  
95 f. : il.

Orientador: Claudia Bueno dos Reis Martinez.  
Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências  
Fisiológicas, 2013.  
Inclui bibliografia.

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

CDU 612:597

ALEXANDRE OLIVEIRA FERNANDES DA SILVA

**EXPOSIÇÃO AGUDA DO TELEÓSTEO *Prochilodus lineatus* AO  
CÁDMIO: BIOACUMULAÇÃO, EFEITOS GENOTÓXICOS,  
BIOQUÍMICOS, FISIOLÓGICOS E COMPORTAMENTAIS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Cláudia Bueno dos Reis Martinez  
Universidade Estadual de Londrina  
UEL – Londrina – PR

---

Profa. Dra. Helenir Medri de Souza  
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes  
UFSCar – São Paulo - SP

---

Profa. Dra. Marta Marques de Souza  
FURG – Rio Grande - RS

---

Profa. Dra. Renata Guimarães Moreira  
USP – São Paulo - SP

Londrina, 02 de setembro de 2013.

## AGRADECIMENTOS

À Professora **Cláudia**, pela orientação e pelo apoio ao longo do curso. Gostaria de expressar minha gratidão por todas as oportunidades que me foram confiadas e pelos ótimos momentos de convivência, dentro e fora do laboratório. Foi um prazer receber seus ensinamentos nos últimos doze anos. Por muito tempo guardarei estes momentos de vida que se confundem com minha formação pessoal.

**Aos meus pais**, que acompanham nesta etapa, como acompanharam todas, com muita atenção e carinho. Obrigado por me acompanhar em todos os passos que dou, por me guiar e proporcionar segurança e amor em qualquer ocasião.

À **Lú**, muito obrigado, minha companheira, por me amar diariamente e pela felicidade da nossa rotina. Obrigado por enfrentar de maneira tão suave os momentos mais conturbados e assim tornar minha vida mais fácil. Obrigado pelas inúmeras formas de colaboração a este trabalho.

**Aos meus irmãos**, pela camaradagem e parceria de todos os tempos, pelas aventuras que ainda viveremos.

Obrigado a todos que frequentaram o LEFA nestes últimos quatro anos: em especial aos que ajudaram, nas amostragens, análises, cursos, e participaram de congressos e das nossas deliciosas festas. Obrigado Cássia, Déia, Lu, Dalita, Ju, Lindalva, Kelly, Débora, Fernanda, Carlos, Bruna, Angélica, Carol e Natara, Nadjha, Natália, Cyrene e Francine, Thiago, Rafaela, sem vocês este trabalho não seria possível.

**Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** pela oportunidade e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

À **Daniela Grosso Borin**, secretária do PMPGCF na UEL, obrigada pelos serviços prestados com eficiência, prontidão e gentileza.

Às **professoras do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas** pelas aulas e reuniões, momentos de vivência que apreciei com grande admiração.

À Banca Examinadora, **Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, Profa. Dra. Renata Moreira Guimarães, Profa. Dra. Helenir Medri de Souza Profa. E Dra. Marta Marques de Souza** por terem aceitado o convite e pela contribuição ao trabalho.

À **Marta**, que além de professora e primeira orientadora sempre serviu como exemplo de pessoa. Pelas conversas prazerosas desenroladas na presença de seu humor admirável e ponto de vista único. Sua presença e colaboração no encerramento deste ciclo ameniza sua ausência no cotidiano do LEFA.

**Ao Professor Dr. Paulo C. Meletti**, por todas as ajudas e soluções encontradas nas mais diversas situações. Muito obrigado por possibilitar os experimentos comportamentais e pelo amparo na descrição e entendimento dos métodos e resultados.

**Ao Wagner E. Risso**, pelo apoio técnico e pelos bons momentos de conversa de balcão

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

À **CNPq e INCT-TA**, pela concessão de bolsa e apoio financeiro.

SILVA, Alexandre Oliveira Fernandes da. **Exposição teleósteo *Prochilodus lineatus* ao cádmio: bioacumulação, efeitos genotóxicos, bioquímicos, fisiológicos e comportamentais.** 2013. 95f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## RESUMO

O cádmio (Cd) é um metal traço não essencial aos animais e muito tóxico aos peixes, é um contaminante frequentemente encontrado nas águas interiores devido a atividades antropogênicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a bioacumulação e os efeitos do Cd para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus*. Para tanto, peixes jovens foram expostos, durante 24 e 96 h, a duas concentrações de Cd, 1 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , que correspondem às concentrações máximas de Cd permitidas pela legislação brasileira (CONAMA, Resolução 357/2005). Os efeitos do Cd foram avaliados por meio da análise dos íons e osmolalidade plasmática, da atividade de enzimas relacionadas à osmorregulação, das defesas antioxidantes, da ocorrência de estresse oxidativo e danos genotóxicos, do conteúdo de proteínas semelhantes a metalotioneínas (PSMT), da atividade da acetilcolinesterase (AChE) e de alterações comportamentais. Os peixes expostos ao Cd apresentaram diminuição na atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase e anidrase carbônica em brânquia e rim. A atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase branquial também apresentou diminuição, enquanto houve elevação da atividade da  $\text{H}^+$ -ATPase no mesmo órgão. A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático apresentou redução significativa, porém nos íons  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e na osmolalidade não ocorreram alterações significativas. As atividades das enzimas glutathiona S-transferase e glutathiona peroxidase em brânquia e fígado não sofreram efeitos da exposição ao Cd, entretanto, a atividade da catalase diminuiu no fígado e aumentou na brânquia, Embora não tenha sofrido alterações no fígado, o conteúdo de glutathiona reduzida (GSH) aumentou nas brânquias após 24 h de exposição. A ocorrência de danos no DNA aumentou nos eritrócitos dos peixes expostos a maior concentração de Cd testada. Após 24 h de exposição a 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd a brânquia e o rim apresentaram acumulação de Cd semelhantes (0,2  $\mu\text{g Cd.g}$  de tecido úmido $^{-1}$ ), no entanto, após 96 h o acúmulo foi de 0,5, 0,45 e 0,1 ( $\mu\text{g Cd.g}$  de tecido úmido $^{-1}$ ) na brânquia, rim e fígado respectivamente. O conteúdo de PSMT no fígado de peixes expostos a 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd aumentou em 35 % (24 h) e 40 % (96 h), e no músculo o aumento foi de 76 % após 96 h. A atividade da AChE nos animais expostos a 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd apresentou redução no músculo e aumento no cérebro, nas mesmas condições a atividade natatória dos animais ficou estimulada, resultando em uma maior distância percorrida com uma velocidade média maior. Este conjunto de resultados demonstra que as concentrações de Cd testadas afetam o funcionamento de diversos órgãos vitais de *P. lineatus*. A exposição aguda ao Cd causou inibição das enzimas envolvidas com a manutenção das concentrações osmoiônicas e com a regulação ácido-básica, o que resultou em hipocalcemia. Os efeitos do Cd não foram caracterizados pelo estresse oxidativo, mas pelos danos genotóxicos, neurotóxicos e no padrão de natação dos peixes. O Cd dissolvido na água acumulou-se na brânquia > rim > fígado, mas não no músculo, onde foi capaz de induzir aumento nas PSMT. Portanto, as concentrações de Cd aceitas pelo CONAMA para águas doce brasileiras são prejudiciais à espécie *P. lineatus*.

**Palavras-chave:** Ecotoxicologia. Metal. ATPases. Osmorregulação. Estresse oxidativo.

SILVA, Alexandre Oliveira Fernandes da. **Exposure to cadmium teleost *Prochilodus lineatus***: bioaccumulation, genotoxic, biochemical, physiological and behavioral effects. 2013. 95p Dissertation (Thesis in Physiological Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

## ABSTRACT

Cadmium (Cd) is a trace metal non-essential for animals, very toxic to fish and represents a contaminant commonly found in freshwaters due to anthropogenic activities. The aim of this study was to evaluate Cd bioaccumulation and its effects to the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Thus, juvenile fish were exposed, for 24 and 96 h, to two Cd concentrations, 1 and 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , which correspond to the maximum Cd concentrations allowed by the Brazilian guidelines (CONAMA, Resolução 357/2005). Cd effects were evaluated by the analysis of plasma ions and osmolality, the activity of enzymes related to osmoregulation, the antioxidant defenses, the occurrence of oxidative stress and genotoxic damage, the content of metallothionein-like proteins (MTL), the activity of acetylcholinesterase (AChE) and changes in behavior patterns. Fish exposed to Cd showed a decrease in the activity of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase and carbonic anhydrase in gills and kidney. The activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the gills also decreased while there was an increase in the activity of  $\text{H}^+$ -ATPase in the same organ. The concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  showed significant decrease, but the other ions and osmolality were not significantly affected by Cd exposure. The activity of glutathione s-transferase and glutathione peroxidase in gills and liver were not affected by the acute exposure to Cd, but catalase activity decreased in the liver and increased in gill. Although reduced glutathione has not changed in the liver, it increased in the gills after 24 h of exposure. The occurrence of DNA damages increased significantly in erythrocytes of fish exposed to 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd. After 24 h of exposure to 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd the gills and kidney showed similar Cd accumulation (0.2  $\mu\text{g Cd.g wet tissue}^{-1}$ ), but after 96 h the metal accumulation was 0.5, 0.45 and 0.1 ( $\mu\text{g Cd.g wet tissue}^{-1}$ ) in gill, kidney and liver, respectively. The content of MTL in liver of fish exposed to 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd increased in 35% (24 h) and 40% (96 h) and in the muscle MTL increased by 76% after 96 h. After exposure to 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cd the AChE activity was significantly reduced in muscle and increased in the brain, in the same condition the swimming activity was stimulated, resulting in greater distance with a higher average speed. This set of results shows that the concentrations of Cd tested affected the functioning of various vital organs of *P. lineatus*. Acute exposure to Cd caused inhibition of enzymes involved in the maintenance of osmoionic concentrations and acid-base regulation and resulted in hypocalcaemia. The effects of Cd were not characterized by oxidative stress, but by genotoxic and neurotoxic effects and changes in the swimming pattern. Cd dissolved in the water accumulated in the gill > kidney > liver, but not in muscle, which was capable of inducing an increase in MTL. Therefore the Cd concentrations in freshwater allowed by the Brazilian guidelines are harmful to *P. lineatus*.

**Keywords:** Ecotoxicology. Metal. ATPases. Osmoregulation. Oxidative stress.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> - Percentual de cada finalidade na utilização do cádmio no século XX (Plachy, 2003).....	16
<b>Figura 1.2</b> - Produção Mundial de cádmio (Buckingham et al., 2010).....	17
<b>Figura 1.3</b> - Espécime juvenil de <i>P. lineatus</i> (A) e anúncio de oferta do curimba em tablóide de supermercado local (B) (veiculado em julho de 2013). .....	20
<b>Figura 1.4</b> - Modelos de CRM de peixes de água doce. Transporte de $H^+$ , $HCO_3^-$ , $Na^+$ , $K^+$ (A) e de $Ca^{2+}$ (B) (Adaptado de Evans, 2005; Gilmour e Perry, 2009).....	21
<b>Figura 1.5</b> - Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (Retirado de Lima e Abdalla, 2001). .....	25
<b>Figura 3.1</b> - Concentração plasmática dos íons sódio, potássio, cloreto, cálcio e osmolalidade de <i>P. lineatus</i> juvenis expostos por 24 (A) e 96 h (B) a água (CTR) ou às concentrações nominais de $1 \mu g.L^{-1}$ (Cd 1) e $10 \mu g.L^{-1}$ (Cd 10) de cádmio dissolvido na água.....	51
<b>Figura 3.2</b> - Atividade da $Na^+/K^+$ -ATPase (média $\pm$ EP) em brânquia e rim de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de $1 \mu g.L^{-1}$ (Cd 1) e $10 \mu g.L^{-1}$ (Cd 10) de cádmio. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10) para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ; $n = 10-14$ ).....	52
<b>Figura 3.3</b> - Atividade da $Ca^{2+}$ -ATPase (média $\pm$ EP) branquial e renal de <i>P. lineatus</i> expostos por 24 (A) e 96 h (B) apenas à água (CTR) ou às concentrações de $1 \mu g.L^{-1}$ (Cd 1) e $10 \mu g.L^{-1}$ (Cd 10) de cádmio.....	52
<b>Figura 3.4</b> - Atividade da $H^+$ -ATPase (média $\pm$ EP) branquial e renal de <i>P. lineatus</i> expostos por 24 (A) e 96 h (B) apenas à água (CTR) ou às concentrações de $1 \mu g.L^{-1}$ (Cd 1) e $10 \mu g.L^{-1}$ (Cd 10) de cádmio.....	53

<b>Figura 3.5</b> - Atividade da anidrase carbônica (média ± EP) branquial e renal de <i>P. lineatus</i> expostos por 24 (A) e 96 h (B) apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 1) e 10 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 10) de cádmio .....	54
<b>Figura 4.1</b> - Atividade da GST (média ± EP, n = 6) em brânquia e fígado de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 1) e 10 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h .....	65
<b>Figura 4.2</b> - Atividade da catalase (média ± EP, n = 6) em brânquia e fígado de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 1) e 10 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h.....	65
<b>Figura 4.3</b> - Atividade da GPx (média ± EP, n = 6) em brânquia e fígado de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 1) e 10 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h. ....	66
<b>Figura 4.4</b> - Concentração de GSH (média ± EP, n = 6) em brânquia e fígado de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 1) e 10 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h.....	67
<b>Figura 4.5</b> - Conteúdo de MDA (média ± EP, n = 5-10) em fígado e rim de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 1) e 10 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h .....	67
<b>Figura 4.6</b> - Escores de danos no DNA (média ± EP, n = 6-8) de eritrócitos de <i>P. lineatus</i> expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 1) e 10 µg.L <sup>-1</sup> (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h.....	68
<b>Figura 5.1</b> - Áquario e câmara para a obtenção dos dados de comportamentos natatórios.....	76

- Figura 5.2** - Tempo médio (n= 6 - 7) de ocupação das áreas superiores e inferiores (em % do tempo total) do aquário por *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio .....79
- Figura 5.3** - Tempo em movimento (média  $\pm$  EP, n = 6 - 7) de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio ..... 80
- Figura 5.4** - Distância percorrida (média  $\pm$  EP, n= 6 - 7) por *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio .....80
- Figura 5.5** - Velocidade de natação (média  $\pm$  EP, n= 6 - 7) de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio .....81
- Figura 5.6** - Atividade da AChE (média  $\pm$  EP, n= 6) cerebral e muscular de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio ..... 82
- Figura 5.7** - Concentrações de Cd (média  $\pm$  EP, n= 6 - 7) em brânquia, fígado e rim de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio..... 83
- Figura 5.8** - Conteúdo de proteínas semelhantes à metalotioneínas (média  $\pm$  EP, n= 6 - 10) em brânquia, fígado, rim e músculo de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio .....84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> - Valores dos parâmetros físicos, químicos, de Cd total e dissolvido da água utilizada nos experimentos de osmorregulação .....	50
<b>Tabela 5.1</b> - Concentrações de Cd ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) total e dissolvido quantificado nos grupos ao longo dos experimentos.....	79

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 CONTAMINAÇÃO PELO CÁDMIO .....	15
1.2 PROCHILODUS LINEATUS .....	19
1.3 OSMORREGULAÇÃO.....	20
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO .....	23
1.5 COMPORTAMENTO .....	27
1.6 ACÚMULO DE CÁDMIO E METALOTIONEÍNAS.....	29
1.7 REFERÊNCIAS .....	32
<b>2 HIPÓTESE E OBJETIVOS</b> .....	44
2.1 HIPÓTESES.....	44
2.2 OBJETIVO GERAL .....	44
2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	44
<b>3 EFEITOS DO CÁDMIO NA OSMORREGULAÇÃO DE <i>Prochilodus lineatus</i></b> .....	45
3.1 MATERIAL E MÉTODOS .....	45
3.1.1 Animais.....	45
3.1.2 Delineamento Experimental.....	45
3.1.3 Análises plasmáticas .....	46
3.1.4 Atividade da Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase.....	47
3.1.5 Ca <sup>2+</sup> -ATPase .....	48
3.1.6 H <sup>+</sup> -ATPase.....	48
3.1.7 Anidrase Carbônica .....	49
3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	49
3.3 RESULTADOS.....	49
3.4 DISCUSSÃO .....	54
3.5 REFERÊNCIAS .....	58

<b>4</b>	<b>ESTRESSE OXIDATIVO E DANOS GENOTÓXICOS EM PROCHILODUS LINEATUS</b> .....	61
4.1	MATERIAL E MÉTODOS .....	61
4.1.1	Delineamento Experimental.....	61
4.1.2	Defesa antioxidante enzimática e não enzimática .....	62
4.1.3	Peroxidação lipídica.....	63
4.1.4	Ensaio do Cometa .....	63
4.2	ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	64
4.3	RESULTADOS .....	64
4.4	DISCUSSÃO .....	68
4.5	REFERÊNCIAS .....	72
<b>5</b>	<b>BIOCUMULAÇÃO DE CÁDMIO E SEUS EFEITOS EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DE PROCHILODUS LINEATUS</b> .....	75
5.1	MATERIAL E MÉTODOS .....	75
5.1.1	Animais.....	75
5.1.2	Protocolo experimental para análise de comportamento.....	76
5.1.3	Protocolo experimental para análises químicas e bioquímicas .....	77
5.1.4	Acetilcolinesterase (AChE).....	77
5.1.5	Biocumulação de Cd.....	77
5.1.6	Conteúdo de Proteínas Semelhantes a Metalotioneínas.....	78
5.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
5.3	RESULTADOS .....	78
5.4	DISCUSSÃO .....	84
5.5	REFERÊNCIAS .....	89
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	94

## APRESENTAÇÃO

Esta tese foi escrita e formatada com o objetivo de facilitar a posterior publicação dos resultados obtidos ao longo do curso de doutorado. O trabalho foi dividido em seis capítulos: 1) Introdução; 2) Hipóteses e objetivos; 3) Efeitos do cádmio na osmorregulação de *Prochilodus lineatus*; 4) Estresse oxidativo e danos genotóxicos em *P. lineatus* causados pelo cádmio; 5) Biocúmulação de cádmio e seus efeitos em parâmetros bioquímicos e comportamentais de *Prochilodus lineatus*; 6) Considerações finais. Por causa do desmembramento da parte experimental do trabalho em três capítulos (3, 4 e 5) alguns trechos dos textos inevitavelmente tornaram-se recorrentes para que cada uma das metodologias pudesse ser completamente descrita.

O primeiro capítulo contém uma sucinta revisão bibliográfica sobre os principais elementos constituintes deste trabalho com a finalidade de fornecer o embasamento teórico fundamental para justificar sua coerência e relevância. O segundo capítulo reúne as hipóteses e os objetivos correspondentes aos conteúdos avaliados pelos capítulos subsequentes. Cada um dos capítulos 3, 4 e 5 contém uma descrição metodológica, apresenta seus resultados e os discute para, em conjunto, testar as hipóteses e alcançar os objetivos. O sexto capítulo faz uma síntese integradora dos resultados separados pela configuração assumida da tese, evidências que precisavam ser unificadas para terem maior significado.

## 1 INTRODUÇÃO

A população humana passou de um bilhão de habitantes em 1802, a sete bilhões em 2011, a maior taxa de crescimento demográfico de sua história. Nos últimos 30 anos o consumo de energia *per capita* aumentou em cerca de 80% (ONU, 2010; USEIA, 2013). Estes fatos causaram incremento na demanda pelos recursos naturais, associados à inserção no cotidiano das pessoas de novos processos e produtos cada vez mais descartáveis. Como resultado disto, a sociedade industrializada tem gerado uma complexa mistura de resíduos oriundos de atividades industriais, agropecuária e doméstica com grande potencial poluidor. Os metais são um dos principais elementos encontrados nos compostos que são descartados no meio ambiente durante ou após atividades humanas. Tais elementos compõem uma classe de poluentes tóxicos para a maioria dos seres vivos e como não são degradados, persistem por longos períodos no local em que são depositados. Por mais distinta que seja a sua origem ou localização, seja no solo, ar ou em organismos, os metais acabam transportados, em maior proporção, aos sistemas hídricos (Campos et al., 2005). Metais traço como o Cd são incorporados aos ambientes aquáticos como resíduos de atividades industriais, agropecuárias e pelo despejo direto de efluentes urbanos (Heath, 1987). No entanto, ainda pouco se conhece a respeito dos efeitos tóxicos dos metais sobre a biota aquática da região Neotropical (EPA, 2001).

Atualmente, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), através da resolução 357/2005 normatiza a emissão de substâncias tóxicas nos ambientes aquáticos brasileiros. Contudo os valores máximos de metais aceitáveis no Brasil estão baseados principalmente nos valores preconizados pelas agências de proteção ambiental norte-americana, *United States Environmental Agency* (USEPA), e europeia, *European Environmental Agency* (E.E.A.). Consequentemente não levam em consideração as características das águas brasileiras e os efeitos deletérios dos poluentes sobre as espécies nativas do Brasil.

Testes de toxicidades são experimentos conduzidos para estabelecer a relação de causa e efeito de uma substância tóxica sobre a biota. Cada espécie de uma comunidade apresenta uma sensibilidade característica a um determinado poluente, portanto é desejável que os testes de toxicidade sejam feitos com o maior número de espécies possível. Os seus resultados são extremamente

úteis para agências reguladoras padronizarem as concentrações máximas permitidas de um elemento nas águas superficiais, principalmente quando são utilizadas espécies com grande importância ecológica em um ecossistema (Martins e Bianchini, 2011).

O Brasil possui a maior biodiversidade de peixes de água doce do mundo com cerca de 2500 espécies descritas (Buckup, 2007) e este é um dos grupos de animais mais utilizado em testes de toxicidade. A avaliação da sensibilidade dos peixes aos metais é essencial para a proteção dos seus habitats uma vez que são espécies chaves dos ecossistemas aquáticos. Dentre os metais mais avaliados nos testes toxicológicos estão o cobre, chumbo e alumínio. O cádmio (Cd) é um dos metais mais tóxicos aos peixes, porém poucos estudos foram conduzidos para avaliar os seus efeitos em espécies brasileiras de teleósteos (Martins e Bianchini, 2011).

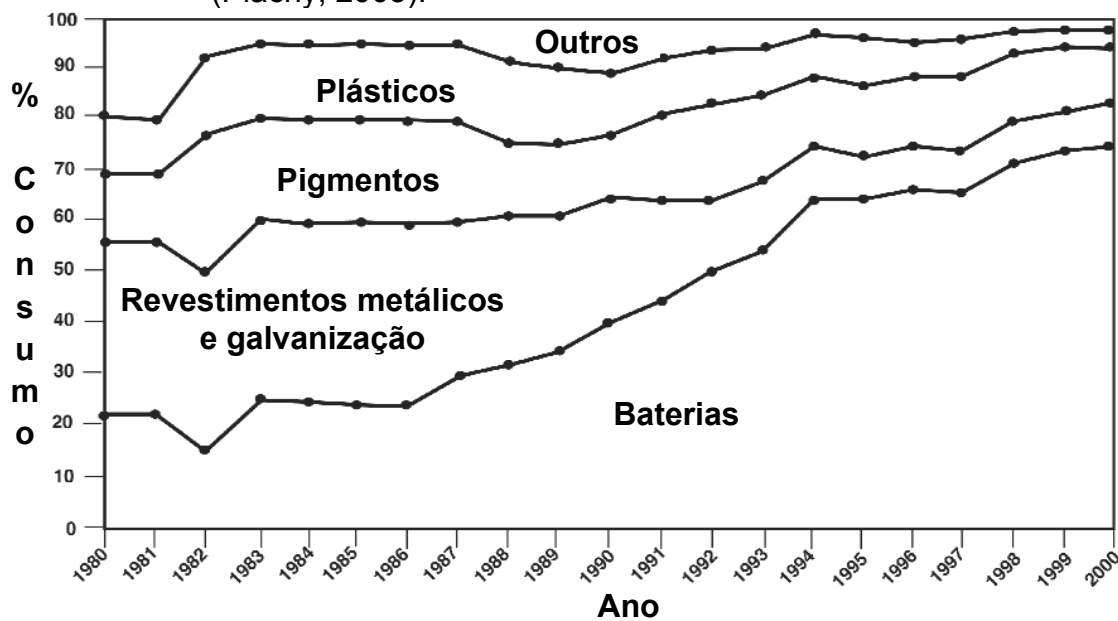
### 1.1 CONTAMINAÇÃO PELO CÁDMIO

O Cd é um elemento que tem uma descoberta relativamente recente, em 1817, por Friedrich Strohmeyer, na Alemanha. A partir da observação de uma amostra de carbonato de zinco, obtido do óxido de zinco (calamina) extraído do campo de mineração Salzgitter, Strohmeyer notou que mesmo sem ferro, o mineral apresentava coloração amarelada. Sua purificação, a partir do óxido de Cd ocorreu no ano seguinte. O nome cádmio foi estabelecido em referência à calamina cujo nome em latim é *cadmia* (Budgen, 1924).

Os minerais de Cd não são encontrados isolados em depósitos comercialmente viáveis, o único mineral de Cd relevante é a greenockita (CdS). É um metal de ocorrência rara, sua concentração na crosta terrestre é de  $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$  e nos oceanos menor do que  $1 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ . O Cd é extraído principalmente a partir de minérios de zinco (Zn), mas também de minérios de chumbo, cobre, sempre associado ao Zn. No Brasil, somente depósitos localizados nos Estados de Minas Gerais e Mato Grosso tem importância econômica. A extração do Zn é dominada pela Votorantim Metais Zinco S/A que concentra suas atividades nos municípios de Vazante e Paracatu, e faz o processamento em usinas em Três Marias e Juiz de Fora (DNPM, 2012). A produção estimada de Cd no Brasil é de 200 toneladas por ano (Tolcin, 2011).

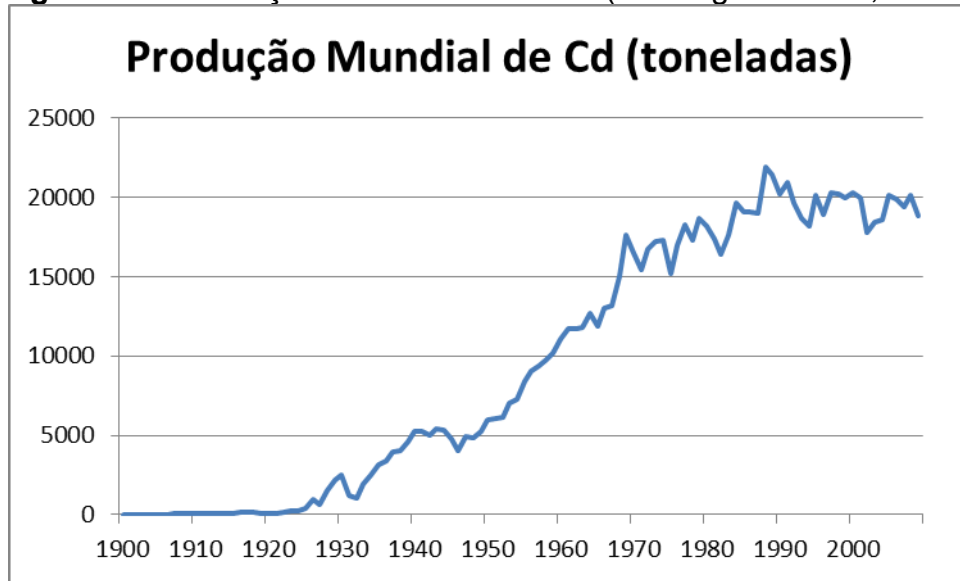
Nos 70 anos que seguiram a sua descoberta, o Cd foi destinado apenas em pequena escala para a produção de pigmentos. Na I Guerra Mundial o Cd foi utilizado como substituto do estanho. Durante a II Guerra Mundial os Estados Unidos iniciaram a construção das baterias de níquel (Ni) e Cd, finalidade que emprega cerca de 75% do Cd produzido no mundo (Fig. 1.1). A confecção de pigmentos, revestimentos, ligas metálicas e estabilizadores são outras aplicações industriais atuais do Cd (Llewellyn, 1994; UNEP, 2006).

**Figura 1.1** - Percentual de cada finalidade na utilização do cádmio no século XX (Plachy, 2003).



A produção mundial de Cd cresceu constantemente ao longo do século XX até o início da década de 1980, quando estabilizou em cerca de 20000 toneladas por ano (Fig. 1.2). A produção primária de Cd tem diminuído desde 1990, no entanto, o seu consumo não diminuiu, o déficit criado pela queda na produção têm sido compensado pela reciclagem de baterias do Ni-Cd. Esta fonte secundária corresponde atualmente a 20% da produção mundial de Cd.

**Figura 1.2** - Produção Mundial de cádmio (Buckingham et al., 2010).



A liberação do Cd na biosfera pode ser dividida em três categorias:

1) Fontes naturais: mobilização do Cd contido na crosta terrestre por meio eventos piroclásticos ou erosão;

2) Origens antropogênicas secundárias: Cd presente como impureza, como em adubos minerais fosfatados, combustíveis fósseis e tratamento de materiais recicláveis;

3) Origens antropogênicas resultantes do emprego intencional do Cd: em produtos ou processos que utilizam Cd, durante sua vida útil ou por causa descarte irregular.

Dentre as emissões da categoria 1, a liberação de Cd para a atmosfera é estimada em  $3.800 \text{ t.ano}^{-1}$  e nos corpos hídricos em  $15.000 \text{ t.ano}^{-1}$ , de um total de  $88.000 \text{ t.ano}^{-1}$  de Cd que devem alcançar a biosfera proveniente de fontes naturais (IPCS, 1992; Richardson et al., 2001). Quanto às emissões originárias de ações antropogênicas, estima-se que cerca de  $7.500 \text{ t.ano}^{-1}$  de Cd sejam inseridas na atmosfera e cerca de  $15.000 \text{ t.ano}^{-1}$  acabam alcançando águas subterrâneas e superficiais (Nriagu e Pacyna, 1989; Pacyna e Pacyna, 2001).

Os rios são importantes vias de transporte dos metais em escala regional e nacional. Normalmente os recursos hídricos superficiais não poluídos contém de  $0,02$  a  $0,08 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd total em suas águas (EPA, 2001). Entretanto, rios situados próximos a regiões urbanas e industriais, apresentam concentrações de Cd superiores às permitidas pelo CONAMA (Resolução 357, 2005) para rios de

classe 1, 2 (  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  ), 3 e 4 (  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  ). Na bacia hidrográfica do Tietê (Estado de São Paulo) as águas podem conter Cd em concentrações de até  $13 \mu\text{g.L}^{-1}$  e nos sedimentos até  $5 \text{mg.kg}^{-1}$  (Rodgher et al., 2005). O Cd é normalmente encontrado em concentrações menores do que o cobre (Cu) e zinco (Zn), mas mesmo em baixas concentrações é altamente tóxico à vida aquática (Pelgron et al., 1997; Wong e Wong, 2000; Borgmann et al., 2005; Cambier, et al., 2010). Dentre os animais mais susceptíveis aos efeitos tóxicos do Cd estão os peixes (EPA, 2001). A toxicidade do Cd manifesta-se nos organismos aquáticos nas primeiras horas após a contaminação e é muito persistente. Trabalhos recentes em ecotoxicologia utilizam principalmente modelos de exposição subcrônica e crônica, (Kamunde e MacPhail, 2011; Maunder et al., 2011; Cao et al., 2012). Mas uma vez que os efeitos tóxicos do Cd instalam-se rapidamente e estendem-se a diversos níveis de organização biológica, é primordial identificar as alterações fisiológicas e bioquímicas agudas deste elemento sobre os seres vivos.

Em peixes dulcícolas, a principal rota de entrada deste metal, quando dissolvido na água, é através das brânquias. Em quantidades subletais, o Cd prontamente é absorvido da água em sua forma iônica livre  $\text{Cd}^{2+}$  e se acumula principalmente nas brânquias, intestino, rins e fígado de peixes (Wu et al., 2007; Franco-Uría et al., 2010; Malik et al., 2010), o que faz destes sítios órgãos-alvo para avaliação dos efeitos no organismo. Como o Cd não é um metal essencial para os animais, sua presença normalmente desencadeia respostas fisiológicas ao estresse, seguidas de alterações metabólicas, danos celulares ou sistêmicos. A toxicidade aguda do Cd é variável, mesmo entre espécies filogeneticamente próximas. Os efeitos agudos do Cd estão relacionados com distúrbios osmo-iônicos, estresse oxidativo, danos genotóxicos, alteração na sinalização celular e expressão gênica, neurotoxicidade e alterações comportamentais (Risso-de Faverney et al., 2001; Chowdhury et al., 2003; Scott et al., 2003; Lacroix e Hontela, 2004; Hans Reynders et al., 2006 ; Nawaz et al, 2006; Richetti et al., 2011). A exposição crônica de peixes ao Cd também causa alterações histológicas, má formação esquelética, comprometimento do crescimento e reprodução (Garcia Santos et al., 2006, Huang et al., 2009; Sassi et al., 2010; Annabi et al., 2012).

## 1.2 PROCHILODUS LINEATUS

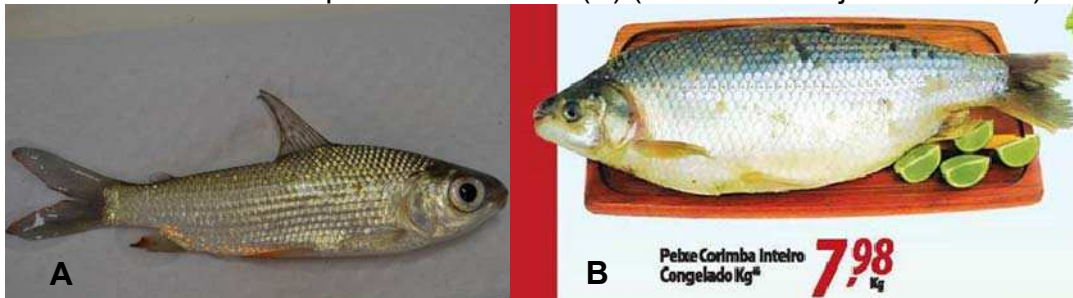
O *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1837) (Fig. 1.3A) é uma das 13 espécies do gênero *Prochilodus* descritas até o momento. Pertencentes à família Prochilodontidae possuem como características corpo de porte médio a grande, iliofagia (alimentam-se de detritos lamacentos), reofilia (dependem da correnteza do ambiente natural fluvial) e grande capacidade migratória durante o período de sua piracema compreendida entre os meses de novembro a janeiro (Castro, 1990). Espécies de *Prochilodus* são conhecidas no Brasil pelos nomes populares de curimbatá, curimba, curimatã, curimatã-pioa, curimatã-pacu, papa-terra e corimbatá e por sábalo na Argentina. Apresentam desova única por temporada com elevado número de óvulos, fecundação externa e ausência de cuidado parental (Lowe-McConnel, 1999).

O gênero *Prochilodus* destaca-se por sua ampla distribuição na região Neotropical, o *P. lineatus* está distribuído por toda América do Sul, habitando as bacias do rio Paraná, Grande, Uruguai, Amazonas, Orinoco, Magdalena, sendo uma das espécies de peixe de água doce mais abundante e dispersa da América do Sul. A expansão geográfica do curimba é calculada em 238 mil anos (Pleistoceno médio) e as análises de DNA mitocondrial de populações das bacias que habita, revelaram grande semelhança genética entre elas, não havendo associação com a geografia (Sivasundar et al., 2010). Os indivíduos da família Prochilodontidae chegam a representar de 50 a 80% da biomassa de peixes em um rio (Taylor et al., 2006).

O curimba é um peixe abundante nas águas interiores brasileiras, segundo Shibata et al. (2007) o *P. lineatus* é a terceira espécie de maior ocorrência na bacia hidrográfica do rio Tibagi. O *P. lineatus* é um importante recurso pesqueiro frequentemente comercializado no mercado brasileiro, o fornecimento de carne de curimba é feito por pisciculturas e por pescadores. Sua carne é comercializada no varejo (Fig. 1.3B), porém não é considerada nobre por possuir forte gosto em consequência dos seus hábitos alimentares. Outra característica do *P. lineatus* é a sensibilidade a xenobióticos avaliada em testes ecotoxicológicos com poluentes de diversas naturezas. Entre os poluentes que conhecidamente geram efeitos tóxicos agudos nesta espécie estão os metais, chumbo (Monteiro et al., 2011), cobre (Nascimento et al., 2012) e alumínio (Camargo et al., 2009) e compostos orgânicos

como os herbicidas glifosato (Langiano e Martinez, 2008) e clomazone (Pereira et al., 2013), gasolina (Simonato et al., 2011) e diesel (Vanzela et al., 2007).

**Figura 1.3** - Espécime juvenil de *P. lineatus* (A) e anúncio de oferta do curimba em tablóide de supermercado local (B) (veiculado em julho de 2013).



### 1.3 OSMORREGULAÇÃO

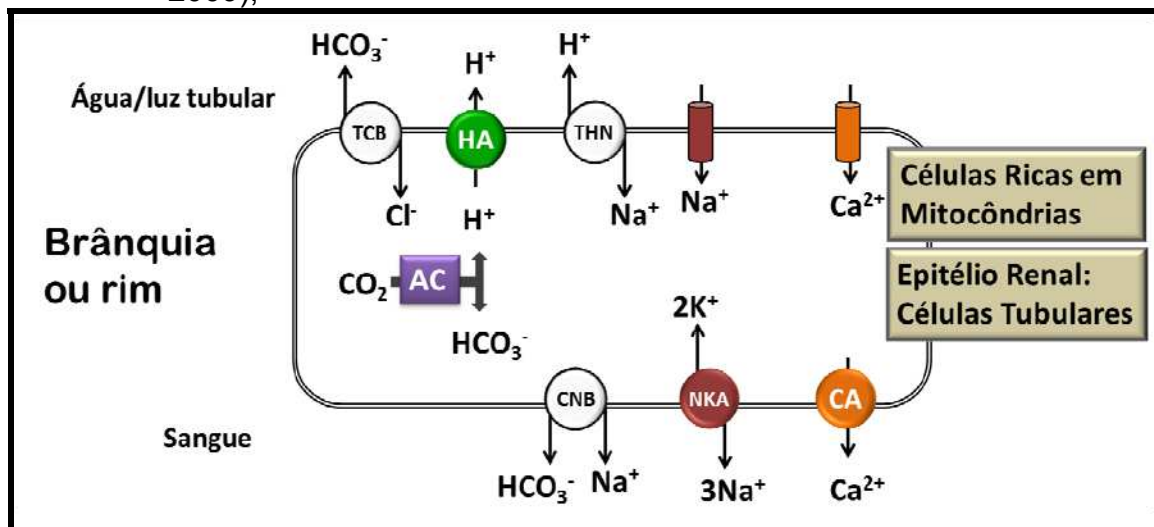
Os peixes são hiperosmóticos em relação à água-doce, situação que estabelece um constante gradiente osmótico para entrada de água no organismo, ao mesmo tempo em que favorece a perda difusional de íons através do epitélio branquial. Para eliminar o excesso de água e conservar íons, o rim dos teleósteos dulcícolas produz uma copiosa quantidade de urina diluída. A atividade ATPásica nos ionócitos ou células ricas em mitocôndrias (CRM) de brânquia e rim são elementos fundamentais para o transporte iônico através das membranas mantendo o balanço osmótico em peixes. A brânquia desempenha papel principal na respiração, regulação ácido-básica e osmótica, além da excreção de resíduos nitrogenados. Exceto pela função respiratória, o rim também é um órgão multifuncional e age como coadjuvante da brânquia nas demais atividades de manutenção da homeostase.

A  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (NKA) está localizada na membrana basolateral das CRM (Fig. 1.4) e está envolvida na geração de força motriz para o transporte ativo de eletrólitos através dos epitélios. Para obtenção de cálcio exógeno e demais íons, os peixes de água doce dependem dos componentes da dieta, ou da captação ativa realizada pela brânquia (Hwang et al., 1996). A  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (CATPase) branquial é responsável pela absorção dos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Figura 1.4) presente em baixas concentrações na água doce (Wong e Chan, 1999), enquanto a CATPase renal é responsável pela reabsorção do  $\text{Ca}^{2+}$  do filtrado glomerular para o plasma sanguíneo.

Em peixes dulcícolas, os processos bioquímicos envolvidos com a regulação iônica não podem ser separados do controle ácido-básico, porque ambos ocorrem nos mesmos locais e compartilham as mesmas vias. A maioria dos peixes mantêm o pH interno ajustando a concentração de bicarbonato plasmático pela excreção preferencial de  $H^+$  ou  $HCO_3^-$ , e assim como a regulação osmo-iônica o rim tem papel secundário na manutenção ácido-básica em relação às brânquias (Evans et al., 2005).

Os efluxos dos íons  $H^+$  e do  $HCO_3^-$  estão acoplados ao influxo de  $Na^+$  e  $Cl^-$  respectivamente. Para excreção de  $H^+$  existe uma  $H^+$ -ATPase (HATPase) do tipo V (Fig. 1.4) na região apical das membranas de células epiteliais, que bombeia prótons da célula para o meio externo, o que por sua vez gera um gradiente elétrico intracelular negativo (Lin et al., 1994; Lin e Randall, 1993). Esta condição favorece o influxo do  $Na^+$  por difusão via canal de sódio (Fig. 1.4), o principal mecanismo osmorregulatório em peixes de água-doce para absorção de  $Na^+$  (Lin e Randal, 1995). A metaloenzima anidrase carbônica (AC) citosólica, catalisa a hidratação do  $CO_2$  para formar  $HCO_3^-$  e  $H^+$  que é secretado pela HATPase apical. A NKA bombeia  $Na^+$  através da membrana basolateral, favorecendo a entrada de  $Na^+$  do meio aquático para as células. O  $Na^+$ , em conjunto com o  $HCO_3^-$ , produzido pela AC, é transportado pelo cotransportador  $Na^+$ - $HCO_3^-$  (Fig. 1.4) (Evans et al., 2005).

**Figura 1.4** - Modelos de CRM de peixes de água doce. Transporte de  $H^+$ ,  $HCO_3^-$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  (A) e de  $Ca^{2+}$  (B) (Adaptado de Evans, 2005; Gilmour e Perry, 2009),



THN – transportador  $Na^+/H^+$ ; HA – HATPase; TCB – transportador  $Cl^-/HCO_3^-$ ; CNB – cotransportador de  $Na^+$  e  $HCO_3^-$ ; CA – CATPase.

As alterações nas ATPases e na AC dos órgãos responsáveis pela regulação osmótica são biomarcadores sensíveis ao Cd (Watson e Benson, 1987; Pratap e Weendelaar Bonga, 1993). Alterações na operação dos mecanismos enzimáticos estão entre os efeitos iniciais da interação dos metais com os componentes celulares (Herak-Kramberger et al., 2000; Atli e Canli, 2011). Metais podem alterar a atividade enzimática através da ligação com seus grupamentos funcionais ou pelo deslocamento dos metais constitutivos associados à enzima (Viarengo, 1989). Geralmente a exposição de peixes a metais causa inibição da atividade ATPásica, porém, aumentos de atividade podem ser observados em alguns casos, possivelmente como resultado de mecanismos adaptativos (Atli e Canli, 2007; Adiele et al., 2012).

As evidências apontam que um dos principais efeitos tóxicos do Cd em peixes de água doce é inibição da CATPase basolateral branquial e consequente hipocalcemia (Verbost et al., 1988). A exposição de tilápias (*Oreochromis mossambicus*) a concentrações de Cd de 40 a 160  $\mu\text{g.L}^{-1}$  por 3 e 7 dias causaram decréscimos na atividade da CATPase e também alterações morfológicas nas CRM (Wong e Wong, 2000). Além da inibição da CATPase em rim e brânquia de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Atli e Canli (2011) observaram o mesmo efeito sobre a NKA após exposição aguda dos animais ao Cd. Entretanto, em outro estudo com tilápias do Nilo expostas ao Cd, Garcia-Santos et al. (2006), não observaram diminuição da atividade da NKA e tampouco hipocalcemia. A expressão da HATPase em brânquia de camarão (*Litopenaeus vannamei*) foi inibida após 3 h de exposição (Wang et al., 2012) ao Cd e em peixes sua atividade está relacionada com a absorção de  $\text{Na}^+$  e com a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  na água (Sullivan et al., 1995; Hawkings, et al., 2004). Tecidos de enguias (*Anguilla anguilla*) expostos *in vitro* ao Cd apresentaram inibição de até 80% da atividade da AC, sendo o tecido branquial mais sensível do que o intestinal (Lionetto et al., 2000).

Portanto, as ATPases e AC estão envolvidas em processos fundamentais na manutenção do meio interno de peixes e são sensíveis à contaminação por Cd. Como a inibição destas enzimas ocorrem antes da maioria dos distúrbios osmorregulatórios, a avaliação funcional delas pode ser utilizada como sinalização precoce de danos ao sistema de controle osmoiônico.

## 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A bioacumulação de metais pode causar aumento nas espécies reativas de oxigênio (ERO), como peróxido de hidrogênio, radical superóxido e radical hidroxil, causando estresse oxidativo em peixes (Radi e Matkovics, 1988). O estresse oxidativo é um distúrbio causado pela alteração do balanço redox celular em favor às substâncias pró-oxidantes e podem resultar em degradação de proteínas, danos ao DNA e peroxidação lipídica de membranas (Thévenod, 2009). Em condições fisiológicas normais, ERO são produzidas principalmente nos peroxissomos e mitocôndrias, organelas com alto metabolismo oxidativo e presença de cadeias transportadoras de elétrons. Os danos oxidativos gerados pelos metais traço podem ocorrer pelo aumento direto ou indireto das espécies reativas de oxigênio ou pelo decréscimo da capacidade antioxidante celular (Pinto et al., 2003).

O Cd, metal traço não essencial, não induz a produção de ERO diretamente, pois é incapaz de catalisar reação redox em sistemas biológicos. Mas tem sido demonstrado que o Cd aumenta a quantidade de ferro e cobre livre, possivelmente por substituí-lo em sítios proteicos, elevando a quantidade de metais com atividade redox livres no meio celular (Casalino et al., 1997; Dorta et al., 2003). No citoplasma, a presença do  $\text{Fe}^{2+}$  catalisa as reações de Fenton e Haber-Weiss, sendo oxidado em  $\text{Fe}^{3+}$  durante a produção de radical hidroxil. Nas células, as maiores produtoras de ERO são as mitocôndrias, seja em condições normais ou durante estresse (Fleury et al., 2002). A atividade da cadeia respiratória na membrana mitocondrial interna produz ERO no complexo I (NADH/ubiquinona oxireductase) e no complexo II (ubiquinol/ citocromo c oxireductase) (Boveris et al., 1976; Kehrer, 2000). A produção de ERO mitocondrial em condições normais é pequena, mas durante estresse promovido por xenobióticos, sofre substancial aumento (Keher, 2000).

O fígado e a brânquia de peixes são órgãos envolvidos com a defesa antioxidante enzimática e não enzimática para proteger os órgãos e todo o organismo do estresse oxidativo (Basha e Rani, 2003). As superóxido dismutases (SOD) formam uma família de enzimas, as SOD citosólica podem estar associadas ao Cu ou ao Zn, enquanto as SOD mitocondrial está ligada ao Mn. As SOD são componentes da defesa celular antioxidante primária e catalisa a dismutação do radical superóxido em oxigênio molecular ( $\text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$ ). (McCord e Fridovich,

1969) A detoxificação do peróxido de hidrogênio celular é feita pelas enzimas catalases (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A CAT é uma enzima da defesa antioxidante primária, que degrada o peróxido de hidrogênio ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ), uma espécie reativa de oxigênio não radical, que tem grande permeabilidade nas membranas biológicas e pode inativar enzimas diretamente. A CAT encontra-se principalmente nos peroxissomos das células hepáticas e sanguíneas e por possuir grande capacidade catalítica dificilmente sua atividade é saturada pelo substrato (Atli et al., 2006). A GPx é uma heme enzima que utiliza o  $\text{H}_2\text{O}_2$  como substrato para oxidar a glutathione (GSH). Enquanto a atuação da CAT predomina em situações severas de estresse oxidativo, a GPx exerce seu efeito protetor em situações de menor estresse (Mates, 2000). As enzimas da família glutathione-S-transferase (GST) participam da conjugação de xenobióticos eletrofílicos com a GSH, formando um produto de biotransformação mais hidrofílico e excretável geralmente pela via do ácido mercaptúrico. Enquanto as enzimas antioxidantes estão envolvidas na neutralização das ERO, muitos metabólitos também possuem propriedades antioxidantes. Destaca-se entre os metabólitos hidrofílicos a GSH, um tripeptídeo composto pelos resíduos de glutamato, cisteína e glicina. Além de participar das ações catalisadas pela GPx e GST, a GSH também pode se ligar diretamente aos compostos oxidantes (Cuypers et al., 2010).

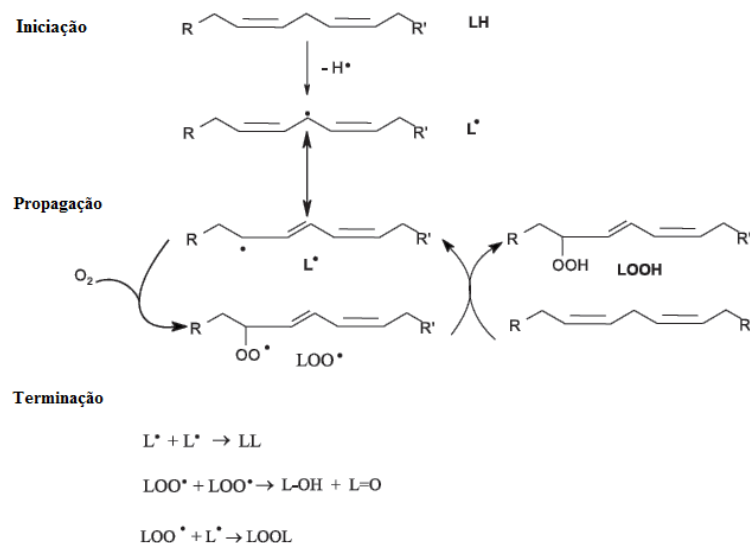
O Cd apresenta grande afinidade por radicais tióis, o que faz da GSH o seu primeiro alvo celular. Ao se ligar à GSH o Cd pode ser tanto excretado através da bile como lançado na corrente sanguínea na forma Cd-GSH até alcançar o fígado ou rim (Ercal et al., 2001). No entanto a saída do complexo Cd-GSH das células pode causar depleção da GSH e em seguida, possibilitar a formação de ERO. (Thévenod, 2003). Os efeitos do Cd sobre as enzimas antioxidantes são dúbios, pois a ativação das diferentes isoformas da CAT, GPx e GST são reguladas diferencialmente em cada tecido, dependendo das condições de exposição do organismo aos xenobióticos. A diminuição da atividade destas metaloenzimas pode se dar pela ocupação do sítio catalítico pelo Cd ou devido ao deslocamento dos íons metálicos que integram a estrutura original (Wronska-Nofer et al., 1999; Jihen et al., 2009; Jurczuk et al., 2004; Ognjannovic et al., 2008).

Estima-se que uma única célula, produza  $1,5 \cdot 10^5$  moléculas de ERO por dia, se a capacidade antioxidante das defesas enzimáticas não for suficiente para neutralizar a formação de ERO, o organismo passa a sofrer danos pelo

estresse oxidativo (Beckman e Annes, 1997). Além da interação com proteínas, as ERO alteram as estruturas do DNA e das membranas celulares, causando respectivamente danos mutagênicos e peroxidação lipídica nos ácidos graxos dos fosfolípidos de membrana (Marnett, 1999).

A peroxidação lipídica (LPO) é definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres principalmente sobre os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, gerando radicais alquil, alcoxil e peroxil. A LPO consiste na incorporação de um oxigênio molecular a um ácido graxo de membrana produzindo um hidroperóxido lipídico. O processo de LPO é dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação (Fig. 1.5). Na primeira fase ocorre o ataque de uma ERO suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH<sub>2</sub>), formando um radical carbono. Este radical por sua vez, é estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado (Halliwell e Gutteridge, 1999). O radical alquil inicialmente formado reage com um oxigênio e resulta em um radical peroxil, o qual pode extrair um hidrogênio de outro radical carbono, promovendo a fase de propagação. A reação do radical peroxil como hidrogênio retirado gera um hidroperóxido lipídico. A terceira e última fase da reação dá-se pela extinção dos radicais formados originando produtos não radicalares. Os radicais peroxil e alcoxil também podem sofrer dismutação ou clivagem e originar aldeídos (Gardner, 1989).

**Figura 1.5** - Esquema das principais reações ocorridas durante o processo de peroxidação lipídica (Retirado de Lima e Abdalla, 2001).



O malondialdeído (MDA) é um dialdeído formado como produto secundário durante a LPO por cisão beta dos ácidos graxos poli-insaturados peroxidados, principalmente do ácido araquidônico (Janero, 1990). O MDA é mutagênico e cancerígeno e normalmente empregado para quantificar os níveis de LPO através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). A modificação estrutural das membranas pela LPO pode ter como consequência a redução da fluidez da membrana, ruptura da integridade da bicamada e em casos extremos causa morte celular (Baber e Harris, 1994).

Os radicais hidroxil reagem com os componentes da molécula de DNA, causando modificações nas bases púricas, pirimídicas e na cadeia de desoxirribose (Dizdaroglu et al., 2002). Os danos da molécula de DNA podem estender-se e resultar em quebras de uma ou das duas fitas e ainda em *cross-links*. Como resultado as atividades transcricionais são perturbadas e as cascatas de sinalização celular alteradas, o que faz com que ocorram erros de replicação, eventos que mantêm relação com carcinogênese. Como maneira de enfrentar estes defeitos, existem vários mecanismos de reparo genético. Contudo, se o DNA não for reparado pode ocorrer morte celular tanto por necrose como por apoptose (Sandrini et al., 2009). As vias de regulação gênica e sistemas de reparo de DNA são controlados por proteínas *zinc fingers*, macromoléculas que viabilizam a interação entre proteínas e DNA. Os zinc fingers possuem domínios contendo 4 cisteínas e/ou histidinas as quais estão ligadas ao Zn, o que confere a adequada conformação estrutural à proteína e previne reações oxidativas nas imediações do DNA. O Cd, devido a sua alta afinidade pelos grupos –SH, remove o Zn, altera o controle dos processos genéticos e resulta em modificações pré mutagênicas nas bases do DNA (Green e Berg, 1990; Hartwig, 2001).

A avaliação integrada das defesas antioxidantes, peroxidação lipídica e dos danos genotóxicos causados pela exposição aguda de peixes ao Cd são importantes instrumentos para identificação dos efeitos tóxicos, pois caracteriza a resposta do organismo frente um cenário de contaminação aquática, revelando vulnerabilidades e mecanismos de combate ao estresse.

## 1.5 COMPORTAMENTO

Avaliações do comportamento humano e de outros mamíferos são utilizadas há muitos de anos em estudos toxicológicos de substâncias químicas e drogas. No entanto, o uso do comportamento aliado a estudos de toxicologia aquática ganhou destaque apenas há cerca de 50 anos. O significado e a relevância do comportamento da fauna aquática foram lentamente incorporados aos testes ecotoxicológicos, mas ainda hoje pouco se compreende sobre como as alterações de comportamento podem ser relacionadas com questões ecologicamente significantes (Kane et al., 2005). Em 1986 os estudos comportamentais em ecotoxicologia aquática ganharam reconhecimento da *Natural Resources Damage Assessments* que passou a aceitar comportamento de esquiva ou “*avoidance behaviour*” como evidência de danos ao meio ambiente em processos de violação de leis ambientais (NRDA, 1986), a legislação brasileira, no entanto ainda não reconhece nenhuma resposta comportamental como fato relevante legalmente.

O comportamento de um organismo gera uma perspectiva única da relação da sua fisiologia e ecologia com o meio ambiente (Little e Brewer, 2001). O comportamento de um indivíduo tanto é a sequência quantificável de ações operadas pelo sistema nervoso central, como a manifestação cumulativa dos processos genéticos, fisiológicos e bioquímicos essenciais à sobrevivência, tais como alimentação, reprodução e fuga. Como as ações comportamentais são extremamente variáveis e controladas, podem responder adaptativamente constantemente, de maneira seletiva, através da interação direta com os aspectos químicos, físicos, sociais e fisiológicos do ambiente (Kane et al., 2005).

Como o comportamento não é formado por processos aleatórios, mas por uma sequência de atividades estruturadas para garantir sobrevivência de um indivíduo e de sua espécie, é um parâmetro valioso para caracterizar e avaliar os efeitos da exposição a contaminantes ambientais. Manifestações comportamentais integram fatores endógenos e exógenos que associando processos bioquímicos e fisiológicos possibilitam o entendimento dos efeitos dos contaminantes em níveis de indivíduos e comunidades (Vogl et al., 1999). Alterações comportamentais tem ainda a vantagem de ser uma resposta integrada de todo o organismo, o que por sua vez podem estar associadas com a redução da aptidão e sobrevivência individual e consequentemente de toda população (Bridges, 1997).

Peixes são ideais para estudos comportamentais, pois têm grande relevância ecológica, possuem ampla distribuição geográfica, são muito susceptíveis a estressores, pois, permanecem com o corpo todo em contato direto com os poluentes dissolvidos na água (Little et al., 1993). Dentre os diferentes tipos de comportamentos de peixes avaliados em testes toxicológicos destacam-se padrões respiratórios, capacidade natatória, preferência térmica ou de intensidade luminosa e comportamento espontâneo (Sprague, 1964; Giattina et al., 1981; Giattina e Garton, 1982; Diamond et al. 1990; Cleveland et al. 1991; Gouveia et al., 2005). Também são frequentemente estudados os comportamentos complexos como relação presa e predador, corte e acasalamento, fuga, interação social entre indivíduos e relação parental (Weis e Weis, 1974; Pavlov and Kasumyan, 2000; Sloman et al., 2003). Os parâmetros usualmente quantificados para análise comportamental incluem distância total de natação, velocidade, linearidade e tortuosidade dos movimentos, tempo de natação, distribuição horizontal e vertical dos indivíduos (Little e Brewer, 2001).

As alterações de comportamento são detectadas em peixes expostos a baixas concentrações de metais, revelando, portanto sua relevância ambiental (Grillitsch et al., 1999). Em uma revisão da literatura, Beitinger (1990) averiguou estudos com 75 substâncias químicas diferentes e constatou que as repostas dos organismos aquáticos aos metais variavam podendo ser até opostas, mas que os peixes são os mais sensíveis aos contaminantes. Em um estudo para o governo dos Estados Unidos, Black e Birge (1980) constataram que  $52 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd causa repulsa em trutas, enquanto indivíduos da mesma espécie são atraídos pelo Cu na concentração de  $74 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Uma dada espécie de peixe pode reagir de maneira diferencial ao mesmo contaminante dependendo das condições de exposição às quais os indivíduos são confrontados (McNicol e Scherer, 1991).

As alterações nos padrões de natação dos peixes, relacionados a uma condição teste, servem de valioso indício sobre alterações no sistema nervoso. A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima chave da via que encerra a transmissão sináptica entre muitos tipos de células nervosas (Szabo et al., 1992). A inibição da AChE causa aumento da acetilcolina na fenda sináptica e conseqüente hiperestimulação dos receptores colinérgicos da célula pós sináptica. Esta situação pode causar alterações fisiológicas como comprometimento comportamental ou até mesmo morte. Em peixes o impacto de agentes anticolinesterásicos causa

modificações no padrão natatório (Chebbi e David, 2009), e há grande correlação entre a atividade da AChE e a atividade de natação espontânea e comportamento de alimentação de salmões (Sandahl et al., 2005).

A inibição da AChE é um biomarcador clássico utilizado em ambientes aquáticos como indicador de exposição a organofosforados e carbamatos, mas não há consenso se este efeito pode ser considerado para diagnóstico de exposição subletal de peixes aos metais (Van der Oost et al., 2003; Silva e Patiratne, 2008; Tilton et al., 2011). Alguns estudos reportam a inibição da AChE em peixes expostos a metais, mas as concentrações utilizadas neste experimentos geralmente são maiores do que aquelas com relevância ambiental (Gill et al., 1991; Grillitsch et al., 1999, Eissa et al., 2010). As informações a respeito do efeito inibitório que o Cd pode exercer sobre a AChE são contraditórias. Alguns trabalhos não observaram efeitos do Cd sobre a atividade da AChE (de La Torre et al. 2000; Beauvaris et al. 2001; Senger et al. 2006), enquanto outros detectaram tanto estimulação como inibição da atividade da AChE após a exposição peixes ao Cd. Os resultados variam não apenas entre as espécies e modelos experimentais, mas também entre cérebro, músculo e fígado (Gill et al., 1991; Jebali et al., 2006). Informações sobre a influência de baixas concentrações de Cd sobre a atividade da AChE em espécies de teleósteos neotropicais *in vivo* ainda são escassas (Nunes, 2011).

É possível que o Cd possa inibir a atividade da AChE se quantidades suficientes alcançarem os órgãos alvo, uma vez que metais traço como o Cd ligam-se a grupamentos sulfidrilas (-SH) nos próprios sítios ativos da enzima ou próximo a eles. Para tanto, é necessário que haja a absorção e distribuição do Cd até os órgãos alvo.

## 1.6 ACÚMULO DE CÁDMIO E METALOTIONEÍNAS

O Cd é um poluente cumulativo encontrado frequentemente nos ecossistemas aquáticos onde os peixes são particularmente vulneráveis à sua exposição (Bhakta e Munekage, 2008). O acúmulo de metais é resultado da diferença entre as taxas de absorção e eliminação dos elementos (Cinier et al., 1999; Soares et al., 2008). Os modelos farmacocinéticos que descrevem a distribuição dos metais entre os diversos tecidos assumem que uma vez no

organismo, os metais são transportados até diferentes tecidos pelo sangue (Reynders et al., 2006). A bioacumulação apresenta particularidades específicas em cada tecido, nos teleósteos dulcícolas expostos ao Cd dissolvido na água o acúmulo ocorre inicialmente através das brânquias. No caso de metais não essenciais como o Cd, a exposição crônica resulta em maior acúmulo nos órgão de detoxificação como fígado e rim (Brown et al., 1986; Cinier et al., 1999; Hollis et al., 2001). Embora a AChE tenha papel fundamental na atividade locomotora, comportamentos complexos podem ser alterados por outros motivos, o acúmulo de Cd no bulbo olfatório de peixes compromete a resposta comportamental em situações de alarme (Scott et al., 2003).

A cinética de acúmulo de metais é complexa, pois os processos de assimilação e eliminação não envolvem apenas difusão passiva, mas também difusão facilitada, transporte ativo e endocitose (Simkiss e Taylor, 1995). Como a maioria dos metais são hidrofílicos, não conseguem atravessar a matriz lipídica das membranas celulares. Suas formas iônicas são absorvidas preferencialmente através de três tipos de transportadores de membrana: canais, bombas e carreadores, todos com constituição proteica. Estes transportadores têm como função original o transporte de nutrientes essenciais como zinco, cobre, sódio, potássio e principalmente o cálcio. Metais não essenciais como cádmio, mercúrio e chumbo são absorvidos por estas vias, pois mimetizam as características de seus íons análogos (Bell et al., 2002). Em peixes estes processos são dependentes de tempo de exposição e da concentração dos metais dissolvidos na água (Pretto et al., 2011).

Após exposições agudas e crônicas, o Cd presente nas células gera respostas protetivas contra sua toxicidade em teleósteos (McDonald and Wood, 1993). Uma destas respostas envolve ligação do Cd com proteínas citosólicas específicas como as metalotioneínas (MT). As MT constituem uma família de proteínas não catalíticas, ubíquas e extremamente heterogêneas, formadas por uma cadeia polipeptídica rica em resíduos de cisteína. A maioria das MT de peixes já sequenciadas possuem 60 aminoácidos e cerca de 30% de cisteínas em sua cadeia estrutural. Os grupamentos sulfidrilas (-SH) presentes nas cisteínas formam complexos metal-tiolatos e através destas ligações as MT regulam a homeostase dos metais essenciais, principalmente Cu e Zn. Eventualmente as MT também cooperam na detoxificação de metais não essenciais (Kägi e Nordberg, 1979). Com

uma estrutura primária pouco usual e com um arranjo tridimensional único em forma de haltere, as MT possuem um domínio  $\alpha$  e outro  $\beta$  capazes de se ligarem a quatro e três íons divalentes respectivamente (Braun et al., 1986; Zhou et al., 2000; Romero-Isart et al., 2002). Devido à sua alta afinidade por metais do grupo IB e IIB da tabela periódica, o sequestro de íons metálicos pelas MT os torna indisponível para interagir com outras proteínas tais quais enzimas (Brown e Parsons, 1978).

As MT ocorrem naturalmente no citoplasma das células e sua síntese é estimulada pela interiorização tanto de metais essenciais como não essenciais. Cada metal tem uma capacidade específica para induzir a produção de MT, entre os potenciais contaminantes o Cd é o maior indutor (Roesijadi, 1992; Hollis et al., 2001; Atli e Canli, 2003, 2008). Desta maneira as MT podem ser utilizadas como indicador de contaminação do ambiente aquático por metais, principalmente pelo Cd (De Conto Cinier et al., 1998; Atli e Canli, 2003). Em diversos tecidos de peixes a síntese de MT eleva-se em resposta à presença de metais, porém apenas no fígado a concentração de MT parece ter potencial suficiente para quelar os íons metálicos absorvidos após a exposição ao Cd. Na brânquia e no rim a relação Cd/ MT aumenta após a exposição (Hollis et al., 2001). No entanto, mesmo no fígado o Cd não está em sua totalidade ligado às MT (Brown et al., 1990) e em caso de grandes concentrações celulares de Cd a síntese de MT pode ser suprimida (George, 1989).

Muitos estudos de laboratório correlacionam a exposição ao Cd com o aumento da concentração das MT em *Onchorynchus mykiss*, *Spaurus aurata*, *Oreochromis sp*, *Coho salmo*, *Scorpaena guttata* (Brown et al., 1990; Hollis et al., 2001; Chowdhury et al., 2005; Wu et al., 2007; Isani et al., 2009) porém poucos são os trabalhos que utilizam o modelo de exposição aguda (Espinoza et al., 2012). As MT de *P. lineatus* mostraram ser sensível a exposição aguda de Cu (Vicentini, 2011), mas não são conhecidos os efeitos do Cd sobre esta espécie.

## 1.7 REFERÊNCIAS

- Adiele, R. C., Stevens, D., Kamunde, C., 2012. Differential Inhibition of Electron Transport Chain Enzyme Complexes by Cadmium and Calcium in Isolated Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) J. Hepat. Mitochon. Toxicol. Sci., 127(1), 110–119.
- Allin, C.J., Wilson, R. W., 2000. Effects of pre-acclimation to aluminum on the physiology and swimming behaviour of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during a pulsed exposure. Aquat. Toxicol., 51: 213-224.
- Annabi, A., Kessabi, K., Kerkeni, A., Said, K., 2012. Influence of cadmium exposure on growth and fecundity of freshwater mosquitofish *Gambusia affinis*: in situ and in vivo studies. I. Biol. Trace. Elem. Res., 148,345-55.
- Atli, G., Canli, M., 2003. Natural occurrence of metallothionein-like proteins in the liver of fish *Oreochromis niloticus* and effects of cadmium, lead, copper, zinc, and iron exposures on their profiles. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 70, 619–627.
- Atli, G., Canli, M., 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comp. Biochem. Phys. C, 145, 282-287.
- Atli, G., Canli, M., 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwaterfish *Oreochromis niloticus* following metal exposures Environ. Toxicol. Phar., 25, 33–38.
- Atli, G., Canli, M., 2011. Metals ( $Ag^+$ , Cd,  $Cr^{6+}$ ) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. Environ. Toxicol., doi: 10.1002/tox.20766.
- Barber, A. A., Bernheim, F., 1967. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. Adv. Gerontol. Res., 2, 355-403.
- Barber, A. D., Harris, S. R., 1994. Oxygen free radicals and oxidants: a review. Amer. Pharm., 9, 26-35.
- Basha, P. S., Rani, A. U., 2003. Cadmium-induced antioxidante defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). Ecotox. Environ. Safe., 56, 218-221.
- Beauvais, S. L., Jones, S. B., Parris, J. T., Brewer, S. K., Little, E. E., 2001. Cholinergic and behavioral neurotoxicity of carbaryl and cadmium to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotox. Environ. Safe., 56, 218-221.
- Beckman, K. B., Ames, B. N., 1997. Oxidative decay of DNA, J. Biol. Chem. 272, 19633–19636.
- Beitinger, T., 1990. Behavioral Reactions for the Assessment of Stress in Fishes. Fish Community Health: Monitoring and Assessment in Large Lakes. 16, 495-528.
- Bell, R. A., Ogden, N., Kramer, J. R., 2002 The biotic ligand model and a cellular approach to class B metal aquatic toxicity. Comp. Biochem. Phys. C., 133, 175–188.

Bhakta, J. N., Munekage, Y., 2008. Role of ecosystem components in Cd removal process of aquatic ecosystem. *Ecol. Eng.*, 32, 274–280.

Black, J. A., Birge, W. J. 1980. An avoidance response bioassay for aquatic pollutants. Water Resources Research Institute Research Report 123. University of Kentucky.

Borgmann, U., Couillard, Y., Doyle, P., Dixon, D. G., 2005, Toxicity of sixty three metals and metalloids to *Hyalella azteca* at two levels of water hardness. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 641–652.

Boveris, A., Cadenas, E., Stoppani, A. O., 1976. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 156, 435–44.

Braun, W., Wagner, G., Worgotter, E., Vaák, M., Kägi, J. H. R., Wüthrich, K., 1986. Polypeptide fold in the two metal clusters of metallothionein-2 by nuclear magnetic resonance in solution. *J. Mol. Biol.*, 187, 125–129.

Bridges, C. M., 1997. Tadpole swimming performance and activity affected by acute exposure to sublethal levels of carbaryl. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 1935-1939.

Brown, D. A., Bay, S. M., Hershelman, G. P., 1990. Exposure of scorpion fish (*Scorpaena guttata*) to cadmium: effects of acute and chronic exposures on the cytosolic distribution of cadmium, copper and zinc. *Aquat. Toxicol.*, 16, 295–310.

Brown, M. W., Thomas, D. G., Shurben, D., Solbe, J. F., Kay, J., Cryer, A., 1986. A comparison of the differential accumulation of cadmium in the tissues of three species of freshwater fish, *Salmo gairdneri*, *Rutilus rutilus* and *Noemacheilus barbatulus*. *Comp. Biochem. Phys. C*, 84, 213-217.

Brown, D. A., Parsons, T. R., 1978. Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. *J. Fish Res. Bd. Can.*, 35, 880–884.

Buckup, P. A., Menezes, N. A., Ghazzi, M. S., 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil, Museu Nacional, Rio de Janeiro (RJ), Brasil, p. 195.

Buckingham, D. A., Plachy, J., Kuck, P. H., Tolcin, A. C., 2010. United States Geological Survey, Cadmium Statistics.

Budgen, N. F., 1924. Cadmium: Its Metallurgy, Properties and Uses. Ed. Charles Griffin & cia, Londres, 239 p.

Cambier, P. G., Durrieu, G., Bourdineaud, J. P., 2010. Cadmium-induced genotoxicity in zebra fish at environmentally relevant doses. *Ecotox. Environ. Safe.*, 73, 312–319.

Camargo, M. M., Fernandes, M. N., Martinez, C. B., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquat. Toxicol.*, 94, 40-46.

Campos, M. L., da Silva, F. N., Neto, A. E. F., Guilherme, L. R. G., Marques, J. J., Antunes, A. S., 2005. Determinação de cádmio, cobre, cromo, níquel, chumbo e zinco em fosfatos de rocha. *Pesq, Agropecu. Bras.*, 40, 361-367.

Cao, L., Huang, W., Shan, X., Ye, Z., Dou, S., 2012. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. *Environ. Toxicol. Phar.*, 3, 16–25.

Casalino, E., Sblano, C., Landriscina, C., 1997. Enzyme activity alteration by cádmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 346, 171-179.

Castro, R. M. C., 1990. Revisão taxonômica da familia Prochilodontidae (Ostriophysii, Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Brasil.

Chebbi, S. G., David, M., 2009. Neurobehavioral responses of the freshwater teleost, *Cyprinus carpio* (Linnaeus.) under quinalphos intoxication. *Biotechnol. Animal Husband.*, 25, 241–249.

Chowdhury, M. J., Gossel, M., McDonald, D. G., Wood, C. M., 2003. Plasma clearance of cadmium and zinc in non-acclimated and metal-acclimated trout. *Aquat. Toxicol.*, 64, 259- 275.

Chowdhury, M. J., Baldisserotto, B., Wood, C. M., 2005. Tissue-Specific Cadmium and Metallothionein Levels in Rainbow Trout Chronically Acclimated to Waterborne or Dietary Cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 381–390.

Cinier, C. C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comp Biochem Phys. C*, 122, 345–352.

Cleveland, L, Little, E. E., Ingersoll, C. G., Wiedmeyer, R. H., Hunn, J. B., 1991. Sensitivity of brook trout to low pH, low calcium and elevated aluminum concentrations during laboratory pulse exposures. *Aquat. Toxicol.*, 19, 303-317.

Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A. R., Munter, E., Artois, T. J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K., 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals*, 23, 927-940.

De Conto Cinier, C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Bortolato, M., 1998. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 61, 793–799.

De La Torre, F. R., Salibián, A., Ferrari, L., 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environ. Pollut.*, 109, 277-282.

Departamento Nacional de Produção Mineral, Ministério do Meio Ambiente. 2012. Sumário Mineral, Brasília, vol 32.

Dizdaroglu, M., Jaruga, P., Birincioglu, M., Rodriguez, H., 2002. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement, *Free Rad. Biol. Med.*, 32, 1102–1115.

Dorta, D. J., leite, S., DeMarco, K. C., 2003. A proposed sequence of events for cadmium-induced mitochondrial impairment. *J. Inorg. Biochem.*, 97, 251-257.

Eissa, B. L., Ossana, N. A., Ferrari, L., Salibián, A., 2010. Quantitative Behavioral Parameters as Toxicity Biomarkers: Fish Responses to Waterborne Cadmium *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 1032–1039.

Environmental Protection Agency – EPA. 2001 Update of ambient water quality criteria for cadmium. Washington: Office Water 2001a 159p.  
<http://epa.gov/waterscience/criteria/cadmium> (Acesso em 17 de julho, 2013).

Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.*, 1, 529–539.

Espinoza, H. M., Williams, C. R., Gallagher, E. P., 2012. Effect of cadmium on glutathione S-transferase and metallothionein gene expression in coho salmon liver, gill and olfactory tissues *Aquat. Toxicol.*, 110– 111, 37– 44 .

Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gas Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiol. Rev.*, 85, 97–177.

Fleury, C., Mignotte, B., Vayssière, J-L., 2002 Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signalling. *Biochimie.*, 84, 131–141.

Franco-Uría, A., Otero-Muras, I., Balsa-Canto, E., Alonso, A. A., Roca, E., 2010. Generic parameterization for a pharmacokinetic model to predict Cd concentrations in several tissues of different fish species. *Chemosphere*, 79, 377–386.

Garcia-Santos, S; Fontainhas-Fernandes, A.; Wilson, J. M., 2006. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ. Toxicol.*, 21, 33-46.

Gardner, H. W., 1989. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biol. Med.*, 7, 65-86.

George, S. G., 1989. Cadmium Effects on Plaice Liver Xenobiotic and Metal Detoxification Systems: Dose–Response, *Aquat. Toxicol.*, 15, 303–310.

Giattina, J. D., Cherry D. S., Cairns, J., Larrick, S. R., 1981. Comparison of laboratory and field avoidance behavior of fish in heated chlorinated water. *T. Am. Fish. Soc.*, 110, 526-535.

Giattina, J. D., Garton, R. R., 1982. Graphical Model of Thermoregulatory Behavior by Fishes with a New Measure of Eurythermality. *Can. J. Fish. Aquat., Sci.*, 39, 524-528.

Gill, T., Tewari, H., Pander, J., 1991. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchonioides* (Rosy barb) *Camp. Biochem. Physiol.*, 100 C, 501-505.

Gouveia Jr, A., Zampieri, R. A., Ramos, L. A., Silva, E. F., Mattioli, R., Morato, S., 2005. Preference of goldfish for dark places reference of Goldfish (*Carassius auratus*) for Dark Places. *Rev. Etol.*, 7, 63-66.

Green, L. M., Berg, J.M., 1990. Retroviral nucleocapsid protein– metal ion interactions: folding and sequence variants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 6403–6407.

Grillitsch, B., Vogl, C., Wytek, R. 1999. Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part II. Variability of measurement parameters under toxicant-induced stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 2743-2750.

Halliwell, B., 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant. Physiol.*, 141, 312–322.

Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C., 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press.

Hartwig, A., 2001. Antioxidants & Redox Signaling. 3, Mary Ann Liebert, Inc.

Hawkings, G. S., Galvez, F., Goss, G. G., 2004. Seawater acclimation causes independent alterations in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 207, 905-912.

Herak-Kramberger, C. M.; Sabolic, I.; Blanus, M.; Smith, P. J.S.; Brown, D. 2000. Cadmium Inhibits Vacuolar H<sup>+</sup> ATPase-Mediated Acidification in the Rat Epididymis. *Biol. Reprod.*, 63, 599–606.

Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C. M., 2001. Tissue-specific cadmium accumulation, metallothionein induction, and tissue zinc and copper levels during chronic sublethal cadmium exposure in juvenile rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41, 468–474.

Huanga, Z., Li, L., Huanga, G., Yanb, Q., Shic, B., Xu, X., 2009. Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. *Aquat. Toxicol.*, 91, 54–61.

Hwang, P. P., Tung, Y. C., Chang, M. H., 1996. Effect of environmental calcium levels on calcium uptake in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 15, 363-370.

IPCS, 1992. Cadmium. Environmental Health Criteria 134. The International Programme on Chemical Safety (IPCS), a joint venture of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Isani, G., Andreani, G., Cocchioni, F., Fedeli, D., Carpena, E., Falcioni, G, 2009. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure *Ecotox. Environ. Safe.*, 72, 224– 230.

- Janero, D.R., 1990. Malondialdehyde and thiobarbituric acid reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biol. Med.*, 9, 515-540.
- Jebali, J., Banni, M., Guerbej, H., Almeida, E. A., Bannaoui, A., Boussetta, H., 2006. Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in fish *Seriola dumerilli*. *Fish Physiol. Biochem.*, 32, 93–98.
- Jihen, E. H., Imed, M., Fatima, H., 2009. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. *Ecotox. Environ Safe.*, 72, 1559-1564.
- Kamunde, C., MacPhail, R., 2011. Subcellular interactions of dietary cadmium, copper and zinc in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.*, 105, 518-527
- Kane, A.S., Salierno, J. D., Brewer, S.K., 2005. Fish models in behavioral toxicology: Automated techniques, updates and perspectives. Pages 559-590 In: Ostrander, GK, editor. *Methods in Aquatic Toxicology*, Volume 2. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.
- Kägi, J. H. R., Nordberg, G. F., 1979. *Metallothionein*. Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Kehrer, J. P., 2000. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149:43–50.
- Lacroix, A., Hontela, A., 2004. A comparative assessment of the adrenotoxic effects of cadmium in two teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*. *Aquat. Toxicol.*, 67, 13–21
- Langiano, V. do C., Martinez, C. B., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Phys. C*, 147, 222-231.
- Lima, E. S., Abdalla, D. S. P., 2001. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 37, 293-303.
- Lin, H., Pfeiffer, D. C., Vogl, A. W., Pan, J., Randall, D., 1994. Immunolocalization of H<sup>+</sup>-ATPase in the gill of epithelia of rainbow trout. *J. Exp. Biol.*, 195, 169–183.
- Lin, H., Randall, D. J., 1995. Proton pumps in fish gills. In: Wood, C. M., Shuttleworth, T.J., editors. *Cellular and molecular approaches to fish ionic regulation*. San Diego: Academic Press. p 229–255.
- Lionetto, M. G., Giordano, M. E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. *Aquat. Toxicol.*, 48, 561–571.
- Little, E. E., Brewer, S. K., 2001. Neurobehavioral toxicity in fish. Schlenk, D. and Benson, W.H. (Ed.), *Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleost New Perspectives: Toxicology and the Environment*, Taylor and Francis, London and New York. 2, 139-174.

- Little, E. E., Fairchild, J. F., and DeLonay, A. J. 1993. Behavioral methods for assessing the impacts of contaminants on early life stage fishes. In American Fisheries Society Symposium 14 Water Quality and the Early Life Stages of Fishes. L. Fuiman (ed). American Fisheries Society, Bethesda.
- Llewellyn, T. O., 1994. Cadmium. United States Department of Interior, 12 p.
- Lowe McConnell, R. H., 1999. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais, São Paulo, Edusp, 535p.
- MacDonald, R. W., Barrie, L. A., Bidleman, T. F., Diamond, M. L., Gregor, D. J., Semkin, R. G., Strachan, W. M. J., Li, Y. F., Wania, F., Alaee, M., Alexeeva, L. B., Backus, S. M., Bailey, R., Bowers, J. M., Gobeil, C., Halsall, C. J., Harner, T., Hoff, J. T., Jantunen, L. M. M., Lockhart, W. L., Mackay, D., Muir, D. C. G., Pudykiewicz, J., Reimer, K. J., Smith, J. N., Stern, G. A., Schroeder, W. H., Wagemann, R., Yunker, M. B., 2000, Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci. Total Environ.*, 254, 93–234.
- Mates, J. M., 2000. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Biol. Amines*, 16, 53-62.
- Malik, N., Biwas, A. K., Qureshi, T. A., Borana, K., Virha, R., 2010. Bioaccumulation of heavy metals in fish tissues of a freshwater lake of Bhopal. *Environ. Monit. Assess.*, 160, 267-276.
- Marnett, L. J., 2000. Oxyradicals and DNA damage, *Carcinogenesis*, 21, 361–370.
- Martins, S. E., Bianchini, A. J., 2011. Toxicity tests aiming to protect Brazilian aquatic systems: current status and implications for management. *J. Environ. Monit.*, 13, 1866-1875.
- Maunder, R. J., Buckley, J., Val, A. L., Sloman, K. A., 2011. Accumulation of dietary and aqueous cadmium into the epidermal mucus of the discus fish *Symphysodon sp.* *Aquat. Toxicol.*, 103, 205–212.
- McCord, J. M., Fridovich, I., 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein), *J. Biol. Chem.*, 244, 60409–60455.
- McDonald, D. G., Wood, C. M., 1993. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish. In: Rankin, J.C., Jensen, F.B. (eds) *Fish Ecophysiology*. Chapman and Hall, London, 297–321.
- McNicol, R. E., Scherer, E., 1991. Behavioral responses of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) to cadmium during preference-avoidance testing. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10, 225-234.
- Monteiro, V., Cavalcante, D. G., Viléla, M. B., Sofia, S. H., Martinez, C. B., 2011. In vivo and in vitro exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquat. Toxicol.*, 104, 291-298.

Nascimento, C. R., Souza, M. M., Martinez, C. B., 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Phys. C*, 155, 456-461.

Nawaz, M., Manzl, C., Lacher, V., Krumschnabel, G., 2006. Copper-Induced Stimulation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in Trout Hepatocytes: The Role of Reactive Oxygen Species,  $Ca^{2+}$  and Cell Energetics and the Impact of Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling on Apoptosis and Necrosis. *Toxicological Sciences*, 92, 464–475 .

Nriagu, J. and Pacyna, J. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature*, 333: 134-139.

NRDA (Natural Resource Damage Assessments). 1986. Final rule. *Federal Register* 51, 27674-27753.

Nunes, B., 2011. The Use of Cholinesterases in Ecotoxicology Book Title Rev. *Environ. Contam. T.*, 212, 29-59.

Pacyna, J. M., Pacyna, E. G., 2001. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environ. Rev.*, 9, 269-298.

Pavlov, D. S., Kasumyan, A. O. 2000. Patterns and Mechanisms of Schooling Behavior in Fish: a Review. *J. Ichth.*, 40, 163-231.

Pelgrom, S. M. G. J., Lock, R. A. C., Balm, P. H. M., Wendelaar Bonga, S. E., 1997. Calcium fluxes in juvenile tilapia, *Oreochromis mossambicus*, exposed to sublethal waterborne Cd, Cu or mixtures of these metals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 770–774.

Pereira, L., Fernandes, M .N., Martinez, C. B., 2013. Hematological and biochemical alterations in the fish *Prochilodus lineatus* caused by the herbicide clomazone. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 36, 1-8.

Pinto, E., Sigaud-Kutner, T. C. S., Leitão, M. A. S., Okamoto, O. K., Morse, D., Colepicolo, P., 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J. Phycol.*, 39, 1008-1018.

Plachy, J., 2003. Cadmium Recycling in the United States in 2000. U.S. Geological Survey Circular, 1196-0.

Pratap, H. B., Weendelaar Bonga, S.E., 1993. Effect of ambient and dietary cadmium on pavement cells, chloride cells, and  $Na^+/K^+$ -ATPase activity in the gills of the freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* at normal and high calcium levels in the ambient water. *Aquat. Toxicol.*, 26, 133±150.

Pretto, A., Loro, V. L., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., Moraes, B. S., Menezes, C., Cattaneo, R., Clasen, B., Finamor, I. A., Dressler, V., 2011. Effects of Water Cadmium Concentrations on Bioaccumulation and Various Oxidative Stress Parameters in *Rhamdia quelen* Arch. *Environ. Contam. Toxicol.*, 60, 309–318.

- Radi, A. A. R., Matkovics, B., 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Phys. C*, 90, 69–72.
- Reynders, H., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W. M., Blust, R., 2006. Dynamics of cadmium accumulation and effects in common carp (*Cyprinus carpio*) during simultaneous exposure to water and food (*Tubifex tubifex*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 1558–1567.
- Richardson, G. M., Garrett, R., Mitchell, I., Mah-Poulson, M., Hackbarth, T. 2001. Critical review on natural global and regional emissions of six trace metals to the atmosphere. Prepared for the International Lead Zinc Research Organisation, the International Copper Association, and the Nickel Producers Environmental Research Association.
- Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogo, M. R., Bonan, C. D., 2011. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology*, 32, 116–122.
- Risso-de Faverney, Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J. P., Bailly, B., Rahmani, R. 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquat. Toxicol.*, 53, 65–76
- Rodgher, S., Espíndola, E. L. G., Rocha, O., Fracácio, R., Pereira, R. H. G., Rodrigues, M. H. S., 2005. Limnological and ecotoxicological studies in the cascade of reservoirs in the tietê river (São Paulo, Brasil). *Braz. J. Biol.*, 65, 697-710.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, 22, 81–114.
- Romero-Isart, N., Vaák, M., 2002. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.*, 88, 388–396.
- Sandahl, J. F., Baldwin, D. H., Jenkins, J. J., Scholz, N. L., 2005. Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in *Coho salmon* exposed to chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24, 136–145.
- Sandrini, J. Z., Bianchini, A., Trindade, G. S., Nery, L. E. M., Marins, L. F. F., 2009. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquat. Toxicol.*, 95, 285–291.
- Sassi, A., Annabi, A., Kessabi, K., Kerkeni, A., Saïd, K., Messaoudi, E., 2010. Influence of high temperature on cadmium-induced skeletal deformities in juvenile mosquitofish (*Gambusia affinis*). *Fish Physiol. Biochem.*, 36, 403-409.
- Senger, M. R., Rosemberg, D. B., Rico, E. P., Arizi, M. B., Dias, R. D., Bogo, M. R., Bonan, C. D., 2006. In vitro effect of zinc and cadmium on acetylcholinesterase and ectonucleotidase activities in zebrafish (*Danio rerio*) brain. *Toxicol. In Vitro*, 20, 954–958.

- Shibata, O. A., Gealh, A. M., Bennemann, S. T., 2007. Ictiofauna de trechos alto e médio da bacia do rio Tibago, Paraná, Brasil. *Biota Neotropica*, 2, 125-134.
- Silva, K. T. U., Pathiratne, A., 2008. In vitro and in vivo effects of cadmium on cholinesterases in Nile tilapia fingerlings: implications for biomonitoring aquatic pollution. *Ecotoxicology*, 17, 725–731.
- Simkiss, K., Taylor, M. G., 1995. Transport of metals across membranes. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R. Eds.; Johns Wiley & Sons: New York.
- Simonato, J. D., Fernandes, M. N., Martinez, C. B., 2011. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology*, 20, 1400-1410.
- Scott, G. R., Sloman, K. A., Rouleau, C., Wood, C. M., 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, 206, 1779-1790.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., Ort, G., 2010. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.*, 10, 407–417.
- Sloman, K. A., Scott, G. R., Diao, Z., Rouleau, C., Wood, C. M., McDonald, D. G., 2003. Cadmium affects the social behaviour of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.*, 65, 171- 185.
- Soares, S. S., Martins, H., Gutiérrez-Merino, C., Aureliano, M., 2008. Vanadium and cadmium in vivo effects in teleost cardiac muscle: metal accumulation and oxidative stress markers. *Comp. Biochem. Phys. C*, 147, 168–178.
- Sprague, J. B., 1964. Avoidance of copper-zinc solutions by young salmon in the laboratory. *J. Water Pollut. Control. Fed.*, 36, 990-1004.
- Sullivan, G. V., Fryer, J. N., Perry, S. F., 1995. Immunolocalization of proton pumps (H<sup>+</sup>-ATPase) in pavement cells of rainbow trout gill. *J. Exp. Biol.*, 198, 2619–2629.
- Szabo, A., Nemcsok, J., Asztalos, B., Rakonczay, Z., Kasa, P., Hieu, L.H., 1992. The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio* L). Acetylcholinesterase and its biochemical characterization. *Ecotox. Environ. Saf.*, 23, 39–45.
- Taylor, B. W., Flecker, A. S., Hall Jr., R. O., 2006. Loss of a harvest fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. *Science*, 313, 833-836.
- Thévenod, F., 2003. Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol.*, 93, 87–93.
- Thévenod, F., 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharm.*, 238, 221–239.

Tilton, F. A., Bammler, T. K., Gallagher, E. P., 2011. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebra fish exposed to cooper or clorpyrifos separately or as a mixture. *Comp. Biochem. Phys.*, 153, 9-16.

Tolcin, A., 2011. 2010 Minerals Yearbook, Cadmium Advance Release.

Turrens, J. F., Alexandre, A., Lehninger, A. L., 1985. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, 237, 408–414.

United Nations Environment Programme, 2006. Interim review of scientific information on cadmium. 172 p.

United States Energy Information Administration, Independent Statistics and Analysis, 2013

<http://www.eia.gov/cfapps/ipdbproject/iedindex3.cfm?tid=44&pid=44&aid=2&cid=ww,&syid=2007&eyid=2011&unit=QBTU> Acesso em 23 de julho de 2013 19:00h

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharm.*, 13, 57–149.

Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., Cólus, I. M. S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutat. Res.* 631, 36-43.

Viarengo, A. 1989. Heavy metals in marine invertebrates. Mechanism of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquat. Sci.* 1, 295–317.

Vicentini, R. A. 2011. Defesas antioxidantes e alterações funcionais no curimba, *Prochilodus lineatus*, em resposta à exposição aguda ao cobre. Dissertação de Mestrado, Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas-UEL, Londrina.

Vogl, C., Grillitsch, B., Wytek, R., Hunrich Spieser, O., Scholz, W. 1999. Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part I. Variability of measurement parameters under general test conditions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 2736-2742.

Wang, L; Wang, W., Liu, Y., Cai, D., Li, J., Wang, A., 2012. Two types of ATPases from the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* in response to environmental stress. *Mol. Biol. Rep.*, 39, 6427-6438.

Watson, C. F., Benson, W. H., 1987. Comparative activity of gill ATPase in three freshwater teleosts exposed to cadmium. *Ecotox. Environ. Safe.*, 14, 252-259.

Weis, P., Weis, J. S., 1974. Schooling Behavior of *Menidia medidia* in the Presence of the Insecticide Sevin (Carbaryl). *Mar. Biol.*, 28, 261-263.

Wong, C. K. C., Wong, M. H., 2000. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.*, 48, 517–527.

Wu, S. M., Shih, M., Ho, Y., 2007. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*) upon cadmium exposure. *Comp. Biochem. Phys. C*, 145, 218-226.

Zhou, Y., Li, L., Ru, B., 2000. Expression, purification and characterization of beta domain and beta domain dimer of metallothionein. *Biochem. Biophys. Acta*, 1524, 87-93.

## 2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

### 2.1 HIPÓTESES

A legislação brasileira permite concentrações de Cd em águas doces brasileiras que não são adequadas à fauna nativa. Os efeitos agudos do Cd podem acarretar distúrbios fisiológicos, bioquímicos, genotóxicos e comportamentais em *P. lineatus* juvenis.

### 2.2 OBJETIVO GERAL

- Avaliar os efeitos da exposição aguda ao Cd no peixe neotropical *Prochilodus lineatus*.

### 2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se as concentrações de Cd permitidas pela legislação brasileira para águas doce são prejudiciais a peixe nativo;
- Quantificar a bioacumulação de Cd e conteúdo de PSMT em órgãos alvo;
- Analisar se as concentrações de Cd permitidas pelo CONAMA podem acarretar distúrbios osmoiônicos (plasmáticos, atividade enzimática) e de estresse oxidativo (defesa antioxidante e lipoperoxidação);
- Investigar o potencial genotóxico e neurotóxico;
- Verificar os efeitos da contaminação aguda por Cd sobre o comportamento espontâneo.

### 3 EFEITOS DO CÁDMIO NA OSMORREGULAÇÃO DE *Prochilodus lineatus*

Nesta seção estão descritos os experimentos e resultados referentes à avaliação dos efeitos de duas concentrações nominais de Cd ( $1$  e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) em dois tempos (24 e 96 h) de exposição aguda, sobre a fisiologia osmorregulatória da espécie de peixe *P. lineatus*.

#### 3.1 MATERIAL E MÉTODOS

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizados juvenis de *P. lineatus* ( $12,4 \pm 1,2$  g;  $11,2 \pm 3$  cm, n= 251) fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Os peixes foram aclimatados por pelo menos cinco dias em tanques (300 litros) com água desclorada e aeração constante, sob fotoperíodo 12 h claro: 12 h escuro. Durante aclimação os peixes foram alimentados com ração comercial (Guabi®, 36 % de proteínas) a cada dois dias, a alimentação foi suspensa 24 h antes e durante os testes de toxicidade. Os parâmetros físicos e químicos da água foram periodicamente monitorados com um analisador de multiparâmetros (Horiba U-50).

##### 3.1.2 Delineamento Experimental

Após a aclimação os animais foram submetidos a teste de toxicidade aguda, do tipo estático, durante 24 e 96 h, em aquários de vidro com capacidade para 100 L, contendo 80 L de água. Em cada aquário foram colocados de seis a oito indivíduos, mantendo a densidade máxima de 1 g de peixe por litro de água. Para realização dos testes, foram formados três grupos para cada período experimental, um grupo controle (CTR), com peixes expostos somente à água desclorada e dois grupos experimentais contendo  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) ou  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de Cd, que foi adicionado a partir de uma solução estoque de  $1 \text{mg.L}^{-1}$  do Cd preparada com  $\text{CdCl}_2$ . Essas concentrações foram definidas de acordo com os

limites máximos de Cd permitidos em águas doce de classes 1 e 2 ( $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) e 3 e 4 ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) pela legislação brasileira (CONAMA, 2005).

Decorrido o tempo de exposição, os peixes foram anestesiados com benzocaína ( $0,12 \text{ g.L}^{-1}$ ) e, com o auxílio de seringas heparinizadas, foi retirado o sangue pela veia caudal. Após a coleta de sangue, os animais foram mortos por secção medular para a retirada das brânquias e rim, de acordo com procedimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (Processo 35004.2011.18).

O sangue coletado foi transferido para tubos plásticos de 1,5 mL e mantidos em gelo. Os filamentos das brânquias foram lavados e separados dos arcos branquiais e assim como o rim foram armazenados em tubos plásticos com os tampões apropriados para dosagem das atividades da NKA,  $\text{H}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase e anidrase carbônica. Todas as amostras foram mantidas congeladas ( $-80^\circ\text{C}$ ) até o momento dos ensaios.

Durante os testes, monitorou-se a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água dos aquários. Amostras de água foram coletadas após cada tempo experimental, fixadas em  $\text{HNO}_3$  ( $\text{pH} \leq 2$ ) e analisadas em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (Perkin Elmer A700) por método de atomização eletrotérmica acoplado ao forno de grafite para a determinação da concentração de Cd total e dissolvido. A concentração de Cd total foi determinada em amostras de água não-filtradas e a concentração de Cd dissolvido foi determinado em amostras de água filtradas (filtro de  $0,45 \mu\text{m}$ ).

### 3.1.3 Análises Plasmáticas

Realizada a amostragem, o sangue coletado foi centrifugado (10 min, 1870 g) e as amostras de plasma foram congeladas ( $-20^\circ\text{C}$ ). A osmolalidade foi determinada por congelamento utilizando um osmômetro (Osmomat 030, Gonotec, Alemanha). A concentração do íon cloreto foi avaliada pelo método do tiocianato de mercúrio com o auxílio do kit comercial (Labtest Diagnóstica, Brasil), em espectrofotômetro de microplacas (Victor™, PerkinElmer) a 470 nm. O plasma foi diluído em água deionizada (1:100) para a determinação da concentração de sódio e potássio, em fotômetro de chama (Analyser 900, Brasil). Os resultados da concentração de sódio e potássio plasmáticos foram expressos em relação a uma

curva padrão a partir de soluções estoques de NaCl (100 mM) e KCl (100 mM). A concentração de cálcio foi determinada pelo método de atomização por chama em Espectrofotômetro de Absorção Atômica (EAA, PerkinElmer Analyst A700). As amostras de plasma foram diluídas 1:40 com modificador de cloreto de lantânio 1%. Os resultados foram obtidos utilizando uma curva feita a partir de uma solução padrão certificada (NIST). O limite de detecção do método para a dosagem de cálcio é de  $1,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

#### 3.1.4 Atividade da $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase

A atividade da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase foi determinada em frações de homogeneizados de brânquias e rins pelo método descrito por Quabius et al. (1997). Este método baseia-se na produção de fósforo inorgânico em um meio após incubação na presença e ausência de ouabaína. Realizada a excisão, os órgãos foram imersos em tampão SEI (sacarose 0,3 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM e Imidazol 30 mM, 0,035% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7,4), antes de serem congelados ( $-80^\circ\text{C}$ ). As amostras foram homogeneizadas em tampão SEI com Triton X-100 (1:1000, p/v), centrifugadas (13.600 g, 15 min,  $4^\circ\text{C}$ ), e o sobrenadante utilizado no ensaio e nas dosagens de proteínas totais (Lowry et al., 1951). Cada amostra foi pipetada e incubada em seis poços, três deles contendo tampão (NaCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  8 mM, Imidazol 30 mM, EDTA 0,1 mM, ATP 3 mM) com KCl (13 mM) e aos demais adicionado o mesmo tampão com ouabaína (2,5 mM). Após 30 minutos de incubação no escuro, a reação foi interrompida pela adição de uma mistura 1:1 de TCA 8,6 % e do reagente de cor (0,66 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$  + 9,2 mM de molibdato de amônia + 0,33 mM de  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ). Uma solução de fosfato de 650  $\mu\text{M}$  (Sigma) foi usada como padrão. A leitura (Leitora ELX 800, BioTek) foi feita em  $\lambda$  620 nm e a atividade da enzima foi calculada e expressa em  $\mu\text{M Pi.mg proteínas.h}^{-1}$ .

#### 3.1.5 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (CATPase)

Para analisar as funções das CATPase branquial e renal, os órgãos foram armazenados em tampão SEEI (sacarose 0,3 mM,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  0,1 mM, 0,1 mM EGTA e Imidazol 30 mM, 0,035% de  $\beta$ -mercaptoetanol, pH 7,6). As amostras foram homogeneizadas em tampão SEEI com Triton X-100 (1:1000) e centrifugadas

(13684 g, 15 min, 4 °C). Alíquotas do sobrenadante foram utilizadas para dosagem de proteínas totais (Lowry et al., 1951) e incubadas em tampão (MgCl<sub>2</sub> 4 mM, NaCl 100 mM, Imidazol 30 mM, EDTA 0,1 mM, ATP 3 mM, pH 7,6) complementados para três finalidades: mensuração da atividade ATPásica total (CaCl<sub>2</sub> 4 mM, KCl 20 mM), sem atividade da CATPase (KCl 20 mM e EGTA 1 mM) e apenas atividades da CATPase (ouabaína 2,5 mM e CaCl<sub>2</sub> 4 mM). Após 30 minutos de reação adicionou-se aos meios a solução de parada, mistura 1:1 de TCA 8,6 % e reagente de cor (0,66mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 9,2 mM de molibdato de amônia + 0,33 mM de Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> .7 H<sub>2</sub>O). Utilizou-se uma solução de fosfato de 650 µM (Sigma) como padrão. A leitura foi feita em λ 620 nm e a atividade da enzima foi calculada em µM Pi.mg proteínas.h<sup>-1</sup>.

### 3.1.6 H<sup>+</sup>-ATPase (HATPase)

O ensaio empregado para quantificação da atividade enzimática da HATPase foi descrito por Gibbs e Somero (1989), modificado para leitura em microplacas. Os filamentos branquiais e o rim foram homogeneizados 1:10 (p/v) em tampão SEID (sacarose 150 mM, imidazol 50 mM, EDTA 10 mM, deoxicolato de sódio 2,4 mM, pH 7,5) e centrifugados (7 min, 1000 g a 4 °C). Determinou-se a concentração de proteínas totais (Lowry et al., 1951) nos sobrenadantes e os mesmos foram diluídos em SEID de modo a adequar a concentração de proteínas a 1 mg.mL<sup>-1</sup> para todas amostras. A solução de reação (imidazol 30 mM, NaCl 45 mM, KCl 15 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, KCN 0,4 mM, ATP 1 mM, 0,2 mM, piruvato kinase 3 U.mL<sup>-1</sup>, frutose 1,6 difosfato 0,1 mM, fosfoenolpiruvato 2 mM, pH 9,0) pura serviu para mensuração da atividade ATPásica total das amostras. Para a quantificação da atividade da HATPase adicionou-se à solução de reação 2 mM de N-etilmaleimida (NEM), seu inibidor. As amostras foram adicionadas em triplicatas, aos diferentes meios de reação e após 30 minutos foram realizadas as leituras. As absorbâncias foram lidas a cada minuto, durante 15 minutos a 340 nm (Victor<sup>TM</sup>, PerkinElmer). A atividade foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: {(inclinação\*coeficiente de extinção)/([Proteínas]\*diluição)\*tempo/1000}<sup>-1</sup> e expressa em µmol ADP.mg proteína<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

### 3.1.7 Anidrase Carbônica

A atividade da enzima AC foi determinada por um método eletrométrico segundo Vitale et. al (1999). As amostras de rim e brânquias foram homogeneizadas em tampão (225 mM de manitol, 75 mM de sacarose, 10 mM de Tris-base e 10 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) de pH 7,4, centrifugadas em 13.600 g por 10 minutos (4 °C) e o sobrenadante foi utilizado no ensaio. A atividade catalítica da enzima foi quantificada pela acidificação do meio saturado com  $\text{CO}_2$  durante 20 s, utilizando um pHmetro (Jenway 3510). A inclinação da reta gerada pela queda do pH ao longo do tempo forneceu a taxa de reação catalisada (TC) e a taxa de reação não-catalizada (TNC) foi obtida pela leitura do pH na ausência de amostra, substituindo-se amostra por tampão. A partir dessas duas medidas a atividade da anidrase carbônica (AC) foi calculada pela fórmula:  $\text{AC} = [\text{TC}/\text{TNC} - 1].\text{mg}^{-1}$  de proteína.

## 3.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados estão representados como média  $\pm$  EP. Após a verificação da normalidade e homogeneidade de variância, os resultados dos diferentes parâmetros, obtidos para cada tempo experimental (24 e 96 h), foram comparados entre os diferentes grupos (CTR X Cd1 X Cd10) por meio de análise de variância fator único (ANOVA) e as diferenças foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK), quando necessário. Valores  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 3.3 RESULTADOS

Não houve mortalidade de peixes ao longo dos experimentos. Os parâmetros físicos e químicos da água estão apresentados na Tabela 3.1. Os valores aferidos de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade e dureza não apresentaram variações significantes entre os grupos experimentais.

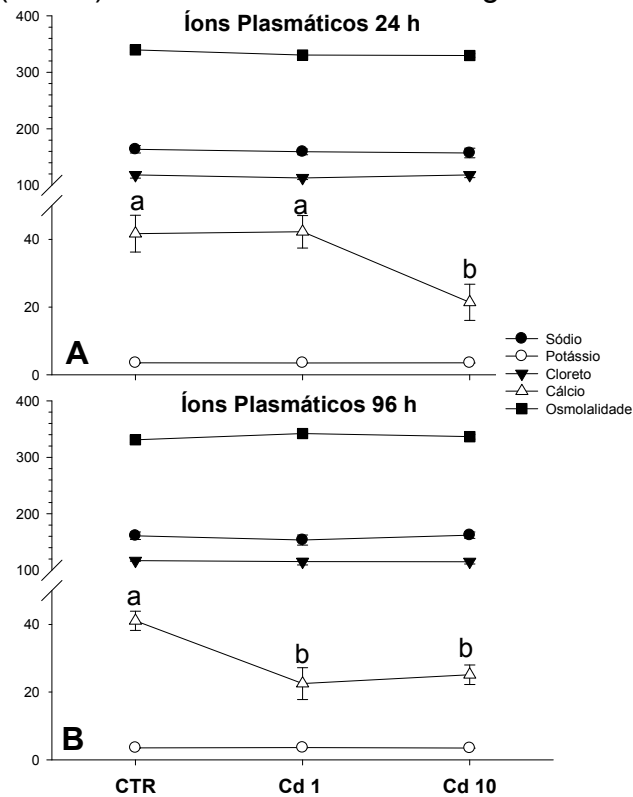
**Tabela 3.1** - Valores dos parâmetros físicos, químicos, de Cd total e dissolvido da água utilizada nos experimentos de osmorregulação.

<b>Variáveis da água</b>	<b>CTR</b>	<b>Cd 1</b>	<b>Cd 10</b>
<b>Temperatura (°C)</b>	19,55 ± 1,55	20,05 ± 1,10	19,80 ± 1,28
<b>pH</b>	6,73 ± 0,20	6,85 ± 0,35	6,93 ± 0,52
<b>Oxigênio dissolvido (mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	7,66 ± 0,98	8,1 ± 0,72	8,0 ± 0,87
<b>Condutividade (µS.cm<sup>-1</sup>)</b>	86 ± 15,00	88 ± 12,00	92 ± 8,00
<b>Dureza (mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>)</b>	57,8 ± 3,2	55,1 ± 3,9	56,2 ± 4,1
<b>Cádmio total (µg.L<sup>-1</sup>)</b>	Nd	0,882 ± 0,079	7,91 ± 1,1
<b>Cádmio dissolvido (µg.L<sup>-1</sup>)</b>	Nd	0,739 ± 0,066	6,81 ± 0,9

Os valores correspondem à média ± EP (n=8). Nd: não detectado.

A osmolalidade e as concentrações da dos íons plasmáticos analisados estão representados na Figura 3.1. Decorridas 24 h de exposição, apenas os animais do grupo Cd 10 apresentaram concentrações plasmáticas de Ca<sup>2+</sup> significativamente diminuídas ( $P = 0,03$ ). Após o período experimental de 96 h o Ca<sup>2+</sup> plasmático diminuiu nos indivíduos do grupo Cd 1 e Cd 10 ( $P = 0,003$ ). Os demais íons analisados não sofreram alterações causadas pela exposição ao Cd ( $P \geq 0,69$ ). A osmolalidade plasmática também não apresentou alterações em nenhum grupo experimental ( $P \geq 0,97$ ).

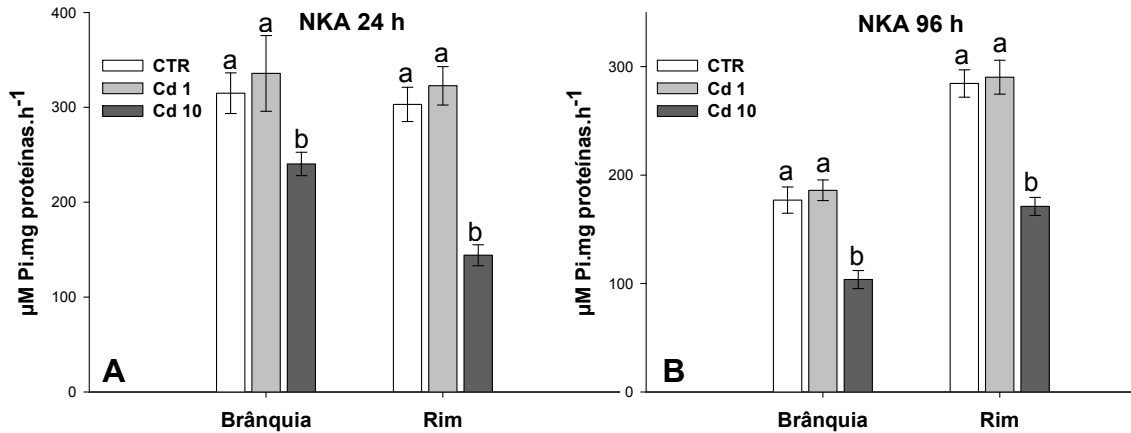
**Figura 3.1** - Concentração plasmática dos íons sódio, potássio, cloreto, cálcio e osmolalidade de *P. lineatus* juvenis expostos por 24 (A) e 96 h (B) a água (CTR) ou às concentrações nominais de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio dissolvido na água.



As barras indicam a média e as linhas o EP. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10) para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ;  $n = 6-8$ ).

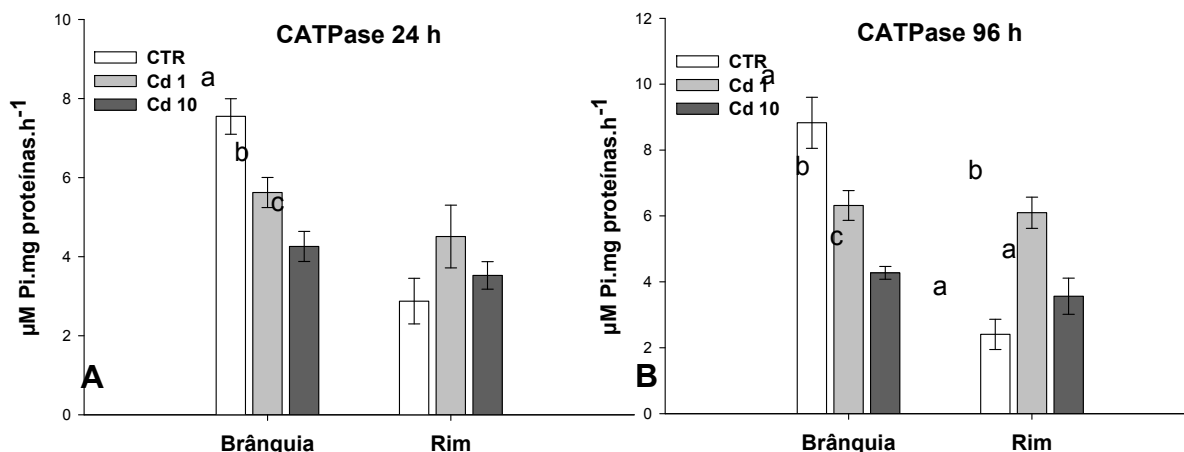
A atividade da NKA da brânquia e rim dos animais do grupo Cd 10 diminuiu em relação aos animais CTR e Cd 1, após 24 ( $P \leq 0,03$ ) e 96 ( $P < 0,001$ ) horas de exposição (Fig. 3.2). Os peixes do grupo Cd 1 não apresentaram variação significativa em relação aos do CTR.

**Figura 3.2** - Atividade da  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (média  $\pm$  EP) em brânquia e rim de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10) para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ;  $n = 10-14$ ).



Após 24 h e 96 h de exposição os peixes do grupo Cd 10 apresentaram redução significativa na atividade da CATPase branquial em relação ao Cd 1 e o CTR. (Fig. 3.3). Os animais do grupo Cd 1 também apresentaram redução significativa da atividade da CATPase branquial em relação aqueles do grupo CTR em ambos períodos de exposição ( $P < 0,001$ ). No rim dos animais avaliados, apenas no grupo Cd 1 foi observado um aumento significativo na atividade da CATPase após 96 h de exposição ( $P < 0,001$ ).

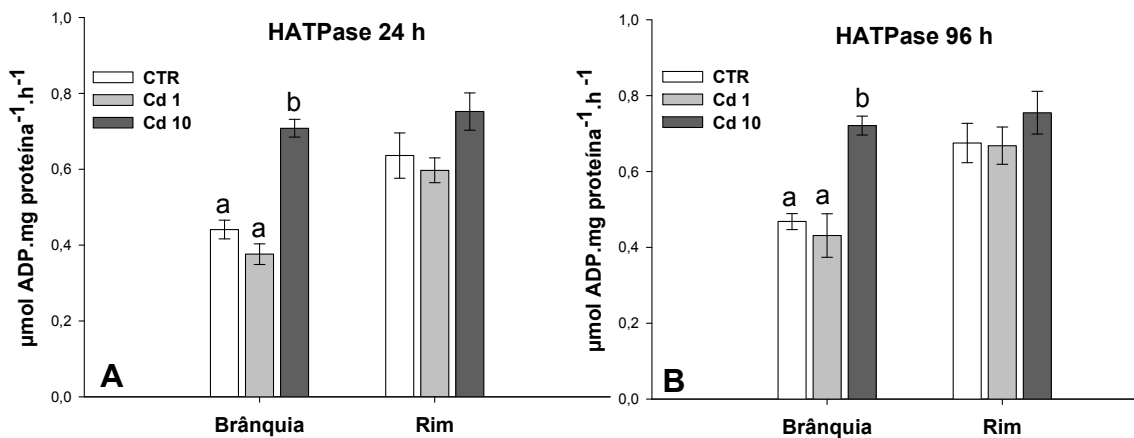
**Figura 3.3** - Atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (média  $\pm$  EP) branquial e renal de *P. lineatus* expostos por 24 (A) e 96 h (B) apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio.



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10) para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ;  $n = 6-8$ ).

Em nenhuma condição experimental foi observada alteração significativa na atividade da HATPase renal (24h:  $P = 0,085$ ; 96 h:  $P = 0,443$ ) (Fig. 3.4). Também não houve diferença de atividade da HATPase branquial entre os grupos CTR e Cd1 após 24h, porém foi constatado nos peixes do grupo Cd10 um aumento significativo na atividade da HATPase branquial em ambos os períodos de experimentais ( $P < 0,001$ ).

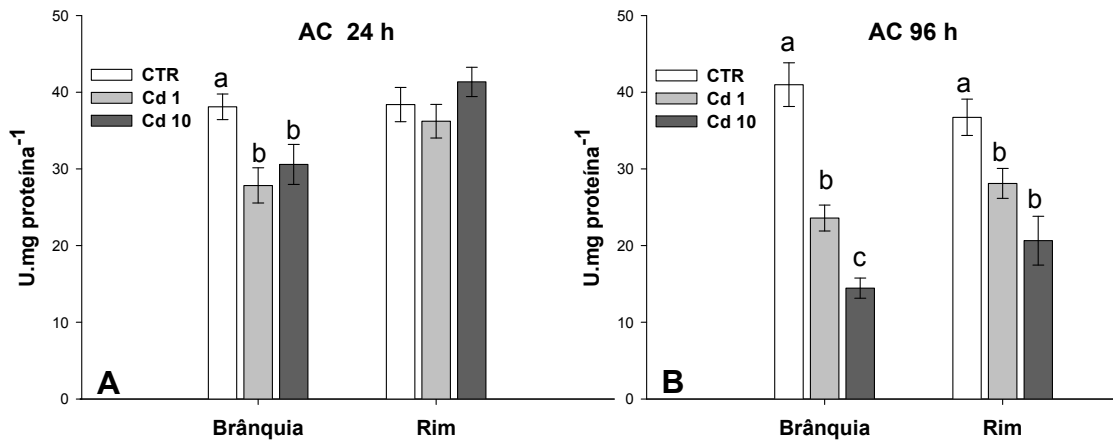
**Figura 3.4** - Atividade da  $H^+$ -ATPase (média  $\pm$  EP) branquial e renal de *P. lineatus* expostos por 24 (A) e 96 h (B) apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio.



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10) para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ;  $n = 7-8$ ).

A atividade da AC (Fig. 3.5) nas brânquias apresentou decréscimo significativo em relação aos respectivos CTR, em todas as condições exposição ( $P \leq 0,002$ ). Os peixes do grupo Cd 10 demonstraram maior redução na atividade da AC branquial do que os peixes do grupo Cd 1 após 96 h de tratamento ( $P = 0,024$ ). A atividade da AC renal sofreu diminuição significativa nos animais dos grupos Cd 1 e Cd 10 após 96 h de exposição ( $P \leq 0,001$ ).

**Figura 3.5..** Atividade da anidrase carbônica (média  $\pm$  EP) branquial e renal de *P. lineatus* expostos por 24 (A) e 96 h (B) apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio.



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10) para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ;  $n = 7-14$ ).

### 3.4 DISCUSSÃO

Os espécimes juvenis de *P. lineatus* submetidos à exposição aguda ao Cd exibiram alterações de atividade nas enzimas envolvidas com a regulação ácido-básica e osmoiônica. Este é o primeiro trabalho que avaliou os efeitos das concentrações máximas de Cd permitidas pela legislação brasileira para águas doce, sobre uma espécie de peixe Neotropical. As concentrações de cádmio avaliadas, de  $1$  e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , são relativamente baixas e a maioria dos estudos de ecotoxicologia testa concentrações maiores, entre  $60 \mu\text{g.L}^{-1}$  a  $1600 \mu\text{g.L}^{-1}$  (de la Torre et al., 2000; Garcia-Santos et al., 2006; Huang et al., 2009; Atli e Canli, 2011). Normalmente os trabalhos que empregam concentrações semelhantes às utilizadas no presente estudo envolvem exposições subcrônicas e crônicas (Franklin et al., 2005). Uma vez que nem todas as espécies de peixes avaliadas apresentam danos nos processos osmorregulatórios, mesmo em condições-teste mais adversas, os presentes resultados caracterizam o *P. lineatus* como uma espécie muito sensível ao Cd.

Os ensaios de atividade enzimática auxiliaram no entendimento dos mecanismos fisiológicos pelos quais o Cd causa seus efeitos tóxicos. A AC, NKA, HATPase e CATPase são enzimas abundantes nos epitélios renais e branquiais destes principais órgãos de entrada e conservação iônica em teleósteos de água-doce. A atividade das NKA branquial e renal parecem ser sensíveis à concentração

de Cd, pois os grupos testados com Cd 10 apresentaram inibição já nas primeiras 24 h de exposição, enquanto os animais do grupo Cd 1 não tiveram alterações ao longo das 96 h avaliadas. O tecido branquial de *A. anguilla* incubado com Cd ( $363 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) apresentou inibição da NKA a partir de 10 min e os efeitos máximos foram obtidos após 1 h (Lionetto et al., 2000). De fato, estudos *in vitro* demonstram que concentrações micromolares de Cd causam rápida inibição da NKA em tecidos de diversas espécies de peixes (Van Kerkhove et al., 2010). Em brânquia de *Cyprinus carpio* a inibição da NKA pela exposição de 14 dias a  $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cd estabeleceu-se de maneira irreversível, pelo menos após 19 dias de recuperação (de la Torre et al., 2000). Em fígado e rim de tilápias, Atli e Canli (2011) também observaram decréscimos da atividade de NKA após a exposição aguda ao Cd.

As CRM em brânquias de *P. lineatus* estão distribuídas principalmente ao longo dos filamentos e em menor quantidade nas lamelas (Camargo et al., 2009). Mas após exposição ao alumínio, esses autores mostraram que as CRM das lamelas desapareceram e a quantidade presente nos filamentos sofreu grande redução e como resultado houve menor atividade branquial da NKA. Embora cada xenobiótico tenha um efeito próprio sobre uma dada espécie, esta modificação na ultraestrutura das brânquias de *P. lineatus* pode não ser exclusiva da exposição alumínio, mas também ocorrer em decorrência da contaminação por Cd. A inibição da NKA pelo Cd segundo Kinne-Saffrin et al. (1993), pode ocorrer por competição pelo sítio de ligação dos íons  $\text{K}^+$  ou  $\text{Mg}^{2+}$ , que provavelmente envolve a interação do íon Cd com grupamentos  $-\text{SH}$ . Os radicais sulfidríla das proteínas são alvo dos metais, tais grupamentos podem ser oxidados pelo Cd desfazendo pontes de hidrogênio e alterando a estrutura tridimensional das proteínas (Dawson, 1982).

A atividade da HATPase em brânquias está ligada à absorção de Na pelo balanço eletroquímico. Com a queda da atividade da NKA basolateral, causada pelo Cd, menores quantidades de  $\text{Na}^+$  são retirados da CRM. Isso faz com que o meio intracelular fique menos eletronegativo e com maior concentração de  $\text{Na}^+$ , situação que desfavorece a entrada de  $\text{Na}^+$  através do seu canal na membrana apical (Lin e Randall, 1991; Hawkings et al, 2004;). O aumento da atividade da HATPase nas brânquias dos curimbas acentua a eletronegatividade celular e favorece a absorção de  $\text{Na}^+$ . Esta talvez seja uma resposta adaptativa que possibilitou aos animais manterem os níveis plasmáticos de  $\text{Na}^+$  estáveis frente ao estresse do Cd.

Independente das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  na água, este íon deve ser absorvido pelas brânquias para manter sua homeostase plasmática, além de ser fundamental para o crescimento de indivíduos juvenis (Perry e Flik, 1988). Está bem estabelecido que o Cd inibe a captação ativa de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo epitélio branquial e causa distúrbios no seu metabolismo (Verboost et al., 1988; Pratap e Wendelaar Bonga, 2007). De fato, o Cd dissolvido na água inibiu a atividade da CATPase branquial, mas não sua atividade no rim de curimba. Embora a CATPase do sistema de absorção iônica branquial em situações normais não seja fator limitante para a tomada de  $\text{Ca}^{2+}$  (Perry, 1997; Reader et al., 1988), a atividade deste transportador branquial é fundamental para a manutenção dos níveis plasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ . A inibição da CATPase das brânquias de *P. lineatus*, foi sempre acompanhada pela queda nos níveis plasmáticos de  $\text{Ca}^{2+}$ . A CATPase renal teve suas funções pouco comprometidas pelo Cd, contudo a sua atividade aumentada pelo tratamento com Cd por 96 h talvez seja devido a uma maior reabsorção de  $\text{Ca}^{2+}$  tubular, uma vez que neste período o organismo já apresentava hipocalcemia. Este resultado demonstra que o papel principal das brânquias nos processos de absorção iônica, não pode ser compensado pelo rim. A maior atividade da CATPase não foi suficiente para reverter a baixa concentração plasmática de  $\text{Ca}^{2+}$ , um dos efeitos tóxicos do Cd. Em tilápias do Nilo, a exposição aguda ao Cd ( $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) inibiu a atividade CATPase do tecido branquial e também do tecido renal (Atli e Canli, 2011).

Para que a inibição da CATPase ocorra é necessário que uma quantidade mínima de Cd adentre ao meio intracelular para que atinja o limiar de concentração mínimo (Verboost et al., 1988; Franklin et al., 2005). É comum este efeito ocorrer quando concentrações acima de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd são utilizadas (Giles, 1988; Reid e McDonald, 1988; Hollis et al, 2000). Por exemplo, Hollis et al. (2000) não observaram efeitos em brânquias de trutas após de 30 dias de tratamento com  $2 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd. Em outro estudo com trutas não houve diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático após exposição crônica a  $3,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, efeito que só foi constatado nos animais submetidos a  $6,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Giles, 1988). Pelos presentes resultados o limiar de inibição da CATPase branquial em curimbas foi alcançado com ambas as concentrações de Cd, 1 e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ , todavia na menor das duas concentrações a inibição da CATPase aconteceu apenas no período de exposição mais prolongado.

A atividade da AC branquial teve sua atividade reduzida em todas as condições experimentais e no rim apenas na exposição de 96 h ao Cd. As isoformas

de AC e NKA estão colocalizadas, principalmente em células de túbulos proximais em peixes (Georgalis et al., 2006), porém não são afetadas pela toxicidade do Cd de maneira uniforme. Na brânquia, o contínuo fluxo de água e a grande área formada pelos filamentos branquiais em contato com o meio ambiente favorecem a exposição de suas células ao contaminante e embora a brânquia normalmente não seja o local de maior acúmulo de Cd em longo prazo, é através de seu estreito epitélio que os metais entram da água para o organismo, este talvez seja o motivo da grande sensibilidade das proteínas avaliadas neste tecido. A AC de brânquia foi mais sensível ao Cd do que todas as demais ATPases avaliadas neste órgão de *P. lineatus*. Uma das possíveis explicações para a redução da atividade desta enzima seria a grande semelhança do Cd em relação ao Zn, o que gera uma competição pelo sítio de associação à AC com o deslocamento do zinco e sua substituição pelo metal com maior afinidade, o Cd.

A brânquia de teleósteos de água doce, além de realizar trocas gasosas e eliminar excretas nitrogenadas, é o principal órgão de osmorregulação e balanço ácido básico, sendo estes dois mecanismos acoplados. Com a atividade das ATPases e da AC branquiais inibidas compromete-se tanto a captação iônica como também a manutenção do pH, realizada primordialmente pela eliminação ou conservação de  $H^+$  e  $HCO_3^-$ . Em teleósteos de água doce a regulação ácido-básica é realizada por compensação metabólica, em adição à função majoritária da brânquia, o papel compensatório do rim na excreção de  $H^+$  por todo o organismo durante alterações de pH sistêmico é de cerca de 30% (Georgalis et al., 2006; Gilmour & Perry, 2009). Isto significa que a exposição do *P. lineatus* a  $10 \mu g \cdot L^{-1}$  de Cd, por 96 h, que causou inibição da AC renal, além da branquial, compromete os principais mecanismos homeostáticos compensatórios no controle das concentrações hidrogeniônicas.

Quando se compara os diferentes tecidos observa-se que as ATPases branquiais são mais sensíveis à contaminação por Cd do que as ATPases renais. A superfície branquial se defronta diretamente com os xenobióticos presentes no ambiente, deflagrando uma situação de estresse e desencadeando mudanças fisiológicas. No caso dos peixes podem iniciar uma resposta integrada compensatória para enfrentar os efeitos tóxicos do Cd. Se o ajuste observado no rim para compensar as alterações no metabolismo do  $Ca^{2+}$  não foi eficiente para prevenir a hipocalcemia o mesmo não pode ser dito a respeito dos demais íons. As

concentrações  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e a osmolalidade plasmática não apresentaram variações significativas mesmo com todos os efeitos do Cd sobre as ATPases branquiais. Neste caso, como observado em *P. lineatus*, após exposição aguda a concentrações subletais de Cd, o rim passa a exercer função essencial para a manutenção das condições osmo-iônicas.

Esta é a primeira vez que as ATPases HATPase, NKA e CATPase e a anidrase carbônica de rim e brânquias são analisadas conjuntamente em modelo de contaminação aguda por Cd. Em suma, os efeitos subletais do Cd em *P. lineatus* são detectados mais rapidamente nas ATPases e AC do que nos parâmetros iônicos do plasma, exceto pelo íon  $\text{Ca}^{2+}$ . As enzimas de transporte localizadas nas brânquias demonstraram ser sensíveis aos efeitos tóxicos do Cd, que se instalam rapidamente. Estas características são adequadas para que a atividade das ATPases sejam consideradas biomarcadores na contaminação por Cd. Dentre as ATPases, a atividade da CATPase aliada com a análise do  $\text{Ca}^{2+}$  plasmático firma-se como instrumentos de grande importância como avaliações comprobatórias clássicas em estudo de toxicidade do Cd em peixes de água doce.

### 3.5 REFERÊNCIAS

- Atli, G., Canli, M., 2011. Metals ( $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{6+}$ ) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures. *Environ. Toxicol.*, doi: 10.1002/tox.20766
- Camargo, M. M. P., Fernandes, M. N., Martinez, C. B. R., 2009. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquat. Toxicol.*, 94, 40–46.
- CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente, 2005. Resolução n 357, Ministério do Meio Ambiente, Brasil 17 de março.
- Dawson, A. P., 1982. Kinetic properties of the  $\text{Ca}^{2+}$ -accumulation system of a rat liver microsomal fraction. *Biochem. J.*, 206, 73–79.
- de la Torre, F. R., Salibián, A., Ferrari, L., 2000. Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environ. Poll.*, 109, 279-282.
- Garcia-Santos, S; Fontainhas-Fernandes, A.; Wilson, J. M., 2006. Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ. Toxicol.*, 21, 33-46.
- Georgalis, T., Gilmour, K. M., Yorston, J., Perry, S. F., 2006. Department Roles of cytosolic and membrane-bound carbonic anhydrase in renal control of acid-base

- balance in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Am. J. Physiol. Renal Physiol., 291, F407–F421.
- Gibbs, A., Somero, G. N., 1989. Pressure adaptation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in gills of marine teleosts. J. Exp. Biol., 143, 475-492.
- Gilmour, K. M., Perry, S. F., 2009. Carbonic anhydrase and acid–base regulation in fish. J. Exp. Biol., 212, 1647-1661.
- Giles, M. A. 1988. Accumulation of cadmium by rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during extended exposure. Can. J. Fish Aquat. Sci., 45, 1045–1053.
- Giles, M. A., 1984. Electrolyte and water balance in plasma and urine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during chronic exposure to cadmium. Can. J. Fish Aquat. Sci., 41, 1678–1685.
- Hawkings, G. S., Galvez, F., Goss, G. G., 2004. Seawater acclimation causes independent alterations in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>- and H<sup>+</sup>-ATPase activity in isolated mitochondria-rich cell subtypes of the rainbow trout. J. Exp. Biol., 207, 905-912.
- Hollis, L., McGeer, J. C., McDonald, D. G., Wood, C. M., 2000. Protective effects of calcium against chronic waterborne cadmium exposure to juvenile rainbow trout. Environ. Toxicol. Chem., 19, 2725–2734.
- Huanga, Z., Li, L., Huanga, G., Yanb, Q., Shic, B., Xu, X., 2009. Growth-inhibitory and metal-binding proteins in *Chlorella vulgaris* exposed to cadmium or zinc. Aquat. Toxicol., 91, 54–61.
- Lin, H, Randall, D., 1991. Evidence for the presence of an electrogenic proton pump on the trout gill epithelium. J. Exp. Biol., 161, 119–134.
- Lionetto, M. G., Giordano, M. E., Vilella, S., Schettino, T., 2000. Inhibition of eel enzymatic activities by cadmium. Aquat. Toxicol., 48, 561–571.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275.
- Franklin, N. M., Glover, C. N., Nicol, J. A., Wood, C. M., 2005. Calcium/cadmium interactions at uptake surfaces in rainbow trout: waterborne versus dietary routes of exposure. Environ. Toxicol. Chem., 24, 2954-64.
- Perry, S. F., 1997. The chloride cell: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. Annu. Rev. Physiol., 59, 325–47.
- Perry, S. F., Flik, G., 1988. Characterization of branchial transepithelial calcium fluxes in freshwater trout *Salmo gairdneri*. Am. J. Physiol., 254, 491–498.
- Pratap, H. B., Wendelaar Bonga, S. E., 2007. Calcium homeostasis in low and high calcium water acclimatized *Oreochromis mossambicus* exposed to ambient and dietary cadmium J. Environ. Biol., 28, 385-393.
- Quabius, E. S., Balm, P. H. M., Wendelaar-Bonga, S. E., 1997. Interrenal stress

responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 108, 472-482.

Reid, S. D., McDonald, D. G., 1988. Effects of cadmium, copper, and low pH on ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45, 244–253.

Van Kerkhove, E., Pennemans, V., Swennen, Q., 2010. Cadmium and transport of ions and substances across cell membranes and epithelia. *Biometals*, 23, 823-855.

Verbost, P. M., Flik, G., Lock, R. A. C., Wendelaar Bonga, S. E., 1988. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *J. Membrane. Biol.*, 102, 97–104.

Vitale, A. M., Monserrat, J. M., Castilho, P., Rodriguez, E. M., 1999. Inhibitory effects of cadmium on carbonic anhydrase activity and ionic regulation of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae). *Comp. Biochem. Phys. C*, 122, 121-129.

## 4 ESTRESSE OXIDATIVO E DANOS GENOTÓXICOS EM *PROCHILODUS LINEATUS*

Nesta seção estão descritos os experimentos e resultados referentes à avaliação dos efeitos de duas concentrações nominais de Cd (1 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) em dois tempos (24 e 96 h) de exposição aguda nas defesas antioxidantes e na ocorrência de peroxidação lipídica e danos no DNA na espécie de peixe *P. lineatus*.

### 4.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1.1 Delineamento Experimental

Juvenis de *P. lineatus* (Valenciennes, 1837) (n = 96) com massa de  $10,31 \pm 2,95$  g e comprimento total de  $10,9 \pm 2,51$  (média  $\pm$  DP) foram obtidos na EPUEL. Antes dos experimentos os peixes foram aclimatados por pelo menos cinco dias, em tanques de 300 L. Durante a aclimação, os animais foram alimentados a cada 2 dias, com ração comercial com 36% de proteína (Guabi®, BR), sendo a alimentação suspensa 24 h antes do início e durante os testes de toxicidade. Os parâmetros físicos e químicos da água foram continuamente monitorados.

Depois da aclimação, grupos de peixes (6 a 8 por aquário) foram transferidos para aquários de vidro de 100 L com 80 L de água e divididos nos seguintes grupos: peixes dos grupos CTR expostos somente à água e animais expostos a 1 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de Cd, formando respectivamente os grupos Cd 1 e Cd 10. O Cd foi adicionado à água na concentração nominal de 1 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  na forma de  $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Os testes de toxicidade aguda foram conduzidos em dois tempos experimentais, 24 e 96 h, em experimentos independentes. Todos os aquários foram cheios com água não clorada, e mantidos com aeração constante e fotoperíodo de 12 h:12 h. Durante os testes, a temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade da água foram monitoradas.

Depois de cada período experimental, os peixes foram anestesiados com benzocaína (0,12  $\text{g.L}^{-1}$ ) e amostras de sangue foram retiradas pela veia caudal por meio de seringas heparinizadas e mantidas em gelo. Os animais foram então mortos por secção medular e as brânquias, fígado e rim foram removidos, de acordo

com procedimento aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL (Processo 35004.2011.18), e congelados ( $-80^{\circ}\text{C}$ ).

As amostras de fígado, brânquias e rim foram pesadas e homogeneizadas (1:10 p/v) em tampão fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  50 mM; pH 7,0), centrifugadas (20 min; 13.000 g;  $4^{\circ}\text{C}$ ) e o sobrenadante separado para as análises e dosagens de proteínas totais (Lowry et al., 1951).

#### 4.1.2 Defesa Antioxidante Enzimática e Não Enzimática

A atividade da glutathione-S-transferase (GST) foi determinada seguindo a complexação da glutathione reduzida (GSH) com o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Keen et al., 1976). Em uma cubeta foram adicionados 970  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato ( $25^{\circ}\text{C}$ ), 10  $\mu\text{L}$  de CDBN (100 mM), 10  $\mu\text{L}$  GSH (100 mM) e 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das amostras. Depois de misturados, a solução resultante teve sua cinética de reação lida em espectrofotômetro a 340 nm por 1 min. A atividade da enzima foi expressa em nmol de CDBN conjugado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$  de proteína $^{-1}$ .

A atividade da catalase (CAT) foi determinada através da velocidade de decomposição de peróxido de hidrogênio pela enzima, sendo quantificado o decréscimo de absorvância em espectrofotômetro a 240 nm (Beutler, 1975). As amostras (1:100) foram adicionadas a um meio de reação ( $\text{H}_2\text{O}_2$  0,03%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 0,25 mM), e o decréscimo de sua absorvância a 240 nm determinado durante 1 min. A atividade da enzima foi expressa em  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado. $\text{min}^{-1}.\text{mg}$  proteína $^{-1}$ .

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) foi estimada indiretamente através da oxidação do NADPH em presença de glutathione redutase (GR) e o substrato glutathione oxidada, produzida pela ação da GPx. Uma alíquota (10  $\mu\text{L}$ ) das amostras foi misturada concomitantemente a 1 mL do tampão ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 25 mM, EDTA 2 mM,  $\text{NaN}_3$  5 mM, NADPH 0,2 mM, GSH 1 mM,  $25^{\circ}\text{C}$  e protegido da luz), à GR (1 U) e ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,4 mM) e a cinética da reação foi analisada por 1 minuto em espectrofotômetro a 340 nm. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de NADP em presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . $\text{min}^{-1}.\text{mg}$  proteína $^{-1}$  (Hopkins e Tudhope, 1973).

A concentração de GSH foi estimada de acordo com Beutler et al. (1963) por meio da reação da glutathione com o substrato 5,5'-ditiobis-2-ácido

nitrobenzóico (DTNB), formando o ânion tiolato (TNB). Para o ensaio, cada amostra foi misturada (1:1) com ácido tricloroacético 6% e em seguida com DTNB (2,5 mM) e tampão fosfato de potássio (0,1 M, pH 7,0). A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (Victor™, PerkinElmer) a 412 nm e o conteúdo de GSH foi expresso em  $\mu\text{g}$  de GSH.mg proteína<sup>-1</sup>, a partir de uma curva padrão 5 a 200  $\mu\text{M}$  de GSH.

#### 4.1.3 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada em amostras de fígado e rim por meio do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que quantifica o malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação lipídica. A leitura do ensaio foi feita em espectrofotômetro (Victor™, PerkinElmer) em 530 nm, segundo metodologia estabelecidas por Satoh (1978). Utilizou-se curva padrão de MDA e os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$  de MDA.mg proteína<sup>-1</sup>.

#### 4.1.4 Ensaio do Cometa

O ensaio alcalino do cometa foi realizado com eritrócitos, com base na metodologia descrita por Singh et al. (1988) e com modificações descritas por Cavalcante et al. (2008). Após a amostragem, o sangue foi adicionado à solução tampão (NaCl 126,6 mM, KCL 4,8 mM, CaCl 1,5 mM, NaHCO<sub>3</sub> 3,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,9 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,9 mM) e misturado com agarose de baixo ponto de fusão. Esta mistura foi colocada em lâmina de vidro previamente coberta com agarose normal, coberta com lamínula, e permaneceu na geladeira por 30 min. Em seguida as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram colocadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 10 % DMSO, 1 mL Triton X-100, pH 10,0) por, no mínimo, 1 hora. Após esse tempo as lâminas foram transferidas para cubas de eletroforese contendo solução tampão (0,3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH > 13) e permaneceram por 30 minutos. Logo depois foram submetidas à eletroforese por 20 minutos (300 mA, 25 V, 1 V.cm<sup>-1</sup>), e após as lâminas foram neutralizadas com tampão (0,4 M Tris, pH 7,5), em 3 lavagens de 5 min, e fixadas em etanol por 10 minutos.

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

#### 4.2 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

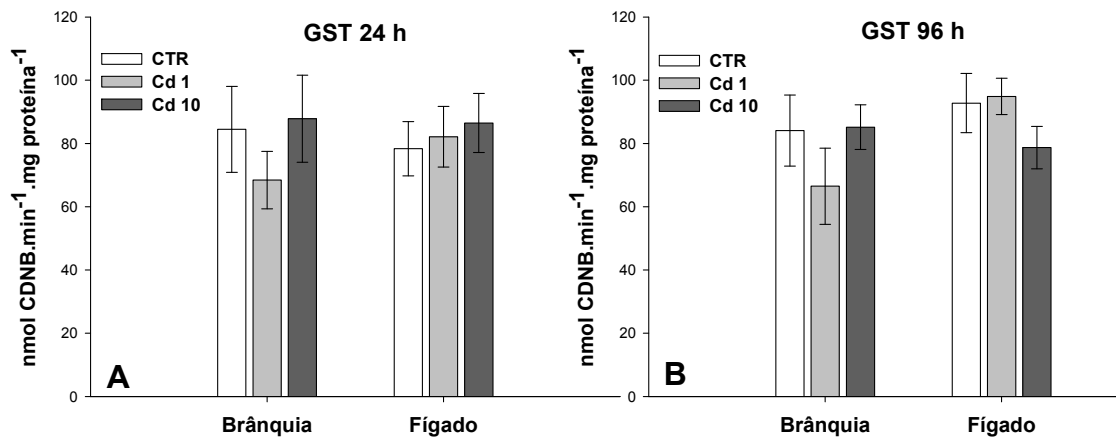
Os resultados estão representados como média  $\pm$  EP. Após a verificação da normalidade e homogeneidade de variância, os resultados dos diferentes parâmetros obtidos para os peixes dos grupos CTR, Cd1 e Cd10, para cada tempo experimental (24 e 96 h) foram comparados entre si por meio de análise variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kruskal-Wallis), dependendo da distribuição dos dados. Quando indicado, as diferenças foram localizadas pelo teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls (SNK). Valores  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 4.3 RESULTADOS

Durante todo o período experimental os valores de temperatura, oxigênio dissolvido, pH, condutividade, dureza e conteúdo de Cd não variaram significativamente entre os grupos. A Tabela 3.1 apresenta os valores obtidos na análise da água dos aquários controles e experimentais utilizados neste trabalho.

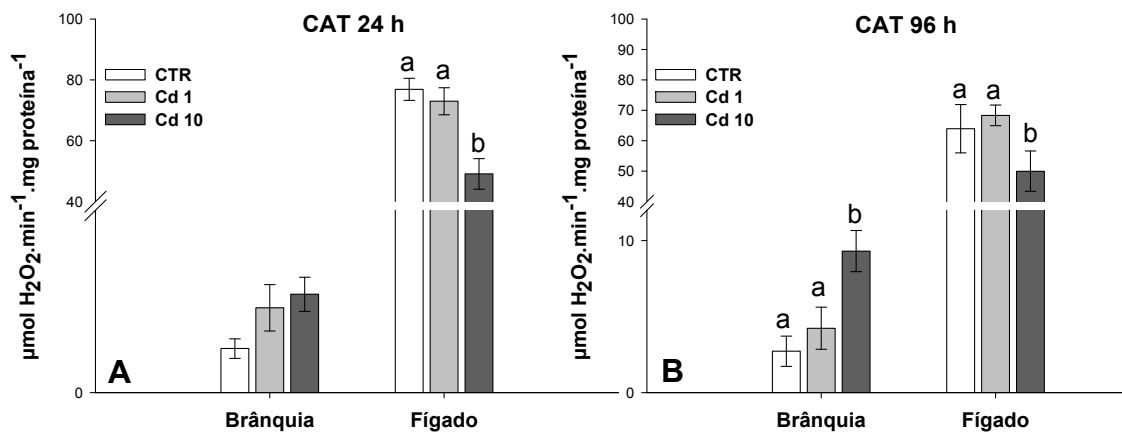
Os curimbas submetidos por 24 e 96 h ao Cd 1 ou Cd 10 não apresentaram nenhuma alteração significativa na atividade da GST em seus tecidos branquial ( $P \geq 0,368$ ) e hepático ( $P \geq 0,344$ ) (Fig. 4.1).

**Figura 4.1** - Atividade da GST (média  $\pm$  EP, n = 6) em brânquia e fígado de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h.



A CAT branquial dos peixes expostos ao cádmio não sofreu alterações de atividade em relação ao controle após os testes de 24 h ( $P = 0,101$ ) (Fig. 4.2). Contudo, após 96 h, os animais do grupo Cd 10 apresentaram aumento significativo de cerca de 340% na atividade branquial desta enzima em relação ao grupo CTR ( $P = 0,025$ ). A atividade da CAT no fígado foi de 20 a 40 X maior do que a observada na brânquia e apresentou diminuição significativa no grupo Cd 10, em relação aos respectivos grupos CTR, após exposição por 24 ( $P < 0,01$ ) e 96 h ( $P = 0,02$ ).

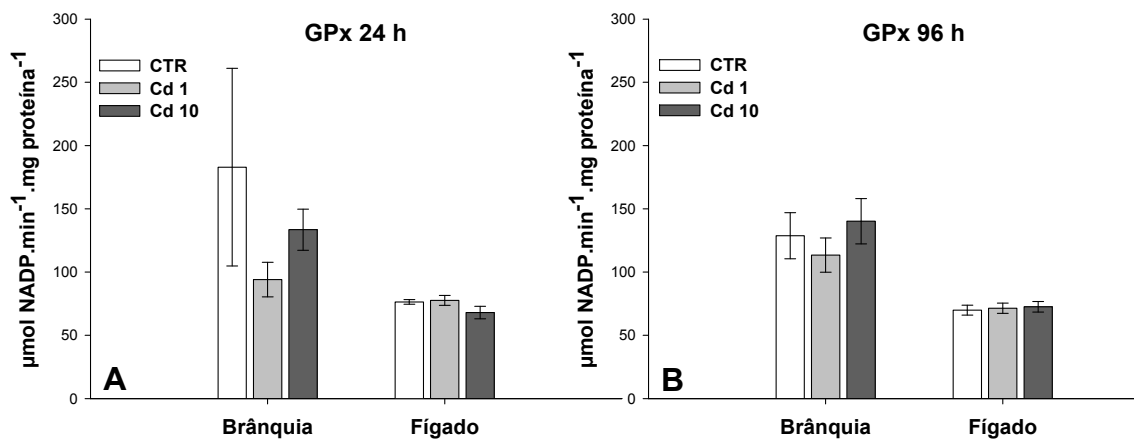
**Figura 4.2** - Atividade da catalase (média  $\pm$  EP, n = 6) em brânquia e fígado de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10), para o mesmo órgão no mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

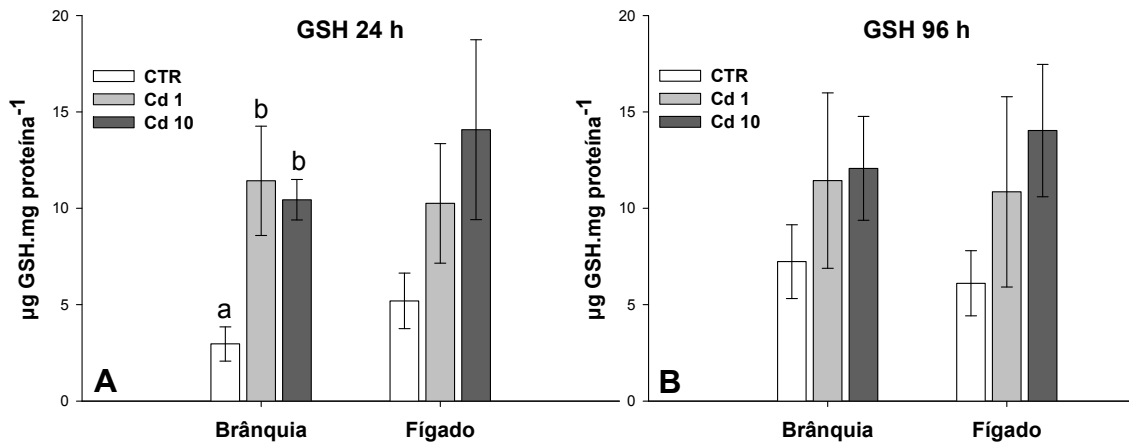
A exposição aguda dos peixes ao Cd, nas concentrações e períodos avaliados neste trabalho, não modificaram significativamente a atividade da GPx (Fig. 4.3) branquial ( $P_{24h} = 0,072$ ;  $P_{96h} = 0,534$ ) ou hepática ( $P_{24h} = 0,229$ ;  $P_{96h} = 0,339$ ).

**Figura 4.3** - Atividade da GPx (média  $\pm$  EP, n = 6) em brânquia e fígado de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h.



A concentração de GSH na brânquia (Fig. 4.4) dos animais dos grupos Cd 1 e Cd 10 aumentaram significativamente após 24 h de exposição em relação ao respectivo CTR ( $P = 0,019$ ). Entretanto, as brânquias dos animais que foram submetidos ao Cd por 96 h não apresentaram variações significativas na concentração de GSH ( $P = 0,248$ ). No fígado (Fig. 4.4) de *P. lineatus* não foram constatadas alterações significativas nas concentrações de GSH dos animais expostos ao cádmio por 24 h ( $P = 0,182$ ) ou 96 h ( $P = 0,193$ ).

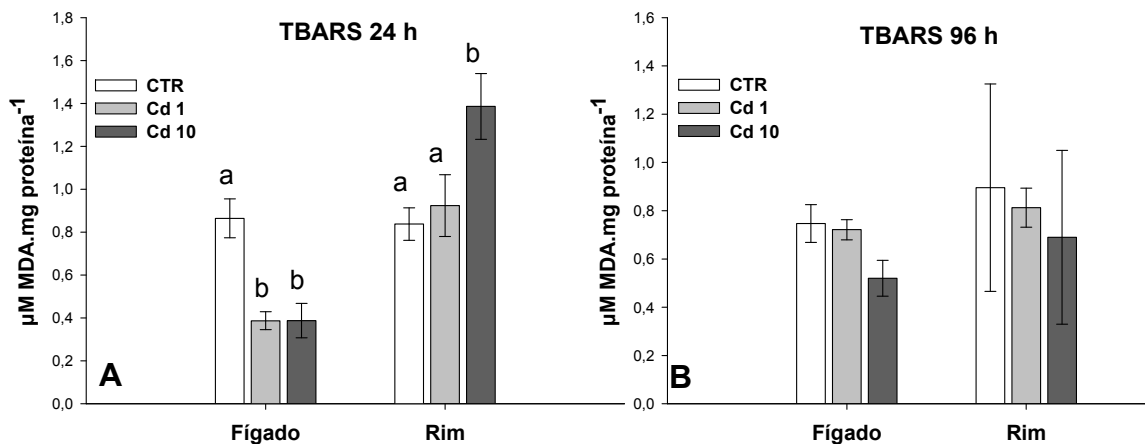
**Figura 4.4** - Concentração de GSH (média  $\pm$  EP, n = 6) em brânquia e fígado de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10), para o mesmo órgão no mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

Os resultados do ensaio do TBARS para fígado e rim estão apresentados na Figura 4.5. O conteúdo de MDA hepático dos grupos Cd 1 e Cd 10 ( $P = 0,003$ ) diminuíram em relação ao grupo CTR após a exposição de 24 h, no entanto após 96 h de exposição não houve variação significativa na quantidade de MDA no fígado dos peixes ( $P = 0,18$ ). O conteúdo de MDA aumentou significativamente no rim dos peixes do grupo Cd 10, em relação ao CTR, após 24 h de exposição ( $P = 0,011$ ), mas após 96 h de exposição não foram verificadas alterações significativas no conteúdo de MDA no rim dos peixes ( $P = 0,097$ ).

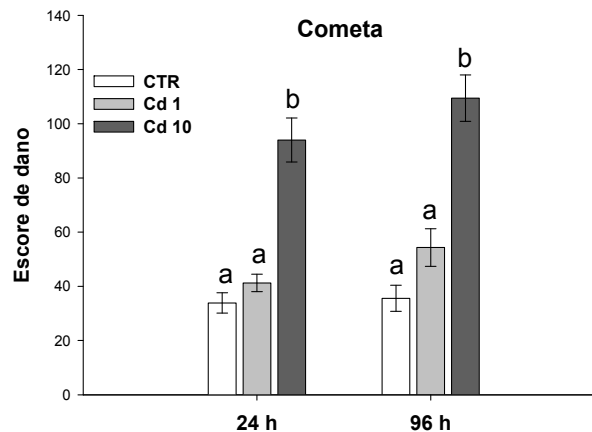
**Figura 4.5** - Conteúdo de MDA (média  $\pm$  EP, n = 5-10) em fígado e rim de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10), para o mesmo órgão no mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

Os resultados do ensaio do cometa com os eritrócitos (Fig. 4.6) de *P. lineatus* demonstraram que a exposição ao Cd 10 causou aumento significativo do escore médio de dano nos tempos experimentais de 24 ( $P < 0,001$ ) e 96 h ( $P < 0,001$ ). Os animais do grupo Cd 1 não sofreram variações significativas no escore de dano.

**Figura 4.6** - Escores de danos no DNA (média  $\pm$  EP, n = 6-8) de eritrócitos de *P. lineatus* expostos apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio, durante 24 e 96 h



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10), para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

#### 4.4 DISCUSSÃO

O Cd é altamente tóxico para os peixes, porém os mecanismos responsáveis pela toxicidade do Cd ainda não são completamente conhecidos. Ao que parece, o Cd não gera radicais livres de maneira direta (Ochi et al., 1997), mas há evidências de que pode formar ERO quando presente em diversos órgãos, sendo o motivo de alterações nas estruturas proteicas, de membranas e das moléculas de DNA (Valko et al., 2005; Thévenod, 2009).

Estudos prévios reportam os efeitos do Cd em enzimas de defesa antioxidante que participam da fase II do processo de detoxificação. A GST é uma componente celular da fase II, responsável por promover a conjugação de xenobióticos orgânicos ou seus metabólitos com a GSH. Os efeitos dos metais geram resultados conflitantes sobre a atividade e expressão gênica da GST em diferentes tecidos (Arrigo, 1999; Rahaman et al., 1999). As condições experimentais impostas ao *P. lineatus* não acarretaram em alterações nas funções da GST

branquial ou hepática. Este não parece ser o efeito mais comum frente à exposição de *P. lineatus* ao Cd, mas a exposição aguda ao Cu foi capaz de induzir a atividade da GST em fígado desta espécie de peixe (Camargo e Martinez, 2006). Já para *Sparus aurata* a atividade da GST foi induzida após 12, 24 e 48 h de exposição ao Cd injetado intraperitonealmente ( $200 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) (Bouraoui et al., 2008).

A atividade da CAT nas brânquias de *P. lineatus* é bastante reduzida, e assim como averiguado por Hidalgo et al. (2002), a atividade da CAT é maior no fígado. A exposição aguda de *P. lineatus* ao Cd 10 resultou em uma marcante diminuição na atividade da CAT hepática. Por outro lado, Atli et al. (2006) observaram aumento da CAT hepática após 96 h de exposição ao Cd assim como ocorre para a maioria dos metais, exceto a prata (Ag). Os metais aumentaram a atividade da catalase, mas a sua não ativação pela Ag pode ser consequência da inibição resultante da interação da prata com o grupamento  $-\text{SH}$  (Atli et al., 2006). A diminuição da atividade da CAT também foi observado no peixe *Fundulus heteroclitus* devido a provável interação do Cd com a CAT (Pruell e Egelhart, 1980). Em outras três espécies de peixes de água doce não houve alteração funcional na CAT por Cd (Palace e Kleverkamp, 1993). Alterações da atividade das enzimas antioxidantes em testes de laboratório utilizando poluentes orgânicos ou metais são conhecidas, mas as respostas são variadas para diferentes espécies e enzimas. A literatura mostra que o fígado é o órgão com maior atividade das enzimas antioxidantes e o local mais capacitado para enfrentar o estresse oxidativo. Fato sempre correlacionado com a função hepática de processar múltiplas reações oxidativas geradoras de ERO.

Uma vez que o Cd pode gerar radicais livres indiretamente, a partir do peróxido de hidrogênio (Ochi et al., 1997, Valko et al., 2005), a ausência de alterações na CAT de brânquias e fígado nos curimbas expostos a menor concentração de Cd poderia ser justificada pela ação efetiva da GPx na decomposição da  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Já a redução da atividade da CAT hepática em peixes do grupo Cd 10 poderia ser consequência do excesso de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , molécula capaz de interferir na função da CAT (Radi e Matkovic, 1988). Como não foi constatada nenhuma variação significativa na atividade da GPx em fígado e brânquias de *P. lineatus* é pouco plausível que a GPx tenha sido a responsável pela degradação do  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerada em decorrência do Cd. Para tanto a GPx deveria degradar o  $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidando a GSH. Ao analisar a condição das defesas redox de *P. lineatus*,

considerando-se que houve elevação inicial no conteúdo de GSH nas brânquias, esta hipótese fica ainda mais enfraquecida. A estes argumentos deve-se acrescentar o não envolvimento da GST como parâmetro sensível à exposição aguda ao Cd, pois sua atividade aumentada deveria promover em conjunto com a atividade da GPx, efluxo e oxidação da GSH respectivamente, culminando com sua depleção intracelular, o que é considerado um marcador de estresse oxidativo (Franco e Cidlowski, 2012).

Em situações onde fica estabelecida a alteração do balanço redox celular, devido à presença de substâncias pró-oxidantes sem que as defesas celulares possam neutralizá-las, fica caracterizado o estresse oxidativo. Esta condição adversa é particularmente prejudicial às membranas celulares e moléculas de DNA. A exposição a metais gera LPO dependendo do tempo de exposição, e tais efeitos são correlacionados com alterações morfológicas teciduais (Pandey et al., 2008). Em peixes a ocorrência da LPO é precedida ou acompanhada de alterações no sistema de defesa antioxidante, o que geralmente acumula evidência do status oxidativo do animal (Cao et al., 2010). Em um mesmo animal diferentes órgãos alvo podem apresentar respostas enzimáticas distintas e conseqüentemente sofrer ou não LPO (Cao et al., 2012). Em *P. lineatus* submetidos ao Cd por 24 h não houve respostas contra o estresse oxidativo, medidas neste trabalho, que possam justificar a diminuição da LPO hepática. Este efeito contrasta com os resultados obtidos para a LPO do tecido renal, onde um houve um aumento apenas transitório da LPO.

Compostos que tem o potencial de causar danos no material genético dos organismos são considerados agentes genotóxicos. Essas substâncias podem agir diretamente, alterando a estrutura do DNA. Tais efeitos podem incluir rupturas na cadeia de DNA, modificações nos nucleotídeos, aberrações cromossômicas e mutações de ponto (Frenzilli et al., 2004). A perda da integridade do DNA, se não for reparada, pode determinar a indução de mutação, aberrações cromossômicas, defeitos congênitos e câncer. O Cd é um elemento não essencial com potencial oncogênico e genotóxico para os animais aquáticos (Zhiyi e Haowen, 2004).

O presente trabalho demonstra pela primeira vez os efeitos genotóxicos do Cd em células eritrocitárias de *P. lineatus*. Outros trabalhos já demonstraram a sensibilidade desta espécie aos danos genotóxicos elicitados por

inseticidas e herbicidas (Cavalcante et al., 2008; Simoniello et al., 2009; Santos e Martinez, 2012;). Os efeitos genotóxicos do Cd apareceram em eritrócitos *P. lineatus* já após 24 h de exposição a maior concentração testada e permaceram até 96 h. Em *S. aurata* não foi observado danos no DNA após 11 dias de exposição a uma concentração maior de Cd (Isani et al., 2009).

Os mecanismos da toxicidade aguda do Cd nas condições permitidas pela legislação brasileira (CONAMA) não estão primordialmente relacionados com os danos oxidativos. Como já comentado, a maioria das defesas celulares antioxidantes e LPO avaliadas não indicaram uma situação de estresse oxidativo conclusiva. Os efeitos do Cd sobre o material genético dos eritrócitos destacaram-se dentre os demais parâmetros avaliados. Neste caso a ação das ERO sobre o material genético deve ser entendida como secundária ou até mesmo desconsiderada. O que não se pode concluir é se as alterações nas moléculas de DNA foram induzidas diretamente pelo metal, pela sua interação com proteínas associadas ao DNA ou se pela inibição da maquinaria de reparo genético.

O teste do cometa demonstrou ser uma avaliação sensível que permitiu detectar danos primários no DNA de células individuais. Segundo os nossos resultados o teste do cometa é uma ferramenta que possibilita relacionar danos no DNA com a exposição aguda de organismos aquáticos a compostos genotóxicos como o Cd. A avaliação de danos genotóxicos pode ser utilizada como biomarcador para biomonitoramento de ambientes aquáticos, por possuir sensibilidade suficiente para alertar sobre os perigos da contaminação por Cd antes que efeitos deletérios possam ocorrer na biota aquática. Para melhor compreensão dos efeitos agudos do Cd sobre a defesa antioxidante de *P. lineatus* estudos mais detalhados precisam ser realizados.

Em conclusão, exposição aguda de curimbas juvenis às concentrações de Cd permitidas pelo CONAMA não comprometeu a defesa antioxidante, ou causou marcante estresse oxidativo embora gerado aumento nos danos genotóxicos eritrocitários.

## 4.5 REFERÊNCIAS

- Almeida, J. A., Barreto, R. E., Novelli, E. L. B., Castro, F. J., Moron, S. E., 2009. Oxidative stress biomarkers and aggressive behavior in fish exposed to aquatic cadmium contamination. *Neotrop. Ichth.*, 7, 103-108.
- Arrigo, A. P., 1999. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 936–944.
- Beutler, E., Durom, O., Kelly, B. M., 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J. Lab. Clin. Med.*, 61, 882-890.
- Beutler, E., 1975. *Red Cell Metabolism: a manual of biochemical methods*. New York: Grune & Straton.
- Bouraoui, Z., Banni, M., Ghedira, J., Clerandau, C., Guerbej, H., Narbonne, J. F., Boussetta, H., 2008. Acute effects of cadmium on liver phase I a phase II enzymes and metallothionein accumulation on sea bream *Sparus aurata*. *Fish Physiol. Biochem.*, 34, 201–207.
- Cao, L., Huang, W., Liu, J., Yin, X., Dou, S., 2010. Accumulation and oxidative stress biomarkers in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic cadmium exposure. *Comp. Biochem. Phys. C*, 151, 386–392.
- Cao, L., Huang, W., Shana, X., Yed, Z., Shuozen, D., 2012. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder. *Environ. Toxicol. Phar.*, 33, 16-25.
- Cavalcante, D. G., Martinez, C. B., Sofia, S. H., 2008. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.*, 655, 41-46.
- Franco, R., Cidlowski, J. A., 2012. Glutathione Efflux and Cell Death Antiox. *Redox Sign.*, 17, 1694-1713.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Barga, I. D., Nigro, M., Forlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J., 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparous*) from Goteborg harbor. *Mutat. Res.*, 552, 187–195.
- Hidalgo, M. C., Exposito, A., Palma, J. M., Higuera, M., 2002. Oxidative stress generated by dietary Zn-deficiency: studies in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 34, 183–193.
- Hopkins, J., Tudhope, G. R., 1973. Glutathione peroxidase in human red cells in health and disease. *J. Haematol.*, 25, 563–575.
- Isani, G., Andreani, G., Cocchioni, F., Fedeli, D., Carpena, E., Falcioni, G, 2009. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72, 224– 230.
- Keen, J. H., Habig, W. H., Jakoby, W. B. 1976. Mechanism for several activities of the glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.*, 20, 6183-6188.

Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

Ochi, T., Takahashi, K., Ohsawa, M., 1997. Indirect evidence for the induction of a pro-oxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mut. Res.*, 180, 257–266.

Pandeya, B. S., Parvezb, S., Ansaria, R. A., Alia, M., Kaura, M., Hayat, F., Ahmada, F., Raisuddina, S., 2008. Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctate*. *Chem-Biol. Interac.*, 174, 183–192.

Palace, V. P., Klaverkamp, J. F., 1993. Variation of hepatic enzymes in three species of freshwater fish from Precambrian shield lakes and the effect of cadmium exposure. *Comp. Biochem. Phys. C*, 104, 147–154.

Pruell, R. J., Engelhart, 1980. Liver cadmium uptake, catalase inhibition and cadmium thionein production in the killfish (*Fundulus heteroclitus*) induced by experimental cadmium exposure. *Mar. Environ. Res.*, 3, 101-111.

Radi, A. A. R., Matkovics, B., 1988. Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein contents and lipid peroxidation of carp tissues. *Comp. Biochem. Phys. C*, 90, 69–72.

Rahaman, Q., Abidi, P., Afaq, F., Schiffman, D., Mossman, B. T., Kamp, D. W., Athar, M., 1999. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit. Rev. Toxicol.*, 29, 543–568.

Reynders, H., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W. M., Blust, R., 2006. Dynamics of cadmium accumulation and effects in common carp (*Cyprinus carpio*) during simultaneous exposure to water and food (*Tubifex tubifex*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 25, 1558–1567.

Satoh, K. 1978. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin.Chim. Acta.*, 90, 37-43.

Santos, T. G., Martinez, C. B. R., 2012. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*, 89, 1118–1125.

Simoniello, M. F., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., Scagnetti, J., Parma, M. J., 2009. Alkaline Comet Assay for Genotoxic Effect Detection in Neotropical Fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 83, 155–158.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.*, 175, 184-91.

Thévenod, F., 2009. Cadmium and cellular signaling cascades: to be or not to be? *Toxicol. Appl. Pharm.*, 238, 221–239.

Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D., 2005. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.*, 12, 1161–1208.

Zhiyi, R., Haowen, Y., 2004. A method for genotoxicity detection using random amplified polymorphism DNA with *Danio rerio*. *Ecotox. Environ. Saf.*, 58, 96–103.

## 5 BIOACUMULAÇÃO DE CÁDMIO E SEUS EFEITOS EM PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS DE *PROCHILODUS LINEATUS*

Nesta seção estão descritos os experimentos e resultados referentes à avaliação dos efeitos de duas concentrações nominais de Cd (1 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), em dois tempos de exposição (24 e 96 h), no acúmulo de cádmio, no conteúdo de metalotioneínas, na atividade da acetilcolinesterase e no comportamento natatório de *P. lineatus*.

### 5.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 5.1.1 Animais

Juvenis de *P. lineatus* foram fornecidos pela Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (EPUEL). Os peixes foram aclimatados por pelo menos 5 dias, em tanques de 300 L, com água desclorada e aeração constante, sob fotoperíodo de 12h/12h. Ao longo de todo o experimento, os parâmetros físicos e químicos da água foram monitorados usando uma sonda para multiparâmetros (Horiba U-50). Os animais foram alimentados com ração (Guabi®, BR) no segundo, quarto e sexto dia de aclimação e a alimentação foi suspensa 24 h antes e durante o período experimental. Os animais ( $n = 96$ ), com massa de  $11,64 \pm 4,1$  e comprimento total de  $10,32 \pm 1,31$ , foram submetidos a testes de exposição aguda do tipo estático por 24 e 96 horas. Conjuntos de peixes ( $n = 6$  a  $8$ ) randomicamente selecionados foram agrupados em aquários com 80 litros de água desclorada (CTR) ou com concentrações nominais de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). As concentrações utilizadas foram definidas de acordo com a legislação brasileira para águas doces de classes 1 e 2 (1  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) e 3 e 4 (10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ), segundo Resolução CONAMA nº 357 (2005). Antes do início e ao término de cada experimento amostras de água foram coletadas dos aquários para a determinação das concentrações de Cd total e as concentrações de Cd dissolvido foram quantificadas em amostras de água filtrada (malha de 0,45  $\mu\text{m}$ ). Após a coleta e filtragem as amostras de água foram acidificadas com  $\text{HNO}_3$  1 % ( $\text{pH} \leq 2$ ).

### 5.1.2 Protocolo Experimental para Análise de Comportamento

Após as exposições aguda ao Cd (CONAMA), os peixes foram transferidos individualmente para um aquário-teste de 30 L (50 x 50 x 15 cm) contendo águas com concentrações nominais de Cd semelhantes aos aquários de onde os indivíduos foram retirados. Cada aquário estava inserido em uma caixa isolada, provida de câmara e de retroiluminação (Fig. 5.1). As tomadas das imagens foram feitas frontalmente e a atividade natatória espontânea foi registrada por um software para avaliação do comportamento de animais em movimento – Sacam, Embrapa Instrumentação (Jorge et al., 2005b). Foram registradas, em tempo real, as coordenadas x e y do movimento a 2 quadros por segundo e calculadas a distância percorrida, a velocidade média por tempo de movimento e a exploração do espaço nas áreas pré-definidas virtualmente (áreas superior e inferior da coluna d'água, de dimensões iguais). As tomadas foram de 15 minutos, com 5 minutos de adaptação prévia ao aquário-teste para cada um dos peixes. A fim de evitar variações na locomoção devido à variação do ciclo circadiano, os experimentos foram realizados sempre entre as 10:00 h e 16:00 h.

**Figura 5.1** - Aquário e câmara para a obtenção dos dados de comportamentos natatórios.



### 5.1.3 Protocolo Experimental para Análises Químicas e Bioquímicas

Ao final de cada período experimental os peixes foram prontamente anestesiados com  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  de benzocaína, mortos por secção medular. Para quantificação de Cd e PSMT no músculo branco, brânquia, fígado e rim foram utilizados os animais que participaram do experimento de comportamento. O encéfalo e o músculo branco empregados nos ensaios da AChE foram obtidos a partir de um experimento independente. Todos os órgãos foram transferidos para microtubos plásticos e mantidos congelados ( $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até as análises.

#### 5.1.4 Acetilcolinesterase (AChE)

Amostras de tecido cerebral e muscular foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio ( $0,1 \text{ M}$ ;  $\text{pH } 7,5$ ;  $10\% \text{ p/v}$ ) e centrifugadas ( $10.000 \text{ g}$ ,  $20 \text{ min}$ ,  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para a determinação da atividade da AChE, de acordo com o método de Ellman et al. (1961), adaptado para microplaca por Alves Costa et al. (2007). A quantificação da atividade da AChE ( $\text{nmol DTNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$ ) ocorreu a partir da reação do substrato de iodeto de acetilcolina ( $9 \text{ mM}$ ) com o reagente de cor contendo DTNB ( $0,5 \text{ mM}$ ). A tiocolina, produto da degradação do iodeto de acetilcolina pela AChE reage com o DTNB, formando o nitrobenzoato, uma ânion amarelo. As leituras da variação da absorbância da solução, durante 6 minutos, foram feitas por espectrofotometria a  $415 \text{ nm}$  e a concentração de proteínas totais foram determinadas pelo método Lowry et al. (1951).

#### 5.1.5 Bioacumulação de Cd

A análise da concentração de Cd foi realizada em tecido muscular, branquial, hepático e renal. Após a pesagem, os tecidos permaneceram em estufa a  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 48 horas, para secagem. O tecido seco foi acondicionado em tubo criogênico e a ele foi adicionado ácido nítrico supra puro (Merck)  $1 \text{ N}$  na proporção  $1:5 \text{ (p/v)}$ . Os tubos, tampados, foram reconduzidos à estufa por mais  $48 \text{ h}$  a  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$  até completa digestão ácida (Alves e Wood, 2006). Após este período a solução foi centrifugada e o sobrenadante foi diluído em  $\text{HNO}_3 \text{ } 1\%$  para quantificação do metal em espectrofotômetro de absorção atômica (Perkin Elmer A700) por método de

atomização eletrotérmica acoplado ao forno de grafite. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de Cd.g de tecido úmido<sup>-1</sup>. O limite de detecção do método utilizados é  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Foi preparada uma curva padrão a partir de uma solução padrão de  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  (Specsol) com certificação do *National Institute of Standards and Technology* (NIST).

#### 5.1.6 Conteúdo de Proteínas Semelhantes a Metalotioneínas (PSMT)

Os tecidos foram homogeneizados (1:5-m/v) em tampão (Tris-HCl 20 mM, sacarose 0,5 mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,01 %, pH 8,6) e centrifugados por 45 minutos (18.600 g; 4 °C) e o sobrenadante foi submetido a fracionamento etanol/clorofórmio ácido para obtenção de uma fração de metaloproteínas parcialmente purificada. Nesta fração foram quantificados os grupos sulfidril (-SH) utilizando-se o reagente de Ellman, em espectrofotômetro a 412 nm. A glutatona reduzida (GSH) foi utilizada como padrão e o conteúdo de metalotioneínas foi expresso em  $\mu\text{mol}$  de GSH mg de proteína<sup>-1</sup> (Viarengo et al., 1997). O conteúdo de proteínas totais foram quantificadas pelo método descrito por Lowry et al. (1951).

## 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EP. Após a verificação da normalidade e homogeneidade de variância, os resultados dos diferentes parâmetros obtidos para os peixes dos grupos CTR, Cd 1 e Cd 10 foram comparados entre si, para cada tempo de exposição, por meio de análise de variância paramétrica (ANOVA) ou não paramétrica (Kuskall Wallis), dependendo da distribuição dos dados. O teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls (SNK) foi utilizado para a localização das diferenças, quando necessário. Valores  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 5.3 RESULTADOS

Não houve mortalidade durante os experimentos realizados e os parâmetros físicos e químicos da água monitorados durante os ensaios não apresentaram variações significativas entre os grupos (média  $\pm$  EP): temperatura

21,21 ± 0,95 °C ; pH 6,87 ± 0,55; oxigênio dissolvido 8,0 ± 0,87 mg O<sub>2</sub>.L<sup>-1</sup>; condutividade 85 ± 10,50 μS.cm<sup>-1</sup>, dureza 59,6 ± 3,7 mg CaCO<sub>3</sub>.L<sup>-1</sup>. As concentrações de Cd total e dissolvido nas amostras de água dos aquários utilizados nos experimentos estão apresentadas na Tabela 5.1

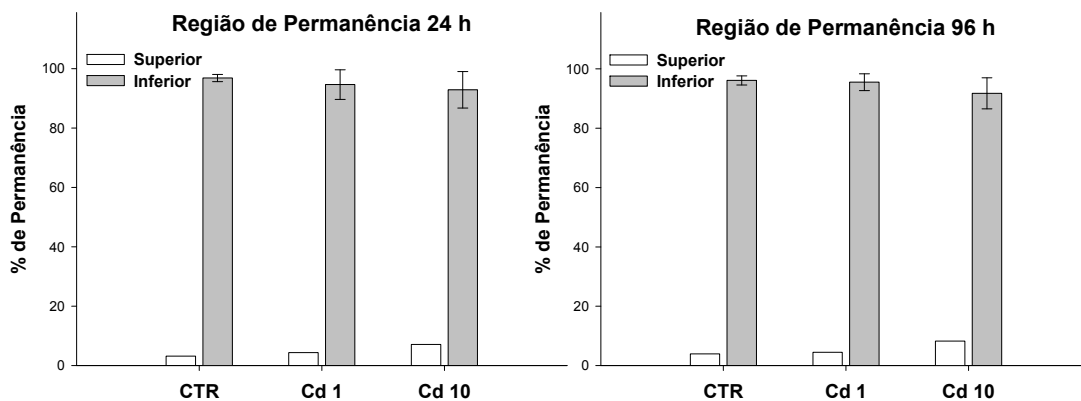
**Tabela 5.1** - Concentrações de Cd (μg.L<sup>-1</sup>) total e dissolvido quantificado nos grupos ao longo dos experimentos.

Condições Experimentais	CTR		Cd 1		Cd 10	
	Total	Dissolvido	Total	Dissolvido	Total	Dissolvido
0 h	ND	ND	1,02 ± 0,16	0,94 ± 0,09	9,92 ± 0,22	9,21 ± 0,43
24 h	ND	ND	0,94 ± 0,12	0,88 ± 0,13	8,95 ± 0,46	8,13 ± 0,58
96 h	ND	ND	0,82 ± 0,19	0,79 ± 0,15	7,63 ± 0,52	6,14 ± 0,31

Os valores correspondem à média ± EP (n = 3). nd = não detectado.

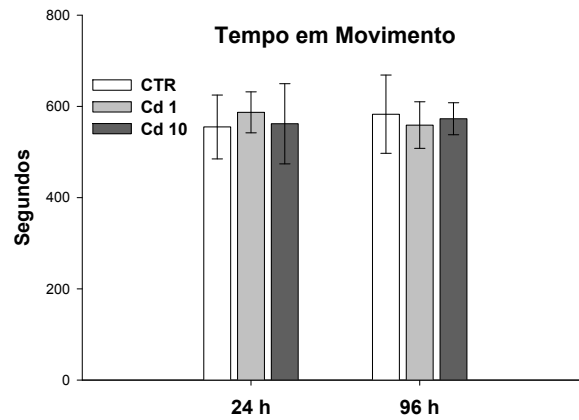
Os *P. lineatus* submetidos à avaliação comportamental espontânea em todas as condições experimentais, permaneceram a maior parte do tempo (> 90%) em que foram monitorados na metade inferior do aquário (Fig. 5.1).

**Figura 5.2** - Tempo médio (n= 6 - 7) de ocupação das áreas superiores e inferiores (em % do tempo total) do aquário por *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1 μg.L<sup>-1</sup> (Cd 1) e 10 μg.L<sup>-1</sup> (Cd 10) de cádmio.



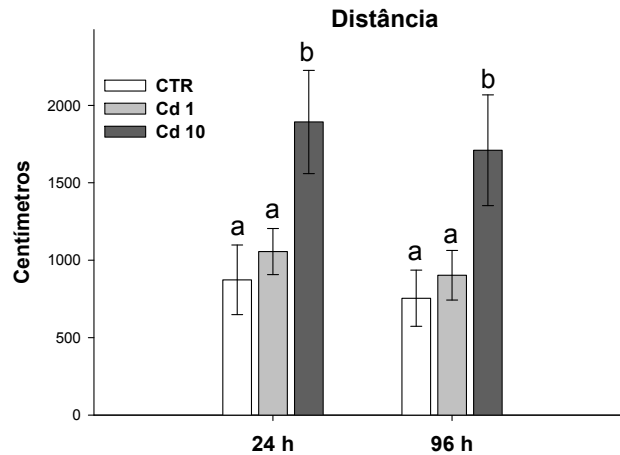
O tempo em movimento dos animais sob avaliação da atividade natatória espontânea estão apresentados na Figura 5.2. A quantidade de tempo em movimento não foi alterada pelo tratamento com Cd ( $P_{24h} = 0,83$ ;  $P_{96h} = 0,91$ ).

**Figura 5.3** - Tempo em movimento (média  $\pm$  EP,  $n = 6 - 7$ ) de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio.



A distância percorrida (Fig. 5.3) pelos peixes durante a avaliação comportamental foi significativamente maior nos indivíduos expostos ao Cd 10, em relação aos peixes dos respectivos grupos Cd 1 e CTR, após exposição de 24 h ( $P = 0,017$ ) e 96 h ( $P = 0,003$ ).

**Figura 5.4** - Distância percorrida (média  $\pm$  EP,  $n = 6 - 7$ ) por *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio

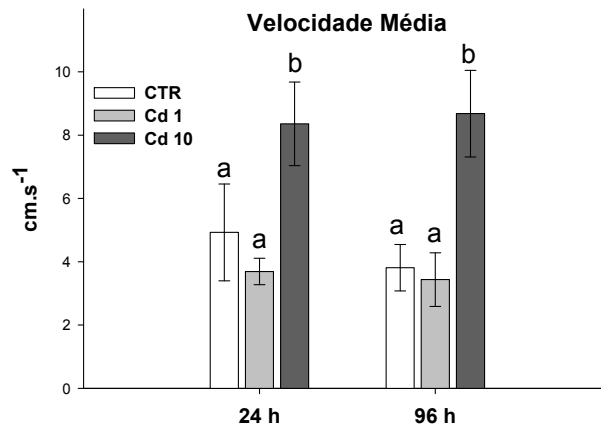


Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10) para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

A velocidade média da atividade natatória de *P. lineatus* (Fig. 5.4) expostos ao Cd 1 por 24 h e 96 h, não foi alterada significativamente em relação ao respectivo CTR ( $P = 0,606$ ). Entretanto, após 96 h de exposição ao Cd 1 e Cd 10 os

peixes apresentaram velocidade de natação significativamente maior do que nos grupos CTR e Cd 1 ( $P = 0,003$ ).

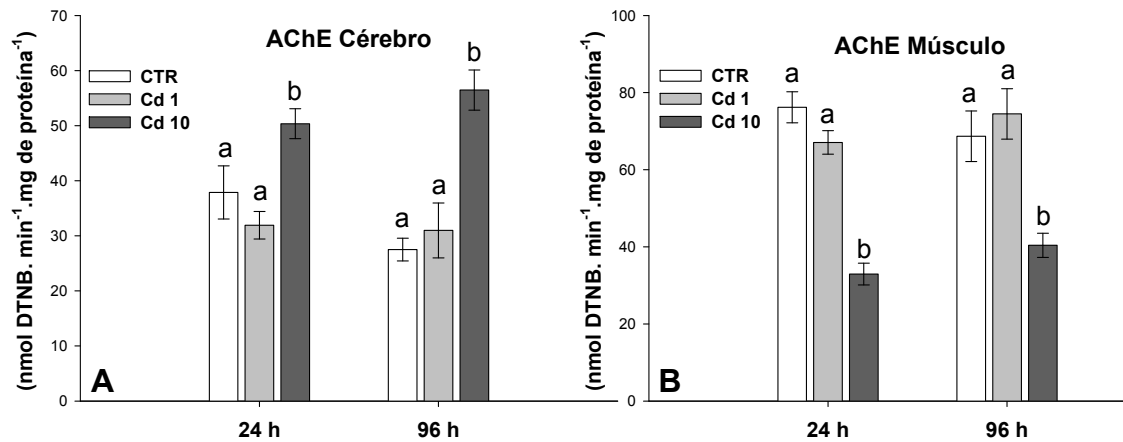
**Figura 5.5** - Velocidade de natação (média  $\pm$  EP,  $n = 6 - 7$ ) de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio.



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10) para o mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

A atividade da AChE cerebral e muscular de *P. lineatus* foi significativamente alterada pelo Cd (Fig. 5.5). No cérebro foi observada atividade significativamente maior nos animais expostos ao Cd 10, durante 24 h ( $P = 0,003$ ) e 96 h ( $P = 0,003$ ), em relação aos respectivos grupos CTR e Cd 1. Por outro lado, no tecido muscular a atividade da AChE foi significativamente menor nos peixes expostos ao Cd 10, durante 24 h ( $P < 0,001$ ) e 96 h ( $P = 0,001$ ), em relação aos respectivos grupos CTR e Cd 1.

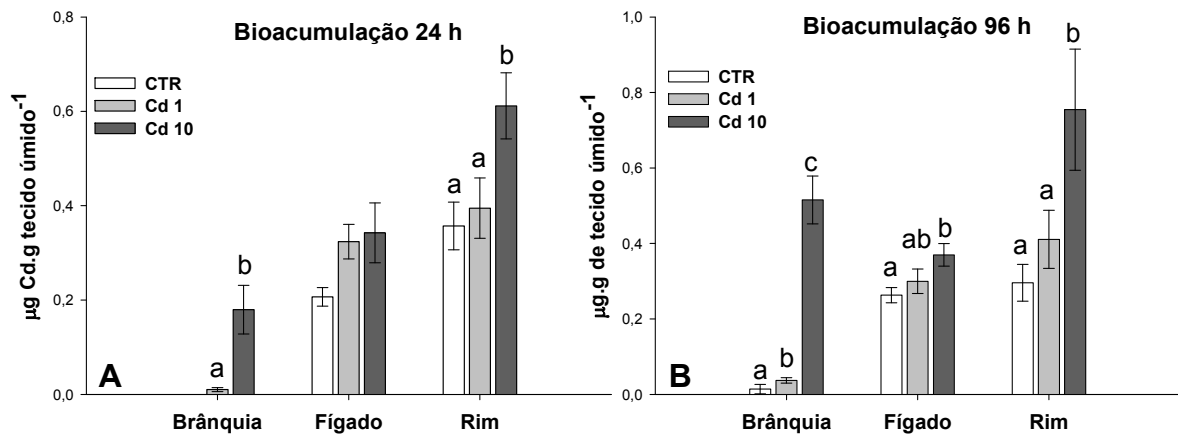
**Figura 5.6** - Atividade da AChE (média  $\pm$  EP, n= 6) cerebral e muscular de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de 1  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio.



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10), para o mesmo órgão, no mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

As análises de quantificação de Cd nos tecidos de *P. lineatus* foram acompanhadas pela dosagem de Cd em um tecido de referência (ERM - CE728 - IRMM). A recuperação obtida pelo método variou de 93,67 a 102% do valor nominal. Os resultados da análise de Cd em brânquias, fígado, rim estão representados na Figura 5.6. A brânquia apresentou aumento significativo de Cd após 24 h e 96 h de exposição ao Cd 10 ( $P = 0,001$ ). O fígado dos animais expostos ao Cd por 24 h não apresentou aumento significativo do acúmulo de Cd ( $P = 0,081$ ), já os animais expostos por 96 h ao Cd 10 apresentaram aumento significativo no conteúdo de Cd em relação aos animais CTR ( $P = 0,036$ ). A exposição ao Cd 10 também promoveu aumento significativo de Cd no rim de *P. lineatus*, em relação aos grupos CTR e Cd 1, após 24 ( $P = 0,011$ ) e 96 h ( $P = 0,03$ ) de exposição. Não foi detectado Cd no tecido muscular dos animais expostos ao Cd 1 e Cd 10 por 24 e 96 h.

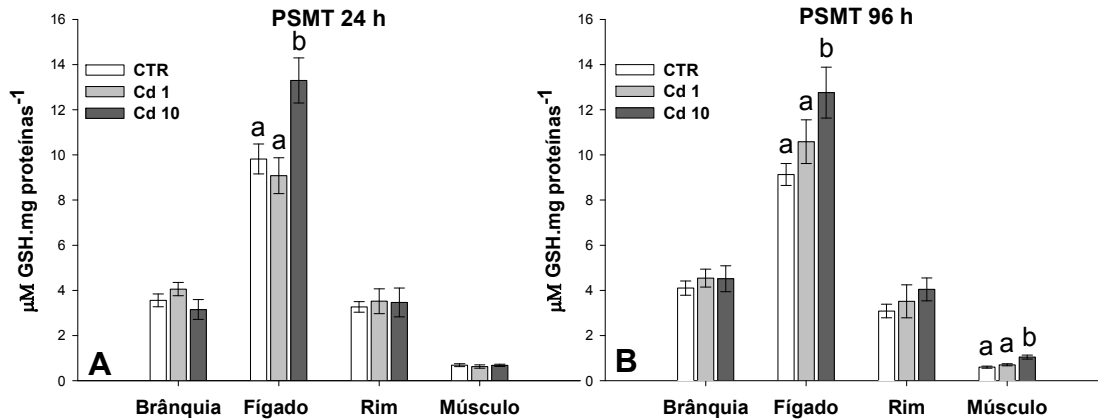
**Figura 5.7** - Concentrações de Cd (média  $\pm$  EP, n= 6 - 7) em brânquia, fígado e rim de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio.



Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10), para o mesmo órgão, no mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

O conteúdo de PSMT após a exposição aguda de curimbas ao Cd estão apresentados na Figura 5.7. Decorrido o período experimental, não foram observadas alterações significativas no conteúdo de PSMT em brânquias de *P. lineatus* em nenhum grupo avaliado ( $P_{24} = 0,266$ ;  $P_{96} = 0,669$ ). Já o conteúdo de PSMT no fígado aumentou nos animais expostos ao Cd 10, tanto por 24 ( $P = 0,004$ ) como por 96 h ( $P = 0,028$ ). O tecido renal não apresentou alterações significativas no conteúdo de PSMT após 24 h ( $P = 0,903$ ) ou 96 h ( $P = 0,348$ ) de exposição ao Cd. No músculo, a exposição por 24 h ao Cd 1 e Cd 10 também não promoveu alterações significativas nas concentrações de PSMT ( $P = 0,674$ ), mas o conteúdo de PSMT aumentou significativamente nos peixes expostos ao Cd 10, durante 96 h, em relação ao respectivo CTR ( $P < 0,001$ ).

**Figura 5.8** - Conteúdo de proteínas semelhantes à metalotioneínas (média  $\pm$  EP, n= 6 - 10) em brânquia, fígado, rim e músculo de *P. lineatus* expostos, por 24 e 96 h, apenas à água (CTR) ou às concentrações de  $1 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 1) e  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  (Cd 10) de cádmio



. Letras diferentes indicam diferença significativa entre os resultados obtidos entre os grupos (CTR X Cd1 X Cd10), para o mesmo órgão, no mesmo período experimental ( $P < 0,05$ ).

#### 5.4 DISCUSSÃO

O Cd é um metal que não tem função biológica e é muito tóxico para os animais aquáticos. Os seus efeitos são persistentes e quando se acumula nos organismos o tempo para sua excreção é muito longo (Kjellstrom e Nordberg, 1978). Alterações fisiológicas em proteínas e enzimas causadas pelos efeitos subletais de contaminantes em peixes podem ainda causar distúrbios comportamentais com grande relevância ecológica (Webb, 1979). Os resultados de trabalhos anteriores que avaliaram a exposição de peixes ao Cd reportam alterações na atividade da AChE e no comportamento natatório (Gill et al., 1991; Scott et al., 2003). O Cd dissolvido na água é absorvido pela brânquia e se acumula em órgãos-alvo induzindo a síntese de MT, o que por sua vez influencia a distribuição e toxicidade do metal (De Smet et al., 2001; Hollis et al., 2001).

A concentração de Cd total na água dos aquários utilizados nestes experimentos reduziu com o passar do tempo. Nos aquários dos grupos Cd 1, após 24 h, a concentração foi reduzida a 92% e após 96 h a concentração final foi de 70% em relação ao valores iniciais. Nos grupos Cd 10, a concentração de Cd na água sofreu redução de 10% após o experimento de 24 h e de 28% após 96 h. Como a relação entre Cd total e Cd dissolvido na água dos experimentos não variou muito entre o início dos testes e os períodos de 24 e 96 h a diferença entre os valores

iniciais e finais, em grande parte, deve representar o metal que foi absorvido pelos peixes. A concentração de Cd dissolvido nas águas dos grupos experimentais apresentaram valores de 86 a 95% daquele quantificados para o Cd total. Estes resultados estão dentro do esperado, pois por ser um metal com grande solubilidade em água, a diferença entre as amostras de água não filtradas (concentração total) e água que são filtradas em poros 0,45  $\mu\text{m}$  (concentração dissolvida) é de 5 a 10% (Stephan, 1995).

O padrão de comportamento dos peixes é uma variável importante que pode ser empregada como biomarcador de estresse associado à contaminação aquática por metais (Beitinger, 1990). Alterações na atividade locomotora servem como sinal de alerta em modelos experimentais de ecotoxicologia aquática que avaliam efeitos de poluentes em indivíduos ou populações (Fleeger et al., 2003). A sensibilidade de comportamentos das espécies de peixes de água doce aos efeitos agudos do Cd é, no entanto, muito variável (Grillitsch et al., 1999; Eissa et al., 2003).

Um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o comportamento espontâneo de *P. lineatus* frente ao estresse agudo representado pelo Cd dissolvido na água em concentrações ambientalmente relevantes. Para obter os dados foi utilizado um software ("Sacam" - Software para Avaliação do Comportamento de Animais em Movimento) que rastreia o animal por meio de imagens capturadas por uma câmera ligada a um computador pessoal e armazena as coordenadas de deslocamento ao longo do tempo, que são automaticamente transferidas para uma planilha. Este sistema foi originalmente desenvolvido para rastrear movimentos de insetos (Jorge et al., 2005) e tem sido adaptado para o monitoramento de peixes. Embora o software seja muito sensível e possa calcular simultaneamente a velocidade de deslocamento, distância percorrida, tempo de permanência em áreas pré-determinadas, tempo de movimentação e tortuosidade do movimento, a câmera acoplada ao sistema comprometeu principalmente os dados de tortuosidade. Por este motivo, os dados deste parâmetro não foram considerados.

O Cd causou hiperatividade nos animais, os indivíduos apresentaram aumento da distância percorrida e também maior velocidade de deslocamento. O tempo em que os animais estiveram em deslocamento não variou entre os diferentes tratamentos, não houve diferença entre a velocidade média em relação ao tempo total (dados não apresentados) ou em relação ao tempo de deslocamento. De acordo com o aumento da atividade locomotora dos *P. lineatus* os

resultados da AChE foram muito interessantes. A atividade da AChE cerebral foi elevada nas condições em que houve aumento na distância percorrida pelos peixes, ao mesmo tempo em que a atividade da AChE muscular mostrou-se inibida.

A ação dos organoclorados e carbamatos sobre a AChE já está bem estabelecida, entretanto, os resultados deste trabalho confirmam a ação neurotóxica do Cd em *P. lineatus* e reforçam as evidências de que metais também são potenciais inibidores da AChE (Frasco et al., 2005). A inativação da AChE nas junções neuromusculares aumenta a permanência e por consequência a quantidade do neurotransmissor nas junções sinápticas, condição que pode gerar hiperatividade, natação errática e até letargia (Pandey et al., 2005). Além da velocidade de natação e distância percorrida, os poluentes podem alterar a distribuição espacial do indivíduo na coluna d'água. A espécie *P. lineatus*, por ser detritívora, tem como hábito permanecer próximo ao sedimento nos rios e, por conseguinte nos estratos inferiores dos aquários. Este padrão de preferência dos *P. lineatus* não foi alterado pelo Cd, mas foi observado em *C. carpio* (Eissa et al., 2003).

O Cd altera a sinalização colinérgica em peixes, e desencadeia efeitos no metabolismo e comportamento (Grillitsch, et al., 1999). Os efeitos neurotóxicos da contaminação aguda por baixas concentrações de Cd são rapidamente deflagrados em peixes e podem envolver as colinesterases (Chebbi e David, 2009). As alterações comportamentais são manifestações que decorrem da integração de fatores biológicos e ambientais e são fundamentais para garantir a sobrevivência dos indivíduos ao longo de todas as fases da vida. Os resultados deste trabalho demonstram que avaliações comportamentais de espécies brasileiras devem ser mais bem compreendidas para que possa servir como indicadora de contaminação ambiental por metais.

Mesmo que caracterizadas as possíveis alterações comportamentais associadas aos efeitos neurotóxicos do Cd, os resultados deste trabalho não explicam como o Cd pode exercer seu efeito neurotóxico, pois o metal não atravessa a barreira hematoencefálica (Evans e Hastings, 1992) e tampouco acumulou no músculo de *P. lineatus*. A exposição aguda de *P. lineatus* a 5 e 9  $\mu\text{g.L}^{-1}$  Cu gerou hiperatividade proporcional à concentração, assim como aumento na velocidade média de deslocamento, porém na concentração de 20  $\mu\text{g.L}^{-1}$  os resultados caracterizaram letargia, com diminuição da velocidade e distância (Cola et al. dados

não publicados). Grillitsch et al. (1999) observaram em *Brachydanio rerio* expostos por 4 dias ao Cd, aumento transitório da atividade natatória na menor concentração avaliada e letargia na maior concentração. Como utilizaram concentrações de Cd (440 e 1320  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) maiores do as concentrações utilizada neste trabalho, mesmo sendo espécies diferentes, podemos inferir que os metais (Cd e Cu) em baixas concentrações podem causar hiperatividade, enquanto concentrações maiores comprometem a atividade locomotora e culminam com comportamento letárgico. A hiperatividade pode ser transitória e os padrões basais de natação podem ser reestabelecidos após um período de recuperação dependendo da espécie avaliada (Eissa et al., 2010).

O reestabelecimento da atividade natatória, assim como da atividade da AChE, podem ocorrer após contaminação aguda ou durante uma exposição contínua a metais. Os peixes são capazes de tolerar ambientes contaminados, pois dispõem de mecanismos defensivos capazes de reduzir a toxicidade dos metais. O Cd induz a expressão de MT, proteína que regula a função de metais essenciais como o Zn e o Cu e participa da detoxificação de metais não essenciais, como chumbo e cádmio (Roesijadi and Robinson 1994). As MT atenuam a acumulação de cádmio no cérebro e músculo de peixes, e com isso contribui para a restauração da atividade normal da AChE nestes tecidos (Chowdhury et al., 2005; Silva e Patiratne, 2008).

A absorção de metais traço em peixes ocorre pela brânquia ou através da ingestão de alimentos contaminados. Para um dado elemento a acumulação varia dependendo da via de absorção, intensidade e duração da exposição (Reinfelder et al., 1998). Peixes dulcícolas expostos ao Cd dissolvido na água acumulam o metal particularmente nos tecidos branquiais, hepático e renal (Roberts et al., 1978; Cinier et al., 1999; Hollis et al., 2000). A exposição aguda de *P. lineatus* ao Cd causou acumulação do metal na brânquia, fígado e rim, mas não no tecido muscular. O padrão de distribuição do Cd nos diferentes tecidos variou dependendo da concentração e tempo de exposição. O órgão que mais acumulou foi a brânquia ( $0,5 \mu\text{g Cd.g de tecido úmido}^{-1}$ ), seguida em ordem decrescente pelo rim ( $0,45 \mu\text{g Cd.g de tecido úmido}^{-1}$ ) e fígado ( $0,1 \mu\text{g Cd.g de tecido úmido}^{-1}$ ), estes resultados também foram constatados para outras espécies (Hollis et al., 2000; Asagba et al., 2008; Kamunde, 2009). Estes três órgãos são os principais órgão de acumulação de Cd (Cinier et al., 1999; McGeer et al., 2007; Wu et al., 2007), incluído

espécies de climas tropicais (Matsuo et al., 2005) e de temperado (Cao et al., 2012). Somente quando a capacidade de estocagem de metal atinge seu limite é que o Cd passa a se acumular em outros tecidos, como o músculo (Cinier et al., 1997).

As concentrações de Cd quantificadas em *P. lineatus* juvenis foram altas quando comparadas a outros estudos de exposição aguda ou crônica (Reynders et al., 2006; Ciardullo et al., 2008; Isani et al., 2009; Kamunde, 2009). Sabe-se que as taxas de assimilação de metal do ambiente varia entre as espécies (Luoma e Rainbow, 2005; Has-Shön et al., 2008) e estágios iniciais de vida são mais sensíveis aos efeitos tóxicos de xenobióticos (Wren et al., 1995). Segundo McGeer et al. (2007) o processo de absorção de Cd é dividido em duas etapas, a primeira inclui a tomada rápida do metal seguida de outro pool absorvido lentamente pela brânquia. A entrada rápida de Cd ocorreria devido à rápida interação do elemento com sítios de grande afinidade. A segunda etapa envolveria incorporação de longa duração com estruturas dos órgãos alvo e moléculas envolvidas no processo de detoxificação. Os grupamentos sulfidrilas são um dos sítios que apresentam grande afinidade pelo Cd e favorecem a sua acumulação inicial rápida. Outros fatores que podem ter favorecido a absorção de Cd da água pelo *P. lineatus* é a baixa dureza da água e também o status do  $\text{Ca}^{2+}$  no organismo, normalmente comprometido por este metal.

Além disso, quanto maior for a concentração de Cd na brânquia, maior será a a velocidade de passagem para o sangue, uma vez na circulação, sua entrada nos tecidos a partir do plasma sanguíneo acontece em 2 h (Chowdhury et al., 2003; McGeer et al., 2007). Ainda que os teleósteos de água doce produzam grande volume urinário, esta via de excreção, assim como ocorre em mamíferos (Nordberg e Nordberg, 1975; Järup e Åkesson, 2009), não elimina quantidades significantes de Cd absorvido (Chowdhury et al., 2005). E apesar da rápida distribuição do Cd apresentada entre órgãos, a sua eliminação necessita de um longo período tempo para ocorrer (Pretto et al., 2011), e em decorrência disto ocorrem alterações funcionais onde o metal está localizado (Vetillard e Bailhach, 2005; Asagba et al., 2008).

Os grupamentos sulfidrilas das MT tem alta afinidade e são capazes de se ligar e imobilizar metais (Van der Oost et al., 2003). As MT podem ser consideradas um biomarcador bioquímico útil para avaliação da qualidade ambiental. Entretanto o uso das MT como biomarcadores em estudos para detecção

de contaminação por metais pode ser limitado caso as concentrações dos metais não atinjam seu limiar de indução. Os metais não essenciais apresentam um baixo limiar de indução à síntese de MT, dentre os quais o Cd é um dos principais indutores (Atli e Canli, 2008).

Em *P. lineatus* o fígado foi o órgão que apresentou maiores concentrações basais de MT, de 3 a 4 vezes mais do que encontrado no seu rim e brânquia. Apesar de o tecido muscular ter a menor concentração de MT entre os órgãos estudados, e de não ter apresentado bioacumulação de Cd, foi o único tecido além do fígado que teve elevação das MT após a exposição aguda ao Cd. Considerado o principal órgão do metabolismo de detoxificação, o fígado pode receber os átomos de Cd absorvidos pelo epitélio branquial para sua subsequente excreção, ligados à MT ou a outras moléculas como as apotioneínas (Klaverkamp et al., 1984; Kay et al., 1986). Mesmo em tecidos em que todo o Cd for imobilizado pelas MT os efeitos tóxicos podem ocorrer pelo deslocamento de Zn de seus sítios de ligação com as MT (Hollis et al., 2001).

Ao que parece, a bioacumulação em rim e brânquia ocorre antes que a síntese de MT seja induzida, com grandes quantidades de Cd e sem a proteção conferida pela MT estes dois órgãos ficam sujeitos aos efeitos tóxicos do metal. O Cd livre no citosol pode interagir com biomoléculas e desencadear danos oxidativos, inibição enzimática, alterações comportamentais e até mesmo comprometer a sobrevivência do organismo. As respostas de defesa do *P. lineatus* não são efetivas para anular toxicidade aguda de baixas concentrações do Cd por serem insuficientes ou ativadas tardiamente, não protegendo o organismo dos efeitos neurotóxicos e dos distúrbios comportamentais.

## 5.5 REFERÊNCIAS

- Alves Costa, J. R. M., Mela, M., Silva de Assis, H. C., Pelletier, E., Randi, M. A. F., Oliveira Ribeiro, C. A., 2007. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. *Ecotox. Environ. Safe.*, 67, 82–88.
- Alves, L. C., Wood, C. M., 2006. The chronic effects of dietary lead in freshwater juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed elevated calcium diets. *Aquat. Toxicol.*, 78, 217-232.

- Asagba, S. O., Eriyamremu, G. E., Igberaese, M. E., 2008. Bioaccumulation of Cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish (*Clarias gariepinus*). *Fish Physiol. Biochem.*, 34, 61–69.
- Beitinger, T., 1990. Behavioral Reactions for the Assessment of Stress in Fishes. *J. Great Lakes Res.*, 16, 495-528.
- Cao, L., Huang, W., Shan, X., Ye, Z., Dou, S., 2012. Tissue-specific accumulation of cadmium and its effects on antioxidative responses in Japanese flounder juveniles. *Environ. Toxicol. Phar.*, 3, 16–25.
- Ciardullo, S., Federica, A., Coni, E., Guandalini, E., Iosi, F., Raggi, A., Rufo, G., Cubadda, F., 2008. Bioaccumulation Potential of Dietary Arsenic, Cadmium, Lead, Mercury, and Selenium in Organs and Tissues of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a Function of Fish Growth. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 2442–2451
- Cinier, C. C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., 1997. Cadmium Bioaccumulation in Carp (*Cyprinus carpio*) Tissues during long term high exposure: analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Ecotox. Environ. Safe.*, 38, 137–143.
- Cinier, C. C., Petit-Ramel, M., Faure, R., Garin, D., Bouvet, Y., 1999. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues. *Comp. Biochem. Phys. C*, 122, 345–352.
- Chebbi, S. G., David, M., 2009. Neurobehavioral responses of the freshwater teleost, *Cyprinus carpio* (Linnaeus.) under quinalphos intoxication. *Biotechnol Animal Husband*, 25, 241–249.
- Chowdhury, M. J., Baldisserotto, B., Wood, C. M., 2005. Tissue-Specific Cadmium and Metallothionein Levels in Rainbow Trout Chronically Acclimated to Waterborne or Dietary Cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 381–390.
- De Smet, H., De Wachter, B., Lobinski, R., Blust, R., 2001. Dynamics of (Cd,Zn)-metallothioneins in gills, liver and kidney of common carp *Cyprinus carpio* during cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.*, 52, 269–281.
- Eissa, B. L., Ossana, N. A., Ferrari, L., Salibián, A., 2010. Quantitative Behavioral Parameters as Toxicity Biomarkers: Fish Responses to Waterborne Cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 1032–1039.
- Eissa, B. L., Salibián, A., Ferrari, L., Porta, P., Borgnia, M., 2003. Evaluación toxicológica no invasiva del cadmio: modificaciones de biomarcadores conductuales en *Cyprinus carpio*. *Biol, Acuát*, 20, 56–62.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. Jr., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.
- Evans, J., Hastings, L., 1992. Accumulation of Cd (II) in the CNS depending on the route of administration: intraperitoneal, intratracheal, or intranasal. *Fund. Appl. Toxicol.*, 19, 275-278.

- Fleeger, J. W., Carman, K. R., Nisbet, R. M., 2003. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.*, 317, 207–233.
- Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F., Guilhermino, L., 2005. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers*, 10, 360- 375.
- Gill, T., Tewari, H., Pander, J., 1991. *In vivo* and *in vitro* effects of cadmium on selected enzymes in different organs of the fish *Barbus conchonioides* (Rosy barb) *Camp. Biochem. Phys. C*, 100, 501-505.
- Grillitsch, B., Vogl, C., Wyttek, R. 1999. Qualification of spontaneous undirected locomotor behavior of fish for sublethal toxicity testing. Part II. Variability of measurement parameters under toxicant-induced stress. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18, 2743-2750.
- Has-Schön, E., Bogut, I., Rajkovic, V., Bogut, S., Cacic, M., Horvatic, J., 2008. Heavy metal distribution in tissues of six fish species included in human diet, inhabiting freshwaters of the Nature Park “Hutovo Blato” (Bosnia and Herzegovina). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 54:75–83.
- Hollis, L., Hogstrand, C., Wood, C. M., 2001. Tissue-Specific Cadmium Accumulation, Metallothionein Induction, and Tissue Zinc and Copper Levels During Chronic Sublethal Cadmium Exposure in Juvenile Rainbow Trout. *Arch. Environ. Con. Toxicol.*, 41, 468–474.
- Hollis, L., McGeer, J. C., McDonald, D. G., Wood, C. M., 2000. Protective effects of calcium against chronic waterborne cadmium exposure to juvenile rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19, 2725-2734.
- Isani, G., Andreani, G., Cocchioni, F., Fedeli, D., Carpena, E., Falcioni, G, 2009. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure. *Ecotox. Environ. Safe.*, 72, 224–230.
- Järup, L., Åkesson, A., 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol. Applied Pharm.*, 238, 201–208
- Jorge, L. A. C., Laumann, R., Borges, M., Moraes, M. C. B., Cruz, R. A., Milare, B. N., Palhares, L., 2005. “Software para avaliação do comportamento de insetos”. *Circular Técnica 30*, 1ª edição - *Embrapa CNPDIA*, São Carlos.
- Kamunde, C., 2009. Early subcellular partitioning of cadmium in gill and liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following low-to-near-lethal waterborne cadmium exposure. *Aquat. Toxicol.*, 91, 291–301,
- Kay, J., Thomas, D. G., Brown, M. W., Cryer, A., Shurben, D., Solbe, J. F. L. G., Garvey, J. S., 1986. Cadmium Accumulation and Protein Binding Patterns in Tissues of the Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* *Environ. Health Persp.*, 65, 133-139.
- Kjellstrom, T., Nordberg, G. F., 1978. The kinetic model of cadmium metabolism in the human body. *Environ. Res.*, 16, 248-269.

- Klaverkamp, J. E., McDonald, W. A., Duncan, D. A., Wagenann, R., 1984. Metallothionein and acclimation to heavy metals in fish, a review. In: Cairns, V. W., Hodson, P. V., Nriagu, J. O. (Eds.), *Contaminant Effects on Fisheries*. Wiley, New York, pp. 99–113.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Luoma, S. N., Rainbow, P. S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.*, 39, 1921–1931
- Matsuo, A., Wood, C. M., Val, A. L., 2005. Effects of copper and cadmium on ion transport and gill metal binding in the Amazonian teleost tambaqui (*Colossoma macropomum*) in extremely soft water. *Aquat. Toxicol.*, 74, 351–364.
- McGeer, J. C., Nadella, S., Alsop, D. H., Hollis, L., Taylor, L. N., McDonald, D. G., Wood, C. M., 2007. Influence of acclimation and cross-acclimation of metals on acute Cd toxicity and Cd uptake and distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquat. Toxicol.*, 84, 190–197.
- Nordberg, M., Nordberg, G. F., 1975. Distribution of metallothionein-bound cadmium and cadmium chloride in mice - preliminary studies. *Environ. Health Perspect.*, 12, 103- 108.
- Pandey, S., Kumar, R., Sharma, S., Nagpure, N. S., Srivastava, S. K., Verma, M. S., 2005. Acute toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctata* (Bloch). *Ecotox. Environ. Safe.*, 61, 114-120.
- Pretto, A., Loro, V. L., Baldisserotto, B., Pavanato, M. A., Moraes, B. S., Menezes, C., Cattaneo, R., Clasen, B., Finamor, I. A., Dressler, V., 2011. Effects of Water Cadmium Concentrations on Bioaccumulation and Various Oxidative Stress Parameters in *Rhamdia quelen*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 60, 309–318.
- Reinfelder, J. R., Fisher, N. S., Luoma, S. N., Nichols, J. W., Wang, W., 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: a critique of the kinetic model approach. *Sci. Total Environ.*, 219, 117–135.
- Roberts, K. S., Cryer, A., Kay, J., Solbe, J. F. L. G., Wharfe, J. R., Simpson, W. R., 1978. The effects of exposure to sub-lethal concentrations of cadmium on enzyme activities and accumulation of the metal in tissues and organs of rainbow and brown trout (*Salmo gairdneri*), and (*Salmo trutta* fario L.). *Comp. Biochem. Phys. C*, 62, 135-140.
- Roesijadi, G., Robinson, W. E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: Malins, D. C., Ostrander, G. K. (eds) *Aquat. Toxicol.: molecular, biochemical and cellular perspectives*. Lewis Publishers, CRC, 387–420.
- Scott, G. R., Sloman, K. A., Rouleau, C., Wood, C. M., 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.*, 206, 1779-1790.

Silva, K. T. U., Pathiratne, A., 2008. In vitro and in vivo effects of cadmium on cholinesterases in Nile tilapia fingerlings: implications for biomonitoring aquatic pollution. *Ecotoxicology*, 17, 725–731.

Stephan, C. E., 1995, Derivation of conversion factors for the calculation of dissolved freshwater aquatic life criteria for metals: Duluth, Minn., U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Research Laboratory.

Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N. P. E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Phar.*, 13, 57–149.

Vetillard, A., Bailhache, T., 2005. Cadmium: An Endocrine Disrupter That Affects Gene Expression in the Liver and Brain of Juvenile Rainbow Trout. *Biol. Reprod.*, 72, 119-126.

Viarengo, A., Ponzano, E., Dondero, F., Fabbri, R. A., 1997. Simple Spectrophotometric Method for Metallothionein Evaluation in Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Mar. Environ. Res.*, 44, 69-84.

Wang, W.-X.; Fisher, N. S., 1999. Effects of calcium and metabolic inhibitors on trace element uptake in two marine bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 236, 149–164.

Webb, M., 1979. *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*. Elsevier/North Holland, Amsterdam.

Wren, C. D., Harris, S., Harttrup, N., 1995. Ecotoxicology of mercury and cadmium. In: Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton Jr, G. A., Cairns Jr, J., editors. *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton, Fl: Lewis Publ.; p. 392–423.

Wu, S. M., Shin, M., Ho, Y., 2007. Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis sp.*) upon cadmium exposure. *Comp. Biochem. Phys. C*, 145:218–226.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostra que o *P. lineatus* é uma espécie de peixe muito sensível aos efeitos tóxicos do Cd. As concentrações de Cd cádmio empregadas em testes de curta duração são de relevância ambiental e constituíram condições suficientes para proporcionar distúrbios de diversas etiologias e com grande potencial deletério. Esta característica do *P. lineatus*, a torna uma espécie chave nativa para os estudos de ecotoxicologia aquática, tanto em laboratório como em campo. Os efeitos sobre o curimba devem ser considerados para o estabelecimento de níveis máximos de xenobióticos permitidos nas águas-doces brasileiras que sejam seguros aos peixes.

A brânquia do *P. lineatus* foi o órgão mais afetado pela exposição ao Cd dissolvido na água. Foi marcante a inibição das ATPases e da AC presentes no tecido branquial que também foi o local em que houve maior acúmulo do metal. Provavelmente estes fatos ocorreram pelo contato direto da água com a grande área superficial do epitélio branquial sem que houvesse barreiras suficientes para evitar a absorção do Cd. Uma vez nas células da brânquia, as defesas celulares não foram capazes de neutralizar os efeitos tóxicos do Cd, houve um aumento rápido e transitório aumento do conteúdo de GSH, capaz de se ligar ao metal e retirá-lo do meio intracelular, no entanto este aumento logo desapareceu sem o conteúdo do metal fosse diminuído no órgão. O conteúdo de PSMT na brânquia também não aumentou na presença do Cd, deixando o órgão desprovido de um mecanismo de defesa capaz de evitar a interação do metal com moléculas biologicamente ativas. A ausência de mecanismos branquiais efetivos contra a toxicidade do Cd permitiu que seus efeitos fossem disseminados para outros órgãos.

A inibição da CATPase branquial causou hipocalcemia, efeito característico da contaminação por Cd. Após ser absorvido pelas brânquias, o Cd foi distribuído pelo sangue, o que causou sua acumulação no rim e fígado. Durante este processo os efeitos genotóxicos do metal foram observados nos eritrócitos, provavelmente devido à interação direta do Cd com o material genético, já que não ficou caracterizado a situação de estresse oxidativo e o elemento circulante provavelmente não estava ligado à MT.

No rim do *P. lineatus*, além do expressivo conteúdo de Cd, houve inibição da NKA e da AC. Com a inibição de diversas enzimas do principal órgão

responsável pela manutenção da homeostase, a função renal na regulação ácido-básica e manutenção da concentração osmoiolônica ganha muita importância. Embora a ação do Cd sobre a atividade das enzimas analisadas tenha sido maior na brânquia, a extensão destes efeitos sobre o rim pode anular os mecanismos compensatórios alternativos do organismo. Como agravante, os efeitos neurotóxicos do Cd sobre a AChE causou aumento da atividade natatória dos peixes o que acelera as reações metabólicas e exige maior atividade dos mecanismos homeostáticos de um sistema com seu funcionamento já comprometido.